



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Crecimiento, Sistema Inmune, Metabolismo y
Marcadores de Obesidad tras el Consumo de
Alimentos Infantiles con Diferente Composición
Nutricional en un Modelo Animal de Ratón**

D^a Elvira Pilar Sánchez Samper

2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Crecimiento, Sistema inmune, Metabolismo y Marcadores de Obesidad tras el Consumo de Alimentos Infantiles con Diferente Composición Nutricional en un Modelo Animal de Ratón

Memoria presentada por la Licenciada en Veterinaria
D^a. Elvira Pilar Sánchez Samper
para optar al grado de Doctor
en el área de Conocimiento de Nutrición y Bromatología

Dirigida por
D. Gaspar Ros Berruezo

Murcia, 2017

**Facultad de Veterinaria
Departamento de Tecnología de los Alimentos
Nutrición y Bromatología**

Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia
T. 868 88 87 67 – F. 868 88 71 67 – www.um.es/nutricion-bromatologia/

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1.1. PROGRAMACIÓN NUTRICIONAL	7
1.2. MECANISMOS POTENCIALES DE LOS EFECTOS DE PROGRAMACIÓN TEMPRANA DE LA NUTRICIÓN	10
1.2.1. Programación metabólica	11
1.3. MALNUTRICIÓN POR EXCESO: SOBREPESO Y OBESIDAD	12
1.3.1. Obesidad y enfermedades asociadas	13
1.4. PERIODO DE ALIMENTACIÓN COMPLEMENTARIA	14
1.5. ALIMENTOS INFANTILES	18
1.6. BIOMARCADORES DE LA INGESTA DIETÉTICA Y DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS	19
1.7. ÁCIDOS GRASOS Y MECANISMOS DE PROGRAMACIÓN	21
1.7.1. Efectos de los PUFAs a corto y largo plazo sobre la composición corporal	23
1.8. METABOLISMO HEPÁTICO	25
1.8.1. Función del hígado en el metabolismo de los lípidos	25
1.9. MICROBIOTA	32
1.9.1. Microbiota intestinal	32
1.9.2. Disbiosis y enfermedad	33
1.9.3. Microbiota y obesidad	34
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	37
CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS	41
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	43
3.1.1. Modelo animal	43
3.1.2. Comisión de Bioética de la Investigación	43
3.1.3. Grupos de intervención y dietas	44
3.1.4. Características técnicas de las jaulas	48
3.1.5. Recogida de datos periódicos, sacrificio y toma de muestras	49
3.2. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS	52
3.2.1. Datos morfométricos e ingestas	52
3.2.2. Parámetros bioquímicos en plasma	52
3.2.3. Análisis de ácidos grasos en tejido adiposo	53
3.2.4. Estudio de expresión génica relacionada con el metabolismo de ácidos grasos	54
3.2.5. Estudio de expresión de genes relacionados con la obesidad	57
3.2.6. Estudio de la microbiota intestinal mediante qPCR	61
3.2.7. Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)	65
3.2.8. Cytometric Bead Array (CBA)	66
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
4.1. CRECIMIENTO: curva de crecimiento, datos morfométricos y dietéticos	71
4.2 RELACIÓN ENTRE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA Y LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS	82

4.3. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN TEJIDO ADIPOSO, CORRELACIONES CON LA INGESTA Y EFECTOS METABÓLICOS	86
4.4. EXPRESIÓN GÉNICA DEL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS	95
4.5. EXPRESIÓN GÉNICA DE LA OBESIDAD	102
4.6. MICROBIOTA INTESTINAL	109
4.7. SISTEMA INMUNE: poblaciones celulares en bazo y citoquinas plasmáticas	118
4.8. CORRELACIONES ENTRE CITOQUINAS PLASMÁTICAS Y GRUPOS BACTERIANOS	123
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	125
CAPÍTULO 6. EXTENDED SUMMARY AND CONCLUSIONS	129
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA	141
CAPÍTULO 8. RESUMEN / ABSTRACT	163

Introducción

Introducción

La «programación nutricional» o «programación nutricional temprana de la salud a largo plazo» se define como el efecto de ciertos alimentos o nutrientes, en cantidades específicas, durante las primeras etapas del desarrollo, que pueden influir en el metabolismo, dando lugar a cambios permanentes cuya expresión clínica puede tener lugar varias décadas más tarde (Agostoni *et al.*, 2013).

En este sentido, el sobrepeso, la obesidad y los trastornos asociados, además de ofrecer algunas de las mejores pruebas con respecto a la programación temprana de la nutrición, se consideran problemas de salud pública cada vez más urgentes ya que, dado su aumento exponencial en la población, se considera un fenómeno o epidemia global en el siglo XXI. Este aumento de la prevalencia también se observa en las edades pediátricas. (WHO, 2016; Koletzko *et al.*, 2012).

Los niños obesos y 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 más tempranas. Derivado de ello, cada vez se investigan con más interés todos aquellos factores que puedan estar relacionados con su causa en edades más tempranas (WHO, 2016). La mayoría de los modelos experimentales establecidos en relación con la programación dietética se centran en el desarrollo fetal y la nutrición materna, o en la influencia de los componentes de la leche materna y las fórmulas infantiles durante los primeros meses de vida (Koletzko *et al.*, 2012). Sin embargo, aún hay poco conocimiento sobre los efectos de la introducción de alimentos sólidos a partir de los 6 meses de vida.

Durante el período de alimentación complementaria, los bebés experimentan estos fenómenos de "programación" porque es una ventana crítica de tiempo donde la exposición a nuevos componentes alimenticios junto con la creciente demanda de nutrientes son críticos para los cambios epigenéticos. Además, durante este período se establecen preferencias alimentarias y patrones de alimentación que también pueden influir en la salud y el estado nutricional en estadios posteriores (Grote *et al.*, 2014). Un ejemplo de esto es que el 96% de los niños españoles de 7 a 36 meses consumen proteínas por encima del doble según el estudio ALSALMA, lo cual también se asoció con un aumento del índice de masa corporal (IMC) (Dalmau *et al.*, 2015). Además, el rápido aumento de peso en la infancia aumenta el riesgo de obesidad a largo plazo (Ong *et al.*, 2006).

Además de las proteínas, las grasas, particularmente el perfil de ácidos grasos, y los hidratos de carbono cobran protagonismo en los estudios sobre programación nutricional, debido a la importancia de las enfermedades con que potencialmente podrían estar relacionados. Los estudios experimentales en animales, los estudios de cohorte históricos y prospectivos en sujetos humanos a lo largo de la vida, y las intervenciones experimentales y de prueba de hipótesis en sujetos humanos con seguimiento a largo plazo, apoyan este conocimiento.

Cabe destacar, que los alimentos infantiles producidos por la industria han sido ampliamente utilizados en algunos países europeos, donde un gran porcentaje de los progenitores a menudo ofrecen estos productos a sus hijos. Esto pone de relieve el papel central de la industria alimentaria infantil en la configuración de las dietas de los bebés y la importancia de comprender el tipo de alimentos infantiles disponibles en el mercado. El papel de la calidad de los macronutrientes, en contraposición a la cantidad, sigue siendo en gran parte desconocido y merece ser investigado. Además, la medida en que la nutrición temprana durante la infancia y la niñez puede afectar la salud metabólica del adulto durante la exposición a un ambiente obesogénico moderado sigue siendo difícil de alcanzar.

Por este motivo, en la presente Tesis doctoral, nos hemos planteado como objetivo general estudiar el efecto del consumo de alimentos infantiles del mercado español, sobre el crecimiento, el sistema inmune, el metabolismo y otros marcadores de obesidad, como la microbiota intestinal, en relación con la obesidad en la vida adulta. El conocimiento científico sobre los efectos y las vías mecanicistas de la nutrición temprana permitiría formular recomendaciones dietéticas para una nutrición infantil optimizada, que tendrán como objetivo reducir el riesgo futuro de obesidad y sus comorbilidades.

Capítulo 1. Revisión Bibliográfica

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**1.1. PROGRAMACIÓN NUTRICIONAL**

En las últimas décadas, diversos estudios han puesto a prueba la hipótesis de que, en etapas tempranas del desarrollo, ciertos alimentos o nutrientes en cantidades específicas, suministrados durante períodos sensibles concretos, pueden determinar un activo metabólico-endocrino que conduce a alteraciones clínicas que se manifiestan décadas después. Esto es lo que actualmente se conoce como «programación nutricional» o «programación nutricional temprana de la salud a largo plazo» o («*nutritional programming*» o «*early nutritional programming of long term health*») (Agostoni *et al.*, 2012).

La obesidad y los trastornos asociados, además de ofrecer algunas de las mejores pruebas con respecto a la programación temprana de la nutrición, se consideran problemas cada vez más urgentes por las siguientes razones (Koletzko *et al.*, 2012):

- ✓ La obesidad en niños y adultos ha aumentado exponencialmente y ahora es de inmensa importancia para la salud pública.
- ✓ Las extensas comorbilidades de la obesidad, como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (ECV), significan que la investigación en esta área de salud es relevante.
- ✓ La amplificación transgeneracional de la programación de la obesidad se suma a la importancia de la salud pública.

Actualmente se proponen tres hipótesis clave para explicar por qué la nutrición temprana nutre la obesidad y sus comorbilidades. Éstas no son mutuamente excluyentes y podrían tener un impacto mayor o menor en diferentes circunstancias:

- Hipótesis *in utero* o «*fuel-mediated in utero hypothesis*».
- Hipótesis de ganancia de peso acelerada postnatal o «*accelerated postnatal growth hypothesis*».
- Hipótesis de desajuste o «*mismatch hypothesis*».

La hipótesis *in utero* propone que la obesidad materna y/o el aumento excesivo del peso durante el embarazo aumentan el riesgo de obesidad en el niño. Un ambiente uterino obesigénico es de gran importancia en la modulación del riesgo a largo plazo de la adiposidad y

los trastornos relacionados. La hipótesis acelerada de crecimiento postnatal propone que el rápido aumento de peso en la infancia se asocia con un mayor riesgo de obesidad posterior y otros resultados adversos, como el riesgo de ECV. El aumento acelerado del peso postnatal puede ser el resultado de un alto consumo de nutrientes que mejoran el crecimiento, como las proteínas en la dieta infantil. La hipótesis de desajuste sugiere que los sujetos que experimentan «desajuste» en el desarrollo entre un ambiente subóptimo prenatal y/o infantil y un posterior ambiente infantil obesogénico tienen una predisposición particular a la obesidad y las comorbilidades asociadas, es decir, los sujetos nacidos con bajo peso y/o con un crecimiento pobre durante la infancia, tienen un mayor riesgo de enfermedad coronaria, sobre todo si su deterioro del crecimiento temprano es seguido por un aumento en el peso durante la infancia (Koletzko *et al.*, 2012).

Las vías de nutrición tempranas para la programación de la obesidad probablemente sean multifactoriales. La **Figura 1.1** ilustra cómo estas hipótesis podrían contribuir a la programación del desarrollo del riesgo de enfermedades no transmisibles.

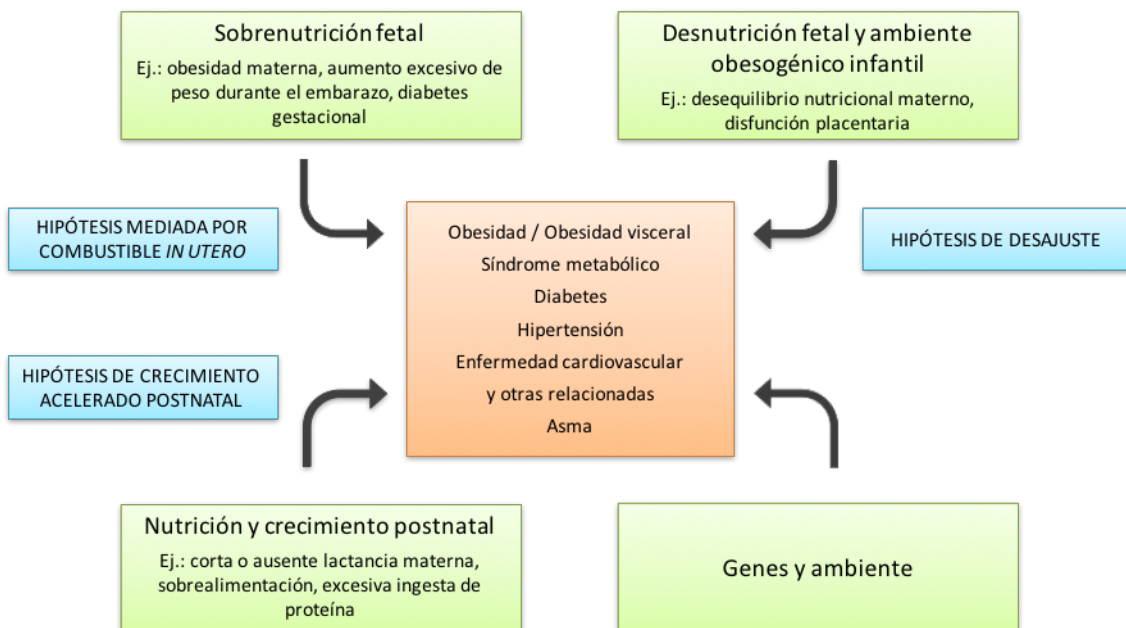


Figura 1.1. Integración de hipótesis para la programación de la obesidad y trastornos relacionados. Adaptado de Koletzko *et al.*, 2012.

El efecto de «programación» se atribuye principalmente a una ventana crítica de sensibilidad y debe distinguirse de los procesos de «impresión» («*imprinting*»), que actúan en los niveles genómicos. Sin embargo, ambos pueden mediar la expresión génica a través de mecanismos epigenéticos. Actualmente se reconocen tres etapas o ventanas críticas de tiempo principales (Agostoni *et al.*, 2012):

- ⇒ La fase intrauterina de crecimiento, correspondiente a las primeras semanas de vida extrauterina en los nacidos prematuros.
- ⇒ Los primeros 4 a 6 meses de vida, que representan el período de alimentación con leche, ya sea con lactancia materna o fórmula infantil.
- ⇒ El período de alimentación complementaria, en el que los alimentos sólidos se introducen progresivamente y se extienden hasta el final del segundo año de vida.

1.2. MECANISMOS POTENCIALES DE LOS EFECTOS DE PROGRAMACIÓN TEMPRANA DE LA NUTRICIÓN

Los mecanismos precisos que subyacen a la forma en que la nutrición temprana puede causar la programación de la obesidad son desconocidos, pero se cree que están asociados con un desarrollo alterado de la estructura del órgano o una alteración persistente a nivel celular. Algunos mecanismos propuestos (Waterland & Garza, 1999) incluyen:

- Memoria epigenética: modificación transcripcional mediante, por ejemplo, metilación del ADN, acetilación o metilación de histonas, y expresión alterada de microARN.
- Inducción de la alteración de la estructura de órgano (vascularización, inervación y yuxtaposición). Por ejemplo, la alteración de la arquitectura hepática durante la organogénesis que puede modificar permanentemente el metabolismo.
- Reducción del número de nefronas que pueden influir en el riesgo de hipertensión.
- Alteración del número de células: hiperplasia e hipertrofia.
- Clonal: crecimiento desproporcionado de células que proliferan rápidamente en condiciones metabólicas específicas.
- Diferenciación metabólica: por ejemplo, cambios hepatocelulares asociados con actividad metabólica mejorada.

Los mecanismos moleculares propuestos incluyen la expresión aguda o persistentemente alterada de los genes a través de una variedad de vías epigenéticas. Durante el desarrollo *in utero* o postnatal temprano, los cambios a corto plazo a través de las influencias ambientales podrían cambiar permanentemente el desarrollo del órgano en un momento de extrema vulnerabilidad o "plasticidad". Por ejemplo, estudios experimentales y observaciones en humanos han demostrado que una reducción en el suministro de nutrientes y oxígeno afecta diferencialmente al crecimiento y desarrollo de órganos y tejidos. Los órganos afectados incluyen los pulmones, el riñón, el intestino y el hígado. Además, los estudios clínicos y experimentales proporcionan evidencia de cambios en el desarrollo de los puntos de referencia homeostáticos para muchas hormonas y para alteraciones en la sensibilidad de los tejidos a estas hormonas. Las alteraciones del eje fetal hipotálamo-hipófisis-adrenal, los mecanismos centrales que controlan el equilibrio energético y las respuestas simpato-suprarrenales son probablemente un importante mecanismo por el cual las exposiciones del desarrollo afectan las respuestas subsiguientes de la descendencia. Mientras que conceptualmente, la modificación epigenética proporciona un marco para entender cómo las diferencias en el medio ambiente

temprano pueden conducir a cambios permanentes en el metabolismo y, por tanto, riesgos a largo plazo para la salud. Mucho trabajo todavía está por hacer para desentrañar las modificaciones post epigenéticas específicas implicadas en diferentes procesos de la enfermedad (Koletzko *et al.*, 2012).

1.2.1. Programación metabólica

Los estudios en modelos animales han mostrado que dietas obesogénicas durante la gestación y/o la lactancia, además de incrementar el riesgo de obesidad del recién nacido, causan alteraciones en su metabolismo afectando a distintos órganos y tejidos. Entre dichas alteraciones metabólicas se encuentran las siguientes (Rivero Uguell *et al.*, 2015):

- ⇒ Aparición de resistencia a la insulina a nivel muscular.
- ⇒ Reorganización de las vías neuronales con alteración de la regulación del apetito, incremento de las concentraciones de insulina y leptina en los recién nacidos.
- ⇒ Alteraciones a nivel de los adipocitos, que provocan una capacidad aumentada para almacenar lípidos durante la vida posnatal.
- ⇒ Una disminución de la función pancreática que produce una reducción de la homeostasis de la glucosa/insulina asociada a la edad.

1.3. MALNUTRICIÓN POR EXCESO: SOBREPESO Y OBESIDAD

La obesidad es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo desarrollado, considerándose una de las epidemias del siglo XXI, con un gran impacto sobre la calidad de vida y los costes sanitarios. Es la enfermedad metabólica más prevalente de los países desarrollados y constituye una de las causas fundamentales del incremento de la morbimortalidad. En las últimas décadas, se ha producido una transición nutricional hacia una alimentación opulenta debido al aumento del poder adquisitivo, el desarrollo de la tecnología alimentaria y del estilo de vida diaria. Asociado a ello, se suma el aumento del sedentarismo, con la consiguiente disminución del gasto energético. Esta situación favorece la aparición y desarrollo de otras enfermedades como diabetes tipo 2, síndrome metabólico o enfermedades cardiovasculares, que se suman a la obesidad, en la edad pediátrica. El aumento de la prevalencia indica que los factores ambientales influyen sustancialmente en el aumento de la obesidad infanto-juvenil en las últimas décadas. Todo ello convierte a los niños en el principal grupo de riesgo, en el que se deben implementar las estrategias de prevención e intervención para evitar enfermedades, de inicio precoz, en la edad adulta (Rivero Urguell *et al.*, 2015).

Diferentes estudios ponen de manifiesto que la dieta de los niños es inadecuada y de baja calidad y que está estrechamente relacionada con la obesidad. Esto se debe, principalmente, a la falta de supervisión y control familiar de los cambios alimentarios que se producen en la infancia y, también, a la falta de tiempo para compartir el momento de las comidas o realizar actividad física en común que permita un mejor desarrollo y estado corporal del niño (MSSI, 2011). Entre las debilidades más destacadas de la alimentación en los niños se encuentran las siguientes (Lama *et al.*, 2006):

- Excesiva ingesta de calorías totales.
- Excesiva ingesta de calorías procedente de las grasas saturadas, *trans* y ω -6.
- Aporte deficiente de ω -3, con un índice ω -6/ ω -3 elevado.
- Excesivo aporte de proteínas de origen animal, carnes grasas y embutidos.
- Deficiente aporte de calorías procedentes de carbohidratos complejos.
- Excesiva ingesta de sal y azúcares simples.

1.3.1. Obesidad y enfermedades asociadas

La obesidad es la expresión de la interacción entre los genes y el ambiente. De hecho, el 95% de los pacientes tienen una obesidad exogénica, multifactorial y poligénica, y solo un 5% son monogénicas. Además, hay más de 300 genes implicados en el desarrollo de la obesidad (Rivero Uguell *et al.*, 2015).

Existen periodos cronobiológicos que son críticos para el desarrollo del tejido graso, como el embarazo, el primer año de vida, el momento del rebote adiposo y la adolescencia. En ellos se establecen cambios en la composición corporal, en la estructura y función de órganos y aparatos, en la regulación metabólica y hormonal y en la expresión génica, con consecuencias no solo a corto, sino también a medio y largo plazo. Así, al nacer la grasa representa el 12-15 % del total corporal, aumentado durante el primer año de vida hasta el 21-23% (Rivero Uguell *et al.*, 2015).

El índice de masa corporal (IMC) o índice de Quelet es una medida universalmente aceptada para el diagnóstico de la obesidad, aunque la localización de la grasa es tanto o más importante que la cantidad total ya que esto condiciona el tipo de grasa, su funcionalidad y el riesgo metabólico que supone. De hecho, un individuo obeso puede ser «metabólicamente saludable» y uno delgado «metabólicamente obeso», en función de la cantidad de grasa visceral, que es un factor independiente de riesgo de comorbilidades (Rivero Uguell *et al.*, 2015).

1.4. PERIODO DE ALIMENTACIÓN COMPLEMENTARIA

La introducción de la alimentación complementaria en el lactante supone un proceso de gran importancia, ya que esta práctica podría influir en los resultados posteriores de la salud mediante una serie de mecanismos que incluyen efectos de programación en un amplio sentido. Dichos efectos de programación se dan tanto para el crecimiento y desarrollo del niño como para el establecimiento de sus preferencias alimentarias, adquisición de autonomía, interacción con la familia e incorporación a las tradiciones del entorno sociocultural (Koletzko, 2016). Se describen tres aspectos fundamentales a tener en cuenta en la alimentación complementaria: el momento o *timing*, el orden y modo, y el contenido y calidad nutricional (EFSA, 2009; Agostoni *et al.*, 2008; Alvisi *et al.*, 2015).

El **momento de introducción o *timing*** de la alimentación complementaria se recomienda entre los 4 y los 6 meses según la institución que se pronuncie. La lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses suele ser adecuada para la mayoría de los lactantes, aunque en algunos casos puede ser necesario comenzar con la introducción de nuevos alimentos antes de los 6 meses, y siempre después de los 4 meses, para asegurar un crecimiento y desarrollo óptimos (EFSA, 2009; Agostoni *et al.*, 2008; Alvisi *et al.*, 2015).

Además de la edad, el **orden** de introducción de los alimentos complementarios ha evolucionado desde esquemas estrictos con calendarios de introducción para cada grupo de alimentos, a la flexibilidad actual donde el retraso en la introducción de ciertos alimentos no parece tener relación con la prevención de alergias. También el **modo** de administración de los alimentos complementarios está evolucionando desde los tradicionales purés y papillas con cuchara a las nuevas tendencias de destete dirigido por el bebé o *babyledweaning*. El comportamiento de los padres, «dar ejemplo», también puede influir en las prácticas de alimentación infantil y en el crecimiento. Asimismo, la exposición a una dieta altamente variada, incluyendo verduras de sabor amargo, se asocia con patrones dietéticos más óptimos en etapas posteriores de la infancia (Alvisi *et al.*, 2015; Koletzko, 2016; Rivero Urguell *et al.*, 2015)

Con respecto al **contenido y calidad** nutricional, las principales recomendaciones nutricionales a tener en cuenta para la prevención de obesidad y otras patologías son (Rivero Urguell *et al.*, 2015):

- Una ingesta excesiva de energía (>75-80 kcal/kg/día) es un factor directamente relacionado con el sobrepeso.

- Una ingesta excesiva de proteínas (>15% Valor Calórico Total) parece correlacionarse con un mayor riesgo de sobrepeso y obesidad en etapas posteriores.
- La alimentación complementaria debe aportar >90% de los requerimientos de hierro en los lactantes de pecho.
- La introducción de LC-PUFAs del pescado podría tener un efecto positivo sobre el neurodesarrollo, la agudeza visual y, posteriormente, sobre la tensión arterial.

Para evaluar los efectos de los hábitos nutricionales tempranamente diversificados sobre el riesgo posterior de trastornos no transmisibles es útil separar las tres principales familias de macronutrientes, es decir, proteínas, grasas e hidratos de carbono.

- **Proteína**

La proteína es el macronutriente que aumenta más rápidamente su fracción del contenido calórico total durante el periodo de alimentación complementaria. De hecho, el contenido promedio aproximado de proteínas de la leche humana es de 1.2 g/100 kcal, lo que supone el 5% del contenido energético total. Dentro de esta cantidad se calculan también algunas clases de proteínas funcionales (IgA y lactoferrina) que no se utilizan con fines nutricionales puros (Agostoni *et al.*, 2012). Durante la etapa de alimentación complementaria la ingesta de proteínas puede llegar a ser de dos a tres veces más alta que las necesidades fisiológicas en un gran número de niños. Un ejemplo de esto es que el 96% de los niños españoles de 7 a 36 meses consumen proteínas por encima del doble según el estudio ALSALMA, lo cual también se asoció con un aumento del índice de masa corporal (IMC) (Dalmau *et al.*, 2015). Esta relación causa-efecto de la proteína ha sido estudiada en las fórmulas infantiles frente a la leche materna, donde un mayor consumo de proteínas lácteas durante el primer año de vida ha dado lugar a un mayor IMC a los dos años de edad, aumentando el riesgo de obesidad futura. Se cree que la ingesta proteica estimula la secreción del factor de crecimiento 1 semejante a la insulina (IFG-1), que lleva a la proliferación celular, acelera el crecimiento y aumenta el tejido adiposo (Mennella *et al.*, 2011; Agostoni *et al.*, 2012)

- **Grasas**

Las grasas representan la principal fuente de energía de la leche humana, suministrando más del 50% de calorías durante los primeros meses. Su absorción como triglicéridos es favorecida por la alta prevalencia de ácido palmítico en la posición 2. Entre otros compuestos bioactivos calóricos, la leche humana es una fuente natural de LC-PUFAs, particularmente el

ácido docosahexaenoico (DHA, C22: 6n-3), proporcionando alrededor de 7 mg/dl de DHA que se depositan preferentemente en el prosencéfalo, ofreciendo así una explicación plausible de las ventajas sobre el neurodesarrollo observadas en los lactantes amamantados. La leche humana es también una fuente de colesterol, de modo que los niveles de colesterol en sangre suelen ser más altos en los bebés alimentados con leche materna. Los datos disponibles muestran una capacidad peculiar de estos lactantes para regular la síntesis de colesterol endógeno en los primeros meses de vida. Además, más adelante en la vida, estos bebés muestran niveles progresivamente más bajos de colesterol total y LDL-colesterol (Agostoni *et al.*, 2012).

En comparación con la lactancia materna exclusiva, la introducción de alimentos complementarios conduce a una reducción de las grasas de la dieta, que caen del 50 al 30% aproximadamente del total de calorías. Por otro lado, a pesar del alto suministro dietético inicial, la oxidación de la grasa se suprime significativamente y aumenta muy gradualmente después del nacimiento. Con la introducción de alimentos complementarios, la caída en la ingesta de grasa se asocia con una decadencia de la oxidación de las grasas. La dinámica de la ingesta de grasas y la oxidación en las primeras edades sugieren una reorientación preferencial de las grasas dietéticas hacia el almacenamiento y, posiblemente, hacia el soporte del crecimiento. Por otro lado, no hay evidencia convincente de asociación alguna entre la ingesta de grasa durante el 6º al 24º mes después del nacimiento y los índices posteriores de adiposidad. La calidad de grasa de la dieta entera puede afectar a las lipoproteínas de la sangre a corto plazo durante los primeros 12 meses de vida. A largo plazo, la calidad y la cantidad de lípidos dietéticos también tienen un efecto sobre los niveles de colesterol sérico, la resistencia a la insulina y la función endotelial (Agostoni *et al.*, 2012).

- **Fibra e hidratos de carbono**

Los estudios sobre los efectos de una ingesta temprana de fibra y la salud posterior son escasos, ya que casi todos los esfuerzos en investigación han sido dedicados a los efectos de la composición de la leche, las proteínas y las grasas (Agostoni *et al.*, 2012).

Los hidratos de carbono constituyen un grupo grande y heterogéneo que se compone desde azúcares simples hasta carbohidratos de absorción lenta y fibra no digerible. Las tasas de absorción de hidratos de carbono son el factor regulador clave de la respuesta insulinémica, que afectan directamente a las principales vías metabólicas. La cantidad y el tipo de carbohidratos no digeribles y fibra despiertan actualmente interés en investigación, ya que éstos son los principales determinantes de la biodiversidad de la flora intestinal. La leche humana incluye un

porcentaje relevante (10-25%) de hidratos de carbono no digeribles, mientras que la parte restante está representada por lactosa. Esta combinación se ha asociado con el desarrollo de una flora que en general se cree que ejerce efectos positivos a corto plazo sobre el sistema inmunológico. Con la introducción de la alimentación complementaria virtualmente todos los tipos de hidratos de carbono pueden ser introducidos en la dieta infantil, principalmente a través de frutas y verduras. Una ingesta de fibra superior a la media no desplaza la energía ni perturba el crecimiento en los niños, además otorga una menor la concentración sérica de colesterol total a largo plazo. La adición extra de azúcares se desaconseja por completo en la alimentación complementaria (Agostoni *et al.*, 2012).

En resumen, la mayor dificultad para establecer la asociación de un determinado macronutriente con las enfermedades de la edad adulta, está representada por la capacidad de separar los efectos inmediatos de dicho nutriente de los efectos de los otros nutrientes, y luego relacionarlos con resultados clínicos posteriores (síntomas y signos propios de los trastornos no transmisibles) (Agostoni *et al.*, 2012).

En este contexto, con recientes publicaciones que cuestionan las recomendaciones actuales, se analiza la alimentación complementaria en sus aspectos generales, nutricionales y en relación con el riesgo de desarrollo de enfermedades (Rivero Urguell *et al.*, 2015). Existe una falta de información adecuada sobre el período crítico de 6 a 24 meses y hay poca información e investigación sobre el consumo de ciertos alimentos infantiles para alimentación complementaria y su rol protector o de riesgo en el desarrollo de enfermedades no transmisibles en niños entre 1 y 3 años (Branca *et al.*, 2012). Esta información es aún más escasa en relación con el consumo de alimentos infantiles comercializados, fabricados de acuerdo con las recomendaciones de la Unión Europea (Reglamento 609/2013).

1.5. ALIMENTOS INFANTILES

Los alimentos infantiles producidos por la industria han sido ampliamente utilizados en algunos países europeos, donde un gran porcentaje de las madres a menudo ofrecen estos productos a sus hijos (Kersting *et al.*, 1998; McAndrew *et al.*, 2012). Esto pone de relieve el papel central de la industria alimentaria infantil en la configuración de las dietas de los bebés y la importancia de comprender el tipo de alimentos infantiles disponibles en el mercado (García *et al.*, 2013).

En la actualidad los alimentos infantiles se encuentran regulados bajo el Reglamento (UE) nº 609/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de junio de 2013, relativo a los alimentos destinados a los lactantes y niños de corta edad, los alimentos para usos médicos especiales y los sustitutivos de la dieta completa para el control de peso y por el que se derogan la Directiva 92/52/CEE del Consejo, las Directivas 96/8/CE, 1999/21/CE, 2006/125/CE y 2006/141/CE de la Comisión, la Directiva 2009/39/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y los Reglamentos (CE) nº 41/2009 y (CE) nº 953/2009 de la Comisión.

En este reglamento se define «lactante» como niño menor de 12 meses y «niño de corta edad» como niño de entre 1 y 3 años de edad. También define los «alimentos infantiles» como alimentos destinados a satisfacer las necesidades particulares de los lactantes sanos durante el destete y de los niños de corta edad sanos como complemento a su dieta o para su progresiva adaptación a una alimentación corriente, con excepción de los alimentos elaborados a base de cereales, y las bebidas a base de leche y los productos similares destinados a niños de corta edad.

Establece los requisitos generales de composición e información para los alimentos infantiles. La composición de los alimentos infantiles será apta para las personas a las que van destinadas y adecuada para satisfacer sus necesidades nutricionales, con arreglo a datos científicos generalmente aceptados. Además, los alimentos infantiles no contendrán ninguna sustancia en una cantidad tal que ponga en peligro la salud de las personas a las que van destinados. El etiquetado, la presentación y la publicidad de los alimentos infantiles ofrecerán información para el uso adecuado del alimento, no serán engañosos y no deberán atribuir a dichos alimentos propiedades de prevención, de tratamiento o curación de una enfermedad humana ni hacer referencia a tales propiedades (Reglamento (UE) nº 609/2013).

1.6. BIOMARCADORES DE LA INGESTA DIETÉTICA Y DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Junto con los indicadores clínicos, dietéticos y morfométricos, los marcadores biológicos o biomarcadores son uno de los instrumentos utilizados para evaluar el estado nutricional. Los biomarcadores tienen una doble utilidad ya que, por un lado, sirven como indicadores del estado nutricional y pronostican la enfermedad, y, por otro lado, sirven como indicadores de ingesta dietética. Su principal ventaja reside en el hecho de que realizan mediciones objetivas y exactas de la ingesta dietética. (Hunter, 1998; Gibson, 1990).

El objetivo final de utilizar un biomarcador es obtener mediciones cuantitativas, es decir, proporcionar información de manera precisa de la cantidad de nutriente disponible, después de su absorción y metabolismo, que puede ser utilizado por los tejidos para su acción específica. También se utilizan para validar cuestionarios dietéticos (Potischam, 2003).

La interpretación de los biomarcadores resulta difícil ya que reflejan factores endógenos y exógenos, y su utilidad puede diferir entre las distintas poblaciones. Además, la toma, procesado y conservación de las muestras biológicas, así como la propia validez y variabilidad del método de análisis utilizado, pueden no estar exentos de inconvenientes. Los mejores biomarcadores son fácilmente abordables, sensibles a pequeñas diferencias en la ingesta alimentaria e integran el tiempo con la ingesta real a lo largo del período de intervención (a largo o a corto plazo) (Willett, 1998).

El efecto de las grasas dietéticas en la salud y la enfermedad ha sido tema de interés durante muchas décadas. Hasta la actualidad, ningún biomarcador ha podido reflejar con precisión la ingesta absoluta de grasa, en gran parte, debido a la síntesis endógena de ácidos grasos y al complejo metabolismo de éstos; es decir, aún no se ha podido determinar cuánto es producción endógena y cuánto proviene de la dieta. Sin embargo, existen biomarcadores para determinar ácidos grasos (Gil-Hernández & Serra-Majem, 2012).

Las grasas y, concretamente, los PUFAs ω -3 son unos de los biomarcadores de mayor interés en salud pública puesto que son los que más contribuyen al estudio de la relación entre dieta y enfermedades crónicas en los países desarrollados. El interés por el estudio de estos biomarcadores de ingesta dietética es bastante reciente, sin embargo, las perspectivas son muy prometedoras. Por ejemplo, varios estudios han utilizado el EPA y el DHA como biomarcadores para validar el EPA y el DHA ingeridos. La razón es que, aunque el ser humano y los modelos

murinos son capaces de sintetizar de forma endógena EPA y DHA a partir de su precursor, el ácido alfa-linolénico, dicha conversión es poco eficiente (Plourde & Cunnane, 2007). Los efectos beneficiosos atribuidos al consumo de PUFAs ω -3, particularmente al EPA y DHA, son ampliamente conocidos (Sullivan *et al.*, 2006, Gil-Hernández & Serra-Majem, 2012).

Los tejidos orgánicos que mejor reflejan la ingesta a largo plazo de un nutriente son los tejidos de almacén (médula ósea, hígado y tejido adiposo). El tejido adiposo, de cualquier localización, es el terreno preferido para la identificación y medición de ácidos grasos como reflejo de ingesta dietética y almacenamiento de grasa a largo plazo. La vida media de los ácidos grasos en el tejido adiposo puede variar, pero en general se acepta que refleja la ingesta de grasa durante los últimos 2 ó 3 años (Garry & Koehler, 1990). Puede haber diferencias entre las concentraciones de ácidos grasos en las diferentes localizaciones de tejido adiposo (Malcom *et al.*, 1989). Así, en el estudio de Phinney *et al.* (1994), se encontraron niveles más altos de ácidos grasos saturados (SFAs) en la grasa abdominal que en la grasa del muslo, mientras que los niveles de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) más altos se encontraron en la cara externa del muslo, y los niveles más bajos en el abdomen.

Otras opciones para obtener biomarcadores, que proporcionan información a corto y medio plazo, son: ácidos grasos libres en suero o plasma, componentes de membranas de los eritrocitos, ésteres de colesterol y ácidos grasos de fosfolípidos, componentes de triglicéridos circulantes o diversas subfracciones de lipoproteínas (Gil-Hernández & Serra-Majem, 2012).

Existen factores no dietéticos que condicionan la concentración de nutrientes en los tejidos y, por lo tanto, pueden influir en la medición de un biomarcador. Algunos de estos factores son la edad y estado fisiológico (embarazo), el estado nutricional (niveles de minerales) y la enfermedad (cáncer, fibrosis quística) (Gil-Hernández & Serra-Majem, 2012).

Para evaluar la fiabilidad de los biomarcadores, es necesario revisar los datos de biomarcadores a partir de estudios que informen de los cambios en el nivel de ácidos grasos. Serra Majem *et al.* (2012) utilizaron como método de referencia el tejido adiposo y algunas fracciones sanguíneas, en su revisión sistemática sobre biomarcadores. Además, expresaron la necesidad de conocer la validez y la capacidad de reproducción de las estimaciones de ingesta dietética de ácidos grasos a partir de diferentes cuestionarios. De acuerdo con esta revisión, el registro dietético con pesada de alimentos podría ser el mejor de los métodos de evaluación utilizados para conocer la ingesta dietética de ácidos grasos (Serra Majem *et al.*, 2012).

1.7. ÁCIDOS GRASOS Y MECANISMOS DE PROGRAMACIÓN

Entre los nutrientes estudiados capaces de articular el efecto de «programación», los LC-PUFAs se encuentran entre los más populares debido a la importancia de las enfermedades con que potencialmente podrían estar relacionados. Algunos estudios, se han preocupado por revisar los efectos del consumo LC-PUFAs durante la lactancia y el período postnatal sobre la composición corporal del recién nacido a corto, medio y largo plazo (Rodríguez *et al.*, 2012). La conclusión a la que se llegó con esta revisión sistemática fue que se necesitan más estudios para entender mejor cuál es la relación real entre los LC-PUFAs y la programación de la composición corporal a medio y largo plazo. Por esta razón, este tema despierta cada vez mayor interés.

Los patrones de ingesta de ácidos grasos, en los países desarrollados, han cambiado en las últimas décadas, aumentando la ingesta de PUFAs ω -6 en detrimento de la de ω -3 (Ailhaud *et al.*, 2008). La composición, cuantitativa y cualitativa, en ácidos grasos de la dieta puede contribuir al desarrollo de la obesidad. Con anterioridad, muchos ensayos se han llevado a cabo para contrastar los efectos de la suplementación con PUFAs durante el período perinatal en el desarrollo cognitivo o en la agudeza visual del niño, como monitorización de un buen estado de salud, y su influencia en el crecimiento (Simmer *et al.*, 2008). A pesar de ello, existe muy poca información sobre la suplementación con LC-PUFAs y sus efectos en la composición corporal del niño y en la programación a largo plazo de la grasa corporal.

La disponibilidad temprana de LC-PUFAs podría influir en el desarrollo de tejido adiposo durante la edad fetal y la infancia. En estudios con seres humanos y animales se ha encontrado que los eicosanoides derivados del ARA y otros LC-PUFAs ω -6 poseen un efecto adipogénico. Esto ocurre porque, al actuar como ligandos o precursores de ligandos de PPAR γ , favorecen la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos maduros durante las etapas tempranas de crecimiento hiperplásico del tejido adiposo. En cambio, aquellos eicosanoides derivados del EPA y del DHA tienen un efecto opuesto en la adipogénesis, ya que ambos inhiben la diferenciación celular y el desarrollo del tejido graso, es decir, tienen efecto antiadipogénico (Amri *et al.*, 1994; Gil-Hernández & Serra-Majem, 2012). Por este motivo, el cociente entre los LC-PUFAs ω -6 y los ω -3 en la dieta puede desempeñar un papel importante en el desarrollo del tejido adiposo en edades tempranas (Ailhaud & Guestnet, 2004).

Los PUFAs actúan con diferente efectividad *in vivo* e *in vitro*. Los PUFAs son menos efectivos en incrementar el número de adipocitos *in vivo*, pero son mucho más efectivos en estimular la diferenciación de preadipocitos en adipocitos maduros que los SFAs *in vitro*

(Massiera *et al.*, 2003; Gaillard *et al.*, 1989; Diascro *et al.*, 1998). Este efecto está mediado por la capacidad de los PUFAs de actuar como ligandos o precursores de ligandos de PPAR γ . Existen varias vías redundantes sobre el papel de los ácidos grasos en la promoción de la adipogénesis:

Por un lado, los eicosanoides derivados de los PUFAs ω -6 tienen un efecto altamente específico en la diferenciación del preadipocito. En este sentido, la prostaciclina (PGI₂), que es un derivado del ARA, estimula la adipogénesis a través de su unión al receptor IP de membrana de los preadipocitos (IP-R), lo cual activa la adenilato ciclasa. El aumento de AMPc intracelular subsiguiente induce rápidamente a los factores de expresión C/EBP β y C/EBP δ (CCAAT/enhancer-binding protein β y δ), que a su vez expresan a PPAR γ , cuya expresión promueve la diferenciación terminal o adipogénesis. Por otro lado, la PGI₂ puede estimular la diferenciación de los adipocitos gracias a su habilidad de actuar directamente como ligando de PPAR γ . El angiotensinógeno secretado por los propios adipocitos, es un precursor de la angiotensina, que además de su papel como vasoconstrictor, también promueve el proceso adipogénico mediante la estimulación de la secreción de PGI₂ de los adipocitos. Por último, el factor inhibidor de la leucemia (LIF) se une a su receptor (LIF-R) y activa la vía ERK (extracellular signal-regulated kinase), para regular, también de forma positiva, la expresión de C/EBP β y C/EBP δ (Ailhaud *et al.*, 2008).

El ARA puede ser proporcionado por la dieta o indirectamente a través del metabolismo del ácido linoleico, así como liberado de los glicerofosfolípidos de membrana a través de la actividad fosfolipasa A2 (PLA2) (Ailhaud *et al.*, 2008).

El factor de transcripción C/EBP β es capaz de inducir la expresión de C/EBP α , incluso en ausencia de PPAR γ (Kubota *et al.*, 1999a), aunque este hecho es controvertido (Rosen *et al.*, 1999). Los factores PPAR γ y C/EBP α a su vez inducirían la expresión de sí mismos, así como uno de los otros. La expresión forzada de PPAR γ (en presencia de sus ligandos) y de C/EBP α estimula la adipogénesis aún en ausencia de agentes inductores exógenos. Aunque PPAR γ es suficiente para inducir la expresión de la mayoría de los genes adipocitarios, C/EBP α es necesario para conferir al adipocito la sensibilidad a la insulina (Wu *et al.*, 1999).

La PGI₂ también se puede unir directamente a PPAR β y PPAR δ . Otros ácidos grasos no esterificados (NEFA) también actúan como activadores/ligandos de PPAR β , PPAR δ y PPAR γ . Después de la diferenciación terminal del preadipocito, el LIF ya no se produce, y la producción de PGI₂ y otras prostaglandinas cesa y se acompaña de una reducción de la expresión y pérdida de la IP funcional. Además de los metabolitos de ARA sintetizados a través de ciclooxigenasas

(COX) en etapas tempranas, los metabolitos ARA sintetizados a través de lipoxigenasas (LOX) como ligandos de PPAR γ también están implicados en estadíos celulares posteriores (Ailhaud *et al.*, 2008).

Varios mecanismos podrían explicar el papel inhibitor de la adipogénesis de los PUFAs ω -3 en el desarrollo del tejido adiposo. El EPA y el DHA proporcionados por la dieta o que surgen del metabolismo del ácido alpha-linolénico inhiben la adenilato ciclasa y las actividades ciclooxigenasas (COX) y lipooxigenasas (LOX), bloqueando la transcripción mediada por NF-kB a través de múltiples vías de señalización, alterando la adipogénesis en última instancia (Ailhaud *et al.*, 2008; Massiera *et al.*, 2003).

La formación de adipocitos es un evento crítico, ya que los adipocitos maduros no se dividen *in vivo* y no experimentan una rotación significativa en condiciones fisiológicas. La capacidad de proliferación de células precursoras y su diferenciación en adipocitos es mayor a edades tempranas y disminuye posteriormente en seres humanos y roedores. Por lo tanto, las grandes cantidades de ácido linoleico consumidos desde muy pronto durante el embarazo, la lactancia y la infancia temprana, son factores importantes de los eventos fisiológicos implicados en un momento en que el tejido adiposo está en una fase dinámica de su desarrollo, y que podría conducir a la obesidad infantil (Massiera *et al.*, 2003).

Los estudios con animales sugieren que diferentes cocientes ω -6: ω -3 podrían afectar la composición corporal, el tamaño de los adipocitos y la distribución de la grasa (Korotkova *et al.*, 2002; Raclot *et al.*, 1997). En este sentido, como ejemplo, los LC-PUFAs ω -3 pueden tener efectos antiadipogénicos que inhiban el desarrollo de la grasa, y el ARA tiene un efecto adipogénico (Amri *et al.*, 1994; Makrides *et al.*, 2011).

1.7.1. Efectos de los PUFAs a corto y largo plazo sobre la composición corporal

La bibliografía disponible sobre los efectos de los PUFAs a corto y largo plazo sobre la composición corporal no es mucha. Además, muchos de los resultados obtenidos en los estudios resultan controvertidos tal y como describe Rodríguez *et al.* (2012) en su revisión sistemática, con información sobre el consumo de LC-PUFAs ω -3 durante el embarazo y el período posnatal, y el efecto en la composición corporal de los niños a largo plazo.

Dada la diversidad encontrada en los resultados de las intervenciones de los artículos seleccionados en dicha revisión (Rodríguez *et al.*, 2012), las conclusiones sobre el efecto de la suplementación materna con ω -3 en la composición corporal del recién nacido todavía no son claras. En algunos casos, la mayor ingesta de ω -3 durante el embarazo se asoció con menor adiposidad y riesgo de obesidad posterior en el niño; y en otros estudios, los resultados fueron contradictorios, mostrando una mayor acumulación de tejido adiposo en los niños. Por otro lado, en las intervenciones realizadas, tanto en niños prematuros como nacidos a término, con diferentes LC-PUFAs, también se encontraron resultados muy controvertidos. Por lo tanto, Rodríguez *et al.* (2012) afirmaron que actualmente no es posible asegurar si el cambio de la composición corporal detectado en los recién nacidos, sean prematuros o no, puede estar asociado con la diferente composición de PUFAs de las fórmulas ingeridas o si varía con los años en diferentes sentidos e intensidades debido al efecto de una posible programación metabólica difícil de sostener con los modelos revisados. La conclusión a la que se llegó con esta revisión sistemática fue que se necesitan más estudios para entender mejor cuál es la relación real entre los LC-PUFAs y la programación de la composición corporal a medio y largo plazo.

En etapas posteriores de la vida, como la preadolescencia, el efecto de la programación podría modular la composición corporal en aquellos individuos que obtuvieron baja adiposidad en etapas anteriores. Además, existen muchos estudios que no muestran ninguna variación en la composición corporal en etapas posteriores, en aquellos individuos que tomaron un suplemento con LC-PUFAs durante la lactancia (de Jong *et al.*, 2011; Scholtens *et al.*, 2009).

1.8. METABOLISMO HEPÁTICO

El hígado es un órgano parenquimatoso implicado en multitud de rutas metabólicas, entre las que se encuentra la regulación de los lípidos, hidratos de carbono y proteínas (formación de proteínas plasmáticas y lipoproteínas, entre otras). Además, posee funciones inmunológicas, de desintoxicación de fármacos, producción de bilis, almacenamiento de glucógeno, vitaminas y minerales, y es órgano hematopoyético durante el periodo fetal (Gyamfi et al., 2010).

1.8.1. Función del hígado en el metabolismo de los lípidos

Con respecto al metabolismo de los ácidos grasos, el hígado realiza funciones tanto catabólicas como anabólicas. Los lípidos ingeridos en la dieta son absorbidos a través de la pared del intestino delgado. Los ácidos grasos de cadena corta y media se incorporan directamente al torrente sanguíneo, y los ácidos grasos de cadena larga, los triglicéridos, los fosfolípidos y el colesterol, forman parte de quilomicrones. Además de los quilomicrones, las lipoproteínas VLDL, formadas en el hígado, y el proceso de lipólisis que tiene lugar en el tejido adiposo, son los responsables de la presencia de ácidos grasos en el torrente sanguíneo. En general, los ácidos grasos se incorporan al hígado ya sea para sufrir oxidación o para constituir triglicéridos (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010; Fon Tacer y Rozman, 2011).

1.8.1.1. Oxidación de ácidos grasos

La oxidación de los ácidos grasos se lleva a cabo principalmente mediante la β -oxidación, en la mitocondria, aunque también puede darse en otros orgánulos como los peroxisomas (Reddy y Hashimoto, 2001), que están implicados en el metabolismo de una gran variedad de ácidos grasos, sobre todo los de cadena muy larga y los ramificados. Estos sistemas de oxidación extramitocondriales son esenciales durante los periodos en los que hay un gran flujo de ácidos grasos entrando al hígado. Por tanto, diversos agentes, conocidos como proliferadores del peroxisoma, como ciertos los ácidos grasos y metabolitos derivados de estos, pueden actuar, en el hígado, como estimuladores de la proliferación del peroxisoma, lo que se asocia con un incremento en la expresión de genes implicados en la β -oxidación peroxisomal (Wei et al., 2008; Gyamfi et al., 2010). Existen otras rutas de oxidación de ácidos grasos, como la α - y ω -oxidación

mediadas por la familia del citocromo P450 4A en el retículo endoplasmático (Wei et al., 2008; Gyamfi et al., 2010).

La oxidación hepática de los ácidos grasos comienza con la llegada de los ácidos grasos, procedentes del torrente circulatorio, al interior celular a través de su unión a una serie de transportadores presentes en la membrana externa de los hepatocitos. Ya en el citosol se unen a proteínas específicas que les permiten desplazarse y poder activarse mediante la formación de un tioéster con la coenzima A, proceso catalizado por la enzima acil-CoA sintetasa presente en la membrana externa de la mitocondria para producir derivados acil-CoA de los ácidos grasos (Kalant y Cianflone, 2004).

Los ácidos grasos de cadena corta y media pueden de atravesar la membrana mitocondrial interna mediante un mecanismo de difusión, mientras que los ácidos grasos de cadena larga (> 16 carbonos) se unen a la carnitina mediante la enzima carnitina-palmitoiltransferasa 1 (CPT-1), sustituyendo el grupo CoA por la molécula de carnitina, y son transportados como derivados de la carnitina (acilcarnitina) para poder acceder al interior de la membrana mitocondrial interna. Una vez allí, tiene lugar la reacción inversa, formándose de nuevo carnitina y el derivado acil CoA mediante la enzima carnitina-palmitoiltransferasa 2 (CPT-2).

Finalmente, los grupos acil CoA sufren ahora el proceso de la β -oxidación, siendo degradados por eliminación secuencial de dos átomos de carbono a partir del final del ácido graso, dando lugar a moléculas acetil-CoA (Wei et al., 2008). Este proceso genera también una molécula de NADH y FADH₂, que se emplean como fuente de energía en la cadena respiratoria.

El acetil-CoA producido se dirige principalmente al ciclo tricarboxílico o ciclo de Krebs para la obtención de energía, aunque si se genera en exceso es convertido en acetoacetato e 3-hidroxiacetato mediante el proceso denominado cetogénesis. El acetoacetato puede sufrir una descarboxilación y dar lugar a acetona. Estos tres productos, 3-hidroxiacetato, acetoacetato y acetona se denominan cuerpos cetónicos y son producidos principalmente en el hígado y liberados al torrente sanguíneo, ya que este órgano no puede utilizarlos como sustrato energético por carecer de la enzima HMG-CoA liasa, necesaria para ello. Una vez en circulación, los cuerpos cetónicos son consumidos por los tejidos periféricos, como el músculo esquelético y la corteza renal. Los cuerpos cetónicos se producen cuando la degradación de los ácidos grasos no puede completarse, bien debido a que la cantidad de ácidos grasos es muy elevada o bien porque falta glucosa. Aunque el uso principal de los cuerpos cetónicos es como sustrato

energético, también pueden formar parte de la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Cahill y Veech, 2003, Browning y Horton, 2004; Koek et al., 2011).

1.8.1.2. Regulación de la oxidación de ácidos grasos

La β -oxidación está regulada, en primera instancia, por la disponibilidad de ácidos grasos, que a su vez depende de los ácidos grasos liberados a sangre procedentes de los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo y cuya regulación está a cargo de la lipasa sensible a hormonas. Otra forma de regulación consiste en la inhibición de la enzima CPT-1 por la presencia de malonil-CoA, intermediario del proceso de lipogénesis. Por otra parte, la insulina inhibe la β -oxidación incrementando la concentración de este sustrato mediante la activación de acetil-CoA carboxilasa (ACC) y por estimulación del proceso de esterificación para la formación de triglicéridos. Sin embargo, el glucagón ejerce un efecto contrario, ya que favorece la oxidación de los ácidos grasos, probablemente por su efecto sobre la enzima CPT-1.

En la regulación a largo plazo, los receptores PPARs tienen una función esencial. Estos receptores (PPAR α , PPAR γ y PPAR δ) se expresan principalmente en tejidos implicados en el metabolismo de ácidos grasos, entre los que se encuentra el hígado (Gyamfi et al., 2010; Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010). El receptor PPAR α está fuertemente implicado en la regulación de la expresión de genes implicados en la oxidación hepática de ácidos grasos tanto mitocondrial como extramitocondrial, y por tanto, cualquier defecto en la expresión de estos genes supondría la alteración del grado de oxidación hepática de ácidos grasos (Rao y Reddy, 2004).

1.8.1.3. Síntesis de lípidos

Los lípidos ingeridos a través de la dieta son transportados por el torrente sanguíneo unidos a unas lipoproteínas denominadas quilomicrones. Los quilomicrones van liberando triglicéridos por el torrente mediante la actuación de la lipoproteína lipasa presente en el endotelio vascular, que los degrada en ácidos grasos y glicerol para que sean incorporados en los diferentes tejidos. El quilomicrón remanente se dirige al hígado para aportar los lípidos restantes, que no han sido utilizados por los tejidos periféricos. En función del estado energético, los ácidos grasos presentes en el hígado pueden ser esterificados para formar triglicéridos y así almacenarse como reserva energética en los hepatocitos y/o también pueden ser secretados a la circulación mediante lipoproteínas VLDL, que transportan esta grasa a los tejidos que la requieran (Koek et al., 2011). La síntesis de lípidos en el hígado tiene lugar, por tanto, a través de la utilización de los ácidos grasos procedentes del tejido adiposo blanco o mediante el

proceso de lipogénesis de novo a partir de los glúcidos en exceso. La síntesis de novo de lípidos a partir de componentes no lipídicos, como la glucosa, se lleva a cabo en el citosol de los hepatocitos a partir del acetil-CoA. Debido a la impermeabilidad de la membrana interna mitocondrial al paso del acetil-CoA, es necesaria su conversión a citrato mediante la enzima citrato sintasa para poder lograr su entrada al citosol. Una vez en su interior, el citrato es degradado por la enzima ATP/citrato liasa para regenerar la molécula de acetil-CoA y esta es carboxilada por la enzima ACC para formar malonil-CoA. La síntesis de ácidos grasos se produce a partir de intermediarios de acetil-CoA y malonil-CoA, mediante la adición de dos unidades de carbono por la enzima ácido graso sintasa. Por otra parte, los ácidos grasos sintetizados pueden combinarse con gliceraldehido 3-fosfato (producto intermediario de la glucólisis) para formar triglicéridos y fosfolípidos (Wei et al., 2008; Fon Tacer y Rozman, 2011).

1.8.1.4. Regulación de la síntesis de lípidos

La enzima ACC es la enzima principal de la regulación de la síntesis de ácidos grasos debido a su función sobre la síntesis de malonil-CoA. Esta enzima se activa cuando existe abundancia de energía y se inhibe cuando se genera un déficit de energía. Estos cambios de activación y desactivación ocurren por medio de la vía de desfosforilación y fosforilación, respectivamente (Wei et al., 2008; Gyamfi et al., 2010).

Además, la enzima ACC puede ser regulada de forma hormonal, a través de la insulina. Cuando existe energía suficiente en el organismo los niveles de insulina se elevan y estimulan la activación de la enzima ACC, aumentando los niveles de malonil-CoA y por tanto, inhibiendo la oxidación de ácidos grasos y promoviendo la síntesis y esterificación de ácidos grasos y su almacenamiento. Por el contrario, cuando existe un déficit energético, el glucagón inhibe el proceso de desfosforilación, evitando de ese modo la activación de la enzima ACC y bloqueando la síntesis de ácidos grasos (Gyamfi et al., 2010).

Por otra parte, la insulina favorece la activación de SREBP-1c, un factor importante de transcripción que regula una serie de genes que promueven el proceso de lipogénesis. Sin embargo, se ha observado que SREBP-1c no puede actuar sólo en la expresión de genes implicados en los procesos de lipogénesis y glucólisis (Denechaud et al., 2008). Existe otro factor de transcripción denominado ChREBP que se activa en presencia de glucosa (Uyeda y Repa, 2006). La glucosa actúa a través de su intermediario, xilosa 5-fosfato, generado por la ruta de las pentosas fosfato no oxidativa, que favorece el proceso de desfosforilación y activa el factor ChREBP, que promueve la expresión de las regiones de los genes que participan en los procesos

de glucólisis y lipogénesis. Por este motivo, cuando hay un exceso de carbohidratos, el hígado transforma la glucosa en grasa con el objetivo de controlar los niveles plasmáticos de glucosa y evitar la hiperglucemia (Ishii et al., 2004; Postic et al., 2007)

1.8.1.5. Síntesis de colesterol

El hígado es el principal órgano regulador de la síntesis, distribución y excreción de colesterol. El colesterol de la dieta llega al hígado transportado en los quilomicrones remanentes, y el hígado sólo desencadena la síntesis de colesterol cuando el aporte dietético no es suficiente. La mayor parte de los tejidos también pueden sintetizar colesterol, pero no suelen desarrollar esta capacidad debido al suministro continuo por parte del hígado mediante las lipoproteínas, por lo que la propia entrada de colesterol a los tejidos inhibe su síntesis por parte de éstos (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010).

La síntesis de colesterol se produce, al igual que los cuerpos cetónicos, a partir del hidroximetilglutaril CoA pero con la diferencia del orgánulo en el que se produce. Los cuerpos cetónicos se sintetizan en las mitocondrias y el colesterol en el retículo endoplásmico. El proceso de síntesis transcurre del siguiente modo: a partir del hidroximetilglutaril CoA se forma ácido mevalónico por acción de la enzima hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMGCoA-R). El ácido mevalónico da lugar a un isopreno activo que forma la base fundamental de la estructura del colesterol. Son necesarios seis isoprenos para generar escualeno, que a su vez, se cicla formando la molécula de lanosterol y tras la pérdida de tres grupos metilo se origina finalmente la molécula de colesterol (Van der Wulp et al., 2013).

La regulación de la síntesis de colesterol se lleva a cabo principalmente por la enzima HMGCoA-R y otros mecanismos (Brown y Goldstein, 1980). Esta enzima puede activarse o desactivarse mediante procesos de fosforilación-desfosforilación por una proteína quinasa activada por AMP. De este modo, cuando los niveles de ATP son bajos, aumenta el AMP y se desactiva la síntesis. Por otro lado, la expresión de la enzima está regulada por la proteína SREBP (proteína de unión a elementos de respuesta regulados por esteroides) que se produce únicamente cuando existe escasez de colesterol. Por ello, cuando existe una cantidad adecuada de colesterol la síntesis de la enzima se desactiva (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010; Edwards y Ericsson, 1999; Itsvan y Deisenhofer, 2001).

El colesterol presente en el organismo, como se menciona anteriormente, puede proceder de la dieta o de la síntesis endógena llevada a cabo por el hígado, siendo esta última

vía la principal fuente de colesterol del ser humano. Esta homeostasis implica el desplazamiento del colesterol entre los distintos tejidos periféricos y el hígado. El hígado regula la biosíntesis de novo de colesterol, la excreción de colesterol a través de la bilis, la secreción de colesterol al torrente sanguíneo a través de las lipoproteínas VLDL, la modulación de los receptores que median su absorción a nivel celular, la formación de ésteres de colesterol y su almacenamiento (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010).

En este sentido, para conseguir una adecuada homeostasis del colesterol es fundamental la función de los receptores hepáticos X de colesterol (LXRs) (Sharpe et al., 2013). Se trata de receptores nucleares que se activan por la presencia de oxisteroles endógenos, es decir, derivados oxidados del colesterol. Los receptores LXRs actúan como sensores de colesterol, por tanto, cuando los oxisteroles se acumulan como resultado de un incremento de las concentraciones de colesterol, LXRs inducen la transcripción de genes que protegen a las células de la sobrecarga de colesterol. Su activación regula la síntesis de ácidos biliares y metabolismo y/o excreción, el transporte reverso de colesterol (TRC), la biosíntesis de colesterol y la absorción y excreción de colesterol en el intestino (Zhao et al., 2010). El transporte reverso de colesterol (TRC) es el proceso por el cual el colesterol de los tejidos periféricos es transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) al hígado para su excreción en la bilis (Gómez Coronado, 2010).

La síntesis de bilis es otro mecanismo de excreción de colesterol. Esta secreción, necesaria para la emulsión y digestión de las grasas procedentes de la dieta, está formada entre otros componentes, por las sales biliares y el colesterol. Las sales biliares se forman a partir de la hidroxilación del núcleo de colesterol por la acción de hidrolasas hepáticas (7-, 12- y 26-) y la modificación de su cadena lateral (Sánchez Pozo y Gil Hernández, 2010).

1.8.1.6. Función del hígado en el metabolismo de los carbohidratos

El hígado ejerce una función fundamental en el metabolismo de los carbohidratos, tanto en condiciones de ayuno como tras la ingesta de alimento.

En condiciones de ingesta, la glucosa absorbida a nivel intestinal es transportada a través de la vena porta al hígado. Una vez allí, la glucosa penetra al interior del hepatocito mediante los transportadores de glucosa 2, cuya acción no depende de la insulina. Por tanto, la absorción de glucosa por los hepatocitos es proporcional a la concentración plasmática. Una vez dentro del hepatocito, la glucosa es fosforilada para formar glucosa-6-fosfato (G6P) por la enzima

glucoquinasa, que tiene la característica de que, bajo condiciones fisiológicas, no se ve afectada por su producto, G6P. Este hecho propio del hígado le otorga la característica de fosforilar la glucosa cuando las concentraciones plasmáticas son elevadas y de liberarla cuando aumentan las necesidades (Nuttall et al., 2008).

La G6P puede ser empleada en la glucólisis, cuando aumenta la demanda de energía, o puede dar lugar a la síntesis de glucógeno, cuando disminuyen las necesidades energéticas. La glucólisis se produce en el citosol y da lugar a la obtención de piruvato. El glucógeno almacenado también puede ser degradado por la enzima glucógeno fosforilasa (GP) para producir G6P, que puede dirigirse a la ruta de la glucólisis o ruta de las pentosas fosfato o transformarse en glucosa por acción de la enzima glucosa 6-fosfatasa, si aumentan las necesidades. El piruvato puede entrar al ciclo de Krebs en la mitocondria por la vía del Acetil-CoA para formar citrato. El citrato también puede incorporarse a la ruta del proceso de lipogénesis por la vía del Acetil-CoA para producir triglicéridos y colesterol en el citosol. Las enzimas implicadas en los procesos de lipogénesis están reguladas por la insulina, al igual que la formación de glucógeno. (Gyamfi et al., 2010).

1.8.1.7. Gluconeogénesis

La gluconeogénesis es la ruta metabólica anabólica que permite la síntesis de glucosa a partir de fuentes no glucídicas, y el hígado es el principal órgano con una función esencial en este proceso.

Los principales sustratos implicados en esta ruta son el lactato, piruvato, glicerol, aminoácidos y metabolitos intermediarios del Ciclo de Krebs. La regulación de la glucogenogénesis depende principalmente de dos factores: 1. Regulación hormonal de las enzimas implicadas en dicha ruta y 2. Tasa de producto disponible. La hormona glucagón activa la ruta de la gluconeogénesis y la insulina la inhibe (Frayn et al., 2003).

1.9. MICROBIOTA

1.9.1. Microbiota intestinal

La microbiota intestinal tiene la mayor diversidad microbiana del cuerpo humano, con más de 1000 especies bacterianas diferentes pertenecientes, en su mayoría, a relativamente pocos filamentos bacterianos: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Proteobacteria (D'Argenio & Salvatore, 2015; Subramanian *et al.*, 2015).

La colonización del tracto gastrointestinal comienza antes del nacimiento, con la microbiota adquirida a través de la barrera placentaria y posteriormente del entorno circundante durante la lactancia, aumentando la complejidad y la diversidad microbiana (Koenig *et al.*, 2011). La microbiota del intestino varía ampliamente entre los individuos y depende de factores genéticos y ambientales como el estado de salud, la exposición ambiental, el envejecimiento y la dieta (Gutierrez-Diaz *et al.*, 2016).

En este sentido, los lactantes que son alimentados exclusivamente con leche materna albergan una microbiota dominada por Bifidobacteria y Lactobacillus (van Best *et al.*, 2015). Estas diferencias pueden ser causadas no sólo por la composición bacteriana de la leche humana, sino también por la presencia de oligosacáridos de la leche humana (Gómez-Gallego & Salminen, 2016). Más adelante, durante el periodo de alimentación complementaria y el destete, aumenta la diversidad del microbioma y la microbiota funcionalmente madura por una disminución en la abundancia relativa de genes implicados en la degradación de la utilización de lactato y hacia el enriquecimiento de los genes implicados en la degradación de los hidratos de carbono (Gómez-Gallego & Salminen, 2016). A la edad de tres años, la microbiota intestinal se asemeja a la composición de la de un adulto, con altos niveles de Bacteroides y Clostridium, cambios en la población de Lactobacillus y reducción de los niveles de Bifidobacterium (van Best *et al.*, 2015). Finalmente, cada individuo alcanza una composición homeostática, permaneciendo relativamente estable durante la mayor parte de su vida adulta sana (Ottman *et al.*, 2011; Faith *et al.*, 2011). Definir una microbiota sana normal no es posible debido a la gran variación interindividual entre las especies de microbios presentes en el intestino, junto con variaciones relacionadas con la edad, área geográfica, antecedentes genéticos, modo de parto, lactancia materna, edad, ciclos hormonales, viajes, estado de salud, tratamientos médicos y, por supuesto, la dieta del huésped (Gómez-Gallego & Salminen, 2016; D'Argenio & Salvatore, 2015; Ottman *et al.*, 2011; Farland, 2014).

La microbiota tiene un profundo impacto en su huésped al proporcionar una barrera competitiva contra los patógenos invasores, utilizando componentes de alimentos no digeridos y la producción de metabolitos esenciales, modula las respuestas inmunes y contribuye al desarrollo del sistema inmunológico, y estimula la maduración intestinal (Fernandez *et al.*, 2013; Ottman *et al.*, 2011).

La riqueza microbiana, entendida como alta diversidad bacteriana, suele considerarse un indicador de un estado saludable y hace que el huésped sea menos propenso a una serie de enfermedades (Jordan *et al.*, 2015). La baja riqueza, se asocia con varias enfermedades no transmisibles relacionadas con el estilo de vida, como la obesidad, el síndrome metabólico, las enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario y las inflamatorias (D'Argenio V, Salvatore, 2015). El número y la diversidad de especies bacterianas dentro del tracto gastrointestinal de un individuo permanecen relativamente constantes a lo largo de la vida, como se mencionó anteriormente, pero es posible estimular la proliferación de microorganismos específicos con efectos benéficos para la salud manipulando la dieta del huésped (Gómez-Gallego & Salminen, 2016).

1.9.2. Disbiosis y enfermedad

La disbiosis o disbacteriosis se define como una perturbación en la composición de la microbiota, con una disminución en el número relativo de microbios beneficiosos y un crecimiento de microbios dañinos en el tracto intestinal (Ducatelle *et al.*, 2015). Cualquier desequilibrio definido entre las bacterias protectoras y dañinas puede tener la capacidad de promover la susceptibilidad a la enfermedad y/o la progresión de una enfermedad. Por lo tanto, es importante identificar el desarrollo saludable de la microbiota y los factores que causan desviaciones. Sin embargo, la distinción entre bacterias beneficiosas y nocivas a menudo no está clara (Gómez-Gallego & Salminen, 2016).

Las enfermedades asociadas a la disbiosis incluyen problemas gastrointestinales y sistémicos, obesidad, alergia e incluso enfermedades cardiovasculares (Butel, 2014). Sin embargo, no está claro si la disbiosis es la causa de la enfermedad, o si ambos son fenómenos concomitantes (Ducatelle *et al.*, 2015). Además, existen múltiples causas que provocan disbiosis, tales como parto por cesárea, parto prematuro, lactancia materna corta, estilo de vida, higiene, antibióticos o dieta.

El aumento del riesgo de obesidad infantil en niños nacidos por cesárea se ha atribuido a los diferentes patrones de colonización intestinal en estos niños (van Best *et al.*, 2015). La evidencia emergente sugiere que la variación en el microbioma puede tener un papel más importante que la variación del genoma humano en la patogénesis de la obesidad, dada su interacción directa con factores ambientales (Le Chatelier *et al.*, 2013). Se ha sugerido que una "microbiota obesa" tiene un alto potencial para extraer energía de la dieta debido a que el número de genes dedicados a la hidrólisis de polisacáridos es mucho mayor (Jakobsdottir *et al.*, 2014; Ley *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la composición de las bacterias en el intestino difiere entre los individuos delgados y obesos con una alta tasa de Firmicutes en relación con Bacteroidetes, pero algunas publicaciones recientes han contradicho estos hallazgos (Sarhini *et al.*, 2014).

1.9.3. Microbiota y obesidad

Aunque la causa principal de la obesidad es la ingesta excesiva de energía y el gasto energético reducido, otros factores contribuyen a la aparición de la obesidad y sus trastornos asociados. Entre estos factores que son capaces de afectar la respuesta del huésped a los nutrientes, la microbiota intestinal representa uno muy importante (Cani, 2013). El desarrollo del sobrepeso y la obesidad se ha asociado con las primeras variaciones en el desarrollo de la microbiota, incluyendo tanto la riqueza y como la diversidad de la microbiota (Gerritsen *et al.*, 2011).

Según el estudio de Kalliomäki *et al.*, (2008), las diferencias tempranas desarrolladas durante el primer año de vida, en la composición de la microbiota intestinal, pueden predecir el desarrollo de sobrepeso y obesidad en etapas posteriores. Existen muchos estudios que demuestran la relación entre la composición de la microbiota intestinal y la obesidad, y su asociación con la inflamación crónica de bajo grado (Ley *et al.*, 2005; Turnbaugh *et al.*, 2006; Cani *et al.*, 2008). Los estudios previos muestran que el microbioma de sujetos obesos aumenta la absorción de energía de la dieta, contribuyendo a la fisiopatología de la obesidad. Además, la disbiosis que caracteriza la microbiota intestinal de sujetos obesos aumenta los niveles de lipopolisacáridos plasmáticos (LPS), lo que conduce a un aumento de las citoquinas proinflamatorias plasmáticas (IL-6, TNF- α) y el riesgo de resistencia a la insulina (Cani *et al.*, 2008; Cani *et al.*, 2007).

La microbiota intestinal de los humanos obesos se comporta de la misma manera que los ratones obesos. Los *phyla* bacterianos más abundantes que se encuentran en el tracto gastrointestinal humano y del ratón son Firmicutes (60-80% del total de bacterias) o Bacteroidetes (20-40%) (Ley *et al.*, 2005). La microbiota intestinal de ratones y humanos obesos exhibe una mayor proporción de Firmicutes/Bacteroidetes en comparación con aquellos de peso normal (Ley *et al.*, 2005; Adair, 2012; Finegold *et al.*, 2014; Turnbaugh *et al.*, 2008). Uno de los factores más importantes relacionados con la dieta es el perfil de ácidos grasos ya que pueden regular fuertemente la composición de la microbiota intestinal (Liu *et al.*, 2012; Desbois & Smith, 2010; de Wit *et al.*, 2012). Los trastornos de la progresión intestinal en etapas tempranas pueden conducir a disfunciones metabólicas permanentes de gran alcance que pueden manifestarse en la infancia y en la edad adulta (van Best *et al.*, 2015; Arrieta *et al.*, 2014).

La obesidad infantil ha alcanzado niveles epidémicos en el mundo occidental y las investigaciones sobre el papel de la ingesta de macronutrientes de los alimentos complementarios (Branca & Caroli, 2012) y su impacto en sobre la microbiota intestinal es también escaso.

Capítulo 2. Objetivos

2. OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral, se ha propuesto como hipótesis de partida que el consumo de diferentes perfiles nutricionales de alimentos infantiles puede programar, durante el período de alimentación complementaria, el desarrollo, el metabolismo y la salud para el futuro. En la actualidad, el aumento de la prevalencia de la obesidad durante la infancia es una realidad que conlleva a una posterior obesidad adulta y sus enfermedades relacionadas.

Por ello, el **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral ha sido evaluar el efecto del consumo de dos alimentos infantiles, pertenecientes a dos marcas de alimentación infantil líderes en el mercado español, con diferentes perfiles nutricionales, sobre el crecimiento, el metabolismo, el sistema inmune y otros marcadores de obesidad, en relación con la obesidad en la vida adulta, mediante un estudio *in vivo* con ratones C57BL/6J.

Para la consecución del objetivo general se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar el efecto del consumo de los alimentos infantiles sobre el crecimiento en ratones durante 12 semanas. Estudiar los parámetros morfométricos y su relación con la ingesta de nutrientes y energía procedentes de los alimentos infantiles.
2. Conocer los parámetros bioquímicos en sangre de los ratones para evaluar el estado de salud y su relación con la obesidad y enfermedades asociadas.
3. Estudiar el perfil de ácidos grasos acumulados en el tejido adiposo y evaluar su correlación con los ácidos grasos procedentes de la dieta.
4. Evaluar los cambios producidos en el metabolismo lipídico hepático a través del estudio de la regulación de la expresión génica de los genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos, en los ratones que consumieron los alimentos infantiles.
5. Evaluar otros cambios metabólicos en los ratones que consumieron los alimentos infantiles a través de las diferencias de expresión de los genes involucrados en la obesidad.
6. Estudiar el impacto de los alimentos infantiles sobre la microbiota intestinal, cuantificando los posibles cambios en las concentraciones de ciertas poblaciones bacterianas, tanto en intestino delgado como grueso.
7. Analizar el impacto del consumo de los diferentes alimentos infantiles sobre el sistema inmune y otros marcadores de obesidad en la sangre de los ratones. Comprobar la

presencia de inflamación de bajo grado, mediante el análisis de las poblaciones celulares del bazo y citoquinas inflamatorias en plasma.

Capítulo 3. Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la consecución de los objetivos de la presente Tesis Doctoral, se llevó a cabo un estudio en ratones C57BL/6J. El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación Animal de la Universidad de Murcia, controlándose en todo momento las condiciones de humedad ($55 \pm 10\%$), temperatura ($20 - 24 \text{ }^\circ\text{C}$) y luz (ciclo luz-oscuridad 8 am – 8 pm) durante el periodo de experimentación.

3.1.1. Modelo animal

Se utilizaron ratones de la estirpe C57BL/6J (Harlan Laboratories Inc, Indiana, USA) de 3 semanas de edad y con un peso que osciló entre los 8-12 gramos. Esta cepa de ratones fue elegida por ser un modelo de obesidad inducida por la dieta (DIO), y se utilizan comúnmente en la investigación de la obesidad sin deficiencia de leptina. Estos ratones mantenidos con dietas ajustadas en calorías (normocalóricas) pueden desarrollar fácilmente las siguientes características: resistencia a la insulina (Kolonin *et al.*, 2004), hiperfagia (Gallou-Kabani *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2004), disminución del gasto energético (Hu *et al.*, 2004), hipercolesterolemia (Gallou-Kabani *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 1999), hiperglicemia (Gallou-Kabani *et al.*, 2007), hiperinsulinemia (Gallou-Kabani *et al.*, 2007; Hu, 2004 *et al.*; Kolinin *et al.*, 2004) o hiperlipidemia (Hu *et al.*, 2004).

3.1.2. Comisión de Bioética de la Investigación

El protocolo fue aprobado por la Comisión de Bioética de la Universidad de Murcia y teniendo en cuenta lo indicado en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos; en la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio; y en la Directiva 86/609/CEE, del Consejo de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para

experimentación y otros fines científicos; y la Recomendación 2007/526/CE de la Comisión, de 18 de junio de 2007, sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y al cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

3.1.3. Grupos de intervención y dietas

Para la experiencia se utilizaron 36 crías macho, destetados a los 21-28 días, que fueron distribuidos aleatoriamente en 3 grupos de 12 ratones cada uno, alojando 2 animales en cada jaula como se muestra en la **Figura 3.1** y **Figura 3.2**. De este modo se conformaron 6 Unidades Experimentales (UE) con 2 ratones cada una, por grupo. Cada grupo de ratones fue sometido a una dieta distinta durante un período de intervención de 12 semanas tras el destete, conformando 2 grupos de estudio y un control. Los animales fueron sacrificados a la edad de 15 semanas.

Se estudiaron dos alimentos infantiles complementarios a partir de 6 meses de vida, homogeneizados y envasados en tarritos de cristal, listos para el consumo, pertenecientes a dos marcas de alimentación infantil líderes en el mercado español. Ambos productos estaban elaborados a partir de una base proteica de origen animal (pollo) y energética de cereal (arroz) (**Tabla 3.1**). Uno de los alimentos tenía un contenido estándar en proteínas, hidratos de carbono y sodio, y un perfil lipídico con base de aceite de oliva exclusivamente (alimento infantil A). El otro producto contenía un nivel reducido de estos nutrientes y un perfil lipídico con base de aceite de oliva y otros aceites vegetales que tenían como objetivo equilibrar dicho perfil (alimento infantil B). Como alimento control se utilizó pienso de mantenimiento para roedores con un 14% de proteína (Harland Teklad Global Diets, Horst, Netherlands). La composición detallada de dichos alimentos infantiles (tarritos) y del pienso se muestra en la **Tabla 3.2**. La **Figura 3.3** muestra el perfil de ácidos grasos de los alimentos infantiles y del pienso.

Al primer grupo de estudio (grupo A) se le administró una dieta a base del alimento infantil A y pienso de mantenimiento para roedores. Al segundo grupo de estudio (grupo B) se le administró una dieta a base del alimento infantil B y pienso de mantenimiento. El pienso de mantenimiento para roedores, en estos dos grupos, se utilizó por un lado para evitar o minimizar carencias de vitaminas o minerales, y, por otro lado, para ofrecer una segunda fuente de alimentación y simular la alimentación complementaria la cual debe ir siempre acompañada de otros alimentos. El tercer grupo de estudio fue el grupo control (grupo C) al que se le administró

únicamente pienso de mantenimiento para roedores. La administración de las dietas y el agua para todos los grupos fue *ad libitum*.

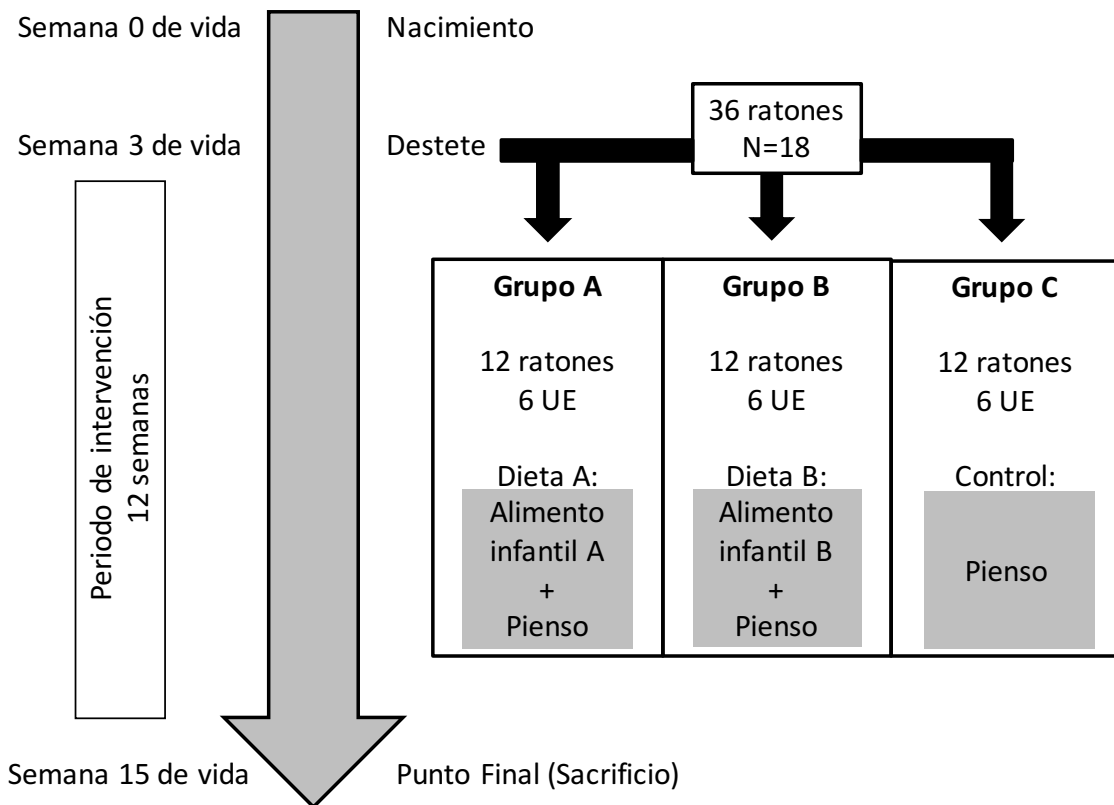


Figura 3.1. Diseño del estudio experimental. N = tamaño muestral. Grupos A y B: ratones a los que se le administró la dieta A y B, respectivamente. Grupo C o Control: ratones a los que se les administró sólo pienso de mantenimiento para roedores. UE = Unidad Experimental.

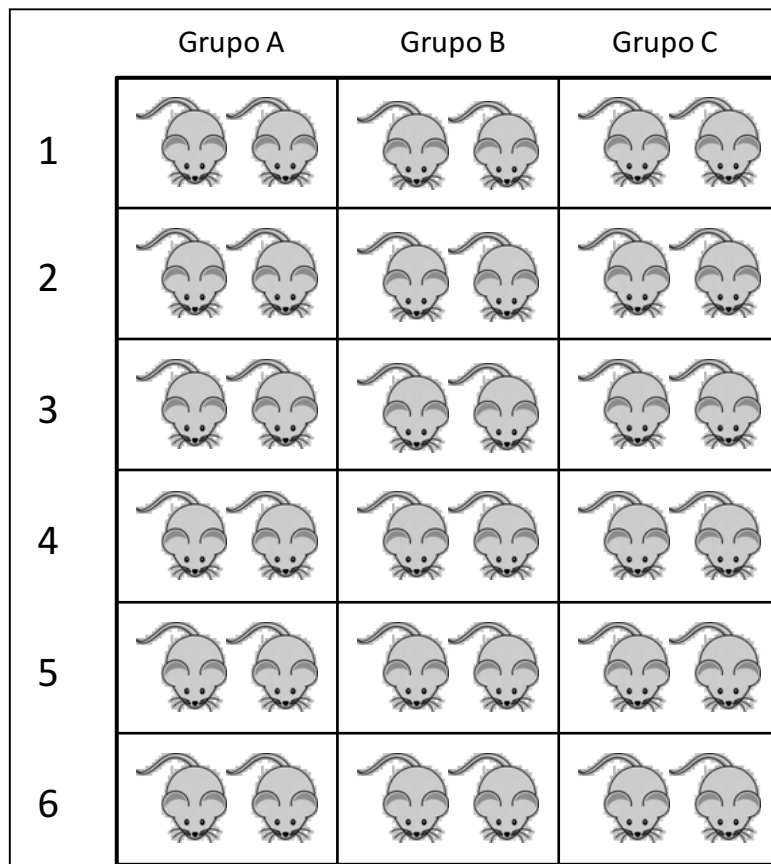


Figura 3.2. Esquema de la distribución de los animales en cada jaula y por dieta. La Unidad Experimental se corresponde con la jaula (6 jaulas = 6 UE).

Tabla 3.1. Lista de ingredientes de los alimentos infantiles en orden decreciente.

Ingredientes	
Alimento infantil A	Agua de cocción, pollo 20%, arroz 9%, almidón de maíz, zumo de limón, aceite de oliva 0.6%, sal.
Alimento infantil B	Agua de cocción, carne de pollo 15%, arroz 6%, zanahorias, almidón de maíz, tomate, cebolla, aceite de oliva 0.8%, aceites vegetales, apio, sal.

Tabla 3.2. Composición nutricional de los alimentos infantiles A y B*, y del pienso para roedores.

	Alimento infantil A	Alimento infantil B	Pienso
Macronutrientes y energía (g/100g)			
Humedad	80.8	86	13.1
Proteína	4.5	3.6	14.5
Grasa	3.1	2.7	4
Fibra alimentaria	0.5	0.5	4.5
Hidratos de carbono	11.1	7.2	63.9
Valor energético (kcal/100g)	90.3	67.5	310
Ácidos grasos (g/100g)			
SFA	0.84	0.45	0.72
MUFA	1.74	1.25	0.83
PUFA	0.41	0.78	2.49
Perfil S:M:P	1:2.1:0.6	1:2.8:1.7	1:1:3.5
Ác. Palmítico	0.64	0.36	0.64
Ác. Palmitoleico	0.16	0.09	0.001
Ác. Esteárico	0.17	0.17	0.07
Ác. Oléico	1.52	0.99	0.81
Ác. Linoleico	0.46	0.69	2.34
Ác. Linolénico	0.04	0.14	0.14
Ác. Araquídico	0.01	0.09	0.01
Ác. Eicosaenoico	0.02	0.09	0.00
Ác. Láurico	-	-	0.006
Ác. Mirístico	-	-	0.001
Ác. Behénico	-	-	0.001
Linoleico/Linolénico	12.55	11.36	16.16
Sodio (mg/100g)	165	108	130

*Datos proporcionados por el Instituto Hero de Nutrición Infantil.

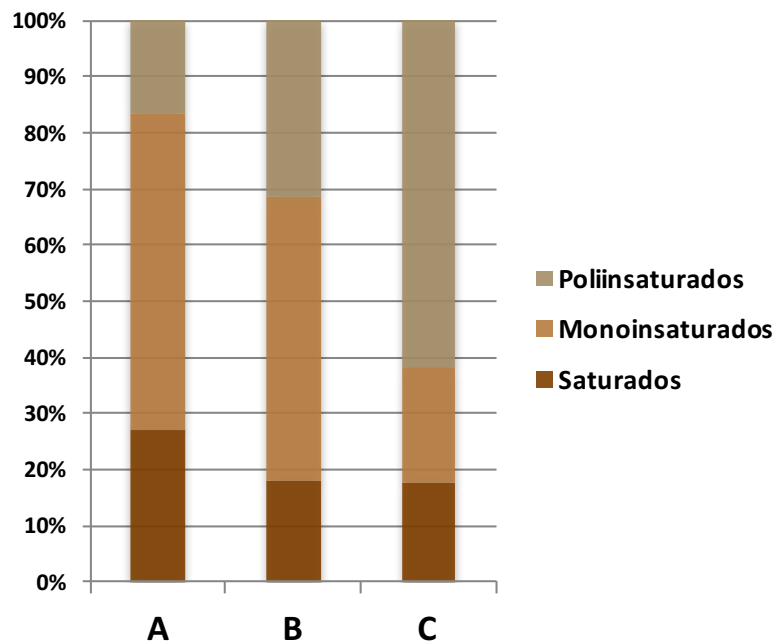


Figura 3.3. Representación gráfica del perfil general de ácidos grasos de los tarritos A y B, y del pienso para roedores (C).

3.1.4. Características técnicas de las jaulas

Para ubicar a los animales se utilizó un rack ventilado Sealsafe® (Tecnoplast SpA, Milán, Italia), de prevención y protección en acero inoxidable, que incluye 30 miniaisladores (jaulas) modelo 1291H, de medidas 425 x 266 x 180 mm, válidos indistintamente según normativa para rata/ratón (**Imagen 3.1**). Los miniaisladores estaban fabricados en polieterimida, material muy resistente a productos químicos para su limpieza y desinfección, y alta resistencia térmica (hasta 150 °C) para su esterilización. Poseían un flujo de aire filtrado que proporciona una alta protección contra bacterias, virus y alérgenos.

Para la dispensación de los alimentos infantiles y del pienso se utilizaron comederos independientes. El agua se dispensó en biberones estériles.



Imagen 3.1. Instalaciones del animalario de la Universidad de Murcia. Rack ventilado con miniaisladores.

3.1.5. Recogida de datos periódicos, sacrificio y toma de muestras

Durante el Periodo de Intervención se recogieron los datos sobre la ingesta diaria de las dietas y los parámetros morfométricos de los animales. La cantidad de comida ingerida fue cuantificada a diario y se llevó a cabo de forma independiente para el alimento infantil y para el pienso. El peso y longitud corporal fueron registrados semanalmente durante las 12 semanas y a término del estudio. El control del peso se llevó a cabo en una balanza (Adventurer Pro AV, Ohaus Europe, Nänikon, Suiza) con los animales conscientes (**Imagen 3.2**). La medida de la longitud corporal se realizó, previa anestesia inhalatoria con isoflurano (IsoFlo®, Abbott Laboratories Ltd., Reino Unido), como se muestra en la **Imagen 3.3**, desde la punta de la nariz hasta la base de la cola utilizando un Calibre (Digimatic Caliper 2074M, Mitutoyo American Corporation, USA).

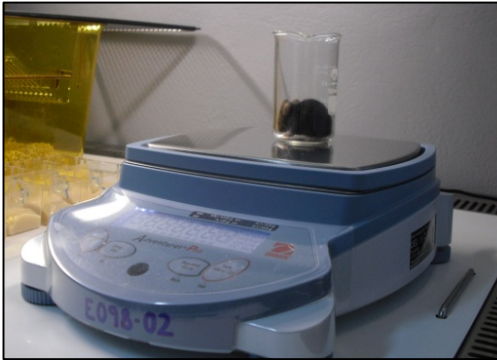


Imagen 3.2. Control del peso de los animales

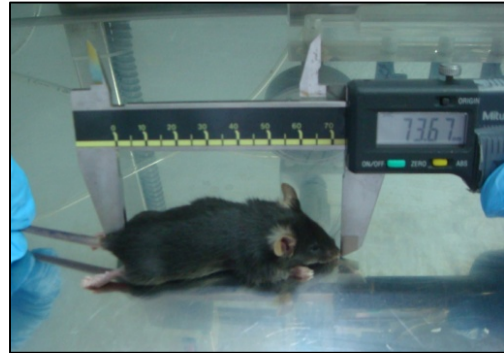


Imagen 3.3. Medida de longitud de los animales.

Los animales fueron sacrificados a las 12 semanas tras haber iniciado el estudio, con una edad aproximada de 15 semanas. Para ello, se aplicó anestesia inhalatoria con isoflurano (IsoFlo®, Abbott Laboratories Ltd., Reino Unido) y se les realizó una exanguinación con punción cardíaca (**Imagen 3.4**). Posteriormente, la muerte fue confirmada por dislocación cervical.



Imagen 3.4. Exanguinación con punción cardíaca.

Las muestras sanguíneas se traspasaron a tubos heparinizados (LH-Li Heparin, Aquisel, Barcelona, España) que después fueron centrifugados (3000 x g, 4 °C, 10 minutos) para separar el plasma de la fracción celular, almacenándose a -80 °C en microtubos para ser analizado posteriormente.

A continuación, se procedió a la disección para obtener muestras de hígado, tejido adiposo epididimal, intestino delgado y grueso, las cuales fueron congeladas inmediatamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Para los análisis de expresión génica, las muestras fueron recogidas en microtubos estériles libres de ARNasa con adición de RNAlater (Qiagen, Sydney, Australia) para evitar la degradación del ARN. Para el estudio histopatológico se recogieron muestras de hígado en formol tamponado al 10%. Las muestras de bazo se tomaron en tubos Falcon (BD, New Jersey, USA) con 1 mL de tampón FACS I (D-PBS, 1% suero fetal bovino, 0.1% sodium azide) y su análisis se efectuó el mismo día del sacrificio dada la labilidad de las muestras. Todas las operaciones se realizaron lo más rápido posible tratando que la manipulación y contaminación de las muestras fuese mínima. Los parámetros analizados y las metodologías analíticas aplicadas (**Figura 3.4**) se describen en el apartado 3.2.

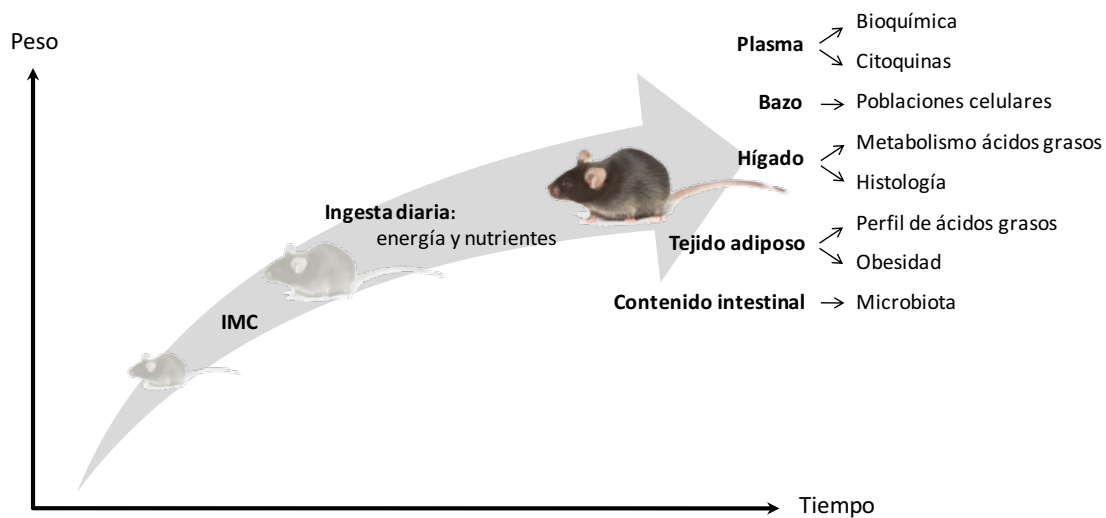


Figura 3.4. Representación esquemática de los parámetros analizados a lo largo del tiempo y en las muestras biológicas de los ratones.

3.2. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

3.2.1. Datos morfométricos e ingestas

El índice de masa corporal (IMC) o índice de Quetelet y la tasa de crecimiento diario tras el destete fueron calculadas para cada ratón, al final del periodo de intervención, mediante la **Ecuación 3.1** (Garrow *et al.*, 1985; Bayol *et al.*, 2007) y **Ecuación 3.2** (Bayol *et al.*, 2007), respectivamente. La ingesta media diaria (o consumo) de las dietas fue calculada según la **Ecuación 3.3** (Bayol *et al.*, 2007) para cada Unidad Experimental, tanto para obtener la cantidad (g/d) de la dieta total como desglosada en función de su procedencia (tarrito o pienso), energía total y desglosada (tarrito o pienso), proteína, grasa, fibra, hidratos de carbono y sodio. La ingesta media diaria de energía procedente de las dietas a lo largo de las 12 semanas de estudio, para cada Unidad Experimental, fue calculada semanalmente mediante la **Ecuación 3.4** (Bayol *et al.*, 2007).

$$IMC = \frac{\text{peso (kg)}}{\text{longitud (m)}^2} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$$\text{Tasa crecimiento postdestete} = \frac{\text{peso (g) día 105} - \text{peso (g) día 21}}{84 \text{ días}} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

$$\text{Ingesta} = \frac{\text{g o kcal totales consumidos en 84 días}}{84 \text{ días}} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

$$\text{Ingesta energía semanal} = \frac{\text{Energía (kcal) de 7 días}}{7 \text{ días}} \quad \text{Ecuación 3.4}$$

3.2.2. Parámetros bioquímicos en plasma

Se analizaron los niveles de triglicéridos, colesterol y sus fracciones HDL y LDL, glucosa, urea, albúmina, proteínas totales, y las enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotrasferasa (ALT). Las muestras de sangre fueron analizadas en el Hospital Clínico

Veterinario de la Universidad de Murcia mediante un analizador automático (AU 600 Olympus Life, Alemania). La fracción VLDL del colesterol fue calculada según la **Ecuación 3.5**.

$$VLDL = \text{colesterol} - LDL - HDL \quad \text{Ecuación 3.5}$$

3.2.3. Análisis de ácidos grasos en tejido adiposo

El perfil de ácidos grasos de cadena media (C:8 a C:13), larga (C:14 a C:20) y muy larga (C:21 o más) se analizó en las muestras de tejido adiposo epididimal siguiendo el método descrito por Folch *et al.* (1957) con algunas modificaciones.

Se pesaron aproximadamente 200 mg de tejido adiposo en tubos de vidrio y se homogeneizaron con 1 mL de hexano (Panreac, España) agitando suavemente con una varilla de vidrio. A continuación, se añadieron 500 µL de potasa metanólica 2 N (KOH: Panreac, España; CH₃OH: Sigma-Aldrich, Alemania) para conseguir la metilación de los ácidos grasos, se homogeneizó de nuevo con varilla de vidrio y se mezcló fuertemente en un agitador tipo Vortex (Ovan, España). Tras un reposo de 60 minutos para la clarificación de las muestras, se recogió el sobrenadante y se introdujo en viales de cromatografía (Agilent Technologies, USA).

La determinación de los ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases utilizando un equipo Agilent GC 7890A con un detector de ionización de llama (FID) e inyector automático (7683B, Agilent Technologies, USA) operando en modo split (20:1) y una columna capilar DB-23 (50% cianopropil-metilpolixilosano) de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película (122-2362, Agilent Technologies, USA). Las muestras se analizaron por triplicado con las siguientes condiciones cromatográficas:

- Gas portador: helio (Air Liquide, España) a presión constante de 230 kPa.
- Rampa de temperatura del horno: 50 °C durante 1 minuto/25°C/min hasta 175°C/4°C/min hasta 230°C/230°C 5 minutos.
- Temperatura del detector: 300 °C.
- Flujo de aire y de hidrógeno (Air Liquide, España) de 400 mL/m y de 35 mL/m, respectivamente.
- Multipatrón comercial (PUFA-1 Marine source, 47033, Supelco, USA).
- Multipatrón comercial (37 component FAME Mix, 47885-U, Supelco, USA).

Los ácidos grasos metilados fueron identificados por comparación de los tiempos de retención con los obtenidos en los patrones. La proporción relativa de cada ácido graso se expresó como porcentaje con respecto del total, de la suma de todas las áreas. Se calculó la suma de los ácidos grasos saturados (SFA), monosaturados (MUFA) y polisaturados (PUFA), así como la suma de los ácidos grasos ω 3 y ω 6 y el cociente entre ambos.

3.2.4. Estudio de expresión génica relacionada con el metabolismo de ácidos grasos

El estudio de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos en muestras de hígado se realizó mediante un chip de ADN (array). Para extraer y purificar el ARN total a partir de células hepáticas (50 mg) se utilizó el kit RNeasy Mini de columnas de centrifugación (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante del kit. Para eliminar las posibles trazas de ADN genómico en las extracciones se realizó un tratamiento con ADNasa I (SABiosciences, Qiagen).

Una vez extraído el ARN se determinó su concentración y pureza utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, USA).

Para la transcripción inversa se utilizó el kit RT² First Strand (SABioscience, Qiagen), con 1 μ g de ARN total extraído de cada muestra de hígado. A continuación, el ADN complementario (ADNc) obtenido de la transcripción se empleó para analizar la expresión de los genes mediante la PCR a tiempo real (qPCR). Para esta técnica se usó un termociclador BioRad CFX 89[®] (BioRad, USA), cuyas condiciones quedan indicadas en la **Tabla 3.4**. La expresión de mRNA de todos los genes reportados se normalizó a β -actina de la expresión génica.

Tabla 3.4. Condiciones de tiempo y temperatura para la amplificación de cada gen.

Ciclos	Duración	Temperatura	Comentario
1	10 minutos	95 °C	Desnaturalización
40	15 segundos	95 °C	Desnaturalización
	1 minuto	60 °C	Anillamiento*

*Recolección de datos de fluorescencia.

La expresión génica se determinó utilizando el kit Mouse Fatty Acid Metabolism RT² Profiler® PCR array (PAMM007Z, SABiosciences, Qiagen). Esta matriz contiene 84 genes clave involucrados en el catabolismo, biosíntesis y transporte de ácidos grasos, cetogénesis y catabolismo de triglicéridos (**Tabla 3.5**). Para su realización se siguieron las instrucciones del fabricante usando RT² SYBR Green qPCR Mastermix y RT² Profiler PCR (SABioscience, Qiagen).

Los valores de Cycle Threshold (Ct) de todos los pocillos se exportaron para su análisis empleando el paquete Software PCR RT² Profiler™ basado en el método $\Delta\Delta CT$ que aparece disponible en la página web (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) de la casa comercial SABioscience. Los resultados de la expresión génica de este *array* comercial fueron considerados estadísticamente significativos cuando el valor de expresión de cada gen fue superior o igual a 2, o bien inferior o igual a -2 y el *p*-valor inferior o igual a 0.05.

Tabla 3.5. Lista de genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos.

Símbolo	Descripción
CATABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS	
<i>Acetil-CoA Transferasas</i>	
Acaa1a	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1A
Acaa2	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)
Acat1	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1
Acat2	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2
<i>Acil-CoA Deshidrogenasas</i>	
Acad9	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 9
Acad10	Acyl-Coenzima A dehydrogenase family, member 10
Acad11	Acyl-Coenzima A dehydrogenase family, member 11
Acadl	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain
Acadm	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain
Acads	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain
Acadsb	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain
Acadvl	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain
Ehhadh	Enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase
Gcdh	Glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase
<i>Acil-CoA Oxidasas</i>	
Acox1	Acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl
Acox2	Acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain
Acox3	Acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl
<i>Acil-CoA Sintetasas</i>	
Acsbg1	Acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1
Acsbg2	Acyl-CoA synthetase bubblegum family member 2
Acs11	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1

Acsl3	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3
Acsl4	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4
Acsl5	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5
Acsl6	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 6
Acsm2	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 2
Acsm3	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3
Acsm4	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 4
Acsm5	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5

Acil-CoA Tioesterasas

Acot2	Acyl-CoA thioesterase 2
Acot3	Acyl-CoA thioesterase 3
Acot6	Acyl-CoA thioesterase 6
Acot7	Acyl-CoA thioesterase 7
Acot8	Acyl-CoA thioesterase 8
Acot9	Acyl-CoA thioesterase 9
Acot12	Acyl-CoA thioesterase 12

Carnitina Transferasas

Cpt1a	Carnitine palmitoyltransferase 1a, liver
Cpt1b	Carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle
Cpt1c	Carnitine palmitoyltransferase 1c
Cpt2	Carnitine palmitoyltransferase 2
Crat	Carnitine acetyltransferase
Crot	Carnitine O-octanoyltransferase

Otros

Aldh2	Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial
Decr1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial
Decr2	2-4-dienoyl-Coenzyme A reductase 2, peroxisomal
Echs1	Enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial
Hadha	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit
Mcee	Methylmalonyl CoA epimerase
Mut	Methylmalonyl-Coenzyme A mutase
Eci2	Enoyl-Coenzyme A delta isomerase 2
Pecr	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase
Ppa1	Pyrophosphatase (inorganic) 1

TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRASOS

Cpt1a	Carnitine palmitoyltransferase 1a, liver
Cpt1b	Carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle
Cpt1c	Carnitine palmitoyltransferase 1c
Cpt2	Carnitine palmitoyltransferase 2
Crat	Carnitine acetyltransferase
Crot	Carnitine O-octanoyltransferase
Fabp1	Fatty acid binding protein 1, liver
Fabp2	Fatty acid binding protein 2, intestinal
Fabp3	Fatty acid binding protein 3, muscle and heart
Fabp4	Fatty acid binding protein 4, adipocyte
Fabp5	Fatty acid binding protein 5, epidermal
Fabp6	Fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin)

Slc27a1	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1
Slc27a2	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2
Slc27a3	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3
Slc27a4	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4
Slc27a5	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 5
Slc27a6	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 6

REGULACIÓN DE BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS

Prkaa1	Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit
Prkaa2	Protein kinase, AMP-activated, alpha 12 catalytic subunit
Prkab1	Protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit
Prkab2	Protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit
Prkaca	Protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha
Prkacb	Protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta
Prkag1	Protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit
Prkag2	Protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit
Prkag3	Protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit

CETOGENESIS

Bdh1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1
Bdh2	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2
Hmgcl	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase
Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1
Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2
Oxct2a	3-oxoacid CoA transferase 2A

CATABOLISMO DE TRIACILGLICÉRIDOS

Gk2	Glycerol kinase 2
Gpd1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)
Gpd2	Glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial
Gyk	Glycerol kinase
Lipe	Lipase, hormone sensitive
Lpl	Lipoprotein lipase

3.2.5. Estudio de expresión de genes relacionados con la obesidad

El estudio de la expresión de genes relacionados con la obesidad en muestras de tejido adiposo epididimal se realizó mediante un chip de ADN (array). Para extraer y purificar el ARN total a partir de células adiposas (≤ 100 mg) se utilizó el kit RNeasy Lipid Tissue Mini de columnas de centrifugación (Qiagen, Alemania), con un paso previo que consistió en añadir a la muestra 0.9 mL de trizol (Sigma-Aldrich, USA) y homogeneizar con TissueRuptor (Qiagen, Alemania). Después añadir 200 μ L de cloroformo (Sigma-Aldrich, Alemania) y agitar 15 segundos, incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y agitar 15 segundos. Centrifugar a 15000 x *g*, 10 minutos a 4 °C y tomar el sobrenadante para continuar con las instrucciones del fabricante del

kit. Para eliminar las posibles trazas de ADN genómico en las extracciones se realizó un tratamiento con ADNasa I (SABiosciences, Qiagen).

Una vez extraído el ARN se determinó su concentración y pureza utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, USA). Sólo aquellas muestras cuyos ratios de absorbancia a 260nm/230nm y 260nm/280nm fueran superiores a 1.8 se consideraron de alta pureza para ser empleadas en los procedimientos sucesivos.

Para la transcripción inversa se utilizó el kit RT² First Strand (SABioscience, Qiagen), con 1 µg de ARN total extraído de cada muestra de tejido adiposo. A continuación, el ADN complementario (ADNc) obtenido de la transcripción se empleó para analizar la expresión de los genes mediante la PCR a tiempo real (qPCR). Para esta técnica se usó un termociclador BioRad CFX 89® (BioRad, USA), cuyas condiciones quedan indicadas en la **Tabla 3.4**. La expresión de mRNA de todos los genes analizados se normalizó a β-actina de la expresión génica.

La expresión génica se determinó utilizando el kit Mouse Obesity RT² Profiler® PCR array (PAMM017Z, SABiosciences, Qiagen). Esta matriz contiene 84 genes clave relacionados con la obesidad que están directamente involucrados en la regulación de la ingesta y el gasto energético. Los genes codifican para los péptidos orexigénicos, hormonas y receptores; péptidos anorexigénicos, hormonas, receptores; y las moléculas de señalización centrales y periféricas implicadas en el gasto de energía (**Tabla 3.6**). Para su realización se siguieron las instrucciones del fabricante usando RT² SYBR Green qPCR Mastermix y RT² Profiler PCR (SABioscience, Qiagen).

Los valores de Cycle Threshold (Ct) de todos los pocillos se exportaron para su análisis empleando el paquete Software PCR RT² Profiler™ basado en el método $\Delta\Delta CT$ que aparece disponible en la página web (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) de la casa comercial SABioscience. El paquete de software web realiza automáticamente todos los cálculos de cambios de expresión basados en sus valores de Ct.

Tabla 3.6. Lista de genes involucrados en la obesidad.

Símbolo	Descripción
GENES OREXIGÉNICOS	
<i>Neuropéptidos y receptores</i>	
Adra2b	Adrenergic receptor, alpha 2b
Agrp	Agouti related protein
Cnr1	Cannabinoid receptor 1 (brain)
Gal	Galanin
Galr1	Galanin receptor 1
Mchr1 (Gpr24)	Melanin-concentrating hormone receptor 1
Hcrt	Hypocretin
Hcrtr1	Hypocretin (orexin) receptor 1
Npy	Neuropeptide Y
Npy1r	Neuropeptide Y receptor Y1
Nr3c1 (Grl1)	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
Oprk1	Opioid receptor, kappa 1
Oprm1	Opioid receptor, mu 1
Sigmar1	Sigma non-opioid intracellular receptor 1
<i>Hormona y receptor intestinal</i>	
Ghrl	Ghrelin
Ghsr	Growth hormone secretagogue receptor
GENES ANOREXIGÉNICOS	
<i>Neuropéptidos y receptores</i>	
Atrn	Attractin
Bdnf	Brain derived neurotrophic factor
Brs3	Bombesin-like receptor 3
Calca	Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha
Calcr	Calcitonin receptor
Cartpt (Cart)	CART prepropeptide
Cntfr	Ciliary neurotrophic factor receptor
Crhr1	Corticotropin releasing hormone receptor 1
Drd1a	Dopamine receptor D1A
Drd2	Dopamine receptor D2
Gh	Growth hormone
Ghr	Growth hormone receptor
Grp	Gastrin releasing peptide
Grpr	Gastrin releasing peptide receptor
Hrh1	Histamine receptor H1
Htr2c	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C
Il1a	Interleukin 1 alpha
Il1b	Interleukin 1 beta
Il1r1	Interleukin 1 receptor, type I
Il6	Interleukin 6
Il6ra	Interleukin 6 receptor, alpha
Mc3r	Melanocortin 3 receptor
Nmb	Neuromedin B
Nmbr	Neuromedin B receptor

Nmu	Neuromedin U
Nmur1 (Gpr66)	Neuromedin U receptor 1
Ntrk2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
Nts	Neurotensin
Ntsr1	Neurotensin receptor 1
Prlhr (Gpr10)	Prolactin releasing hormone receptor
Pomc	Pro-opiomelanocortin-alpha
Sort1	Sortilin 1
Trh	Thyrotropin releasing hormone
Ucn	Urocortin
Zfp91 (Cntf)	Zinc finger protein 91

Hormonas y receptores intestinales

Apoa4	Apolipoprotein A-IV
Cck	Cholecystokinin
Cckar	Cholecystokinin A receptor
Glp1r	Glucagon-like peptide 1 receptor
Pyy	Peptide YY

Péptidos y receptores derivados de los adipocitos

Lep (Leptin)	Leptin
Lepr	Leptin receptor
Tnf	Tumor necrosis factor

Péptidos y receptores derivados del páncreas

Calcr	Calcitonin receptor
Clps	Colipase, pancreatic
Gcg	Glucagon
Gcgr	Glucagon receptor
Glp1r	Glucagon-like peptide 1 receptor
Iapp	Islet amyloid polypeptide
Ins1	Insulin I
Ins2	Insulin II
Insr	Insulin receptor
Ramp3	Receptor (calcitonin) activity modifying protein 3
Sst	Somatostatin
Sstr2	Somatostatin receptor 2

GENES RELACIONADOS CON EL GASTO ENERGÉTICO

Péptidos y receptores derivados de los adipocitos

Adipoq (Acrp30)	Adiponectin, C1Q and collagen domain containing
Adipor1	Adiponectin receptor 1
Adipor2	Adiponectin receptor 2
Adrb1	Adrenergic receptor, beta 1
C3	Complement component 3
Ppara	Peroxisome proliferator activated receptor alpha
Pparg	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
Ppargc1a	Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha
Ptpn1	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1
Ucp1	Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)

Péptidos y receptores derivados del Sistema Nervioso Central

Adcyap1	Adenylate cyclase activating polypeptide 1
Adcyap1r1	Adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1
Cpd	Carboxypeptidase D
Cpe	Carboxypeptidase E
Thrb	Thyroid hormone receptor beta

3.2.6. Estudio de la microbiota intestinal mediante qPCR

El estudio de la microbiota intestinal en muestras de contenido intestinal se llevó a cabo en los laboratorios del Functional Foods Forum perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad de Turku, Finlandia. El contenido intestinal de las muestras de intestino delgado y grueso se extrajo para estudiar las poblaciones bacterianas que se muestran en la **Tabla 3.7**.

La extracción de ADN del contenido intestinal se realizó con el kit InviMag® Stool DNA/KFmL (Strattec Molecular, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza de ADN se determinó con espectrofotómetro Nanodrop-2000 (Nanodrop, USA).

Todas las muestras positivas fueron analizadas usando un equipo ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, USA). Todas las reacciones contenían 1 µL de la muestra, 12.5 µL de Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, USA) y la cantidad apropiada de cebadores (**Tabla 3.7**) en 25 µL. Las reacciones se realizaron en placas ópticas de 96 pocillos MicroAmp® (Applied Biosystems, USA) selladas con una película óptica adhesiva MicroAmp® (Applied Biosystems, USA).

En la **Tabla 3.8** se resumen las condiciones del termociclador. Constan de un paso inicial a 95°C durante 10 minutos; 40 ciclos a 95°C durante 20 segundos (15 segundos para *Bifidobacterium* genus), 53-61°C durante 20 segundos (30 segundos para *Clostridium leptum* subgroup y *Akkermansia muciniphila*; 1 minuto para *Bifidobacterium* genus) y 72°C durante 30 segundos (40 segundos para *Akkermansia muciniphila* y 50 segundos para los géneros *Bifidobacterium*, clostridois y *Staphylococcus aureus nuc* genes). Los productos fluorescentes se detectaron en el último paso de cada ciclo. El análisis de disociación final se realiza por calentamiento lento de 60 a 95 °C con la recolección de fluorescencia continua.

La curva estándar se creó usando diluciones decimales de la suspensión bacteriana de ADN correspondiente desde 10^2 a 10^7 moléculas/ μL . En la **Tabla 3.9** se indica el origen de las especies bacterianas utilizadas para ello. La concentración de bacterias en estas suspensiones se analizó con el Kit de VIVO / DEAD® BacLight® de viabilidad bacteriana (Molecular Probes, USA). La concentración bacteriana de cada muestra se calculó comparando los valores de Ct obtenidos de las curvas estándar.

Tabla 3.7. Patrones y cebadores utilizados en la investigación de los grupos microbianos.

Grupo bacteriano (estándar)	Cebadores (concentración)	Secuencia	Tª anillamiento	Referencia
<i>Bifidobacterium</i> genus (<i>B. longum</i>)	Bifido5' (0.2 µM)	GAT TCT GGC TCA GGA TGA ACG C	60 °C	Gueimonde et al., 2004
	Bifido3' (0.2 µM)	CTG ATA GGA CGC GAC CCC AT		
Bacteroides-Prevotella group (<i>B. fragilis</i>)	g-Bfra-F (0.2 µM)	ATA GCC TTT CGA AAG RAA GAT	60 °C	Matsuki et al., 2002
	g-Bfra-R (0.4 µM)	CCA GTA TCA ACT GCA ATT TTA		
<i>Escherichia coli</i>	Ecoli-F (0.25 µM)	GTT AAT ACC TTT GCT CAT TGA	60 °C	Malinen et al., 2003
	Ecoli-R (0.25 µM)	ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT		
<i>Staphylococcus aureus</i> nuc genes	NUC1 (0.25 µM)	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	55 °C	Brakstad et al., 1992
	NUC2 (0.25 µM)	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC		
<i>Clostridium</i> <i>coccoides</i> group	g-Ccoc-F (0.2 µM)	AAA TGA CGG TAC CTG ACT AA	53 °C	Matsuki et al., 2002
	g-Ccoc-R (0.2 µM)	CTT TGA GTT TCA TTC TTG CGA A		
<i>Clostridium leptum</i> subgroup	sg-Clept-F (0.3 µM)	GCA CAA GCA GTG GAG T	60 °C	Matsuki et al., 2004
	sg-Clept-R3 (0.3 µM)	CTT CCT CCG TTT TGT ACC		
<i>Lactobacillus</i> group	Lac-F (1258) (0.25 µM)	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A	60 °C	Rinttilä et al., 2004
	Lac-R (1259) (0.25 µM)	CAC CGC TAC ACA TGG AG		
<i>Enterococcus</i> spp.	Ent-F (0.25 µM)	CCC TTA TTG TTA GTT GCC ATC ATT	61 °C	Rinttilä et al., 2004
	Ent-R (0.25 µM)	ACT CGT TGT ACT TCC CAT TGT		
<i>Streptococcus tuf</i> gene	Str1 (0.25 µM)	GTA CAG TTG CTT CAG GAC GTA TC	61 °C	Picard et al., 2004
	Str2 (0.25 µM)	ACG TTC GAT TTC ATC ACG TTG		
<i>Akkermansia muciniphila</i>	AM 1 (0.2 µM)	CAG CAC GTG AAG GTG GGG AC	60 °C	Collado et al., 2007
	AM 2 (0.2 µM)	CCT TGC GGT TGG CTT CAG AT		
Bacterias totales (<i>Bifidobacterium longum</i>)	Longum5' (0.2 µM)	TTC CAG TTG ATC GCA TGG TCT TCT	50 °C	Rinne et al., 2005
	Longum3' (0.2 µM)	GGC TAC CCG TCG AAG CCA CG		

Tabla 3.8. Condiciones de tiempo y temperatura para la amplificación de los grupos microbianos.

Ciclos	Duración	Temperatura	Comentario
1	10 minutos	95 °C	Desnaturalización
40	15-20 segundos*	95 °C	Desnaturalización
	20-60 segundos*	53-61 °C*	Anillamiento
	30-50 segundos*	72 °C	Extensión

*Según grupo bacteriano.

Tabla 3.9. Especies bacterianas utilizadas para realizar las curvas estándar en la cuantificación de los diferentes grupos microbianos.

Línea	Origen
<i>Bifidobacterium</i> genus	DSM 20219
<i>Bacteroides-Prevotella</i> group	DSM 2151 ^T
<i>Escherichia coli</i>	K-12
<i>Staphylococcus aureus nuc</i> gene	DSM 20231
<i>Clostridium coccooides</i> group	DSM 935
<i>Clostridium leptum</i> subgroup	DSM 753T
<i>Lactobacillus</i> group	LGG ATCC 53103
<i>Enterococcus</i> spp.	DSM 20478
<i>Streptococcus tuf</i> gene	DSM 20617
<i>Akkermansia muciniphila</i>	ATCC BAA-835
Bacterias totales	JCM 1217

3.2.7. Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)

Los linfocitos y macrófagos del bazo se identificaron en función de sus antígenos de diferenciación (CD) mediante anticuerpos monoclonales y el empleo de citometría de flujo.

Para la clasificación de células activadas por fluorescencia, los bazos fueron depositados en tubos Falcon de poliestireno (BD, USA) con 1 mL de tampón FACS I (D-PBS, 1% suero fetal bovino, 0.1% sodium azide). El tejido se troceó y tamizó con un filtro tamizador de células de nylon con tamaño de poro 100 μm (BD, USA), vertiendo sobre él 2 mL de FACS I. La suspensión obtenida en el tubo Falcon fue recogida y centrifugada a 1000 x *g*, 10 minutos, 4 °C. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento con 1 mL de FACS I y se agitó suavemente. Se centrifugó de nuevo a 1000 x *g*, 2 minutos, 4 °C y se tiró el sobrenadante.

Los eritrocitos se lisaron por choque osmótico. Para ello, se añadieron a las muestras 500 μl de NaCl 0.2% (AppliChem Panreac, Alemania) y se agitaron durante 30 segundos. Después, se añadieron 500 μl de NaCl 1.6%, se centrifugaron inmediatamente (1000 x *g*, 2 min, 4 °C), y se eliminó el sobrenadante.

Posteriormente, se añadió 1 mL de tampón FACS I a los tubos Falcon y se agitaron suavemente para resuspender las células. Finalmente, se centrifugaron a 1000 x *g*, 2 minutos, 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Por último, se añadieron 100 μL de FACS I y se agitó suavemente.

La viabilidad celular se estimó mediante tinción con Azul Trypan (Sigma-Aldrich, Alemania) y cámara de recuento Blaubrand® (Brand, Alemania), y se ajustó la suspensión celular a 10^6 - 10^7 células/mL aproximadamente en caso necesario. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas y se les eliminó el FACS I. Por último, se añadieron unos 200 μL de FACS I a los tubos para resuspender las células.

Las poblaciones celulares objeto de estudio fueron: linfocitos B, linfocitos T (*Helper* y *Citotóxicos*), células *Natural Killer* (NK) y macrófagos. Para ajustar el citómetro con los estándares se utilizaron de forma independiente 2 μL de cada anticuerpo monoclonal (**Tabla 3.3**) con 100 μL de suspensión celular, y un control negativo con células, pero sin anticuerpos. Para las muestras, se adicionaron 2 μL de cada uno de los anticuerpos a 100 μL de la misma. Se agitaron rápida y suavemente todos los tubos. Se incubaron 15 minutos en oscuridad y hielo. Se añadieron 500 μL de tampón FACS II (D-PBS, 1% suero fetal bovino) y se agitaron brevemente.

Se centrifugaron (1000 x g, 2 min, 4 °C) y se desechó el sobrenadante. Se añadió 1 mL de FACS II y se agitaron rápidamente. De nuevo, se centrifugaron (1000 x g, 2 min, 4 °C) y se desechó el sobrenadante. Por último, se añadieron 200 µL de FACS II y se agitó rápidamente. Las muestras se conservaron en oscuridad hasta el momento de adquirir con citómetro de flujo BD FACSCalibur® con doble láser para 4 canales (BD, USA). Finalmente, se analizaron las muestras con el software BD CellQuest Pro, versión 5.1 (BD, USA) obteniendo las proporciones de las distintas poblaciones celulares estudiadas.

Tabla 3.3. Anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos.

Población celular	Anticuerpo	Referencia*
Marcador panleucocitario	CD45 FITC	553080 RUO
Linfocitos Th	CD4 PE	553652 RUO Isotipo IgG2a,k
Linfocitos B	CD19 PerCP-Cy5.5	551001 RUO
Linfocitos Tc	CD8a APC	553035 RUO
Linfocitos NK	NK1.1 PE	557391 RUO
Macrófagos	CD11b APC	553312 RUO

*Becton, Dickinson and Company, USA

3.2.8. Cytometric Bead Array (CBA)

Para el análisis de citoquinas en las muestras de plasma, mediante la técnica BD™ Cytometric Bead Assay (CBA), se siguió el protocolo descrito por el fabricante del kit de citoquinas para ratón Th1/Th2/Th17 (BD, USA). Las citoquinas estudiadas fueron: interleuquina 2 (IL-2), interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 6 (IL-6), interferón γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina 17A (IL-17A) e interleuquina 10 (IL-10). La adquisición de las muestras se realizó con citómetro de flujo BD FACSCalibur® con doble láser para 4 canales (BD, USA) con el software BD CellQuest Pro, versión 5.1 (BD, USA) y el análisis de datos se llevó a cabo con el software FCAP Array® (BD, USA).

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los tratamientos estadísticos de los datos se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 19.0 Inc., (IBM, USA). Se llevó a cabo un análisis descriptivo expresando los datos en forma de valor medio y error típico (SEM). Para determinar la existencia de posibles diferencias entre las variables de estudio entre los tres grupos, se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, empleando un intervalo de confianza del 95%, considerando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ y un test de separación de medias (*post hoc*), seleccionando el test de Tukey en aquellos casos en los que existía homogeneidad de varianzas y el test de Games-Howell cuando no existía dicha homogeneidad. Además, se realizó una comparación entre las medias de ciertos datos (cantidad y energía ingeridas procedentes de los alimentos infantiles y del pienso) de los grupos A y B mediante la prueba *t* de Student con un nivel de significación de $p < 0.05$, con el fin de detectar posibles diferencias producidas por las distintas dietas. Para la asociación de variables se realizaron correlaciones de Pearson o Spearman, según procediera, considerando correlaciones estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$. Para todos los análisis, *p* valores entre 0.05 y 0.1 se interpretaron como tendencias.

Para el análisis estadístico de los datos relativos a las curvas de crecimiento y otras monitorizaciones periódicas (energía consumida semanalmente), se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, con medidas repetidas en un factor.

Debido a que los grupos de estudio no siguieron una distribución normal en cuanto a las poblaciones microbianas y no cumplieron la condición de homogeneidad de varianzas, se aplicaron pruebas no paramétricas para evaluar la influencia de la alimentación en la composición de la microbiota fecal. Los resultados de la cuantificación de las poblaciones microbianas en contenido intestinal de ratones se representaron en diagramas de cajas y bigotes. Se realizó el test de Kruskal Wallis sobre medianas de los tres grupos de estudio y múltiples test de Mann Witney por pares corrigiendo la significación por el método de Bonferroni (α/n). Para contrastar los porcentajes de muestras positivas para cada grupo microbiano en los tres grupos de estudio, se llevó a cabo un test de Fisher.

Capítulo 4. Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CRECIMIENTO: curva de crecimiento, datos morfométricos y dietéticos

La **Figura 4.1** muestra la curva de crecimiento de los tres grupos de estudio, la cual expresa la evolución semanal del peso de los ratones. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con medidas repetidas en un factor. El peso de los ratones incrementó significativamente durante el periodo de intervención en los tres grupos de estudio ($p < 0.001$). Además, el aumento de peso fue dependiente del tipo de dieta ($p < 0.001$). El mayor crecimiento fue para los grupos A y B, con respecto al grupo C. Observamos que, aunque entre los grupos A y B las diferencias no fueron significativas, el grupo A siempre presenta mayores valores de crecimiento.

Tras realizar un ANOVA de una vía, para cada semana, se vio que al comienzo del período de intervención no se observaron diferencias significativas entre grupos en el peso corporal ya que los pesos oscilaron entre 7.86 ± 0.38 y 8.09 ± 0.36 gramos. Por el contrario, sí se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) a partir de la quinta semana de vida, ya que en los grupos A y B se produjo un aumento de peso mayor que en el grupo C.

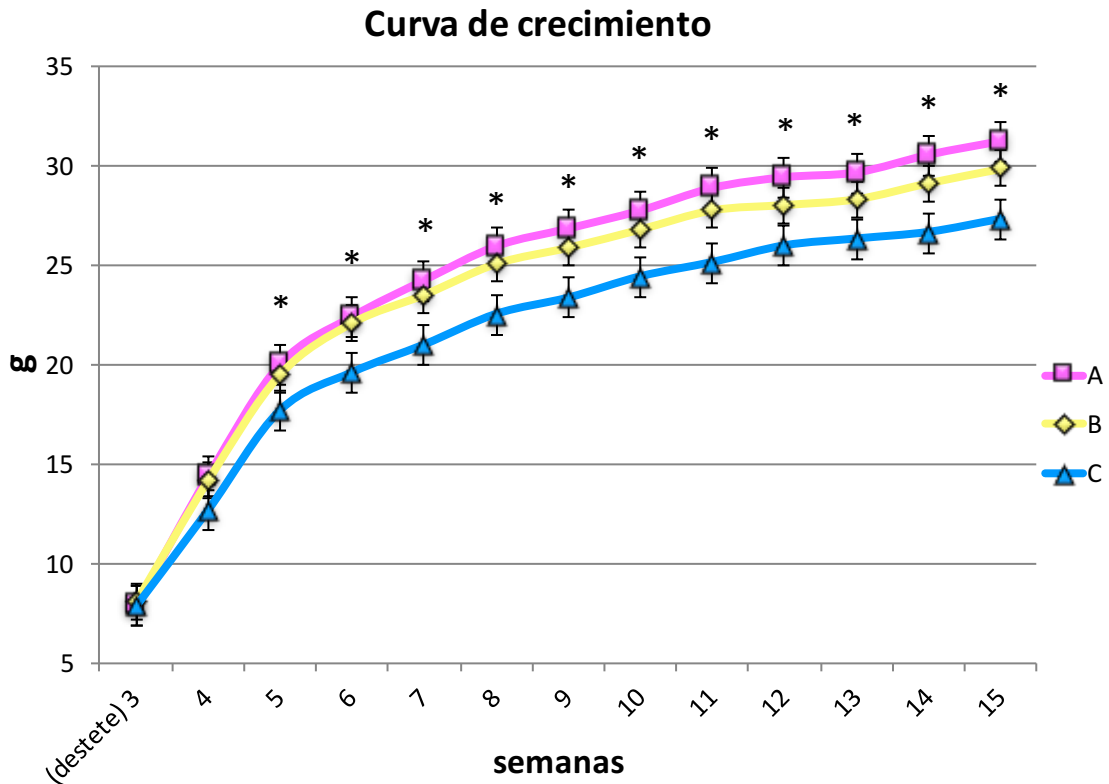


Figura 4.1. Curva de crecimiento (g) a lo largo de las 12 semanas de estudio. *Los puntos con asterisco muestran diferencias significativas entre grupos tras realizar un ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

En la **Tabla 4.1** se muestran las medidas corporales alcanzadas al final del periodo de intervención. Las medidas corporales comprenden el peso y la longitud corporal, el índice de masa corporal (IMC), la tasa de crecimiento diario tras el destete y el peso del hígado inmediatamente después de su disección.

En la **Tabla 4.1** se observa que los grupos A y B alcanzaron significativamente mayor peso corporal (C vs. B, $p=0.008$; C vs. A, $p<0.001$), índice de masa corporal (C vs. B, $p=0.002$; C vs. A, $p<0.001$) y ratio de crecimiento diario tras el destete (C vs. B, $p=0.012$; C vs. A, $p<0.001$) comparados con el grupo C. Se encontró que la longitud corporal del grupo A tendía a ser mayor que la del grupo C (C vs. A, $p=0.055$).

Tabla 4.1. Valores medios de los parámetros morfométricos obtenidos al final del periodo de intervención (15ª semana de vida).

Parámetros morfométricos	A	B	C
Peso corporal (g)	31.23 ± 0.40 ^a	29.87 ± 0.44 ^a	27.31 ± 0.75 ^b
Longitud corporal (mm)	98.14 ± 0.52	97.34 ± 0.67	96.25 ± 0.44
IMC (kg/m ²)	3.24 ± 0.03 ^a	3.15 ± 0.03 ^a	2.94 ± 0.06 ^b
Ratio crecimiento post-destete (g/d)	0.28 ± 0.01 ^a	0.26 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.01 ^b
Peso del hígado (g)	1.48 ± 0.06	1.51 ± 0.18	1.36 ± 0.05

^aLos valores se expresan como media ± SEM (n=12 por grupo) por ratón.

a,b,c. Los valores con diferentes letras muestran diferencias significativas entre grupos tras realizar un ANOVA de una vía (p <0.05).

La **Tabla 4.2** recoge los valores obtenidos sobre la ingesta media diaria (consumo) de las dietas, expresada por Unidad Experimental, para los tres grupos. La ingesta media diaria comprende la cantidad de comida total y desglosada en función de su procedencia (alimento infantil o pienso), energía total y desglosada, proteína, grasa total y desglosada en función de si fueron ácidos grasos saturados (SFA) o insaturados (UFA), fibra, hidratos de carbono y sodio.

A pesar de que todos los grupos se alimentaron *ad libitum*, se observaron diferencias significativas entre grupos respecto a la ingesta. Los grupos A y B mostraron una cantidad total de comida ingerida mayor que el grupo C. Estas diferencias suponen un incremento de un 136 y 102%, respectivamente, con respecto al grupo C (**Figura 4.2**). Estos dos grupos de ratones mostraron una preferencia significativa por los alimentos infantiles sobre el pienso, siendo el grupo A el que ingirió mayor cantidad de alimento infantil comparado con el grupo B (p=0.033). Las cantidades de pienso ingeridas por los grupos A y B no fueron diferentes.

Sin embargo, el grupo C presentó el mayor consumo de energía total. Esto supone que el grupo A ingirió aproximadamente un 12% menos energía total que el grupo C; y que el grupo B ingirió significativamente un 33% menos (**Figura 4.3**). Las diferencias de energía ingerida por los grupos A y B se debieron a la energía procedente de los alimentos infantiles, siendo el grupo A el que ingirió más energía procedente del alimento infantil (p<0.001) (**Tabla 4.2**). Además, la energía procedente de los alimentos infantiles supuso el 70 y 55% de la energía total ingerida por los grupos A y B, respectivamente, durante las 12 semanas de intervención (**Figura 4.4**).

Con respecto a los nutrientes, el grupo A consumió más grasa total (p=0.016) y sodio (p<0.001) que el grupo B, y éste a su vez cantidades significativamente mayores que el grupo C

($p=0.009$ y $p=0.002$, respectivamente). Sin embargo, el tipo de grasa ingerido de forma mayoritaria, para todos los grupos, fueron UFAs, siendo estos valores mayores en los grupos A y B, respecto al grupo C. El grupo C ingirió significativamente más carbohidratos que el grupo A, y éste a su vez significativamente más que el grupo B. Los grupos A y C ingirieron significativamente más proteína que el grupo B; y entre ambos grupos, los valores del grupo C mostraron una tendencia a ingerir más proteínas que el grupo A ($p=0.066$). La cantidad de fibra consumida fue significativamente mayor en el grupo C, sin diferencias entre los grupos A y B.

Tabla 4.2. Valores medios de la ingesta de comida, energía y macronutrientes.

Ingesta	A	B	C
Cantidad total (g/d)	14.90 ± 0.63 ^a	12.74 ± 0.83 ^a	6.31 ± 0.22 ^b
<i>Cantidad procedente del alimento infantil (g/d)</i>	13.20 ± 0.61*	10.85 ± 0.73*	-
<i>Cantidad procedente del pienso (g/d)</i>	1.70 ± 0.13	1.98 ± 0.19	-
Energía total (Kcal/d)	17.18 ± 0.71 ^a	13.12 ± 0.92 ^b	19.56 ± 0.69 ^a
<i>Energía procedente del alimento infantil (kcal/d)</i>	11.92 ± 0.55*	7.33 ± 0.49*	-
<i>Energía procedente del pienso (kcal/d)</i>	5.26 ± 0.42	5.85 ± 0.59	-
Proteína (g/d)	0.84 ± 0.03 ^a	0.66 ± 0.05 ^b	0.91 ± 0.03 ^a
Grasa total (g/d)	0.48 ± 0.02 ^a	0.37 ± 0.02 ^b	0.25 ± 0.01 ^c
<i>SFA (g/d)</i>	0.12 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.00 ^b	0.05 ± 0.00 ^c
<i>UFA (g/d)</i>	0.35 ± 0.02 ^a	0.30 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.01 ^b
Fibra (g/d)	0.14 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.01 ^b	0.28 ± 0.01 ^a
Hidratos de carbono (g/d)	2.55 ± 0.11 ^b	1.96 ± 0.15 ^c	4.03 ± 0.14 ^a
Sodio (mg/d)	23.99 ± 1.03 ^a	14.17 ± 0.93 ^b	8.20 ± 0.28 ^c

¹Los valores se expresan como media ± SEM (n=6 por grupo) por Unidad Experimental.

a,b,c. Los valores con diferentes letras muestran diferencias significativas entre grupos tras realizar un ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

*Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba t para muestras independientes entre los grupos A y B ($p < 0.05$).

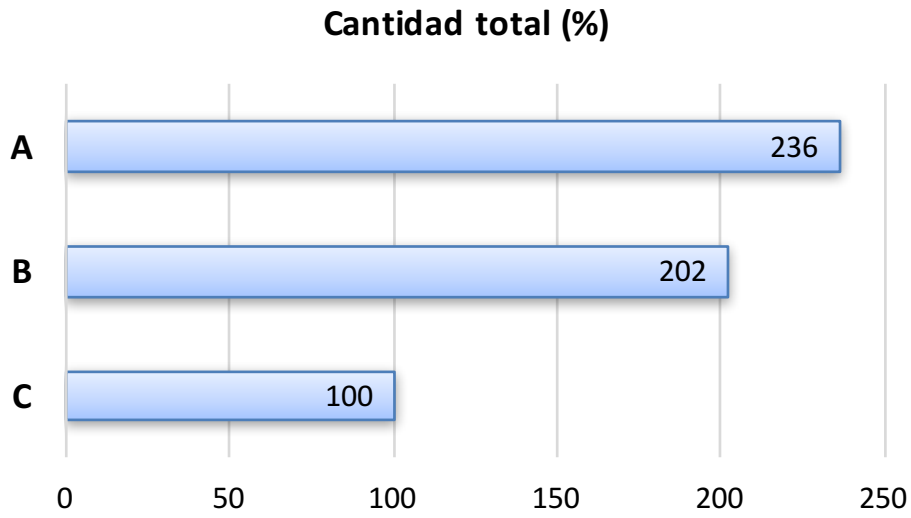


Figura 4.2. Porcentaje de la cantidad total de comida consumida por los grupos A, B y C. El grupo C se consideró como referencia (100%).

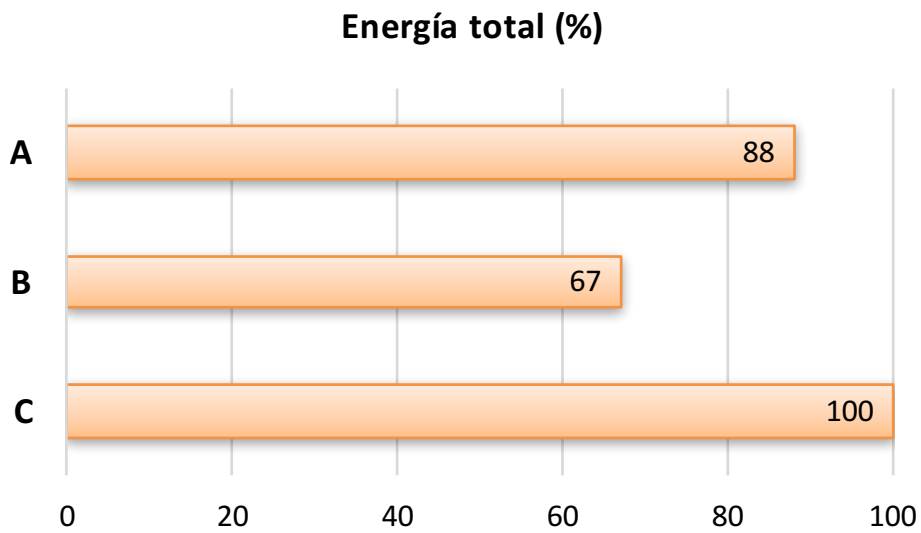


Figura 4.3. Porcentaje de la energía total consumida por los grupos A, B y C. El grupo C se consideró como referencia (100%).

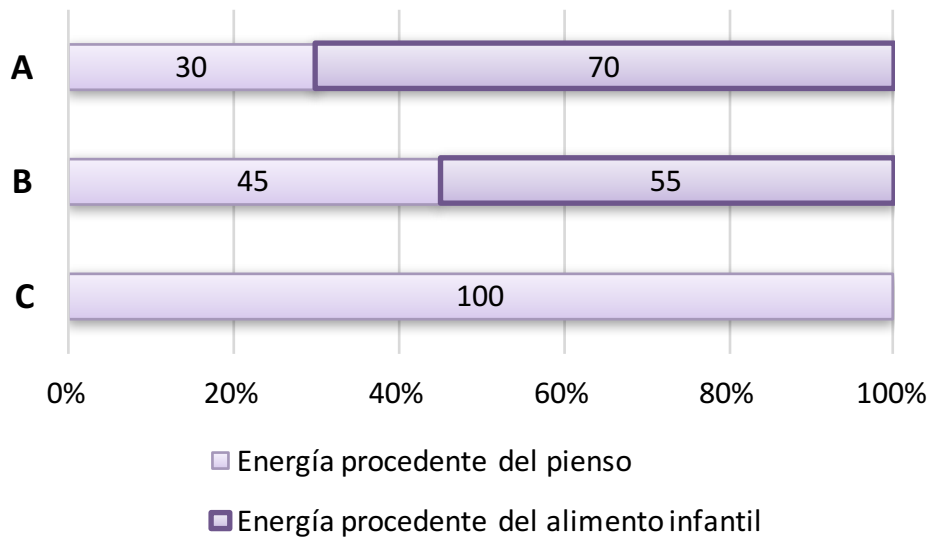


Figura 4.4. Porcentajes de la energía procedente del pienso y de los alimentos infantiles de los grupos A, B y C.

La **Figura 4.5**, **Figura 4.6** y **Figura 4.7** muestran la ingesta media diaria de energía de las dietas a lo largo de las 12 semanas de estudio, expresada por Unidad Experimental. Estas figuras comprenden la energía total (**Figura 4.5**), la energía procedente del pienso (**Figura 4.6**) y la energía procedente de los alimentos infantiles (**Figura 4.7**).

Al igual que ocurría con la curva de crecimiento, según vemos en la **Figura 4.5**, a lo largo de las 12 semanas, se produce un incremento significativo en la ingesta energética en los tres grupos de estudio ($p < 0.001$). Además, la ingesta dietética fue dependiente del tipo de dieta, con un nivel de significación de $p < 0.001$, siendo mayor la ingesta energética en el grupo C con respecto a las otras dietas, y la ingesta energética de la dieta A mayor que la B.

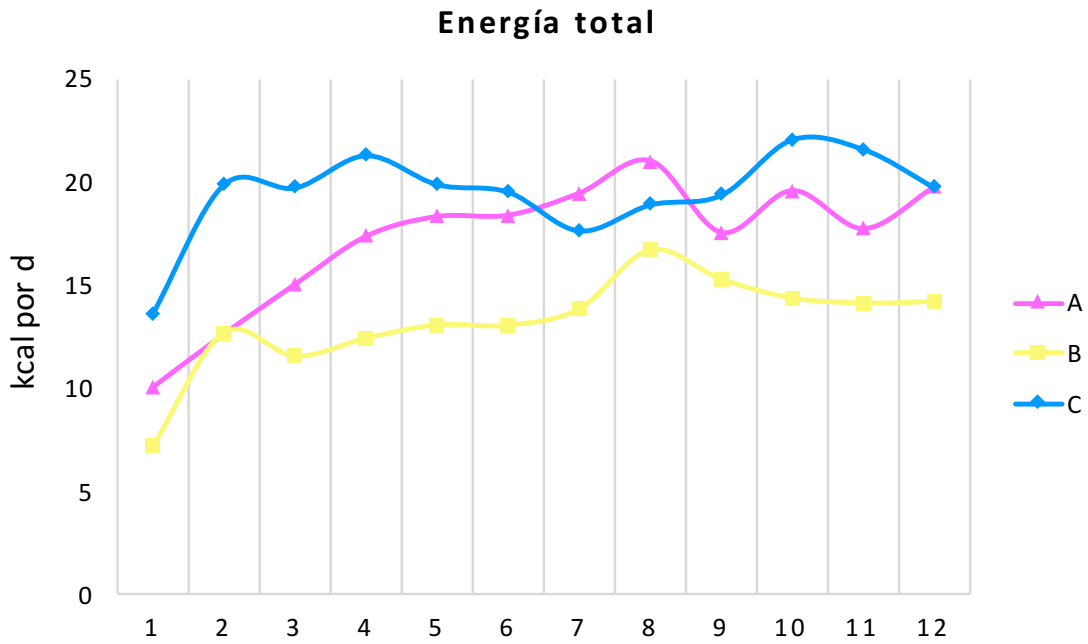


Figura 4.5. Representación gráfica de la ingesta media diaria de energía total (Kcal/d) a lo largo de las 12 semanas de estudio. Se realizó un ANOVA de dos vías, con medidas repetidas en un factor ($p < 0.05$).

En la **Figura 4.6** se observa que la energía ingerida procedente del pienso, a lo largo de todo el período, fue lógicamente superior en el grupo C ya que este a grupo sólo se le suministró el pienso. Entre los grupos B y A no existieron diferencias estadísticamente significativas, con carácter general, a lo largo del período.

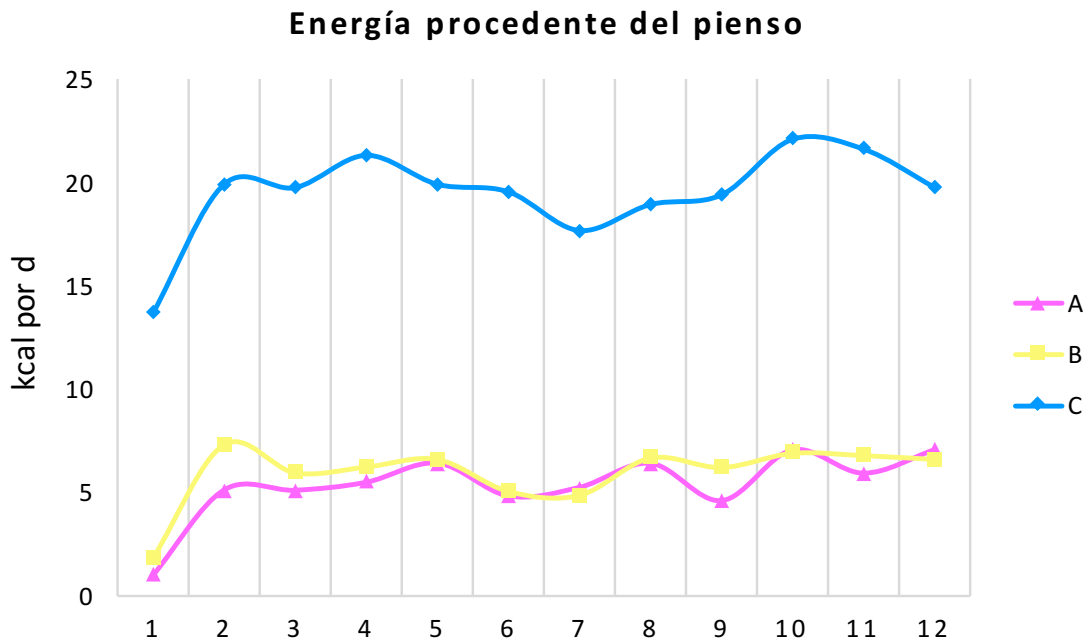


Figura 4.6. Representación gráfica de la ingesta media diaria de energía procedente del pienso (Kcal/d) a lo largo de las 12 semanas de estudio. Se realizó un ANOVA de dos vías, con medidas repetidas en un factor ($p < 0.05$).

Según los datos de la **Figura 4.7**, se produce un incremento significativo en la ingesta energética procedente del alimento infantil durante el periodo de intervención en los grupos A y B ($p < 0.001$). Además, la ingesta energética fue dependiente del tipo de dieta, con un nivel de significación de $p < 0.001$, siendo mayor la ingesta en el grupo A con respecto al grupo B.

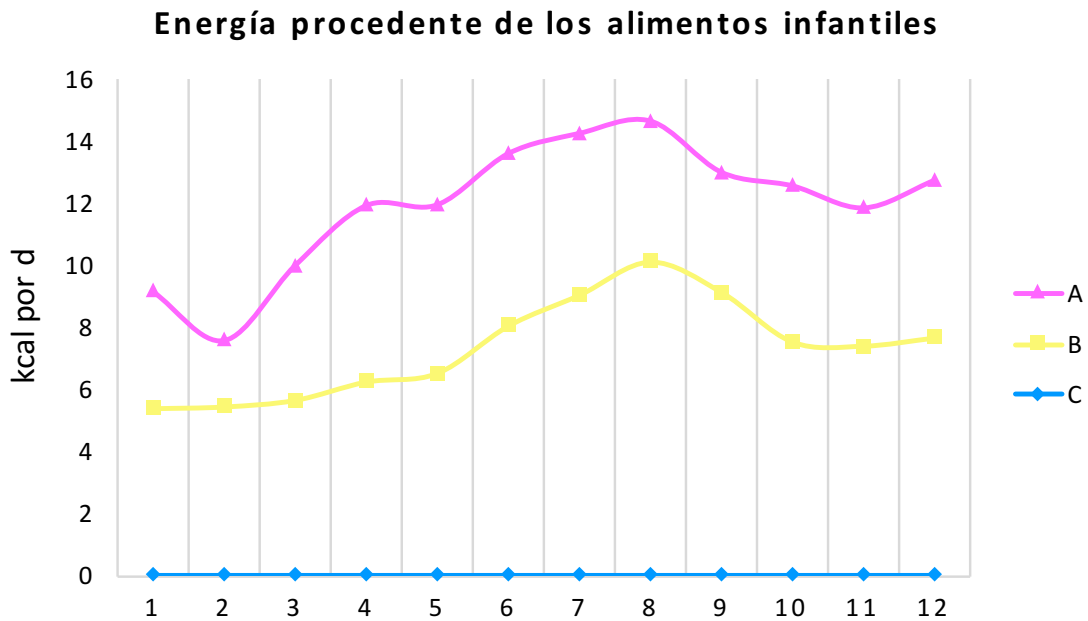


Figura 4.7. Representación gráfica de la ingesta media diaria de energía procedente de los tarritos (Kcal/d) a lo largo de las 12 semanas de estudio. Se realizó un ANOVA de dos vías, con medidas repetidas en un factor ($p < 0.05$).

El consumo de pienso se mantuvo más o menos constante en todos los grupos desde la tercera semana, mientras que en los grupos A y B hubo un incremento significativo de la ingesta de alimento infantil ($p < 0.001$) durante las 12 semanas de estudio, siendo mayor ese incremento en el grupo A.

El crecimiento de los ratones desde la quinta semana de vida, el IMC final y el ratio de crecimiento tras el destete encontrados en este estudio, demuestran que los ratones de los grupos A y B han sufrido un crecimiento acelerado con respecto al grupo C. Además, la cantidad total de alimento infantil ingerido por los grupos A y B puede estar relacionada con este mayor crecimiento, siendo más acentuado en el grupo A. Sin embargo, esto no parece concordar con la energía total ingerida, porque los grupos A y C obtuvieron la misma cantidad de calorías por día y el grupo B obtuvo menos calorías (**Tabla 4.2**). Este hecho puede ser explicado desde el punto de vista de que la energía del pienso sería menos disponible que la de los alimentos infantiles debido a factores tales como un mayor contenido de fibra del pienso y una proteína con diferente origen y digestibilidad (vegetal vs. animal). Por lo tanto, la energía procedente de

los alimentos infantiles puede representar una fuente de energía diferente y relevante en el crecimiento de los grupos A y B, particularmente el alimento infantil A.

Con respecto a los macronutrientes, de forma general, el grupo A ingirió mayores cantidades que el grupo B, sin embargo, el grupo C ingirió las mayores cantidades de proteínas, fibra e hidratos de carbono (**Tabla 4.2**). En este sentido, la grasa total ingerida puede ser el macronutriente que causó el mayor crecimiento e IMC en los grupos A y B, siendo más acentuado, de nuevo, en el grupo A. La grasa, además de ser la fuente de energía más concentrada (9 kcal/g), es responsable de la sobre ingesta de los alimentos que la contienen por la satisfacción (sensación agradable) que produce (Montmayeur and le Coutre, 2010). La sal también confiere una alta palatabilidad a los alimentos. Estos hechos pueden explicar la mayor preferencia en el consumo de los grupos A y B, sobre todo para el grupo A. Bayol *et al.* (2007), en su estudio usando “dieta de cafetería”, mostró que las ratas desarrollaron hiperfagia y una marcada preferencia por la comida alta en grasa, azúcar y sal sobre el pienso para roedores, lo cual fue asociado con un incremento del peso corporal y una tendencia hacia la obesidad. Este hecho también sucede en el ser humano (Bayol *et al.*, 2007).

Por otro lado, las proteínas también pueden jugar un papel importante en el crecimiento. Durante la infancia, la ganancia de peso acelerada tras el nacimiento se asocia con aumentos de la masa grasa, obesidad posterior y otros efectos adversos, como el riesgo de enfermedad cardiovascular (CDV) (Ong *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2011; Koletzko *et al.*, 2012). Este fenómeno se conoce como “hipótesis de crecimiento acelerado postnatal”, el cual forma parte de la teoría de la programación nutricional temprana a largo plazo (“Early Nutrition Programming of Long-Term Health”) (Koletzko *et al.*, 2012). Establece que el aumento rápido de peso postnatal puede ser el resultado de una alta ingesta de nutrientes que estimulan tal crecimiento. Las evidencias científicas disponibles sugieren que una alta ingesta de proteínas conduce a un aumento de la adipogénesis y un aumento de peso (Koletzko *et al.*, 2012; Socha *et al.*, 2011, Rolland *et al.*, 1995).

Los resultados mostraron que el grupo C ingirió la mayor cantidad de proteínas, pero este hecho no parece estar de acuerdo con el peso alcanzado y la evidencia antes mencionada sobre la proteína. Sin embargo, teniendo en cuenta que el valor nutricional de la proteína vegetal junto con la probable presencia de inhibidores de la tripsina, taninos, fitatos y otros compuestos antinutricionales en los cereales que componen los piensos para animales, podrían causar reducciones sustanciales en la digestibilidad de las proteínas y aminoácidos (Gilani *et al.*, 2012), resultando en una reducción de la calidad de la proteína ingerida por el grupo C.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que el grupo C ingirió mayor cantidad de proteínas, hidratos de carbono y fibra que los grupos A y B, junto con el hecho de que los grupos A y B ingirieron mayor cantidad de grasa que el grupo C (**Tabla 4.2**), puede concluirse que el aumento de peso encontrado en los ratones este estudio se puede atribuir principalmente a la grasa, y este nutriente puede ser un factor de "programación" en el crecimiento rápido.

4.2 RELACIÓN ENTRE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA Y LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS

La **Tabla 4.3** recoge los valores obtenidos sobre la ingesta media diaria (consumo) de los ácidos grasos presentes en las dietas, expresada por Unidad Experimental, para los tres grupos. La ingesta media diaria comprende la cantidad total (tarrito + pienso) de los distintos ácidos grasos, el ratio linoleico/linolénico ($\omega 6/\omega 3$), el total de omega 6 (o ácido linoleico), el total de omega 3 (o ácido linolénico), el total de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y el total de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).

Al igual que ocurre con la ingesta de grasa total, SFA y UFA (**Tabla 4.2**), se observan diferencias significativas entre grupos. El grupo A ingirió la mayor cantidad de ácido palmítico, palmitoleico, esteárico y oleico ($\Sigma 0.3544$ g/d), siendo el ácido oleico el más abundante para este grupo (0.2143 ± 0.0094 g/d). El grupo B ingirió las mayores cantidades de ácido linolénico, araquídico y eicosenoico ($\Sigma 0.0198$ g/d), sin embargo, los ácidos grasos más representativos para este grupo fueron el oleico y linoleico ($\Sigma 0.2417$ g/d). Los consumos de los ácidos laurico, mirístico y behénico fueron lógicamente superiores en el grupo C, dado que estos ácidos grasos sólo están presentes en el pienso ($\Sigma 0.0006$ g/d). Sin embargo, el ácido graso más representativo para este grupo fue ácido linoleico (0.1477 ± 0.0051 g/d), cuya ingesta fue significativamente superior a los otros dos grupos, por los altos niveles de este ácido graso en el pienso. No se encontraron diferencias significativas en el ratio linoleico/linolénico.

Tabla 4.3. Valores medios de la ingesta de ácidos grasos presentes en la dieta.

Ingesta total (g/d)	A	B	C
Laurico (C12:0)	0.0001 ± 0.0000 ^b	0.0001 ± 0.0000 ^b	0.0004 ± 0.0000 ^a
Mirístico (C14:0)	0.0000 ± 0.0000 ^b	0.0000 ± 0.0000 ^b	0.0001 ± 0.0000 ^a
Palmítico (C16:0)	0.0954 ± 0.0041 ^a	0.0511 ± 0.0034 ^b	0.0404 ± 0.0014 ^b
Palmitoleico (C16:1)	0.0211 ± 0.0010 ^a	0.0098 ± 0.0007 ^b	0.0001 ± 0.0000 ^c
Esteárico (C18:0)	0.0236 ± 0.0011 ^a	0.0198 ± 0.0013 ^a	0.0044 ± 0.0002 ^b
Oleico (C18:1n9c)	0.2143 ± 0.0094 ^a	0.1227 ± 0.0080 ^b	0.0510 ± 0.0018 ^c
Linoleico (C18:2n6c) (total ω6)	0.1004 ± 0.0044 ^b	0.1190 ± 0.0081 ^b	0.1477 ± 0.0051 ^a
Linolénico (C18:3n3α) (total ω3)	0.0108 ± 0.0033 ^{ab}	0.0178 ± 0.0012 ^a	0.0088 ± 0.0003 ^b
Araquídico (C20:0)	0.0015 ± 0.0001 ^b	0.0100 ± 0.0007 ^a	0.0006 ± 0.0000 ^c
Eicosaenoico (C20:1n9)	0.0026 ± 0.0001 ^b	0.0098 ± 0.0007 ^a	0.0000 ± 0.0000 ^c
Behénico (C22:0)	0.0000 ± 0.0000 ^b	0.0000 ± 0.0000 ^b	0.0001 ± 0.0000 ^a
Linoleico/Linolénico (ω6/ω3)	9.9413 ± 1.8312	8.6084 ± 1.4558	10.0441 ± 2.1093
MUFA	0.2446 ± 0.1085 ^a	0.1629 ± 0.0107 ^b	0.0459 ± 0.0016 ^c
PUFA	0.1096 ± 0.0048 ^b	0.1386 ± 0.0094 ^{ab}	0.1606 ± 0.0056 ^a

¹Los valores se expresan como media ± SEM (n=6 por grupo) por Unidad Experimental.

a,b,c. Los valores con diferentes letras muestran diferencias significativas entre grupos en el ANOVA de una vía (p<0.05).

Los parámetros bioquímicos plasmáticos se muestran en la **Tabla 4.4**. La concentración de triglicéridos fue mayor para el grupo C, y menor para el grupo B, con valores intermedios para el grupo A. Además, se observó una tendencia de la mayor concentración del grupo C sobre el A (CvsA, p=0.066). Tanto el colesterol total como el LDL-colesterol presentaron los mayores valores significativos para el grupo A, seguido por el grupo B y, por último, el grupo C. Las concentraciones de HDL-colesterol y VLDL-colesterol no presentaron diferencias significativas entre grupos. Sin embargo, se observó una tendencia de la mayor concentración de HDL-colesterol del grupo A sobre el grupo C (Cvs.A, p=0.079). El índice aterogénico fue significativamente mayor para el grupo A y menor para el grupo C, con valores intermedios para el grupo B. Las enzimas hepáticas AST y ALT no mostraron diferencias significativas entre grupos.

A pesar de que los valores plasmáticos de glucosa no fueron significativamente diferentes entre los tres grupos, y por lo tanto no se vieron afectados por la dieta, muestran

valores elevados en todos los grupos, lo que suele asociarse al estrés provocado en la manipulación de los animales en los momentos previos al sacrificio.

Las concentraciones de urea, albúmina y proteínas totales no presentaron diferencias significativas entre grupos.

Tabla 4.4. Parámetros bioquímicos y enzimas hepáticas analizados en las muestras de plasma de los tres grupos experimentales al final del período de intervención.

	A	B	C
Triglicéridos (mg/dl)	74.25 ± 5.93 ^{ab}	58.19 ± 6.70 ^b	135.65 ± 21.57 ^a
Colesterol (mg/dl)	104.93 ± 4.62 ^a	98.03 ± 4.48 ^{ab}	89.21 ± 2.34 ^b
HDL Colesterol (mg/dl)	67.75 ± 3.06	65.38 ± 2.49	58.51 ± 1.69
LDL Colesterol (mg/dl)	28.20 ± 1.80 ^a	23.52 ± 1.49 ^{ab}	21.77 ± 1.53 ^b
VLDL Colesterol (mg/dl)	8.97 ± 0.87	9.13 ± 1.54	8.93 ± 1.46
Índice aterogénico (TC/HDL-C)	37.17 ± 1.69 ^a	32.65 ± 2.25 ^{ab}	30.70 ± 0.99 ^b
Glucosa (mg/dl)	247.57 ± 9.85	239.05 ± 10.02	245.44 ± 13.14
Urea (mg/dl)	55.85 ± 3.22	49.38 ± 2.42	52.54 ± 2.12
Albúmina (g/dl)	2.27 ± 0.07	2.33 ± 0.15	2.49 ± 0.13
Proteínas Totales (g/dl)	4.63 ± 0.08	4.71 ± 0.17	4.65 ± 0.13
AST (U/l)	210.35 ± 49.20	157.68 ± 23.40	207.51 ± 92.82
ALT (U/l)	50.25 ± 9.00	57.65 ± 8.47	65.90 ± 12.30

¹Los valores se expresan como media ± SEM (n=12 por grupo).

a,b,c. Los valores con diferentes letras muestran diferencias significativas entre grupos tras realizar un ANOVA de una vía (p <0.05).

Cada uno de los ácidos grasos saturados (SFA) afecta de manera diferente a las concentraciones de las fracciones lipoproteicas de colesterol plasmáticas. Esto se ve reflejado principalmente en el grupo A dada su mayor ingesta de ácido palmítico y que los niveles de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol (tendencia A>C) e índice aterogénico fueron significativamente más elevados. Es sabido que los ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) incrementan el colesterol total, el LDL-colesterol, el HDL-colesterol y modifican el índice aterogénico, mientras que el ácido esteárico (C18:0) no tiene este efecto (FAO & FINUT, Mensink *et al.*, 2003). Con respecto a los MUFAs, el ácido oleico tampoco posee estos efectos sobre las fracciones lipoproteicas (FAO & FINUT, 2012), aunque haya sido el ácido graso más consumido por el grupo A.

El grupo C tuvo la mayor ingesta de PUFAs (sobre todo de ácido linoleico) e hidratos de carbono y los menores niveles de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol (tendencia A>C) e índice aterogénico. Hay evidencia convincente de que sustituir los SFA (C12:0-C16:0) por ácidos grasos insaturados (UFAs) disminuye la concentración de colesterol total, LDL-colesterol y el índice aterogénico, siendo este efecto mucho más acentuado para los PUFAs (principalmente el ácido linoleico) (Mensink *et al.*, 2003; Mozaffarian y Clarke, 2009). Además, al sustituir los SFA por hidratos de carbono se da este mismo efecto y también disminuye el HDL-colesterol (Grasas y ácidos grasos en nutrición humana, Consulta de expertos, 2008, 2012). Al igual que algunos SFA antes mencionados (los ácidos esteárico y oleico), el ácido linolénico tampoco ~~ejere~~ parece afectar a ninguna influencia en las concentraciones de las fracciones lipoproteicas en plasma (Balk *et al.*, 2006).

Aunque haya insuficiente evidencia para la relación entre el consumo de UFAs y el peso corporal, los grupos A y B presentaron tanto los mayores consumos de UFAs como los mayores pesos corporales. Por otro lado, existen pruebas convincentes de que los sujetos que mantienen un peso saludable tienen menos probabilidades de desarrollar una proporción aumentada de su índice aterogénico (Whitlock *et al.*, 2009).

La relación entre la concentración de triglicéridos plasmáticos en ayunas puede ser modificada de forma transitoria por la dieta, entre otros factores (NCEP-3, 2001). Para justificar los altos niveles de triglicéridos del grupo C, sin estar asociados a aumento de VLDL-colesterol ni descensos de HDL colesterol (propios de la dislipemia aterogénica), ¿encontramos que existen pruebas convincentes de que el reemplazo de las SFAs o de UFAs *cis* C18 por carbohidratos aumenta los triglicéridos plasmáticos? en ayunas (Mensink *et al.*, 2003). Por otro lado, las dietas bajas en grasa (por debajo del 20% de ingesta de energía) y mayor proporción de hidratos de carbono, reducen los niveles de LDL-colesterol y HDL-colesterol, y aumentan los triglicéridos en ayunas (FAO-WHO, 2008; IOM 2002/2005; AHANC, 2006; Mensink *et al.*, 2003). Todo esto podría justificar los valores de triglicéridos encontrados en el grupo C, dado que ingirieron relativamente más hidratos de carbono y menos SFAs y UFAs *cis* C18, que los grupos A y B, y la energía procedente de la grasa del pienso fue del 12%, (frente al 31 y 36% de los grupos A y B, respectivamente). Además. Sin embargo, el índice aterogénico es un marcador lipídico más fuerte para estimar el riesgo de CVD relacionado con el factor dieta, ya que las diferencias en esta proporción dentro y entre las poblaciones se deben en su mayoría a factores de relacionados con el estilo de vida, tales como la (dieta, la actividad física, la obesidad y/o el consumo de alcohol) (Lewington *et al.*, 2007).

4.3. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN TEJIDO ADIPOSO, CORRELACIONES CON LA INGESTA Y EFECTOS METABÓLICOS

En la **Tabla 4.5** se presentan las abundancias relativas (%) de los ácidos grasos presentes en el tejido adiposo epididimal, expresadas por ratón, para los tres grupos de estudio al final del periodo de intervención. Estos datos comprenden los distintos ácidos grasos, el total de SFA, total de MUFA, total de PUFA, total de omega 3 (o ácido linolénico), total de omega 6 (ácido linoleico + ácido eicosatrienoico) y ratio $\omega 6/\omega 3$.

Para una mejor visualización de los datos de la **Tabla 4.5**, se han representado las abundancias relativas de los SFA, MUFA y PUFA del tejido adiposo en la **Figura 4.8**, y las abundancias relativas de cada ácido graso en la **Figura 4.9**.

Al igual que sucedía con los ácidos grasos ingeridos (**Tabla 4.4**), los ácidos grasos encontrados en tejido adiposo presentaron diferencias significativas entre grupos. Los MUFA fueron los más abundantes en los tres grupos de estudio, debido al ácido oleico mayoritariamente, con diferencias significativas entre ellos, siendo el mayor porcentaje para el grupo A, seguido del grupo B y el menor porcentaje fue para el grupo C. Los SFA aparecieron en mayor porcentaje en el grupo C, seguido del grupo A y por último el grupo B, debiéndose estas diferencias mayoritariamente al ácido palmítico en los tres grupos. En el caso de los PUFA, el grupo C volvió a presentar un porcentaje significativamente superior, pero esta vez seguido por el grupo B y después el grupo A, siendo estos porcentajes debidos al ácido linoleico en los tres grupos. Las mayores proporciones de omega 3 y omega 6 fueron para el grupo control, seguido del grupo B y después el grupo A. No se encontraron diferencias entre grupos para el ratio $\omega 6/\omega 3$.

Aunque no estaban presentes en las dietas en cantidades importantes (<0.001%), los ácidos pentadecanoico (C15:0), heptadecanoico (C17:0), cisheptadecanoico (C17:1 $\omega 8$), eicosatrienoico (C20:3 $\omega 6$), sí se detectaron en el tejido adiposo, en pequeños porcentajes, en todos los casos. Los ácidos undecanoico (C11:0) y araquidónico (C20:4n6), se detectaron solo en algunos casos individuos del grupo B (<0.9 y 0.1%, respectivamente). De igual forma, el ácido tridecanoico (C13:0) se detectó sólo en algunos casos animales de los grupos A y C, en porcentajes inferiores al <0.6%. Otros ácidos grasos no presentes en la dieta en concentraciones detectables (o cuantificables no sé cuál sería más apropiado) pero que fueron detectados son el miristoleico (C14:1), cispentadecanoico (15:1), henecosanoico (C21:0). Por el

contrario, el ácido behénico (C22:0) presente en el pienso no fue detectado en tejido adiposo epididimal en ningún grupo.

Tabla 4.5. Abundancia relativa (%) de los ácidos grasos presentes en el tejido adiposo epididimal de los tres grupos de estudio al final del periodo de intervención (15ª semana de vida).

	A	B	C
Total SFA	20.60 ± 0.54 ^b	17.57 ± 0.32 ^c	22.97 ± 0.38 ^a
Total MUFA	65.44 ± 0.60 ^a	58.45 ± 0.47 ^b	44.05 ± 0.38 ^c
Total PUFA	13.95 ± 0.35 ^c	23.98 ± 0.28 ^b	32.97 ± 0.25 ^a
Ácido Láurico (C12:0)	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Ácido Mirístico (C14:0)	0.62 ± 0.03 ^b	0.50 ± 0.01 ^c	0.79 ± 0.02 ^a
Ácido Miristoléico (C14:1)	0.06 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.00 ^b	0.04 ± 0.00 ^b
Ácido Pentadecanoico (C15:0)	0.12 ± 0.00 ^b	0.10 ± 0.00 ^c	0.17 ± 0.00 ^a
Ácido Cis-pentadecanoico(C15:1)	0.12 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.00 ^b	0.16 ± 0.05 ^a
Ácido Palmítico (C16:0)	16.68 ± 0.57 ^b	13.95 ± 0.25 ^c	19.25 ± 0.31 ^a
Ácido Palmitoléico (C16:1)	6.25 ± 0.35 ^a	3.85 ± 0.13 ^b	5.98 ± 0.25 ^a
Ácido Heptadecanoico (C17:0)	0.13 ± 0.01 ^b	0.12 ± 0.01 ^b	0.17 ± 0.00 ^a
Ácido Cis-heptadecanoico (C17:1)	0.21 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.00 ^b	0.23 ± 0.02 ^a
Ácido Esteárico (C18:0)	2.04 ± 0.21 ^a	2.04 ± 0.07 ^a	1.53 ± 0.01 ^b
Ácido Oleico (C18:1n9c)	58.80 ± 0.55 ^a	54.36 ± 0.46 ^b	37.61 ± 0.28 ^c
Ácido Linoleico (C18:2n6c)	13.30 ± 0.32 ^c	23.03 ± 0.26 ^b	31.60 ± 0.23 ^a
Ácido Linolénico (C18:3n3α) (total ω3)	0.43 ± 0.02 ^c	0.74 ± 0.02 ^b	1.03 ± 0.02 ^a
Ácido Araquídico (C20:0)	0.80 ± 0.05 ^a	0.63 ± 0.03 ^b	0.79 ± 0.04 ^a
Ácido Eicosenoico (C20:1n9)	0.07 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^b	0.09 ± 0.01 ^a
Ácido γ-eicosatrienoico (C20:3n6)	0.24 ± 0.01 ^b	0.21 ± 0.01 ^b	0.37 ± 0.02 ^a
Ácido Heneicosanoico (C21:0)	0.17 ± 0.03 ^{ab}	0.14 ± 0.01 ^b	0.21 ± 0.01 ^a
Total ω6 (linolénico+eicosatrienoico)	13.52 ± 0.33 ^c	23.24 ± 0.26 ^b	31.94 ± 0.24 ^a
Ratio ω6/ω3	31.77 ± 1.08	31.49 ± 0.70	31.29 ± 0.70

¹Los valores se expresan como media ± SEM (n=12 por grupo).

a,b,c. Los valores con diferentes letras muestran diferencias significativas entre grupos tras realizar un ANOVA de una vía (p <0.05).

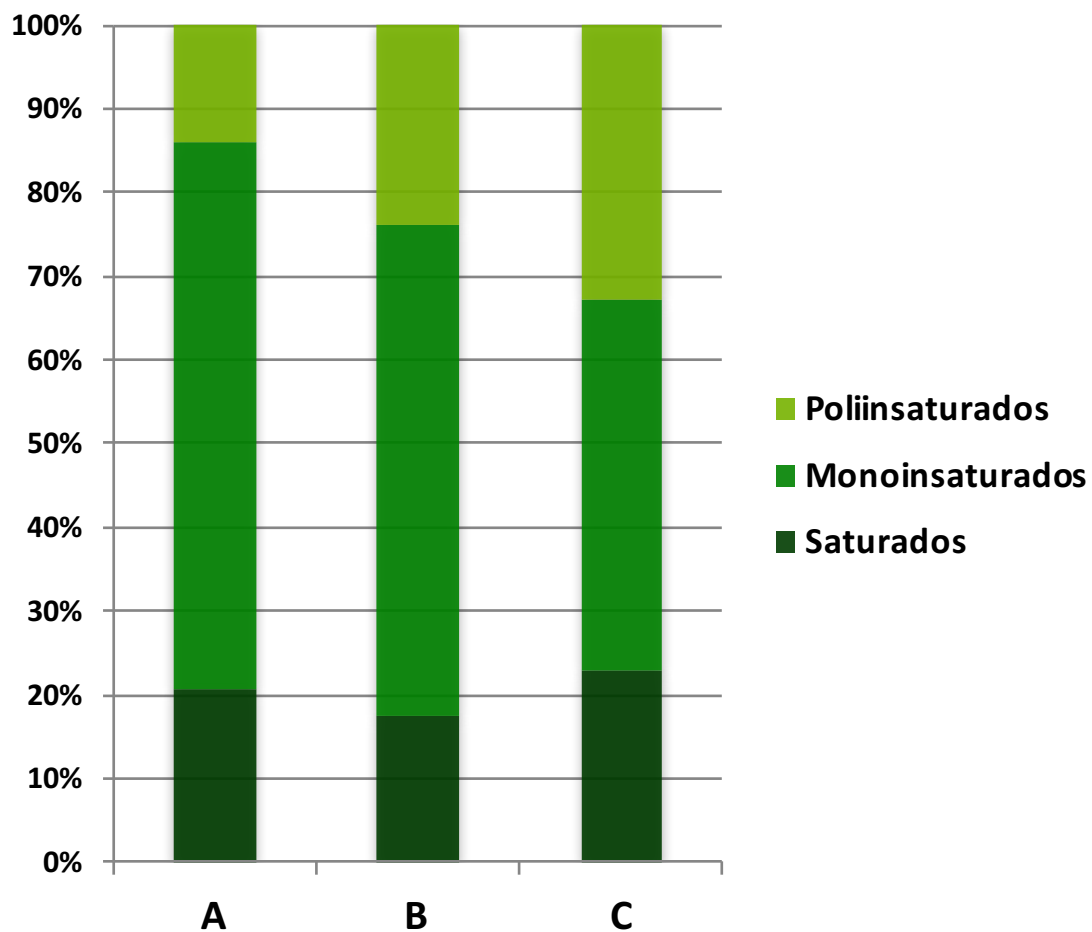


Figura 4.8. Representación gráfica del perfil general de ácidos grasos del tejido adiposo.

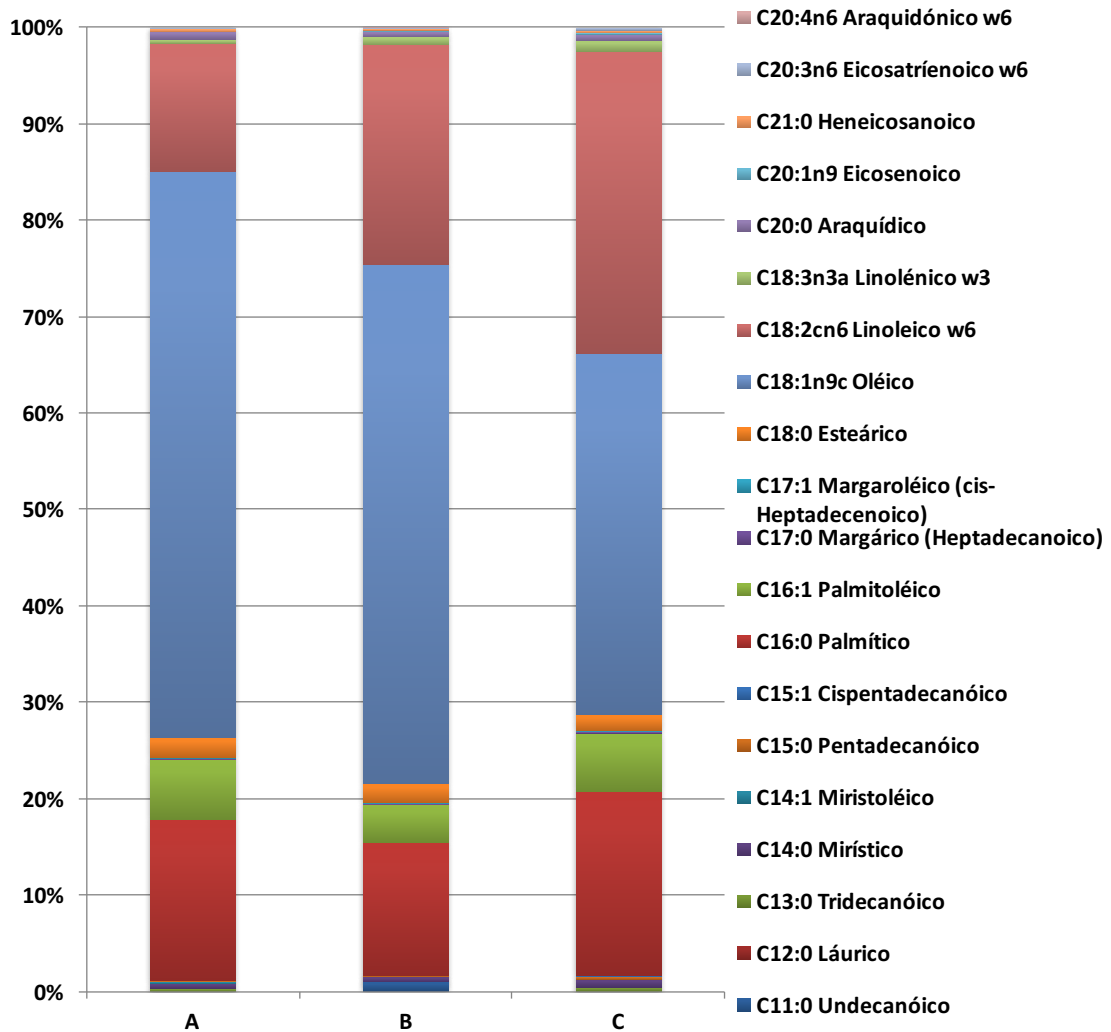


Figura 4.9. Representación gráfica del perfil específico de ácidos grasos del tejido adiposo.

La **Tabla 4.6** muestra las correlaciones lineales entre la ingesta de ácidos grasos de la dieta (g/d) (**Tabla 4.3**) y los ácidos grasos presentes en el tejido adiposo (**Tabla 4.5**). Estos datos comprenden correlaciones para los distintos ácidos grasos, el total de SFA, total de MUFA, total de PUFA, total de omega 3, total de omega 6 y ratio $\omega 6/\omega 3$.

En los ratones, la mayor correlación con la ingesta media diaria fue observada para los MUFA y PUFA, tanto totales ($r=0.957$ y $r=0.792$) como para los ácidos palmitoleico, oleico, ecosaenoico, linoleico y linolénico, indicando ser estimaciones entre «buenas» y «muy buenas». Sin embargo, los SFA totales mostraron una correlación «inexistente», debido principalmente a los ácidos palmítico y láurico. Otros SFA, como los ácidos mirístico, esteárico y araquídico, mostraron correlaciones entre «moderadas» y «buenas». Los totales de omega 3 y omega 6 presentaron correlaciones «muy buenas», mientras que para su ratio la correlación fue «inexistente».

Tabla 4.6. Correlaciones bivariadas lineales entre la ingesta de ácidos grasos de la dieta y los ácidos grasos presentes en el tejido adiposo epididimal.

	Coefficiente	p-valor	Correlación
SFA	-0.135	0.529	Inexistente
MUFA	0.957	0.000	Muy buena
PUFA	0.792	0.000	Buena
Láurico (C12:0)	0.321	0.126	Inexistente
Mirístico (C14:0)	0.703	0.000	Buena
Palmítico (C16:0)	-0.121	0.572	Inexistente
Palmitoleico (C16:1)	0.682	0.002	Buena
Esteárico (C18:0)	0.530	0.008	Moderada
Oleico (C18:1n9c)	0.885	0.000	Muy buena
Linoleico $\omega 6$ (C18:2n6c)	0.791	0.000	Muy buena
Linolénico $\omega 3$ (C18:3n3 α)	0.844	0.001	Muy buena
Araquídico (C20:0)	-0.540	0.007	Moderada
Eicosaenoico (C20:1n9)	-0.753	0.000	Buena
Total $\omega 3$	0.844	0.001	Muy buena
Total $\omega 6$	0.823	0.000	Muy buena
Ratio $\omega 6/\omega 3$	0.128	0.552	Inexistente

Coefficientes de correlación de Pearson o Spearman, según las variables fueron paramétricas o no paramétricas respectivamente. Si el coeficiente se encuentra entre 0-0.19 la correlación fue muy baja; 0.20-0.39 baja; 0.40-0.59 moderada; 0.60-0.79 buena; 0.80-1.00 muy buena.

Los ácidos grasos del tejido adiposo generalmente se consideran la mejor fuente para evaluar la ingesta a largo plazo de ácidos grasos. Aunque algunos ácidos grasos son biomarcadores de la ingesta más adecuados que otros (Baylin *et al.*, 2002).

La correlación entre la ingesta alimentaria de diferentes ácidos grasos y los encontrados en el tejido adiposo varía entre diferentes estudios, ya que depende del instrumento utilizado para recopilar la información dietética y del sitio de biopsia del tejido adiposo (Knutsen *et al.*, 2003). Los registros de la dieta de 24 horas se han considerado tradicionalmente como el mejor patrón en la evaluación dietética, pero Garland *et al.* (1998) encontraron que la correlación entre los ácidos grasos del tejido adiposo y la información de los cuestionarios de frecuencia de consumo (CFC) dio resultados similares a los de registros dietéticos durante 2 semanas. Esto sugiere que la información de los cuestionarios de frecuencia de consumo (CFC) puede tener una mayor validez de lo que se pensaba anteriormente.

La alta correlación que encontramos para los PUFAs fue similar ($r=0.75$, van Staveren *et al.*, 1986; $r=0.79$, Jacobsen *et al.*, 1983; $r=0.70$, Knutsen *et al.*, 2003) o mayor ($r=0.42$, Garland *et al.*, 1998; $r=0.54$, Plakke *et al.*, 1983; $r=0.44$, Tjonneland *et al.*, 1993; $r=0.49$, Hunter *et al.*, 1992; $r=0.37$, London *et al.*, 1991) que las reportadas por otros autores que también usaron el tejido adiposo y distintos registros dietéticos (cuestionarios de frecuencia de consumo (CFC), registros de alimentos y recordatorios de 24 horas) en sus estudios en humanos. La correlación para el ácido linolénico fue modestamente mayor que para el ácido linoleico, pero los valores de ambos fueron mayores que los reportados por otros autores ($r_{LA}=0.44$ y $r_{ALA}=0.12$, Tjonneland *et al.*, 1993; $r_{ALA}=0.35$, London *et al.*, 1991; $r_{LA}=0.37$ y $r_{ALA}=0.34$, Garland *et al.*, 1998; $r_{LA}=0.70$, van Staveren *et al.*, 1986; $r_{LA}=0.71$ y $r_{ALA}=0.62$, Knutsen *et al.*, 2003). En ocasiones, es frecuente encontrar una correlación inversa en el ácido linolénico, que se podría explicar por el hecho de que los aceites vegetales son una fuente de ácido linoleico que compiten con el ácido linolénico para la absorción (Punchard *et al.*, 2000).

El único ácido graso representante de la serie omega 3 y, por lo tanto, presente en las dietas fue el ácido linolénico, ya que los PUFA omega 3 son en gran parte exógenos, lo que significa que no son sintetizados en el cuerpo y que la principal fuente de los mismos es la ingesta a través de la dieta, lo cual hace la correlación con biomarcadores más fácil de comprender y útil para medir el estado de ácidos grasos de los sujetos (Serra-Majem *et al.*, 2012). Además, los coeficientes de correlación de varios estudios, recogidos en la revisión sistemática de Serra-Majem *et al.* (2012) sobre biomarcadores y validación de métodos dietéticos, se encontraban en el intervalo de 0.40-0.66 para el ácido linolénico, siendo estos

valores de nuevo inferiores a la correlación encontrada en este trabajo ($r=0.844$). Serra-Majem *et al.* (2012) también observó el mismo intervalo para eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), sin embargo, estos ácidos grasos no formaban parte de las dietas y tampoco fueron detectados en el tejido adiposo.

Con respecto a los MUFAs, otros autores han reportado correlaciones entre? más bajas, inexistentes y/o no significativas ($r=0.22$, Hunter *et al.*, 1992; $r=0.22$, Plakke *et al.*, 1983; $r=0.03-0.35$, Knutsen *et al.*, 2003; Inexistente, London *et al.*, 1991, Garland *et al.*, 1998 y Tjonneland *et al.*, 1993; $r=0.46$ no significativa, Beynen *et al.*, 1980) sin duda reflejando el hecho de que gran parte de los MUFA adiposos son endógenos y no dependen de la ingesta dietética (Lands *et al.*, 1995). Esto explicaría la «buena» correlación encontrada para el ácido palmitoleico y la correlación negativa para el eicosaenoico. Sin embargo, encontramos una alta correlación para el ácido oleico, posiblemente debida a su alto contenido en la dieta.

La correlación inexistente que encontramos para los SFA concuerda con algunos autores ($r=0.59$ no significativa, Beynen *et al.*, 1980; $r=0.14$ no significativa, Garland *et al.*, 1998), aunque lo más reportado son correlaciones bajas ($r=0.57$, Field *et al.*, 1985; $r=0.16$, Hunter *et al.*, 1992; $r=0.24$, Tjonneland *et al.*, 1993; $r=0.24$, Plakke *et al.*, 1983; $r=0.21-0.56$, Knutsen *et al.*, 2003). Exceptuando los ácidos palmítico y láurico, que no mostraron correlaciones significativas, la correlación para el ácido mirístico fue superior a otros autores ($r=0.43$, Knutsen *et al.*, 2003; $r=0.27$, Hunter *et al.*, 1992) y para el ácido esteárico fue similar ($r=0.58$, Field *et al.*, 1985). No tenemos explicación para la correlación inversa del ácido araquídico.

En conclusión, según las distintas correlaciones encontradas, nuestro estudio demuestra que el registro dietético diario realizado en este trabajo ha sido un instrumento que ha funcionado bien para los MUFAs y PUFAs, pero no así para los SFA. Esto podría, en parte, ser explicado por errores en la medición y/o toma, procesado y conservación (oxidación) de las muestras biológicas, y, por otro lado, por los factores endógenos tales como el metabolismo y transformación de los ácidos grasos (Gil-Hernández & Serra-Majem, 2013). Por lo tanto, ponemos de manifiesto que para afirmar que un biomarcador es eficaz (es decir, que refleje un cambio en el estado o nivel) debe cumplir, entre otras condiciones, con la disposición de tres o más herramientas que aporten datos (Gil-Hernández & Serra-Majem, 2012). En el presente trabajo, sólo se dispuso de dos herramientas (registro dietético diario y perfil de ácidos grasos en tejido adiposo) y sería necesaria otra herramienta de medición adicional para poder validar el método nuestros ratones C57BL/6J.

Además de utilizar los biomarcadores, por un lado, como indicadores de ingesta dietética, sirven, por otro lado, como indicadores del estado nutricional y pronostican la enfermedad (obesidad). En este sentido, se ha reportado que los ácidos grasos se encuentran entre los nutrientes capaces de modular el efecto de «programación» durante las primeras etapas de la vida y condicionar la salud futura (Gil-Hernández & Serra-Majem, 2012). Este efecto se debe a que, entre sus muchas funciones biológicas, son capaces de modular la expresión génica (Jump, 2002).

La ingesta de una dieta rica en grasa, particularmente rica en SFA, induce una hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo. Sin embargo, hasta qué punto los ácidos grasos de este trabajo han sido capaces de afectar la diferenciación *de novo* de los adipocitos, es un hecho que aún desconocemos. Sin embargo, aunque las correlaciones sobre los SFA (**Tabla 4.6**) no han podido arrojar información suficiente, los grupos A y B ingirieron las mayores cantidades de SFA (**Tabla 4.3**), lo cual se muestra en consonancia con sus IMC alcanzados (**Tabla 4.1**). Por otro lado, los PUFAs, que son menos efectivos en incrementar el número de adipocitos, son mucho más efectivos en estimular la diferenciación de preadipocitos que los SFA (Gaillard *et al.*, 1989; Diascro Jr. *et al.*, 1998). La evidencia existente, procedente de estudios con seres humanos y animales, sugiere que la disponibilidad temprana de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs) podría influir en el desarrollo del tejido adiposo durante el desarrollo fetal y la infancia (Oosting *et al.*, 2010; Janovska & Kopecky, 2009; Ailhaud *et al.*, 2008; Amri *et al.*, 1994; Libro Blanco de los Omega 3, 2012). Se ha descrito que los LC-PUFAs ω -6 y, sobre todo, las prostaciclina derivadas del ácido araquidónico (ARA) poseen un efecto adipogénico. Tal efecto viene dado por la habilidad de estos PUFAs de actuar como ligandos o precursores de ligandos de PPAR γ , favoreciendo la diferenciación de preadipocitos en adipocitos maduros durante las etapas tempranas del crecimiento hiperplásico del tejido adiposo, es decir, en los primeros pasos del proceso de diferenciación celular (Oosting *et al.*, 2010; Massiera *et al.*, 2003). Se ha descrito que, en los lactantes, dado el enriquecimiento relativo de diversos alimentos en ácido linoleico como precursor del ácido araquidónico, un consumo excesivo del mismo, en este periodo de tiempo en que el tejido adiposo se encuentra en una fase dinámica de su desarrollo, puede favorecer la obesidad infantil (Massiera *et al.*, 2003). Unos altos niveles de ácido linoleico en la dieta conllevan a activar las vías de señalización dependientes de AMPc en los preadipocitos, lo que favorecería la formación de adipocitos maduros cuyo relleno de lípidos se incrementa entonces para hacer frente a los altos niveles exógenos de ácidos grasos (Massiera *et al.*, 2003). En cambio, los derivados del ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) tienen un efecto antiadipogénico, ya que ambos inhiben la diferenciación celular y el

desarrollo del tejido adiposo (Amri *et al.*, 1994; Gil-Hernández & Serra-Majem, 2012), e incrementan la beta β -oxidación de los ácidos grasos (Ailhaud *et al.*, 2008). Se ha reportado que alimentar ratas tras el destete con dieta grasa rica en ácido alfa-linolénico, precursor de EPA y DHA, previene el crecimiento excesivo del tejido adiposo (Okuno *et al.*, 1997). Por lo tanto, los PUFAs omega 6 y 3 no son equipotentes en la promoción de la adipogénesis. Por este motivo, el ratio ω -6/ ω -3 (ALA/LA) en la dieta desempeña un papel importante en el desarrollo del tejido graso en edades tempranas (Ailhaud & Guesnet, 2004). En ratones alimentados con una dieta rica en grasa que contiene una mezcla de ácidos linoleico y alfa-linolénico, la producción reducida de AMPc puede limitar la formación de adipocitos, dando lugar a hiperplasia para acomodar el suministro de ácidos grasos. Esta alteración de la producción de AMPc podría deberse a una disminución de la síntesis de ácido araquidónico a partir del ácido linoleico a través de la inhibición de la actividad Δ 6-desaturasa por el ácido alfa-linolénico y sus metabolitos (Raz *et al.*, 1997).

Las dietas del presente trabajo no contenían ARA, DHA ni EPA en la composición, pero sí sus precursores (linoleico y linolénico). A pesar de que los grupos A y B ingirieron menores cantidades de linoleico con respecto al control, ingirieron también las menores cantidades de linolénico. Suponemos por tanto que, según los datos de los ácidos grasos encontrados en el tejido adiposo, los ratios ω 6/ ω 3 (LA/ALA) de las dietas A y B no tuvieron el mismo papel protector sobre la adipogénesis que el ratio de la dieta control. Esta observación podría ser la causa que afecte el equilibrio entre la proliferación de células precursoras adiposas y su diferenciación en adipocitos, y esto podría justificar una vez más el aumento significativo del IMC en los ratones de estos dos grupos.

4.4. EXPRESIÓN GÉNICA DEL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS

Para comprender los mecanismos que pueden ejercer los alimentos infantiles sobre el metabolismo lipídico del hígado, se estudió la expresión de genes relacionados con el mismo. La cuantificación relativa de ARNm de 84 genes claves implicados en rutas enzimáticas y en la regulación del metabolismo de ácidos grasos se llevó a cabo por RT-qPCR. Se detectaron aquellos genes que presentaban un valor significativo ($p < 0.05$) de expresión o *fold change* al menos dos veces mayor o menor, es decir, sobreexpresados o subexpresados, en comparación relativa al grupo C.

En la **Tabla 4.7** observamos que, en el grupo A, se encontraron diferencias de expresión en 39 genes con respecto al control, de los cuales 13 fueron sobreexpresados y 26 subexpresados. En el grupo B se encontraron diferencias de expresión en 24 genes con respecto al control, todos ellos subexpresados. Veintitrés genes coincidieron en ambos grupos (**Figura 4.10**). Sólo se encontraron diferencias de expresión en un gen entre los grupos A y B (*Acot3*, $fold\ change_{Avs.B} = -3.91$).

Entre los 23 genes con diferencias de expresión comunes a ambos alimentos infantiles (**Figura 4.10**), se encontraron algunos implicados en la deshidrogenación (*Acads*), síntesis (*Acsbg1*, *Acsbg2*, *Acs15*, *Acs16* y *Acsm4*), esterificación de grupos tioles (*Acot6*, *Acot7* y *Acot8*) y transporte (*Cpt1b*) de los acil-coenzima A en el catabolismo de los ácidos grasos, entre otros (*Aldh2*). También se encontraron genes implicados en el transporte de ácidos grasos (*Fabp3*, *Fabp6*, *Slc27a1*, *Slc27a3* y *Slc27a4*); en la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos (*Prkab2*, *Prkaca*, *Prkacb* y *Prkag3*); y en el catabolismo de triacilglicéridos (*Gk2*, *Gpd1* y *Lipe*).

Además, en el grupo A, las diferencias de expresión se encontraron en más en genes implicados en la transferencia (*Acaa1a* y *Acaa2*), síntesis (*Acs11* y *Acs14*), esterificación de grupos tioles (*Acot3* y *Acot12*) y transporte (*Cpt1a* y *Cpt2*) de los acil-coenzima A, entre otros (*Decr1*, *Mut* y *Pecr*). También más genes implicados en el transporte de ácidos grasos (*Fabp1*, *Fabp2* y *Slc27a2*); en la cetogénesis (*Hmgcs1*); y en el catabolismo de triacilglicéridos (*Lpl*).

En el grupo B, además de los genes comunes, el gen *Prkab1*, implicado en la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos, fue encontrado con diferencia de expresión.

Tabla 4.7. Símbolo, nombre y valor de expresión o *fold change* de los genes que mostraron un valor de subexpresión o sobreexpresión superior a 2 y un valor de $p < 0.05$ en las muestras de tejido hepático¹.

Símbolo	Nombre	Fold-change	
		A	B
Acaa1a	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1A	4.10	—
Acaa2	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	2.39	—
Acads	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	-2.61	-2.32
Acot12	Acyl-CoA thioesterase 12	2.04	—
Acot3	Acyl-CoA thioesterase 3	-9.33	—
Acot6	Acyl-CoA thioesterase 6	-18.37	-18.67
Acot7	Acyl-CoA thioesterase 7	-8.98	-6.03
Acot8	Acyl-CoA thioesterase 8	-3.95	-4.38
Acsbg1	Acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1	-12.55	-12.75
Acsbg2	Acyl-CoA synthetase bubblegum family member 2	-13.20	-13.42
Acs11	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	2.31	—
Acs14	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	-2.31	—
Acs15	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	-31.26	-26.96
Acs16	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	-10.38	-15.56
Acsm4	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 4	-20.48	-20.10
Aldh2	Aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	-21.40	-17.30
Cpt1a	Carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	3.44	—
Cpt1b	Carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle	-12.03	-11.82
Cpt2	Carnitine palmitoyltransferase 2	2.72	—
Decr1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	2.02	—
Fabp1	Fatty acid binding protein 1, liver	2.09	—
Fabp2	Fatty acid binding protein 2, intestinal	3.00	—
Fabp3	Fatty acid binding protein 3, muscle and heart	-41.24	-41.05
Fabp6	Fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin)	-18.41	-18.71
Gk2	Glycerol kinase 2	-25.74	-22.83
Gpd1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	-3.09	-3.04
Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	-3.16	—
LiPe	Lipase, hormone sensitive	-13.36	-13.58
Lpl	Lipoprotein lipase	2.27	—
Mut	Methylmalonyl-Coenzyme A mutase	3.23	—
Pecr	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	2.18	—
Prkab1	Protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit	—	-3.69
Prkab2	Protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	-20.67	-13.02
Prkaca	Protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha	-3.93	-3.93
Prkacb	Protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta	-2.14	-2.57
Prkag3	Protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit	-18.54	-18.84
Slc27a1	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1	-13.11	-13.32
Slc27a2	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	3.04	—
Slc27a3	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3	-7.24	-10.22
Slc27a4	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4	-13.23	-10.95

¹El valor de expresión o *fold change* de cada gen de los grupos A y B se calculó tomando como referencia el grupo C.

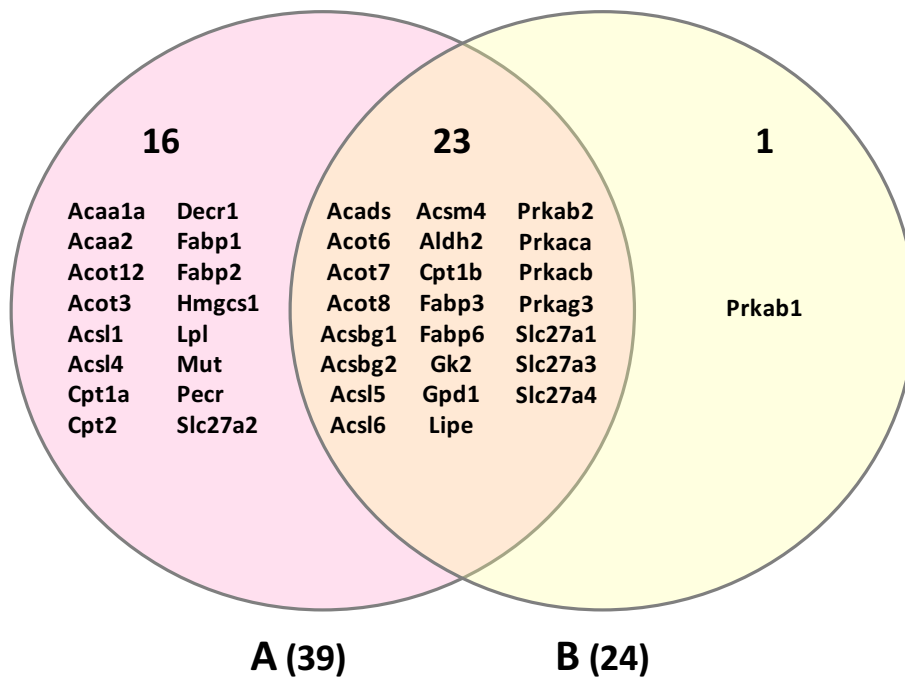


Figura 4.10. Diagrama de Venn. Relaciones entre los genes con diferencias de expresión significativas y resumen del número de genes implicados.

Para estimar la similitud en la expresión génica entre las muestras, se realizó una agrupación (*cluster*) de todos los genes (**Figura 4.11**). Los resultados mostraron que el perfil de expresión génica más parecido al grupo control fue el del grupo B, quedando el grupo A al lado izquierdo de la agrupación.

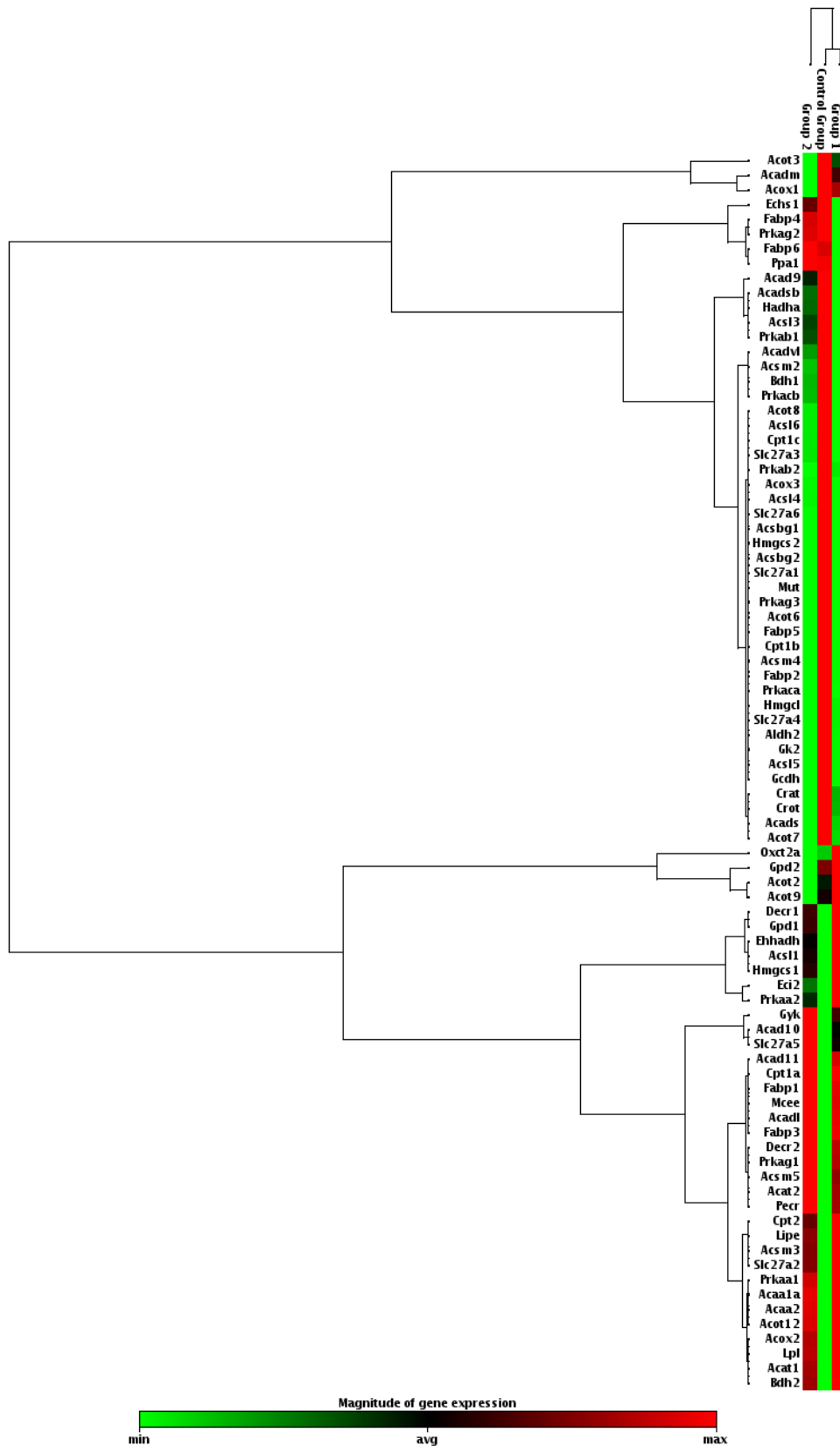


Figura 4.11. Cluster (valores de C(t)) de cada grupo de estudio. El grupo 1 corresponde al grupo B. El grupo 2 corresponde al grupo A. Expresión génica y cluster mostrando los genes que fueron sobreexpresados o subexpresados en el tejido hepático. Los perfiles de expresión similares se agrupan para formar un árbol cluster. El mapa de color representa los valores de intensidad normalizados (normalizados a la mediana de todas las muestras) si los genes (filas), donde el rojo y el verde representan los genes regulados arriba y abajo, respectivamente.

El alimento infantil A fue el alimento que más diferencias provocó en la expresión génica de los ratones con respecto al grupo C, de modo que en este grupo se observó una sobreexpresión de las proteínas Fabp1 y Fabp2, implicadas en el transporte intracelular de ácidos grasos de cadena larga y sus acil-CoA-ésteres, y Pecn, transportador que favorece la oxidación de los derivados de acil-CoA, activando las rutas de oxidación de los ácidos grasos. Estos resultados sugieren una mejora del transporte de ácidos grasos en el interior del hepatocito, incrementando la eficiencia de la β -oxidación en las mitocondrias, ya que estas proteínas están involucradas en la transformación de dienoil-CoA a trans-enoil-CoA, lo que permite la continuación de la β -oxidación cuando los ácidos grasos no pueden ser hidrolizados por la acil-CoA deshidrogenasas debido a la presencia de los dobles enlaces (Musso *et al.*, 2009).

En los animales del grupo A se observó un aumento de genes de proteínas FATP del transporte intracelular de ácidos grasos: Fabp1, Fabp2 y Slc27a1. La sobreexpresión de Fabp1, correspondiente al hígado, y simultáneamente la sobreexpresión de Fabp2, de intestino, indican un aumento del transporte de lípidos hacia el interior de las células lo que contribuiría a disminuir el contenido de ácidos grasos plasmáticos, reduciendo la dislipemia e incrementando la oxidación de los ácidos grasos (Auinger *et al.*, 2010). Además, la expresión de la FABP es regulada por hormonas como la insulina, por los mediadores de inflamación (TNF α y IL-1), y debido a su papel en la homeostasis de los ácidos grasos del hígado, también está regulada por los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR- α or $-\gamma$) (Doege *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2013).

Fabp2 es un gen identificado como posible candidato implicado en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico y obesidad (Liu *et al.*, 2015). Los transportadores de la familia Fabp son proteínas localizadas en el citosol que facilitan el transporte intracelular de ácidos grasos de cadena larga desde el citosol a los receptores nucleares, controlando la disponibilidad de ligandos que pueden regular la transcripción de los genes involucrados en determinados procesos metabólicos e inflamatorios (Helledie *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2002). Aunque han sido identificadas nueve proteínas Fabp, diferentes según el tejido en el que se encuentren localizadas (Musso *et al.*, 2009), estas proteínas se localizan, en general, en tejidos que intervienen en el metabolismo lipídico y no solo se expresan en aquel tejido del que proceden originalmente, sino que se pueden expresar en varios tejidos.

El otro transportador de membrana sobreexpresado únicamente en el grupo A, fue el Slc27a2 (miembro 2 de la familia 27 de transportadores de ácidos grasos), que transporta ácidos

grasos de cadena larga, muy larga y ramificados a través de la membrana del peroxisoma y retículo endoplásmico, por lo que el perfil lipídico del alimento infantil A parece favorecer un significativo mayor el transporte de ácidos grasos, aumentando el metabolismo lipídico.

En los animales del grupo A se observó la sobreexpresión en un gen relacionado con la hidrólisis de las grasas: Lpl. La proteína Lpl (lipoproteína lipasa) es una triglicérido hidrolasa crucial para el catabolismo de las lipoproteínas VLDL y los quilomicrones y es expresada en el hígado bajo determinadas condiciones, a la vez que se incrementa como respuesta al aumento de TNF α en el hígado (Fruchard *et al.*, 2006). Diferentes estudios han puesto de manifiesto la relación inversa entre el contenido de Lpl y la concentración de triglicéridos plasmáticos (Wong *et al.*, 2002; Augustus *et al.*, 2003). Sin embargo, en el presente estudio no se ha determinado la concentración de TNF α en el hígado y no se observaron diferencias significativas para este indicador de inflamación en plasma.

Cuando los ácidos grasos circulantes alcanzan el hígado son transportados al interior del citosol, donde miembros de la familia de las acil-CoA sintetasas (Acs) producen los acil-CoA derivados que son transportados al interior de la mitocondria y degradados por las acil-CoA deshidrogenasas (Acads). Ramírez-Torres *et al.*, 2012, han descrito que la sobreexpresión del ARNm de las Acad puede ser considerado un marcador de esteatosis debido al papel relevante que tienen estas enzimas en el metabolismo lipídico, lo que pondría en evidencia la presencia de un mayor contenido de grasa en el interior de las células. Por lo tanto, la sobreexpresión de Acs11, en el hígado del grupo A, sugiere un incremento del metabolismo lipídico asociado a la esteatosis, favoreciendo la incorporación de ácidos grasos en el interior de la mitocondria; y particularmente, se ve incrementada la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (palmitato, oleato, linoleato). Además, mientras que los ácidos grasos de cadena corta y media tienen la capacidad de atravesar la membrana de la mitocondria por un proceso de difusión, los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) requieren la participación de un transportador, la enzima Cpt1a (Carnitina palmitoiltransferasa 1a), la cual permite la unión de los derivados acil-CoA a una molécula polar de carnitina, dando lugar a la formación de moléculas acil-carnitina que transportan los AGCL hacia el interior de la mitocondria para ser incorporados al proceso de la β -oxidación (Gyamfi *et al.*, 2010). Cpt2 realiza el proceso contrario. A pesar de que Kohjima *et al.* 2007, han descrito una disminución en la expresión de la Cpt1 en la esteatosis, Cpt1a estuvo sobreexpresado en el grupo A, es decir, demuestra un mayor transporte de ácidos grasos de cadena larga hacia el interior de la mitocondria. Otras enzimas activadas en los estados de esteatosis son aquellas que intervienen en la oxidación extramitocondrial

(Gyamfi *et al.*, 2010; Kohjima *et al.*, 2007), como son las Acot12 (Acil-CoA tioesterasa) y Pecn (trans-2-enoil-CoA reductasa peroxisomal). La Acot12 es responsable de la actividad tioesterasa de los peroxisomas, mientras que la Pecn, tal y como se ha descrito anteriormente, transforma el dienoil-CoA a trans-enoil-CoA, permitiendo la continuación de la β -oxidación en el interior de la mitocondria.

Los resultados de expresión génica demuestran que el alimento infantil A parece incrementar la actividad de las enzimas involucradas en la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga en las mitocondrias y los peroxisomas en el hígado, haciendo esta ruta metabólica más eficiente.

4.5. EXPRESIÓN GÉNICA DE LA OBESIDAD

Para comprender los mecanismos que pueden ejercer los alimentos infantiles sobre la obesidad, se estudió la expresión de genes relacionados con la misma. La cuantificación relativa de ARNm de 84 genes claves, que están directamente involucrados en la regulación de la ingesta y el gasto energético, se llevó a cabo por RT-qPCR. Los genes codifican para los péptidos orexigénicos, hormonas y receptores; péptidos anorexigénicos, hormonas, receptores; y las moléculas de señalización centrales y periféricas implicadas en el gasto de energía. Se detectaron aquellos genes que presentaban un valor significativo ($p < 0.05$) de expresión o *fold change* al menos dos veces mayor o menor, es decir, sobreexpresados o subexpresados, en comparación relativa al grupo C (**Tabla 4.8**).

En la **Tabla 4.8** observamos que, en el grupo A, se encontraron diferencias de expresión en 27 genes con respecto al control, todos ellos subexpresados. En el grupo B se encontraron diferencias de expresión en 13 genes con respecto al control, también todos ellos subexpresados. Doce genes coincidieron en ambos grupos (**Figura 4.12**).

Entre los 12 genes con diferencias de expresión, comunes a ambos alimentos infantiles (**Figura 4.12**), se encontraron algunos anorexigénicos que codifican para un neuropéptido (Ucn) y varios receptores (Hrh1, Nmur1, Ntrk2 y Prlhr); una hormona (Apoa4); y, un péptido (Sst) y varios receptores derivados del páncreas (Sstr2 y Ramp3). También se encontraron algunos receptores orexigénicos (Oprk1, Oprm1 y Sigmar1).

Además, en el grupo A, las diferencias de expresión se encontraron en más genes anorexigénicos que codifican para otros neuropéptidos (Nmb y Sort1) y un receptor (Il6ra); y para varios receptores del páncreas (Gcgr y Insr). También se sumó otro receptor orexigénico (Adra2b), y una hormona intestinal orexigénica (Ghrl). Además, se encontraron genes relacionados con el gasto energético: un péptido (C3) y varios receptores derivados de los adipocitos (Adipor1, Adrb1, Ppara, Ppargc1 y Ptpn1) y del sistema nervioso central (Cpd y Thrb, respectivamente).

En el grupo B, además de los genes comunes, el gen lapp, péptido anorexigénico derivado del páncreas, fue encontrado con diferencia de expresión.

Tabla 4.8. Símbolo, nombre y valor de expresión o *fold change* de los genes que mostraron un valor de subexpresión o sobreexpresión superior a 2 y un valor de $p < 0.05$ en las muestras de tejido adiposo epididimal¹.

Símbolo	Nombre	Fold-change	
		A	B
Adipor1	Adiponectin receptor 1	-2.07	—
Adra2b	Adrenergic receptor, alpha 2b	-2.03	—
Adrb1	Adrenergic receptor, beta 1	-2.48	—
Apoa4	Apolipoprotein A-IV	-4.16	-3.30
C3	Complement component 3	-2.96	—
Cpd	Carboxypeptidase D	-3.07	—
Gcgr	Glucagon receptor	-3.16	—
Ghrl	Ghrelin	-2.07	—
Hrh1	Histamine receptor H1	-2.90	-2.59
Iapp	Islet amyloid polypeptide	—	-2.70
Il6ra	Interleukin 6 receptor, alpha	-3.20	—
Insr	Insulin receptor	-2.63	—
Nmb	Neuromedin B	-2.74	—
Nmur1	Neuromedin U receptor 1	-2.77	-3.12
Ntrk2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	-8.73	-3.13
Oprk1	Opioid receptor, kappa 1	-3.05	-2.03
Oprm1	Opioid receptor, mu 1	-2.92	-6.25
Sigmar1	Sigma non-opioid intracellular receptor 1	-6.33	-2.69
Ppara	Peroxisome proliferator activated receptor alpha	-2.95	—
Ppargc1a	Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha	-2.03	—
Prlhr	Prolactin releasing hormone receptor	-2.39	-4.64
Ptpn1	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	-3.76	—
Ramp3	Receptor (calcitonin) activity modifying protein 3	-3.47	-2.88
Sort1	Sortilin 1	-2.89	—
Sst	Somatostatin	-2.07	-4.06
Sstr2	Somatostatin receptor 2	-3.85	-3.41
Thrb	Thyroid hormone receptor beta	-3.18	—
Ucn	Urocortin	-2.07	-2.00

¹El valor de expresión o *fold change* de cada gen de los grupos A y B se calculó tomando como referencia el grupo C.

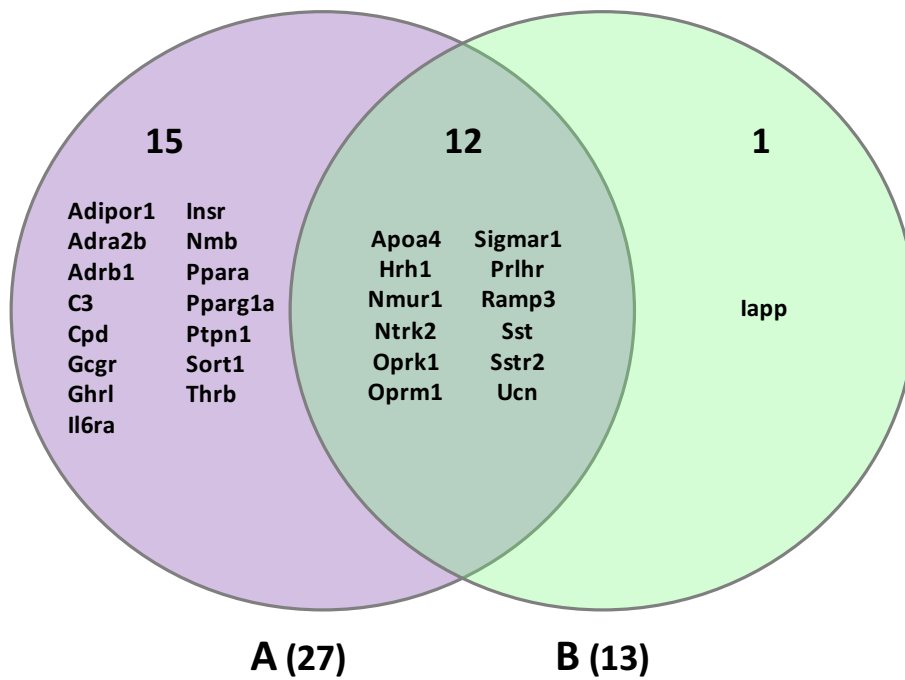


Figura 4.12. Diagrama de Venn. Relaciones entre los genes con diferencias de expresión significativas y resumen del número de genes implicados.

Para estimar la similitud en la expresión génica entre las muestras, se realizó una agrupación (*cluster*) de todos los genes (**Figura 4.13**). Los resultados mostraron que el perfil de expresión génica de los grupos A y B era más similar entre ellos que con el grupo de control, situándose éste en el lado izquierdo de la agrupación.

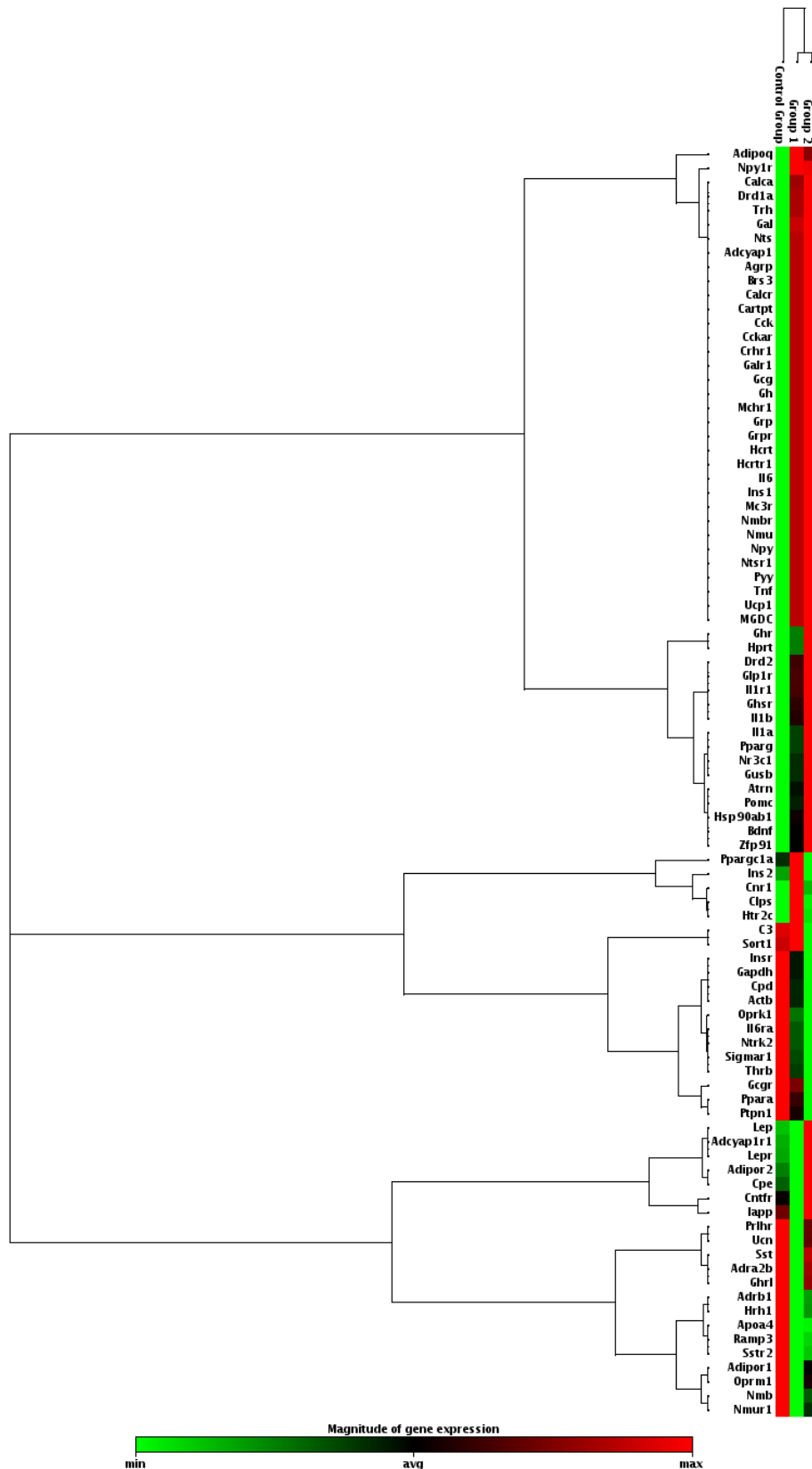


Figura 4.13. Cluster (valores de $C(t)$) de cada grupo de estudio. El grupo 1 corresponde al grupo B. El grupo 2 corresponde al grupo A. Expresión génica y cluster mostrando los genes que fueron sobreexpresados o subexpresados en el tejido adiposo. Los perfiles de expresión similares se agrupan para formar un árbol cluster. El mapa de color representa los valores de intensidad normalizados (normalizados a la mediana de todas las muestras) si los genes (filas), donde el rojo y el verde representan los genes regulados arriba y abajo, respectivamente.

El control de una relación de peso corporal estable depende de una compleja interacción entre los ejes hormonales en el sistema nervioso periférico y las señales de los neurotransmisores en el sistema nervioso central que desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de un metabolismo energético equilibrado.

Adipor1 es un gen que codifica una proteína que actúa como receptor de la adiponectina, una hormona secretada por los adipocitos que regula el catabolismo de los ácidos grasos y los niveles de glucosa. La unión de adiponectina a Adipor1 activa una vía de señalización de quinasa activada por AMP que afecta a los niveles de oxidación de ácidos grasos y sensibilidad a la insulina. Este receptor es requerido para la homeostasis normal de glucosa y grasa, y para mantener un peso corporal normal. Adra2b codifica una proteína transmembrana de siete dominios. Esta proteína es un miembro de una subfamilia de receptores G acoplados, que regulan la liberación de neurotransmisores de los nervios simpáticos y de las neuronas adrenérgicas en el sistema nervioso central. Adrb1 es un receptor adrenérgico. Los receptores adrenérgicos (subtipos alfa 1, alfa 2, beta 1 y beta 2) son una familia prototípica de receptores acoplados a proteínas reguladoras de fijación de nucleótidos de guanina que median los efectos fisiológicos de la hormona epinefrina y el neurotransmisor norepinefrina. Se ha demostrado que polimorfismos específicos en este gen afectan la frecuencia cardíaca en reposo y pueden estar implicados en la insuficiencia cardíaca. El C3 está relacionado con la síntesis de triglicéridos (TG) y el transporte de glucosa en los adipocitos, regulando el almacenamiento de grasa y desempeñando un papel en la depuración postprandial de triglicéridos. La proteína codificada por el gen Gcgr es un receptor de glucagón que es importante para controlar los niveles de glucosa en sangre. Los defectos en este gen son una causa de diabetes mellitus no insulino-dependiente. Ghrl codifica la preproteína de grelina-obestatina que se escinde para producir dos péptidos, ghrelina y obestatina. La grelina es un poderoso estimulante del apetito y juega un papel importante en la homeostasis energética. Su secreción se inicia cuando el estómago está vacío, con lo cual se une al receptor secretagogo de la hormona del crecimiento en el hipotálamo que da como resultado la secreción de la hormona del crecimiento (somatotropina). Se cree que la grelina regula múltiples actividades, incluyendo el hambre, la percepción de la recompensa a través de la vía mesolímbica, la secreción de ácido gástrico, la motilidad gastrointestinal y la secreción de insulina estimulada por la glucosa pancreática. Se propuso inicialmente que la obestatina juega un papel opuesto a la grelina al promover la saciedad y, por tanto, disminuir la ingesta de alimentos, pero esta acción todavía se debate. Recientes informes sugieren múltiples funciones metabólicas para obestatin, incluyendo la regulación de la función adipocitaria y el metabolismo de la glucosa. Iapp codifica un miembro de la familia de la

calcitonina de hormonas peptídicas. Esta hormona se libera de las células beta-pancreáticas después de la ingesta de alimentos para regular los niveles de glucosa en la sangre y actúan como una señal de saciedad. Los pacientes humanos con diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2 presentan niveles reducidos de la hormona codificada en la sangre y el páncreas. *IL6ra* codifica una subunidad del complejo del receptor de la IL-6. La IL-6 es una potente citoquina pleiotrópica que regula el crecimiento y la diferenciación celular y juega un papel importante en la respuesta inmune. El receptor de IL6 es un complejo de proteínas que consiste en esta proteína y el transductor de señal de interleucina 6 (*IL6ST / GP130 / IL6-beta*), una subunidad receptora también compartida por muchas otras citoquinas. *Insr* codifica un miembro de la familia de proteínas del receptor tirosina quinasa. La preproteína codificada se procesa proteolíticamente para generar subunidades alfa y beta que forman un receptor heterotetramérico. La unión de insulina u otros ligandos a este receptor activa la vía de señalización de insulina, que regula la captación y liberación de glucosa, así como la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas. Las mutaciones en este gen subyacen a los síndromes severos heredados de resistencia a la insulina incluyendo el síndrome de resistencia a la insulina tipo A, el síndrome de Donohue y el síndrome de Rabson-Mendenhall. *Nmb* codifica a un miembro de la familia de neuropeptídeos similar a la bombesina, que regula negativamente el comportamiento alimenticio. La proteína codificada puede regular la contracción del músculo liso colónico a través de la unión a su receptor cognado, el receptor de neuromedina B (NMBR). Los polimorfismos de este gen pueden estar asociados con el hambre, el aumento de peso y la obesidad. Los proliferadores de peroxisomas (*Ppara*) incluyen fármacos hipolipidémicos, herbicidas, antagonistas de leucotrienos y plastificantes. El nombre que reciben surge porque inducen un aumento en el tamaño y el número de peroxisomas que se encargan de la respiración y el metabolismo de colesterol y lípidos. Se piensa que la acción de los proliferadores de peroxisomas está mediada por receptores específicos, llamados PPAR, que pertenecen a la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas. Los PPARs afectan a la expresión de los genes diana implicados en la proliferación celular, la diferenciación celular y en las respuestas inmune e inflamatoria. Se han identificado tres subtipos estrechamente relacionados (alfa, beta / delta y gamma). Este gen codifica el subtipo PPAR-alfa, que es un factor de transcripción nuclear. La proteína codificada por *Ppargc1a* es un coactivador transcripcional que regula los genes implicados en el metabolismo energético. Esta proteína interactúa con PPARgamma, que permite la interacción de esta proteína con múltiples factores de transcripción. Esta proteína puede interactuar con, y regular las actividades de, cAMP respuesta elemento vinculante proteína (CREB) y nuclear respiratoria factores (NRF). Proporciona un enlace directo entre los estímulos fisiológicos externos y la regulación de la biogénesis

mitocondrial, y es un factor importante que regula la determinación del tipo de fibra muscular. Esta proteína también puede estar implicada en el control de la presión sanguínea, la regulación de la homeostasis del colesterol celular y el desarrollo de la obesidad. La proteína codificada por Ptpn1 es el miembro fundador de la familia de la proteína tirosina fosfatasa (PTP). Se sabe que las PTP son moléculas de señalización que regulan una variedad de procesos celulares incluyendo el crecimiento celular, la diferenciación, el ciclo mitótico y la transformación oncogénica. Se ha demostrado que esta PTP actúa como un regulador negativo de la señalización de insulina desfosforilando los restos de fosfotirosina de la quinasa de receptor de insulina. También se informó que esta PTP desfosforiló la quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico, así como las quinasas JAK2 y TYK2, lo que implicó el papel de esta PTP en el control del crecimiento celular y la respuesta celular a la estimulación con interferón. Sort1 codifica un miembro de la familia de proteínas de la sortilina relacionada con VPS10. La preproteína codificada es procesada proteolíticamente por furina para generar el receptor maduro. Este receptor juega un papel en el tráfico de diferentes proteínas a la superficie de la célula, o compartimentos subcelulares tales como lisosomas y endosomas. Los niveles de expresión de este gen pueden influir en el riesgo de infarto de miocardio en pacientes humanos. La proteína codificada por Thrb es un receptor de hormonas nucleares para la triyodotironina. Es uno de los varios receptores de la hormona tiroidea, y se ha demostrado que mediar las actividades biológicas de la hormona tiroidea. Estudios en ratones sugieren que los diferentes receptores, aunque tienen cierto grado de redundancia, pueden mediar en diferentes funciones de la hormona tiroidea. Se sabe que las mutaciones en este gen son una causa de la resistencia a la hormona tiroidea generalizada (GTHR), un síndrome caracterizado por bocio y altos niveles de hormona tiroidea circulante (T3-T4), con hormona estimulante tiroidea (TSH) normal o ligeramente elevada.

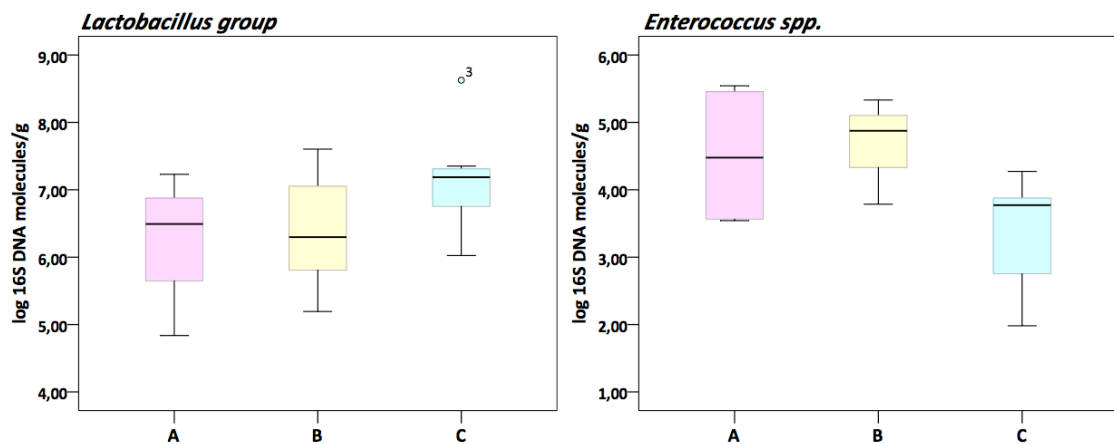
El sobrepeso es un gran problema de salud pública en los países occidentales. Por esto es de vital importancia estudiar sus bases genéticas para entender mejor los mecanismos y la susceptibilidad de cada individuo, y frenar el impacto negativo que el exceso de peso ejerce sobre la sociedad.

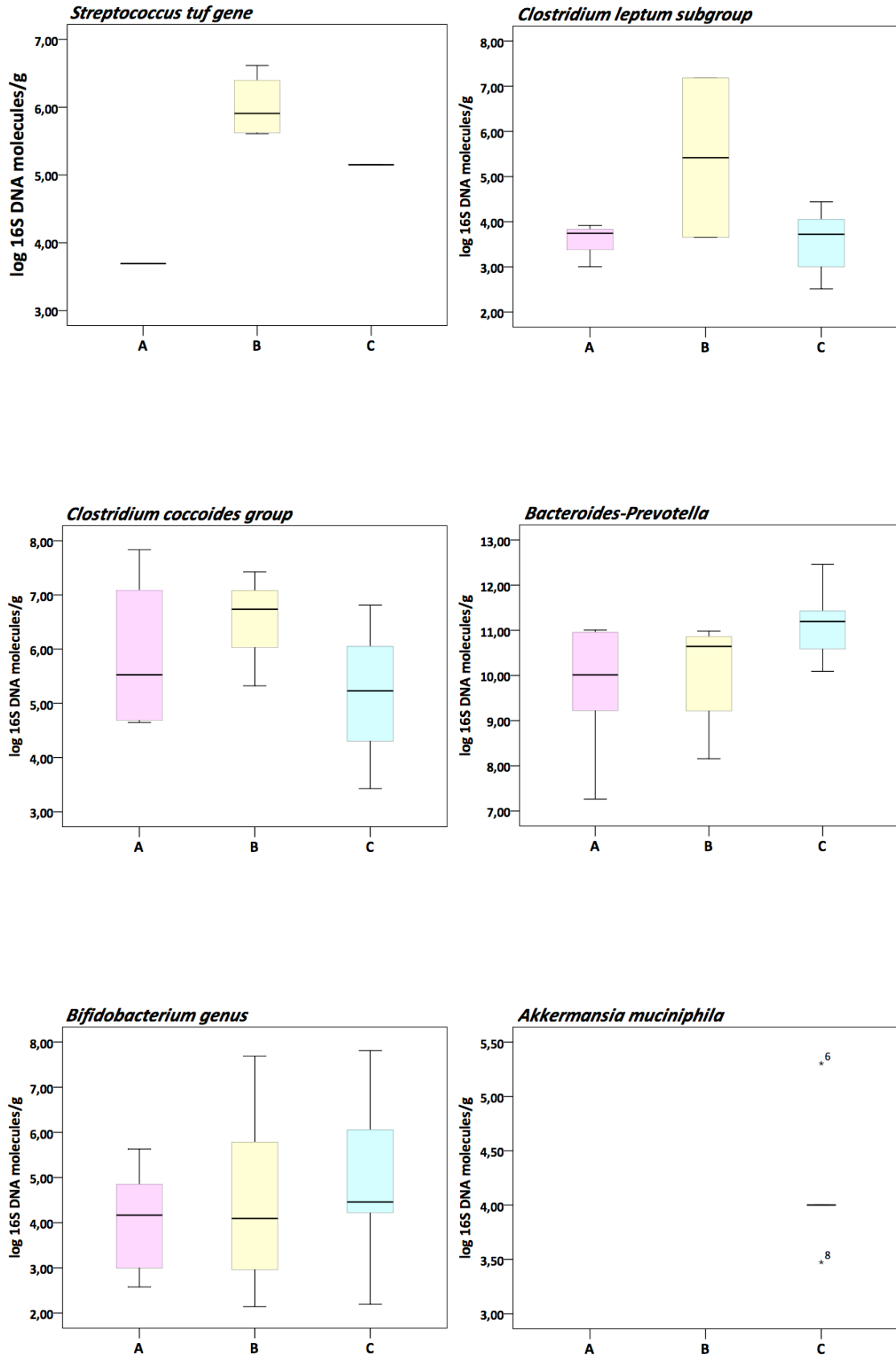
4.6. MICROBIOTA INTESTINAL

En el presente trabajo, se ha evaluado la influencia de la composición en macronutrientes de los alimentos infantiles, sobre la microbiota intestinal, tanto del intestino delgado como grueso. Se realizó un análisis cuantitativo, mediante técnicas moleculares, sobre la composición de la microbiota presente en el contenido intestinal de los ratones alimentados con las distintas dietas, a las 15 semanas de vida.

La **Figura 4.14** muestra los diagramas de caja y bigotes de las poblaciones bacterianas estudiadas en el contenido fecal del intestino delgado. Dichos resultados se expresan como el logaritmo del número de moléculas de ADN 16S/g de heces. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna población bacteriana examinada.

En la **Tabla 4.9**, se puede observar el porcentaje de muestras positivas en cada grupo de estudio (A, B y C) para los distintos grupos microbianos analizados. En los tres tratamientos, encontramos un 100% de muestras positivas tan sólo en *Bacteroides-Prevotella* y, previsiblemente, en las bacterias totales. Por el contrario, no se encontró ninguna muestra positiva para los grupos *Staphylococcus aureus nuc gene* y *Escherichia coli*. El resto de los grupos bacterianos estudiados presentaron distintos porcentajes de muestras positivas, sin diferencias significativas entre los tres grupos de estudio (A, B y C).





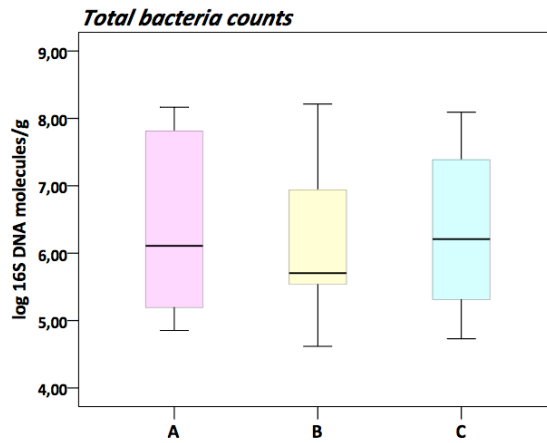


Figura 4.14. Diagramas de caja y bigotes (*box-plot*) de los recuentos bacterianos en las muestras fecales de intestino delgado de ratón, analizadas por qPCR. Representan la mediana de las moléculas de ADN 16S por gramo de heces, el rango intercuartílico (Q1-Q3) y la observación más pequeña/grande. Los círculos (°) y los asteriscos (*) representan los valores anormales (atípicos y extremos, respectivamente). Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Tabla 4.9. Frecuencias absolutas y porcentajes de amplificaciones positivas de las muestras de intestino delgado analizadas por PCR.

	A	B	C	p-valor
<i>Lactobacillus</i> group	4/8 (50%)	7/8 (87.5%)	8/8 (100%)	0.083
<i>Enterococcus</i> spp.	4/8 (50%)	3/8 (37.5%)	7/8 (87.5%)	0.106
<i>Staphylococcus aureus</i> nuc gene	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	—
<i>Streptococcus tuf</i> gene	1/8 (12.5%)	4/8 (37.5%)	1/8 (12.5%)	0.278
<i>Clostridium leptum</i> subgroup	3/8 (37.5%)	2/8 (25%)	7/8 (85.5%)	0.069
<i>Clostridium coccooides</i> group	4/8 (50%)	3/8 (37.5%)	4/8 (50%)	0.999
<i>Bifidobacterium</i> genus	7/8 (87.5%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	1.000
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	8/8 (100%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	—
<i>Akkermansia muciniphila</i>	0/8 (0%)	0/8 (0%)	2/8 (25%)	0.304
<i>Escherichia coli</i>	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	—
Bacterias totales	8/8 (100%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	—

p-valor: significancia estadística en la prueba exacta de Fisher ($p < 0.05$).

La **Figura 4.15** muestra los diagramas de caja y bigotes de las poblaciones bacterianas estudiadas en el contenido fecal del intestino grueso. Dichos resultados se expresan como el logaritmo de moléculas de ADN 16S/g de heces.

Los niveles de *Lactobacillus* group (moléculas de ADN 16S/g de heces) fueron significativamente diferentes entre grupos ($p=0.001$) siendo el grupo C el que presentó los mayores valores, seguido por el grupo A, mientras que los menores valores correspondieron al grupo B. [C: 8.64 (8.45-8.95); A: 7.46 (7.19-8.54); B: 6.45 (6.31-6.99)].

Se observaron diferencias significativas en los niveles de *Enterococcus* spp. entre el grupo B y los otros grupos ($p=0.003$) [B: 3.14 (2.90-3.43); C: 3.58 (3.45-4.14); A: 3.79 (3.59-5.02)] y los niveles de *Bacteroides-Prevotella* fueron significativamente mayores en el grupo C, comparado con el grupo B ($p=0.025$) [C: 13.81 (13.45-13.91); B: 12.85 (12.66-13.47)], mientras que los ratones del grupo A mostraron valores intermedios [A: 13.18 (12.71-14.14)].

La cantidad de bacterias totales fue significativamente mayor para el grupo C, comparado con el grupo B ($p=0.011$) [C: 9.98 (9.81-10.27); B: 9.25 (8.93-9.40)], mientras que el grupo A mostró valores intermedios [A: 9.47 (9.05-10.63)].

Clostridium leptum subgroup y *Clostridium coccooides* group mostraron menor variabilidad en los grupos B y C que en el grupo A, aunque las medianas obtenida en los tres grupos fueron similares.

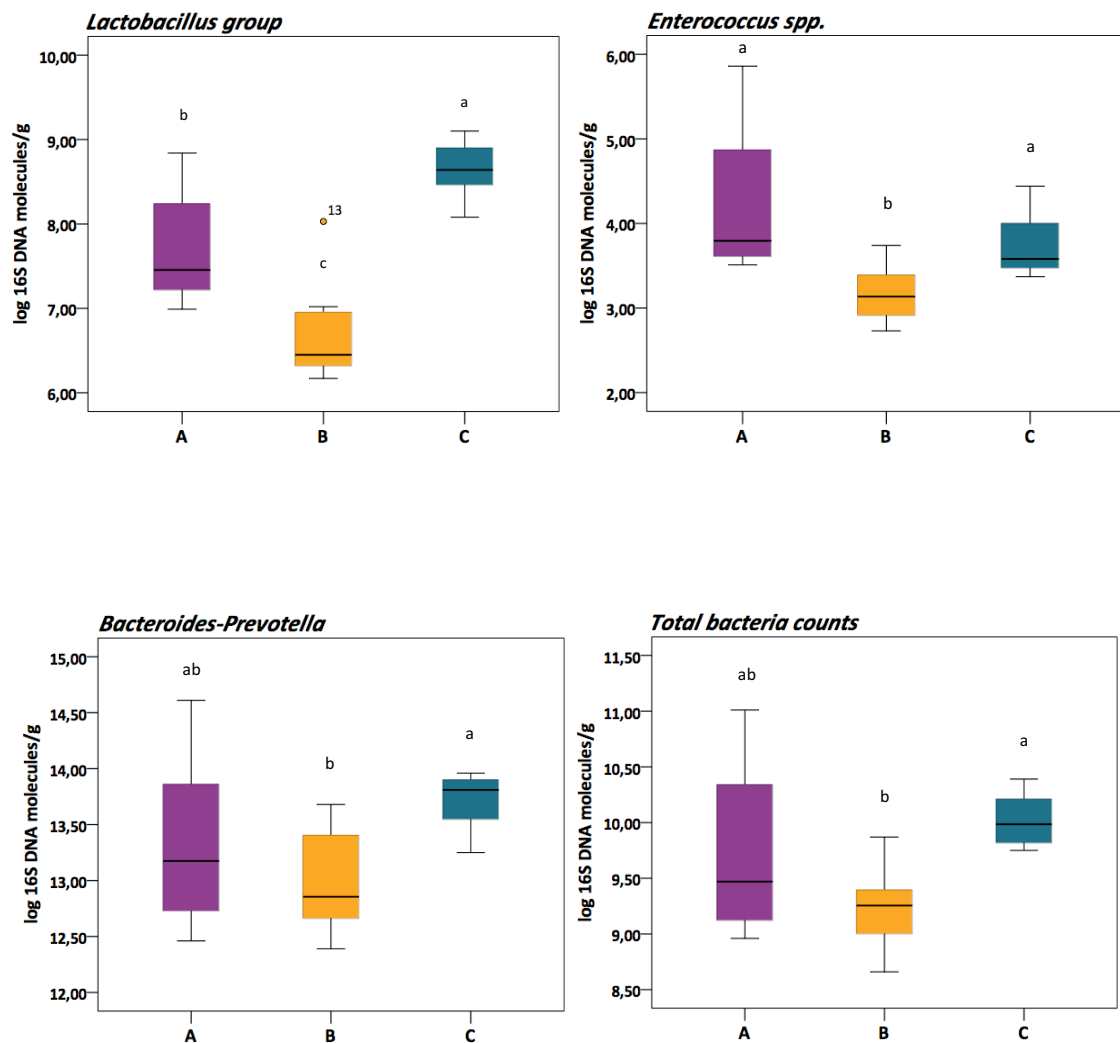
Bifidobacterium genus tuvo una tendencia estadística a ser menor en los grupos A y B ($p=0.068$) [C: 12.42 (12.09-12.71); A: 11.49 (11.12-11.88); B: 11.03 (10.50-12.28)].

En el caso de *Streptococcus tuf* gene, su presencia fue detectada en los grupos A y B, pero no se encontraron diferencias significativas en ellos [A: 3.45 (3.20-); B: 1.62 (1,57-)]. No se detectaron ni *Staphylococcus aureus* ni *Escherichia coli* en este modelo animal. Estas poblaciones se encontraron por debajo del nivel de detección (35 ciclos). Esto podría deberse a la cepa de ratones C57BL/6J escogida para el estudio y/o a la higiene procurada durante la manipulación de estos animales.

Akkermansia muciniphila no se detectó en ningún ratón del grupo B. Para este microorganismo, el grupo A mostró una menor variabilidad con respecto al grupo C, aunque las medianas de ambos grupos fueron similares [C: 5.67 (4.34-7.79); A: 4.36 (4.18-)].

En la **Tabla 4.10**, se puede observar el porcentaje de muestras positivas en cada grupo de estudio (A, B y C) para los distintos grupos microbianos analizados. En los tres tratamientos, encontramos un 100% de muestras positivas en los grupos *Lactobacillus group*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium coccooides group* y *Bacteroides-Prevotella*. Por el contrario, como en el caso del intestino delgado, no se encontró ninguna muestra positiva para los grupos *Staphylococcus aureus nuc gene* y *Escherichia coli*.

Interesantemente, a nivel cualitativo, *A. muciniphila* presentó un porcentaje significativo de muestras positivas mayor en el grupo C ($p=0.041$), mientras que no se encontraron diferencias en las frecuencias de aparición para otros grupos bacterianos (*Streptococcus tuf gene*, *Clostridium leptum* subgroup y *Bifidobacterium* genus) (**Tabla 4.10**).



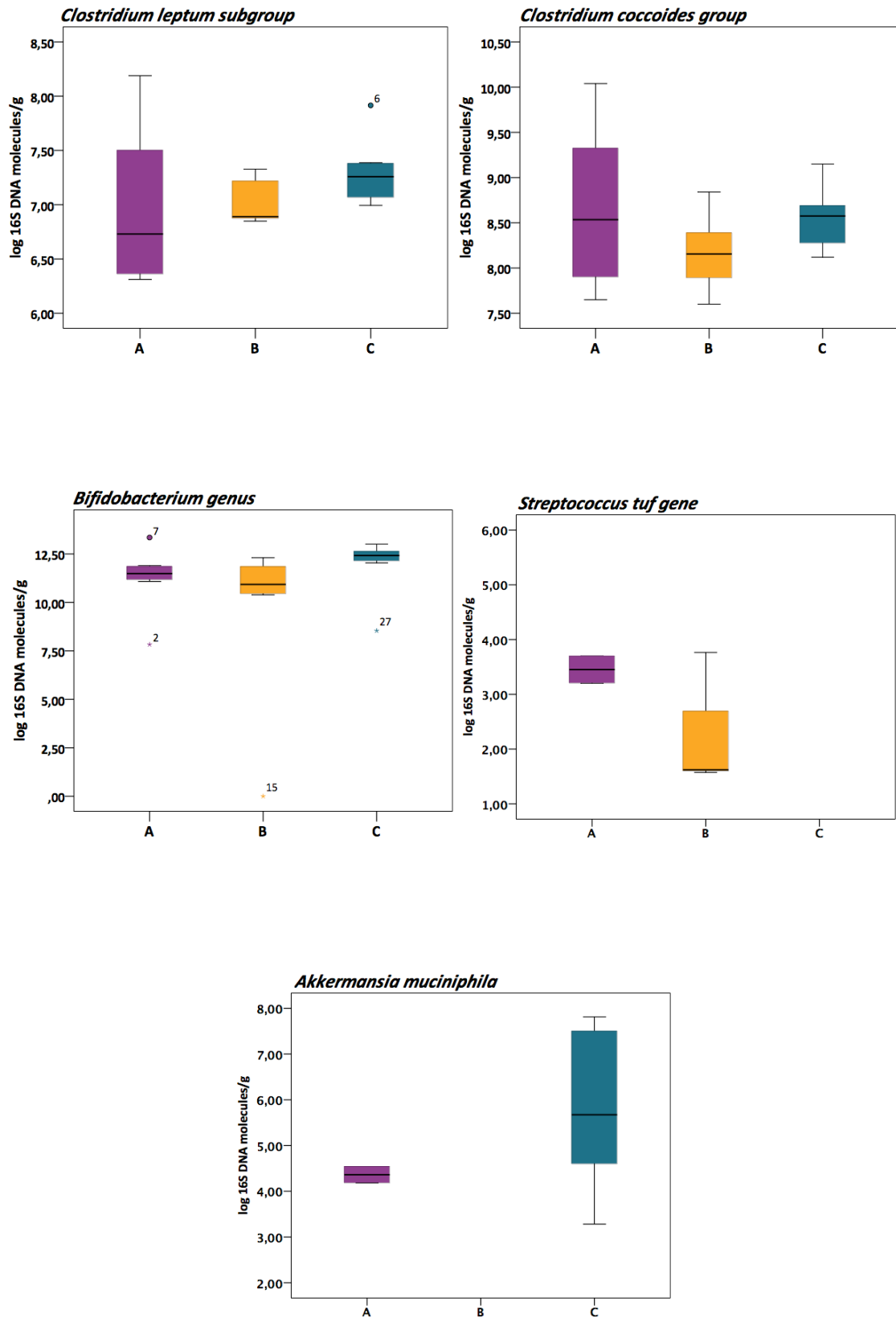


Figura 4.15. Diagramas de caja y bigotes (*box-plot*) de los recuentos bacterianos en las muestras fecales de intestino grueso de ratón, analizadas por qPCR. Representan la mediana de las moléculas de ADN 16S por gramo de heces, el rango intercuartílico (Q1-Q3) y la observación más pequeña/grande. Los círculos (°) y los asteriscos (*) representan los valores anormales (atípicos y extremos, respectivamente). Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Tabla 4.10. Frecuencias absolutas y porcentajes de amplificaciones positivas de las muestras de intestino grueso analizadas por PCR.

	A	B	C	p-valor
<i>Lactobacillus</i> group	8/8 (100%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	-
<i>Enterococcus</i> spp.	8/8 (100%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	-
<i>Staphylococcus aureus nuc</i> gene	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	-
<i>Streptococcus tuf</i> gene	2/8 (25%)	3/8 (37.5%)	0/8 (0%)	0.304
<i>Clostridium leptum</i> subgroup	7/8 (87.5%)	5/8 (62.5%)	8/8 (100%)	0.273
<i>Clostridium coccooides</i> group	8/8 (100%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	-
<i>Bifidobacterium</i> genus	8/8 (100%)	7/8 (87.5%)	8/8 (100%)	1.000
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	8/8 (100%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	-
<i>Akkermansia muciniphila</i>	2/8 (25%)	0/8 (0%)	7/8 (87.5%)	0.001
<i>Escherichia coli</i>	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	-
Bacterias totales	8/8 (100%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	-

p-valor: significancia estadística en la prueba exacta de Fisher ($p < 0.05$).

Este es el primer estudio, según nuestro conocimiento, que muestra las diferencias en la microbiota intestinal por el consumo de diferentes marcas comerciales de alimentos infantiles, homogeneizados y envasados en tarritos de cristal, listos para el consumo.

El grupo B mostró mayores cambios significativos en Firmicutes y Bacteroidetes que el grupo A, ambos con respecto al grupo C. Estos cambios se produjeron en los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroidetes-Prevotella*, y *Streptococcus*. El grupo A mostró cambios significativos en *Lactobacillus* group y la presencia de *Streptococcus* genus en algunos ratones (**Figura 4.15**). Según Wallace *et al.*, (2016), el fenotipo obeso es descrito por los filos Firmicutes y Bacteroidetes y su relación (ratio). Sin embargo, no hay evidencias sólidas de los mecanismos que establecen la existencia de una microbiota delgada (saludable) y obesa (enferma). Por lo tanto, hay una gran discrepancia en la literatura sobre qué géneros y especies bacterianas pueden estar asociadas con efectos adversos.

En comparación con sujetos de peso normal, la microbiota de ratones genéticamente obesos exhibe una mayor proporción de Firmicutes/Bacteroidetes (Ley *et al.*, 2005; Finegold *et al.*, 2014; Turnbaugh *et al.*, 2008). Esta proporción puede ser más eficiente en la obtención de energía de la dieta debido a que el número de genes dedicados a la hidrólisis de polisacáridos

es mucho mayor (Turnbaugh *et al.*, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2008). Además, la microbiota del intestino de los seres humanos obesos se comporta de la misma manera que la de los ratones obesos: el porcentaje de Bacteroidetes disminuye mientras que el porcentaje de Firmicutes aumenta (Ley *et al.*, 2005; Finegold *et al.*, 2014). Esto concuerda con la disminución en la población *Bacteroides-Prevotella* mostrada por el grupo B, y la presencia de *Streptococcus* genus en algunos ratones de los grupos A y B y su ausencia en el grupo C (**Figura 4.15**).

En contraste con la hipótesis que relaciona la obesidad genética con los cambios en la microbiota intestinal, otros autores han propuesto que tales cambios pueden ser explicados por la mayor cantidad de grasa que alcanza el colon (Cani *et al.*, 2007; Hildebrandt *et al.*, 2009). En estos estudios, el uso de una dieta rica en grasas disminuye efectivamente la cantidad de Bacteroidetes y correlativamente aumenta la de Firmicutes, independientemente de los fenotipos obesos o no obesos de los ratones.

Además del porcentaje de grasa en la dieta, el tipo de grasa también puede influir en la población de microbiota intestinal (Liu *et al.*, 2012). Los ácidos grasos insaturados (UFAs) ejercen efectos antibacterianos más fuertes en bacterias gram-positivas (en su mayoría Firmicutes) que en cepas gram-negativas (Desbois *et al.*, 2010). La **Tabla 4.2** demuestra que los grupos A y B ingirieron una cantidad de UFAs significativamente mayor que el grupo C. Por lo tanto, la tendencia de los UFAs a inhibir selectivamente las especies gram-positivas puede explicar por qué los ratones alimentados con las dietas A y B no mostraron el aumento esperado de Firmicutes, usualmente observado en la microbiota de sujetos obesos. Este hecho es más acentuado en el caso de *Lactobacillus* group para ambos grupos, y de *Enterococcus* spp. Para el grupo B (**Figura 4.15**). En este sentido, el perfil de ácidos grasos del alimento infantil B puede tener un efecto protector contra la microbiota obesa.

Kalliomäki *et al.*, (2008) reportaron una disminución en las bifidobacterias fecales en niños lactantes, que posteriormente desarrollaron sobrepeso u obesidad a la edad de 7 años. Por lo tanto, la reducción de *Bifidobacterium* genus observada en los grupos A y B podría ser un indicador del riesgo de obesidad en estos ratones.

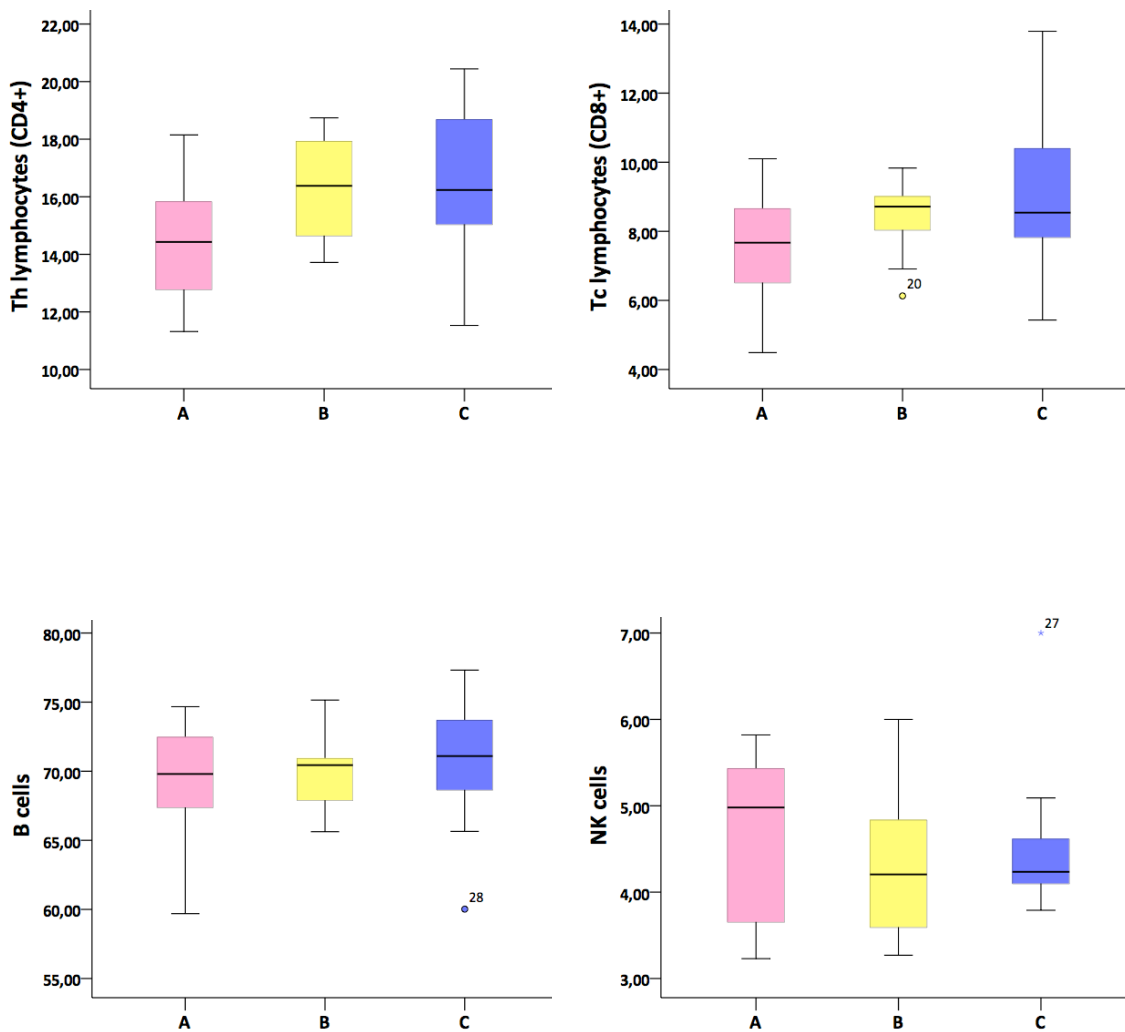
Con respecto a *A. muciniphila*, es una bacteria degradadora de la mucina que tiene una correlación inversa con el peso corporal tanto en roedores como en seres humanos (Everard *et al.*, 2011). Otro estudio de Everard *et al.* (2013) (Everard *et al.*, 2013) reportó que los ratones obesos tratados con *A. muciniphila*, a pesar de ser una bacteria gram-negativa, sufrieron trastornos metabólicos inducidos por dietas ricas en grasas, incluyendo ganancia de grasa

corporal, endotoxemia metabólica, inflamación del tejido adiposo y resistencia a la insulina. La presencia de *A. muciniphila* en el grupo C y su ausencia en el grupo B es consistente con la literatura, ya que el grupo C fue el más delgado y los ratones del grupo B desarrollaron sobrepeso. La colonización y degradación de la mucina por *A. muciniphila* es altamente sensible a los cambios ambientales porque depende tanto del pH como de la concentración de mucina (Van Herreweghen *et al.*, 2017). Este hecho puede explicar por qué la abundancia de *A. muciniphila* cambia drásticamente *in vivo* cuando cambian las condiciones en el colon como, por ejemplo, debido a ciertos estados de enfermedad (Everard *et al.*, 2011) o a intervenciones dietéticas como sucede en el presente estudio (Caesar *et al.*, 2015).

4.7. SISTEMA INMUNE: poblaciones celulares en bazo y citoquinas plasmáticas

La **Figura 4.16** muestra los diagramas de caja y bigotes de los porcentajes de las poblaciones celulares estudiadas en el bazo. No hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguna población celular examinada.

Se observó una correlación positiva «muy buena» entre las poblaciones de Th CD4+ y Tc CD8+ (coeficiente de correlación de Pearson 0.832, $p < 0.001$). Mientras que estas dos poblaciones se correlacionaron negativamente de forma «moderada» con las células B (Th CD4+ -0.521, $p = 0.001$, Tc CD8+ -0.495, $p = 0.002$). Además, Tc CD8+ se correlacionó negativamente con los macrófagos, también de forma «moderada» (-0.407, $p = 0.014$).



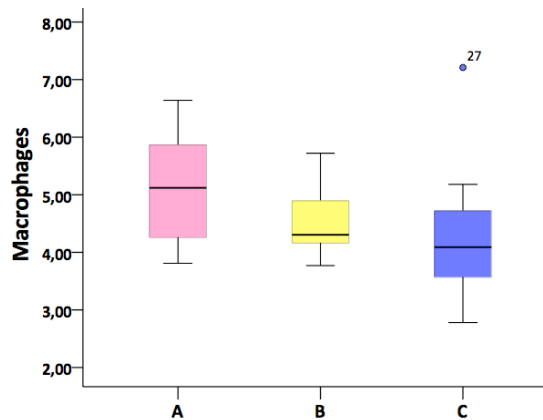


Figura 4.16. Diagramas de caja y bigotes (*box-plot*) de los porcentajes de linfocitos Th (CD4+), linfocitos Tc (CD8+), linfocitos B, células NK y macrófagos, encontrados en bazo. Representan la mediana, el rango intercuartílico (Q1-Q3) y la observación más pequeña/grande. Los círculos (°) y los asteriscos (*) representan los valores anormales (atípicos y extremos, respectivamente).

Por otra parte, la **Tabla 4.11** muestra los valores de citoquinas (pg/mL) en el plasma. Los mayores valores estadísticamente significativos de IL-10 se encontraron en el grupo A y los valores más bajos en el grupo C ($p=0.027$). El grupo B presentó valores intermedios sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en otras citoquinas.

Se observaron correlaciones «bajas» negativas entre la población de Th CD4+ y los niveles de IL-2 e IL-10 (IL-2 -0.398 , $p=0.024$; IL-10 -0.319 , $p=0.023$). Además, la población de Tc CD8+ se correlacionó, de forma «baja», negativamente con los niveles de IL-10 (-0.331 , $p=0.019$). Se encontró una correlación positiva, también «baja», entre las células B y los niveles de IL-2 (0.360 , $p=0.043$). Los niveles de IL-2 se correlacionaron negativamente con los niveles de IFN- γ , de forma «baja» (-0.324 , $p=0.013$).

Tabla 4.11. Citoquinas inflamatorias analizadas en las muestras de plasma de los tres grupos experimentales al final del período de intervención.

Citoquinas (pg/mL)	A	B	C
IL-2	1.66 ± 0.37	1.80 ± 0.33	1.70 ± 0.40
IL-4	0.13 ± 0.08	0.10 ± 0.07	0.13 ± 0.09
IL-6	35.62 ± 9.63	28.96 ± 5.53	13.82 ± 4.11
IFN-γ	1.05 ± 0.58	0.91 ± 0.56	1.31 ± 0.79
TNF	14.99 ± 4.60	12.08 ± 1.93	10.67 ± 2.96
IL-17A	2.43 ± 1.04	0.55 ± 0.55	1.54 ± 1.06
IL-10	27.14 ± 8.55 ^a	11.45 ± 5.08 ^{ab}	2.23 ± 2.23 ^b

¹Los valores se expresan como media ± SEM (n=12 por grupo).

a,b,c. Los valores con diferentes letras muestran diferencias significativas entre grupos tras realizar un ANOVA de una vía (p <0.05).

A pesar de las mayores ingestas de grasa por parte de los grupos A y B, no se encontraron diferencias en las poblaciones celulares del bazo. Estudios llevados a cabo en animales y en seres humanos, indican que las dietas con una elevada cantidad de grasa disminuyen la proliferación linfocitaria y la actividad de las células *natural killer* (NK) (efecto inmunodepresor), comparadas con dietas con bajo contenido graso. Sin embargo, estos efectos dependen de la cantidad y la proporción de grasa de la dieta, así como de su fuente (Ruiz-Bravo López & Jiménez Valera, 2010). Por otro lado, la administración de dietas deficientes en ácidos grasos esenciales a ratones provoca una disminución en el peso del bazo, así como una respuesta disminuida en la proliferación linfocitaria, el quimiotactismo de los neutrófilos, la toxicidad de los macrófagos y la respuesta de hipersensibilidad cutánea retrasada. Todos estos efectos suceden porque las células del sistema inmune necesitan ácidos grasos esenciales para formar sus membranas y, por consiguiente, mantener una respuesta inmunitaria adecuada (Gil-Hernández & Serra-Majem, 2012). Dada la presencia de ácidos grasos esenciales en cantidades suficientes en las dietas de ensayo, nuestros resultados no mostraron tales efectos de deficiencia en dichos macronutrientes.

No obstante, el enlace entre los ácidos grasos de la dieta y el sistema inmune, son los eicosanoides derivados de los PUFAs de 20 átomos de carbono (ETA, ARA y EPA) que, el presente trabajo, fueron obtenidos por los animales a partir de sus precursores (ácidos linoleico y linolénico). Estos eicosanoides regulan la inflamación y la función de los neutrófilos, macrófagos,

linfocitos B y T (Gil-Hernández & Sánchez de Medina Contreras, 2010; Tull *et al.*, 2009), y poseen efectos más o menos potentes en función de si proceden de la serie ω -6 u ω -3, respectivamente. En este sentido, la ingesta regular de PUFAs ω -3 limita la inflamación, ya que éstos compiten con el ARA por incorporarse a las membranas celulares y liberan eicosanoides (Calder, 2006; Singer *et al.*, 2008; Gil-Hernández & Sánchez de Medina Contreras, 2010) mucho menos activos, además de otros compuestos (lipoxinas, resolvinas y protectinas) derivados del EPA y DHA, los cuales desempeñan un papel importante en los procesos de resolución de la inflamación (Schwab & Serhan, 2006; Serhan, 2007; Kohli & Levy, 2009; Buckley *et al.*, 2013).

Altas ingestas de PUFAs ω -3 en la dieta reducen la producción de citoquinas (Vedin *et al.*, 2008) y, probablemente, reducen además otros biomarcadores de inflamación (proteína C reactiva, factores de complemento, mediadores lipídicos, enzimas proteolíticas, etc.) (Buckley *et al.*, 2013). Las citoquinas TNF, IL-6 e IL-10 actúan como mediadores de la inflamación. TNF e IL-6 son producidos por los macrófagos y por linfocitos T. Respecto a la citoquina antiinflamatoria IL-10, es capaz de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias derivadas de las células T y macrófagos activados (TNF, entre otras). La producción endógena de IL-10 ejerce un papel importante en la respuesta inflamatoria.

La obesidad puede contribuir a una incrementada producción de IL-6 por parte del tejido adiposo. La lipemia postprandial puede además modificar la producción de citoquinas que intervienen en la regulación de la inflamación y el remodelado vascular (Grainger *et al.*, 2000; Erridge *et al.*, 2007).

En cuanto a la IL-10, el grupo A mostró niveles significativamente más altos que el grupo C con valores intermedios para el grupo B ($p > 0.05$). Por un lado, se ha informado de que la disminución de la producción endógena de IL-10 está relacionada con la intolerancia a la glucosa y el desarrollo de la obesidad (Nakata *et al.*, 2016). Por otro lado, Cintra *et al.* (2012) informó que el tipo de ácidos grasos en la dieta de ratones pueden influir en los niveles de IL-10. Sustituyeron a las SFAs por UFAs en la dieta de los ratones (independientes del tipo de dosis y de ácidos grasos) y esto promovió reducciones en las expresiones de los marcadores inflamatorios (pI κ B- α , pJNK, TNF- α , SOCS3 e iNOS) en el hipotálamo, mientras que aumentó la expresión de IL-10. Por lo tanto, una vez más, la cantidad de UFAs ingerida por los grupos A y B puede ser la razón por la que el grupo A mostró los niveles de IL-10 más altos seguidos por el grupo B.

Por último, a pesar de las correlaciones mencionadas y debido a los bajos niveles de citoquinas encontradas en este estudio (**Tabla 4.4**), junto con el hecho de que no hubo diferencias significativas en las poblaciones de células del bazo (**Figura 4.8**), no se observó asociación clara entre estos hechos y la inflamación de bajo grado o cualquier deterioro del sistema inmunológico. Esto puede explicarse, en parte, por el hecho de que las dietas utilizadas en este estudio no son dietas ricas en grasas (HFD) y los alimentos infantiles son ricos en UFAs, como se discutió anteriormente, que pueden ejercer una especie de efecto protector contra los fenómenos mencionados, siendo más acentuado en el caso del grupo A. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para dilucidar este hecho.

4.8. CORRELACIONES ENTRE CITOQUINAS PLASMÁTICAS Y GRUPOS BACTERIANOS

Estudiamos la relación entre las citoquinas plasmáticas y la microbiota del intestino grueso. Se observó una correlación «moderada» negativa entre los niveles de *Bacteroides-Prevotella* e IL-4 (-0.414, $p=0.020$). Y se encontró una correlación «moderada» negativa entre los niveles de *A. muciniphila* e IL-6 (-0.450, $p=0.010$). Se observó una correlación «baja» positiva entre las dos poblaciones de clostridios analizados y los niveles de IL-17A (*Cl. Coccoides* 0.394, $p=0.030$, *Cl. Leptum* 0.553, $p=0.002$).

El impacto del contenido en grasa de la dieta en la microbiota intestinal y el desarrollo de la inflamación de bajo grado, ha sido ampliamente estudiado (Cani *et al.*, 2008; Cani *et al.*, 2007). Se caracteriza, además de por una alteración de la microbiota, por el aumento de bacterias gram-negativas en detrimento de las gram-positivas, por el aumento de la permeabilidad al LPS intestinal, un incremento de peso corporal y un aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6) en el plasma, lo cual se conoce como endotoxemia metabólica. Estos eventos aumentan los procesos oxidativos y proinflamatorios tanto en el plasma como en los tejidos periféricos, y también aumentan el riesgo de resistencia a la insulina (Cani *et al.*, 2008). En este trabajo, no se evaluaron las alteraciones de la permeabilidad intestinal ni las concentraciones plasmáticas de LPS, sin embargo, se han encontrado algunas correlaciones en los niveles de citoquinas en plasma.

Se encontró una correlación negativa entre IL-6 y *A. muciniphila*, que puede ser consistente con el hecho de que los sujetos obesos suelen presentar altos niveles de IL-6 y bajos niveles o ausencia de *A. muciniphila* (Cani *et al.*, 2008; Everard *et al.*, 2011). Además, una correlación positiva entre las dos poblaciones de clostridios analizados y los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-17A se observó para todos los grupos. La citoquina IL-17A proinflamatoria está relacionada con sujetos obesos (Zúñiga *et al.*, 2010), pero todavía no hay explicación para esta correlación positiva y tampoco para la correlación negativa entre la citoquina anti-inflamatoria IL-4 y *Bacteroides-Prevotella*. Por lo tanto, se necesita más investigación a este respecto.

Capítulo 5. Conclusiones

5. CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral, se ha llegado a las siguientes conclusiones globales:

- 1 El consumo de los alimentos infantiles conlleva un crecimiento acelerado de los ratones que comienza dos semanas después del destete y continúa durante todo el periodo de intervención. Dicho crecimiento se debe a un incremento en la adiposidad de los ratones de los grupos A y B, evidenciada por los parámetros morfométricos -peso, IMC y ratio de crecimiento tras el destete- que desemboca en un estado de sobrepeso de los animales, siendo el grupo A el de mayor adiposidad y sobrepeso. El macronutriente más influyente en estas diferencias entre los parámetros morfométricos es la cantidad de grasa total que, junto con la cantidad de sal, confieren mayor palatabilidad a los alimentos infantiles y una consiguiente hiperfagia.
- 2 El consumo de alimentos infantiles con mayor cantidad de ácido palmítico y menor de PUFAs como el ácido linoleico, incrementó significativamente la concentración plasmática de colesterol total y LDL-colesterol, empeorando el índice aterogénico. Estos resultados sugieren un posible efecto hipercolesterolémico asociado al consumo del alimento infantil A y a la llegada masiva de grasa al hígado. No obstante, los niveles de triglicéridos, AST y ALT en plasma no reflejan una relación con el estado obeso ni trastornos relacionados como resistencia a la insulina o diabetes.
- 3 El perfil de ácidos grasos del tejido adiposo epididimal de ratón es un buen biomarcador de la ingesta de MUFAs y PUFAs a largo plazo, no así en el caso de SFAs. Aunque los ratios ω -6/ ω -3 de las dietas no presentaran diferencias significativas, podrían influir en la «programación» mediante diferenciación de los preadipocitos en etapas tempranas del crecimiento para acomodar los adipocitos a la llegada de las grandes cantidades de grasa de los alimentos infantiles. Por otro lado, hasta qué punto las cantidades de SFAs presentes han sido capaces de afectar la diferenciación *de novo* de los adipocitos, es un hecho que aún desconocemos.
- 4 La expresión de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos en hígado sufrió las mayores diferencias de expresión tras el consumo del alimento infantil A. El consumo de este alimento infantil incrementó la expresión génica de proteínas

relacionadas con el transporte de lípidos y con la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal, regulando el metabolismo lipídico en el grupo A.

- 5 La expresión de genes relacionados con las principales vías de regulación de obesidad en el tejido adiposo sufrió las mayores diferencias de expresión con el consumo del alimento infantil A. Estos cambios de expresión génica afectan principalmente a genes relacionados con el gasto de energía y a receptores anorexigénicos, y en menor medida a hormonas y receptores orexigénicos.
- 6 Tanto la cantidad como la calidad de la grasa de los alimentos infantiles modulan la microbiota intestinal. No obstante, el perfil de ácidos grasos del alimento infantil B tiene un efecto mayor sobre las poblaciones bacterianas y podría además tener un efecto protector contra la típica microbiota del estado obeso, que se refleja en la disminución de las concentraciones de algunas poblaciones de Firmicutes; efecto contrario al esperado en el estado obeso.
- 7 La ingesta de grasa no se relacionó con cambios en las poblaciones celulares del bazo ni con las principales citoquinas proinflamatorias del estado obeso (TNF- α e IL-6). Aunque el consumo del alimento infantil A estuvo relacionado con cambios en la citoquina antiinflamatoria IL-10.
- 8 Estos resultados sugieren que el consumo a largo plazo de alimentos infantiles procedentes del mercado español, tendría que ser considerado como un factor dietético que afecta a la programación del crecimiento, el metabolismo y la microbiota intestinal durante el periodo crítico de la alimentación complementaria. Estos alimentos infantiles tendrían que ser considerados dentro de las estrategias dietéticas dirigidas a la prevención de sobrepeso y obesidad. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios que permitan conocer y determinar los mecanismos de actuación de cada uno de los macronutrientes tanto de forma independiente como en relación al resto de la matriz, y sobre todo investigar en la mejora de los perfiles de ácidos grasos de los alimentos. Por otro lado, se necesitan más estudios que avalúen pequeñas diferencias dietéticas integradas con otros alimentos de la dieta del bebé y sus hábitos de vida (tipo de lactancia, suplementos dietéticos, otros alimentos sólidos, actividad física, etc.). Asimismo, es necesario desarrollar un panel de biomarcadores más sensibles que permita una detección temprana para su prevención.

Capítulo 6. Extended Summary and Conclusions

SUMMARY

Introduction

"Nutritional programming" or "early nutritional programming of long-term health" is defined as the impact of specific amounts of foods or nutrients given during early stages of development, which may influence metabolism, leading to long-term changes. The impact of such changes may be manifested even several decades later (Agostoni *et al.*, 2013).

In this sense, overweight, obesity and associated disorders, besides offering some of the best evidence regarding early nutrition programming, are considered to be increasingly urgent public health problems since, given their exponential increase in the population, is considered a global phenomenon or epidemic in the 21st century. This increased prevalence is also seen in paediatric ages (WHO, 2016; Koletzko *et al.*, 2012).

Obese and overweight children tend to remain obese in adulthood and are more likely to have noncommunicable diseases, such as diabetes and cardiovascular disease, at an earlier age. Therefore, all those factors that may be related to their cause at earlier ages are widely investigated (WHO, 2016). Most of the experimental models established in relation to dietary programming focus on fetal development and maternal nutrition, or on the influence of breast milk components and infant formulas during the first months of life (Koletzko *et al.*, 2012). However, there is still little knowledge about the effects of introducing solid foods from 6 months of age.

During the complementary feeding period, programming has a critical window when the exposure to new food components together with the increased demand for nutrients may cause epigenetic changes. Moreover, during this period, both food preferences and feeding patterns are established with a long-term impact on health and nutritional status (Grote *et al.*, 2014). In addition, rapid weight gain in infancy increases the long-term risk of obesity (Ong & Loos, 2012).

Proteins, fats, particularly the fatty acid profile, and carbohydrates are prominent in nutritional programming studies because of the importance of potentially related diseases. Experimental animal studies, historical and prospective cohort studies in human subjects throughout life, and experimental and hypothesis testing interventions in human subjects with long-term follow-up support this knowledge. An example of this is the ALSALMA study reporting

that 96% of Spanish children aged 7 to 36 months consume more than twice the recommended amount of protein, which may increase the body mass index (BMI) (Dalmau *et al.*, 2015).

Notably, baby foods manufactured by industry has been widely used in some European countries, where a large percentage of parents often offer these products to their children (Kersting *et al.*, 1998; McAndrew *et al.*, 2010). This highlights the central role of the infant food industry in shaping the diets of babies and the importance of understanding the type of commercially available baby foods (García *et al.*, 2013). The role of macronutrient quality, as opposed to quantity, remains largely unknown and deserves to be investigated. In addition, how early nutrition during infancy and childhood can affect the metabolic health of the adult during exposure to a moderate obesogenic environment remains elusive.

On this basis, the main objective of the present Doctoral Thesis was to evaluate the effect of baby foods consumption from Spanish market, on growth, immune system, metabolism and other obesity biomarkers, such as gut microbiota, related to obesity in adult life, through an *in vivo* study. For that, a study using weaned C57BL/6J mice was carried out.

Materials and Methods

- **Experimental design**

For the experiment, thirty-six weaned male C57BL/6J mice (Harlan Laboratories®, Horst, Netherlands) aged between 21 to 23 days (3 weeks) were randomly separated in three different experimental groups for a 12-week intervention period. Each group was housed two mice per cage with six Experimental Units (EU) per group (**Figure 3.1** and **Figure 3.2**, Chapter 3). The animals had free access to food and sterile water and were kept in a light (12-12 hours light-dark cycles), temperature (22 ± 2 °C) and humidity (45-65% relative humidity) controlled environment throughout the experiment.

Different diets were administered to each experimental group ad libitum (**Figure 3.1**, Chapter 3). The first diet (group A) consisted of baby food jar A (90.3 kcal/100 g, 165 sodium mg/100g, 4.5% proteins, 11.1% carbohydrates, 0.5% fibre, 80.8% humidity, 3.1% fat, and a fatty acids profile S/M/P 1:2.1:0.6) and rodent chow. The second diet (group B) consisted of baby food jar B (67.5 kcal/100 g, 108 sodium mg/100g, 3.6% proteins, 7.2% carbohydrates, 0.5% fibre, 86% humidity, 2.7% fat and a fatty acids profile 1:2.8:1.7) and rodent chow. The control diet

(group C) was only rodent chow. The baby foods belonged to different brands of the Spanish market, both made with rice and chicken as main ingredients but with different profiles of macronutrients, as described earlier (**Table 3.2**, Chapter 3).

- **Analytical methods**

Daily food intake was recorded, and body weights and lengths were measured weekly and at the end of the experiment. At the end of the study, all mice were euthanized and blood, liver, adipose tissue, spleen and gut contents of small and large intestine samples were collected. Plasma was drawn by centrifugation (3000 g, 10 min, 4 °C). All samples were stored at -80 °C until the analytical procedures were carried out. Spleen samples were conserved in saline buffer until flow cytometer analysis.

Biochemical parameters were analysed in plasma, using an automatic analyser. Adipose tissue was used to determine the concentration of fatty acids by gas-liquid chromatography. The study of gene expression was carried out in liver and adipose tissue samples using 96-well PCR arrays design for the evaluation of fatty acid metabolism and obesity genes (PAMM007Z and PAMM017Z Qiagen, SABiosciences, respectively). Gut microbiota were analysed by qPCR. Finally, spleen cell populations and cytokines in plasma were analyzed by flow cytometry (**Figure 3.4**, Chapter 3).

Results and discussion

The growth curve from the fifth week of life until the endpoint, final BMI and post-weaning growth rates, observed in this study, demonstrate that mice growth in groups A and B were accelerated when compared with the group C (**Figure 4.1** and **Table 4.1**, Chapter 4). The baby food total amount ingested by groups A and B can be related to the higher growth, especially in group A. However, this does not agree with the total energy ingested, as groups A and C consumed the same kcal per day and group B ate less calories (**Table 4.2**, Chapter 4). It may well be that the energy from the rodent chow would be less available than that of the baby foods due to factors such as higher fiber content and the different protein origin and digestibility (vegetable vs animal). Therefore, baby foods can represent a different energy source in groups A and B growth, particularly the baby food A.

Group A ingested higher macronutrient amounts than group B, however group C ingested the highest quantities of proteins, fiber and carbohydrates (**Table 4.2**, Chapter 4). In this sense, the total fat ingested can be the key macronutrient that causes the highest growth and BMI of groups A and B, being more accentuated, again, in group A. Fat, besides being the most concentrated dietary energy source, may be responsible for the over-eating of foods due to favourable sensory properties (Montmayeur & Coutre, 2009). Salt also confers a high palatability to food. These facts may explain the greater preference for diets A and B, in particular for diet A. Bayol *et al.* (2007), in their cafeteria diet study reported that rats developed hyperphagia and a marked preference for foods high in fat, sugar and salt over rodent chow, which was associated with an increase in body weight and a trend toward obesity. This preference also occurs in humans (Bayol *et al.*, 2007).

On the other hand, proteins may also play an important role in growth. During infancy, accelerated postnatal weight gain is associated with fat mass increases, but later with developing obesity and other adverse effects, such as increased cardiovascular disease (CVD) risk. (Ong & Loos, 2006; Patel & Srinivasan, 2011; Koletzko *et al.*, 2012). This phenomenon is known as "accelerated postnatal growth hypothesis", and it is included in the Early Nutrition Programming of Long-Term Health (Koletzko *et al.*, 2012). It establishes that rapid postnatal weight gain may be the result of a high intake of nutrients that encourage such growth. The available evidences suggest that high protein intake leads to increased adipogenesis and weight gain (Koletzko *et al.*, 2012; Socha *et al.*, 2011; Rolland-Cachera *et al.*, 1995; Swiatecka *et al.*, 2017).

Our results show that group C ingested the highest amount of proteins, but this does not appear to be in agreement with the weight achieved and earlier data on protein. However, taking into account that the nutritional value of vegetable proteins together with the probable presence of dietary trypsin inhibitors, tannins, phytates and other antinutritional compounds in the rodent chow may cause substantial reductions in protein and amino acid digestibility (Gilani *et al.*, 2012) resulting in reduction of the protein quality ingested by group C.

Therefore, taking into account that group C ingested higher amount of proteins, carbohydrates and fiber than groups A and B, together with the fact that groups A and B ingested higher amount of fat than group C (**Table 4.2**, Chapter 4), it can be concluded that the weight increase found in this study can be attributed mainly to fat, and this nutrient may be a "programming" factor in rapid growth.

Increased concentration of total cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index was found in group A. It was associated with the abundant intake of certain fatty acids, such as palmitic acid. However, triglyceride, AST and ALT levels in plasma do not reflect a relationship to the obese condition or related disorders such as insulin resistance or diabetes.

The fatty acid profile of the mouse epididimal adipose tissue is a good biomarker of the long-term intake of MUFAs and PUFAs, but not in the case of SFAs. A high number of correlations were found between adipose tissue fatty acids and dietetic fatty acids.

In relation to fatty acid gene expression analysed in liver, an underexpression of several genes related to fatty acid transport, catabolism and biosynthesis regulation was observed in groups A and B. In addition, more genes were expressed in group A. The consumption of this baby food increased the gene expression of proteins related to lipid transport and mitochondrial and peroxisomal β -oxidation, regulating lipid metabolism in group A. In addition, the expression of genes related to the main pathways of regulation of obesity in adipose tissue suffered the greatest differences in expression with consumption of baby food A. These changes in gene expression mainly affect genes related to energy expenditure and anorexigenic receptors, and also to hormones and orexigenic receptors.

Related to gut microbiota results, group B showed more significant changes in Firmicutes and Bacteroidetes than group A, both with respect to group C. These changes were in *Lactobacillus* group, *Enterococcus* spp., *Bacteroidetes-Prevotella* and the *Streptococcus* genus presence in some mice. Group A showed significant changes in *Lactobacillus* group and the *Streptococcus* genus presence in some mice (**Figure 4.15** and **Table 4.10**, Chapter 4). According to Wallace *et al.*, (2016), the obese phenotype is described by the phyla Firmicutes and Bacteroidetes and their ratio. However, there is no solid evidence of the mechanisms that establish a lean (healthy) and obese (diseased) microbiota exists. Therefore, there is a large discrepancy in the literature as to which bacterial genera and species may be associated with untoward effects.

Compared with normal weight subjects, genetically obese mice gut microbiota exhibit a higher proportion of Firmicutes/Bacteroidetes (Ley *et al.*, 2005; Finegold *et al.*, 2014; Turnbaugh *et al.*, 2008). This proportion may be more efficient in harvesting energy from the diet because the number of genes dedicated to polysaccharide hydrolysis is much higher (Turnbaugh *et al.*, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2008). In addition, obese humans gut microbiota behaves in the same way as that of obese mice: Bacteroidetes percentage decreases while the percentage of

Firmicutes increases (Ley *et al.*, 2005; Finegold *et al.*, 2014). This is consistent with the decrease in *Bacteroides-Prevotella* population shown by group B and *Streptococcus* genus presence in some mice of groups A and B and its absence in group C (**Figure 4.15**, Chapter).

In contrast to the hypothesis that relates genetic obesity to gut microbiota changes, other authors have proposed that such changes can be explained by the greater amount of fat that reaches the colon (Cani *et al.*, 2007; Hildebrandt *et al.*, 2009). In these studies, using a high-fat diet effectively decreases the Bacteroidetes amount and correlatively increases that of Firmicutes, regardless of the obese or non-obese mice phenotype.

In addition to the percentage of fat in diet, the fat type can also influence intestinal microbiota population (Liu *et al.*, 2012). Unsaturated fatty acids (UFAs) exert stronger antibacterial effects on gram-positive (mostly Firmicutes) than gram-negative strains (Desbois & Smith, 2010). **Table 4.2** (Chapter 4) demonstrates that group A and B ingested significantly higher UFA than group C. Therefore, UFAs tendency to selectively inhibit gram-positive species may explain why mice fed diets A and B, did not show the expected Firmicutes increase, usually observed in the microbiota of obese subjects. This fact is more accentuated in the case of *Lactobacillus* group for both groups, and *Enterococcus* spp. for group B (**Figure 4.15**, Chapter 4). In this sense, the fatty acid profile of baby food B can have a protective effect.

Kalliomäki *et al.*, (2008) reported a decrease in the infant's fecal bifidobacteria, which subsequently developed overweight or obesity at the age of 7 years. Therefore, the reduction of Bifidobacterium genus observed in groups A and B might be an indicator of obesity risk in these mice.

With regard to *A. muciniphila*, being a mucin-degrading bacterium has an inverse correlation with body weight in both rodents and humans (Everard *et al.*, 2011). Another study of Everard *et al.* (2013) reported that obese mice treated with *A. muciniphila*, despite being a gram-negative bacterium, suffered metabolic disorders induced by high-fat diets, including fat gain, metabolic endotoxemia, adipose tissue inflammation and insulin resistance. The presence of *A. muciniphila* in group C and its absence in group B is consistent with the literature as group C was the leanest and group B mice were overweight (**Table 4.10**, Chapter 4). Colonization and mucin degradation by *A. muciniphila* is highly sensitive to environmental changes because it is dependent on both pH and mucin concentration (Van Herreweghen *et al.*, 2017). This fact can explain why *A. muciniphila* abundance change drastically in vivo when conditions in the colon

change, e.g. because of certain disease states (Everard *et al.*, 2011) or dietary interventions such as in the present study (Caesar *et al.*, 2015).

The diet fat content impact on the gut microbiota and the low-grade inflammation development has been extensively studied (Cani *et al.*, 2008; Cani *et al.*, 2007). It is characterized, in addition to a microbiota alteration by increasing gram-negative bacteria in detriment of gram-positive, for intestinal LPS permeability increase, body weight increase and pro-inflammatory cytokine (TNF- α , IL-6) levels increase in plasma, which is known as metabolic endotoxemia. These events increase oxidative and pro-inflammatory processes in both plasma and peripheral tissues, and also increase the risk of insulin resistance (Cani *et al.*, 2008). Neither alteration of intestinal permeability nor plasma LPS concentrations were evaluated, however some cytokine alterations have been found in this study.

A negative correlation between IL-6 and *A. muciniphila* was found, that can be consistent with the fact that obese subjects usually present high IL-6 levels and low levels or absence of *A. muciniphila* (Cani *et al.*, 2008; Everard *et al.*, 2011). In addition, a positive correlation between the two Clostridial population analysed and pro-inflammatory IL-17A levels was observed for all groups. Pro-inflammatory IL-17A is related with obese subjects (Zúñiga *et al.*, 2010) but there is still no explanation to this positive correlation and neither for the negative correlation between anti-inflammatory IL-4 and *Bacteroides-Prevotella* group. Therefore, further research is needed in this regard.

As regard to IL-10, group A had significantly higher levels of IL-10 than C group with intermediate values for B group ($p > 0.05$) (**Table 4.11**, Chapter 4). On the one hand, it has been reported that lowered IL-10 endogenic production is related to glucose intolerance and obesity development (Nakata *et al.*, 2016). On the other hand, Cintra *et al.* (2012) reported that fatty acids type in the mice diet can influence IL-10 levels. They substituted SFAs for UFAs in the mice diet (dose-, and fatty acid type-independent) and this fact promoted reductions in the expressions of the inflammatory markers (pI κ B- α , pJNK, TNF- α , SOCS3 and iNOS) in the hypothalamus, while increasing IL-10 expression. Therefore, once again, the UFAs amount ingested by groups A and B can be the reason why the group A showed the highest IL-10 levels followed by group B.

CONCLUSIONS

The following conclusions were extracted from the study carried out in the present Doctoral Thesis:

- 1 The consumption of baby foods produces an accelerated growth of mice that begins two weeks after weaning and continues throughout the intervention period. This growth is due to an increase in the adiposity of groups A and B, evidenced by the morphometric parameters -weight, BMI and post-weaning growth rates- leading to a state of overweight of the animals, being the group A the one of greater adiposity and overweight. The most influential macronutrient in these differences between the morphometric parameters is the amount of total fat that, together with the amount of salt, confer greater palatability to baby foods and a consequent hyperphagia.
- 2 The consumption of baby foods with higher amounts of palmitic acid and lower PUFAs such as linoleic acid significantly increased the plasma concentration of total cholesterol and LDL-cholesterol, worsening the atherogenic index. These results suggest a possible hypercholesterolemic effect associated with consumption of baby food A and the massive arrival of fat to the liver. However, triglyceride, AST and ALT levels in plasma do not reflect a relationship to the obese condition or related disorders such as insulin resistance or diabetes.
- 3 The fatty acid profile of the mouse epididimal adipose tissue is a good biomarker of the long-term intake of MUFAs and PUFAs, but not in the case of SFAs. Although the ω -6/ ω -3 ratios of the diets show no significant differences, they could influence "programming" by differentiating preadipocytes in early stages of growth to accommodate adipocytes upon the arrival of large amounts of fat from baby foods. On the other hand, to what extent the amounts of SFAs present have been able to affect *de novo* differentiation of adipocytes, is a fact that we still do not know.
- 4 Expression of genes related to fatty acid metabolism in liver suffered the greatest differences in expression after consumption of baby food A. The consumption of this baby food increased the gene expression of proteins related to lipid transport and mitochondrial and peroxisomal β -oxidation, regulating lipid metabolism in group A.

- 5 The expression of genes related to the main pathways of regulation of obesity in adipose tissue suffered the greatest differences in expression with consumption of baby food A. These changes in gene expression mainly affect genes related to energy expenditure and anorexigenic receptors, and also to hormones and orexigenic receptors.
- 6 Both the amount and quality of fat in baby foods modulate the gut microbiota. However, the fatty acid profile of baby food B has a greater effect on bacterial populations and could also have a protective effect against the typical microbiota of the obese state, which is reflected in the decrease in the concentrations of some populations of Firmicutes.
- 7 Fat intake was not related to changes in spleen cell populations or to proinflammatory cytokines of the obese state (TNF- α and IL-6). Although consumption of baby food A was related to changes in the IL-10 anti-inflammatory cytokine.
- 8 These results suggest that the long-term consumption of baby foods from the Spanish market would have to be considered as a dietary factor affecting the growth, metabolism and gut microbiota programming during the critical period of complementary feeding. These baby foods would have to be considered within dietary strategies aimed at preventing overweight and obesity. However, it is necessary to carry out more studies to know and determine the mechanisms of action of each of the macronutrients both independently and in relation to all the food matrix, and especially to investigate the improvement of acid fatty profiles in foods. On the other hand, more studies are needed to evaluate small dietary differences integrated with other foods in the baby's diet and lifestyle (breastfeeding, dietary supplements, other solid foods, physical activity, etc.). It is also necessary to develop a panel of more sensitive biomarkers that allows an early detection for its prevention.

Capítulo 7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adair, L. S. (2012). How could complementary feeding patterns affect the susceptibility to NCD later in life? *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 22(10), 765-769. doi: 10.1016/j.numecd.2012.03.011
- Agostoni, C., Baselli, L., & Mazzoni, M. B. (2013). Early nutrition patterns and diseases of adulthood: a plausible link? *Eur J Intern Med*, 24(1), 5-10. doi: 10.1016/j.ejim.2012.08.011
- Agostoni, C., Braegger, C., Decsi, T., Kolacek, S., Koletzko, B., Mihatsch, W., van Goudoever, J. (2011). Role of dietary factors and food habits in the development of childhood obesity: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 52(6), 662-669. doi: 10.1097/MPG.0b013e3182169253
- Agostoni, C., Decsi, T., Fewtrell, M., Goulet, O., Kolacek, S., Koletzko, B., . . . van Goudoever, J. (2008). Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 46(1), 99-110. doi: 10.1097/01.mpg.0000304464.60788.bd
- Agricultura, O. d. I. N. U. p. I. A. y. I. (2012). *Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos*. Granada: Organización Mundial de la Salud.
- Ailhaud, G., & Guesnet, P. (2004). Fatty acid composition of fats is an early determinant of childhood obesity: a short review and an opinion. *Obes Rev*, 5(1), 21-26.
- Ailhaud, G., Guesnet, P., & Cunnane, S. C. (2008). An emerging risk factor for obesity: does disequilibrium of polyunsaturated fatty acid metabolism contribute to excessive adipose tissue development? *Br J Nutr*, 100(3), 461-470. doi: 10.1017/s0007114508911569
- Alam, C., Valkonen, S., Ohls, S., Tornqvist, K., & Hanninen, A. (2010). Enhanced trafficking to the pancreatic lymph nodes and auto-antigen presentation capacity distinguishes peritoneal B lymphocytes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*, 53(2), 346-355. doi: 10.1007/s00125-009-1599-x

- Alvisi, P., Brusa, S., Alboresi, S., Amarri, S., Bottau, P., Cavagni, G., . . . Agostoni, C. (2015). Recommendations on complementary feeding for healthy, full-term infants. *Ital J Pediatr*, *41*, 36. doi: 10.1186/s13052-015-0143-5
- Amri, E. Z., Ailhaud, G., & Grimaldi, P. A. (1994). Fatty acids as signal transducing molecules: involvement in the differentiation of preadipose to adipose cells. *J Lipid Res*, *35*(5), 930-937.
- Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M., & Finlay, B. (2014). The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front Immunol*, *5*, 427. doi: 10.3389/fimmu.2014.00427
- Balk, E. M., Lichtenstein, A. H., Chung, M., Kupelnick, B., Chew, P., & Lau, J. (2006). Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis*, *189*(1), 19-30. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.012
- Ballesteros Arribas, J. M., Dal-Re Saavedra, M., Pérez-Farinós, N., & Villar Villalba, C. (2007). La estrategia para la nutrición, actividad física y prevención de la obesidad: estrategia NAOS. *Revista Española de Salud Pública*, *81*(5), 443-449.
- Baylin, A., Kabagambe, E. K., Siles, X., & Campos, H. (2002). Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr*, *76*(4), 750-757.
- Bayol, S. A., Farrington, S. J., & Stickland, N. C. (2007). A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br J Nutr*, *98*(4), 843-851. doi: 10.1017/s0007114507812037
- Beynen, A. C., Hermus, R. J., & Hautvast, J. G. (1980). A mathematical relationship between the fatty acid composition of the diet and that of the adipose tissue in man. *Am J Clin Nutr*, *33*(1), 81-85.
- BK, J., K, T., I, H., MS, T., C, R., & KR, N. (1983). Acyl pattern of adipose tissue triglycerides, plasma free fatty acids, and diet of a group of men participating in a primary coronary prevention program (the Oslo Study). *Am J Clin Nutr*, *38*, 906-913.

- Brakstad, O. G., Aasbakk, K., & Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(7), 1654-1660.
- Branca, F., & Caroli, M. (2012). Complementary feeding and dietary prevention of non communicable diseases: A gap in the life course approach? *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *22*(10), 763-764. doi: 10.1016/j.numecd.2012.07.009
- Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Serhan, C. N., Stockinger, B., & Tak, P. P. (2013). The resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, *13*(1), 59-66. doi: 10.1038/nri3362
- Burns, A., Parker, L., & Birch, L. L. (2011). *Early childhood obesity prevention policies*: National Academies Press.
- Butel, M. J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect*, *44*(1), 1-8. doi: 10.1016/j.medmal.2013.10.002
- C, G.-G., & S, S. (2016). Novel Probiotics and Prebiotics: How Can They Help in Human Gut Microbiota Dysbiosis? *Applied Food Biotechnology*, *3*(2), 72-81.
- Caesar, R., Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., Cani, P. D., & Backhed, F. (2015). Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab*, *22*(4), 658-668. doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.026
- Calder, P. C. (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*, *83*(6 Suppl), 1505s-1519s.
- Cani, P. D. (2013). Gut microbiota and obesity: lessons from the microbiome. *Brief Funct Genomics*, *12*(4), 381-387. doi: 10.1093/bfpg/elt014
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, *56*(7), 1761-1772. doi: 10.2337/db06-1491
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic

- endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57(6), 1470-1481. doi: 10.2337/db07-1403
- Cintra, D. E., Ropelle, E. R., Moraes, J. C., Pauli, J. R., Morari, J., Souza, C. T., Velloso, L. A. (2012). Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One*, 7(1), e30571. doi: 10.1371/journal.pone.0030571
- Collado, M. C., Derrien, M., Isolauri, E., de Vos, W. M., & Salminen, S. (2007). Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Appl Environ Microbiol*, 73(23), 7767-7770. doi: 10.1128/aem.01477-07
- D'Argenio, V., & Salvatore, F. (2015). The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta*, 451, 97-102. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.003>
- Dalmau, J., Pena-Quintana, L., Morais, A., Martinez, V., Varea, V., Martinez, M. J., & Soler, B. (2015). [Quantitative analysis of nutrient intake in children under 3 years old. ALSALMA study]. *An Pediatr (Barc)*, 82(4), 255-266. doi: 10.1016/j.anpedi.2014.09.017
- de Jong, C., Boehm, G., Kikkert, H. K., & Hadders-Algra, M. (2011). The Groningen LCPUFA study: No effect of short-term postnatal long-chain polyunsaturated fatty acids in healthy term infants on cardiovascular and anthropometric development at 9 years. *Pediatr Res*, 70(4), 411-416. doi: 10.1203/PDR.0b013e31822a5ee0
- de Wit, N., Derrien, M., Bosch-Vermeulen, H., Oosterink, E., Keshtkar, S., Duval, C., van der Meer, R. (2012). Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303(5), G589-599. doi: 10.1152/ajpgi.00488.2011
- Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85(6), 1629-1642. doi: 10.1007/s00253-009-2355-3

- Diascro, D. D., Jr., Vogel, R. L., Johnson, T. E., Witherup, K. M., Pitzemberger, S. M., Rutledge, S. J., . . . Schmidt, A. (1998). High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. *J Bone Miner Res*, *13*(1), 96-106. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.1.96
- Dörner, G. (1975). Perinatal hormone levels and brain organization *Anatomical neuroendocrinology* (pp. 245-252): Karger Publishers.
- Ducatelle, R., Eeckhaut, V., Haesebrouck, F., & Van Immerseel, F. (2015). A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: present status and future perspectives. *Animal*, *9*(1), 43-48. doi: 10.1017/s1751731114002584
- Efsa Panel on Dietetic Products, N., & Allergies. (2009). Scientific Opinion on the appropriate age for introduction of complementary feeding of infants. *EFSA Journal*, *7*(12), 1423-n/a. doi: 10.2903/j.efsa.2009.1423
- Erridge, C., Attina, T., Spickett, C. M., & Webb, D. J. (2007). A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr*, *86*(5), 1286-1292.
- EU. (2013). *Journal. L 181/35-56*.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., . . . Delzenne, N. M. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(22), 9066-9071.
- Everard, A., Lazarevic, V., Derrien, M., Girard, M., Muccioli, G. G., Neyrinck, A. M., Cani, P. D. (2011). Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes*, *60*(11), 2775-2786. doi: 10.2337/db11-0227
- Faith, J. J., McNulty, N. P., Rey, F. E., & Gordon, J. I. (2011). Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science*, *333*(6038), 101-104. doi: 10.1126/science.1206025
- FAO. (2009). *Fats and fatty acids in human nutrition*: Karger.

- Fernandez, L., Langa, S., Martin, V., Maldonado, A., Jimenez, E., Martin, R., & Rodriguez, J. M. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res*, *69*(1), 1-10. doi: 10.1016/j.phrs.2012.09.001
- Field, C. J., Angel, A., & Clandinin, M. T. (1985). Relationship of diet to the fatty acid composition of human adipose tissue structural and stored lipids. *Am J Clin Nutr*, *42*(6), 1206-1220.
- Finegold, S. M., Li, Z., Summanen, P. H., Downes, J., Thames, G., Corbett, K., . . . Heber, D. (2014). Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. *Food Funct*, *5*(3), 436-445. doi: 10.1039/c3fo60348b
- Gaillard, D., Négrel, R., Lagarde, M., & Ailhaud, G. (1989). Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells. *Biochemical Journal*, *257*(2), 389-397.
- García, A. L., Raza, S., Parrett, A., & Wright, C. M. (2013). Nutritional content of infant commercial weaning foods in the UK. *Arch Dis Child*. doi: 10.1136/archdischild-2012-303386
- Garland, M., Sacks, F. M., Colditz, G. A., Rimm, E. B., Sampson, L. A., Willett, W. C., & Hunter, D. J. (1998). The relation between dietary intake and adipose tissue composition of selected fatty acids in US women. *Am J Clin Nutr*, *67*(1), 25-30.
- Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G. T., & de Vos, W. M. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr*, *6*(3), 209-240. doi: 10.1007/s12263-011-0229-7
- Gibson, R. S. (2005). *Principles of Nutritional Assessment*: Oxford University Press.
- Gil, A., & Sánchez, F. (2010). Comunicación intercelular: hormonas, eicosanoides y citoquinas. *Gil Hernández A. Tratado de nutrición*, *2*, 51-60.
- Gil, A., & Sánchez, F. (2010). Comunicación intercelular: hormonas, eicosanoides y citoquinas. *Gil Hernández A. Tratado de nutrición*, *2*, 51-60.

- Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Cooper, C., & Thornburg, K. L. (2008). Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med*, *359*(1), 61-73. doi: 10.1056/NEJMra0708473
- Grainger, D. J., Mosedale, D. E., Metcalfe, J. C., & Bottinger, E. P. (2000). Dietary fat and reduced levels of TGFbeta1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions. *J Cell Sci*, *113* (Pt 13), 2355-2361.
- Grote, V., & Theurich, M. (2014). Complementary feeding and obesity risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *17*(3), 273-277. doi: 10.1097/mco.0000000000000054
- Gueimonde, M., Tolkkio, S., Korpimaki, T., & Salminen, S. (2004). New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Appl Environ Microbiol*, *70*(7), 4165-4169. doi: 10.1128/aem.70.7.4165-4169.2004
- Gutierrez-Diaz, I., Fernandez-Navarro, T., Sanchez, B., Margolles, A., & Gonzalez, S. (2016). Mediterranean diet and faecal microbiota: a transversal study. *Food Funct*, *7*(5), 2347-2356. doi: 10.1039/c6fo00105j
- Hildebrandt, M. A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S. A., Keilbaugh, S. A., Hamady, M., Chen, Y. Y., . . . Wu, G. D. (2009). High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, *137*(5), 1716-1724.e1711-1712. doi: 10.1053/j.gastro.2009.08.042
- Hui-Hui T, J. P.-E. C. (2010). Non-alcoholic fatty liver disease. *Proceedings of Singapore Healthcare*, *19*(1), 36-50.
- Hunter, D. (1998). Biochemical indicators of dietary intake. In W. WC (Ed.), *Nutritional epidemiology* (2 ed., pp. 174-243). New York: Oxford University Press.
- Hunter, D. J., Rimm, E. B., Sacks, F. M., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Litin, L. B., & Willett, W. C. (1992). Comparison of measures of fatty acid intake by subcutaneous fat aspirate, food frequency questionnaire, and diet records in a free-living population of US men. *Am J Epidemiol*, *135*(4), 418-427.
- J., G. P., & K.M., K. (1990). Problems in interpretation of dietary and biochemical data from population

- studies. In B. ML (Ed.), *Present knowledge in nutrition* (pp. 407-414). Washington: International Life Sciences Institute. Nutrition Foundation.
- Jakobsdottir, G., Nyman, M., & Fak, F. (2014). Designing future prebiotic fiber to target metabolic syndrome. *Nutrition, 30*(5), 497-502. doi: 10.1016/j.nut.2013.08.013
- Janovska, P., & Kopecky, J. (2009). Adipose tissue-muscle interactions and the metabolic effects of n-3 LCPUFA - implications for programming effects of early diet. *Adv Exp Med Biol, 646*, 149-157. doi: 10.1007/978-1-4020-9173-5_17
- Jensen, C. L., Prager, T. C., Fraley, J. K., Chen, H., Anderson, R. E., & Heird, W. C. (1997). Effect of dietary linoleic/alpha-linolenic acid ratio on growth and visual function of term infants. *J Pediatr, 131*(2), 200-209.
- Jordán, F., Lauria, M., Scotti, M., Nguyen, T.-P., Praveen, P., Morine, M., & Priami, C. (2015). Diversity of key players in the microbial ecosystems of the human body. *5*, 15920. doi: 10.1038/srep15920
- <https://www.nature.com/articles/srep15920#supplementary-information>
- Jump, D. B. (2002). Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol, 13*(2), 155-164.
- Kalliomaki, M., Collado, M. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2008). Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr, 87*(3), 534-538.
- Kennedy, K., Ross, S., Isaacs, E. B., Weaver, L. T., Singhal, A., Lucas, A., & Fewtrell, M. S. (2010). The 10-year follow-up of a randomised trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants: effects on growth and blood pressure. *Arch Dis Child, 95*(8), 588-595. doi: 10.1136/adc.2009.167270
- Kersting, M., Alexy, U., Sichert-Hellert, W., Manz, F., & Schoch, G. (1998). Measured consumption of commercial infant food products in German infants: results from the DONALD study. Dortmund Nutritional and Anthropometrical Longitudinally Designed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr, 27*(5), 547-552.

- Knutsen, S. F., Fraser, G. E., Beeson, W. L., Lindsted, K. D., & Shavlik, D. J. (2003). Comparison of adipose tissue fatty acids with dietary fatty acids as measured by 24-hour recall and food frequency questionnaire in Black and White Adventists: the Adventist Health Study. *Ann Epidemiol*, *13*(2), 119-127.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108 Suppl 1*, 4578-4585. doi: 10.1073/pnas.1000081107
- Kohli, P., & Levy, B. D. (2009). Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br J Pharmacol*, *158*(4), 960-971. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00290.x
- Koletzko, B., Brands, B., Poston, L., Godfrey, K., & Demmelmair, H. (2012). Early nutrition programming of long-term health. *Proc Nutr Soc*, *71*(3), 371-378. doi: 10.1017/s0029665112000596
- Koletzko, B., Lien, E., Agostoni, C., Bohles, H., Campoy, C., Cetin, I., Uauy, R. (2008). The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med*, *36*(1), 5-14. doi: 10.1515/jpm.2008.001
- Korotkova, M., Gabrielsson, B., Lonn, M., Hanson, L. A., & Strandvik, B. (2002). Leptin levels in rat offspring are modified by the ratio of linoleic to alpha-linolenic acid in the maternal diet. *J Lipid Res*, *43*(10), 1743-1749.
- Kwiterovich, P. O., Jr. (2002). Clinical relevance of the biochemical, metabolic, and genetic factors that influence low-density lipoprotein heterogeneity. *Am J Cardiol*, *90*(8a), 30i-47i.
- Lama More, R. A., Alonso Franch, A., Gil-Campos, M., Leis Trabazo, R., Martínez Suárez, V., Moráis López, A., Pedrón Giner, M. C. (2006). Obesidad Infantil. Recomendaciones del Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría Parte I. Prevención. Detección precoz. Papel del pediatra. *Anales de Pediatría*, *65*(6), 607-615. doi: <http://dx.doi.org/10.1157/130958>

- Lands, W. E. (1995). Long-term fat intake and biomarkers. *Am J Clin Nutr*, 61(3 Suppl), 721s-725s.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), 541-546. doi: 10.1038/nature12506
- <http://www.nature.com/nature/journal/v500/n7464/abs/nature12506.html#supplementary-information>
- León, A., Blanco, D., Peña, A., Ronda, M., González, B., Arteaga, M., Mancebo, A. (2011). Hematological and biochemical parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CENPALAB, Cenp SPRD. *REDVET*, 12(11), 1-10.
- Lewington, S., Whitlock, G., Clarke, R., Sherliker, P., Emberson, J., Halsey, J., Collins, R. (2007). Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet*, 370(9602), 1829-1839. doi: 10.1016/s0140-6736(07)61778-4
- Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(31), 11070-11075. doi: 10.1073/pnas.0504978102
- Lichtenstein, A. H., Appel, L. J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H. A., Wylie-Rosett, J. (2006). Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation*, 114(1), 82-96. doi: 10.1161/circulationaha.106.176158
- Liu, T., Hougren, H., Vollmer, A. C., & Hiebert, S. M. (2012). Gut bacteria profiles of *Mus musculus* at the phylum and family levels are influenced by saturation of dietary fatty acids. *Anaerobe*, 18(3), 331-337. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.02.004
- London, S. J., Sacks, F. M., Caesar, J., Stampfer, M. J., Siguel, E., & Willett, W. C. (1991). Fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue and diet in postmenopausal US women. *Am J Clin Nutr*, 54(2), 340-345.

- Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp*, 156, 38-50; discussion 50-35.
- Makrides, M., Collins, C. T., & Gibson, R. A. (2011). Impact of fatty acid status on growth and neurobehavioural development in humans. *Matern Child Nutr*, 7 Suppl 2, 80-88. doi: 10.1111/j.1740-8709.2011.00304.x
- Malcom, G. T., Bhattacharyya, A. K., Velez-Duran, M., Guzman, M. A., Oalman, M. C., & Strong, J. P. (1989). Fatty acid composition of adipose tissue in humans: differences between subcutaneous sites. *Am J Clin Nutr*, 50(2), 288-291.
- Malinen, E., Kassinen, A., Rinttila, T., & Palva, A. (2003). Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*, 149(Pt 1), 269-277. doi: 10.1099/mic.0.25975-0
- Massiera, F., Saint-Marc, P., Seydoux, J., Murata, T., Kobayashi, T., Narumiya, S., Ailhaud, G. (2003). Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? *J Lipid Res*, 44(2), 271-279. doi: 10.1194/jlr.M200346-JLR200
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., . . . Tanaka, R. (2002). Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*, 68(11), 5445-5451.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T., & Tanaka, R. (2004). Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*, 70(12), 7220-7228. doi: 10.1128/aem.70.12.7220-7228.2004
- McAndrew, F., Thompson, J., Fellows, L., Large, A., Speed, M., & Renfrew, M. J. (2012). Infant feeding survey 2010. *Leeds: Health and Social Care Information Centre*.
- McFarland, L. V. (2014). Use of probiotics to correct dysbiosis of normal microbiota following disease or

- disruptive events: a systematic review. *BMJ Open*, 4(8), e005047. doi: 10.1136/bmjopen-2014-005047
- McMillen, I. C., & Robinson, J. S. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev*, 85(2), 571-633. doi: 10.1152/physrev.00053.2003
- Medicine, I. o. (2005). *Panel on Macronutrients, Panel on the Definition of Dietary Fiber, Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients, Subcommittee on Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. DRI Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids*. Washington DC: The National Academies Press.
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D., & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr*, 77(5), 1146-1155.
- Miette, V. r., Abdenmour, M., Sandrin, L., & Sasso, M. (2011). Metabolic Steatosis & Fibrosis: Review of the Non-Invasive Tools for Diagnosis and Screening *Liver Biopsy in Modern Medicine*: InTech.
- Mozaffarian, D., & Clarke, R. (2009). Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils. *European journal of clinical nutrition*, 63(2), S22.
- Nakata, M., Yamamoto, S., Okada, T., Gantulga, D., Okano, H., Ozawa, K., & Yada, T. (2016). IL-10 gene transfer upregulates arcuate POMC and ameliorates hyperphagia, obesity and diabetes by substituting for leptin. *Int J Obes (Lond)*, 40(3), 425-433. doi: 10.1038/ijo.2015.201
- Nations, F. a. A. O. o. t. U. (2010). Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. *FAO Food Nutr Pap*, 91, 1-166.
- Okuno, M., Kajiwara, K., Imai, S., Kobayashi, T., Honma, N., Maki, T.,

- Moriwaki, H. (1997). Perilla oil prevents the excessive growth of visceral adipose tissue in rats by down-regulating adipocyte differentiation. *J Nutr*, *127*(9), 1752-1757.
- Ong, K. K., & Loos, R. J. (2006). Rapid infancy weight gain and subsequent obesity: systematic reviews and hopeful suggestions. *Acta Paediatr*, *95*(8), 904-908. doi: 10.1080/08035250600719754
- Oosting, A., Kegler, D., Boehm, G., Jansen, H. T., van de Heijning, B. J., & van der Beek, E. M. (2010). N-3 long-chain polyunsaturated fatty acids prevent excessive fat deposition in adulthood in a mouse model of postnatal nutritional programming. *Pediatr Res*, *68*(6), 494-499. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181f74940
- Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol*, *2*, 104. doi: 10.3389/fcimb.2012.00104
- Patel, M. S., & Srinivasan, M. (2011). Metabolic programming in the immediate postnatal life. *Ann Nutr Metab*, *58 Suppl 2*, 18-28. doi: 10.1159/000328040
- Pearce, J., Taylor, M. A., & Langley-Evans, S. C. (2013). Timing of the introduction of complementary feeding and risk of childhood obesity: a systematic review. *Int J Obes (Lond)*, *37*(10), 1295-1306. doi: 10.1038/ijo.2013.99
- Phinney, S. D., Stern, J. S., Burke, K. E., Tang, A. B., Miller, G., & Holman, R. T. (1994). Human subcutaneous adipose tissue shows site-specific differences in fatty acid composition. *Am J Clin Nutr*, *60*(5), 725-729.
- Picard, F. J., Ke, D., Boudreau, D. K., Boissinot, M., Huletsky, A., Richard, D., . . . Bergeron, M. G. (2004). Use of tuf Sequences for Genus-Specific PCR Detection and Phylogenetic Analysis of 28 Streptococcal Species. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(8), 3686-3695. doi: 10.1128/JCM.42.8.3686-3695.2004
- Plakke, T., Berkel, J., Beynen, A. C., Hermus, R. J., & Katan, M. B. (1983). Relationship between the fatty acid composition of the diet and that of the subcutaneous adipose tissue in individual human subjects. *Hum Nutr Appl Nutr*, *37*(5), 365-372.

- Plourde, M., & Cunnane, S. C. (2007). Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr Metab*, 32(4), 619-634. doi: 10.1139/h07-034
- Potischman, N. (2003). Biologic and methodologic issues for nutritional biomarkers. *J Nutr*, 133 Suppl 3, 875s-880s.
- Prentice, A., & Williams, A. (2011). *The influence of maternal, fetal and child nutrition on the development of chronic disease in later life*: The Stationery Office.
- Program, T. N. C. E. (2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*, 285(19), 2486-2497.
- Punchard, N. A., Green, A. T., Mullins, J. G., & Thompson, R. P. (2000). Analysis of the intestinal absorption of essential fatty acids in vivo in the rat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 62(1), 27-33.
- R, L., R, T., & L, R. (2010). Nutrición del niño de 1-3 años, preescolar y escolar. In G. H. Á (Ed.), *Tratado de Nutrición. 2ª ed* (pp. 227-256). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Raclot, T., Groscolas, R., Langin, D., & Ferre, P. (1997). Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. *J Lipid Res*, 38(10), 1963-1972.
- Raj, M., & Kumar, R. K. (2010). Obesity in children & adolescents. *The Indian Journal of Medical Research*, 132(5), 598-607.
- Raz, A., Kamin-Belsky, N., Przeddecki, F., & Obukowicz, M. G. (1997). Fish oil inhibits $\Delta 6$ desaturase activity in vivo: utility in a dietary paradigm to obtain mice depleted of arachidonic acid. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 8(10), 558-565.
- Ridker, P. M. (2001). High-sensitivity C-reactive protein. *Circulation*, 103(13), 1813-1818.
- Ridker, P. M. (2001). High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of

- cardiovascular disease. *Circulation*, 103(13), 1813-1818.
- Rinne, M. M., Gueimonde, M., Kalliomaki, M., Hoppu, U., Salminen, S. J., & Isolauri, E. (2005). Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 43(1), 59-65. doi: 10.1016/j.femsim.2004.07.005
- Rinttila, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., & Palva, A. (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol*, 97(6), 1166-1177. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x
- Rodriguez, G., Iglesia, I., Bel-Serrat, S., & Moreno, L. A. (2012). Effect of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids during the perinatal period on later body composition. *Br J Nutr*, 107 Suppl 2, S117-128. doi: 10.1017/s0007114512001511
- Rolland-Cachera, M. F., Deheeger, M., Akrouf, M., & Bellisle, F. (1995). Influence of macronutrients on adiposity development: a follow up study of nutrition and growth from 10 months to 8 years of age. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 19(8), 573-578.
- Ruiz-Bravo López A, J. V. M. (2010). Sistema inmunitario y mecanismos de inmunidad innata y adaptativa. In E. M. Panamericana (Ed.), *Tratado de Nutrición, tomo I, 2ª ed* (pp. 865-894). Madrid.
- Sarbini, S. R., Kolida, S., Deaville, E. R., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2014). Potential of novel dextran oligosaccharides as prebiotics for obesity management through in vitro experimentation. *Br J Nutr*, 112(8), 1303-1314. doi: 10.1017/s0007114514002177
- Sarwar Gilani, G., Wu Xiao, C., & Cockell, K. A. (2012). Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. *Br J Nutr*, 108 Suppl 2, S315-332. doi: 10.1017/s0007114512002371
- Scholtens, S., Wijga, A. H., Smit, H. A., Brunekreef, B., de Jongste, J. C., Gerritsen, J., & Seidell, J. C. (2009). Long-chain polyunsaturated fatty acids in breast milk and early weight gain in breast-fed infants.

- Br J Nutr*, 101(1), 116-121. doi: 10.1017/s0007114508993521
- Schwab, J. M., & Serhan, C. N. (2006). Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. *Curr Opin Pharmacol*, 6(4), 414-420. doi: 10.1016/j.coph.2006.02.006
- Serhan, C. N. (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol*, 25, 101-137. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647
- Serra-Majem, L., Nissensohn, M., Overby, N. C., & Fekete, K. (2012). Dietary methods and biomarkers of omega 3 fatty acids: a systematic review. *Br J Nutr*, 107 Suppl 2, S64-76. doi: 10.1017/s000711451200147x
- Simmer, K. (2001). Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants born at term. *Cochrane Database Syst Rev*(4), Cd000376. doi: 10.1002/14651858.cd000376
- Singer, P., Shapiro, H., Theilla, M., Anbar, R., Singer, J., & Cohen, J. (2008). Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Intensive Care Med*, 34(9), 1580-1592. doi: 10.1007/s00134-008-1142-4
- Socha, P., Grote, V., Gruszfeld, D., Janas, R., Demmelmair, H., Closa-Monasterolo, R., . . . Koletzko, B. (2011). Milk protein intake, the metabolic-endocrine response, and growth in infancy: data from a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr*, 94(6 Suppl), 1776s-1784s. doi: 10.3945/ajcn.110.000596
- Subramanian, S., Blanton, L. V., Frese, Steven A., Charbonneau, M., Mills, David A., & Gordon, Jeffrey I. (2015). Cultivating Healthy Growth and Nutrition through the Gut Microbiota. *Cell*, 161(1), 36-48. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.013>
- Sullivan, B. L., Williams, P. G., & Meyer, B. J. (2006). Biomarker validation of a long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acid food frequency questionnaire. *Lipids*, 41(9), 845-850.
- Swiatecka, D., Zlotkowska, D., Markiewicz, L. H., Szyc, A. M., & Wroblewska, B. (2017). Impact of whey proteins on the systemic and local intestinal

- level of mice with diet induced obesity. *Food Funct*, 8(4), 1708-1717. doi: 10.1039/c6fo01311b
- Taylor & Francis Group, LLC. *Frontiers in Neuroscience*. (2010). In J. P. Montmayeur & J. le Coutre (Eds.), *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis
- The Power of Programming 2016. *Developmental Origins of Adiposity and Long-Term Health*. October 13-15, 2016, Munich: Abstracts. (2016). *Ann Nutr Metab*, 69(2), 99-118. doi: 10.1159/000450569
- Thomas, L., Olpin, S., Scott, R., & Wilkins, M. (1987). Coronary heart disease and the composition of adipose tissue taken at biopsy. *Human nutrition: Food sciences and nutrition*.
- Tjonneland, A., Overvad, K., Thorling, E., & Ewertz, M. (1993). Adipose tissue fatty acids as biomarkers of dietary exposure in Danish men and women. *Am J Clin Nutr*, 57(5), 629-633.
- Tull, S. P., Yates, C. M., Maskrey, B. H., O'Donnell, V. B., Madden, J., Grimble, R. F., . . . Rainger, G. E. (2009). Omega-3 Fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment. *PLoS Biol*, 7(8), e1000177. doi: 10.1371/journal.pbio.1000177
- Turnbaugh, P. J., Backhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*, 3(4), 213-223. doi: 10.1016/j.chom.2008.02.015
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027-1131. doi: http://www.nature.com/nature/journal/v444/n7122/supinfo/nature05414_S1.html
- Urgell, M. R., & Nutrición, F. E. d. I. (2015). *Libro blanco de la nutrición infantil en España*: Prensas de la Universidad de Zaragoza.
- van Best, N., Hornef, M. W., Savelkoul, P. H., & Penders, J. (2015). On the origin of species: Factors shaping the establishment of infant's gut microbiota. *Birth Defects Res C*

- Embryo Today*, 105(4), 240-251.
doi: 10.1002/bdrc.21113
- Van Herreweghen, F., Van den Abbeele, P., De Mulder, T., De Weirdt, R., Geirnaert, A., Hernandez-Sanabria, E., . . . Belzer, C. (2017). In vitro colonisation of the distal colon by *Akkermansia muciniphila* is largely mucin and pH dependent. *Beneficial microbes*, 8(1), 81-96.
- van Staveren, W. A., Deurenberg, P., Katan, M. B., Burema, J., de Groot, L. C., & Hoffmans, M. D. (1986). Validity of the fatty acid composition of subcutaneous fat tissue microbiopsies as an estimate of the long-term average fatty acid composition of the diet of separate individuals. *Am J Epidemiol*, 123(3), 455-463.
- Vedin, I., Cederholm, T., Freund Levi, Y., Basun, H., Garlind, A., Faxen Irving, G., . . . Palmblad, J. (2008). Effects of docosahexaenoic acid-rich n-3 fatty acid supplementation on cytokine release from blood mononuclear leukocytes: the OmegaAD study. *Am J Clin Nutr*, 87(6), 1616-1622.
- Vemuri, M., & Kelley, D. (2007). The effects of dietary fatty acids on lipid metabolism. *Fatty acids in Foods and their Health Implications*, 591-630.
- Wallace, J. G., Gohir, W., & Sloboda, D. M. (2016). The impact of early life gut colonization on metabolic and obesogenic outcomes: what have animal models shown us? *J Dev Orig Health Dis*, 7(1), 15-24. doi: 10.1017/s2040174415001518
- WC, W. (1998). *Nutritional epidemiology*. New York: Oxford University Press.
- Whitlock, G., Lewington, S., Sherliker, P., Clarke, R., Emberson, J., Halsey, J., . . . Peto, R. (2009). Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*, 373(9669), 1083-1096. doi: 10.1016/s0140-6736(09)60318-4
- Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., . . . Spiegelman, B. M. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*, 3(2), 151-158.
- Zalewski, B. M., Patro, B., Veldhorst, M., Kouwenhoven, S., Crespo Escobar, P., Calvo Lerma, J., . . . Szajewska, H. (2017). Nutrition of infants and

young children (one to three years)
and its effect on later health: A
systematic review of current
recommendations (EarlyNutrition
project). *Critical Reviews in Food
Science and Nutrition*, 57(3), 489-
500. doi:
10.1080/10408398.2014.888701

Zuniga, L. A., Shen, W. J., Joyce-Shaikh, B.,
Pyatnova, E. A., Richards, A. G.,
Thom, C., . . . Butcher, E. C. (2010).
IL-17 regulates adipogenesis,
glucose homeostasis, and obesity. *J
Immunol*, 185(11), 6947-6959. doi:
10.4049/jimmunol.1001269

Capítulo 8. Resumen / Abstract

RESUMEN

Introducción: La «programación nutricional» o «programación nutricional temprana de la salud a largo plazo» se define como el efecto de ciertos alimentos o nutrientes, en cantidades específicas, durante las primeras etapas del desarrollo, que pueden influir en el metabolismo, dando lugar a cambios permanentes cuya expresión clínica puede tener lugar varias décadas más tarde. Este efecto establece que los niños obesos y 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, también a edades más tempranas.

Durante el período de alimentación complementaria, los bebés experimentan estos fenómenos de «programación» dado que es una ventana crítica de tiempo donde la exposición a nuevos componentes alimenticios, junto con la creciente demanda de nutrientes, son críticos para los cambios epigenéticos. Además, durante este período se establecen preferencias alimentarias y patrones de alimentación que también pueden influir en la salud y el estado nutricional en estadios posteriores. Por otro lado, el rápido aumento de peso en la infancia aumenta el riesgo de obesidad a largo plazo. Las proteínas, las grasas, particularmente el perfil de ácidos grasos, y los hidratos de carbono cobran protagonismo en los estudios sobre programación nutricional, debido a la importancia de las enfermedades con que potencialmente podrían estar relacionados.

Los alimentos infantiles producidos por la industria son utilizados por un gran porcentaje de los progenitores que a menudo ofrecen estos productos a sus hijos. Esto pone de relieve el papel central de la industria alimentaria infantil en la configuración de las dietas de los bebés y la importancia de comprender el tipo de alimentos infantiles disponibles en el mercado.

Objetivo: El principal objetivo de la presente Tesis Doctoral fue evaluar el efecto del consumo de alimentos infantiles del mercado español, sobre el crecimiento, el sistema inmune, el metabolismo y otros marcadores de obesidad, como la microbiota intestinal, en relación con la obesidad en la vida adulta, mediante un estudio *in vivo*. Para ello, se llevó a cabo un estudio empleando ratones C57BL/6J recién destetados.

Diseño experimental: Para la experiencia se utilizaron 36 ratones macho destetados, con 21-28 días de vida, que fueron distribuidos aleatoriamente en 3 grupos de 12 ratones cada uno. Cada grupo fue alimentado *ad libitum* con una dieta distinta durante un período de intervención de 12 semanas. La primera dieta (grupo A) consistía en el alimento infantil A (90.3 kcal/100 g, 165 mg/100 g de sodio, 4.5% de proteínas, 11.1% de hidratos de carbono, 0.5% de

fibra, 80.8% de humedad, y un perfil de ácidos grasos S/M/P 1:2.1:0.6) y pienso para roedores. La segunda dieta (grupo B) consistió en el alimento infantil B (67.5 kcal/100 g, 108 mg/100 g de sodio, 3.6% de proteínas, 7.2% de hidratos de carbono, 0.5% de fibra, 86% de humedad y 2.7% de grasa) y un perfil de ácidos grasos 1:2.8:1.7) y pienso para roedores. La dieta control (grupo C) fue sólo pienso para roedores. Ambos alimentos infantiles contenían arroz y pollo como ingredientes principales, pero con diferentes perfiles de macronutrientes, como se ha descrito anteriormente. Tras el sacrificio se extrajeron muestras de sangre, hígado, tejido adiposo, bazo y contenido intestinal de intestino delgado y grueso. Además, se recogieron datos sobre la ingesta diariamente y los parámetros morfométricos semanalmente.

Resultados: El crecimiento desde la quinta semana de vida, el IMC y el ratio de crecimiento tras el destete demostraron que los grupos A y B sufrieron un crecimiento acelerado, siendo el grupo A el de mayor crecimiento. La cantidad de grasa total ingerida fue el macronutriente clave en este aumento de la adiposidad, sobre todo en el grupo A, debido, junto con la mayor concentración de sal, a su carácter altamente palatable que da lugar a hiperfagia. Los niveles de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol e índice aterogénico del grupo A se correspondieron con la ingesta abundante de ciertos ácidos grasos, como el ácido palmítico.

En los grupos A y B se observó una subexpresión de varios genes relacionados con el transporte, catabolismo y regulación de la biosíntesis de ácidos grasos, lo que sugiere un bajo rendimiento en el metabolismo lipídico hepático asociada a los perfiles de ácidos grasos. Además, en el grupo A, se sobreexpresaron y subexpresaron un mayor número de genes que sugieren mayor esfuerzo en el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga.

La microbiota intestinal mostró los mayores cambios en los niveles de Firmicutes y Bacteroidetes del intestino grueso del grupo B. Estos cambios del grupo B se encontraron en *Lactobacillus* group, *Enteroccus* spp., *Bacteroidetes-Prevotella* y se detectaron *Streptococcus* genus en algunos ratones. En el grupo A los cambios se produjeron en *Lactobacillus* group y también y se detectaron *Streptococcus* genus en algunos ratones. Estos resultados representan un estado de disbiosis que tiene origen en una dieta con diferentes concentraciones de SFAs, MUFAs y PUFAs. Además, los resultados de *Akkermansia muciniphila*, IL-6 e IL-10 pueden tener también su origen en dicho perfil de ácidos grasos.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que la grasa total, y particularmente el perfil de ácidos grasos, de los alimentos infantiles, influyen notoriamente en el crecimiento, metabolismo y microbiota intestinal, a largo plazo. Sin embargo, se necesitan más estudios para elucidar los mecanismos de programación de cada uno de los macronutrientes, en dosis concretas, sobre el desarrollo de sobrepeso y obesidad, durante el periodo de alimentación complementaria, que puedan tener efectos en la edad adulta.

ABSTRACT

Background: "Nutritional programming" or "early nutritional programming of long-term health" is defined as the impact of specific amounts of foods or nutrients given during early stages of development, leading to long-term changes. The impact of such changes may be manifested even several decades later. This effect establish that obese and overweight children tend to remain obese in adulthood and are more likely to suffer noncommunicable diseases, such as diabetes and cardiovascular disease, also at earlier ages.

During the complementary feeding period, programming has a critical window when the exposure to new food components together with the increased demand for nutrients may cause epigenetic changes. Moreover, during this period, both food preferences and feeding patterns are established with a long-term impact on health and nutritional status. In addition, rapid weight gain in infancy increases the long-term risk of obesity. Proteins, fats, particularly the fatty acid profile, and carbohydrates are prominent in nutritional programming studies because of the importance of potentially related diseases.

Commercially produced complementary foods are widely offered by European progenitors, to their children. This highlights the central role of the infant food industry in shaping the diets of infants and the importance of understanding the type of commercially available baby foods.

Objective: On this basis, the main objective of the present Doctoral Thesis was to evaluate the effect of baby foods consumption from Spanish market, on growth, immune system, metabolism and other obesity biomarkers, such as gut microbiota, related to obesity in adult life, through an *in vivo* study. For that, a study using weaned C57BL/6J mice was carried out.

Experimental design: For the experiment, 36 weaned male mice, 21-28 days old, were randomly distributed into 3 groups with 12 mice each one. Each group was fed *ad libitum* a different diet during 12-week intervention period. The first diet (group A) consisted of baby food A (90.3 kcal/100 g, 165 sodium mg/100g, 4.5% proteins, 11.1% carbohydrates, 0.5% fibre, 80.8% humidity, 3.1% fat, and a fatty acids profile S/M/P 1:2.1:0.6) and rodent chow. The second diet (group B) consisted of baby food B (67.5 kcal/100 g, 108 sodium mg/100g, 3.6% proteins, 7.2% carbohydrates, 0.5% fibre, 86% humidity, 2.7% fat and a fatty acids profile 1:2.8:1.7) and RC. The

control diet (group C) was only RC. Both baby foods were made with rice and chicken as main ingredients but with different profiles of macronutrients, as described earlier. After twelve weeks, mice were sacrificed and blood, liver, adipose tissue, spleen and gut contents of small and large intestine samples were collected. In addition, data on daily intake and morphometric parameters weekly have been collected.

Results: The growth from the fifth week of birth, final BMI and post-weaning growth rates, demonstrate that mice growth in groups A and B were accelerated, especially group A. The total fat ingested can be the key macronutrient that causes the highest adiposity, especially in group A, due, together with salt contents, to its highly palatable character that leads to hyperphagia. The total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol levels and atherogenic index of group A were associated with the abundant intake of certain fatty acids, such as palmitic acid.

In relation to fatty acid gene expression analysed in liver, an underexpression of several genes related to fatty acid transport, catabolism and biosynthesis regulation was observed in groups A and B. In addition, more genes were expressed in group A.

Gut microbiota showed more significant changes in Firmicutes and Bacteroidetes in B group. These changes were in *Lactobacillus* group, *Enteroccus* spp., *Bacteroidetes-Prevotella* and the *Streptococcus* genus presence in some mice. Group A showed significant changes in *Lactobacillus* group and the *Streptococcus* genus presence in some mice. These results represent a status of dysbiosis that has an origin in a diet with different concentrations of SFAs, MUFAs and PUFAs. In addition, the results of *Akkermansia muciniphila*, IL-6 and IL-10 may also have their origin in the mentioned fatty acid profile.

Conclusions: In summary, these results suggest that total fat, and particularly the fatty acid profile of baby foods, has a significant influence on growth, metabolism and gut microbiota in the long term. However, further researches should be carried out to elucidate the mechanisms of macronutrient in specific doses on the development of overweight and obesity during the period of complementary feeding that may have effects in adult life.