

Universidad CEU San Pablo
CEINDO - CEU Escuela Internacional de Doctorado.
PROGRAMA en CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA SALUD



**La ingesta de fructosa líquida en la gestación
predetermina la aparición de síndrome metabólico
en la descendencia: mecanismos implicados y
respuesta a una dieta occidental**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Elena Fauste Alonso

Dirigida por:
Carlos Bocos de Prada y Paola Otero Gómez

MADRID
2022

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química y Bioquímica en el área de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU-San Pablo, bajo la dirección del Dr. Carlos Bocos de Prada, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular; y la Dra. Paola Otero Gómez, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular.

El Dr. Carlos Bocos y la Dra. Paola Otero como directores del presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo al considerar que reúne los requisitos necesarios y constituye una aportación original al tema tratado.

Fdo. Dr. Carlos Bocos de Prada
Catedrático de Bioquímica
y Biología Molecular

Fdo. Dra. Paola Otero Gómez
Profesora Titular de Bioquímica
y Biología Molecular

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Química y Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU San Pablo, dentro del grupo de investigación “Nutrigenómica y programación fetal”.

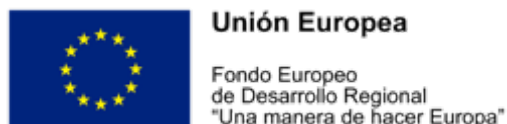
En la financiación de la presente tesis doctoral han contribuido:



Beca Fundación Española de Aterosclerosis/ Sociedad Española de Aterosclerosis 2016 para investigación nutrición “Manuel de Oya”



Ministerio de Ciencia e Innovación. Proyecto retos de Investigación. Fondos FEDER de la Unión Europea. Referencias de los proyectos: SAF2017-89537-R y PID2020-118054RB-I00



Ayudas Internas CEU. Vicerrectorado de profesorado e investigación. Referencias de las ayudas: MPC09/18, MPC09/19, MPC09/20 y MGI21CBP



Ministerio de Universidades. Ayudas para la Formación de Profesorado Universitario (FPU). Referencia de la ayuda: FPU16/04458.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Universidad San Pablo CEU y a la CEU Escuela Internacional de Doctorado (CEINDO) la posibilidad de realizar la parte experimental de la presente tesis doctoral en el Laboratorio de Nutrigenómica y Programación fetal perteneciente al Área de Bioquímica y Biología Molecular (Departamento de Química y Bioquímica). También agradecer al Ministerio de Universidades por concederme la beca FPU que he disfrutado a lo largo de todos estos años de tesis.

La realización de una tesis doctoral es un camino duro, con altibajos y que precisa de rodearse de gente que “sume” en todos los aspectos, tanto dentro del laboratorio como fuera de él. Todos los que aparecéis aquí os merecéis un trocito de esta tesis doctoral, porque sin vosotros se que no hubiera sido capaz de llevarla a cabo.

En primer lugar, Carlos y Paola, siempre seréis mis “papás científicos” y os llevaré en mi corazón allá donde esta vida en la investigación me lleve. Gracias por darme una oportunidad cuando era una simple estudiante de grado y acogerme en vuestro grupo de investigación. Carlos, aunque te sorprenda, gracias por pasarte cuatro años diciéndome que me relaje y no me agobie; que las cosas mejor sin prisa, pero sin pausa; y que tengo datos para escribir cinco tesis. Te prometo que estas “llamadas de atención” me han ayudado a disfrutar, aprender y valorar la ciencia. Paola me has enseñado a cuestionarme todos y cada uno de los protocolos y resultados que han pasado por mis manos y no creerme a la ligera lo que salía, porque era lo más fácil. Además de luchar para que aquellos que se resistían terminaran saliendo adelante. Esta perseverancia que me has inculcado la usaré siempre dentro y fuera de un laboratorio. Espero ahora y siempre poder seguir contando con vosotros tanto profesional como personalmente.

Después de estos años me he dado cuenta de que gran parte de estar contento con lo que haces se basa en la gente con la que te rodeas todos los días. Creo que puedo decir que yo he compartido laboratorio con los mejores compañeros que uno puede pedir. Maribel, las horas de animalario contigo, aunque largas y duras, han sido de las más divertidas de estos años. Gracias por ser un apoyo constante y por poder contar contigo en cualquier situación. Cris, espero no haber sido muy insoportable con mis manías estos años y haber conseguido transmitirte mi pasión por la ciencia. Por favor, cuida del labo (y sigue poniendo el toque musical) ahora que ya no voy a estar. Tampoco puedo olvidarme de mis *minions* (Made, Carla, Ana y Toni), luchad por vuestros sueños. Vais a conseguir todo lo que os propongáis, espero, al menos, haberos podido enseñar esto. Finalmente, aunque ya no formen parte del laboratorio, no me puedo olvidar de Lourdes y Silvia que estuvieron conmigo en mis comienzos y me transmitieron desde el principio todo lo que sabían.

En estos años he aprendido que el éxito de la ciencia se basa en la colaboración y en ayudar desinteresadamente para aprender. Esto lo sé gracias a las muchas personas con las que me he cruzado por el CEU. Tengo que hacer mención especial a mis *predoctoritas*, compañeras de tesis estos 4 años. Hemos hecho este camino juntas tanto dentro, como fuera del CEU. Yanira, quien nos lo iba a decir a nosotras que íbamos a terminar siendo “hermanas

de otra madre”, se que allá donde vayamos ahora siempre vamos a estar unidas. Gracias por los audios eternos, los cafés reparadores y las llamadas a la puerta del labo de SOS. Begoña, hemos llegado al punto de cruzarnos por el pasillo y solo con mirarnos saber como nos va el día. A mis compis del laboratorio de orgánica (Alberto, Alex, José María y Jorge), se que vais a echar de menos mis “¡hola vengo a tirar cosas!” o “¿por un casual no tendréis?”. Tenemos que seguir organizando celebraciones de tesis, pero sin que provoque que nos tengamos que encerrar 10 días en casa después, por favor. A los Paras (Ana, Carmencita, Fer, Rubén y Sergio), gracias por haber estado siempre dispuestos a ayudarme y perder vuestro tiempo en buscar soluciones a muchos de mis problemas estos años. A los investigadores que forman parte del departamento de Bioquímica (Ágata, Aurora, Cris, Cani, Emilio, Eva, Gloria, Henar, Julio, Jimena, Javier, las Marías, Miriam y Pilar), me habéis transmitido grandes enseñanzas en estos años. A toda la gente del CEMBIO, de los laboratorios de farmacología, microbiología y nutrición gracias por poder contar con vosotros. No puedo olvidarme de Jose Alfredo, sin ti nunca habría conocido a toda esta gente maravillosa, gracias por hacer que mi sueño se hiciera posible.

Gracias al grupo de investigación de la Dra. Lidia Daimiel en el IMDEA Alimentación por abrirme las puertas del centro, desde el comienzo me acogisteis como una más allí. Gracias permitirme aprender nuevas técnicas y formas de trabajar durante el tiempo que estuve con vosotros.

A todas las personas que han estado conmigo fuera de mi vida científica. Algunos me lleváis aguantando muchos años, otros habéis aparecido en mi vida hace poco. A mi *chupipandi* (Ali B, Ali G, Bea, Cris, Clara, Judith, Maite, María y Rocío), nos hemos visto crecer desde que llevábamos un pichi azul con tablas, somos el grupo de amigas del cole más variopinto que existe, pero como dicen: “los polos opuestos se atraen”. Nuestras charlas han sido, son y siempre serán reparadoras. Creo que me conocéis mejor vosotras a mí, que yo a mí misma después de tantos años. Querida *kuadrilla* (Edu, Jon, Miguel y Raul) aparecisteis de una manera muy casual, pero os habéis transformado en los mejores planes para los fines de semana. Gracias por sacarme una sonrisa hasta en los momentos más duros. A mis *gofiteros* (Alejandro, Alexandra, Ana, Bea, Carmen, Cris, Edi, Fanny, Icia, Ignacio, Iris, Maryam, Omar, Palmero, Sara, Sofi y Vicky), gracias por aparecer en la fila de espera o encima de la tarima de una clase cualquiera del gimnasio hace ya cuatro años. Con vosotros es verdad eso de que “la felicidad también se entrena”, habéis sido la mejor forma de desconectar que una puede pedir.

Otro pilar fundamental en mi vida ha sido siempre mi familia. A todos mis tíos, primos y abuelos; los que estáis y los que ya os fuisteis. Mis primeros pasos los di a vuestro lado y si soy la persona que soy es gracias a vosotros.

Finalmente, mamá y papá gracias por apoyarme en todos y cada uno de los momentos de mi vida. Gracias por luchar por mí como nadie. Gracias por no cortarme nunca las alas. Gracias por dejar que me cayera cuando sabíais que iba a hacer algo mal y estar siempre ahí para levantarme después. Tengo mucha suerte de ser vuestra hija.

Os quiero.

A mis padres

Índice

Índice

| | |
|--|-----------|
| Índice | 1 |
| Abreviaturas | 9 |
| Lista de Figuras | 15 |
| Lista de Tablas..... | 23 |
| Resumen | 27 |
| Introducción General..... | 33 |
| 1. Dieta occidental o <i>Western Diet</i> | 37 |
| 2. Consumo de azúcar | 39 |
| 3. Absorción y metabolismo de la fructosa | 43 |
| 4. Patologías asociadas al consumo de fructosa: obesidad y síndrome metabólico | 46 |
| 4.1. Efectos de la fructosa sobre la ingesta y la respuesta a leptina | 46 |
| 4.2. Efectos de la fructosa sobre la respuesta a insulina..... | 48 |
| 4.3. Efectos de la fructosa sobre el metabolismo lipídico..... | 48 |
| 4.4. Efectos de la fructosa sobre la producción de FGF21 | 50 |
| 4.5. Efecto de la fructosa en la producción de ácido úrico | 51 |
| 4.6. Efectos de la fructosa sobre la tensión arterial..... | 53 |
| 4.7. Efectos de la fructosa sobre el estrés oxidativo | 54 |
| 4.8. Efectos de la fructosa sobre el intestino | 55 |
| 5. Programación fetal..... | 58 |
| 6. Epigenética..... | 61 |
| 6.1. Mecanismos epigenéticos..... | 62 |
| a) Metilación del ADN..... | 62 |
| b) Acetilación de histonas | 64 |
| c) miRNA..... | 65 |
| 6.2. Epigenética y nutrición..... | 67 |
| 7. Sulfuro de hidrógeno..... | 70 |
| 7.1. Síntesis de sulfuro de hidrógeno: Transulfuración..... | 70 |
| 7.2. Metabolismo del sulfuro de hidrógeno..... | 74 |
| 7.3. Sulfuro de hidrógeno y su efecto gasotransmisor..... | 75 |
| a) Reacción del sulfuro de hidrógeno con grupos tiol | 75 |
| b) Interacción del sulfuro de hidrógeno con el óxido nítrico y las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno | 75 |
| c) Interacción con metales y metaloproteínas | 77 |
| 7.4. Relación entre el sulfuro de hidrógeno y el desarrollo de enfermedades metabólicas..... | 77 |
| a) Enfermedades cardiovasculares | 78 |
| b) Diabetes tipo II y resistencia a la insulina | 80 |
| c) Obesidad..... | 84 |
| 7.5. Sulfuro de hidrógeno y consumo de fructosa | 85 |
| Objetivos generales..... | 89 |

| | |
|---|------------|
| Materiales y Métodos Generales | 93 |
| 1. Diseño experimental | 95 |
| 1.1. Animales y condiciones ambientales | 95 |
| a) Procedimiento 1 | 95 |
| b) Procedimiento 2 | 97 |
| c) Procedimiento 3 | 98 |
| 1.2. Registro de la ingesta de comida, bebida y peso durante el tratamiento dietético | 99 |
| 1.3. Sacrificio y toma de muestras | 99 |
| 2. Parámetros metabólicos..... | 100 |
| 2.1. Determinaciones en plasma..... | 100 |
| a) Determinación de glucosa | 100 |
| b) Determinación de triglicéridos | 100 |
| c) Determinación de colesterol | 101 |
| d) Determinación de ácidos biliares totales..... | 101 |
| e) Determinación de ácido úrico..... | 101 |
| f) Determinación de urea | 102 |
| g) Determinación de ácidos grasos libres | 102 |
| h) Determinación de Insulina..... | 102 |
| i) Concentración de Leptina | 102 |
| j) Concentración de Adiponectina | 103 |
| k) Concentración de FGF21..... | 103 |
| 2.2. Determinaciones en tejido..... | 103 |
| a) Determinación de glucógeno..... | 103 |
| b) Extracción de lípidos por el método de Folch..... | 103 |
| c) Determinación de lípidos totales en tejido..... | 104 |
| d) Determinación de colesterol en tejido | 104 |
| e) Determinación de triglicéridos en tejido | 104 |
| f) Determinación de glucosa | 104 |
| g) Determinación de ácidos biliares..... | 105 |
| h) Determinación de proteínas | 105 |
| 3. Parámetros moleculares..... | 105 |
| 3.1. Estudio de la expresión génica del ARNm | 105 |
| a) Homogenización de los tejidos y extracción del ARN total..... | 105 |
| b) Purificación del ARN | 106 |
| c) Cuantificación, pureza e integridad del ARN | 106 |
| d) Tratamiento con DNasa | 107 |
| e) Retrotranscripción del ARNm | 108 |
| f) Estudio de la expresión génica por PCR a tiempo real..... | 109 |
| i. Generalidades de la PCR a tiempo real | 109 |
| ii. Protocolo experimental de la PCR a tiempo real..... | 110 |
| iii. Cuantificación relativa de la expresión de genes | 111 |
| 3.2. Determinación de la expresión de micro ARN (miARN) | 112 |
| a) Homogenización de los tejidos y extracción del ARN total..... | 112 |
| b) Cuantificación, pureza e integridad del ARN | 112 |
| c) Retrotranscripción de los miARN..... | 113 |

| | |
|--|------------|
| d) Medida de la expresión de miARN por PCR a tiempo real..... | 114 |
| 3.3. Determinación de metilación de promotores..... | 115 |
| a) Extracción del ADN total del tejido..... | 116 |
| b) Cuantificación, pureza e integridad del ADN obtenido..... | 116 |
| c) Tratamiento del ADN con la enzima de restricción McrBC..... | 116 |
| d) Amplificación por PCR de la zona metilada del promotor..... | 117 |
| i. Búsqueda de la región promotora y diseño de cebadores..... | 117 |
| ii. PCR a tiempo real de la metilación específica de promotores..... | 119 |
| iii. Cálculo del porcentaje de metilación..... | 120 |
| 4. Parámetros relacionados con el estrés oxidativo..... | 121 |
| 4.1. Determinación de la concentración de MDA..... | 121 |
| 4.2. Determinación de carbonilos de proteínas..... | 121 |
| 4.3. Determinación de enzimas antioxidantes..... | 122 |
| a) Glutation reductasa..... | 122 |
| b) Glutation peroxidasa..... | 122 |
| c) Catalasa..... | 123 |
| d) Superóxido dismutasa total, tipo 1 y tipo 2..... | 123 |
| 5. Determinación de sulfuro de hidrógeno (H₂S)..... | 124 |
| 5.1. Determinación de la concentración de H ₂ S en plasma..... | 124 |
| 5.2. Determinación de la producción de H ₂ S en tejido..... | 125 |
| a) Principio del método..... | 125 |
| b) Protocolo seguido para determinar la producción de H ₂ S (protocolo general)..... | 125 |
| c) Modificación de la determinación de la producción de H ₂ S en tejido para diferenciar la producción no enzimática y enzimática de H ₂ S..... | 126 |
| i. Producción no enzimática de H ₂ S..... | 126 |
| ii. Producción enzimática de H ₂ S..... | 127 |
| d) Puesta a punto del método..... | 128 |
| i. Linealidad..... | 128 |
| ii. Repetitividad y reproducibilidad..... | 128 |
| iii. Modificaciones en la concentración de proteínas..... | 129 |
| 6. Análisis estadístico..... | 130 |
| <i>Capítulo 1: La protección de FGF21 frente a la acumulación lipídica y el estrés oxidativo inducidos por la fructosa está influenciada por la nutrición materna en la descendencia macho.</i> | 131 |
| 1. Introducción..... | 133 |
| 2. Materiales y métodos..... | 134 |
| 2.1. Animales y diseño experimental..... | 134 |
| 2.2. Determinaciones plasmáticas y tisulares..... | 134 |
| 2.3. Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real..... | 135 |
| 2.4. Determinación de marcadores de estrés oxidativo..... | 135 |
| 2.5. Análisis estadístico..... | 136 |
| 3. Resultados..... | 136 |

| | |
|---|-----|
| 4. Discusión | 144 |
| Capítulo 2: El consumo materno de fructosa incrementa la síntesis hepática de H₂S, pero exacerba la reducción inducida por la fructosa en la descendencia hembra. ... | |
| 1. Introducción | 151 |
| 2. Materiales y métodos | 153 |
| 2.1. Animales y diseño experimental | 153 |
| 2.2. Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real | 153 |
| 2.3. Determinaciones plasmáticas | 154 |
| 2.4. Determinaciones en hígado y tejido adiposo | 154 |
| 2.5. Análisis estadístico | 154 |
| 3. Resultados | 155 |
| 3.1. El consumo materno de fructosa aumenta la producción de H ₂ S en la descendencia hembra | 155 |
| 3.2. El consumo de fructosa durante la gestación exacerba la represión inducida por la fructosa en la producción hepática de H ₂ S en la descendencia hembra adulta | 159 |
| 4. Discusión | 164 |
| Capítulo 3: El metabolismo lipídico y del colesterol es influenciado tanto por la ingesta de tagatosa como por una dieta de fructosa y colesterol de manera diferente según la dieta materna | |
| 1. Introducción | 173 |
| 2. Materiales y métodos | 175 |
| 2.1. Animales y diseño experimental | 175 |
| 2.2. Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real | 175 |
| 2.3. Determinaciones en plasma | 176 |
| 2.4. Determinaciones en hígado, íleon y heces | 176 |
| 2.5. Análisis estadístico | 176 |
| 3. Resultados | 177 |
| 3.1. El consumo de fructosa líquida, pero no de tagatosa, provoca un aumento en la ingesta de líquido en la descendencia macho de madres control y fructosa. | 177 |
| 3.2. El consumo de tagatosa en machos jóvenes descendientes de madres-fructosa afecta la absorción intestinal de ácidos biliares. | 180 |
| 3.3. El consumo de colesterol agrava la dislipemia provocada por la fructosa en la descendencia independientemente del régimen nutricional de la madre | 185 |
| 4. Discusión | 194 |
| Capítulo 4: El consumo de colesterol acentúa la disminución mediada por la fructosa en la producción de H₂S, específicamente en el hígado. | |
| 1. Introducción | 203 |
| 2. Materiales y métodos | 205 |
| 2.1. Animales y diseño experimental | 205 |

| | |
|--|------------|
| 2.2. Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real..... | 205 |
| 2.3. Extracción de miARN, RT-PCR de miARN y determinación de la expresión de miARN por PCR a tiempo real..... | 206 |
| 2.4. Determinación del porcentaje de metilación del promotor de la CSE en hígado | 207 |
| 2.5. Determinaciones en plasma, hígado, íleon y TAL..... | 207 |
| 2.6. Análisis estadístico | 208 |
| 3. Resultados..... | 208 |
| 3.1. El consumo de fructosa afecta diferencialmente según el tejido a la producción de H ₂ S. 208 | |
| 3.2. La fructosa reduce la ruta de la transulfuración en el hígado..... | 212 |
| 3.3. El consumo de colesterol acentúa la menor producción de H ₂ S hepática asociada al consumo de fructosa y es mediado por ácidos biliares. | 218 |
| 3.4. El consumo materno de fructosa provoca un aumento en la producción de H ₂ S en TAL. 223 | |
| 4. Discusión..... | 229 |
| <i>Capítulo 5: La gestación es suficiente para provocar efectos perjudiciales en las descendientes de madres-fructosa y en sus fetos.....</i> | 235 |
| 1. Introducción..... | 237 |
| 2. Materiales y métodos..... | 239 |
| 2.1. Animales y diseño experimental | 239 |
| 2.2. Determinaciones plasmáticas | 240 |
| 2.3. Determinaciones en hígado y placenta..... | 240 |
| 2.4. Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real..... | 240 |
| 2.5. Análisis estadístico | 241 |
| 3. Resultados..... | 241 |
| 3.1. La gestación en las descendientes de madres fructosa, suplementadas o no con fructosa durante su gestación, altera la sensibilidad a insulina, la respuesta a leptina y el contenido lipídico en hígado y placenta..... | 241 |
| 3.2. La gestación en las descendientes de madres-fructosa suplementadas o no con fructosa durante su gestación modifica la respuesta a insulina y leptina, el contenido lipídico y el estrés oxidativo de sus fetos..... | 247 |
| 4. Discusión..... | 251 |
| <i>Conclusiones generales</i> | 257 |
| <i>Bibliografía</i> | 263 |
| <i>Anexo 1: Lista de cebadores</i> | 301 |
| <i>Anexo 2: Estadísticos 2WAY-ANOVA machos F1</i> | 327 |
| 1. MACHOS F1 CONTROL, FRUCTOSA Y FRUCTOSA + COLESTEROL | 329 |
| 2. MACHOS F1 CONTROL, FRUCTOSA Y TAGATOSA..... | 331 |

Índice

Abreviaturas

Abreviaturas

A

ABCG5: Casete de unión a ATP miembro 5 subfamilia G
ACC: Acetil-CoA carboxilasa
ACE: Enzima convertidora de angiotensina
AcetilCoA: Acetil Coenzima A
ACYL: ATP citrato liasa
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
AGEs: Productos finales de glucosilación avazada
AgnII: Angiotensina II
Ago2: Proteína argonauta
ALT: Alanina-amino transferasa
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
AMP: Adenosina monofosfato
AMPc: AMP cíclico
AMPK: Proteína quinasa activada por AMP
ANOVA: Análisis de la varianza
ASBT: Transportador apical sodio-ácido biliar
AT1b: Receptor de angiotensina II 1b
ATF4: del inglés: *Activating transcription factor 4*
ATP: Adenosina trifosfato
αKG: α-cetoglutarato

B

Bcl2: del inglés: *B-cell lymphoma 2*
BHMT: betaína:homocisteína metiltransferasa
BHT: Butilhidroxitolueno
BSEP: Proteína transportadora de sales biliares

C

CAT: Catalasa
CBS: Cistationina beta sintasa
C/EBPβ/δ: del inglés: *CCAAT/enhancer-binding protein β/δ*
CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
CHOP: Proteína homóloga a C/EBP
ChREBP: Proteína de unión al elemento respuesta de carbohidratos
CO: Monóxido de carbono

CREB: Proteína de unión al elemento respuesta a AMPc

Cp: del inglés: *Crossing point*

CPT1: Carnitina palmitoil transferasa 1

CSE: Cistationina gamma liasa

Cys: Cisteína

CYP: Citocromo P

CYP7A1: Colesterol 7α-hidroxilasa

D

DGCR8: Región Crítica 8 del síndrome de DiGeorge

DHF: Dihidrofolato

DHFR: Dihidrofolato reductasa

DNPH: Dinitrofenilhidracina

DNMT: ADN metiltransferasas

E

ECV: Enfermedades Cardiovasculares

EDHF: Factor hiperpolarizante producido por el endotelio

EEUU: Estados Unidos

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares

ER2: Receptor de estrógenos tipo 2

F

FAS: Ácido graso sintasa

FGFR: Receptor del Factor de crecimiento de fibrobrastos

FGF: Factor de crecimiento de fibrobrastos

FK: Fructoquinasa

FXR: Receptor X de farnesoide

G

GCL: Glutamato cisteína ligasa

GLUT: Transportador de glucosa

GK: Glucoquinasa

GMP: Guanosina monofosfato

GMPc: GMP cíclico

GPBAR-1: del inglés: *G protein-coupled bile acid receptor-1*

GPx: Glutation peroxidasas

GR: Glutation reductasa

GSH: Glutation reducido

GSSH: Glutation persulfido

GTP: Guanosina trifosfato

Abreviaturas

H

H₂S: Sulfuro de hidrógeno
HAT: Histona acetiltransferasa
HCys: Homocisteína
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
HDAC: Histonas desacetilasas
HFCS: Jarabe de maíz rico en fructosa
HIF-1a: Factor inducible por hipoxia 1 alfa
HSL: Lipasa sensible a hormonas

I

IBABP: Proteína de unión ileal de ácidos biliares
IGFBP1: Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1
IL: Interleucina
IMC: Índice de Masa Corporal
IMP: Inosina monofosfato

K

Keap1: del inglés: *Kelch-like ECH-associated protein 1*
KHK: Cetohecoquinasa

L

LDL: Lipoproteínas de baja densidad
LDLoxi: LDL oxidadas
LDLR: Receptor de LDL
L-PK: Piruvato quinasa hepática
LRH1: del inglés: *Liver receptor homolog 1*
LXR: Receptor X del hígado

M

MAT1A: Metionina adenosil transferasa 1A
MBD: Proteínas con dominios de unión m⁵CpG
MDA: Malondialdehído
miARN: micro ARN
3MST: 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa
MTHFD1: Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 1
MTHFR: Metilentetrahidrofolato reductasa
MTR: Metionina sintasa
MTTP: Proteína microsomal de transferencia de triglicéridos
mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero
MTPN: Miotrofina

N

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NEFA: Ácidos grasos no esterificados
NFAT: Factor nuclear de las células T activadas
NF-κB: Factor nuclear kappa B
NH₃: Amoniacó
NHE3: del inglés: *Sodium Hydrogen Exchanger 3*
NOX: NADPH oxidasa
NO: Óxido nítrico
NOS: NO sintasa
NPC1L1: del inglés; *Niemann-Pick C1-Like 1*
Nrf2: Factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2
NRF: Factor respiratorio nuclear
NRS: Especies reactivas de nitrógeno

O

OMS: Organización Mundial de la Salud
OST: Transportador de solutos orgánicos

P

PAT1: del inglés: *Putative Anion Transporter 1*
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PDE: Fosfodiesterasa
PDK-1: Quinasa dependiente de fosfoinositida 1
PEPCK: Fosfenolpiruvato carboxiquinasa
PGC1α: del inglés: *peroxisome proliferator activated receptor g coactivator-1a*
PI3K: Fosfatidilinositol- 3-quinasa
PKC: Proteína quinasa C
PKG: Proteína quinasa G
PLP: Piridoxal 5-fosfato
PPAR: Receptor activado por proliferadores peroxisomales
PPRC: Proteína relacionada con la coactivación de PPAR gamma
Pri-miARN: miARN primario
p38MAPK: del inglés: *p38 mitogen- activated protein kinases*

Q

R

RAGE: Receptores de AGEs

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por RNA

ROS: Especies reactivas de oxígeno

S

SAM: S-adenosilmetionina

SCD1: Estearoil-coA desaturasa 1

sGC: Guanilato ciclasa soluble

SHP: del inglés: *Small heterodimer partner*

Sirt1: Sirtuina 1

SLC: del inglés: Solute carrier

SOD: Superóxido dismutasa

Sp1: del inglés: *specificity protein 1*

SQR: Sulfato:quinona oxidoreductasa

SREBP: Proteína de unión al elemento respuesta a esteroides

SR-B1: Receptor *Scavenger* clase B tipo 1

T

TGR5: del inglés: *Takeda G protein-coupled receptor 5*

THF: Tetrahidrofolato

TICE: Transporte transintestinal de colesterol

Tm: Temperatura de anillamiento

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TRBP: del inglés: *Transactivation response element RNA-binding protein*

U

UE: Unión Europea

V

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGFR: Receptor de VEGF

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

W

X

XBP1u: del inglés: *Unspliced X-box-binding protein 1*

Y

Z

Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Enfermedades no transmisibles (ENT) en España A) Mortalidad proporcional de la población española..... | 36 |
| Figura 2: Relación entre la dieta occidental y el desarrollo de enfermedades metabólicas. | 38 |
| Figura 3: Evolución del consumo de azúcar y la incidencia de obesidad en EEUU. | 41 |
| Figura 4: Consumo de hidratos de carbono en la población española de acuerdo con el estudio ANIBES. | 42 |
| Figura 5: Absorción de la glucosa y la fructosa en el intestino. | 44 |
| Figura 6: Metabolismo hepático de la glucosa y la fructosa..... | 45 |
| Figura 7: Efecto de la ingesta crónica de fructosa en la respuesta a leptina..... | 47 |
| Figura 8: Proceso de síntesis de ácido úrico. | 52 |
| Figura 9: Absorción y metabolismo intestinal de la fructosa y diferencias en sus efectos dependientes de la dosis de fructosa consumida..... | 56 |
| Figura 10: Resumen de los efectos metabólicos debidos al consumo de fructosa..... | 57 |
| Figura 11: Mecanismos epigenéticos y efectos sobre el fenotipo..... | 62 |
| Figura 12: Mecanismo propuesto para explicar el efecto de la metilación de promotores sobre la expresión génica. | 63 |
| Figura 13: Efecto de la metilación del ADN sobre la remodelación de la cromatina y la expresión génica. | 64 |
| Figura 14: Representación de la remodelación de la cromatina y el efecto de la acetilación de histonas sobre la expresión génica. | 65 |
| Figura 15: Maduración de los miARN y efecto sobre el ARNm..... | 66 |
| Figura 16: Metabolismo de un carbono (fechas azules) y transulfuración (Flechas verdes). | 71 |
| Figura 17: Mecanismos de regulación de la cistationina γ -liasa (CSE). | 73 |
| Figura 18: Oxidación enzimática del sulfuro de hidrógeno en la mitocondria.. | 74 |
| Figura 19: Relación entre el H ₂ S y el NO. | 77 |
| Figura 20: Relación entre el H ₂ S y la enfermedad cardiovascular | 79 |
| Figura 21: Efecto del H ₂ S sobre la diabetes y la resistencia a la insulina. | 83 |
| Figura 22: Esquema del diseño experimental del procedimiento 1. | 96 |
| Figura 23: Diseño experimental del procedimiento 2 | 97 |

Lista de figuras

| | |
|--|-----|
| Figura 24: Diseño experimental del procedimiento 3. | 99 |
| Figura 25: Gel de agarosa para comprobar la integridad del ARN obtenido | 107 |
| Figura 26: Gel de comprobación de la eliminación completa del ADN contaminante.. | 108 |
| Figura 27: Gel de comprobación de la funcionalidad del ADNc obtenido. | 108 |
| Figura 28: Mecanismo para detectar el producto de amplificación por PCR a tiempo real usando <i>SYBR-Green I</i> | 109 |
| Figura 29: Realización de una recta de calibrado a partir del Cp..... | 109 |
| Figura 30: A) Picos de fusión correspondientes a un producto de amplificación tras aplicar la segunda derivada de la fluorescencia. B) Curvas de fusión correspondientes a un producto único de amplificación de un gen de interés. | 110 |
| Figura 31: Gel de agarosa para comprobar la integridad del ARN total obtenido..... | 113 |
| Figura 32: Poliadenilación, retrotranscripción y amplificación por PCR a tiempo real realizada por el kit RT miScript® (Qiagen, EE.UU.) | 114 |
| Figura 33: Gel de electroforesis del ADN sin tratar o tratado con McrBC. | 117 |
| Figura 34: Localización de zonas ricas en islas CpGs..... | 118 |
| Figura 35: Descripción de la región promotora del gen de la CSE de rata..... | 119 |
| Figura 36: Curvas de amplificación por PCR a tiempo real de una muestra de ADN usando A) los cebadores control GR y B) los cebadores que amplifican una zona del promotor de la CSE. | 120 |
| Figura 37: Principio del SOD Assay Kit | 123 |
| Figura 38: Fundamento del método de detección de H ₂ S en plasma por el método del azul de metileno | 124 |
| Figura 39: Esquema del protocolo seguido para determinar la formación de H ₂ S en tejido mediante el método del sulfato de plomo | 126 |
| Figura 40: Gel de electroforesis de poliacrilamida de los homogenados en PBS de tejido tratados o no con proteinasa K y posterior tinción con Coomassie..... | 127 |
| Figura 41: Estudio de la linealidad del método de sulfato de plomo para la detección de la producción de H ₂ S en tejido. | 128 |
| Figura 42: Estudio de la repetitividad y reproducibilidad del método de sulfato de plomo para la detección de la producción de H ₂ S en tejido. | 129 |
| Figura 43: Estudio de los cambios en la concentración de proteínas añadidas al ensayo del método de sulfato de plomo para la detección de la producción de H ₂ S en tejido..... | 130 |

| | |
|---|-----|
| Figura 44: La ingesta de fructosa en la gestación exagera la producción de FGF21 inducida por el consumo de fructosa en la descendencia macho adulta..... | 139 |
| Figura 45: La inducción de FGF21 por el consumo de fructosa en la gestación evita el estrés oxidativo hepático en la descendencia macho que consumió fructosa..... | 140 |
| Figura 46: La inducción de FGF21 por el consumo de fructosa en la gestación mejora el estrés oxidativo en el tejido adiposo lumbar en la descendencia macho adulta procedente de madres control, pero no en los descendientes de madres fructosa..... | 143 |
| Figura 47: El consumo materno de fructosa afecta al metabolismo de la HCys en la descendencia hembra adulta. A) Homocisteína plasmática..... | 156 |
| Figura 48: El consumo de fructosa en la gestación afecta a los niveles plasmáticos de H ₂ S debido a una alterada producción hepática..... | 157 |
| Figura 49: El consumo materno de fructosa exagera la represión de la expresión de la CSE debida al consumo de fructosa en la descendencia hembra adulta..... | 160 |
| Figura 50: El consumo materno de fructosa en la gestación exagera la represión de la producción hepática de H ₂ S debida al consumo de fructosa en la descendencia hembra adulta..... | 162 |
| Figura 51: Ingesta de bebida (A), comida sólida (B), Kcal totales (C) e incremento de peso (D) en los 21 días de estudio de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa o agua con un 10% (p/v) de tagatosa..... | 178 |
| Figura 52: Ingesta de bebida (A), comida sólida (B), Kcal totales (C) e incremento de peso (D) en los 21 días de estudio de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa o agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol..... | 179 |
| Figura 53: Trigliceridemia (A), contenido de triglicéridos hepáticos (B), colesterolemia (C) y contenido de colesterol hepático (D) en los 21 días de estudio de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa o agua con un 10% (p/v) de tagatosa..... | 181 |
| Figura 54: Concentración de ácidos biliares en heces (A) e hígado (B) tras 21 días de tratamiento de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa o agua con un 10% (p/v) de tagatosa..... | 182 |
| Figura 55: Esquema de la circulación enterohepática de los ácidos biliares y absorción de ácidos grasos en el intestino (A). Expresión génica de los genes implicados en la absorción intestinal de los ácidos biliares en íleon: ASBT (B), IBABP (C), OST α (D) y OST β (E) tras 21 días de estudio de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa o agua con un 10% (p/v) de tagatosa..... | 183 |

Lista de figuras

| | |
|--|-----|
| Figura 56: Niveles de ácidos biliares plasmáticos en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa o agua con un 10% (p/v) de tagatosa | 184 |
| Figura 57: Triglicéridos en heces (A), lípidos totales (B), colesterol (C) y expresión génica en íleon de MTTP (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa o agua con un 10% (p/v) de tagatosa | 185 |
| Figura 58: Colesterolemia (A) y colesterol hepático (B) de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos , agua con un 10% (p/v) de fructosa o agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol | 186 |
| Figura 59: Colesterol no-HDL (A) y colesterol en HDL (B) e índices de riesgo de aterosclerosis: índice de riesgo coronario (C) e índice aterogénico del plasma (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol | 187 |
| Figura 60: Trigliceridemia (A), niveles plasmáticos de NEFA (B) en plasma y concentración de triglicéridos hepáticos (C) de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, gráficas en tonos claros) y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa o agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol..... | 189 |
| Figura 61: Mecanismos que presenta el organismo para deshacerse de los excesos de colesterol | 190 |
| Figura 62: Concentración de ácidos biliares hepáticos (A) y en heces (B) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol..... | 191 |
| Figura 63: Expresión génica hepática de ABCG5 en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol. | 191 |
| Figura 64: Expresión génica en íleon de los transportadores implicados en la absorción intestinal de colesterol: NPC1L1 (A) y SR-B1 (B), y el transporte transintestinal de colesterol (TICE): LDLR (C) y ABCG5 (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol. | 192 |
| Figura 65: Contenido de colesterol en heces (A) e íleon (B) de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos , agua con un 10% (p/v) de fructosa o agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol | 193 |
| Figura 66: Producción enzimática y no enzimática de H ₂ S en el hígado, íleon y tejido adiposo lumbar (TAL) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa, agua con un 10% (p/v) de tagatosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol | 209 |

Figura 67: Producción total de H₂S en hígado (A) íleon (B) y en tejido adiposo lumbar (TAL) (C) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de tagatosa 210

Figura 68: Producción total de H₂S en hígado (A) íleon (B) y en tejido adiposo lumbar (TAL) (C) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol 211

Figura 69: Producción enzimática de H₂S en hígado tras tratar el homogenado con EDTA (A) y expresión génica hepática (ARNm) de las enzimas de la transulfuración: CSE (B), CBS (C) y 3MST (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de tagatosa..... 213

Figura 70: Expresión génica (ARNm) de la KHK (A) y la aldolasa B (B) en hígado en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de tagatosa 216

Figura 71: Expresión génica (ARNm) de la CSE (A), la KHK (B) y la aldolasa B (C) en íleon en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de tagatosa..... 217

Figura 72: Producción enzimática de H₂S en hígado tras tratar el homogenado con EDTA (A) y expresión génica hepática (ARNm) de las enzimas de la transulfuración: CSE (B), CBS (C) y 3MST (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol 219

Figura 73: Expresión génica (ARNm) de la cetohexoquinasa (KHK) (A) y la aldolasa B (B) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol..... 221

Figura 74: Expresión génica (ARNm) de la CSE (A) la KHK (B) y la aldolasa B (C) en íleon en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol 222

Figura 75: Ácidos biliares hepáticos en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol. 223

Figura 76: Producción enzimática y no enzimática de H₂S en tejido adiposo lumbar (TAL) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivo, agua con un 10% (p/v) de fructosa, agua con un 10% (p/v) de tagatosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol 224

Figura 77: Producción de H₂S en tejido adiposo lumbar (TAL) tras tratar el homogenado con con D-Cisteína (DCys) (no enzimática) (A) o con EDTA y L-Cisteína (enzimática) (B). Expresión génica (ARNm) en

Lista de figuras

| | |
|--|-----|
| TAL de las enzimas de la transulfuración: CSE (C) y 3MST (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de tagatosa..... | 225 |
| Figura 78: Producción de H ₂ S en tejido adiposo lumbar (TAL) tras tratar el homogenado con con D-Cisteína (DCys) (no enzimática) (A) o con EDTA y L-Cisteína (enzimática) (B). Expresión génica (ARNm) en TAL de las enzimas de la transulfuración: CSE (C) y 3MST (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol | 226 |
| Figura 79: Peso del tejido adiposo lumbar (TAL) (A), lípidos totales (B) y triglicéridos (C) en el TAL y leptina (D) y adiponectina (E) plasmática en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (barras, gráficas en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de tagatosa..... | 227 |
| Figura 80: Peso del tejido adiposo lumbar (TAL) (A), lípidos totales (B) y triglicéridos (C) en el TAL y leptina (D) y adiponectina (E) plasmática en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol. | 228 |
| Figura 81: La ingesta de una solución de fructosa al 10% p/vol durante la gestación en ratas gestantes procedentes de madres alimentadas con fructosa deteriora la respuesta a la insulina y leptina..... | 243 |
| Figura 82: La gestación en las descendientes de madres alimentadas con fructosa y la ingesta de fructosa al 10% p/vol durante la gestación afecta a la respuesta a la leptina y la insulina | 245 |
| Figura 83: La gestación en las descendientes de madres alimentadas con fructosa y la ingesta de fructosa al 10% p/v durante la gestación afecta al contenido de lípidos en el hígado materno y en la placenta. | 246 |
| Figura 84: La gestación en las descendientes de madres alimentadas con fructosa y la ingesta de una solución de fructosa al 10% p/vol. durante la gestación afecta la respuesta a la insulina y la leptina en los fetos. | 248 |
| Figura 85: La gestación en las descendientes de madres alimentadas con fructosa y la ingesta de una solución de fructosa al 10% p/vol. durante la gestación afecta a la acumulación de lípidos y el contenido de glucosa en el hígado de los fetos. | 249 |
| Figura 86: La gestación en las descendientes de madres alimentadas con fructosa produce un mayor estrés oxidativo hepático fetal que la ingesta de una solución de fructosa al 10% p/vol. durante la gestación de las ratas descendientes de madres fructosa. | 250 |

Lista de Tablas

Lista de tablas

Tabla 1: Criterios diagnósticos del síndrome metabólico según la definición armonizada. 35

Tabla 2: Los 10 mayores consumidores de azúcar en 2019. Extraído de ISO, 2019. 39

Tabla 3: Composición nutricional dieta estándar de rata 95

Tabla 4: Composición nutricional de la dieta estándar de rata suplementada con un 2% de colesterol. . 98

Tabla 5: Protocolo de la PCR de comprobación para RPS29..... 107

Tabla 6: Protocolo de PCR a tiempo real general utilizado para los estudios de expresión génica utilizando el *Light Cycler 1.5* 111

Tabla 7: Protocolo de PCR a tiempo real general utilizado para los estudios de expresión génica utilizando el CFX96®. 111

Tabla 8: Secuencias de los cebadores específicos para la medida de los diferentes miARN..... 115

Tabla 9: Protocolo de PCR a tiempo real general utilizado para los estudios de expresión de miARN ... 115

Tabla 10: Cebadores utilizados para la medida de la metilación del ADN del promotor del gen de la CSE 118

Tabla 11: Protocolo de PCR a tiempo real para la medida de metilación de promotores..... 120

Tabla 12: Peso corporal y parámetros plasmáticos de la descendencia macho a día 240 de edad de madres control, fructosa y glucosa..... 136

Tabla 13: Peso corporal, ingestas de comida sólida y líquida, parámetros plasmáticos y expresión génica hepática de la descendencia macho a día 261 de edad tratados con fructosa y descendientes de madres-fructosa, glucosa y control. El grupo CC son machos controles de madres control. 138

Tabla 14: Peso del hígado y parámetros hepáticos a día 261 de edad de los machos tratados con fructosa descendientes de madres-fructosa, glucosa o control. El grupo CC son machos controles de madres control. 140

Tabla 15: Sistema antioxidante hepático a día 261 de edad de los machos tratados con fructosa descendientes de madres-fructosa, glucosa o control. El grupo CC son machos controles de madres control. 141

Tabla 16: Peso y parámetros del tejido adiposo y expresión génica del tejido adiposo lumbar a día 261 de edad de los machos tratados con fructosa descendientes de madres-fructosa, glucosa o control. El grupo CC son machos controles de madres control. 142

Tabla 17: Marcadores de estrés oxidativo y sistema antioxidante en las hembras descendientes de madres control, fructosa o glucosa. 158

Tabla 18: Reguladores de la expresión de la CSE y la producción del H₂S. Expresión génica hepática de factores de transcripción y/o sus genes diana en la descendencia hembra de madres control, fructosa o glucosa..... 159

Lista de tablas

| | |
|--|-----|
| Tabla 19: Marcadores de estrés oxidativo y sistema antioxidante en las hembras que consumieron fructosa y son descendientes de madres control, fructosa o glucosa. CC: hembras control descendientes de madres control..... | 163 |
| Tabla 20: Reguladores de la expresión de la CSE y la producción del H ₂ S. Expresión génica hepática de factores de transcripción y/o sus genes diana en las hembras que consumieron fructosa y que son descendientes de madres control, fructosa o glucosa. CC: hembras control descendientes de madres control. | 164 |
| Tabla 21: Expresión génica hepática de genes lipogénicos (FAS y SCD1), de oxidación de ácidos grasos (CPT1) y encargados de la formación de VLDL (MTTP) de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de tagatosa..... | 181 |
| Tabla 22: Expresión génica hepática de genes lipogénicos (SREBP1c, FAS, SCD1, ACYL), de oxidación de ácidos grasos (CPT1), receptores de lipoproteínas (LDLR y SR-B1) y de la síntesis de ácidos biliares (CYP7A1) de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa o agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol..... | 188 |
| Tabla 23: Mecanismos que regulan la expresión de la CSE en hígado de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de tagatosa | 214 |
| Tabla 24: Enzimas del metabolismo alteradas por el consumo de fructosa y su metabolismo en hígado de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de tagatosa..... | 216 |
| Tabla 25: Mecanismos que regulan la expresión de la CSE en hígado de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol..... | 220 |
| Tabla 26: Enzimas del metabolismo alteradas por el consumo de fructosa y su metabolismo en hígado de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol | 221 |
| Tabla 27: Peso corporal, ingesta de comida sólida y bebida en ratas gestantes descendientes de madres que consumieron fructosa sometidas (FF) o no (FC) a fructosa durante su gestación y en las ratas gestantes control (CC). | 242 |
| Tabla 28: Expresión génica hepática y en placenta en ratas gestantes descendientes de madres que consumieron fructosa sometidas (FF) o no (FC) a fructosa durante su gestación y en las ratas gestantes control (CC)..... | 247 |
| Tabla 29: Valores plasmáticos y expresión génica hepática de los fetos de ratas gestantes descendientes de madres que consumieron fructosa sometidas (FF) o no (FC) a fructosa durante su gestación y en las ratas gestantes control (CC)..... | 250 |

Resumen

Resumen

En las últimas décadas, trastornos como la obesidad, el síndrome metabólico, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes han alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial. Numerosos estudios han demostrado cómo cambios metabólicos que se producen durante el desarrollo pre- y postnatal del individuo modulan el riesgo de padecer enfermedades metabólicas una vez se hace adulto. Este fenómeno se denomina “programación fetal”. De entre todos los factores causales, la nutrición constituye uno de los parámetros más influyentes.

La fructosa es un carbohidrato presente en la sacarosa y el jarabe de maíz rico en fructosa, y ambos se adicionan a las bebidas azucaradas y alimentos procesados por su acción edulcorante. La ingesta de fructosa se ha relacionado con el desarrollo de diabetes, obesidad y síndrome metabólico. Múltiples trabajos científicos en animales de experimentación han demostrado que la fructosa, pero no la glucosa, induce resistencia a la leptina, resistencia a la insulina, dislipemia, hipertensión, hiperuricemia y estrés oxidativo, siendo todas estas características típicas del síndrome metabólico. Además, es importante señalar que el consumo de fructosa suele ir acompañado con una alta ingesta de grasas. Se ha descrito que la *Western diet* o dieta occidental (rica en fructosa y grasa) favorece la aparición de enfermedades coronarias y diabetes tipo 2, por lo que es posible que los efectos adversos de la ingesta de grasas se agraven por la presencia conjunta de fructosa.

A pesar de todos los antecedentes, resulta sorprendente que el consumo de bebidas azucaradas no está contraindicado durante la gestación ni la lactancia.

En este contexto, los objetivos de la presente Tesis Doctoral han sido estudiar si el consumo de fructosa durante la gestación modifica la respuesta en los descendientes, de 3 y 8 meses de edad, a situaciones conocidas de favorecer la aparición de síndrome metabólico como son: la ingesta de fructosa líquida con o sin una dieta occidental. Por otra parte, quisimos comprobar si los efectos observados con la fructosa son específicos de este carbohidrato usando un epímero de la misma, la tagatosa. Además, hemos querido conocer si los cambios metabólicos y epigenéticos inducidos por la fructosa durante la gestación se transmiten de generación en generación. Para ello, nos planteamos elucidar los mecanismos implicados a nivel de señalización hormonal (leptina, insulina y FGF21), metabolismo lipídico, estrés oxidativo y de producción de H₂S.

Para la consecución de los objetivos planteados se llevaron a cabo tres procedimientos experimentales. En el primer estudio, se cruzaron ratas hembra Sprague-Dawley con machos. Una vez preñadas se distribuyeron en tres grupos experimentales: uno recibió agua sin aditivos, otro recibió agua suplementada con un 10% de fructosa (p/v) y el último grupo recibió agua suplementada con un 10% de glucosa (p/v), a lo largo de toda la gestación. Tras el parto, las ratas recibieron agua sin aditivo durante la lactancia. La descendencia, después del destete, se separó por géneros y a los 8 meses de edad se les administró agua suplementada con fructosa durante 21 días a todos los descendientes independientemente del tratamiento recibido por sus madres. En los descendientes macho se evaluó el papel de FGF21 tanto en el hígado como tejido adiposo asociado al consumo de fructosa y en las descendientes hembra se determinó la influencia del consumo de fructosa en la producción hepática de H₂S, un gasotransmisor con acción protectora frente al desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. De esta manera, observamos que el consumo de fructosa aumenta la

Resumen

producción de FGF21 en la descendencia macho adulta, principalmente en los descendientes de madres-fructosa, y la dieta materna determina la función de FGF21 tanto en el metabolismo lipídico como en el estrés oxidativo [capítulo 1]. Por otro lado, en la descendencia hembra el consumo de fructosa provoca una reducción en la producción hepática de H_2S , siendo más evidente en las descendientes de madres-fructosa [capítulo 2].

En el segundo procedimiento experimental, se cruzaron ratas hembra Sprague-Dawley con machos y, una vez preñadas, se dividieron en dos grupos experimentales: uno recibió agua sin aditivos y otro grupo agua suplementada con un 10% de fructosa (p/v) durante toda la gestación. Tras el parto, estos animales consumieron agua sin aditivo, durante la lactancia y tras el destete. La descendencia macho a los 3 meses de edad se sometió a un nuevo tratamiento dietético durante 21 días. Así, todos los descendientes macho (independientemente del tratamiento recibido por sus madres) se dividieron en cuatro grupos experimentales según el tratamiento dietético recibido: agua sin aditivo, agua suplementada con fructosa 10% (p/v), agua con tagatosa 10% (p/v) y agua suplementada con fructosa 10% (p/v) además de una dieta sólida enriquecida con colesterol al 2%. En primer lugar, se llevó a cabo un estudio del metabolismo lipídico y del colesterol. De esta manera, pudimos observar que la ingesta materna de fructosa influye en la absorción intestinal de ácidos biliares y triglicéridos cuando se somete a la descendencia macho al consumo de tagatosa. Además, la asociación de fructosa y colesterol condujo a una dislipemia acusada, más evidente que con el consumo solo de fructosa, estos efectos se mostraron independientemente de la dieta recibida por la madre. Curiosamente, los descendientes de madres-fructosa, ingieren algo menos de comida sólida y parece que eliminan algo más de colesterol en heces que los hijos de madres control, por lo que cabría esperar que mostraran una dislipemia más leve que los hijos de madres control. Sin embargo, sorprendentemente, la hipercolesterolemia y la acumulación de colesterol en hígado de estos animales se mantiene en niveles similares a los descendientes de madres control [capítulo 3]. Por otro lado, quisimos conocer cómo afectan los distintos tratamientos a estos descendientes macho jóvenes en la producción de H_2S en diferentes tejidos, así como elucidar los mecanismos implicados. Se pudo observar como el consumo de fructosa provocó una reducción marcada en el metabolismo de este gasotransmisor exclusivamente en el hígado, efecto que se agravó cuando se asoció fructosa y colesterol, y no se vio modificado por la dieta materna. Además, este efecto es específico de la fructosa, ya que dichos cambios no se observaron tras la administración de tagatosa. Es de resaltar que la producción de H_2S en el hígado se ve afectada por la actividad enzimática de enzimas del metabolismo de la fructosa, concretamente la cetohexoquinasa (KHK) y la aldolasa B. Sorprendentemente, la producción de H_2S en tejido adiposo es dependiente de la dieta materna, y así el consumo de fructosa por parte de las madres durante la gestación provocó un aumento de la producción de H_2S en el tejido adiposo de los hijos, independientemente del tratamiento dietético seguido por estos descendientes. Los resultados descritos podrían explicar la mayor adiposidad observada en este grupo de animales [capítulo 4].

Finalmente, en el tercer procedimiento experimental quisimos evaluar si se producía una transmisión de generación en generación de las alteraciones metabólicas asociadas al consumo de fructosa durante la gestación. Para ello, a ratas hembra Sprague-Dawley gestantes se les administró agua suplementada con un 10% de fructosa (p/v) durante toda la

gestación (constituyendo la generación F0). Tras el parto se continuó el estudio con las descendientes hembra (generación F1), las cuales consumieron agua sin aditivo durante la lactancia y tras el destete. A las 8 semanas de edad, estas descendientes hembra se cruzaron con machos y una vez preñadas se distribuyeron en dos grupos: uno que consumió agua sin aditivo y otro que consumió agua suplementada con fructosa 10% (p/v) durante la gestación. En paralelo, se estudió un grupo control procedente de madres control. Se evaluó la respuesta a insulina y leptina, así como el metabolismo lipídico y glucídico de las gestantes y sus fetos (futura F2). Así, se observó que el consumo de fructosa en la gestación programaba un fenotipo en la descendencia hembra la cual, cuando quedaba a su vez preñada, mostraba una alterada respuesta a insulina y leptina, así como dislipemia y esteatosis. Es más, estos cambios se observaban también en sus fetos, lo que pone de manifiesto un evidente efecto de programación fetal [capítulo 5].

Resumen

Introducción General

Introducción general

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades no transmisibles son la primera causa de muerte en el mundo, provocando hasta el 70% de las muertes a nivel mundial. Dentro de este grupo se encuentran las enfermedades cardiovasculares (ECV), el cáncer, la diabetes y las enfermedades respiratorias crónicas (WHO, 2019; Police et al., 2009). Sorprendentemente, todas ellas comparten factores de riesgo modificables y prevenibles en los que todos los países del mundo pueden intervenir. Estos factores de riesgo son principalmente el tabaquismo, el consumo de alcohol, el sedentarismo y la ingesta de dietas poco saludables. Un estilo de vida con los hábitos anteriormente descritos, favorece el desarrollo de alteraciones tales como la hipertensión, el sobrepeso y la obesidad, la hiperglucemia y la hiperlipemia (WHO, 2018b).

Todas estas alteraciones se engloban en lo que se conoce como síndrome metabólico o síndrome X. El síndrome metabólico es un grupo de trastornos que se presentan al mismo tiempo y aumentan el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2. Para el diagnóstico de síndrome metabólico, según su definición armonizada, se requiere la presencia de al menos tres de las siguientes cinco alteraciones: obesidad abdominal, hipertrigliceridemia, bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), hipertensión y elevación de la glucemia en ayunas (Tabla 1) (Unger et al., 2019).

Tabla 1: Criterios diagnósticos del síndrome metabólico según la definición armonizada.

| | |
|---|---------------------------|
| Obesidad abdominal | |
| Niveles de triglicéridos en sangre | ≥ 150 mg/dL |
| Niveles de colesterol en HDL | < 40 mg/dL |
| Tensión arterial | Sistólica ≤ 130 mmHg |
| | Diastólica ≥ 85 mmHg |
| Glucemia en ayunas | ≥ 100 mg/dL |

Según la Federación Internacional de la Diabetes (IDF, 2006) se estima que el 20-25% de la población mundial presenta síndrome metabólico y, por esa razón ha sido considerada por muchos científicos como “la pandemia del siglo XXI”. Además, se ha demostrado que las personas con síndrome metabólico presentan mayor mortalidad y un mayor riesgo de sufrir un infarto de miocardio y diabetes tipo 2 (IDF, 2006). El síndrome metabólico afecta tanto a países desarrollados como a países en vías de desarrollo debido, en parte, a cambios en los patrones de ingesta que llevan a un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético. En todo el mundo en torno a unos 604 millones de adultos y 108 millones de niños aproximadamente son obesos. Se estima que en Estados Unidos, dos tercios de la población presenta sobrepeso u obesidad, un tercio de la población adulta presenta síndrome metabólico y un 12,2% diabetes tipo 2 (Faruque et al., 2019; Saklayen, 2018) y en Europa un 23% de la población es obesa (WHO, 2018b). Pero este no es solo un problema presente en países desarrollados, sino que en los últimos años se ha detectado también un incremento de estos trastornos en países en vías de desarrollo. Así, se estima que en la región Asia-Pacífico 1/5 de la población presenta

Introducción general

síndrome metabólico y un 21,3% de la población china también presenta esta afectación (Ranasinghe et al., 2017).

Preocupa además la incidencia de obesidad y síndrome metabólico dentro de la población infantil, que muestra una tendencia al alza en los últimos años. Este sector de la población presenta, a edad temprana, los signos típicos del síndrome metabólico, como son la diabetes tipo 2, la dislipemia y el hígado graso no alcohólico, aunque los eventos cardiovasculares aparecen solamente de manera excepcional. Además, el 85% de los niños obesos terminan siendo adultos obesos (Weiss et al., 2013).

En España, las enfermedades no transmisibles suponen un 91% de fallecimientos en el país y un 10% de las muertes prematuras. Entre ellas, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte, alcanzando un 28% del total de fallecimientos. Además, se estima que el 27% de los adultos son obesos mostrando una tendencia al aumento en los últimos años (Figura 1) (WHO, 2018b). En cuanto al síndrome metabólico, su prevalencia en España es de un 22,7 %, afectando en un 26% a hombres y un 19,4% a mujeres, y su frecuencia aumenta en función de la edad y del Índice de Masa Corporal (IMC) (Guallar-Castillón et al., 2014). También es destacable el hecho de que España es de los países de Europa con una mayor incidencia de sobrepeso en la población infantil, con un 40% de niños con sobrepeso, de entre los cuales un 18 % presenta obesidad (WHO, 2018a).

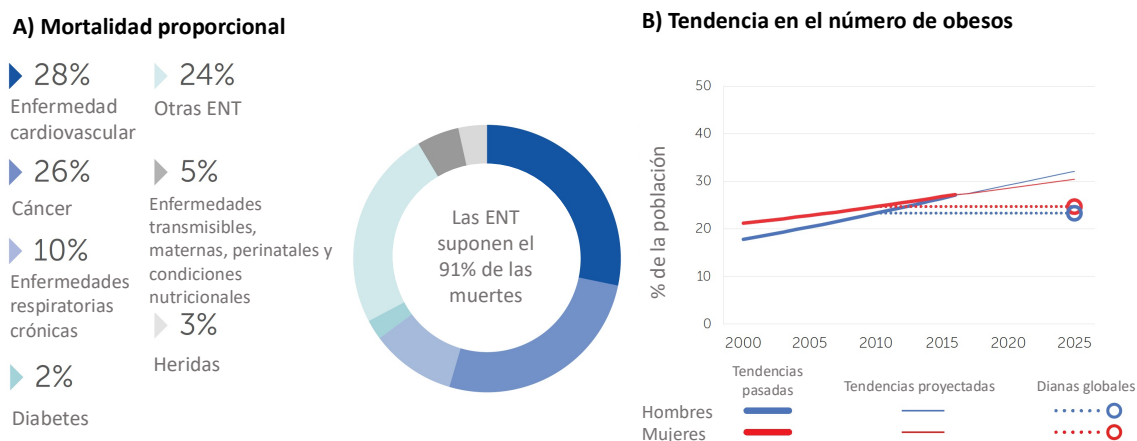


Figura 1: Enfermedades no transmisibles (ENT) en España A) Mortalidad proporcional de la población española. B) Tendencia en el número de obesos y estimaciones futuras en España. Adaptado de *Noncommunicable diseases country profiles 2018*. Gineva: World Health Organization; 2018 (WHO, 2018b)

Como se ha comentado anteriormente, las enfermedades no transmisibles presentan factores de riesgo modificables sobre los que se puede actuar para prevenir su aparición (WHO, 2019) y, de entre todos ellos, la dieta es uno de los factores clave. La occidentalización de la dieta está jugando un papel fundamental en el desarrollo de la obesidad, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico (Kopp, 2019). El exceso de calorías de esta dieta, en forma de grasa e hidratos de carbono, unido a una reducida actividad física se han relacionado tanto en humanos como en modelos animales de experimentación, con la aparición de diabetes tipo 2, resistencia a la insulina y obesidad (Rodríguez-Monforte et al., 2017; van Dijk et al., 2009). En cambio, se ha visto que en poblaciones que llevan una dieta basada en la caza-

recolección o en una dieta tradicional, la obesidad es muy poco frecuente (Kopp, 2019). Sorprendentemente, estas dietas presentan unos porcentajes de grasa similar a los de la dieta occidental, pero el consumo de hidratos de carbono es significativamente menor (Cordain et al., 2000).

La nutrigenómica es la ciencia que estudia el efecto de los nutrientes sobre el genoma, proteoma y metaboloma (Ordovas & Mooser, 2004). Los diferentes componentes de la dieta son capaces de modificar la expresión de los genes actuando sobre factores de transcripción, generando modificaciones epigenéticas, o afectando a nivel de las modificaciones postranscripcionales de las proteínas (Afman & Müller, 2006). El conocer cómo se ven modificados todos estos parámetros, permitiría esclarecer los mecanismos implicados en el desarrollo de las enfermedades no transmisibles relacionadas con la nutrición y, como consecuencia, prevenirlas de una manera mucho más eficiente (Müller & Kersten, 2003).

1. Dieta occidental o *Western Diet*

La dieta occidental o *Western Diet* se caracteriza por una elevada ingesta de ácidos grasos saturados y omega-6, sal y azúcares añadidos (Myles, 2014), todo ello acompañado por a una reducida ingesta de frutas y verduras frescas (Cena & Calder, 2020). Este tipo de dieta comenzó a introducirse en los países occidentales a partir de la Revolución Industrial debido al incremento del uso de aceites, cereales y azúcares refinados y se asentó en la Edad Moderna con la instauración de la comida rápida y el sedentarismo (Carrera-Bastos et al., 2011). Todos estos factores han desencadenado un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético gracias a la asociación de un estilo de vida sedentario y el consumo de dietas hipercalóricas (Hossain et al., 2007).

Desde entonces, los países que han incorporado este tipo de dieta han sufrido un drástico incremento en la incidencia de afecciones como la obesidad, diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, hipertensión y cáncer (Kopp, 2019). En cambio, aquellos países que han mantenido su dieta tradicional (Carrera-Bastos et al., 2011) o una dieta mediterránea (Bonaccio et al., 2012; Martínez-González et al., 2015) muestran una menor incidencia de estas patologías. Desafortunadamente, cada vez un mayor número de países están experimentando una transición hacia una occidentalización de su dieta, viéndose incrementada la incidencia de todas estas enfermedades metabólicas en su población (Bentov, 2014).

La comunidad científica lleva décadas centrada en el estudio de los mecanismos implicados en la relación existente entre los cambios en la dieta y el estilo de vida y el creciente número de enfermedades como la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes (Burkitt, 1973). Una de las teorías establecidas postula que el ser humano ha cambiado drásticamente su forma de vida en los últimos 250 años, pero su genoma comparte la mayoría de la programación genética de los primeros *Homo sapiens* (Kopp, 2019). Esta teoría se conoce como “el genotipo ahorrador” y fue descrita por Neel (Neel, 1962). Según esta, el ser humano estaría programado para ahorrar las calorías ingeridas de una manera muy eficiente, debido a

Introducción general

que el hombre en sus inicios era básicamente una especie cazadora-recolectora y estaba expuesto en cualquier momento a una situación de escasez de alimentos. Actualmente, en países occidentalizados, aunque los genes estén programados de la misma manera, hay un considerable exceso en la ingesta de calorías. Como consecuencia, mientras continuamos teniendo un metabolismo programado para conseguir el máximo ahorro de calorías, nosotros las estamos consumiendo en exceso (Neel, 1962). En este proceso se genera una acumulación de lípidos en los tejidos, como el hígado y el tejido adiposo, que generan una situación de estrés oxidativo y un proceso inflamatorio que derivan en el desarrollo de alteraciones como la resistencia a la insulina, obesidad, hígado graso no alcohólico y alteraciones cardiovasculares (Figura 2) (Kesh et al., 2016; Lozano et al., 2016).

Además, curiosamente en los últimos años se ha establecido una relación entre la dieta occidental y cambios en la microbiota intestinal. Podemos definir la microbiota intestinal como una comunidad compleja y dinámica de microorganismos que mantiene una relación simbiótica con la mucosa intestinal (Statovci et al., 2017). La microbiota intestinal se encarga de metabolizar componentes de la dieta que el intestino no es capaz de absorber generando metabolitos secundarios fundamentales para el correcto funcionamiento del organismo (Battson et al., 2018). Como consecuencia, alteraciones de esta microbiota, debidas a la dieta, se han asociado con una alterada respuesta inmunitaria de la mucosa intestinal y una respuesta inflamatoria no solo a nivel intestinal (Statovci et al., 2017), sino también a nivel sistémico. Así, estudios en animales han mostrado cómo cambios en la microbiota se asociaban a procesos inflamatorios en tejido adiposo (Tran et al., 2020), hígado (Meng et al., 2018) y riñón (Rosas-Villegas et al., 2017) (Figura 2).

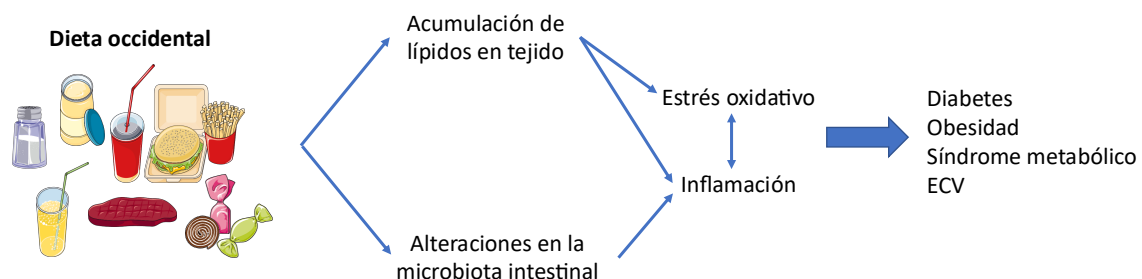


Figura 2: Relación entre la dieta occidental y el desarrollo de enfermedades metabólicas.

Otro dato preocupante con respecto a este tipo de dietas es el hecho de que provoca una deficiencia de micronutrientes esenciales, como vitaminas y minerales, ya que la densidad y biodisponibilidad de estos micronutrientes es mucho menor en los alimentos consumidos en la dieta occidental (Carrera-Bastos et al., 2011). Alguno de estos micronutrientes son vitaminas como la vitamina A, D, B12 y B9 (ácido fólico) con potencial antioxidante, antiinflamatorio y necesarios para el correcto funcionamiento, entre otros, del sistema inmune (Rizzello et al., 2019).

Finalmente, la pandemia generada por el SARS-CoV2 (del inglés: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*) que comenzó en Wuhan (China) a finales de 2019 ha puesto de nuevo en el punto de mira la importancia de la salud metabólica de la población. De

esta manera, aunque el SARS-CoV2 afecta a todos los grupos de población, la severidad de la enfermedad y su mortalidad es mucho mayor en personas de avanzada edad y/o aquellos pacientes que presentan afectaciones previas tales como la diabetes tipo 2, la obesidad y otras enfermedades crónicas (Coate et al., 2020). Es más, dado que hay evidencias que sugieren que la dieta occidental contribuye al desarrollo de estas enfermedades metabólicas, el riesgo de presentar sintomatología severa y muerte por la COVID-19 es mayor en la población que lleva una dieta tipo *Western* (Butler & Barrientos, 2020).

2. Consumo de azúcar

Una de las características principales de la dieta occidental es el excesivo consumo de azúcares añadidos (Lozano et al., 2016). Los azúcares libres son monosacáridos y disacáridos que el fabricante o el consumidor adicionan a comidas y bebidas y aquellos azúcares naturalmente presentes en la miel, siropes, zumos de frutas y concentrados de frutas. La Organización Mundial de la Salud recomienda que su consumo no exceda el 10% de la ingesta calórica total tanto en adultos como en niños (WHO, 2015). El consumo de azúcar en la dieta comenzó a incrementarse a comienzos del siglo XIX cuando se abarató la tecnología para extraer y refinar la caña de azúcar (Tappy & Lê, 2010), y este incremento ha supuesto que actualmente los azúcares lleguen a alcanzar entre el 10 y el 20 % de la ingesta calórica, superando con creces las recomendaciones de la OMS (Tappy, 2018). Según la *International Sugar Organization*, el consumo medio de azúcar en el mundo ha sido de 22,1 kg *per cápita* en el año 2019. Además, entre el año 2000 y el 2018 el consumo ha aumentado de 123,454 millones de toneladas a 172,441 millones de toneladas suponiendo un incremento anual del 2,01% (ISO, 2019). Los principales países consumidores de azúcar según esta organización son India, la Unión Europea, China, Brasil, EEUU, Indonesia, Rusia, Pakistán, México y Egipto (Tabla 2) (ISO, 2019).

Tabla 2: Los 10 mayores consumidores de azúcar en 2019. Extraído de ISO, 2019.

| País | Consumo de azúcar en 2019 (millones de toneladas métricas) |
|------------------|---|
| India | 25,51 |
| UE | 18,11 |
| China | 16,20 |
| Brasil | 10,55 |
| EEUU | 10,24 |
| Indonesia | 6,95 |
| Rusia | 5,95 |
| Pakistán | 5,35 |
| México | 4,09 |
| Egipto | 3,19 |

De entre todos los edulcorantes utilizados en la industria alimentaria, el que ha suscitado más controversia es el jarabe de maíz rico en fructosa (HFCS, del inglés: *High-*

Introducción general

Fructose Corn Syrup), también conocido como isoglucosa, sirope de fructosa-glucosa o sirope rico en fructosa. El HFCS se genera por aislamiento del almidón presente en el maíz, hidrólisis del almidón a glucosa y posterior isomerización enzimática parcial de la glucosa a fructosa dando lugar a dos tipos de HFCS en función de su porcentaje de fructosa: HFCS-42 (con un 42% de fructosa) y HFCS-55 (con un 55% de fructosa) (Tappy et al., 2010; White et al., 2015). Su producción comenzó en los años 60 como edulcorante líquido alternativo a la sacarosa debido a que su forma líquida ofrecía ventajas de manipulación durante su producción, presentaba también una mayor estabilidad en medio ácido y un precio más estable e inferior a la sacarosa (Tappy et al., 2010; White et al., 2015). Estas ventajas del HFCS hicieron posible que su consumo experimentara un aumento rápido durante varias décadas desde su introducción en el mercado y a mitad de la década de los 80 en EEUU el HFCS llegó incluso a sustituir a la sacarosa como edulcorante en la mayoría de las bebidas azucaradas (White & Nicklas, 2016). Debido a que su proporción en fructosa no difiere en gran medida de la sacarosa (disacárido formado por un 50% de fructosa y 50% en glucosa) se defendió durante años que el HFCS presentaba efectos metabólicos similares a la sacarosa (Tappy & Lê, 2015). Sin embargo, su consumo empezó a decaer a partir de 2004 momento en el que comenzó a establecerse una relación entre el consumo de HFCS y el incremento en la incidencia de obesidad (White et al., 2015), síndrome metabólico (Lim et al., 2010), hígado graso no alcohólico (Alwahsh & Gebhardt, 2017) y la resistencia a la insulina (Catena et al., 2003).

En EEUU, país donde se usa la HFCS en mayor medida como aditivo en bebidas azucaradas (White & Nicklas, 2016), el consumo de azúcar se ha incrementado 40 veces desde 1750 y más del 40% de los azúcares consumidos provienen de las bebidas azucaradas (Asgari-Taee et al., 2019). Merece la pena destacar el análisis de los datos de Faruque y col (Faruque et al., 2019) sobre la evolución del consumo de azúcares y HFCS en EEUU y su posible relación con la obesidad. Como puede verse en la Figura 3, el consumo total de azúcar y, en particular de HFCS, experimentó un aumento drástico en este país hasta comienzos del siglo XXI (Figura 3A), coincidiendo con un incremento muy acusado en la prevalencia de obesidad (Figura 3B). A partir del años 2000, el uso de HFCS y, en consecuencia el consumo total de azúcares, comenzó a reducirse (Figura 3A) al mismo tiempo que se produjo una ralentización en el crecimiento anual de los casos de obesidad (Figura 3B) (Faruque et al., 2019). Estos datos contribuyeron a afianzar la relación establecida anteriormente entre el consumo de azúcares y la obesidad. A pesar de que el consumo de azúcares en EEUU muestra una tendencia favorable a la baja, todavía su población consume más de 300% de la cantidad diaria recomendada de azúcares añadidos (Faruque et al., 2019).

Aunque el HFCS es un edulcorante ampliamente utilizado en las bebidas azucaradas en EEUU, no se usa de forma tan extensiva en otros países. De hecho, a nivel mundial el edulcorante predominante es la sacarosa (White & Nicklas, 2016).

El estancamiento en el consumo de azúcar se ha producido también a nivel mundial (ISO, 2019), posiblemente debido a las medidas tomadas en un intento de controlar las elevadas tasas de obesidad, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico (WHO, 2019). A pesar de todo, el consumo de azúcar y más concretamente el consumo de bebidas azucaradas, sigue superando los niveles recomendados por la OMS (WHO, 2015).

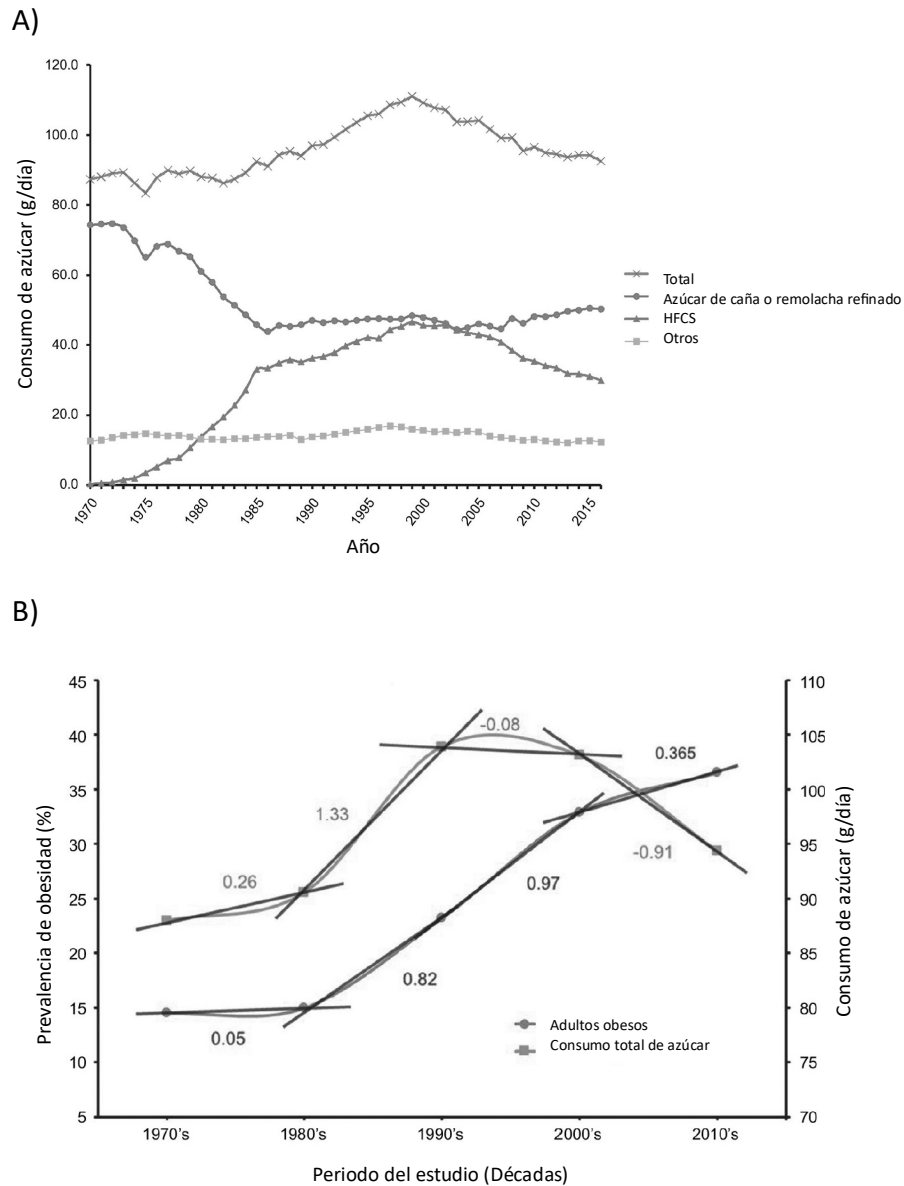


Figura 3: Evolución del consumo de azúcar y la incidencia de obesidad en EEUU A) Evolución del consumo de azúcar total y diferentes tipos de azúcares usados en la industria en EEUU desde 1970 hasta el 2015. B) Relación entre el consumo de azúcar y la prevalencia de obesidad en EEUU desde la década de 1970 hasta la de 2010. Modificado de Faruque S. *Pol J Food Nutr Sci.* 2019; 69(3): 219–233. (Faruque et al., 2019).

En la UE los datos también son alarmantes, ya que se estima que el consumo de azúcares añadidos se encuentra entre un 7,5 y un 17 % de la ingesta calórica. Respecto a los componentes de la dieta que más contribuyen a ese elevado consumo de azúcares, las bebidas azucaradas se encuentran en segunda posición después de los dulces. En adultos, el consumo de azúcares en forma de bebidas azucaradas supone el 12-31% del total de los azúcares añadidos consumidos y en niños este porcentaje alcanza el 20-37% (Azaïs-Braesco et al., 2017).

En España, los resultados obtenidos en el estudio ANIBES muestran cómo el consumo de azúcares añadidos supone un 7,3% de la ingesta calórica total. Además, este consumo varía con la edad, así los españoles entre 65-75 años presentan un menor consumo de azúcares

Introducción general

añadidos (5,1% del total de hidratos de carbono) que los adolescentes (10%) y niños (9,8%), como puede verse en la Figura 4A (Ruiz & Varela-Moreiras, 2017). Uno de los datos más preocupantes extraídos del estudio ANIBES es que uno de cada 4 españoles excede las recomendaciones de la OMS en cuanto al consumo diario máximo de azúcar (Ruiz et al., 2017). Además, la principal fuente de azúcares libres teniendo en cuenta todos los grupos de edad son las bebidas azucaradas (25,5%) seguido del azúcar (17,8%) y la bollería y pastelería (15,2%) (Ruiz et al., 2017). En la Figura 4B se muestra como este consumo varía en función de la edad (Ruiz & Varela-Moreiras, 2017).

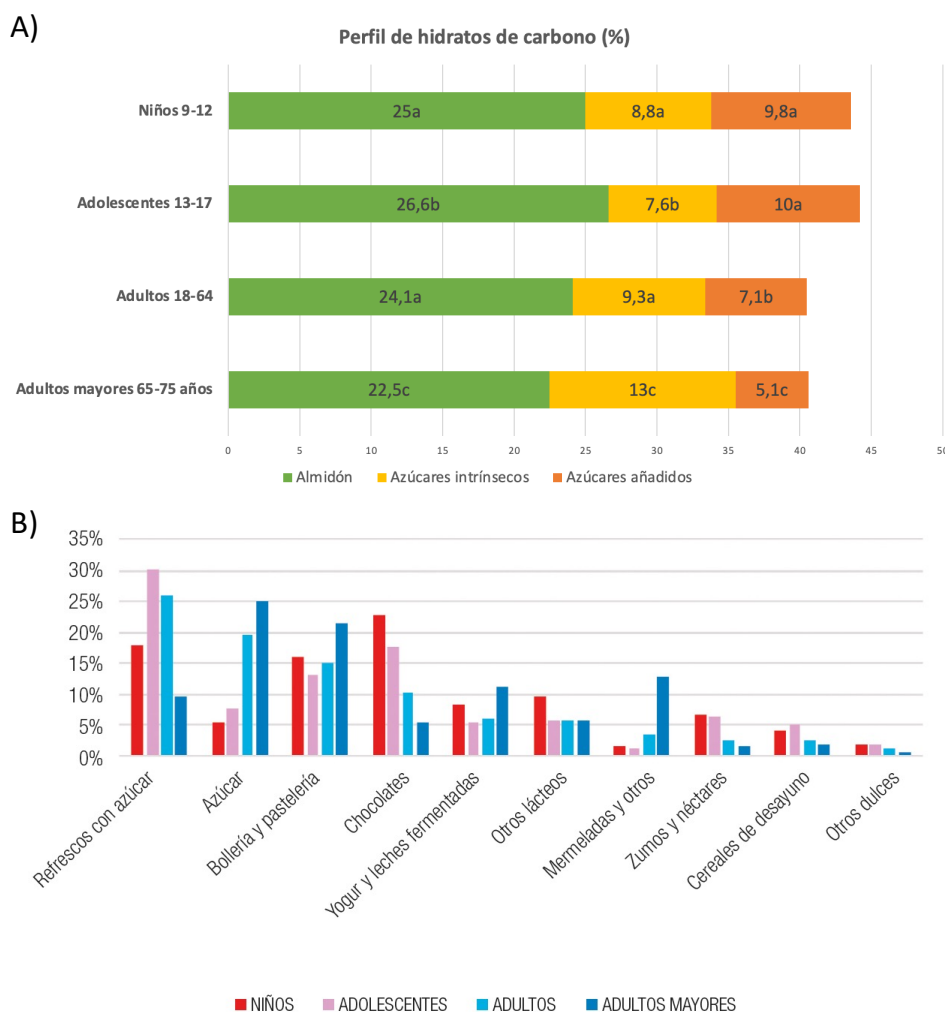


Figura 4: Consumo de hidratos de carbono en la población española de acuerdo con el estudio ANIBES. A) Perfil de hidratos de carbono por grupos de edad. B) Aporte de los principales subgrupos de alimentos a los azúcares añadidos según edad. Modificado de (Ruiz & Varela-Moreiras, 2017).

Con el objetivo de reducir la ingesta calórica, la industria alimentaria ha desarrollado un gran número de edulcorantes bajos en calorías. El término edulcorante bajo en calorías (en inglés *Low-Calorie Sweeteners* o LCS) engloba edulcorantes artificiales, edulcorantes no nutritivos, edulcorantes de alta intensidad, polioles o alcoholes de azúcar y edulcorantes no calóricos naturales (Andrade et al., 2021; Mooradian et al., 2017). Todos ellos presentan sabor

dulce, mejorando la palatabilidad de los alimentos, pero sin aportar o aportando pocas calorías (Hunter et al., 2019). Los efectos del consumo de estos edulcorantes sobre la salud son contradictorios en la bibliografía. Así hay autores que observan mejoras en el peso, el desarrollo de diabetes o enfermedad cardiovascular, pero en otros casos o no aparecen diferencias entre los efectos del consumo de edulcorantes bajos en calorías y el uso de azúcares, como la sacarosa, o incluso se observan efectos negativos (Andrade et al., 2021; Muli et al., 2021). Es más, la adición de algunos edulcorantes bajos en calorías a alimentos y bebidas se ha relacionado con un regusto desagradable posterior y la aparición intolerancia a la glucosa derivada de alteraciones en la microbiota intestinal (Mooradian et al., 2017). Por esa razón, en los últimos años han surgido nuevos edulcorantes conocidos como azúcares raros de origen natural como alternativa a otros edulcorantes utilizados actualmente. Ejemplos de estos nuevos edulcorantes son monosacáridos, como la D-Tagatosa o la D-alulosa, que aparecen en la naturaleza en pequeñas cantidades. Las ventajas de estos nuevos edulcorantes son su palatabilidad, ausencia de regusto desagradable y bajo aporte de calorías porque el cuerpo no los metaboliza o los metaboliza en menor grado que los azúcares naturales (Mooradian et al., 2017).

3. Absorción y metabolismo de la fructosa

A pesar de que la fructosa y la glucosa son isómeros estructurales, comparten la misma fórmula química y peso molecular, su metabolismo es diferente debido al cambio del grupo aldehído presente en la glucosa por una cetona en la estructura de la fructosa (Samuel, 2011). Mientras que la entrada de glucosa al enterocito está mediada por un cotransportador dependiente de sodio que requiere la participación de una bomba de sodio-potasio con gasto de ATP, la fructosa utiliza un sistema de transporte facilitado mediado por el transportador de glucosa (GLUT) tipo 5 (GLUT5), específico de este azúcar (Figura 5) (Hannou et al., 2018; Merino et al., 2019; Tappy & Lê, 2010). Se ha estudiado la evolución de la expresión de GLUT5 a lo largo de la vida y se ha observado que su expresión es mínima tras el nacimiento y va aumentando paulatinamente hasta la edad adulta. El papel clave de GLUT5 en la absorción intestinal de la fructosa se ha demostrado a través de experimentos con ratones en los que se ha observado como la eliminación de GLUT5 conduce a una situación de malabsorción de la fructosa y como consecuencia, esta es fermentada por las bacterias intestinales generando presión osmótica, lo que conlleva la dilatación del colon y el íleon junto con la producción de gases (Hannou et al., 2018). Además, se ha descrito que GLUT5 se sobreexpresa en el intestino cuando se consume fructosa de manera crónica, lo que conduce a una mayor absorción de este carbohidrato. Por tanto, el propio consumo prolongado de fructosa favorece su absorción. Todo esto sugiere una adaptación del organismo al consumo excesivo de fructosa (Havel, 2005; Hernández-Díazcouder et al., 2019). También, el consumo conjunto de fructosa y glucosa, hecho que tiene lugar cuando se ingieren bebidas azucaradas, estimula la absorción de la fructosa contribuyendo así a potenciar los efectos de la ingesta de fructosa (Havel, 2005).

Introducción general

Finalmente, la expresión de GLUT5 varía en función de la parte del intestino donde se determina, siendo mucho mayor en el duodeno que en yeyuno o íleon (Parada & Pettinelli, 2014). Por otro lado, se ha descrito que el factor de transcripción ChREBP (Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos, del inglés: *Carbohydrate response element binding protein*) juega un papel fundamental la expresión de GLUT5 (Taskinen et al., 2019). Así, se ha demostrado cómo dietas ricas en fructosa incrementan los niveles de proteína ChREBP provocando una inducción en la expresión de GLUT5 (Lee & Cha, 2018; Merino et al., 2019). Además, en estudios realizados en ratones que no expresaban ChREBP en el intestino, demostraron una disminuida expresión de GLUT5 y una mala absorción de fructosa tras una dieta rica en fructosa (M. Kim et al., 2017).

Tanto la fructosa como la glucosa acceden desde el interior del enterocito a la circulación portal principalmente a través del transportador GLUT2 (Figura 5). A continuación, la fructosa es rápidamente captada por el hígado que es el encargado de metabolizar entorno al 70% de la fructosa, y como consecuencia es el principal órgano responsable de su aclaramiento, de tal forma que sólo una pequeña cantidad de fructosa llega a la circulación sistémica (Merino et al., 2019; Taskinen et al., 2019). De hecho, se ha observado que, incluso en las personas consumidoras dietas ricas en fructosa o sacarosa, los niveles de fructosa en sangre sistémica tras la ingesta son muy inferiores (<0,5 mM) que a los niveles de glucosa en ayunas (5,5 mM) (Merino et al., 2019). Este hecho es debido a que el hígado solamente metaboliza en torno a 15-30% de la glucosa ingerida, dado que su distribución en otros tejidos es más amplia que la de la fructosa (Kolderup & Svihus, 2015).

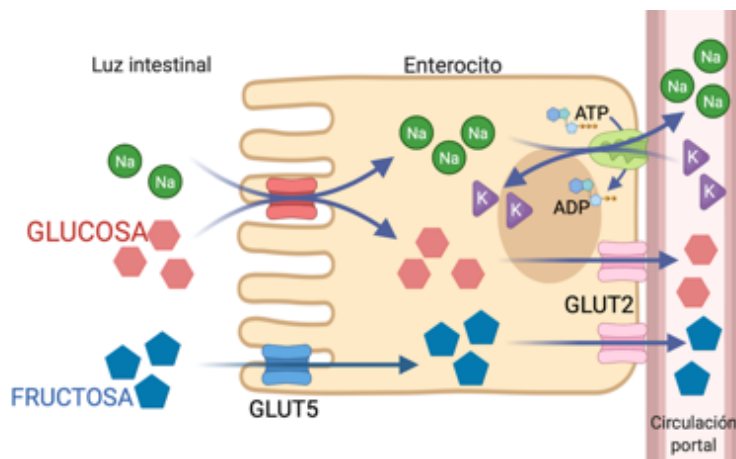


Figura 5: Absorción de la glucosa y la fructosa en el intestino. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

En el hígado es donde difiere más el metabolismo de ambos carbohidratos y es el factor clave en las alteraciones metabólicas derivadas del consumo de fructosa. Como puede verse en la Figura 6, tanto la fructosa como la glucosa son captadas al interior del hepatocito mediante el transportador GLUT2 (Hannou et al., 2018; Tappy & Lê, 2010; White & Nicklas, 2016). Además, se ha descrito que la fructosa puede ser también captada por GLUT8, pudiendo estar este hecho relacionado con el desarrollo de alteraciones metabólicas derivadas del consumo de fructosa (Debosch et al., 2014). Una vez en el hígado, la glucosa entra en la

glucólisis. En su primera reacción, sufre una fosforilación mediada por la glucoquinasa (GK) o hexoquinasa IV y se transforma posteriormente en fructosa 1,6-bisfosfato mediante la fosfofructoquinasa-1, siendo estas dos enzimas las principales reguladoras de la ruta. A continuación, la fructosa 1,6-bisfosfato experimenta varias reacciones dando lugar como producto final piruvato (Nelson et al., 2008; Tappy & Lê, 2010) (Figura 6). La K_m de la GK para la fructosa es mucho mayor que para la glucosa, lo que hace que su metabolismo sea mínimo por esta vía (Johnson et al., 2009). De hecho, la principal enzima encargada del metabolismo hepático de la fructosa es la fructoquinasa (FK) o cetoheixoquinasa (KHK) que la fosforila rápidamente formando fructosa-1-fosfato a través de un proceso denominado fructólisis (Figura 6). El gen de la KHK codifica por dos isoformas, la KHK-A y la KHK-C. Esta última se expresa en mayor medida en el hígado, los riñones y el duodeno y presenta una K_m baja por la fructosa ($< 1\text{mM}$). En cambio, la KHK-A se expresa preferentemente en el tejido adiposo y el músculo y fosforila la fructosa con una eficiencia mucho menor ($K_m = 8\text{ mM}$) (Merino et al., 2019). Posteriormente, se produce la escisión de la fructosa 1-fosfato en dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído catalizado por la aldolasa B. Ambas triosas se pueden transformar en gliceraldehído-3-fosfato, que se incorpora a la glucólisis saltándose los puntos clave de regulación catalizados por la glucoquinasa y la fosfofructoquinasa-1 (Figura 6) (Tappy & Lê, 2010).

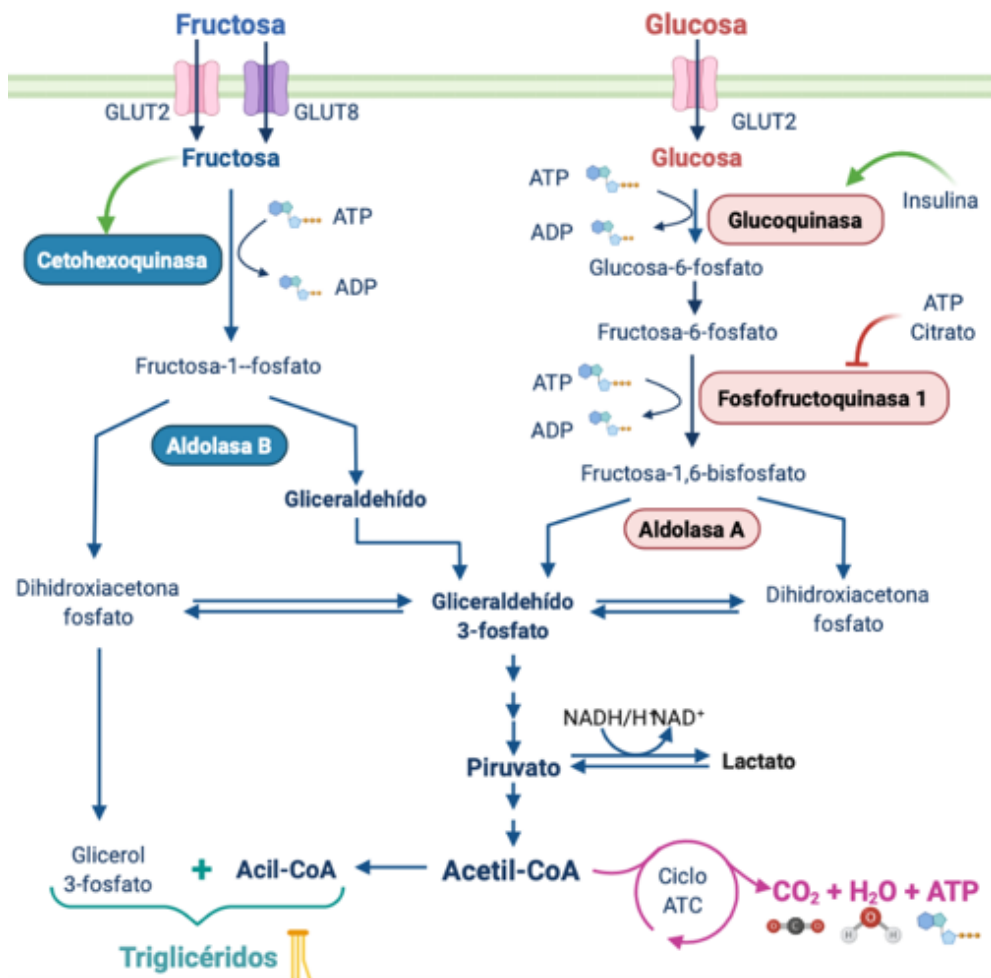


Figura 6: Metabolismo hepático de la glucosa y la fructosa. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com). Ciclo ATC: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Introducción general

La GK, encargada de transformar la glucosa en glucosa-6-fostato, está regulada por los niveles de insulina (Nelson et al., 2008). De esta manera, cuando los niveles de glucosa en sangre aumentan, el páncreas libera insulina y esta activa la expresión de la GK (Iynedjian, 1993; Tappy & Lê, 2010). Por otro lado, la fosfofructoquinasa-1 presenta una estricta regulación por retroalimentación negativa mediada por adenosín trifostato (ATP) y citrato, (Samuel, 2011; Tappy & Lê, 2010). De esta manera, el metabolismo de la glucosa está rigurosamente regulado por el estado metabólico y energético del hígado y por los productos de la glucólisis (Kolderup & Svihus, 2015). En cambio, la KHK no presenta ninguno de estos mecanismos de control. Así, el consumo de fructosa conduce a una producción descontrolada de triosas fosfato sin tener en cuenta el estado metabólico de la célula (Hannou et al., 2018; Tappy, 2018). Además, es importante resaltar que el exceso de triosas-fosfato generadas como consecuencia del metabolismo de la fructosa, además de incorporarse a la glucolisis, presenta otros destinos como pueden ser la formación de glucosa, lactato y ácidos grasos (Figura 6) (Tappy, 2018). Finalmente, se ha demostrado que la fructosa es capaz de estimular su propia absorción y metabolismo, ya que la fructosa activa la expresión de GLUT5, la KHK (Alegret & Laguna, 2012) y la aldolasa B (Hallfrisch, 1990; Hernández-Díazcouder et al., 2019). Por ello, a mayor consumo de fructosa, sus efectos se verán potenciados.

4. Patologías asociadas al consumo de fructosa: obesidad y síndrome metabólico

Numerosos trabajos científicos, tanto en modelos animales de experimentación como en humanos, han puesto de manifiesto la existencia de una estrecha relación entre el consumo de fructosa y el desarrollo del cuadro típico de alteraciones que conllevan a la aparición de síndrome metabólico, entre ellas, la obesidad, la resistencia a la insulina, la hipertensión, la hiperuricemia, la esteatosis hepática, la dislipemia y el estrés oxidativo (Ferder et al., 2010; Herman & Birnbaum, 2021; Lim et al., 2010). A continuación, se detallan los mecanismos descritos en la bibliografía a través de los cuales la fructosa genera dichos efectos.

4.1. Efectos de la fructosa sobre la ingesta y la respuesta a leptina

Una de las propiedades más llamativas de la fructosa es su elevado poder edulcorante. En efecto, utilizando la sacarosa como azúcar de referencia al que se le asigna un 100% de poder edulcorante, se ha estimado que la fructosa tiene un poder edulcorante de 117% en solución acuosa (10% p/v) frente al 65% de la glucosa (White & Nicklas, 2016). Como consecuencia, la adición de fructosa a los alimentos aumenta la palatabilidad de los mismos y reduce las señales de saciedad fomentando su ingesta independientemente de las necesidades energéticas del organismo (Ferder et al., 2010; Merino et al., 2019). Es más, en una revisión realizada por Avena y col. concluyen que existen evidencias que apoyan la teoría de que, en algunas circunstancias, el acceso intermitente al azúcar puede conducir a cambios neuroquímicos y de comportamiento que se asemejan a los efectos de una droga de abuso.

Según estos autores, el acceso intermitente a azúcar y comida en ratas es capaz de producir una “dependencia”(Avena et al., 2008).

Unido a esto se ha demostrado que la fructosa, comparado con la glucosa, provoca una menor inhibición de la secreción de grelina (hormona estimulante del apetito) y una menor estimulación de la liberación de leptina lo que sugiere que la fructosa es menos eficiente que la glucosa en el control de la ingesta de comida (Merino et al., 2019; Tappy & Lê, 2010). La leptina es una adipoquina producida principalmente en el tejido adiposo que presenta un efecto endocrino (Francisco et al., 2018; Havel, 2005). La ingesta de alimentos con glucosa conduce a la liberación de insulina, la cual activa la producción de leptina en el tejido adiposo. Esta actúa sobre el hipotálamo generando un efecto anorexigénico que suprime la sensación de apetito (Fruhwrth et al., 2018; Havel, 2005; Merino et al., 2019). En cambio, tras el consumo de fructosa, los niveles de glucosa aumentan de forma tenue, dado que el índice glucémico de la fructosa es aproximadamente 5 veces inferior al de la glucosa. En consecuencia, la ingesta de fructosa provoca una menor secreción de insulina y de leptina que la glucosa (Havel, 2005; Merino et al., 2019). Todo ello sugiere que la fructosa presenta un poder saciante menor al de la glucosa y como consecuencia conduciría a una mayor ingesta calórica asociado al desarrollo de obesidad (Merino et al., 2019; Moran, 2009). Sorprendentemente, se ha descrito que cuando el consumo de fructosa, y no el de glucosa, es prolongado se produce un proceso de resistencia a leptina tanto en animales de experimentación (Yerlikaya et al., 2017) como en humanos (Dekker et al., 2010) que conlleva una hiperleptinemia probablemente debida a la hipertrofia del tejido adiposo inducida por el consumo de fructosa (Dekker et al., 2010). Uno de los factores que contribuyen a la resistencia a la leptina es la hiperinsulinemia y resistencia a la insulina generadas por el consumo de fructosa (Lustig, 2010; Mortera et al., 2019). Todos estos trastornos metabólicos contribuyen a una desregulación del apetito a nivel central aumentando la ingesta de comida (Yerlikaya et al., 2017) y numerosas alteraciones periféricas que se asocian a la obesidad, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico (Figura 7) (Mechanick et al., 2018; Mortera et al., 2019; Tappy & Lê, 2010).

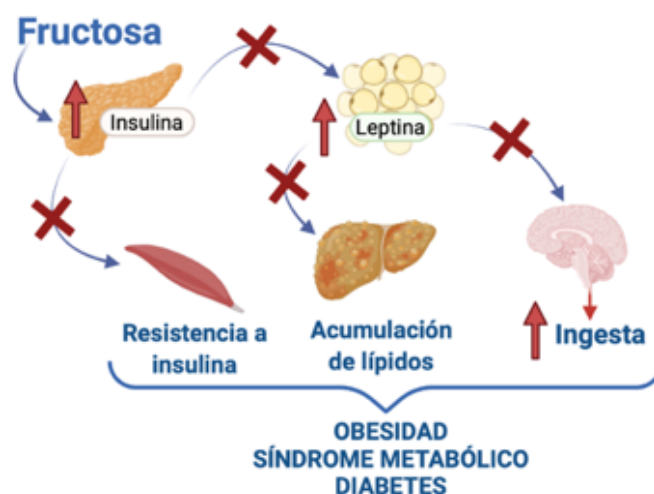


Figura 7: Efecto de la ingesta crónica de fructosa en la respuesta a leptina. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

4.2. Efectos de la fructosa sobre la respuesta a insulina

La insulina es una hormona secretada por las células β del páncreas en respuesta al incremento de glucosa en la sangre y su función es regular el metabolismo lipídico y glucídico. En concreto, a través del receptor GLUT4, favorece la captación de glucosa por el músculo y tejido adiposo. Además, en el hígado inhibe la gluconeogénesis y activa la lipogénesis (Czech, 2017; Nelson et al., 2008).

Aunque la fructosa no estimula a corto plazo la secreción de insulina, sorprendentemente, el consumo prolongado de fructosa genera en animales de experimentación hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (Catena et al., 2003; Ferder et al., 2010; Hannou et al., 2018; Hwang et al., 1987). Los mecanismos concretos por los que se produce esta situación de resistencia a insulina todavía no están completamente establecidos (Hannou et al., 2018). En primer lugar, la hipertrigliceridemia y la esteatosis hepática generada por el consumo de fructosa podría ser uno de los factores responsables de la resistencia a la insulina (Hannou et al., 2018; Stanhope & Havel, 2008). De hecho, se ha demostrado que la fructosa activa la síntesis *de novo* de lípidos generando un aumento de los triglicéridos en plasma y en el hígado (Ferder et al., 2010; Hannou et al., 2018). Aunque la posibilidad de que la acumulación hepática de lípidos *per se* produzca resistencia a insulina sigue siendo controvertida (Hannou et al., 2018), se ha propuesto que una elevación de lípidos intracelulares inducida por la fructosa, favorecería una mayor formación y acumulación de diacilglicerol (DAG) que, a su vez puede conducir a la activación de la proteína quinasa C (PKC), lo que desencadenaría un debilitamiento en la cascada de señalización de la insulina, tanto en el hígado como en el músculo (Hannou et al., 2018; Morino et al., 2006). Acorde con esta hipótesis, diversos estudios han demostrado que la PKC tiene la capacidad de reducir la fosforilación del receptor de insulina y como consecuencia generar un proceso de resistencia a la misma (Morino et al., 2006; Stanhope & Havel, 2008). Otros factores que estarían involucrados en la resistencia a la insulina generada por el consumo de fructosa son la hiperuricemia, la resistencia a leptina, el estrés oxidativo y los elevados niveles de ácidos grasos libres (Johnson et al., 2009).

4.3. Efectos de la fructosa sobre el metabolismo lipídico

Como se ha descrito anteriormente, la fructosa presenta un metabolismo que estimula la lipogénesis, ya que se salta dos puntos de regulación de la glucólisis dando lugar a la producción descontrolada de triosas fosfato que serán utilizadas en la síntesis de ácidos grasos y posteriormente, triglicéridos (Figura 6) (Tappy & Lê, 2010). Además, la fructosa es capaz de activar en el hígado la expresión de ChREBP y de la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides tipo 1C (SREBP-1c, del inglés: *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*) (Lim et al., 2010). Ambos son factores de transcripción que presentan como diana genes relacionados con la síntesis de lípidos *de novo* (Lee & Cha, 2018; Tappy & Lê, 2010; Taskinen et al., 2019). Asimismo, el malonil-CoA, intermediario de la síntesis *de novo* de los lípidos, es capaz de inhibir a la carnitina palmitoil transferasa 1A (CPT1A), enzima necesaria para la translocación de los ácidos grasos al interior de la mitocondria, y como consecuencia se disminuye su

oxidación (Lim et al., 2010). Es más, la disminución en la expresión de receptor activado por proliferadores de peroxisomal tipo alfa (PPAR α ; del inglés, *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) que se produce tras la ingesta de una dieta rica en fructosa contribuye a una menor oxidación de los ácidos grasos (Basciano et al., 2005).

El aumento en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y su reducido catabolismo favorece que los triglicéridos se liberen al torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés: *Very-Low Density Lipoproteins*) generando hipertrigliceridemia (Basciano et al., 2005). La aumentada síntesis de las VLDL que se observa tras la ingesta de fructosa se debe también a un aumento en la expresión de la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTTP; del inglés: *microsomal triglyceride transfer protein*), encargada del ensamblaje de las VLDL (Basciano et al., 2005). Estos efectos de la fructosa sobre los lípidos plasmáticos y lipoproteínas se han visto tanto en estudios en animales (Maithilikarpagaselvi et al., 2016) como en humanos (Low et al., 2018; Taskinen et al., 2019). Estos lípidos son posteriormente captados por tejidos extrahepáticos, como el tejido adiposo y el músculo. En el tejido adiposo, se ha visto que las VLDL fomentan la adipogénesis aumentándose así la masa de grasa visceral (Hernández-Díazcouder et al., 2019). La captación de los lípidos por parte del músculo favorece el depósito de lípidos intramiocelulares (Lim et al., 2010; Stanhope & Havel, 2008; Tappy & Lê, 2010). Ambos procesos están relacionados con el desarrollo de resistencia a la insulina en tejidos extrahepáticos (Johnson et al., 2009).

Además, se ha descrito que la fructosa también altera los niveles de otras lipoproteínas. Así, en individuos sanos, el consumo de fructosa, y no el de glucosa o almidón, conduce a un aumento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL; del inglés: *Low Density Lipoproteins*) y del colesterol total postprandial (Stanhope et al., 2011; Swanson et al., 1992). Esto puede deberse a que las alteraciones en el tejido adiposo generadas por la fructosa conllevarían una alterada función de este tejido para reconocer a las LDL y como consecuencia, se reduce su aclaramiento del torrente sanguíneo (Y. H. Zhang et al., 2013).

Todos estos cambios en los lípidos plasmáticos mediados por la ingesta de fructosa generan una alteración generalizada del metabolismo de las lipoproteínas que asociaría el consumo de fructosa con el desarrollo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (Fried & Rao, 2003; Lim et al., 2010).

Por otro lado, el exceso de lípidos generados en el hígado debidos al consumo de fructosa, asociados a su menor oxidación y a la saturación de su exportación en forma de VLDL, producen una acumulación de lípidos en el hígado que puede desembocar en esteatosis hepática (Basciano et al., 2005; Lim et al., 2010). La acumulación de lípidos en el hígado es uno de los mecanismos involucrados en la aparición de resistencia a la insulina asociada a dietas ricas en fructosa (Stanhope & Havel, 2008).

Finalmente, la fructosa, podría inducir una disfunción de los adipocitos, que junto a una situación de resistencia a insulina, serían los responsables de la disminución observada en la síntesis de adiponectina por este tejido (Khitan & Kim, 2013). La adiponectina es una adipoquina generada en el tejido adiposo cuya función es estimular la oxidación de ácidos grasos, disminuir la trigliceridemia y mejorar la sensibilidad a insulina. Además, evita la formación de la placa de ateroma por inhibición de la adhesión celular (Palomer et al., 2005). Disminuciones en sangre de la adiponectina se han asociado a obesidad, síndrome metabólico

y resistencia a insulina (Palomer et al., 2005). De hecho, la administración de agonistas PPAR γ a animales que consumieron dietas ricas en fructosa consiguió aumentar los niveles de adiponectina y mejorar parámetros metabólicos asociados al síndrome metabólico frente a las que solo consumieron fructosa (Atanasovska et al., 2009; Sharabi et al., 2007).

4.4. Efectos de la fructosa sobre la producción de FGF21

A diferencia de otras proteínas de la familia de los factores de crecimiento que actúan principalmente en la matriz extracelular, el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21; del inglés: *Fibroblast Growth Factor 21*), puede ir al torrente circulatorio y ejercer una función hormonal (Owen et al., 2015). FGF21 está altamente conservado entre especies y se ha descrito su expresión en el hígado, tejido adiposo y páncreas, aunque es el hígado el principal órgano encargado de mantener sus niveles en plasma (Fisher & Maratos-Flier, 2016; Owen et al., 2015). En el hígado, la expresión de FGF21 se activa en situaciones de ayuno o cetosis por acción del receptor activado por proliferadores peroxisomales tipo alfa (PPAR α ; del inglés: *peroxisome proliferator activated receptor α*), ya que este factor de transcripción activa su promotor (Tezze et al., 2019). De hecho, se ha observado en humanos sanos que la administración de fibratos, fármacos activadores de PPAR α , aumentan los niveles en sangre de FGF21 de la misma manera que el ayuno (Gälman et al., 2008). Su producción también se ve aumentada cuando existe una deficiencia de proteínas en la dieta, pero en este caso parece que su activación también está mediada por ATF4 (del inglés: *activating transcription factor 4*). (Owen et al., 2015). Numerosos estudios han relacionado el consumo de dietas ricas en hidratos de carbono con aumentos en la producción hepática de FGF21, a través de la activación de ChREBP (Potthoff, 2017). Este mecanismo se ha puesto de manifiesto en estudios realizados en ratones que no expresaban ChREBP, en los cuales una dieta rica en sacarosa no condujo al incremento en FGF21 que sí mostraban los ratones *wild-type* (von Holstein-Rathlou et al., 2016). Estos mismos efectos se observaron cuando se utilizó una dieta con un 60% de fructosa (Fisher et al., 2017). En humanos sanos, también el consumo de fructosa disuelta en agua produjo un aumento de los niveles de FGF21 en plasma directamente proporcional a la dosis de fructosa consumida (Migdal et al., 2018). Todos estos resultados llevaron a plantearse el FGF21 como un factor clave en la regulación del metabolismo.

FGF21 actúa de manera autocrina y endocrina sobre diversos tejidos como el hígado, el tejido adiposo blanco y marrón, el músculo y el cerebro (Itoh, 2014). Su acción está mediada por los receptores de FGF (FGFR) y la intervención de un co-receptor conocido como β -klotho. Es más, la presencia de β -klotho es esencial para que FGF21 medie su acción, ya que su bloqueo inhibe los efectos de FGF21 (Cuevas-Ramos et al., 2009). La cascada de señalización en el hígado parece activar la vía de PI3K /AKT, mTOR (del inglés: *mammalian target of rapamycin*) e IGF1 (Tezze et al., 2019) y en los adipocitos vía mTOR (Minard et al., 2016). Entre los múltiples efectos descritos de FGF21 en el organismo encaminados a mejorar el perfil metabólico, se incluyen la pérdida de peso, la disminución de la glucemia y la trigliceridemia, la mejora de la esteatosis hepática y el aumento de la sensibilidad a la insulina, el gasto energético y la oxidación de los ácidos grasos (Fisher & Maratos-Flier, 2016; Kharitononkov &

Shanafelt, 2009; Kim & Lee, 2014; Owen et al., 2015). Además, en el tejido adiposo el FGF21 aumenta la producción de adiponectina y el pardeamiento de adipocitos (Fisher et al., 2012; Itoh, 2014). En el cerebro, varios estudios sugieren que el FGF21 produce aversión por el consumo de azúcares y disminuye su ingesta en animales de experimentación (Stevanovic et al., 2020; von Holstein-Rathlou et al., 2016) y en humanos (Søberg et al., 2017). De hecho, el rechazo al consumo de azúcares parece ser específico de la fructosa y está mediado por la expresión de β -klotho a nivel central (Stevanovic et al., 2020).

Por todos los efectos previamente descritos, la administración de FGF21 se ha propuesto como una potencial diana farmacológica para el tratamiento de la obesidad, la enfermedad cardiovascular y la diabetes (Kharitonov & Shanafelt, 2008, 2009). Aunque esta hipótesis todavía es objeto de controversia, ya que se ha visto que las personas obesas, con síndrome metabólico (Zhang et al., 2008) o diabetes (Chen et al., 2008) presentan elevados niveles de FGF21 en plasma sugiriendo una situación de resistencia a FGF21. Además, tanto en población asiática (Li et al., 2010) como caucásica (Dushay et al., 2010) con hígado graso no alcohólico se han observado incrementos en los niveles plasmáticos de FGF21 y una mayor expresión hepática del gen que se correlacionan tanto con el índice de masa corporal como con la trigliceridemia. Curiosamente, la administración de fructosa líquida a personas obesas condujo a incrementos mucho mayores de FGF21 que la administración de glucosa (Dushay et al., 2015). Los mecanismos que subyacen a esta resistencia a FGF21 todavía no están plenamente establecidos. Así, se ha descrito en estudios realizados en animales de experimentación que esta resistencia podría deberse a alteraciones en la transducción de la señal de FGF21 o a la disminución en la expresión de los FGFR (Fisher et al., 2010). Finalmente, otros autores proponen que una regulación a nivel epigenética de microARN (miARN) podría explicar la resistencia a FGF21. Así, en ratones obesos se ha observado un aumento en la expresión del miR-34a, cuyos genes diana son los FGFR y β -klotho, tanto en el hígado como en tejido adiposo, lo cual reduce su traducción a proteínas atenuando la señal metabólica de FGF21 (Fu & Kemper, 2016; Fu et al., 2014). Otro miARN que actúa sobre FGFR1 es miR-22, bloqueándolo de manera directa. Además, este miARN disminuye la expresión de FGF21 de manera indirecta, ya que presenta como dianas el PPAR α y PGC1 α , factores de transcripción que controlan la expresión de FGF21. De hecho, la inhibición de miR-22 reduce la esteatosis hepática de ratones tratados con dieta rica en grasa gracias a la activación de FGF21 (Hu et al., 2020).

4.5. Efecto de la fructosa en la producción de ácido úrico

El ácido úrico se genera en el hígado como un producto secundario del metabolismo de la fructosa. Como puede verse en la Figura 8, la fructoquinasa (o cetohecoquinasa) fosforila la fructosa a fructosa 1-P a expensas de ATP. Esta enzima no está sometida a regulación por retroinhibición, de forma que cuando hay una elevada ingesta de fructosa, el ATP requerido para su acción se agota dando lugar a un aumento de ADP que se transforma en adenosina monofosfato (AMP). A continuación, los disminuidos niveles de ATP inducen la activación de la AMP desaminasa que transforma el AMP por desaminación en inosina monofosfato (IMP). Posteriormente, el IMP es transformado por la enzima 5' nucleotidasa en inosina, la cual se

Introducción general

convierte en hipoxantina, por acción de la purina nucleósido fosforilasa. Por último, la enzima xantina oxidasa, a través de 2 reacciones consecutivas transforma la hipoxantina en ácido úrico (Lanaspa et al., 2011; Mai & Yan, 2019). Numerosos estudios en animales de experimentación (Lanaspa et al., 2012a) y en humanos (Cox et al., 2012) han demostrado cómo la ingesta de fructosa, y no la de glucosa, provoca incrementos en la uricemia que además están asociados al desarrollo de síndrome metabólico y obesidad (Johnson et al., 2009). De hecho, la administración de alopurinol, un inhibidor de la xantina oxidasa, en ratas tratadas con una dieta sólida con un 60% de fructosa condujo a la reducción de los niveles de ácido úrico en plasma y a la mejora de otros parámetros asociados al síndrome metabólico, como los niveles de insulina y la trigliceridemia (Nakagawa et al., 2006). Además, la realización de un test de tolerancia a la fructosa condujo, tanto en individuos sanos como en diabéticos al aumento de la uricemia a los 60 y 120 minutos (Al-Ozairi et al., 2020).

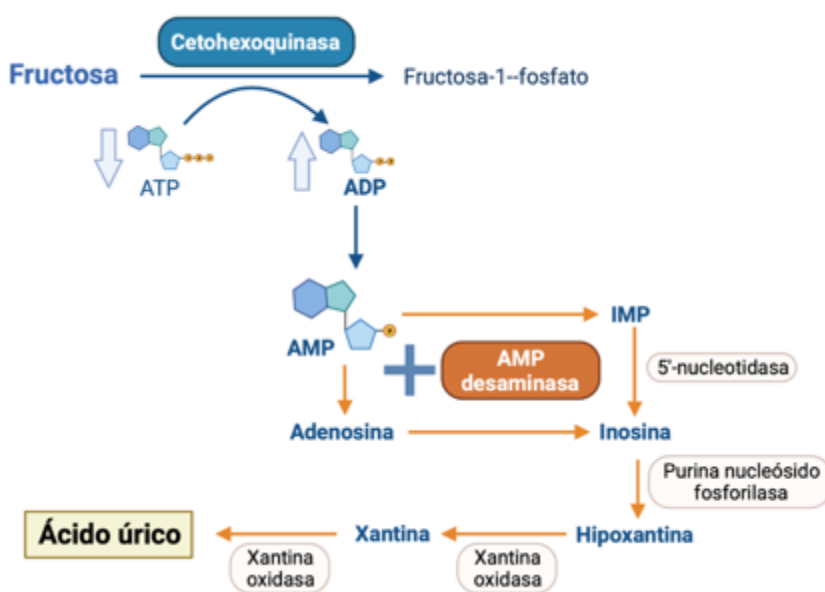


Figura 8: Proceso de síntesis de ácido úrico. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

Los mecanismos que relacionan los elevados niveles de ácido úrico con el desarrollo de obesidad, resistencia a la insulina, hipertensión y síndrome metabólico son numerosos. En primer lugar, diversos autores sugieren que el ácido úrico, aunque sea un potente antioxidante en el medio extracelular, en el medio intracelular se puede comportar como una sustancia prooxidante favoreciendo la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa (NOX) produciendo daño celular e inflamación (Johnson et al., 2009; Lanaspa et al., 2011; Mai & Yan, 2019). Además, en cultivos celulares de hepatocitos tratados con fructosa se ha observado que el ácido úrico favorece la acumulación de lípidos debido a un aumento del estrés oxidativo en la mitocondria por la translocación de la NOX a dicho orgánulo (Lanaspa et al., 2012b). Por otro lado, se ha demostrado que el ácido úrico provoca una disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) generando una situación de disfunción endotelial (Choi et al., 2014; Johnson et al., 2009). Otro mecanismo

que relaciona el ácido úrico con la hipertensión es su implicación en la activación del sistema renina-angiotensina (Johnson et al., 2009; Kanbay et al., 2016).

Finalmente, se ha visto en cultivos celulares de hepatocitos que el ácido úrico puede activar la expresión de la KHK mediada por ChREBP (Lanaspa et al., 2012a), favoreciendo el metabolismo de la fructosa y potenciando así sus efectos. Es más, el ácido úrico también favorece la síntesis endógena de fructosa a través de la vía del poliol por inducción de la expresión de la aldosa reductasa (Sanchez-Lozada et al., 2019).

4.6. Efectos de la fructosa sobre la tensión arterial

En paralelo al aumento en la incidencia de obesidad, diabetes y síndrome metabólico se ha observado un incremento en los casos de hipertensión. Esta se diagnostica en humanos cuando la presión arterial sistólica es ≥ 140 mmHg o la presión arterial diastólica es ≥ 90 mmHg (Burnier & Egan, 2019). Hay un amplio número de estudios en animales de experimentación y algunos trabajos en humanos que relacionan el consumo de fructosa y el desarrollo de hipertensión (Ferder et al., 2010; Hwang et al., 1987). Entre ellos, destaca un metaanálisis realizado en humanos donde se encontró una relación clara entre la incidencia de hipertensión y el consumo de bebidas azucaradas con fructosa, pero no con otras fuentes de fructosa como las frutas, lácteos o zumos de fruta (Q. Liu et al., 2019).

Se han propuesto múltiples mecanismos para explicar el desarrollo de hipertensión asociado al consumo de fructosa. El primero de ellos radica en la hiperuricemia generada por el consumo de fructosa (Lanaspa et al., 2011) que reduce la concentración de NO apareciendo vasoconstricción (Eren et al., 2019; Ferder et al., 2010; Johnson et al., 2007). Otros mecanismos propuestos son una alteración en la reactividad vascular y el estrés oxidativo generados por la ingesta de fructosa (Ferder et al., 2010). Por otro lado, en los últimos años también se ha descrito que la fructosa genera hipertensión inducida por sodio debido a que la fructosa es capaz de favorecer la absorción de sodio en el intestino y su reabsorción renal (Eren et al., 2019; Soleimani, 2011). El transportador implicado en la absorción intestinal y reabsorción renal de sodio es PAT1 (del inglés: *Putative Anion Transporter 1*) en coordinación con el intercambiador de Na^+/H^+ NHE3 (del inglés: *Sodium Hydrogen Exchanger 3*) (Soleimani, 2011). La fructosa es capaz de aumentar la expresión de ambos transportadores, al igual que de GLUT5, en ambos tejidos generando un aumento en los niveles de sodio en plasma que conducirían al desarrollo de hipertensión (Eren et al., 2019; Singh et al., 2008; Soleimani, 2011). De hecho, estudios realizados en ratones que no expresan PAT1 no desarrollaron hipertensión asociada al consumo de fructosa (Singh et al., 2008). Estos resultados sugieren que la asociación de dietas ricas en fructosa y ricas en sal, características de la dieta occidental, podrían agravar aun más los efectos perjudiciales sobre el metabolismo asociados al consumo de fructosa.

Otro mecanismo implicado puede ser la activación del sistema renina-angiotensina por la fructosa (Komnenov et al., 2019; Lanaspa et al., 2011). Tran y col. (Tran et al., 2009a) observaron que ratones tratados con una dieta con un 60% de fructosa durante 6 semanas presentaban incrementos en los niveles de angiotensina II en plasma debidos a una mayor producción de endotelina-1 en el endotelio asociada a la resistencia a insulina generada por el

Introducción general

consumo de fructosa (Tran et al., 2009a). La angiotensina II presenta varias funciones que generarían hipertensión, ya que en el riñón favorece la reabsorción de sodio (Kommenov et al., 2019) y provoca daño endotelial por daño oxidativo, ya que activa la NADPH oxidasa (Klein & Kiat, 2015).

Por último, la hiperinsulinemia asociada al consumo de fructosa genera un estado de activación crónica del sistema nervioso simpático que produce un aumento en los niveles de catecolaminas. Estas se han asociado a daño vascular y vasoconstricción que conducirían al desarrollo de hipertensión (Klein & Kiat, 2015; Tran et al., 2009b).

4.7. Efectos de la fructosa sobre el estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre las sustancias oxidantes y su eliminación por los mecanismos antioxidantes del organismo, a favor de las primeras (Reuter et al., 2010). Los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS; del inglés: *Reactive Oxygen Species*) y nitrógeno (RNS; del inglés: *Reactive Nitrogen Species*) se generan en la célula de manera normal por agentes externos (por ejemplo, por fármacos y la radiación) o internos (como la cadena respiratoria, la actividad xantina oxidasa y la fagocitosis) y son capaces de producir daño celular a nivel de lípidos, proteínas, hidratos de carbono y de los ácidos nucleicos (Ramos Ibarra et al., 2006; Yaribeygi et al., 2019). Estas sustancias oxidantes están estrictamente controladas por los mecanismos antioxidantes presentes en el organismo. Los antioxidantes se dividen en antioxidantes no enzimáticos, como la vitamina E y C, el β -caroteno o el glutatión, y los antioxidantes enzimáticos, que engloban a la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT). Su función es transformar los radicales libres, ROS y RNS en sustancias menos reactivas o restringir su localización en compartimentos celulares donde se minimice el daño oxidativo (González-Torres et al., 2000). Desequilibrios en este sistema se han visto relacionados con el desarrollo de diabetes (West, 2000), obesidad (Furukawa et al., 2004) y síndrome metabólico (Hopps et al., 2010). De hecho, estudios realizados en animales de experimentación han mostrado cómo la dieta juega un papel fundamental en el desarrollo de una situación de estrés oxidativo. Así, ratones sometidos a una dieta rica en grasa y azúcares refinados mostraron un aumento en la expresión de la NADPH oxidasa (principal enzima implicada en la producción de ROS) y una menor actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx en el riñón y la aorta (Roberts et al., 2006).

La relación entre el consumo de fructosa y el desarrollo de estrés oxidativo sigue siendo un tema de interés entre la comunidad científica, existiendo cada vez un mayor número de estudios que intentan esclarecer los mecanismos que relacionan ambos hechos. Múltiples estudios en animales de experimentación han asociado el consumo de fructosa y el desequilibrio entre las sustancias oxidantes y la maquinaria antioxidante del organismo (Fariña et al., 2013; Levi & Werman, 1998). De hecho, continúa el debate entre si es la fructosa *per se* la que produce el estrés oxidativo o si son las alteraciones metabólicas derivadas de su consumo las causantes (Bernardes et al., 2017; Hernández-Díazcoudet et al., 2019). Además, como ya se ha explicado anteriormente, la fructosa produce hiperuricemia y el aumento en la síntesis de angiotensina II que están relacionadas con una aumentada expresión de la NADPH

oxidasa, lo que favorecería una mayor generación de radicales libres (Klein & Kiat, 2015; Lanaspá et al., 2011). De hecho, ratas alimentadas con un 60% de fructosa durante 42 días presentaron una situación de hipertrofia cardíaca y el incremento del estrés oxidativo en el corazón dependiente de una mayor actividad de la NADPH oxidasa (Delbosc et al., 2005).

Por otro lado, se sabe que la fructosa es mucho más reactiva que la glucosa en la formación de productos finales de glucosilación avanzada (AGEs, del inglés: *Advanced glycation endproducts*) (Schalkwijk et al., 2004), y en concreto, se ha asociado a una mayor producción de metilglioxal (Tappy & Lê, 2010; Taskinen et al., 2019). Los AGEs se han relacionado con la progresión de enfermedades cardiovasculares, debido a que favorecen la formación de LDL oxidadas, las cuales son captadas por las células de la pared vascular convirtiéndose así en células espumosas y favoreciendo la progresión de la placa de ateroma (Vlassara & Palace, 2002). Además, la interacción de los AGEs con sus receptores (RAGE), conducen a la formación de ROS por la acción de la NADPH oxidasa y la activación de procesos inflamatorios en la célula mediados por el Factor Nuclear *kappa* B (NF- κ B, del inglés: *nuclear factor kappa B*) (Goldin et al., 2006; Singh et al., 2001). Lui y col. (Liu et al., 2010) confirmaron esta hipótesis al demostrar cómo la administración de fructosa a ratas condujo a un aumento en los RAGE asociados a una mayor expresión de la NADPH oxidasa y NF κ B y a una mayor inflamación, que fue revertida con la administración de pioglitazona (Liu et al., 2010).

Finalmente, el consumo de fructosa también puede provocar una disminución de las defensas antioxidantes de la célula. Así, en estudios realizados en diversos tejidos de animales roedores, tales como el tejido adiposo (Kovačević et al., 2017), el hígado (Y. Yang et al., 2018) y el corazón (Cavarape et al., 2001), han mostrado como la ingesta de fructosa genera una disminución en la expresión y/o actividad de las principales enzimas antioxidantes (CAT, GPx y SOD). También se han observado reducciones en los niveles de vitaminas con potencial antioxidante, como la vitamina A, E y D, producidos por el consumo de fructosa que se han asociado además con la progresión del hígado graso no alcohólico (Guvenc et al., 2017; Maia-Ceciliano et al., 2019).

4.8. Efectos de la fructosa sobre el intestino

En los últimos años se ha estudiado el papel del intestino delgado en el metabolismo de la fructosa y su implicación en el desarrollo de las alteraciones metabólicas asociadas a su consumo (Gonzalez & Betts, 2018). Como se ha descrito anteriormente, GLUT5 es el transportador implicado en la absorción de la fructosa de la luz intestinal al enterocito (Figura 5) y su expresión se ve incrementada por la presencia de elevadas concentraciones de fructosa en el intestino (Douard & Ferraris, 2008; Tappy & Lê, 2010). Además, el intestino también expresa la KHK y es capaz de metabolizar la fructosa siguiendo la misma ruta que en el hígado (Figura 6), generándose triosas fosfato sin una estricta regulación (Merino et al., 2019). Un reciente estudio realizado por Jang y col. (Jang et al., 2018) en ratones a los que se les administró un isótopo de la fructosa demostró que cuando la ingesta de fructosa es baja, esta es metabolizada generando glucosa y otros productos en gran medida en el intestino y no en el hígado, mientras que cuando la ingesta es muy elevada este metabolismo se satura y la fructosa es liberada en su mayoría a la circulación portal (Figura 9) adquiriendo mayor

Introducción general

relevancia su metabolismo hepático (Jang et al., 2018). En consecuencia, parece que el intestino juega una función clave en el desarrollo de alteraciones metabólicas derivadas del consumo de fructosa.

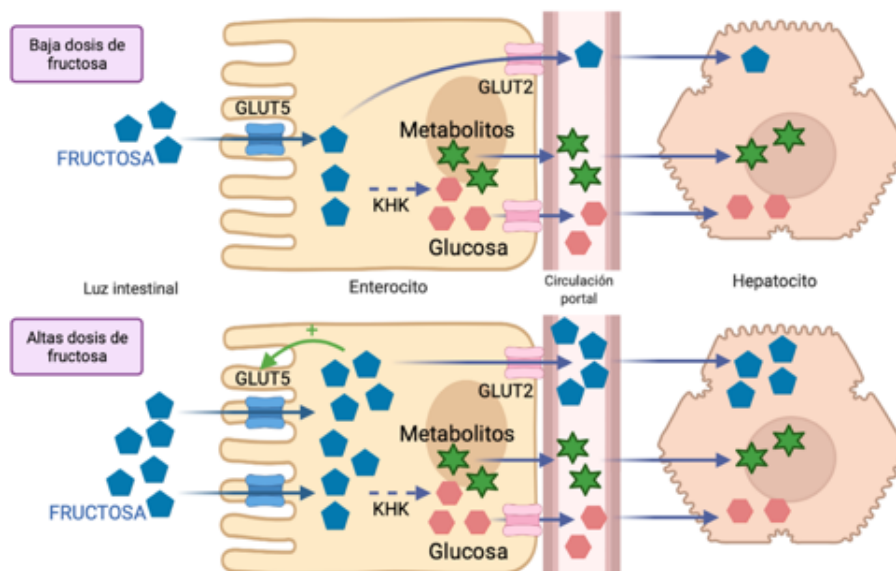


Figura 9: Absorción y metabolismo intestinal de la fructosa y diferencias en sus efectos dependientes de la dosis de fructosa consumida. Adaptado de (Jang et al., 2018). Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

El tracto gastrointestinal desempeña un papel clave en el control de la ingesta gracias a la liberación de hormonas como la grelina. Tras la ingesta de nutrientes, la glucosa desencadena la secreción de hormonas anorexigénicas como la leptina y la insulina y bloquea la secreción de la hormona orexigénica grelina. Todo ello contribuirá a dar una respuesta de saciedad. Sin embargo, tras el consumo de fructosa, disminuyen tanto la secreción de leptina e insulina (hormonas de la saciedad) como la represión en la secreción de grelina (hormona del apetito) en comparación con la glucosa (Merino et al., 2019). Como consecuencia, tras el consumo de fructosa se reduce la sensación de saciedad y, por tanto, ellos favorece un aumento de la ingesta (Tappy & Lê, 2010).

Por otro lado, la pared intestinal se caracteriza por servir de barrera ante la entrada de sustancias potencialmente tóxicas para el organismo. Entre los mecanismos implicados en esta función, se han descrito la existencia de unas uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas que conectan las células epiteliales entre sí para formar una barrera epitelial permeable y selectiva que limita la penetración de sustancias potencialmente patógenas (Lambertz et al., 2017). El consumo de fructosa se ha asociado a una disminución de las proteínas encargadas de formar las uniones estrechas en los enterocitos (Mastrocola et al., 2018; Volynets et al., 2017), lo cual conduciría a un mayor paso de toxinas generadas por la microbiota intestinal que conducirían a una situación proinflamatoria en el organismo (Lambertz et al., 2017). En estudios realizados en primates no humanos sometidos a una dieta con fructosa se ha visto un incremento en la endotoxemia asociada a una situación de esteatosis hepática (Kavanagh et al., 2013). Resultados similares se han observado en niños

con hígado graso no alcohólico, asociado a una situación proinflamatoria en plasma, (Jin et al., 2014) y también en adultos (Verdam et al., 2011).

Como conclusión al apartado 4 de la presente introducción (Patologías asociadas al consumo de fructosa: obesidad y síndrome metabólico), en la Figura 10 se muestra un resumen de todos los efectos metabólicos derivados del consumo de fructosa que se han descrito en la bibliografía.

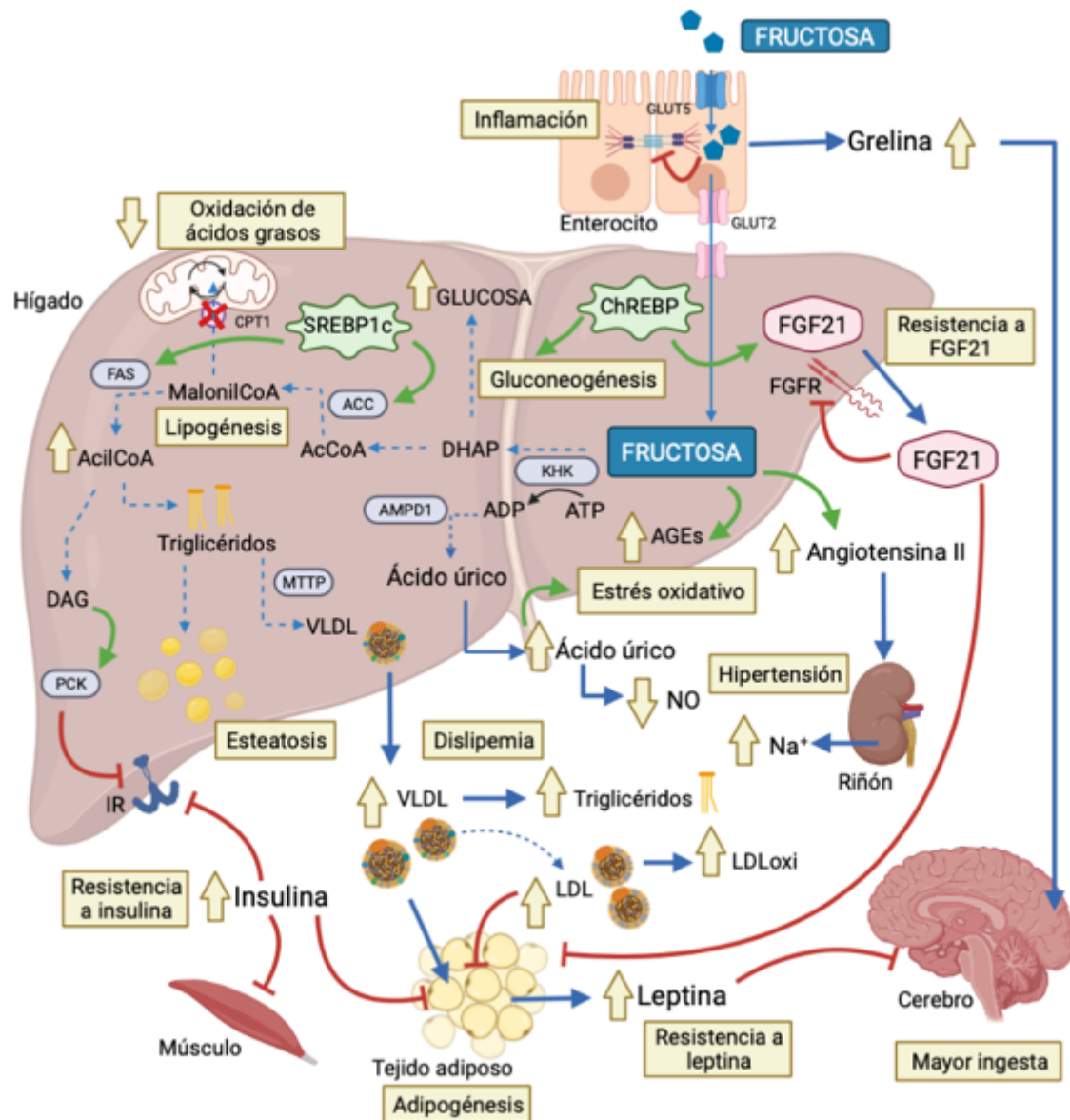


Figura 10: Resumen de los efectos metabólicos debidos al consumo de fructosa. En cuadros amarillos se indican las alteraciones metabólicas. Las flechas amarillas indican aumento o disminución de metabolitos asociados al consumo de fructosa. Las líneas rojas indican rutas o procesos bloqueados. Las líneas verdes indican rutas o enzimas estimuladas. OAG: oxidación de ácidos grasos. LDLoxi: LDL oxidadas. IR: Receptor de insulina. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

5. Programación fetal

Durante el embarazo, la buena salud de la madre es fundamental para el correcto desarrollo de la descendencia. Así, múltiples estudios han demostrado cómo la alimentación y/o la presencia de enfermedades tales como obesidad o diabetes en la madre, favorecen la aparición de alteraciones metabólicas y cardiovasculares en la descendencia, incluso una vez adulta (Gaillard, 2015). Los estudios epidemiológicos realizados tras la hambruna holandesa (1944-1945) fueron de los primeros que relacionaron la alimentación de la madre con el desarrollo de enfermedades en la descendencia. Así, los hijos de aquellas madres que se encontraban embarazadas en su primer trimestre de gestación durante la hambruna presentaron, en la edad adulta, una mayor incidencia de obesidad y enfermedad coronaria (Jasoni et al., 2014). Este mecanismo se denomina programación fetal y plantea como determinados factores ambientales, principalmente la nutrición materna, programan durante el embarazo una mayor probabilidad de sufrir enfermedades en el adulto (Perrone et al., 2016). En este proceso juega un papel fundamental la placenta, ya que aparte de permitir el soporte y protección del feto, regula el paso de nutrientes de la madre al feto, por lo que está íntimamente relacionada con el correcto desarrollo fetal (Desoye et al., 2011).

Diversos trabajos científicos han puesto de manifiesto la mayor propensión de sufrir enfermedades cardiovasculares y diabetes en la descendencia de madres obesas o con diabetes, apareciendo estos efectos desde la infancia (Agarwal et al., 2018; Neri & Edlow, 2015). Además, se ha demostrado que los hijos de madres con diabetes gestacional tienen mayor probabilidad de presentar mayor peso al nacer y de desarrollar obesidad durante la adolescencia (Gillman et al., 2003). Pero no solo eso, sino que a temprana edad los hijos de madres diabéticas y obesas desarrollan características típicas del síndrome metabólico (Boney et al., 2005). Incluso se han descrito alteraciones de los fetos antes de nacer (Edlow et al., 2014) o que nada más nacer presentan resistencia a insulina (Catalano et al., 2009).

La dieta durante la gestación y la lactancia parece ser un factor clave en la programación fetal, ya que tanto la desnutrición como la sobrenutrición de las madres conducen a cambios en los fetos a través de diversos mecanismos como son: alteraciones del número celular, alteraciones de la respuesta hormonal, el estrés oxidativo, la función mitocondrial y cambios epigenéticos (Kwon & Kim, 2017; Symonds et al., 2009). En primer lugar, la desnutrición materna conduce a programar lo que se conoce como un “fenotipo ahorrador”, teoría propuesta por Hales y Barker en los años 90 (Hales & Barker, 1992). Según esta, la restricción calórica fetal conduce a una menor secreción de insulina que se mantiene en la edad adulta. Como consecuencia, si el ambiente posnatal no se corresponde con el prenatal, el adulto tendrá un mayor riesgo de desarrollo de diabetes, resistencia a insulina y obesidad (Hales & Barker, 1992). Actualmente se sabe que este desequilibrio es debido, no solo a alteraciones en la señal de insulina, sino también a otras alteraciones a nivel de expresión génica y marcas epigenéticas (Symonds et al., 2009).

También, numerosos estudios realizados en animales de experimentación sometidos a dietas ricas en grasa o en carbohidratos han demostrado conducir a alteraciones en la descendencia (Kereliuk et al., 2017). Así, la administración de una dieta grasa a ratas condujo a un mayor peso del tejido adiposo, hiperinsulinemia e hiperleptinemia en la descendencia

adulta, obteniendo incluso una respuesta más acusada cuando estos descendientes era re-expuestos a dicha dieta (Howie et al., 2009). Se han propuesto diversos mecanismos para explicar cómo la dieta occidental puede provocar estos efectos. Así, se han visto cambios en la descendencia a nivel neuronal que conducirían a disfunción neuronal y como consecuencia, a una mayor ingesta (G. Q. Chang et al., 2008; Mukerjee et al., 2018). También se han visto cambios en la expresión hepática de genes implicados en el metabolismo de lípidos y carbohidratos en la progenie que conducirían al desarrollo de esteatosis (McCurdy et al., 2009; Zhang et al., 2009). Muchos de estos efectos pueden deberse a una situación de estrés oxidativo provocada por la dieta materna que acarrearía una perturbación de la funcionalidad de la placenta y como consecuencia un alterado transporte de nutrientes al feto (Rodríguez-Rodríguez et al., 2018). Todo ello, ocasionaría una situación de estrés oxidativo en estos fetos durante la gestación que conduciría a cambios epigenéticos y en la expresión de genes que condicionarían su estado metabólico en la edad adulta (M. I. Saad et al., 2016).

Tal y como se ha descrito con anterioridad en el apartado 4 de la introducción de esta Tesis Doctoral, existen numerosos trabajos científicos que relacionan la ingesta de fructosa con el desarrollo de enfermedades metabólicas, lo que ha llevado a muchos investigadores a centrarse en el estudio del consumo de fructosa durante la gestación y sus efectos en la descendencia (Regnault et al., 2013). De este modo, diversos trabajos realizados en modelos animales han demostrado que el consumo de fructosa durante la gestación conduce al desarrollo de obesidad, resistencia a la insulina e hipertensión en la descendencia adulta (Li et al., 2015; A. F. Saad et al., 2016; Tain et al., 2014). De nuevo, se ha establecido la importancia de las alteraciones en la placenta como una de las posibles causas de estos efectos. Así, las placentas de madres que consumieron fructosa presentaban un mayor estrés oxidativo, una mayor producción de ácido úrico y alteraciones en los transportadores de glucosa que conllevarían en los fetos a presentar un menor peso al nacer y otras alteraciones metabólicas (Asghar et al., 2016; Rodrigo et al., 2016; Song et al., 2016). En humanos, se ha estudiado cómo existe una asociación entre el consumo de bebidas azucaradas durante el embarazo con un incremento en el tejido adiposo de los niños a la edad de 6-11 años (Gillman et al., 2017). Incluso, en un estudio en el que se evaluaba la relación del consumo de bebidas azucaradas o no con fructosa durante la gestación con el desarrollo de asma en la infancia, se observó una mayor incidencia de esta patología en los descendientes de madres que consumieron más bebidas azucaradas con fructosa, estableciéndose además una asociación de este efecto con un estado proinflamatorio (Wright et al., 2018).

También resulta muy interesante la diferente respuesta que aparece en la descendencia en función del género, ya que se ha observado que todos estos mecanismos de programación fetal no afectan de la misma manera a los dos sexos (Hsu & Tain, 2019). Por ejemplo, según varios trabajos parece que las hembras descendientes de madres sometidas a desnutrición o dietas hipercalóricas muestran una mayor protección ante el desarrollo de enfermedad cardiovascular e hipertensión que los machos (Franco et al., 2002; Rodríguez-Rodríguez et al., 2018). Este efecto puede ser debido al papel cardioprotector de los estrógenos, ya que el efecto desaparece tras la menopausia o una ovariectomía (Grigore et al., 2008). En los últimos años, ha cobrado relevancia una teoría que sitúa a la placenta como el principal responsable de estas diferencias en función del sexo, ya que la placenta presenta la misma información

Introducción general

genética que sus fetos y como consecuencia puede responder de manera diferente a los estímulos maternos (Tarrade et al., 2015). Parece que las placentas de descendientes hembra cuando el ambiente materno es adverso responden mediante cambios en la expresión génica, lo que conduce a que las hembras crezcan menos, pero que sean capaces de adaptarse mejor a otros agentes desfavorables, tales como dietas ricas en grasa o falta de nutrientes. En cambio, las placentas de los descendientes macho casi no se ven alteradas ante situaciones adversas, lo que hace que estos crezcan sin tener en cuenta el ambiente y que no puedan hacer frente a situaciones desfavorables durante la gestación (Clifton, 2010; Eriksson et al., 2010). Un trabajo que apoya esta hipótesis es el realizado por Vickers y col., en el que demostraron como la administración de fructosa en la gestación condujo a una disminución en el tamaño de las placentas de las descendientes hembra, no observándose cambios en las placentas de los descendientes macho (Vickers et al., 2011).

Otra información relevante es la capacidad que tiene la programación fetal de mantenerse de generación en generación. Por vía materna la exposición de una gestante (F0) a una situación de estrés (como desnutrición o sobrenutrición) supone que sus hijas (F1) estén expuestas a dicha situación durante la gestación, pero también lo estarán sus células germinales (futura F2), ya que los ovocitos se generan durante la gestación (Heard & Martienssen, 2014). Este tipo de transmisión se denomina intergeneracional. En cambio, cuando se ve el mismo fenotipo en la F3, primera generación que no ha estado expuesta directamente al agente estresante, se denomina transgeneracional (Portha et al., 2019). Así, estudios realizados tras la Hambruna Holandesa han mostrado cómo, no solo las hijas cuyas madres gestantes sufrieron la desnutrición, sino también sus nietas, presentaron un menor peso al nacer (Burdge et al., 2007). Esta transmisión de generación en generación se produce únicamente cuando la exposición se origina en las denominadas “ventanas críticas”, las cuales tienen lugar tanto durante la gestación como la lactancia (Portha et al., 2019). Así, Zambrano y col. mostraron cómo una restricción calórica de la F0 conducía a una alterada respuesta a insulina en la generación F2, tanto si la restricción calórica se producía solo durante la gestación o solo durante la lactancia (Zambrano et al., 2005). En otro estudio a mucho más largo plazo, se vio cómo una restricción calórica durante 50 generaciones no consiguió revertir los efectos en la descendencia tras 2 generaciones con una dieta isocalórica. Así, estos animales seguían presentando resistencia a la insulina, mayor susceptibilidad a desarrollar diabetes, hiperhomocisteinemia y mayor adiposidad, debida a alteraciones epigenéticas, así como alteraciones en la metilación de promotores y acetilación de histonas (Hardikar et al., 2015). Aunque existen numerosos estudios sobre la restricción calórica y su efecto transgeneracional, los estudios relacionados con la dieta occidental son menos abundantes. Al igual que en las dietas hipocalóricas, las dietas ricas en grasa durante la gestación también conducen a alteraciones en la F2 tales como resistencia a la insulina, observándose también, cambios de tipo epigenético (Gniuli et al., 2008; Hanafi et al., 2016). Sin embargo, hay pocos estudios sobre el efecto transgeneracional relacionados con el consumo de azúcares. Así, en ratones tratados con dietas ricas en grasa y sacarosa durante la gestación se observaron alteraciones cardíacas asociadas a defectos en la función mitocondrial en la descendencia F2 y F3 a pesar de que ambas generaciones fueron alimentadas con una dieta convencional (Ferey et al., 2019). En otro estudio realizado en ratas con un genotipo que predispone al desarrollo

de hipertensión que fueron alimentadas con una dieta rica en sacarosa observaron en la F2, no expuesta a sacarosa, una mayor cantidad de tejido adiposo marrón y colesterol en HDL (Školníková et al., 2020). Por otro lado, Seong y col. (Seong et al., 2019) han mostrado en ratones tratados con fructosa al 20% en agua de bebida durante la gestación (F0) cómo de la F1 a la F4 (no sometidas a suplementación con fructosa) aparecía una activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, aunque solo presentaron hipertensión la F1 y F2. Además, esta situación estaba asociada a un aumento de la inflamación y estrés oxidativo a nivel renal (Seong et al., 2019).

6. Epigenética

Los mecanismos concretos que conducen a la programación fetal no se conocen en profundidad, pero múltiples estudios han demostrado que la epigenética juega un papel fundamental, ya que la mayoría de marcas epigenéticas se establecen durante la gestación y se mantienen durante la edad adulta (Kereliuk et al., 2017). La epigenética va “más allá” de la genética y se define como aquellos cambios heredables en la expresión de los genes que conducen a cambios fenotípicos sin que se vea alterada la secuencia de ADN (genotipo) (Berger et al., 2009; Corella & Ordovas, 2017). Las principales modificaciones epigenéticas son la metilación del ADN, la modificación de histonas y los microARNs (miRNAs) (Figura 11). Cualquiera de estas modificaciones permite que, aunque todas las células del organismo presenten el mismo genoma, la expresión de los genes sea diferente en cada tipo celular y como consecuencia el fenotipo sea diferente. Así, existen múltiples epigenomas que añaden un mayor nivel de dificultad al estudio del metabolismo y control del mismo (Corella & Ordovas, 2017). De hecho, el conocimiento del epigenoma es fundamental para determinar el riesgo de sufrir alteraciones metabólicas, ya que sus mecanismos son modulables por el entorno. Neri y col. han publicado una revisión de los estudios realizados hasta el momento sobre la influencia de factores como la obesidad y la dieta materna en la epigenética y la programación fetal concluyendo que la exposición en el útero a ambientes obesogénicos puede conducir a cambios epigenéticos que condicionen de forma negativa la salud cardiometabólica y el desarrollo neuronal del adulto (Neri & Edlow, 2015).

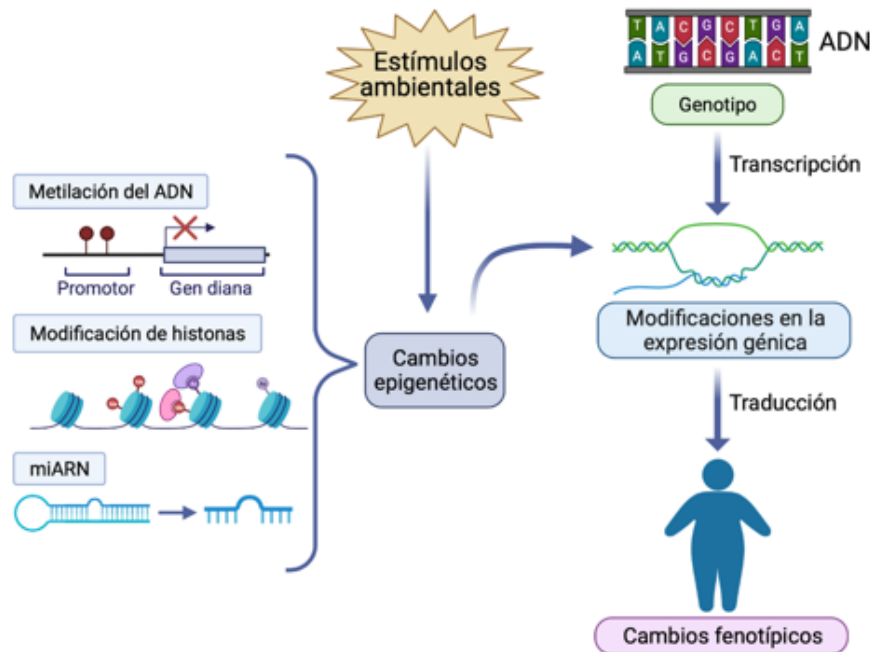


Figura 11: Mecanismos epigenéticos y efectos sobre el fenotipo. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

6.1. Mecanismos epigenéticos

a) Metilación del ADN

La metilación del ADN se basa en la unión covalente de grupos metilo (-CH₃) a residuos de citosina (C) que se encuentran junto a residuos de guanina (G), en los denominados dinucleótidos 5'-CpG-3' (Lim & Maher, 2010). Estos dinucleótidos CpG se suelen agrupar en las denominadas "islas CpG", las cuales tienen unos 200 nucleótidos siendo más del 50% guaninas y citosinas. Estas "islas CpG" se localizan en un 50-60% de los genes en sus regiones promotoras (Robles et al., 2012). La metilación del ADN juega un papel fundamental en la regulación de la expresión génica (Corella & Ordovas, 2017; Zhang, 2015).

La metilación del ADN está mediada por las ADN metiltransferasas (DNMT). En concreto la DNMT3a y DNMT3b, encargadas de la metilación *de novo*, son las responsables de la metilación global del genoma durante la embriogénesis. Estos patrones son mantenidos por la DNMT1 en cada división celular, la cual tiene una alta afinidad al ADN hemimetilado, y asegura que los patrones de metilación se conserven (Lim & Maher, 2010; Robles et al., 2012).

Todavía existe mucha controversia sobre los procesos implicados en las modificaciones epigenéticas, no obstante, uno de los principales mecanismos de regulación que implica la metilación del ADN es la inhibición de la expresión génica a nivel de promotor. En general, cuando el promotor está desmetilado se activa la expresión de los genes, ya que la ARN polimerasa II es capaz de llevar a cabo su acción más fácilmente (Figura 12A). En cambio, la metilación del promotor generalmente conduce a la represión de la transcripción. Aunque el mecanismo no está totalmente establecido, parece ser que cuando el promotor se encuentra metilado, se dificulta la acción de la ARN polimerasa, dando lugar a una reducción de la

expresión (Figura 12B) (Corella & Ordovas, 2017; Lim & Maher, 2010). Además, los residuos m^5CpG reclutan proteínas con dominios de unión m^5CpG (MBD, del inglés: *m⁵CpG binding domain*) que dificultan el acceso y unión de los factores de transcripción al promotor, lo que impide la unión posterior de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción ejerciendo así un efecto inhibitorio de la expresión génica (Figura 12B) (Medvedeva et al., 2014; Turek-Plewa & Jagodziński, 2005).

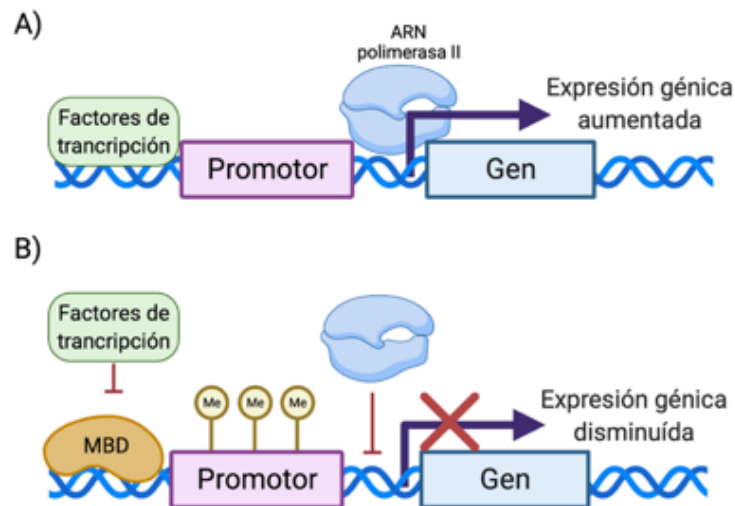


Figura 12: Mecanismo propuesto para explicar el efecto de la metilación de promotores sobre la expresión génica. A) Cuando el promotor no está metilado la ARN polimerasa II es capaz de unirse y se activa la expresión de los genes. B) Cuando el promotor se encuentra metilado se reclutan proteínas MBD que impiden la unión de los factores de transcripción y, en consecuencia, la ARN polimerasa II tampoco puede unirse y se reprime la expresión génica. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

Conjuntamente, estas MBD y la metilación de citosinas del ADN también interviene en la remodelación de la cromatina. Así, las MBD forman complejos con las histonas desacetilasas (HDAC) y otras proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina, dando lugar a lo que se conoce como cromatina "cerrada" o heterocromatina, impidiendo el acceso de los factores de transcripción al ADN, y por consiguiente reprimiendo la expresión de los genes (Turek-Plewa & Jagodziński, 2005) (Figura 13).

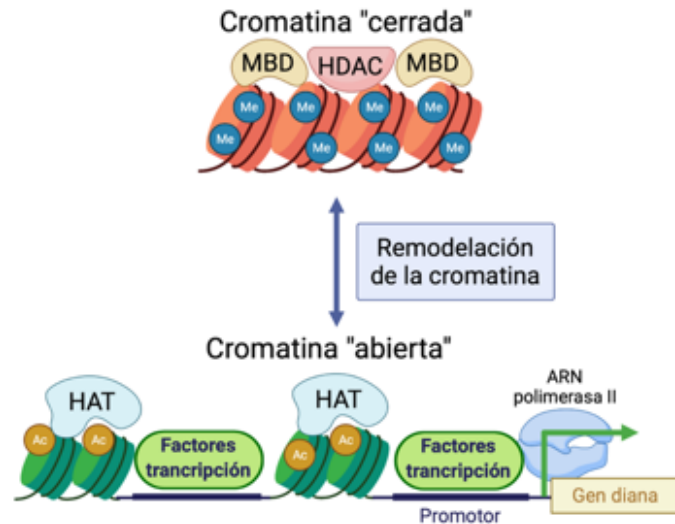


Figura 13: Efecto de la metilación del ADN sobre la remodelación de la cromatina y la expresión génica. La metilación del DNA y la consiguiente unión a las proteínas MBD, juntamente con la desacetilación de histonas mediada por las HDAC favorecen la estabilización de la cromatina "cerrada" que dificulta el acceso de los factores de transcripción al DNA y por consiguiente de la ARN polimerasa, reprimiendo la transcripción. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

b) Acetilación de histonas

En el núcleo, el ADN se encuentra formando un complejo junto con proteínas llamado cromatina. La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma (Figura 14) formado por un núcleo de proteínas denominadas histonas y unas dos vueltas de ADN (Nakao, 2001). El núcleo de histonas está formado por un octámero de 2 copias de cada una de las histonas (H2A, H2B, H3 y H4), las cuales se caracterizan por presentar colas amino terminal que salen de dicho núcleo (Figura 14) (Ng & Cheung, 2016). Son estas colas las que juegan un papel fundamental en la remodelación de la cromatina y la regulación de la expresión génica. Así, gracias a unos patrones muy bien estructurados, estas colas de las histonas sufren procesos de acetilación (en lisinas), metilación (en lisinas y argininas), ubiquitinación (en lisinas) y fosforilación (en serinas y treoninas) (Corella & Ordovas, 2017).

De todas las modificaciones, la mejor descrita es la acetilación de las histonas que está mediada por las histonas acetiltransferasas (HAT). Estas enzimas permiten estabilizar la forma de eucromatina o cromatina "abierta" (Figura 14) que favorece la expresión de los genes. En cambio, las histonas desacetilasas (HDAC) eliminan los grupos acetilo de las histonas favoreciendo la condensación de la cromatina, y la estabilización de la heterocromatina o cromatina "cerrada" que dificulta el acceso de los factores de transcripción al promotor, lo que dificulta la iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa. Los principales complejos de HDAC son SIN3 y Mi2-NuRD (del inglés: *nucleosome-remodelling histone deacetylase*), los cuales, además, interactúan con las MBD formando complejos represores de la expresión de los genes (Figura 14) (Medvedeva et al., 2014; Nakao, 2001; Turek-Plewa & Jagodziński, 2005).

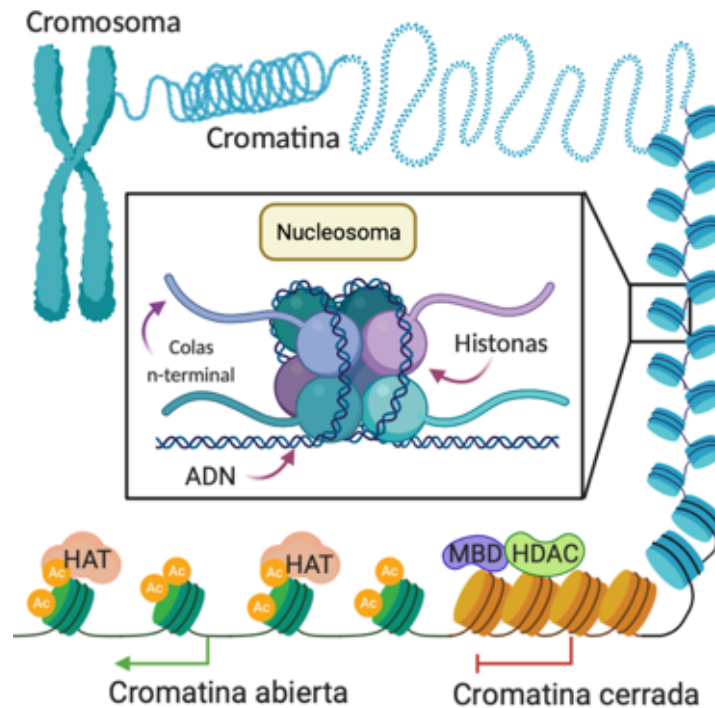


Figura 14: Representación de la remodelación de la cromatina y el efecto de la acetilación de histonas sobre la expresión génica. La flecha verde indica que la transcripción se ve favorecida y la línea roja indica que la transcripción está inhibida. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

c) miRNA

Los micro ARN (miARN) son secuencias de 20-25 nucleótidos no codificantes. Aunque no codifiquen por proteínas su función es fundamental en la regulación del metabolismo (Corella & Ordovas, 2017). Como puede verse en la Figura 15, la secuencia de los miARN se puede encontrar en regiones intergénicas o en regiones intrónicas de genes codificantes. En el primer caso (localización en regiones intergénicas), el miARN tiene mecanismos propios para regular su expresión, mientras que en el segundo (localizado en regiones intrónicas) la expresión está íntimamente relacionada con la expresión del gen donde se encuentra (Fernández Sanjurjo et al., 2016). La secuencia de los miARN se transcribe por la ARN polimerasa II dando lugar a los miARN primarios (pri-miARN) de cientos de nucleótidos y con un extremo 3' poli A y un 5' con una caperuza de metil-guanosina. Los pri-miARN son procesados por un complejo formado por Drosha, con actividad ribonucleasa III, y la proteína de ligación DGCR8 (Región Crítica 8 del síndrome de DiGeorge) dando lugar al pre-miARN. Este pre-miARN tiene una estructura secundaria en forma de horquilla y es exportado al citoplasma por la exportina 5. Su maduración continúa allí gracias a otra ribonucleasa III denominada Dicer, en complejo con TRPBP (del inglés: *transactivation response element RNA-binding protein*) generando un miARN de doble cadena, también denominado miARN dúplex, que es reconocido por la proteína Argonata (Ago2). Esta genera el miARN maduro de cadena sencilla lo que permite su asociación al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, del inglés: *RNA-induced silencing complex*) formando el complejo miRISC. Este complejo es capaz de reconocer secuencias complementarias en las regiones 3'-UTR del ARNm inhibiendo su expresión

Introducción general

mediante distintos mecanismos. Así, si la complementariedad de la secuencia semilla del miARN es completa con el ARNm se produce una degradación del mensajero. En cambio, si la complementariedad con el mensajero es parcial se produce una represión de la traducción de este ARNm a proteína (Figura 15) (Fernández Sanjurjo et al., 2016; Hammond, 2015; Jeon & Osborne, 2016; Vienberg et al., 2017).

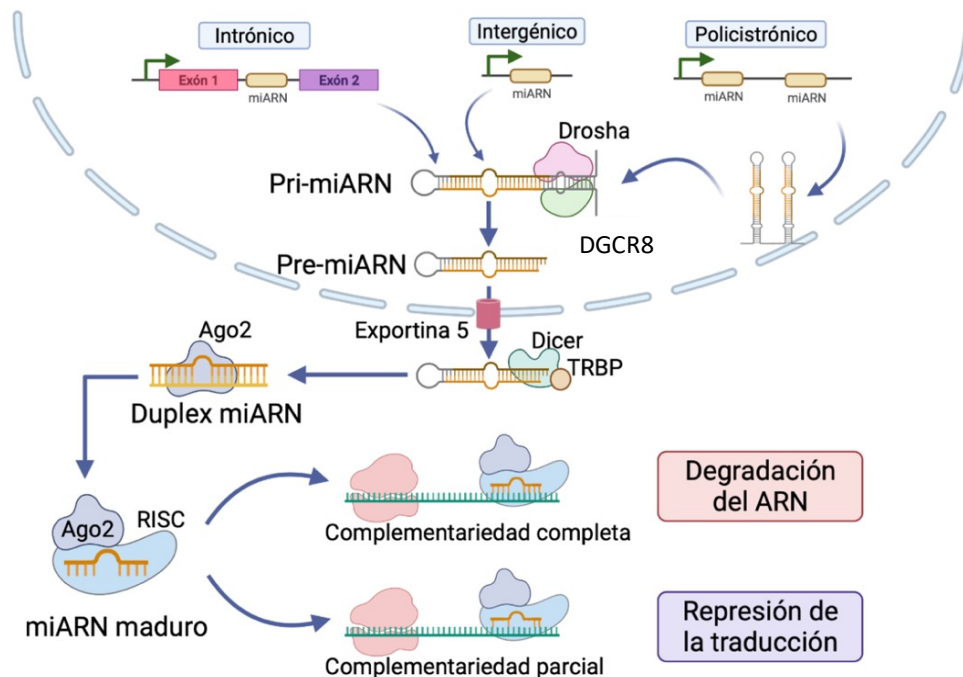


Figura 15: Maduración de los miARN y efecto sobre el ARNm. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

La secuencia semilla del miARN maduro, que es la que se aparea con una secuencia diana en el ARNm, normalmente se localiza en la región que va desde el nucleótido 2 al 7 del miARN y presenta por tanto una longitud de 6 nucleótidos. En mamíferos, en la mayoría de las ocasiones, media su acción por hibridación parcial con la región 3'-UTR del ARNm (Fernández Sanjurjo et al., 2016; Hammond, 2015). Esto hace que un mismo miARN tenga numerosos ARNm como diana, añadiendo un nivel mayor de complejidad a la regulación de la expresión génica. Así, un mismo miARN puede modificar la traducción a proteínas de un gran número de genes implicados en diferentes rutas metabólicas (Bartel, 2009). Además, un mismo gen puede estar regulado por más de un miARN (Fernández-Hernando et al., 2013).

En los últimos años se ha estudiado en profundidad la implicación de los miARN en el desarrollo de enfermedades metabólicas tales como la obesidad, el síndrome metabólico, las enfermedades cardiovasculares y la resistencia a insulina debido a que cambios en el patrón de expresión de los miARN provocan alteraciones en la expresión de sus genes diana provocando alteraciones en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono (Cirillo et al., 2019; Fernández-Hernando et al., 2013; Y. Huang et al., 2018; Hulsmans et al., 2011).

6.2. Epigenética y nutrición

Como se ha descrito anteriormente los cambios epigenéticos son heredables y además son modulados por el ambiente. Entre los múltiples factores ambientales que se han descrito que regulan el epigenoma, la nutrición es uno de los que se considera de mayor importancia (Milagro et al., 2013). Así, alteraciones en el epigenoma a diferentes niveles se han relacionado con el desarrollo de enfermedades como la obesidad, el síndrome metabólico y la enfermedad cardiovascular asociados a patrones de dieta inadecuados (Ling & Rönn, 2019).

El mayor número de estudios que relacionan la dieta con alteraciones epigenéticas se centra en las deficiencias nutricionales en ácido fólico y metionina. Ambos intervienen en lo que se conoce como metabolismo de un carbono (Figura 16), ruta encargada de mantener la síntesis de purinas, aminoácidos y ciertas marcas epigenéticas (Ducker & Rabinowitz, 2017). En concreto, esta ruta es responsable de producir S-adenosilmetionina (SAM), el principal donador de grupos metilo de la célula. La SAM es utilizada por las DNMTs permitiendo la correcta metilación del ADN. De hecho, los niveles de ácido fólico, metionina, homocisteína (HCy) y SAM se han utilizado para determinar la capacidad de metilación del organismo (Ling & Rönn, 2019). Así, se ha observado en individuos con diabetes tipo 2, unos reducidos niveles de ácido fólico asociados a una hipometilación global en el hígado, sin mostrar cambios en la expresión de las DNMTs (Nilsson et al., 2015). Por otro lado, en estudios con animales de experimentación, la administración de dietas deficientes en ácido fólico provoca un incremento en los niveles de homocisteína en plasma (Partearroyo et al., 2013) que está asociado a alteraciones a nivel neuronal (Partearroyo et al., 2016). Además, dietas deficientes en ácido fólico, metionina y colina han generado una hipometilación en el hígado asociada a daños en este tejido (Pogribny et al., 2006).

También se ha demostrado como alteraciones de otros nutrientes de la dieta conducen a modificaciones en el patrón de metilación. De esta forma, ratas que recibieron una dieta rica en grasa han mostrado hipermetilación de promotores específicos como los de la glucoquinasa y la piruvato quinasa en el hígado (Jiang et al., 2011). Esta hipermetilación también se ha observado tras el consumo de fructosa en agua de bebida, que condujo a una expresión reducida de CPT1 y PPAR α en asociación con una mayor metilación de los promotores de dichos genes (Ohashi et al., 2015). Como consecuencia de dichos efectos, estos animales presentaron una acumulación de lípidos en el hígado (Jiang et al., 2011; Ohashi et al., 2015). Asimismo, en humanos también se han observado cambios en los perfiles de metilación asociados a dietas ricas en grasa (Ling & Rönn, 2019). Así, Jacobsen y col. encontraron cambios en la metilación global en el músculo de hombres jóvenes tras el consumo de una dieta rica en grasa durante 5 días (Jacobsen et al., 2012).

La metilación ejerce un papel relevante durante el desarrollo fetal, ya que los patrones de metilación se establecen justamente durante este periodo (Neri & Edlow, 2015; Robles et al., 2012). Por ello, numerosos grupos de investigación se han centrado en el estudio de los efectos a este nivel. Los resultados en cuanto a la restricción calórica son discordantes. Así, algunos autores han observado una hipermetilación del ADN en la descendencia de madres sometidas a una restricción proteica (Rees et al., 2000; van Straten et al., 2010). Sin embargo, otros investigadores han descrito como una dieta materna con restricción proteica genera en

Introducción general

la descendencia una hipometilación (Lillycrop et al., 2008) asociada con alteraciones en el metabolismo de un carbono, presentando una menor actividad de las DNMT y una remodelación de la cromatina (con aumento de la acetilación de histonas y disminuciones en las HDAC) lo que explicaría el aumento de la expresión de genes que predispondrían al desarrollo de obesidad en la descendencia (Lillycrop et al., 2007). También se han descrito cambios, tanto en estudios en animales de experimentación (H.-L. Yu et al., 2015) como en humanos (Phang et al., 2020) en la metilación de genes en la descendencia de madres sometidas a dietas ricas en grasa, pudiendo ser uno de los mecanismos que explicarían las alteraciones asociadas al síndrome metabólico, diabetes y enfermedad cardiovascular que aparecen en dicha descendencia (Phang et al., 2020; H.-L. Yu et al., 2015).

De igual forma, se han estudiado alteraciones epigenéticas a nivel de las histonas y del empaquetamiento de la cromatina asociadas a la dieta (Davis & Ross, 2007; Neri & Edlow, 2015; Vahid et al., 2015). Así, dietas ricas en grasa durante la gestación han provocado en la descendencia una mayor acetilación de histonas en regiones reguladoras de la fosfenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) que podrían explicar la mayor expresión de dicha enzima y como consecuencia la incrementada gluconeogénesis observada en la descendencia (Strakovsky et al., 2011). Este incremento en la acetilación encontrado en descendientes de madres alimentadas con dietas ricas en grasa también ha sido descrito por Aagaard-Tillery y col. (Aagaard-Tillery et al., 2008) en macacos, asociado a una menor actividad de las HDAC. Estos efectos se relacionaron con cambios en la expresión de genes que favorecerían un fenotipo obeso (Aagaard-Tillery et al., 2008).

Finalmente, como se ha descrito anteriormente, los miARN se encargan de regular un gran número de procesos metabólicos y una elevada proporción de los cambios en el perfil de expresión de estos están asociados a patologías relacionadas con el síndrome metabólico (Fernández-Hernando et al., 2013; Price et al., 2014; Rottiers & Näär, 2012). De hecho, se han observado cambios en múltiples miARN circulantes en pacientes con síndrome metabólico, diabetes, hipertensión, obesidad, enfermedad cardiovascular e hígado graso no alcohólico (Mehta et al., 2016; Willeit et al., 2017). Por ejemplo, los niveles de miR-122 se encuentran aumentados en plasma de pacientes con síndrome metabólico y diabetes tipo 2 (Willeit et al., 2017), y en estudios realizados en ratones tratados con una dieta rica en grasa la inhibición de este miARN condujo a una disminución de la esteatosis hepática (Esau et al., 2006). Existen numerosos estudios en modelos animales que han evaluado los efectos de dietas ricas en grasa sobre cambios en el perfil de expresión hepático de miARN que conllevan el desarrollo de hígado graso no alcohólico y alteraciones en el metabolismo de lípidos y de la glucosa (Blasco-Baque et al., 2017; Feng et al., 2014; Jordan et al., 2011) y variaciones en la expresión de miARN en el tejido adiposo blanco (Chartoumpakis et al., 2012; Romao et al., 2012). Además del consumo de lípidos, el consumo de azúcares en la dieta también sea relacionado con cambios en el perfil de miARN usando dietas ricas en sacarosa (Yerlikaya & Mehmet, 2019), galactosa (Varma et al., 2012) y fructosa (Baena et al., 2016; Hanousková et al., 2019; Hutter et al., 2015; Sud et al., 2017). La resistencia a la insulina observada en animales que consumieron fructosa se relacionó con cambios en la expresión de miARN relacionados con su señalización en hígado, tales como miR-33, miR-145, miR-128, miR-30a y miR-7, existiendo una estrecha relación entre ellos y sus genes diana. Así, se observó una menor expresión de IRS-1,

IRS-2, Insig-1, Insig-2 (Baena et al., 2016; Sud et al., 2017). Además, la fructosa también afecta al metabolismo lipídico (Tappy & Lê, 2010), por lo que también se han observado cambios en la expresión de miARN encargados de la regulación del metabolismo de lípidos (Hutter et al., 2015; Sud et al., 2017). En un estudio realizado en hígado, plasma y tejido adiposo blanco, pardo y subcutáneo se observó que el consumo de fructosa conducía a cambios en el perfil de expresión de varios miARN en los diferentes tejidos en función de si los ratones eran o no obesos (Hanousková et al., 2019). De esta manera, la capacidad de la fructosa para exacerbar la expresión de miR-34a y miR-21 en hígado de los ratones obesos podría estar implicada en un agravamiento de la inflamación y una mayor síntesis de lípidos en dichos animales. Además, curiosamente, solo en tejido adiposo blanco de los ratones no obesos se encontró una disminución de la expresión de miR-27a, miR-335, miR-33a, miR-21 asociada al consumo de fructosa, a la par que un aumento de todos ellos en plasma (Hanousková et al., 2019). Estos resultados explican el hecho de que el tejido adiposo es el principal órgano encargado de la liberación de miARN a la sangre, siendo dichos miARN responsables de la regulación del metabolismo a nivel sistémico (Thomou et al., 2017).

La dieta materna durante el embarazo también es fundamental en la correcta expresión de miARN en la descendencia adulta, constituyendo dicha expresión de miARN un factor clave que condiciona el desarrollo de afectaciones metabólicas en los descendientes (Casas-Agustench, Iglesias-Gutiérrez, et al., 2015). Así, la restricción proteica durante el embarazo y la lactancia condujo en los descendientes a los tres meses de edad a una disminución en la densidad, tamaño y proliferación de las células beta del páncreas y a una menor liberación de insulina (Dumortier et al., 2014). Estos cambios se relacionaron con una sobreexpresión de miR-375 y consecuentemente, una menor expresión de sus genes diana: la quinasa dependiente de fosfoinositol 1 (PDK-1) y la miotrofina (MTPN) en el páncreas de los descendientes de madres con restricción calórica. El miR-375 es considerado el principal miARN encargado del control de la liberación de insulina en el páncreas (Dumortier et al., 2014). Estos resultados indicarían un fallo en la funcionalidad del páncreas y, como consecuencia, un mayor potencial de desarrollo de diabetes tipo 2. La aparición de alteraciones en la respuesta a la insulina de descendientes de madres tratadas con dietas ricas en grasa y/o ricas en azúcares simples también se ha asociado a alteraciones de diferentes miARN en el hígado (Zheng et al., 2016) y tejido adiposo (Fernandez-Twinn et al., 2014). Concretamente, la ingesta materna de una dieta obesogénica rica en grasas y azúcares simples provocó en el tejido adiposo de sus descendientes una sobreexpresión de miR-126 que se relacionó con una disminución en la expresión de IRS1 y en la vía de señalización de las PI3K/Akt lo que permitió el desarrollo de una situación de resistencia a insulina (Fernandez-Twinn et al., 2014). Asimismo, la administración de una dieta rica en grasa durante la gestación y la lactancia también condujo a una alteración en la expresión hepática de diversos miARN relacionados con la señalización de insulina que se asocian, además, con la inflamación hepática presente en estos animales (Zheng et al., 2016). Sorprendentemente, el tipo de ácido graso consumido durante la gestación también condiciona la expresión de miARN hepáticos en la descendencia y que, en parte, podrían explicar la resistencia a insulina de estos animales (Casas-Agustench, Fernandes, et al., 2015). Además, el consumo materno de dietas ricas en grasa también indujo cambios en la expresión de miARN de la descendencia que afectaron a su

Introducción general

metabolismo lipídico favoreciendo una acumulación de lípidos y colesterol en el hígado (Benatti et al., 2014; Zinkhan et al., 2018). Otros autores han observado en el músculo de ovejas cuyas madres consumieron una dieta obesogénica una reducida expresión de let-7g promoviendo un aumento en la adipogénesis en este tejido (Yan et al., 2013). También se han descrito alteraciones en el corazón, tales como fibrosis cardíaca, en babuinos cuyas madres consumieron una dieta rica en grasa y fructosa, que se corresponden con alteraciones en la expresión de miARN relacionados con esas patologías (Maloyan et al., 2013).

El efecto del consumo exclusivo de fructosa en agua de bebida durante la gestación y su suplementación en la descendencia adulta sobre las modificaciones epigenéticas en la descendencia adulta apenas ha sido estudiado. Dada la estrecha relación entre el consumo de fructosa en la gestación y el desarrollo de enfermedades metabólicas en la descendencia (Regnault et al., 2013) y la relevancia de una correcta nutrición materna en la programación fetal a nivel epigenético (Neri & Edlow, 2015), es de vital importancia, estudiar en profundidad la conexión entre ambos factores.

7. Sulfuro de hidrógeno

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) ha sido considerado como uno de los mayores tóxicos para el ser humano debido a su capacidad para bloquear la citocromo C oxidasa de la cadena respiratoria (Bełtowski, 2015) pero, sorprendentemente, este gas con olor a huevos podridos ha generado en los últimos años una gran expectación en toda la comunidad científica debido a su efecto como gasotransmisor (Wang, 2014). De esta manera, el organismo no solo es capaz de sintetizarlo en diversos tejidos, sino que sus concentraciones están finamente reguladas llevando a cabo efectos a nivel sistémico.

7.1. Síntesis de sulfuro de hidrógeno: Transulfuración

El sulfuro de hidrógeno es un gas que se sintetiza en una vía metabólica denominada transulfuración en la cual la homocisteína es el principal sustrato. Unos niveles elevados de la homocisteína (HCy) se han asociado a un mayor riesgo cardiovascular en humanos (Chrysant & Chrysant, 2018). Dado su papel clave en el metabolismo, sus niveles están finamente regulados, principalmente, gracias un estricto control de dos rutas metabólicas: el metabolismo de un carbono y la transulfuración. En el metabolismo de un carbono, la homocisteína es remetilada a metionina, a través de un proceso en el que interviene el 5-metilentetrahidrofolato (5-MetilTHF) como dador de grupos metilo (Figura 16). En esta ruta es fundamental contar con niveles adecuados de ácido fólico, que generen una cantidad suficiente de 5-metilTHF para llevar a cabo la remetilación de homocisteína (Wierzbicki, 2007). En cambio, en la ruta de la transulfuración la homocisteína se transforma cisteína y se genera como producto H_2S (Bełtowski, 2015).

Como puede verse en la Figura 16, en la transulfuración intervienen principalmente tres enzimas: la cistationina β -sintasa (CBS), la cistationina γ -liasa (CSE), ambas localizadas en el citoplasma, y la 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa (3MST), que se encuentra en la

mitocondria (Predmore et al., 2012). La CBS y la CSE son enzimas dependientes de piridoxal 5-fosfato (PLP). La CSE es la principal enzima encargada en la formación de H₂S y se caracteriza catalizar reacciones de sustitución en el carbono- γ de la homocisteína y reacciones de sustitución en el carbono- β de la cisteína dando lugar a H₂S, amoníaco (NH₃) y α -cetoglutarato (α KG) o piruvato, respectivamente. En cambio, la CBS solo es capaz de catalizar reacciones de sustitución en el carbono- β condensando la homocisteína y la serina para formar cistationina. Finalmente, la cisteína puede ser transformada por la cisteína aminotransferasa (CAT) en 3-mercaptopiruvato, el cual es sustrato de la 3MST. Esta enzima transfiere el grupo sulfuro desde el mercaptopiruvato a donadores reducidos con grupos tiol, como la ditiol-tioredoxina y el ácido dihidrolipoico, formando piruvato y H₂S (Figura 16) (Predmore et al., 2012; Singh & Banerjee, 2011).

Las enzimas implicadas en la transulfuración se expresan en un gran número de tejidos como son el corazón, el cerebro, el músculo esquelético, el intestino, el tejido adiposo, el riñón y el hígado, siendo este último el tejido que presenta la mayor actividad (Predmore et al., 2012; Zhao et al., 2003).

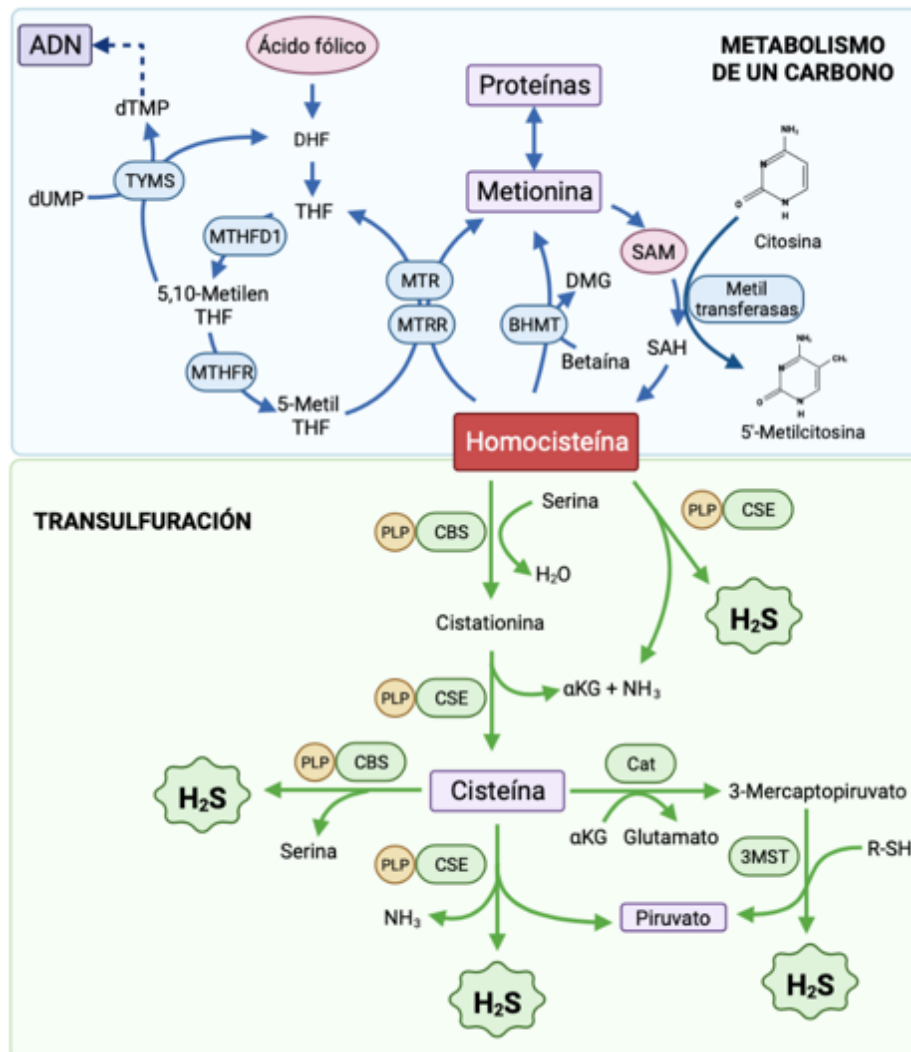


Figura 16: Metabolismo de un carbono (fechas azules) y transulfuración (Flechas verdes). Adaptado de (Carter & Morton, 2016) y (Comas & Moreno-Navarrete, 2021). Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

Introducción general

La mayoría de los estudios realizados sobre la regulación de la transulfuración se centran en la CBS y la CSE. Así, ambas enzimas presentan una regulación postranscripcional y la CSE muestra además una regulación de su expresión génica a nivel de promotor (Sbodio et al., 2019). De este modo, mientras que la CBS se expresa de una manera constitutiva en la mayoría de los tejidos, la CSE presenta una regulación de su expresión compleja inducible a varios niveles (Figura 17) (Sbodio et al., 2019).

Uno de los mecanismos que induce la expresión de la CSE es la unión del factor de transcripción Sp1 (del inglés: *specificity protein 1*) a la región promotora de la CSE. Este factor de transcripción es activado por el receptor de estrógenos 2 (ER2) e inhibido por miR-21 y miR-22 (Hackfort & Mishra, 2016; L. Wang et al., 2015). Además, se ha descrito que el calcio es capaz de estabilizar Sp1, favoreciendo así la expresión de la CSE (Zhao et al., 2014). Por otro lado, se ha visto que la expresión de la CSE también se activa por la unión a su promotor del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2, del inglés: *nuclear factor erythroid-2-related factor*) (Hassan et al., 2012) y ATF4 (del inglés: *activating transcription factor 4*) (Longchamp et al., 2018). Como consecuencia, la expresión de la CSE es activada por el estrés oxidativo, el estrés del retículo endoplasmático, la inflamación y la inanición (Sbodio et al., 2019). Otras moléculas que regulan la expresión de la CSE son los ácidos biliares (Fiorucci et al., 2017). En los últimos años se ha puesto de manifiesto la relevancia de los ácidos biliares en la regulación del metabolismo, ya que son ligandos del factor de transcripción receptor X de farnesoide (FXR, del inglés: *Farnesoid X Receptor*) y del receptor de membrana TGR5 (del inglés: *Takeda G protein-coupled receptor 5*, también conocida como: *G protein-coupled bile acid receptor-1*, GPBAR-1) (Chiang & Ferrell, 2019). Renga y col han descrito cómo los ácidos biliares intracelulares son capaces de regular la expresión de la CSE por favorecer la unión de FXR a su región promotora (Renga et al., 2009). De hecho, la administración de ligandos de FXR consigue activar la expresión de la CSE en el hígado de roedores, mientras que en ratones KO para FXR ese efecto no sucede (Renga et al., 2009). Por otro lado, la activación de TGR5 tiene efectos sobre la CSE tanto a nivel postranscripcional como de expresión génica. En primer lugar, TGR5 activa las rutas de PI3K/Akt y AMPc/PKA conduciendo al aumento de la actividad de la CSE por fosforilación de esta en residuos de serina (Renga et al., 2015). En segundo lugar, la activación de TGR5 provoca un aumento en los niveles de AMP cíclico (AMPc) y como consecuencia se activa la proteína de unión del elemento respuesta a AMPc (CREB; del inglés: *cyclic AMP response element binding protein*). Este factor de transcripción presenta dos sitios de unión, conocidos como CRE (elemento respuesta a AMPc), en el promotor de la CSE favoreciendo la expresión del gen (Renga et al., 2015). Otra familia de factores de transcripción que presenta secuencias diana en el promotor de la CSE es el factor nuclear de las células T activadas (NFAT; del inglés: *Nuclear factor of activated T-cells*) (Bosc et al., 2017). NFAT se encuentra regulado por los niveles de calcio intracelulares y tanto una disminución de estos, como la inhibición de proteínas sensibles al calcio, tales como la calreticulina, consiguen reducir la expresión de la CSE mediada por NFAT (Bosc et al., 2017). Además, se ha demostrado en hígado de ratones que las hormonas tiroideas ejercen un efecto represor la expresión de la CSE. Dicho efecto es posible gracias a la unión de las hormonas al receptor de hormonas tiroideas beta 1 (TR β 1), el cual presenta sitios de unión a las regiones reguladoras

de la CSE. Es más, en situaciones de hipotiroidismo la expresión de la enzima y la producción hepática de H₂S se encuentran aumentadas (Hine et al., 2017)

Finalmente, la regulación de la CSE también se produce a través de mecanismos epigenéticos. Así, la hipermetilación del promotor de la CSE en la región de islas CpG se ha visto que conduce a disminuciones en la expresión de la CSE en sangre de pacientes con enfermedad coronaria arterial (Giannakopoulou et al., 2017). Además, la familia miR-30 se une por complementariedad completa a una región 3'-UTR en el ARNm de la CSE provocando una inhibición en la traducción del mismo (Shen et al., 2015b). De hecho, el uso de miméticos de miR-30 consigue reducir la expresión y niveles de proteína de la CSE, mientras que el bloqueo de miR-30 produce un efecto completamente opuesto (Shen et al., 2015b).

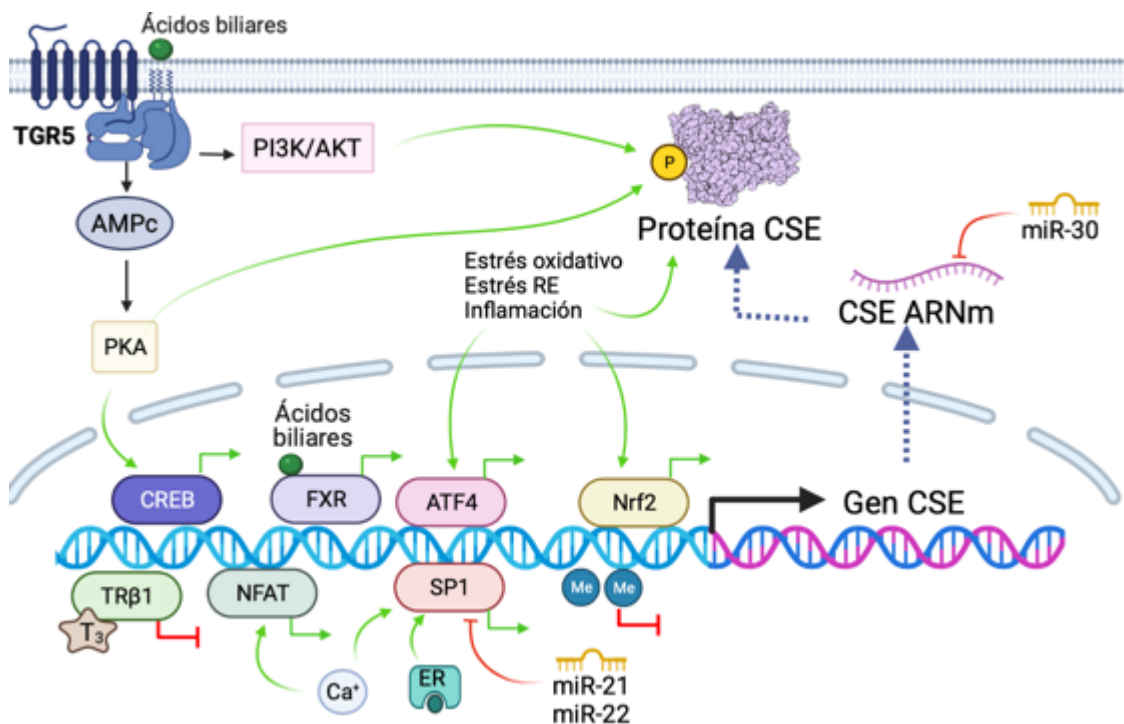


Figura 17: Mecanismos de regulación de la cistationina γ -liasa (CSE). Las flechas en verde indican un efecto activador y las líneas en rojo indican un efecto inhibitor. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

Por otro lado, la regulación postranscripcional es el mecanismo principal de regulación de la CBS. Esta enzima presenta un dominio hemo en su extremo N-terminal que regula su actividad en función del potencial redox. Así, el estado ferroso muestra una actividad dos veces menor que el férrico (Banerjee & Zou, 2005). Además, a este estado ferroso de la CBS es capaz de unirse el monóxido de carbono (CO) y el óxido nítrico (NO) suponiendo una pérdida de actividad de la enzima (Singh et al., 2007). Otras modificaciones postranscripcionales que aumentan la actividad tanto de la CBS como la CSE son la sumoilación y la fosforilación (Sbodio et al., 2019).

7.2. Metabolismo del sulfuro de hidrógeno

Debido a su capacidad de inhibir la citocromo C oxidasa de la cadena respiratoria, la concentración de H_2S debe mantenerse dentro de unos límites finamente regulados (Carter & Morton, 2016). Así, en plasma se estima que la concentración del H_2S ronda valores del orden de micromolar o incluso nanomolar (Bełtowski, 2015). Aunque parezca sorprendente, su oxidación enzimática se realiza en la mitocondria por la sulfato:quinona oxidoreductasa (SQR). Esta enzima transfiere los electrones procedentes del H_2S a la coenzima Q (ubiquinona), la cual los introduce en la cadena respiratoria a nivel del complejo III (Bouillaud & Blachier, 2011). El átomo de azufre procedente del H_2S es transferido por la SQR al glutatión reducido (GSH) generando glutatión persulfuro (GSSH). A continuación, la enzima sulfuro dioxigenasa transforma el GSSH en sulfito (SO_3^{2-}) y GSH consumiendo oxígeno. Por último, el sulfito puede convertirse en tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) con la participación del GSSH y la acción de la enzima tiosulfato sulfurotransferasa (TST). El sulfito también puede transformarse en sulfato (SO_4^{2-}) en una reacción catalizada por la enzima sulfito oxidasa (SO) (Figura 18) (Bełtowski, 2015; Marutani & Ichinose, 2020). Las mitocondrias de diversos tejidos, como el hígado, riñón y corazón, son capaces de oxidar el H_2S mediante este mecanismo, en cambio las del cerebro no presentan esta capacidad (Lagoutte et al., 2010).

Este metabolismo mitocondrial solo se produce a concentraciones de H_2S inferiores de $5 \mu\text{M}$, ya que por encima de este valor el H_2S inhibe a la citocromo C oxidasa. Además, su metabolismo está condicionado por los niveles de oxígeno. Así, a concentraciones bajas de oxígeno (hipoxia) el H_2S no es metabolizado y se acumula, pudiendo ser usado como un “sensor de hipoxia” en el tejido. (Bełtowski, 2019).

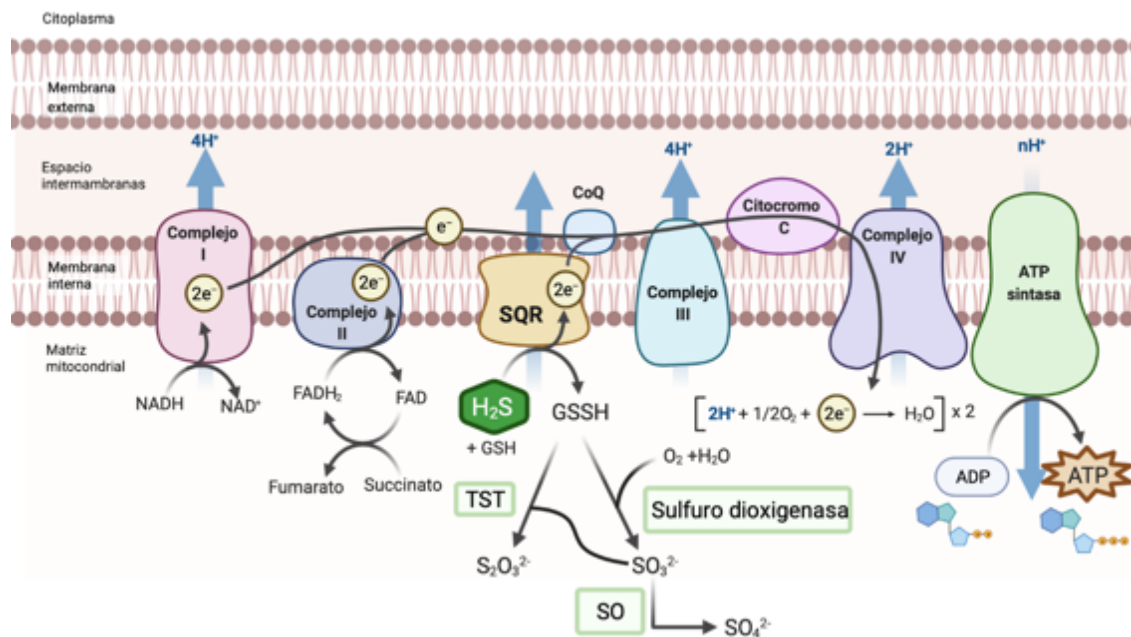


Figura 18: Oxidación enzimática del sulfuro de hidrógeno en la mitocondria. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

7.3. Sulfuro de hidrógeno y su efecto gasotransmisor

Los gasotransmisores son moléculas gaseosas sencillas que comparten las siguientes características: 1) no precisan de receptores específicos en la membrana porque ésta es permeable a los gasotransmisores, 2) se producen en las células gracias a sustratos y enzimas específicos y su producción está regulada para cumplir funciones de señalización, 3) tienen funciones específicas bien definidas a unas concentraciones concretas, 4) su efecto puede ser mimetizado con la administración exógena del gas, y 5) están involucrados en la transducción de señales y tienen dianas celulares y moleculares específicas (Wang, 2014). Los tres gasotransmisores mejor descritos son el CO, el NO y el H₂S, aunque en los últimos años se ha propuesto la inclusión en esta lista de otros gases como el amoníaco (NH₃) y el metano (CH₄) (Wang, 2018).

El H₂S media su acción por su interacción con tres tipos de dianas: a) los grupos tiol, b) las especies reactivas, entre ellas las especies reactivas de Nitrógeno (RNS) como el NO y las especies reactivas de Oxígeno (ROS) y c) los metales y metaloproteínas (Bełtowski, 2015).

a) Reacción del sulfuro de hidrógeno con grupos tiol

El principal mecanismo de acción del H₂S se basa en la reacción con los residuos de cisteína de las proteínas mediante una modificación postranscripcional denominada S-sulfhidración. De esta manera los residuos tiol (-SH) de la cisteína se convierten en persulfuro (-SSH) (Yang, 2014). La S-sulfhidración de proteínas es un mecanismo de regulación de la actividad de las proteínas y, en general, se ha descrito que la S-sulfhidración de proteínas aumenta la actividad de estas (Dongó et al., 2018).

Los primeros en establecer la capacidad del H₂S en mediar la actividad de las proteínas por reacciones de S-sulfhidración fueron Mustafa y col., los cuales observaron que la S-sulfhidración en la Cys-150 de la Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) aumentaba su actividad y que el uso de ratones que no expresaban la CSE (principal enzima de la transulfuración) disminuía su actividad en un 20-30% (Mustafa et al., 2009). Desde entonces, muchas más enzimas; como canales iónicos, la parkina, NFκ-B, la eNOS, el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 1 (VEGFR1; del inglés: *vascular endothelial growth factor receptor 1*), entre otras; han mostrado experimentar cambios en su actividad como consecuencia de una S-sulfhidración mediada por el H₂S y, como consecuencia, este gas es un regulador clave de las rutas metabólicas en la que estas proteínas están implicadas (Bełtowski, 2015).

b) Interacción del sulfuro de hidrógeno con el óxido nítrico y las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno

Se ha estudiado en profundidad los efectos de la interacción entre el H₂S y el NO sobre el sistema cardiovascular, debido al papel relevante de ambos gases en su correcto funcionamiento y su implicación en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (Figura 19) (Altaany, Moccia, et al., 2014; Dongó et al., 2018; Nagpure & Bian, 2016; Szabo, 2017; Wu et al., 2018).

Introducción general

En primer lugar, se ha demostrado que el H₂S es capaz de activar la expresión de la eNOS a varios niveles aumentando la producción de NO en el endotelio (Figura 19) (Szabo, 2017). Como se ha explicado anteriormente, el H₂S media reacciones de S-sulfhidración de proteínas aumentando su actividad (Beltowski, 2015). Se ha demostrado que la actividad de la eNOS se ve incrementada por S-sulfhidración de la Cys-443, aumentando la producción de NO, y que esta es reprimida cuando no se expresa la CSE (enzima productora de H₂S) (Altaany, Ju, et al., 2014). Por otro lado, la actividad de la eNOS está incrementada por fosforilación en su residuo de serina (Ser)-1177, mediada por Akt. Varios estudios han mostrado cómo el tratamiento de células endoteliales con H₂S conduce a una mayor fosforilación de la eNOS (King et al., 2014; Predmore et al., 2011). Los mecanismos por los cuales el H₂S es capaz de activar a Akt son controvertidos (Szabo, 2017), pero su activación por este gasotransmisor y, como consecuencia, su acción sobre la eNOS está ampliamente descrita en la bibliografía (Altaany et al., 2013; Cai et al., 2007; Predmore et al., 2011). Además, la eNOS es una enzima dependiente de calcio y su actividad aumenta en su presencia (Wu et al., 2018). Diversos canales de calcio son activados por S-sulfhidración mediada por el H₂S (Munaron et al., 2013). Como consecuencia se produce un aumento del calcio intracelular libre que permitiría la activación de la eNOS (Kida et al., 2013; Moccia et al., 2011). Todos estos mecanismos descritos conducen a un aumento en la concentración de NO inducido por el H₂S que conllevaría un efecto vasodilatador.

El H₂S y el NO son capaces de reaccionar entre sí generando ácido tionitroso (HSNO) un nitrosotiol que sirve de mecanismo de almacenaje del NO (Figura 19). De hecho, se cree que esta es la razón por la que a bajas concentraciones el H₂S se produce vasoconstricción (Beltowski, 2015). Cuando aumentan las concentraciones de H₂S, este reacciona con el HSNO generando nitroxilo (HNO) (Figura 19). Este compuesto presenta un efecto vasodilatador similar al NO por activación de la adenilato ciclasa (Beltowski, 2015) y presenta un efecto inotrópico y lusitrópico positivo, ya que aumenta los niveles de calcio intracelular (Yong et al., 2010). Además, actúa regulando la función de proteínas como un “interruptor redox” formando puentes disulfuro entre 2 Cys de una proteína y modificando su actividad (Ge & Moss, 2012). En los últimos años, también se han estudiado las propiedades antioxidantes del HNO, ya que inhibe a la NADPH oxidasa (enzima generadora de radicales libres) y activa a la hemo-oxigenasa 1 (enzima antioxidante) (Nagpure & Bian, 2016).

Se ha demostrado que el H₂S presenta actividad antioxidante por sí mismo, bloqueando las ROS, RNS y radicales libres, pero su baja concentración hace que su efecto directo por inactivación de especies reactivas sea despreciable frente a otros antioxidantes endógenos (Beltowski, 2015). En cambio, el potencial antioxidante del H₂S reside en su capacidad de favorecer un aumento en la concentración de otros antioxidantes endógenos, tanto enzimáticos como no enzimáticos. En primer lugar, el H₂S incrementa los niveles de glutatión reducido en la célula debido a que aumenta la captación de cisteína y glutamato hacia el interior celular; reduce la cistina a cisteína en el espacio extracelular, con lo cual aumenta la disponibilidad de los sustratos para la formación de glutatión y además activa a la glutamato-cisteína ligasa (GCL), principal enzima encargada de la síntesis de glutatión (Jain et al., 2014; Kimura et al., 2010; Predmore et al., 2012). No obstante, el principal efecto del H₂S sobre la disminución del estrés oxidativo parece estar mediado por su capacidad de activar Nrf2. El H₂S

inhibe por S-sulfhidración a Keap1 (del inglés: *Kelch-like ECH-associated protein 1*) provocando la activación de Nrf2. Como consecuencia, Nrf2 se transloca al núcleo donde se une a sus secuencias diana en las regiones promotoras de genes como la catalasa, GR y la SOD, aumentando su expresión (Bełtowski, 2015; Xie et al., 2016).

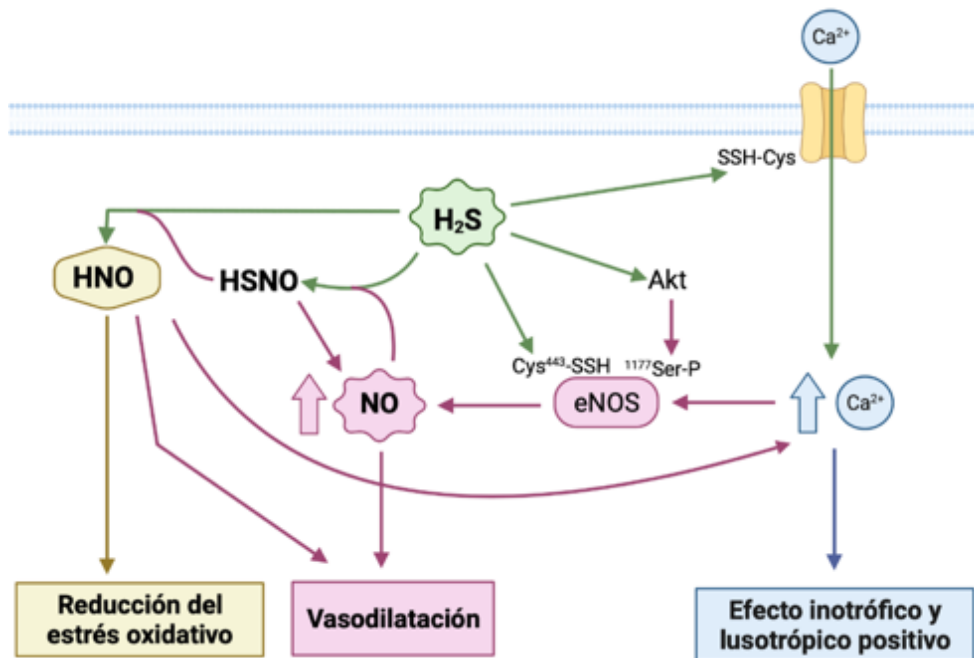


Figura 19: Relación entre el H₂S y el NO. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

c) Interacción con metales y metaloproteínas

El H₂S es capaz de unirse al átomo de hierro del grupo hemo de hemoproteínas. De hecho, mediante este mecanismo el H₂S se une a la citocromo C oxidasa y la bloquea ejerciendo su efecto tóxico (Bełtowski, 2015; Fukuto et al., 2020). También es capaz de unirse a la hemoglobina y a la mioglobina de manera reversible, siendo este uno de los posibles mecanismos de transporte del H₂S por la sangre (Jensen & Fago, 2018).

Pero el H₂S es además capaz de unirse a otro tipo de metales como el Cu⁺, el Zn²⁺, el Hg⁺ y el Pb⁺ (Fukuto et al., 2020). Así, Searcy describió la capacidad del H₂S de unirse al cobre del centro catalítico de la SOD1 aumentando su actividad (Searcy, 1996). También disminuye la toxicidad del Metil-Hg (MeHg) en células por formación de sulfato de bismetilmercurio ((MeHg)₂S), el cual tiene una capacidad muy baja de reaccionar con proteínas y, como consecuencia, ya no resulta tóxico (Yoshida et al., 2011).

7.4. Relación entre el sulfuro de hidrógeno y el desarrollo de enfermedades metabólicas

El conocimiento de los efectos en del H₂S en el organismo y su posible implicación en el desarrollo de enfermedades metabólicas ha despertado un gran interés y ha sido objeto de estudio por la comunidad científica desde hace años (Predmore et al., 2012). Las principales áreas del conocimiento que se investigan sobre este gasotransmisor son la cardiología, la

Introducción general

neurología, la gastroenterología, la endocrinología y la inmunología (Yang & Wu, 2017). En la presente memoria, nos centraremos en la descripción de los efectos del H₂S sobre el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, la resistencia a la insulina y la obesidad como patologías asociadas al síndrome metabólico. Por último, describiremos la asociación entre el consumo de fructosa y los efectos de este gasotransmisor.

a) Enfermedades cardiovasculares

La relación del H₂S y las enfermedades cardiovasculares es la que se ha estudiado en mayor medida debido a que se ha comprobado que el H₂S tiene efecto cardioprotector en la mayoría de afectaciones cardiovasculares (Shen et al., 2015b). Este gasotransmisor ejerce dicho efecto de forma directa por sí mismo y también a través de su interacción con el NO, como se ha explicado anteriormente. Ambos conducen a efectos similares tales como la vasodilatación vascular, la activación de la angiogénesis y la cardioprotección tras un fallo cardíaco (Figura 20) (Wu et al., 2018).

Diversos autores han observado una disminución en la concentración plasmática de H₂S en pacientes con enfermedad coronaria (Jiang et al., 2005), fallo cardíaco (Polhemus et al., 2014) e hipertensión (Sun et al., 2007; Wang et al., 2014). Estos resultados se han correlacionado incluso con incrementos en los niveles de homocisteína plasmática (Sun et al., 2007) y con una disminución en la actividad de la CSE (Wang et al., 2014). De hecho, Kondo y col observaron cómo ratones a los que se les inducía fallo cardíaco mostraban una reducción en la concentración plasmática y cardíaca de H₂S. Además, el daño cardíaco posterior era mayor cuando se inhibía la expresión de la CSE y disminuía este daño si se inducía la expresión de esta enzima (Kondo et al., 2013).

Uno de los primeros efectos sobre el sistema cardiovascular que se asociaron al H₂S fue su acción sobre el endotelio vascular y el tono vascular (Meng et al., 2015). Estudios en tejido endotelial han mostrado cómo el tratamiento con H₂S ejerce una vasodilatación del endotelio. El efecto vasodilatador que realiza el H₂S se debe, en parte, a su capacidad para estimular la producción de NO (como se ha explicado en el apartado anterior), pero también se ha visto cómo este gasotransmisor es capaz de inhibir a la fosfodiesterasa (PDE), evitando la degradación del GMPc, y activar a la Proteína quinasa G (PKG) por S-sulfhidración (Bełtowski, 2015; Bibli et al., 2015) llevando a cabo el efecto vasodilatador por sí mismo. Aunque su acción mejor conocida sobre el endotelio vascular es como factor hiperpolarizante producido por el endotelio (EDHF; del inglés: *endothelium-derived hyperpolarizing factor*). De esta manera, abre los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) y dependientes de calcio de baja conductancia (SK_{Ca}) e intermedia (IK_{Ca}) por S-sulfhidración (Mustafa et al., 2011; Guanghua Tang et al., 2013; Zhao et al., 2001) produciendo hiperpolarización de la membrana (Bełtowski & Jamroz-Wiśniewska, 2014; Guanghua Tang et al., 2013). Además, el H₂S ha mostrado capacidad de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en las células endoteliales disminuyendo la concentración de angiotensina II (AngII) (Laggner et al., 2007).

Otro efecto beneficioso del H₂S sobre el sistema cardiovascular es su efecto proangiogénico tanto a nivel cardíaco como de los vasos sanguíneos (Shen et al., 2015b). Así, la administración de H₂S tras un fallo cardíaco condujo en modelos animales a la reducción del

área infartada, asociada a un incremento en la formación de vasos sanguíneos en el corazón (Qipshidze et al., 2012). En otro estudio realizado con compuestos que liberan H₂S a largo plazo, el tratamiento con estos compuestos tras el infarto de miocardio condujo a una mejora en la remodelación cardíaca postinfarto, así como una menor área de fibrosis y un aumento de la angiogénesis (Polhemus et al., 2013). De igual manera, las células endoteliales y los vasos sanguíneos muestran un incremento en la angiogénesis tras el tratamiento con H₂S, y este proceso se inhibe al bloquear la CSE *in vitro* e *in vivo* (Papapetropoulos et al., 2009). El principal factor implicado en la angiogénesis es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Abhinand et al., 2016), existiendo numerosos estudios que relacionan VEGF y el H₂S, existiendo una interacción entre ambos. De hecho, se ha demostrado como el H₂S aumenta la expresión del VEGF y también contribuye a la activación de su cascada de señalización (Coletta et al., 2012; Kanagy et al., 2017; Papapetropoulos et al., 2009; Polhemus et al., 2013).

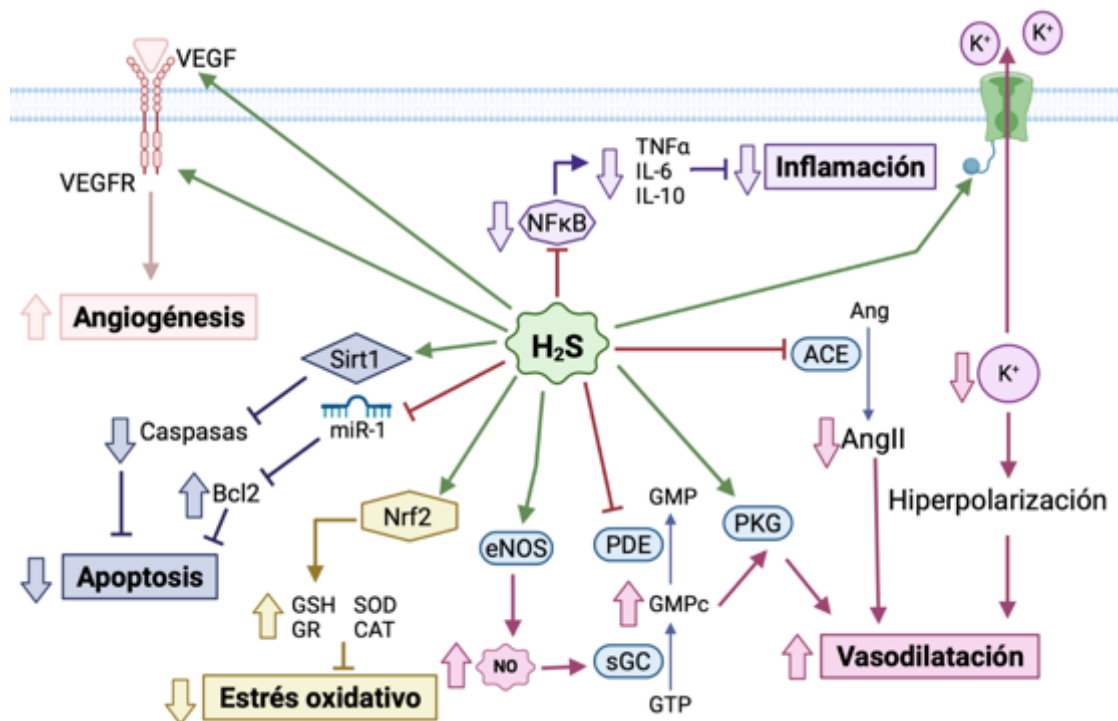


Figura 20: Relación entre el H₂S y la enfermedad cardiovascular. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

Como se ha explicado en el apartado anterior, el H₂S es capaz de reducir el estrés oxidativo a través de su acción sobre Nrf2 (Xie et al., 2016). De hecho, la administración de sulfuro de hidrógeno o moléculas que lo liberan tras un fallo cardíaco provoca una reducción del estrés oxidativo en el corazón y como consecuencia reducir el daño cardíaco (Calvert et al., 2009; Polhemus et al., 2013). Esta cardioprotección parece estar mediada por la activación de Nrf2 por parte del gasotransmisor (Calvert et al., 2009).

La disminución en el estrés oxidativo está íntimamente relacionada con el efecto antiapoptótico y antiinflamatorio observado en el sistema cardiovascular tras la administración de H₂S. El efecto antiinflamatorio se debe a la disminución en la expresión en las citoquinas

Introducción general

proinflamatorias; como MCP1 (del inglés *Monocyte chemoattractant protein-1*), el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), interleucina-6 (IL-6) e IL-10 (Perna et al., 2013; Zhang et al., 2018). Estos resultados sugieren una relación entre la respuesta antiinflamatoria del H_2S y el factor nuclear kappa B (NFkB), uno de los factores de transcripción más importantes en el desarrollo de la respuesta proinflamatoria de la célula (Csiszar et al., 2008). De hecho, se ha visto que el H_2S es capaz de reducir el proceso inflamatorio a través de una inhibición de la ruta de señalización de NFkB (Sivarajah et al., 2009; Zhang et al., 2018).

De manera paralela a este efecto antiinflamatorio, se observa una reducción en la apoptosis de las células gracias a este gasotransmisor. Tanto en células endoteliales, como tras un infarto, se ha observado cómo la administración de H_2S reduce la muerte celular programada debido a cambios en la expresión génica de las caspasas, mediada por Sirt1 (Du et al., 2019) y Bcl2 (de inglés: *B-cell lymphoma 2*), por acción de miR-1 (Kang et al., 2014; Tang et al., 2009).

b) Diabetes tipo II y resistencia a la insulina

También se han establecido conexiones entre la acción del H_2S y el desarrollo de diabetes y resistencia a insulina (Gheibi et al., 2020; Zhang et al., 2020). Además, se ha observado que existe una relación entre los efectos del H_2S y el desarrollo de complicaciones derivadas de esta patología (Szabo, 2012). Los niveles de H_2S en pacientes con diabetes tipo 2 se encuentran reducidos en comparación con individuos sanos (Jain et al., 2010; Suzuki et al., 2017; Whiteman et al., 2010), observándose una correlación entre la reducción en sus niveles plasmáticos, el pobre control glucémico de la diabetes y la existencia de antecedentes de enfermedad cardiovascular (Suzuki et al., 2017). Como se detalla en la Figura 21 se ha descrito en numerosos trabajos la capacidad del H_2S de regular el metabolismo de carbohidratos en el páncreas, hígado, tejido adiposo y músculo esquelético (Gheibi et al., 2020), pero sigue siendo objeto de debate en la comunidad científica si el H_2S resulta beneficioso o no en el desarrollo de diabetes debido a su efecto dual sobre estos tejidos (Untereiner & Wu, 2018).

Las células beta del páncreas son capaces de producir H_2S , ya que expresan las principales enzimas implicadas en su síntesis (CSE, CBS y 3MST) (Kaneko et al., 2009; Tomita et al., 2016; Yang et al., 2007). Además, la CSE presenta una regulación de su expresión por los niveles de glucosa, aunque existen datos contradictorios en cuanto a su regulación, ya que algunos autores han mostrado aumentos en la expresión asociados a la administración de glucosa (Kaneko et al., 2009; Taniguchi et al., 2012), mientras que otros han visto una reducida expresión (Yang et al., 2005; Zhang et al., 2011). En lo que parece que sí están de acuerdo todos los autores es que este gasotransmisor disminuye la liberación de insulina por parte del páncreas debido a su capacidad de abrir los canales de K_{ATP} (Yang et al., 2005) y cerrar los canales de calcio de tipo L dependientes de voltaje (VDCC) (G. Tang et al., 2013) en las células β . De hecho, la administración de H_2S durante 9 semanas a ratas con diabetes inducida por una dieta rica en grasa y dosis bajas de estreptozotocina condujo a disminuciones en los niveles de insulina plasmática que se asociaron a un incremento en la glucemia, una reducción en la secreción de insulina y una disminución en tolerancia a la glucosa. Estos efectos fueron dependientes de la dosis de H_2S administrada (Gheibi et al., 2019) y podrían indicar un efecto

negativo del H₂S sobre el desarrollo de la diabetes, porque disminuiría la captación de glucosa por los tejidos sensibles a insulina. No obstante, este efecto podría ser compensado por el control de la apoptosis en las células β mediado por el H₂S. De hecho, la muerte celular programada de las células β del páncreas debida a la hiperglucemia en personas diabéticas es uno de los signos de progresión de la enfermedad (Tomita, 2016), así como el incremento en el estrés oxidativo en este tejido (Newsholme et al., 2016). En relación a estos procesos, la administración de H₂S a células β pancreáticas de ratón sometidas a una elevada concentración de glucosa ha conducido a una reducción de la apoptosis y del estrés oxidativo en estas células (Kaneko et al., 2009). Estos mismos efectos antiapoptóticos se han visto cuando el agente causante de la apoptosis son sustancias prooxidantes como el peróxido de hidrógeno, los ácidos grasos o citoquinas proinflamatorias (Kaneko et al., 2009). En cambio, Yang y col han observado en células β del páncreas de rata en cultivo una disminución en la viabilidad celular y un mayor estrés del retículo endoplasmático correlacionado con la administración de H₂S (Yang et al., 2007). Estos resultados contradictorios observados pueden deberse al efecto dual del H₂S en función de la concentración utilizada y a cambios en la sensibilidad de los diferentes tipos celulares al H₂S en función de la especie (Okamoto et al., 2015).

Además, se ha demostrado como la administración de H₂S favorece la diferenciación de células mesenquimales humanas a células β pancreáticas, incluso en presencia de unos niveles elevados de glucosa siendo este efecto debido a la activación de la vía de las PI3K/Akt (Matei et al., 2017).

Los 3 principales tejidos implicados en la regulación del metabolismo de la glucosa en el organismo: el hígado, el tejido adiposo y el músculo; son capaces de producir H₂S dado que todos ellos expresan las enzimas responsables de su síntesis: la CSE, la CBS y la 3MST (DU et al., 2013; Feng et al., 2009; Norris et al., 2011; Tomita et al., 2016; Veeranki & Tyagi, 2015; G. Yang et al., 2018).

Estudios realizados en cultivo de miotubos han mostrado cómo la administración de H₂S conducía a un aumento en la captación de glucosa por las células debido a un aumento en la fosforilación del receptor de insulina asociado a una activación de la vía PI3K/Akt, mientras que estos efectos se reducían al inhibir la CSE (Xue et al., 2013). El incremento en la sensibilidad a la insulina y la activación de la vía PI3K/Akt inducidos por el H₂S se han observado también *in vivo* en el músculo esquelético de ratas diabéticas (Bitar et al., 2018; Xue et al., 2013). Además de los efectos anteriormente descritos, el H₂S provocó una disminución en el estrés oxidativo y del daño muscular asociado a la diabetes (Bitar et al., 2018; DU et al., 2013).

Al igual que pasaba en el músculo, en el tejido adiposo el H₂S aumenta la sensibilidad a insulina incrementando la captación celular de glucosa (Cai et al., 2016; Xue et al., 2013). De nuevo, estos efectos pueden deberse a la capacidad del H₂S de activar la vía de PI3K/Akt en los adipocitos (Manna & Jain, 2011; Xue et al., 2013). Además, Cai y col han mostrado cómo el H₂S es capaz de activar por S-sulfhidración a PPAR γ en los adipocitos tanto *in vitro* como *in vivo*, mejorando la respuesta a insulina y aumentando la lipogénesis y a la acumulación de lípidos en los adipocitos (Cai et al., 2016). En cambio, Feng y col. han observado un efecto

Introducción general

completamente opuesto, apareciendo una disminución en la captación de glucosa tras el tratamiento con H₂S en adipocitos (Feng et al., 2009).

El hígado es el principal órgano encargado en la homeostasis del H₂S y, además, juega un papel fundamental en el metabolismo hidratos de carbono. De hecho, se ha estudiado la posible implicación del H₂S en el desarrollo de resistencia a insulina, aunque su efecto en el hígado sigue siendo objeto de debate en la comunidad científica (Mani et al., 2014; Zhang et al., 2020). En primer lugar, algunos autores proponen que el H₂S promueve la gluconeogénesis y disminuye la captación de glucosa y su utilización en células HepG2 en cultivo debido, en el primer caso, a la activación de la PEPCK y, en el segundo, por la inhibición de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y la GK (L. Zhang et al., 2013). Este aumento en la gluconeogénesis también se ha observado en ratas diabéticas expuestas a diferentes concentraciones del gasotransmisor (Gheibi et al., 2019). De hecho, en ratones que no expresan la CSE, la producción de glucosa está disminuida en el hígado, mientras que esta aumenta de manera proporcional a la dosis de H₂S administrada a estos ratones (Untereiner et al., 2016b). Estos mismos autores, en un intento de determinar el mecanismo implicado observaron, en cultivo de hepatocitos primarios, cómo el H₂S activaba por S-sulfhidración a PGC1 α , la PEPCK y la glucosa 6 fosfatasa, lo que explicaría su efecto activador de la gluconeogénesis. Al estudiar los hepatocitos que no expresaban la CSE, no se observaron cambios en cuanto a la expresión de los genes, pero sí disminuciones en la activación por S-sulfhidración de estas enzimas, las cuales se revertían al administrar H₂S (Untereiner et al., 2016b). Estos efectos podrían ser perjudiciales y favorecerían el desarrollo de la diabetes, ya que generarían un aumento en los niveles de glucosa en sangre derivado de su alterado metabolismo en el hígado. En cambio, se ha demostrado el papel beneficioso del H₂S en la mejora de la disfunción mitocondrial, constituyendo esta alteración un factor fundamental asociado al desarrollo de la diabetes a nivel hepático. La disfunción mitocondrial puede cursar con una disminución en el número de mitocondrias y una alterada función de éstas asociada a un aumento del estrés oxidativo y a una disminución en la oxidación de ácidos grasos (Gonzalez-Franquesa & Patti, 2017; Kim et al., 2008). Como ha descrito Xie y col., el H₂S disminuye el estrés oxidativo también a nivel mitocondrial (Xie et al., 2016) y se ha demostrado que mantiene el transporte de electrones en la mitocondria (Figura 18) (Módís et al., 2013). Además, Untereiner y col. usando hepatocitos primarios de ratón que expresaban o no la CSE, observaron una disminución de la cantidad de ADN mitocondrial al inhibir la CSE, que se recuperaba al administrar H₂S (Untereiner et al., 2016a). El aumento de la síntesis de mitocondrias podría deberse a la activación por S-sulfhidración de PGC1 α y PPRC (del inglés: *peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-related protein*), los dos principales activadores de la síntesis mitocondrial. Como consecuencia, se incrementa la expresión del factor respiratorio nuclear 1 (NRF1) y del 2 (NRF2) y, finalmente, del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) que estimula la replicación del ADN mitocondrial (Untereiner et al., 2016a).

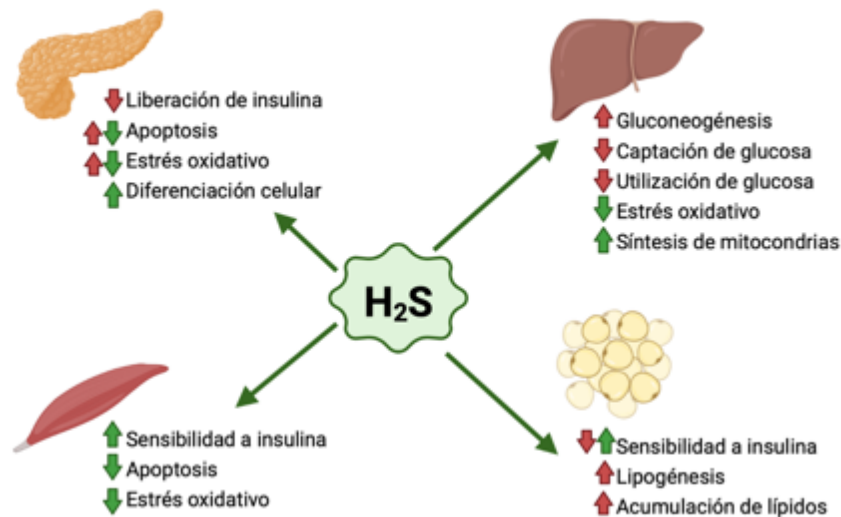


Figura 21: Efecto del H_2S sobre la diabetes y la resistencia a la insulina. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com). Las flechas en rojo indican un posible efecto negativo y las flechas en verde un posible efecto positivo del H_2S en el desarrollo de la diabetes.

Aunque los efectos del H_2S sobre el metabolismo de hidratos de carbono y la resistencia a insulina son en algunos casos perjudiciales y en otros casos se han observado datos contradictorios, lo que resulta evidente y ampliamente aceptado es el efecto beneficioso de este gasotransmisor sobre las complicaciones derivadas de la diabetes (Szabo, 2012). Así, la administración de H_2S a animales de experimentación a los que se les había provocado diabetes condujo a mejoras en afectaciones derivadas de esta enfermedad tales como la disfunción vascular (Suzuki et al., 2011; Zheng et al., 2010), el fallo cardíaco (El-Seweidy et al., 2011; Liu et al., 2018; R. Yang et al., 2019), la nefropatía (Anter et al., 2018; Xue et al., 2013; Yuan et al., 2011), la neuropatía (Li et al., 2020; Zou et al., 2017) y la retinopatía (Biermann et al., 2011; Si et al., 2013). Todas ellas comparten causas comunes: la disfunción endotelial, el incremento del estrés oxidativo y el daño celular producido por la hiperglucemia, los cuales se previenen, como se ha explicado anteriormente, gracias a la acción del H_2S (Bełtowski, 2015; Predmore et al., 2012; Xie et al., 2016). Además, este gasotransmisor estimula la angiogénesis favoreciendo la cicatrización de heridas (Papapetropoulos et al., 2009). La aparición de heridas y la dificultad de su curación es otra de las alteraciones derivadas de la hiperglucemia más prevalentes entre los pacientes diabéticos (Lotfy et al., 2017). En modelos de diabetes en los que se les han generado heridas en la piel, la administración de H_2S se ha asociado a una mayor velocidad de cicatrización de estas en comparación con los animales no tratados gracias a un aumento en la angiogénesis y una disminución en el estrés oxidativo y la inflamación en la piel (Liu et al., 2014; G. Wang et al., 2015; Xu et al., 2019). De hecho, en biopsias de heridas de pacientes diabéticos se ha visto una disminución de la expresión de la CSE y de VEGF frente a heridas de pacientes sin diabetes (Liu et al., 2014).

c) Obesidad

La obesidad se caracteriza por la aparición de una situación proinflamatoria generalizada con la presencia de marcadores y citoquinas proinflamatorias en plasma, todo ello asociado a una hipertrofia y desregulación del tejido adiposo. Como consecuencia, las personas obesas tienen un mayor riesgo de sufrir resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular (Mathieu et al., 2010). En este sentido, pacientes obesos presentan menores niveles de H₂S en plasma en comparación con voluntarios sanos (Whiteman et al., 2010), por lo que alteraciones en la señalización mediada por este gasotransmisor también podrían estar implicadas en las alteraciones asociadas a la obesidad.

En estudios realizados con ratones obesos se ha observado una disminución en la síntesis y concentración de H₂S en tanto en tejido adiposo blanco como marrón (Katsouda et al., 2018). De la misma manera, en macrófagos del tejido adiposo de ratones obesos aparece una disminución en los niveles del gasotransmisor, así como una situación proinflamatoria (Velmurugan et al., 2015).

Cai y col demostraron que el tratamiento con un compuesto donador de H₂S o la sobreexpresión de la CSE favorece la diferenciación de adipocitos e induce la expresión de genes involucrados en la adipogénesis. Además, se demostró que este efecto estaba mediado por la S-sulfhidración y consiguiente activación de PPAR γ (Cai et al., 2016). En consonancia con estos resultados, se ha observado que C/EBP β/δ (del inglés: *CCAAT/enhancer-binding protein β/δ*), dos factores de transcripción activadores de la adipogénesis son capaces de aumentar la expresión de la CSE, por unión a su región promotora, en los preadipocitos. Como consecuencia, aumentan los niveles de H₂S en estas células, lo que favorece la activación de PPAR γ , el cual a su vez promueve la adipogénesis (G. Yang et al., 2018). Esto podría ser un efecto no deseable ya que de este modo el H₂S favorecería el aumento del tejido adiposo. Por otro lado, la administración de compuestos donadores de H₂S a ratones obesos alimentados con una dieta inhibió la lipólisis *in vivo* (Geng et al., 2013). Este efecto parece ser debido a una inhibición de la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la perilipina 1 y a un aumento en la sensibilidad a insulina provocada por el H₂S en el tejido adiposo (Geng et al., 2013). En cambio, en pacientes obesos se observa una mayor lipólisis que conlleva una mayor liberación de glicerol y ácidos grasos libres al plasma, estando este hecho relacionado con el desarrollo de resistencia a insulina y con un mayor estrés oxidativo presente en esta patología (Stanhope & Havel, 2008). Además, también se ha descrito una mayor liberación de adiponectina del tejido adiposo tras la administración de H₂S (X. Wang et al., 2013). Acorde con este efecto, se ha observado en individuos sanos una correlación positiva entre los niveles de adiponectina y los de H₂S en plasma (Jain et al., 2012).

En el hígado de ratones tratados con una dieta rica en grasa, la acumulación de lípidos se redujo tras la administración de H₂S debido a una disminución en la síntesis de ácidos grasos y un aumento de su β -oxidación (D. Wu et al., 2015). Además, en ratones tratados con una dieta aterogénica rica en grasa que no expresaban la CSE, se observó un incremento muy notable del colesterol total y el colesterol en LDL en plasma que consiguió reducirse tras la inyección intraperitoneal de H₂S (Mani et al., 2013). Todo esto podría indicar que el H₂S

mejoraría el metabolismo lipídico en el hígado reduciendo los daños derivados de la obesidad (Mani et al., 2014).

Finalmente, el H₂S es capaz de ejercer un efecto antiinflamatorio, por inhibición de citoquinas proinflamatorias, como TNF α e interleuquinas (Lo Faro et al., 2014), y una acción antioxidante, aumentando la cantidad de glutatión y las enzimas antioxidantes (Xie et al., 2016). Como consecuencia, se han observado mejoras en ambos procesos asociados a la obesidad tras la administración del H₂S en tejidos como el adiposo (Velmurugan et al., 2015), el hígado (D. Wu et al., 2015) y el riñón (Wu et al., 2016).

7.5. Sulfuro de hidrógeno y consumo de fructosa

Como se ha explicado anteriormente, la fructosa genera alteraciones metabólicas relacionadas con el desarrollo de obesidad, síndrome metabólico, resistencia a insulina y enfermedad cardiovascular (Johnson et al., 2007; Tappy, 2018; Tappy & Lê, 2010), por lo que diversos autores se han centrado en el estudio de la posible conexión entre las alteraciones en el metabolismo del H₂S y aquellas derivadas de la fructosa que pudieran explicar las patologías que se desarrollan asociadas a su consumo. De hecho, se ha descrito en animales de experimentación sometidos a dietas con fructosa, una disminución en los niveles de H₂S en plasma y una menor expresión y actividad en tejido de las enzimas de la transulfuración (Jin et al., 2015; Ling et al., 2012; Padiya et al., 2014).

Diversos estudios se han centrado en los efectos del consumo de ajo o compuestos bioactivos presentes en el mismo, sobre la resistencia a insulina o el desarrollo de enfermedad cardiovascular (Lembede et al., 2018; Padiya et al., 2014; Padiya et al., 2011). Los efectos beneficiosos del ajo (*Allium sativum*) sobre la mejora de la enfermedad cardiovascular son debidos a sus propiedades como fibrinolítico, antiagregante plaquetario, antihipertensivo y antiaterogénico (Banerjee & Maulik, 2002). El ajo contiene un gran número de compuestos sulfurados, siendo el más importante el sulfóxido de S-alil-L-cisteína (aliína) (Amagase, 2006). Estas moléculas actúan como donadores de H₂S en el organismo, siendo precisamente este gasotransmisor uno de los agentes responsables de los efectos beneficiosos asociados al consumo de ajo (Benavides et al., 2007). De esta manera, Padiya y col. observaron como la administración de un homogenado de ajo a ratas diabéticas alimentadas con fructosa consiguió mejorar la resistencia a la insulina y disminuyó los niveles séricos de glucosa, triglicéridos, ácido úrico e insulina y el estrés oxidativo en el hígado comparado con los animales que solo recibieron fructosa (Padiya et al., 2011). Además, demostraron como las ratas diabéticas alimentadas con fructosa experimentaron una disminución en los niveles séricos de H₂S y un aumento en los de NO comparado con las ratas controles y a su vez la suplementación con ajo a estos animales consiguió normalizar los niveles de ambos gases (aumentando los de H₂S y disminuyendo los de NO comparado con las ratas diabéticas). Estos datos sugieren la posible implicación del H₂S en los efectos observados tras el tratamiento con ajo. Este mismo grupo de investigación, usando el mismo modelo animal, vieron cómo la fructosa generaba hipertrofia cardiaca asociada a un incrementado estrés oxidativo en este tejido. La suplementación con el homogenado de ajo reducía estos efectos debido a la capacidad del H₂S de inhibir a NF κ B y aumentar la expresión de Nrf2 lo que permitía ejercer

Introducción general

sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes, respectivamente (Padiya et al., 2014). En otro estudio realizado con una suplementación de un 30% de fructosa en agua de bebida durante 15 meses se observaron resultados similares en el corazón, el cual presentaba hipertrofia y fibrosis cardíaca y una aumentada apoptosis debidas a una disminución en la expresión de la CSE y la 3MST y a una reducción en el H₂S en plasma, orina y corazón (Jin et al., 2015). Además, el tratamiento con dietas ricas en fructosa han conducido a una reducida expresión de la CSE en aortas de rata, generando una reducción de la vasodilatación de las aortas de animales tratados frente a las de ratas control (Ling et al., 2012).

Sin embargo, en el tejido adiposo blanco de ratas, la suplementación de una dieta con fructosa indujo un aumento en la expresión de las enzimas implicadas en la transulfuración, mostrando este efecto una correlación negativa con la captación de glucosa por este tejido (Feng et al., 2009). De la misma manera, ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa presentaron disfunción endotelial y mitocondrial en los adipocitos del mesenterio acompañada de estrés oxidativo, pero de nuevo la administración donadores de H₂S consigue atenuar estos efectos (Revenko et al., 2020).

Finalmente, durante la gestación también se han observado cambios tanto en la madre como en la descendencia asociados al H₂S en función de la presencia de diversas patologías (Guo et al., 2017; K. Wang et al., 2013) o de la dieta (Lembede et al., 2018; Tai et al., 2016). Como se ha explicado anteriormente, las enzimas de la transulfuración, principalmente la CSE, presentan una regulación a nivel epigenético que podría estar implicada en procesos de programación fetal en la descendencia (Giannakopoulou et al., 2017; Hackfort & Mishra, 2016; Dan Wu et al., 2015). Lembede y col. administraron a ratas durante la etapa neonatal agua sin aditivo, o bien agua suplementada con un 20% de fructosa o bien fructosa y S-alilcisteína (donador de H₂S presente en el ajo) y, posteriormente, en la edad adulta a los machos y las hembras se les reexpuso a fructosa (Lembede et al., 2018). En este estudio, el consumo de fructosa durante la etapa neonatal condujo a una acumulación hepática de lípidos en la edad adulta, que se vio atenuada con la suplementación de S-alilcisteína tanto en machos como en hembras (Lembede et al., 2018). Aunque en este estudio no se valoraron cambios ni en los niveles de H₂S ni en las enzimas de las transulfuración o posibles genes diana que se pudieran ver alterados, la S-alilcisteína es un donador de H₂S y este muy probablemente sea el mediador de los efectos beneficiosos observados. De hecho, en un modelo de ratas a las que se le indujo hipertensión durante la gestación o la lactancia, sus descendientes mostraron una reducida expresión de la enzima CBS en el cerebro, conjuntamente con un aumento en la presión sanguínea, una infiltración inflamatoria en el riñón y un aumento en el estrés oxidativo en el cerebro comparado con los descendientes de madres normotensas y todas estas alteraciones fueron revertidas con la administración de donadores de H₂S durante la gestación o la lactancia. De hecho, la descendencia cuyas madres recibieron donadores de H₂S presentó un menor estrés oxidativo evidenciado por una menor expresión de la enzima NADPH oxidasa en el cerebro (Guo et al., 2019; Tai et al., 2016; Tain et al., 2016), lo cual se corresponde con los efectos beneficiosos descritos del H₂S (Xie et al., 2016). Estos efectos sobre la descendencia pueden deberse a varios hechos. En primer lugar, podría encontrarse alterada la angiogénesis y funcionalidad de la placenta viéndose afectado en consecuencia el feto (K. Wang et al., 2013). En segundo lugar, podría tener lugar una regulación epigenética. De hecho, los

descendientes de madres hipertensas presentaron una menor metilación del receptor de angiotensina II 1b (AT1b), y, por tanto, una mayor expresión de esta proteína en el riñón, mientras que esta metilación se vio incrementada y su expresión reducida en los descendientes de madres que recibieron NaHS (donador de H₂S) durante la gestación o la lactancia lo que permitió mejorar la presión sanguínea de los descendientes (Guo et al., 2017).

Estos resultados nos permiten ver cómo cambios en la producción de H₂S debidos al consumo de fructosa podrían ser los responsables de las alteraciones asociadas con la enfermedad cardiovascular provocadas por este azúcar y cómo la suplementación con derivados o donadores del H₂S podría paliar sus efectos. Cabe destacar que estos estudios se han realizado, en la mayoría de los casos, con dosis de fructosa muy elevadas y durante tiempos muy prolongados que no se corresponden con el consumo real de la población, por lo que sería interesante comprobar si estos efectos persisten a dosis de fructosa menores. Además, poco se sabe de los mecanismos que relacionan el consumo materno de fructosa con alteraciones en el metabolismo del H₂S y su implicación en el desarrollo de patologías en la descendencia.

Objetivos generales

Objetivos generales

Los antecedentes expuestos anteriormente nos permiten establecer la hipótesis de que la ingesta materna de fructosa podría ejercer cambios en los fetos a nivel epigenético, metabólico y en el estrés oxidativo. Además, teniendo en cuenta estudios previos, cabe la posibilidad de que dichos cambios en los descendientes de madres-fructosa provoquen respuestas muy distintas a los descendientes de madres control, al ser sometidos a un ambiente diferente al que tuvieron durante su etapa intrauterina. Por ello, en la presente Tesis Doctoral nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar si la exposición a fructosa en la gestación provoca en los fetos cambios metabólicos, epigenéticos y a nivel de estrés oxidativo.
2. Estudiar si los cambios generados por la fructosa en los fetos modifican la respuesta en los descendientes, una vez adultos, a situaciones conocidas de favorecer la aparición de síndrome metabólico como son: la ingesta de fructosa líquida con o sin una dieta occidental (rica en colesterol). Además, comprobar si los efectos observados con la fructosa son específicos de este carbohidrato usando un epímero de la misma, la tagatosa. Así como, elucidar los mecanismos implicados a nivel de epigenética, estrés oxidativo, metabolismo glucídico y lipídico y de señalización hormonal (leptina e insulina).
3. Estudiar si la gestación, situación conocida de producir cambios importantes en el metabolismo glucídico y lipídico y en la señalización hormonal, provoca en las descendientes de madres-fructosa efectos diferentes a las hijas de madres control, tanto en ellas como en sus fetos.

Objetivos generales

Materiales y Métodos Generales

1. Diseño experimental

1.1. Animales y condiciones ambientales

Los animales utilizados en los experimentos fueron ratas de la cepa Sprague-Dawley y suministradas por Charles River (Massachusetts, EEUU). Todo el manejo y cuidado de los animales se realizó en las dependencias del animalario de la Universidad CEU San Pablo, con la supervisión de dicho servicio. Los protocolos fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad CEU San Pablo, Madrid (número de referencia: 10/206458.9/13 y 10/042445.9/19). En concreto, se usaron hembras de 200-240 g de peso que fueron cruzadas con machos. Tras obtener un frotis positivo se les administró durante toda la gestación agua sin aditivo o agua suplementada con un 10% de fructosa (p/v) *ad-libitum*. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar de rata (Teklad Global 14% *Protein Rodent Maintenance Diet*, Envigo, EEUU) con la composición nutricional que figura en la Tabla 3.

Tabla 3: Composición nutricional dieta estándar de rata

| Macronutriente | Porcentaje (%) |
|---------------------|----------------|
| Proteínas | 14,3 |
| Grasas | 4 |
| Hidratos de carbono | 48 |
| Fibra | 4,1 |
| Cenizas | 4,7 |

Los animales estuvieron sometidos a ciclos de luz constantes de 12 horas de luz/oscuridad, una temperatura constante de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, y una humedad relativa de $55 \pm 10\%$.

Los grupos experimentales específicos, así como el diseño experimental específico, serán detallados en los capítulos correspondientes.

a) Procedimiento 1

Brevemente, como se ha descrito con anterioridad (Rodríguez et al., 2016a; Rodríguez et al., 2016b), ratas Sprague-Dawley hembra se alimentaron *ad libitum* con comida estándar de rata. Tras quedar preñadas, se dividieron en 3 grupos: control, fructosa y glucosa. Las ratas control recibieron agua sin aditivo mientras que las ratas fructosa y glucosa tomaron agua con un 10% (p/v) de fructosa o de glucosa, respectivamente. Tras el parto se ajustó la camada a 9 crías, madres y crías se alimentaron con dieta estándar de rata *ad libitum* y agua sin aditivo. El día 21 de edad se finalizó el periodo de lactancia y las crías se separaron por géneros.

Parte de la descendencia macho y hembra se les dejó crecer hasta el día 261 de edad administrándoles agua sin ningún tipo de aditivo y comida estándar de rata *ad-libitum* (Figura 22A). Es importante indicar que estos animales no volvieron a consumir fructosa a lo largo de su vida.

Materiales y métodos generales

Por otro lado, el día 240 de edad la otra parte de la descendencia macho y hembra, descendiente de los 3 grupos experimentales de madres, se separó de manera aleatoria y se les comenzó a administrar comida estándar y agua suplementada con un 10 % de fructosa (p/v) hasta el día 261 de edad. Además, se incluyó un cuarto grupo experimental en el cual las madres y la descendencia únicamente bebieron agua sin aditivo. El día 261 tras el parto se sacrificó a los animales macho y hembra y se obtuvo el plasma, el hígado y el tejido adiposo lumbar y epididimal (machos) (Figura 22B).

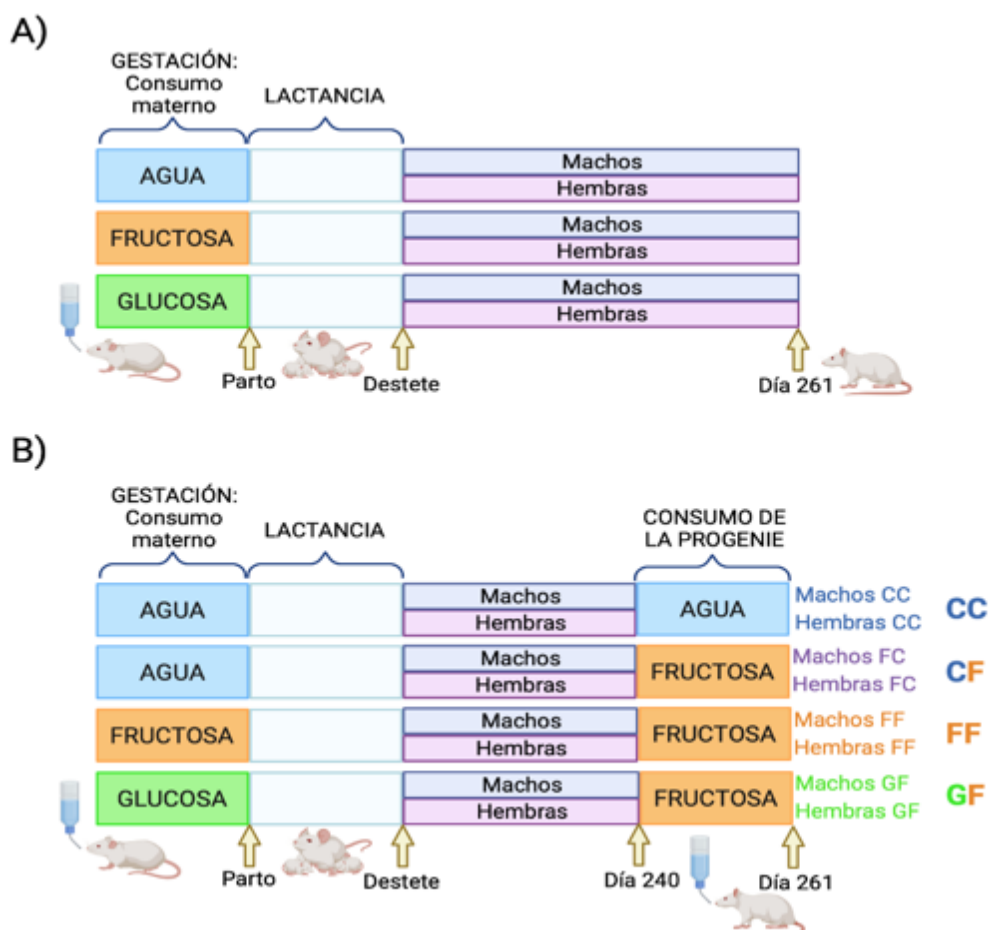


Figura 22: Esquema del diseño experimental del procedimiento 1. CC: Machos y hembras adultos de 261 días de edad, cuyas madres recibieron agua sin aditivo durante la gestación y que tomaron agua sin aditivo desde el día 240 al 261 de edad. CF: Machos y hembras adultos de 261 días de edad, cuyas madres recibieron agua sin aditivo durante la gestación y que tomaron agua suplementada con fructosa al 10 % (p/v) desde el día 240 al 261 de edad. FF: Machos y hembras adultos de 261 días de edad, cuyas madres recibieron agua suplementada con fructosa al 10% (p/v) durante la gestación y que tomaron agua suplementada con fructosa al 10 % (p/v) desde el día 240 al 261 de edad. GF: Machos y hembras adultos de 261 días de edad, cuyas madres recibieron agua suplementada con glucosa al 10% (p/v) durante la gestación y que tomaron agua suplementada con fructosa al 10 % (p/v) desde el día 240 al 261 de edad. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

Las muestras correspondientes a estos animales fueron amablemente cedidos por la Dra. Lourdes Rodríguez Bilbao y formaron parte de su tesis doctoral.

b) Procedimiento 2

Ratas hembra Sprague-Dawley se cruzaron con machos y a lo largo de toda la gestación, se les permitió el acceso libre a agua sin aditivo (Control) o bien agua suplementada con un 10% de fructosa (p/v) (Fructosa) (generación F0). Tras parir, se realizó un ajuste de las camadas a 9 crías y se les administró agua sin aditivo durante la lactancia. Cuando las crías alcanzaron los 20 días de edad se destetaron y se les dejó crecer, permitiéndoles el acceso a agua sin aditivo (generación F1). Las hembras F1 a las 8 semanas de edad se cruzaron con machos controles y se dividieron, como se describe en la Figura 23, creándose así tres grupos experimentales:

1. Gestantes F1 cuyas madres consumieron agua durante la gestación y ellas consumieron agua durante la gestación (Control-Control, CC).
2. Gestantes F1 cuyas madres consumieron agua conteniendo fructosa durante la gestación y ellas consumieron agua sin aditivo durante la gestación (Fructosa-Control, FC).
3. Gestantes F1 cuyas madres consumieron agua con fructosa durante la gestación y ellas consumieron agua suplementada con fructosa (Fructosa-Fructosa, FF).

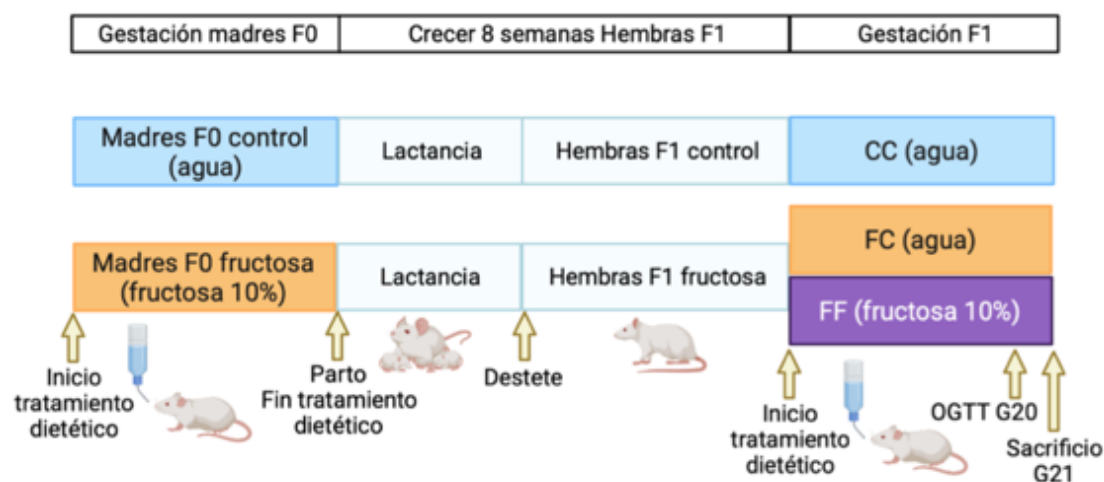


Figura 23: Diseño experimental del procedimiento 2. CC: Ratas gestantes que tanto ellas como sus madres consumieron agua durante la gestación. FC: Ratas gestantes cuyas madres consumieron fructosa (10%) durante la gestación y ellas tomaron agua sin aditivo durante su gestación. FF: ratas gestantes que tanto ellas como sus madres consumieron fructosa (10%) durante la gestación. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

A una parte de las gestantes (5 animales por grupo) se les realizó un Test de Tolerancia Oral a la Glucosa (OGTT) la mañana del día 20 de gestación en una situación de ayuno (12 h). En primer lugar, se tomó sangre de la cola para determinar los valores basales de glucosa e insulina. Posteriormente, un bolo de glucosa (2 g/kg) se administró de manera oral a los animales. Tras ello, se tomaron muestras de sangre de la cola a los 7,5; 15; 22,5; 30 y 60 minutos tras la administración de la glucosa en tubos de EDTA. La sangre fue centrifugada y el

Materiales y métodos generales

plasma se almacenó a -80°C hasta ser procesado. Tras la medida de glucosa e insulina se calculó el área bajo la curva de ambos parámetros.

El resto de las gestantes (5 hembras por grupo experimental) fueron sacrificadas en el día 21 de gestación, y se recogió el plasma, hígado y placentas. Los fetos se pesaron y fueron sacrificados para obtener el plasma y el hígado. En este caso, se llevó a cabo un *pool* (mezcla de varias alícuotas) de los plasmas e hígados de fetos procedentes de la misma madre.

c) Procedimiento 3

Ratas hembra Sprague-Dawley se cruzaron con machos y a lo largo de toda la gestación, se les permitió el acceso libre a agua sin aditivo (Control) o bien agua suplementada con un 10% de fructosa (p/v) (Fructosa) (generación F0). Tras parir, se realizó un ajuste de las camadas a 9 crías y se les administró agua sin aditivo durante la lactancia. Cuando las crías alcanzaron los 20 días de edad se destetaron y se les dejó crecer, permitiéndoles el acceso a agua sin aditivo (generación F1). Los machos F1 a los tres meses de edad, procedentes de madres control o fructosa, se separaron en 4 grupos experimentales según el tratamiento dietético recibido (como se describe en la Figura 24):

1. Control: agua sin aditivos.
2. Fructosa: agua suplementada con 10% fructosa (p/v).
3. Tagatosa: agua suplementada con 10% tagatosa (p/v).
4. Fructosa + Colesterol: agua suplementada con 10% fructosa (p/v) y dieta estándar de rata suplementada con un 2% de colesterol. La dieta suplementada con colesterol fue una dieta personalizada *Tecklad Custome Diets* (TD.07841, Envigo, EEUU) que tiene como base la dieta estándar *Tecklad Global 16% Protein Rodent Diet* (Envigo, EEUU) con un 2% de colesterol suplementado. La composición de dicha dieta figura en la Tabla 4.

Tabla 4: Composición nutricional de la dieta estándar de rata suplementada con un 2% de colesterol.

| Macronutriente | Porcentaje (%) |
|---------------------|----------------|
| Proteínas | 15,9 |
| Grasas | 3,5 |
| Hidratos de carbono | 51,7 |
| Fibra | 3,3 |
| Cenizas | 4,9 |
| Colesterol | 2 |

El tratamiento se realizó durante 21 días, tras el cual las ratas fueron sacrificadas. Se obtuvo el plasma y los diferentes tejidos (hígado, tejido adiposo lumbar e íleon), así como las dos últimas heces contenidas en el colon.

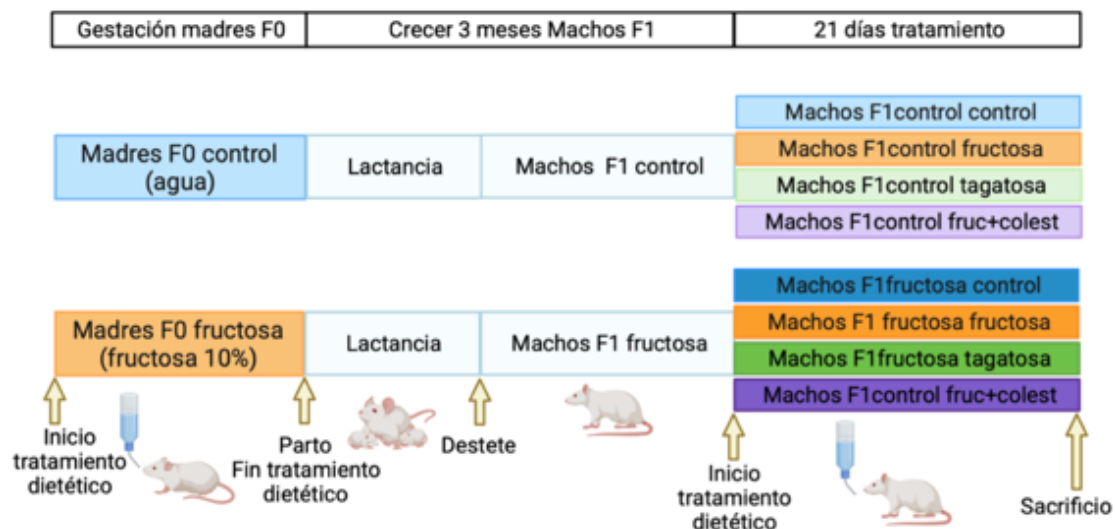


Figura 24: Diseño experimental del procedimiento 3. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

1.2. Registro de la ingesta de comida, bebida y peso durante el tratamiento dietético

Los animales pertenecientes al mismo grupo experimental se distribuyeron en grupos de 3-4 animales por jaula, y siempre se alimentaron *ad libitum* y con libre acceso a agua. Cada dos días se llevó a cabo el registro de la cantidad de comida y el volumen de líquido consumido por jaula para controlar la ingesta sólida de comida y bebida.

El agua que contenía fructosa, glucosa o tagatosa se renovó cada dos días. Además, la dieta sólida suplementada con colesterol se almacenó y se proporcionó a los animales siguiendo las indicaciones suministradas por el fabricante (Envigo, EEUU).

Al final de cada tratamiento se llevó a cabo un estudio del área bajo la curva de la ingesta de bebida y comida sólida. Para ello se tuvo en cuenta que el aporte calórico de las soluciones de fructosa y glucosa al 10% (p/v) es de 4 Kcal/g (Nelson et al., 2008) y el aporte de la solución de tagatosa al 10% es de 1,5 Kcal/g (Roy et al., 2018). En cuanto a la dieta sólida, se tomó la información dada por el fabricante de dichas dietas. De esta manera, la dieta estándar de rata (Teklad Global 14% *Protein Rodent Maintenance Diet*, Envigo, EEUU) aporta 2,9 Kcal/g y la dieta suplementada con un 2% de colesterol (TD.07841, Envigo, EEUU) 3 Kcal/g.

Por otro lado, los animales fueron pesados al inicio de cada tratamiento, a la mitad y justo antes de llevar a cabo el sacrificio. El incremento de peso se calculó como la diferencia entre el peso antes del sacrificio y el peso al inicio del tratamiento dietético.

1.3. Sacrificio y toma de muestras

El sacrificio de los animales fue llevado a cabo el día señalado en función del procedimiento experimental. A los animales se les sometió a un ayuno de 2 horas previo al sacrificio. Previamente, los animales fueron sedados bajo corriente de CO₂.

La sangre fue recogida en tubos Vacutainer® (BD, Nueva Jersey, EEUU) con EDTA-K₂. Para obtener el plasma, las muestras fueron centrifugadas durante 20 minutos a 3000 rpm y

Materiales y métodos generales

4°C. Este se fraccionó en alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su valoración.

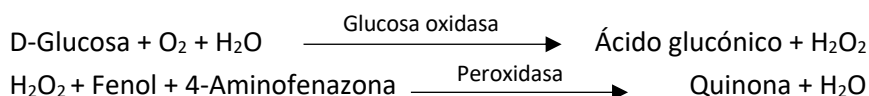
Los tejidos obtenidos (que se especifican en cada capítulo) fueron congelados con nitrógeno líquido tras su extracción. A continuación, se pesaron y almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

2. Parámetros metabólicos

2.1. Determinaciones en plasma

a) Determinación de glucosa

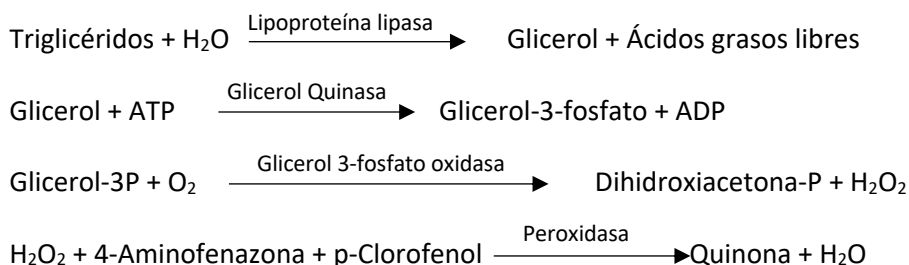
La glucosa plasmática se determinó mediante un kit enzimático colorimétrico a tiempo final, Glucose-LQ GOD-POD Kit (Spinreact, Gerona, España) basado en las siguientes reacciones enzimáticas acopladas que dan lugar a un compuesto coloreado de manera directamente proporcional a al contenido de glucosa:



Las determinaciones se realizaron en un autoanalizador Saturno 180 (Crony Instruments, Roma, Italia) utilizando como calibrador Spintrol H Cal (Spinreact, Gerona, España). Para asegurar que las medidas eran correctas se utilizó un control normal Spintrol H Normal (Spinreact, Gerona, España) y un control patológico Spintrol H Patológico (Spinreact, Gerona, España).

b) Determinación de triglicéridos

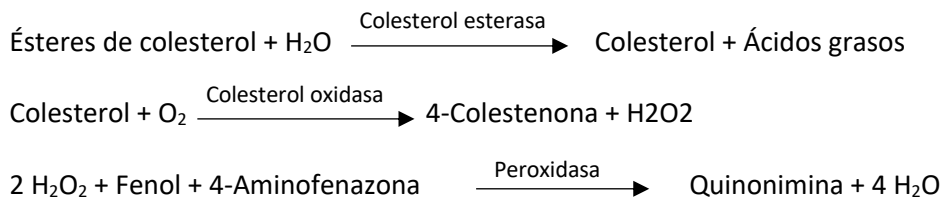
Los triglicéridos plasmáticos se determinaron mediante un método enzimático colorimétrico, utilizando el kit Triglycerides GPO-POD (Spinreact, Gerona, España). Dicho método está basado en las siguientes reacciones enzimáticas acopladas:



Las determinaciones se realizaron en un autoanalizador Saturno 180 (Crony Instruments, Roma, Italia) utilizando como calibrador Spintrol H Cal (Spinreact, Gerona, España). Para asegurar que las medidas eran correctas se utilizó un control normal Spintrol H Normal (Spinreact, Gerona, España) y un control patológico Spintrol H Patológico (Spinreact, Gerona, España).

c) Determinación de colesterol

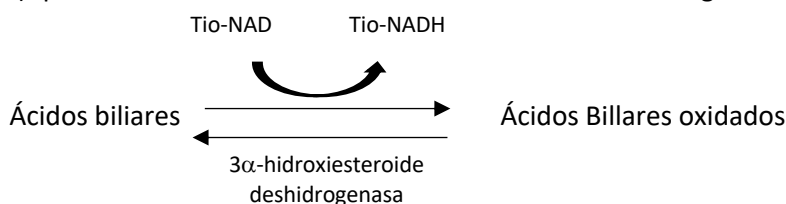
El colesterol plasmático se determinó mediante un ensayo enzimático colorimétrico a tiempo final con el kit Cholesterol CHOD-POD (Spinreact, Gerona, España), que utiliza las siguientes reacciones enzimáticas acopladas:



Las determinaciones se realizaron en un autoanalizador Saturno 180 (Crony Instruments, Roma, Italia) utilizando como calibrador Spintrol H Cal (Spinreact, Gerona, España). Para asegurar que las medidas eran correctas se utilizó un control normal Spintrol H Normal (Spinreact, Gerona, España) y un control patológico Spintrol H Patológico (Spinreact, Gerona, España).

d) Determinación de ácidos biliares totales

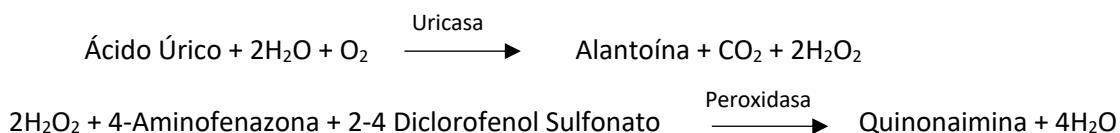
Los ácidos biliares se midieron mediante el kit Total Bile Acids (Spinreact, Gerona, España) que se basa en la formación de Tio-NADH mediante la siguiente reacción:



Las determinaciones se realizaron en un autoanalizador Saturno 180 (Crony Instruments, Roma, Italia) utilizando como calibrador el calibrador de ácidos biliares totales (Spinreact, Gerona, España).

e) Determinación de ácido úrico

El ácido úrico se midió usando el kit Uric Acid (Spinreact, Gerona, España), el cual se trata de un ensayo enzimático colorimétrico a tiempo final basado en las siguientes reacciones:

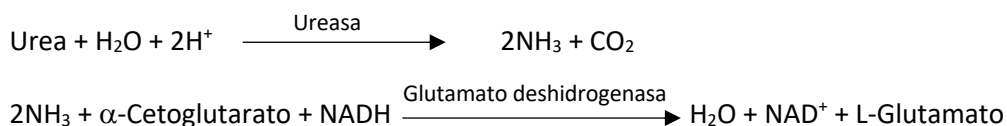


Las determinaciones se realizaron en un autoanalizador Saturno 180 (Crony Instruments, Roma, Italia) utilizando como calibrador Spintrol H Cal (Spinreact, Gerona, España). Para asegurar que las medidas eran correctas se utilizó un control normal Spintrol H Normal (Spinreact, Gerona, España) y un control patológico Spintrol H Patológico (Spinreact, Gerona, España).

Materiales y métodos generales

f) Determinación de urea

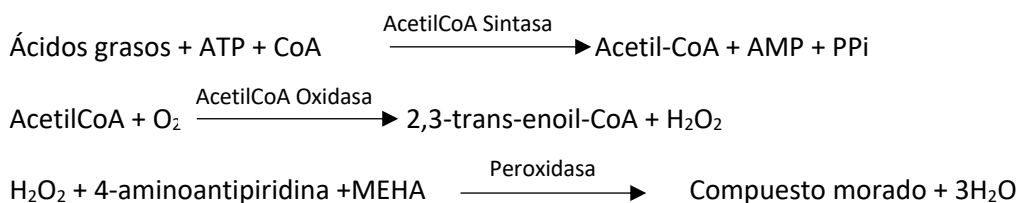
Los niveles de urea se midieron mediante el kit Urea-UV (Spinreact, Gerona, España), el cual se trata de un ensayo enzimático cinético basado en las siguientes reacciones:



Las determinaciones se realizaron en un autoanalizador Saturno 180 (Crony Instruments, Roma, Italia) utilizando como calibrador Spintrol H Cal (Spinreact, Gerona, España). Para asegurar que las medidas eran correctas se utilizó un control normal Spintrol H Normal (Spinreact, Gerona, España) y un control patológico Spintrol H Patológico (Spinreact, Gerona, España).

g) Determinación de ácidos grasos libres

Los ácidos grasos libres se midieron utilizando el kit enzimático colorimétrico a tiempo final NEFA HR (2) ACS·ACOD (Wako, Japon) basado en las siguientes reacciones:



Las medidas se realizaron en placa de 96 pocillos. Como calibrador se utilizó una solución de 1 mmol/L de ácido oleico NEFA Estándar Solution (WAKO, Japon) con la que se creó una recta de calibrado con las siguientes concentraciones: 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 y 1 mmol/L. Las muestras se diluyeron 1/2. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 550 nm en un lector de placas SpectroStar Nano (BMG Labtech, Alemania).

h) Determinación de Insulina

Los niveles de insulina en plasma se midieron mediante un ELISA (del inglés: *enzyme-linked immunosorbent assay*). En concreto, se utilizó el kit Rat Insulin ELISA (Mercodia, Suecia) siguiendo el protocolo especificado por el fabricante. Como control del ensayo se utilizó *Diabetes Antigen Control Rat & Mouse Medium* (Mercodia, Suecia) con una concentración conocida de insulina. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas SpectroStar Nano (BMG Labtech, Alemania).

i) Concentración de Leptina

La concentración de leptina se determinó mediante el kit de *ELISA Mouse & Rat Leptin ELISA Kit* (Biovendor, República Checa) siguiendo el protocolo especificado por el fabricante. Las muestras de plasma de rata adulta se diluyeron 1/6 y los plasmas de fetos 1/3. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas SpectroStar Nano (BMG Labtech, Alemania).

j) Concentración de Adiponectina

Los niveles de adiponectina se midieron mediante el kit Rat Adiponectin ELISA (Merck, Millipore, EEUU). Para ello se llevó a cabo el protocolo especificado por el fabricante. Las muestras de plasma de rata adulta se diluyeron 1/600 y los plasmas de fetos se diluyeron 1/400. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas SpectroStar Nano (BMG Labtech, Alemania).

k) Concentración de FGF21

La concentración de FGF21 se determinó mediante el kit Mouse/Rat FGF-21 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, EEUU) siguiendo las indicaciones marcadas por el fabricante. Los plasmas fueron diluidos 1/2 para su análisis. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas SpectroStar Nano (BMG Labtech, Alemania).

2.2. Determinaciones en tejido

a) Determinación de glucógeno

Para la determinación de glucógeno en hígado se pesaron entre 100 y 150 mg de tejido que se adicionaron a 500 μ L de KOH 30% para la degradación del tejido a 100°C durante 20 minutos. Tras dejar enfriar los tubos, el glucógeno se precipitó con 1 mL de etanol absoluto frío y se dejó 24 horas a -20°C. Para la eliminación de impurezas se centrifugaron las muestras a 3000 rpm 15 min 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido con 500 μ L agua destilada. El proceso de precipitación del glucógeno y posterior lavado se repitió 2 veces más siguiendo la misma metodología. A continuación, se llevó a cabo una hidrólisis ácida del glucógeno a glucosa con 500 μ L de HCl 2N durante 90 minutos a 100°C. Posteriormente, se neutralizó con 500 μ L de NaOH 2N y las muestras fueron diluidas 1/20 para la determinación de glucosa utilizando un kit enzimático colorimétrico a tiempo final Glucose-LQ GOD-POD Kit (Spinreact, Gerona, España). Para realizar los cálculos se tuvo en cuenta que, por cada molécula de glucosa liberada del glucógeno, se produce la entrada de una molécula de agua. Dado que 1 mol de glucosa pesa 180 g y 1 mol de agua 18 g la relación es:

$$\frac{(180 - 18)g \text{ de glucógeno}}{180 g \text{ de glucosa}} = 0,9$$

Este factor se multiplica por el valor de glucosa de las muestras para obtener la concentración de glucógeno.

b) Extracción de lípidos por el método de Folch

Para determinar la concentración de lípidos en tejido se llevó a cabo una extracción de lípidos por el método de Folch (Folch et al., 1957). Para ello, se pesaron aproximadamente 200 mg de hígado, íleon o heces y 50 mg de tejido adiposo, a los que se le añadieron 3 mL de cloroformo-metanol 2:1 con butilhidroxitolueno (BHT) (50 mg/L). Tras 4 horas de rotación en rotatubos, se tomó el sobrenadante utilizando un algodón como filtro. Para asegurar la completa extracción de los lípidos se repitió este paso dos veces más, pero realizando 3 horas de rotación. El sobrenadante se enrasó a 10 mL con cloroformo-metanol 2:1 y BHT (50 mg/L) y

Materiales y métodos generales

se realizaron tres lavados, primero con agua y después con cloruro sódico (NaCl) al 2%. Para ello, se añadieron 2,5 mL de agua o NaCl a los tubos con el extracto, se rotaron 15 minutos en rotatubos y se centrifugaron a 25 °C a 1.000 rpm durante 10 minutos. La fase superior y la interfase se retiraron con pipeta Pasteur a vacío, quedándonos con la fase orgánica inferior que contenía los lípidos. Tras cada lavado los tubos se enrasaron a 10 mL con metanol y BHT (10 mg/L).

c) Determinación de lípidos totales en tejido

Los lípidos totales se determinaron por diferencia de pesada. De esta manera, tubos de vidrio de 5 mL fueron pesados vacíos y, a continuación, se añadieron 4 mL del extracto lipídico. El solvente orgánico fue evaporado utilizando un SpeedVac® (ThermoFisher, EEUU). Cuando los tubos estuvieron completamente secos fueron nuevamente pesados y se calcularon los lípidos totales por diferencia de pesadas.

d) Determinación de colesterol en tejido

Cuatro mL del extracto lipídico se transvasaron a tubos de 5 mL y se evaporó a sequedad el solvente orgánico utilizando un Speed Vac® (ThermoFisher, EEUU). Cuando los tubos quedaron completamente secos los lípidos fueron resuspendidos en 250 µL de isopropanol. El colesterol se determinó utilizando el *kit Cholesterol CHOD-POD* (Spinreact, Gerona, España). Para la realización de la recta de calibrado se utilizó un patrón de colesterol disuelto en isopropanol 100 mg/dL. Los puntos de la recta utilizados fueron: 0; 12,5; 25; 50; 75 y 100 mg/dL. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos añadiendo 20 µL de muestra o estándar por duplicado y 250 µL de reactivo de colesterol. Tras incubarlo 5 min a 37°C la absorbancia fue medida en un lector de placas SpectroStar Nano (BMG Labtech, Alemania) a 505 nm.

e) Determinación de triglicéridos en tejido

La medida de triglicéridos en tejido se llevó a cabo siguiendo el protocolo propuesto por Carr y col. (Carr et al., 1993) con modificaciones. Así, a 300-600 µL del extracto lipídico se le añadió 1 mL de Tritón X-100 1,25% en cloroformo. El solvente fue evaporado a sequedad en un SpeedVac® (ThermoFisher, EEUU). A continuación, las muestras fueron resuspendidas en 500 µL de agua destilada e incubadas a 37°C durante 15 min. Tras ello, los triglicéridos fueron medidos usando el *kit Triglycerides GPO-POD* (Spinreact, Gerona, España). Para la realización de la recta de calibrado se creó un patrón de Trioleína disuelta en cloroformo 200 µg/mL y se utilizaron los siguientes puntos de la recta: 0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 y 200 µg/mL. Los puntos de la recta fueron sometidos al mismo tratamiento previo. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos añadiendo 50 µL de muestra o estándar por duplicado y 250 µL de reactivo de triglicéridos. Tras incubarlo 5 min a 37°C la absorbancia fue medida en un lector de placas SpectroStar Nano (BMG Labtech, Alemania) a 505 nm.

f) Determinación de glucosa

Para determinar glucosa en tejido, 100 mg de los diferentes tejidos fueron homogenados con 1,2 mL de PBS (del inglés: *Phosphate Buffered Saline*) utilizando un

TissueLyser LT (Qiagen, EEUU). Tras una centrifugación durante 30 minutos a 4°C y 10000 rpm se recogió el sobrenadante, los cuales fueron desproteinizados con ácido tricloroacético al 20% y neutralizados con NaOH 2%. Los niveles de glucosa fueron determinados en los homogenados desproteinizados utilizando el kit Glucose-LQ GOD-POD Kit (Spinreact, Gerona, España). Las medidas se realizaron en una placa de 96 pocillos por duplicado usando 20 µL de muestra y 250 µL de reactivo. La absorbancia se midió a 505 nm en un lector de placas SpectroStar Nano (BMG Labtech, Alemania). Para la realización de la recta de calibrado se utilizó un estándar de glucosa con las siguientes concentraciones conocidas: 0, 5, 10, 15, 20,25 y 30 mg/dL.

g) Determinación de ácidos biliares

Homogenados, preparados de la misma manera que en el apartado anterior, de hígado e íleon en PBS fueron utilizados para la medida de ácidos biliares en tejido utilizando el kit Total Bile Acids (Spinreact, Gerona, España). Para ello se utilizaron 10 µL de homogenado, 750µL de R1 y 250µL de R2. La medida se realizó a 405 nm en un equipo SpinLab (Spinreact, Gerona, España). Como calibrador se utilizó el calibrador de ácidos biliares totales (Spinreact, Gerona, España) y se procedió con el igual que con las muestras.

En el caso de la medida en heces, estas se secaron hasta conseguir un peso constante durante dos días a temperatura ambiente. Posteriormente, se pesaron 50 mg de heces secas y se llevó a cabo una extracción de los ácidos biliares en 500 µL de metanol. Los extractos fueron filtrados utilizando un papel Whatman® n°2 acoplado a una jeringuilla y se utilizaron para la medida de ácidos biliares llevando a cabo el mismo protocolo descrito anteriormente.

h) Determinación de proteínas

La medida de proteínas se realizó en los homogenados en PBS utilizando el *kit Total proteins- Biuret* (Spinreact, Gerona, España), el cual es un ensayo a punto final basado en la reacción de las proteínas con sales de cobre en medio alcalino para general un compuesto de color violeta intenso que absorbe a 540 nm. Las medidas se realizaron en una placa de 96 pocillos por duplicado usando 25 µL de muestra y 250 µL de reactivo. La absorbancia se midió a 540 nm en un lector de placas SpectroStar Nano (BMG Labtech, Alemania). Para la realización de la recta de calibrado de crearon soluciones crecientes de proteínas con las siguientes concentraciones: 0; 7; 14, 28 y 70 mg/mL.

3. Parámetros moleculares

3.1. Estudio de la expresión génica del ARNm

a) Homogenización de los tejidos y extracción del ARN total

Para la extracción del ácido ribonucleico (ARN) total se utilizó el kit Ribopure™ (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). Para ello, se procedió a la homogenización de 100 mg de los diferentes tejidos utilizando un TissueLyser LT (Qiagen, EEUU) y *TRI Reagent*® (Invitrogen,

Materiales y métodos generales

ThermoFisher., EEUU) que gracias al fenol y tiocianato de guanidina inactiva las nucleasas y lisa las células. A continuación, las muestras se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente para romper los complejos nucleoproteicos. Tras ello, se centrifugó el homogenado a 16.000 xg a 4°C durante 10 minutos. Después, se añadió al sobrenadante bromocloropropano (Fluka, EEUU), el cual produce la separación de ARN en la fase acuosa superior, y las proteínas y el ADN en la interfase y fase orgánica inferior. Para ello las muestras fueron nuevamente centrifugadas a 16.000 xg a 4°C durante 10 minutos. La fase superior, que contiene el ARN, fue recogida para realizar la purificación final del mismo.

b) Purificación del ARN

La purificación final del ARN se realizó por unión de este a filtros de fibra de vidrio y tras varios lavados y su posterior elución con un tampón bajo en sales. Brevemente, 600 µL procedentes de la extracción del ARN del apartado anterior, se transfirieron a un cartucho con filtro del kit Ribopure™ (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU) previamente insertado en un tubo Eppendorf limpio. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 13.500 xg y a temperatura ambiente durante 30 segundos y se descartó el líquido filtrado, ya que el ARN se queda unido al filtro del cartucho. Seguidamente, se añadieron 500 µL de solución de lavado (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU) al filtro y se centrifugaron los tubos en las condiciones anteriores, eliminando de nuevo el filtrado. El lavado fue repetido dos veces para asegurar la completa eliminación de las impurezas. Los cartuchos se transfirieron a un tubo limpio y se añadieron 100 µL de tampón de elución (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). Se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos y, seguidamente, se centrifugaron a 12.000 xg y temperatura ambiente durante 30 segundos. El filtrado resultante contenía el ARN total de la muestra.

c) Cuantificación, pureza e integridad del ARN

Para conocer la concentración y pureza del ARN total obtenido se utilizó un NanoDrop® One (ThermoFisher., EEUU). La pureza se determina mediante la relación de absorbancias a 260 y 280 nm (contaminación con proteínas) y 260 y 230 nm (contaminación con solventes orgánicos). Cuanto más cercana a 2,0 sean ambas relaciones de absorbancia, mayor será la pureza del ARN obtenido. Nuestras muestras fueron consideradas como válidas cuando presentaban una relación entre 1.8-2.0. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

Para comprobar la integridad del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se realizó un gel de agarosa al 2% teñido con Red Safe™ (iNtRON Biotechnology, Corea del Sur) que se cargó con 500 ng de ARN y fue sometido a 90 V durante 20 minutos para la reparación del ARN. Las bandas del gel correspondientes al ARN, 18S y 28S (ARNs ribosomales mayoritarios en la célula) se observaron bien diferenciadas y nítidas, lo que nos aseguraba que el ARN no estaba degradado. Además, la relación de intensidades correspondientes a las bandas de ARN28S /ARN18S, presentaba en todos los casos un valor entre 1,5 y 2,0, lo que corresponde a una correcta integridad de ARN. Un ejemplo de los geles obtenidos puede observarse en la Figura 25.



Figura 25: Gel de agarosa para comprobar la integridad del ARN obtenido. Las bandas más intensas corresponden a los ARN ribosomales 28S y 18S

d) Tratamiento con DNasa

La extracción de ARN con sales de guanidinio y solventes orgánicos puede dejar trazas de ADN que pueden interferir con los ensayos realizados posteriormente. Por esa razón las muestras fueron tratadas con un tratamiento riguroso con el kit *Turbo DNA-free*TM (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). Brevemente, 10 μg del ARN obtenido se le añadió 3 μL de 10X Turbo DNase Buffer, 3 μL de Turbo DNase (2 U/ L) y agua libre de RNasas hasta un volumen final de 30 μL . Tras incubar la mezcla a 37°C durante 30 minutos, la DNasa fue inactivada añadiendo 6 μL de *DNase Inactivation Reagent* e incubándola a temperatura ambiente 2 minutos. Para eliminar el reactivo de inactivación los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente a 16.000 xg durante 2 minutos. El sobrenadante, que contiene el ARN libre de ADN, se trasvasó a tubos nuevos y se determinó la concentración de ARN siguiendo el mismo protocolo explicado en el apartado anterior.

Para asegurar la completa eliminación del ADN de las muestras se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Si la muestra se encuentra completamente libre de ADN, la polimerasa no va a amplificar las regiones del gen de referencia RPS29 delimitadas por sus cebadores. Para asegurar que la PCR se ha llevado a cabo de manera correcta junto con las muestras se procesó un control positivo (muestra de ADN complementario 5 ng/ μL) y un control negativo (agua destilada). Para llevar a cabo la PCR se utilizó 125 ng de ARN a los que se les adicionó 12,5 μL de *NZYTaq II 2x Green Master Mix* (NZYTech, Portugal), 2 μL de cebadores F y R de RPS29 (10 μM) y agua destilada hasta un volumen final de 25 μL . *NZYTaq II 2x Green Master Mix* (NZYTech, Portugal) es una mezcla lista para su uso que contiene Taq Polimerasa, dNTPs, tampón para la PCR, MgCl_2 y tampón de carga (con 2 colorantes, uno azul y otro amarillo). Las condiciones de la PCR se especifican en la Tabla 5 y fueron realizadas en un termociclador iCycler (Bio-Rad, California, EEUU).

Tabla 5: Protocolo de la PCR de comprobación para RPS29.

| Paso | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|----------------------------------|-------------|-------------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95°C | 3 minutos | 1 |
| Amplificación | 95°C | 30 segundos | 30 |
| | 68°C | 1 minuto | |
| | 72°C | 1 minuto | |
| Extensión final | 72°C | 10 minutos | 1 |

Materiales y métodos generales

Tras la realización de la PCR las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 2% teñido con Red Safe™ (iNtRON Biotechnology, Corea del Sur) y fueron sometidas a electroforesis a 120V. Los resultados se visualizaron en un transiluminador UVIDoc System con cámara incorporada (Uvitec, Reino Unido), utilizando luz ultravioleta a 312 nm. La completa eliminación del ADN se aseguró con la ausencia de banda del producto de PCR en las muestras como puede verse en la Figura 26.

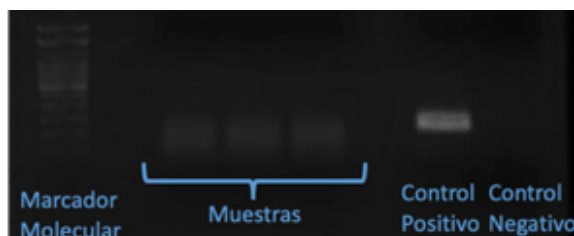


Figura 26: Gel de comprobación de la eliminación completa del ADN contaminante. Tamaño esperado del producto de amplificación RPS29: 236 pares de bases. Marcador molecular cuya primera banda es de 100 pb.

e) Retrotranscripción del ARNm

Para poder llevar a cabo los estudios de expresión génica el ARN mensajero (ARNm) tiene que ser retrotranscrito a ADN complementario (ADNc), para ello se utilizó el kit *SuperScript® II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, EEUU). Brevemente, a 2,5 ng de ARN tratado con DNasa (para muestras de hígado, placenta e íleon) o 1 ng de ARN de muestras de tejido adiposo se le adicionó 1 µL de oligo d(T) 70 µM (Sigma Chemical Co., EEUU) y agua ultrapura estéril hasta un volumen final de 12 µL. La mezcla se mantuvo a 72°C durante 10 minutos en un Termociclador iCycler (Bio-Rad, EEUU). Tras ello, se adicionaron 4 µL de First Buffer 5x (Invitrogen, EEUU), 2 µL de DTT (ditiotreitil) 0.1 M (Invitrogen, EEUU) y 1 µL de dNTPs 40 µM (Sigma Chemical Co., EEUU). La incubación de la muestra se realizó durante 2 minutos a 42°C en el termociclador. Finalmente, se adicionó 1 µL de Transcriptasa inversa 100 U/µL (Invitrogen, Estados Unidos) y se mantuvo a 42°C durante 50 minutos, seguido de 15 minutos a 72°C para obtener el ADNc.

Una vez obtenido el ADNc se llevó a cabo la comprobación de la funcionalidad de dicho ADNc mediante PCR siguiendo el mismo protocolo que el descrito en el apartado anterior. En este caso, si las muestras de ADNc son funcionales se debe obtener banda del producto de PCR del gen de referencia RPS29, como puede verse un ejemplo en la Figura 27. Es más, la similitud de la intensidad de las bandas entre las diferentes muestras nos aseguraba que la cantidad de ADNc de partida era similar entre todas ellas.

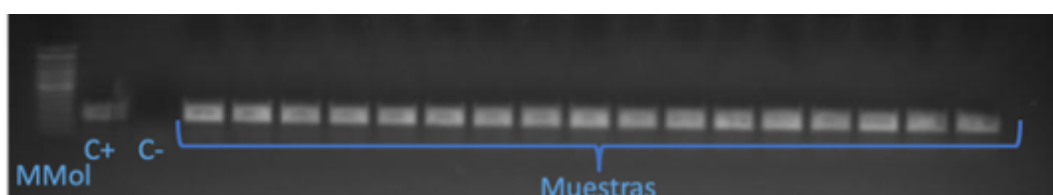


Figura 27: Gel de comprobación de la funcionalidad del ADNc obtenido. Tamaño esperado del producto de amplificación RPS29: 236 pb. Marcador molecular (M Mol) cuya primera banda es de 100 pb.

f) Estudio de la expresión génica por PCR a tiempo real

i. Generalidades de la PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real permite el análisis cualitativo y cuantitativo de la muestra gracias a que monitoriza la amplificación de la secuencia diana según se está produciendo. Esto lo realiza con la medida de fluorescencia en cada ciclo de amplificación. Para ello, se utilizó un fluoróforo específico del ADN bicatenario denominado *SYBR-Green I*. Éste se intercala en el ADN de doble cadena aumentando unas 1.000 veces su fluorescencia (Figura 28). Así, la cantidad de fluorescencia es directamente proporcional al producto amplificado.

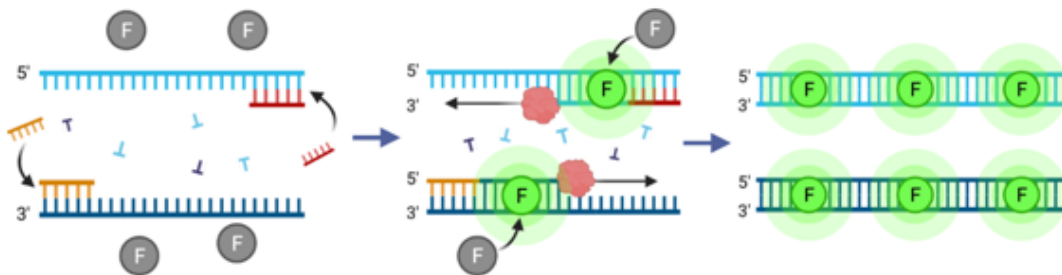


Figura 28: Mecanismo para detectar el producto de amplificación por PCR a tiempo real usando *SYBR-Green I*. El *SYBR-Green* se une al ADN bicatenario pasando de no emitir fluorescencia (círculos grises) a emitirla (círculos verdes), permitiendo así la cuantificación en cada ciclo de amplificación. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com)

El proceso de amplificación se lleva a cabo en 3 fases: *background* o fondo, exponencial y meseta. El número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia supere el umbral de fondo se conoce como C_p (del inglés: *Crossing point*) y corresponde con el comienzo de la fase exponencial. El valor de C_p es inversamente proporcional a la cantidad de ADN inicial, ya que cuando dicha cantidad es baja, se requieren un mayor número de ciclos para que la señal de fluorescencia sea detectable. En base a esto, se puede realizar una cuantificación absoluta de la cantidad de ADN de partida en nuestra muestra usando una recta de calibrado. Para ello, se realizaron diluciones seriadas 1/10 de concentraciones conocidas de una muestra patrón del ADNc diana. Así, se realiza una recta de calibrado que relaciona el C_p de cada dilución con el logaritmo de la cantidad de ADN inicial (Figura 29). Si sobre esta recta se interpola el valor de C_p de las muestras problema, se consigue estimar la cantidad de ADNc inicial en cada una de ellas.

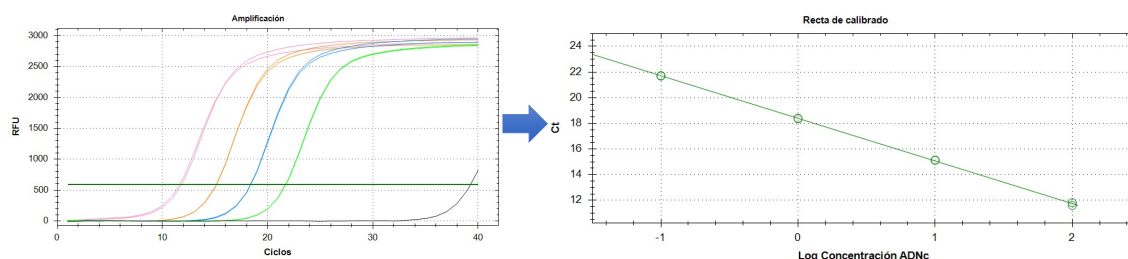


Figura 29: Realización de una recta de calibrado a partir del C_p .

Materiales y métodos generales

La eficiencia de la reacción (E) se calcula a partir de los Cp de la recta de calibrado. La E para cada gen se calcula en base a la fórmula $E=10^{-1/\text{pendiente}}$. Una pendiente de -3.32 indica una eficiencia máxima de la reacción (2.0), ya que la cantidad de producto de PCR se debe duplicar en cada ciclo (Roche Molecular Biochemicals, Nota técnica N° 10/2000).

Para analizar los cambios relativos en la cantidad de transcritos, se elige como patrón un gen cuya expresión no varíe en ninguna de las condiciones experimentales del estudio (gen de referencia o constitutivo). Comparando los Cp del gen de referencia con el gen problema en las muestras analizadas, se pueden determinar cambios relativos en la expresión del gen problema, tal y como se muestra más adelante.

Además, otro parámetro de interés es la temperatura de fusión (Tm, del inglés: *melting temperature*), esta depende del porcentaje de bases GC (por tanto, de la secuencia de bases) y de la longitud de los productos de amplificación o amplicones (Figura 30A). Para cada producto de amplificación se detecta un pico de fusión distinto, por lo que se puede confirmar la amplificación de la secuencia diana específica a través de este análisis. También se puede comprobar si existen estructuras secundarias formadas por los cebadores presentes en la reacción, lo que, reduciría considerablemente la E de la amplificación. La Tm se obtiene al finalizar la amplificación, en lo que se conoce como curva de fusión (Figura 30B). Esta se obtiene como decaimiento de la señal de fluorescencia debido a la desnaturalización dependiente de temperatura del producto de amplificación. Con la subida constante de la temperatura, la fluorescencia decae una vez que la temperatura alcanza la Tm del fragmento de ADN correspondiente.

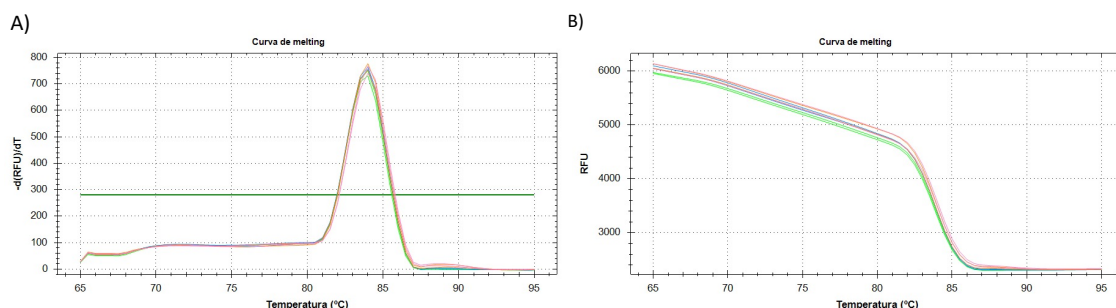


Figura 30: A) Picos de fusión correspondientes a un producto de amplificación tras aplicar la segunda derivada de la fluorescencia. B) Curvas de fusión correspondientes a un producto único de amplificación de un gen de interés.

ii. Protocolo experimental de la PCR a tiempo real

Para realizar la PCR a tiempo real se utilizó un termociclador de PCR a tiempo real *Light Cycler 1.5* (Roche, Alemania) o un CFX96® Touch (Bio-Rad, California, EEUU) y los cebadores que se especifican en anexo 1 (IDT Technologies, EE. UU). Los volúmenes de reactivos que se utilizaron en cada muestra fueron: 10 μ L de SYBR *Premix Ex Taq* (Takara Bio Inc., Japón), 1 μ L de cebador F 10 μ M (IDT Technologies, EEUU), 1 μ L de cebador R 10 μ M (IDT Technologies, EEUU), 2 μ L de la muestra de ADNc y 6 μ L de agua mili-Q estéril. Para asegurarnos que los valores de Cp de las muestras para todos los genes se encontraran dentro de la recta de calibrado y no superaran Cps mayores de 33 ciclos (la amplificación pierde eficiencia y hay mayor probabilidad de encontrar productos de amplificación inespecíficos) las muestras de

ADNc fueron diluidas 1/30 para muestras de hígado, placenta e íleon y 1/5 para muestras de tejido adiposo. En ambas diluciones se trabajó con un ADNc a una concentración de 5 ng/ μ L.

Los parámetros programados para cada gen fueron los indicados por la base de datos de secuencias de cebadores *RT-PCR Primer Sequences for Atlas Nylon Arrays* (Clontech, EEUU) o la aplicación para el diseño de cebadores Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). El protocolo general utilizado para llevar a cabo la amplificación de cada gen en *el Light Cyclers 1.5* (Roche, Alemania) figura en la Tabla 6 y el utilizado para el equipo CFX96® (Bio-Rad, California, EEUU) en la Tabla 7.

Tabla 6: Protocolo de PCR a tiempo real general utilizado para los estudios de expresión génica utilizando el *Light Cyclers 1.5*

| | | |
|------------------------|------------------|-----------------|
| Preincubación | 1 ciclo | |
| 95°C | 10 segundos | |
| Amplificación | 45 ciclos | |
| 95°C | 10 segundos | |
| 68°C | 10 segundos | |
| 72°C | 8 segundos | Medida |
| Curva de fusión | 1 ciclo | |
| 95°C | 0 segundos | |
| 65°C | 15 segundos | Medida continua |
| 95°C | 0 segundos | |

Tabla 7: Protocolo de PCR a tiempo real general utilizado para los estudios de expresión génica utilizando el CFX96®.

| | | |
|------------------------|------------------|-----------------|
| Preincubación | 1 ciclo | |
| 95°C | 3 minutos | |
| Amplificación | 40 ciclos | |
| 95°C | 10 segundos | |
| 68°C | 30 segundos | |
| 72°C | 45 segundos | Medida |
| Curva de fusión | 1 ciclo | |
| 65°C | | |
| 95°C | 5 segundos | Medida continua |

Tras la PCR a tiempo real, se realizó un gel de comprobación del producto de amplificación obtenido para verificar si el tamaño del amplicón correspondía con el esperado y asegurar que no existían fragmentos de amplificación inespecíficos.

iii. Cuantificación relativa de la expresión de genes

El análisis de la cuantificación relativa de la expresión de los genes es realizado por el *Software Light Cyclers 4.05* o el software *CFX Maestro 2.0* que se basan en el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ o método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Como gen de referencia, gen cuya expresión no varía en función de las condiciones experimentales, se utilizó RPS29 que codifica por una proteína ribosomal y cuya secuencia de cebadores figura en el Anexo 1 para las muestras de hígado,

Materiales y métodos generales

placenta e íleon. En el caso del tejido adiposo se utilizó como gen de referencia el que codifica por la Hipoxantina fosforibosil transferasa 1 (HPRT1) y su secuencia de cebadores figura en el anexo 1. De esta manera, los valores de Cp de los genes diana y el gen de referencia fueron corregidos por la eficiencia de su correspondiente PCR, obtenida en la recta de calibrado. El método de cuantificación relativa determina el valor relativo del gen de interés y del gen de referencia en la misma muestra gracias a la curva de calibrado previamente construida para cada gen (anexo 1). Para expresar la cantidad de producto de amplificación del gen diana normalizado, el valor de éste se divide por el del gen de referencia y el valor se expresa en unidades arbitrarias (U.A.).

3.2. Determinación de la expresión de micro ARN (miARN)

La medida de miARN se realizó durante una estancia en el grupo Control Nutricional del Epigenoma bajo la supervisión de la Dra. Lidia Daimiel Ruiz en el Instituto IMDEA Alimentación (Madrid, España).

a) Homogenización de los tejidos y extracción del ARN total.

Para la extracción del ARN total se utilizó el kit miRNeasy Mini® (Qiagen, EEUU). Para ello, se procedió a la homogenización de 50 mg de hígado y 100 mg de tejido adiposo utilizando un TissueLyser LT (Qiagen, EEUU) y en presencia de IAZol® (Qiagen, EEUU) que gracias al fenol y tiocianato de guanidina inactiva las nucleasas y lisa las células. A continuación, las muestras se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente para romper los complejos nucleoprotéicos. Tras ello, se centrifugó el homogenado a 12.000 xg a 4°C durante 10 minutos. Después, se añadió al sobrenadante cloroformo, el cual produce la separación de ARN en la fase acuosa superior, y las proteínas y el ADN en la interfase y fase orgánica inferior. Se realizó un transvase de 350 µL de la fase superior, que contiene el ARN, tras una centrifugación para realizar la purificación final del mismo. A esto, se le adicionaron 525 µL de etanol absoluto frío y se transfirieron a una columna con filtro. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 10.000 xg y a temperatura ambiente durante 15 segundos y se descartó el líquido filtrado, ya que el ARN se queda unido al filtro de la columna. Seguidamente, se añadieron 700 µL de Buffer RWT al filtro y se centrifugaron los tubos en las condiciones anteriores, eliminando de nuevo el filtrado. Se continuaron los lavados con 500 µL de Buffer RPE dos veces para asegurar la completa eliminación de las impurezas. Las columnas se transfirieron a un tubo limpio y se añadieron 80 µL en el caso del hígado y 30 µL para el tejido adiposo de agua libre de RNasas. La elución del ARN se realizó por centrifugación a 10.000 rpm y temperatura ambiente durante 1 minuto. El filtrado resultante contenía el ARN total de la muestra.

b) Cuantificación, pureza e integridad del ARN

Para conocer la concentración y pureza del ARN total obtenido se utilizó un NanoDrop® One (ThermoFisher., EEUU). La pureza se determina mediante la relación de absorbancias a 260 y 280 nm (contaminación con proteínas) y 260 y 230 nm (contaminación con solventes

orgánicos). Cuanto más cercana a 2,0 sean ambas relaciones de absorbancia, mayor será la pureza del ARN obtenido. Nuestras muestras fueron consideradas como válidas cuando presentaban una relación entre 1.8-2.0. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

Para comprobar la integridad del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Para ello se realizó un gel de agarosa al 2% teñido con Red Safe™ (iNtRON Biotechnology, Corea del Sur) que se cargó con 500 ng de ARN y fue sometido a 90 V durante 20 minutos para la reparación del ARN. Las bandas del gel corresponden al ARN 18S y 28S (ARNs ribosomales mayoritarios en la célula) y una banda inferior de miARN. Las tres bandas se observaron bien diferenciadas y nítidas, lo que nos aseguraba que el ARN no estaba degradado y que los miARN se habían extraído de manera óptima. Además, la relación de intensidades correspondientes a las bandas de ARN28S /ARN18S, presentaba en todos los casos un valor entre 1,5 y 2,0, lo que corresponde a una correcta integridad de ARN. Un ejemplo de los geles obtenidos puede observarse en la Figura 31.

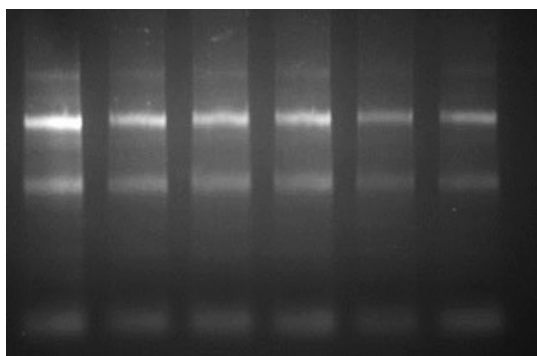


Figura 31: Gel de agarosa para comprobar la integridad del ARN total obtenido. Las bandas más intensas corresponden a los ARN ribosomales 28S y 18S. La banda inferior de menor tamaño corresponde a los miARN.

c) Retrotranscripción de los miARN

Para la retrotranscripción de los miARN se utilizó el sistema miScript® (Qiagen, EEUU), en concreto el kit RT miScript® (Qiagen, EEUU). Este sistema permite una retrotranscripción específica de todos los miARN de una muestra de ARN total. Al contrario que el ARNm los miARN no tiene una cola de poli Adeninas (poliA) para realizar la retrotranscripción. El *miScript Reverse Transcriptase Mix*® (Qiagen, EEUU) contiene una poliA polimerasa que realiza la poliadenilación específica de los miARN. Los miARN poliadenilados son retrotranscritos por una retrotranscriptasa y cebadores oligo-dT para generar ADNc. Estos cebadores oligo-dT contienen una secuencia universal en el extremo 5' que alarga los miARN y facilita su amplificación por PCR a tiempo real. Debido a la poliadenilación y a la secuencia universal del cebador oligo-dT esta técnica evita que se detecten contaminaciones con ADN genómico de la muestra, por lo que el tratamiento con DNasa no es necesario. Además, el sistema miScript® utiliza el *miScript HiFlex Buffer* que permite la retrotranscripción de todas las especies de ARN: miARN maduros, precursores de miARN, ARN no codificante (ARNnc) y ARNm. Un esquema que explica la retrotranscripción usada por el sistema miScript® aparece en la Figura 32.

De esta manera, a 500 ng de ARN se le adicionó 2 µL de *miScript HiFlex Buffer*, 1 µL de 10x *miScript Nucleics Mix* (que contiene dNTPs, rATP y cebadores oligo-dT), 1 µL de *miScript*

Materiales y métodos generales

Reverse Transcriptase Mix y agua ultrapura estéril hasta un volumen final de 10 μ L. La mezcla se mantuvo a 37°C durante 60 minutos, seguido de 5 minutos a 95°C para obtener el ADNc. Este se almacenó a -20°C para medir posteriormente la expresión de miARN.

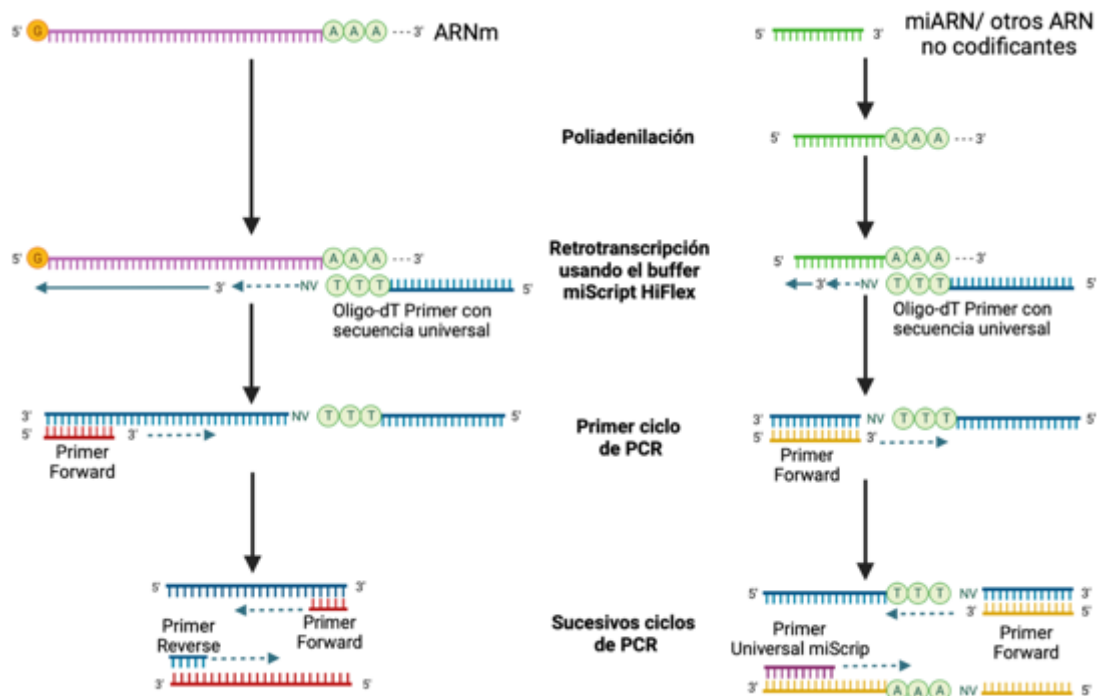


Figura 32: Poliadenilación, retrotranscripción y amplificación por PCR a tiempo real realizada por el kit RT miScript® (Qiagen, EE.UU.) utilizando el *miScript HiFlex Buffer* y el kit *miScript SYBR Green PCR* (Qiagen, EE.UU.). Modificado de *miScript PCR System Handbook* (Qiagen, EE.UU.). Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

d) Medida de la expresión de miARN por PCR a tiempo real

Para la realización de la PCR a tiempo real específica para la cuantificación de la expresión de miARN se utilizó el sistema miScript® (Qiagen, EE.UU.), en concreto el *kit miScript SYBR Green PCR* (Qiagen, EE.UU.). El fundamento de la PCR a tiempo real se ha explicado en el apartado “Generalidades de la PCR a tiempo real”.

El *kit miScript SYBR Green PCR* (permite la detección del ADNc de miARN maduros generados con el kit RT miScript® (Qiagen, EE.UU.). Así, el ADNc es amplificado gracias a un cebador universal de miScript que es complementario a la secuencia universal del cebador oligo-dT y a un cebador específico para cada miARN de interés (Tabla 8), el cual corresponde con la secuencia completa del miARN maduro (Figura 32).

Para realizar la PCR a tiempo real de los miARN se utilizó un equipo de PCR a tiempo real QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems™, ThermoFisher., EE.UU) en placas de 384 pocillos. Los volúmenes de reactivos que se utilizaron en cada muestra fueron: 5 μ L de 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, EE.UU), 1 μ L de cebador específico 10 μ M (IDT Technologies, EE.UU), 1 μ L de 10x cebador universal miScript 10 μ M (Qiagen, EE.UU), 2 μ L de la muestra de ADNc y 1 μ L de agua mili-Q estéril. Para asegurarnos que los valores de Cp de las

muestras para todos los genes se encontraran dentro de la recta de calibrado y no superaran Cps mayores de 33 ciclos las muestras de ADNc fueron diluidas 1/5 trabajando así con ADNc a una concentración de 5 ng/ μ L.

Tabla 8: Secuencias de los cebadores específicos para la medida de los diferentes miARN

| miARN | Secuencia miARN (Cebador específico) | Referencia del miARN |
|-----------|---|-----------------------------|
| miR21-5p | TAGCTTATCAGACTGATGTTGA | >mo-miR-21-5p MIMAT0000790 |
| miR22-3p | AAGCTGCCAGTTGAAGAAGTGT | >mo-miR-22-3p MIMAT0000791 |
| miR30c-5p | TGTAACATCCTACTCTCAGC | >mo-miR-30c-5p MIMAT0000804 |

El protocolo de amplificación utilizado para llevar a cabo la determinación de todos los miARN figura en la Tabla 9.

Tabla 9: Protocolo de PCR a tiempo real general utilizado para los estudios de expresión de miARN utilizando el QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems™, ThermoFisher., EEUU)

| | | |
|------------------------|-------------|------------------|
| Preincubación | | 1 ciclo |
| 95 ^o C | 15 minutos | |
| Amplificación | | 40 ciclos |
| 94 ^o C | 15 segundos | |
| 58 ^o C | 30 segundos | |
| 72 ^o C | 45 segundos | Medida |
| Curva de fusión | | 1 ciclo |
| 95 ^o C | 16 segundos | Medida continua |
| 65 ^o C | | |

Como ARN de referencia se utilizó el ARN nuclear pequeño U6 (RNU6). El análisis de la cuantificación relativa de la expresión de los miARN se realizó por el método de 2- Δ Ct o método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). De esta manera, los valores de Cp de los miARN diana y RNU6 fueron corregidos por la eficiencia de su correspondiente PCR, obtenida en la recta de calibrado. El método de cuantificación relativa determina el valor relativo del miARN de interés y RNU6 en la misma muestra gracias a la curva de calibrado previamente construida para cada gen. Para expresar la cantidad de producto de amplificación del gen diana normalizado, el valor absoluto de éste se divide por el del gen de referencia y el valor se expresa en unidades arbitrarias (U.A.).

3.3. Determinación de metilación de promotores

Para realizar el estudio del nivel de metilación de promotores específicos se ha llevado a cabo el procedimiento descrito por Oakes y col y, posteriormente usado por Ohashi y col, basado en el uso de una enzima de restricción dependiente de metilación seguido de PCR a tiempo real (Oakes et al., 2006; Ohashi et al., 2015).

Materiales y métodos generales

a) Extracción del ADN total del tejido

Para obtener el ADN total del hígado se utilizó el Kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, EEUU). Dicho kit permite la extracción y purificación del ADN de manera rápida evitando la extracción con alcohol y la precipitación con fenol o cloroformo. Además, el ADN se obtiene libre de contaminantes e inhibidores enzimáticos.

Brevemente, 25 mg de hígado se incubaron durante 3h a 56°C con *buffer ALT* y proteínasa K, para lisar el tejido. Posteriormente, el ARN contaminante se eliminó con Rnase A (100 mg/ml, Qiagen). A dicho lisado se le adicionó el *buffer de lisis AL* y etanol absoluto. Este *buffer* contiene tiocianato de guanidinio que inhibe las DNasa y RNasa y permite la eliminación de las proteínas. La mezcla se adicionó a una columna que contiene una membrana que permite la unión selectiva del ADN y la eliminación por centrifugación del resto de contaminantes. Para asegurar la completa eliminación de los contaminantes se realizaron tres lavados con los reactivos AW1, AW2 y etanol al 80%, sucesivamente. Finalmente, el ADN fue eluido utilizando el *buffer AE* compuesto por Tris-Cl 10 mM, EDTA 0,5 mM a pH 9 que permite que el ADN se libere de la columna y eluya por centrifugación. El ADN fue almacenado a -20°C para su uso posterior.

b) Cuantificación, pureza e integridad del ADN obtenido

El ADN obtenido se cuantificó con un NanoDrop® One (ThermoFisher., EEUU). La pureza se determinó con el mismo equipo mediante la relación de absorbancias a 260 y 280 nm (contaminación con proteínas) y 260 y 230 nm (contaminación con solventes orgánicos). Cuanto más cercana a 2,0 sean ambas relaciones de absorbancia, mayor será la pureza del ADN obtenido. Nuestras muestras fueron consideradas como válidas cuando presentaban una relación entre 1.8-2.0. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

Para comprobar la integridad del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Para ello se realizó un gel de agarosa al 2% teñido con Red Safe™ (iNtRON Biotechnology, Corea del Sur) que se cargó con 500 ng de ADN y fue sometido a 120 V durante 20 minutos para su separación. Para asegurar que el ADN se encontraba completamente íntegro se observó en todas las muestras una única banda bien diferenciada y nítida (Figura 33).

c) Tratamiento del ADN con la enzima de restricción McrBC

La McrBC es una enzima de restricción dependiente de metilación que reconoce como secuencia diana compleja 5'AC(Nn)GC3' y solamente realiza cortes en el caso de que las citosinas pertenecientes a la diana se encuentren metiladas.

De esta manera, el ADN previamente obtenido se trató con McrBC (Takara Bio Inc., Japón) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, 1 µg de ADN se trató con 1 µL de McrBC, 2 µL *buffer* 10X, 2 µL de seroalbúmina bovina (BSA) 0,1%, 0.2 µL de GTP 100 mM y agua ultrapura estéril hasta completar el volumen a 20µL. La mezcla se incubó 16 h a 37°C, temperatura óptima de trabajo de la enzima, y posteriormente se inactivó a 56°C durante 20 minutos. En paralelo, se tomó una replica de las muestras las cuales en lugar de adicionarle la enzima se les añadió 1 µL *buffer* 10X para usarlas como control no tratado.

El ADN resultante se cuantificó y se determinó la integridad en gel de agarosa en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. En este caso, como puede verse en la Figura 33, en muestras tratadas con McrBC el ADN aparece degradado, lo cual se visualiza en el gel como una estela a lo largo del carril. En cambio, las muestras que forman parte del control no tratado continúan visualizándose como un única banda nítida y bien diferenciada.

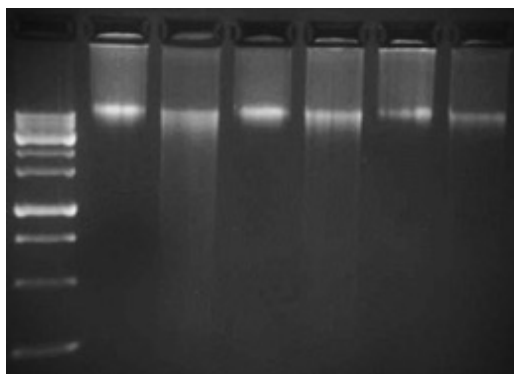


Figura 33: Gel de electroforesis del ADN sin tratar o tratado con McrBC. Las muestras control no tratado se ven como bandas nítidas sin degradar, mientras que las tratadas presentan una estela a lo largo del carril debido a los múltiples cortes del ADN por parte de la enzima.

d) Amplificación por PCR de la zona metilada del promotor

El estudio del nivel de metilación de promotores se llevó a cabo por PCR a tiempo real del ADN tratado con McrBc y el ADN control no tratado de manera individual. El fundamento de la técnica de PCR a tiempo real figura en el apartado “Generalidades de la PCR a tiempo real”.

i. Búsqueda de la región promotora y diseño de cebadores

En primer lugar, se llevó a cabo una búsqueda de la secuencia del gen de interés en la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (National Library of Medicine, EEUU). En concreto nos centramos en el gen de la CSE (también conocido como Cth) de la rata (Gene ID: 24962) y utilizamos como modelo de que estábamos aplicando correctamente la metodología el promotor de ratón, el cual se encuentra descrito en la bibliografía (Ishii et al., 2004). La secuencia del gen y una región de unas 1000 pares de bases *upstream* del gen se introdujo en el programa informático MethPrimer (Li & Dahiya, 2002). Este programa identifica las regiones de alta proporción de CG dentro del gen y que, como consecuencia, tienen una mayor probabilidad de formar parte de una isla CpG del promotor (Li & Dahiya, 2002). Estas regiones se indican como una zona sombreada en azul, como puede observarse en el análisis realizado para el gen de la CSE (Figura 34), en cambio el resto de la secuencia del gen no muestra ninguna otra zona rica en CG.

Materiales y métodos generales

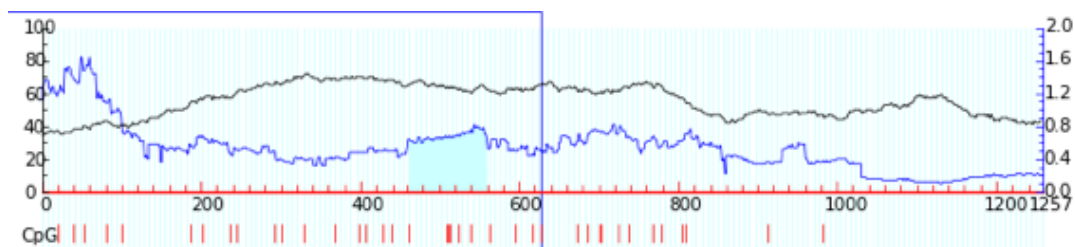


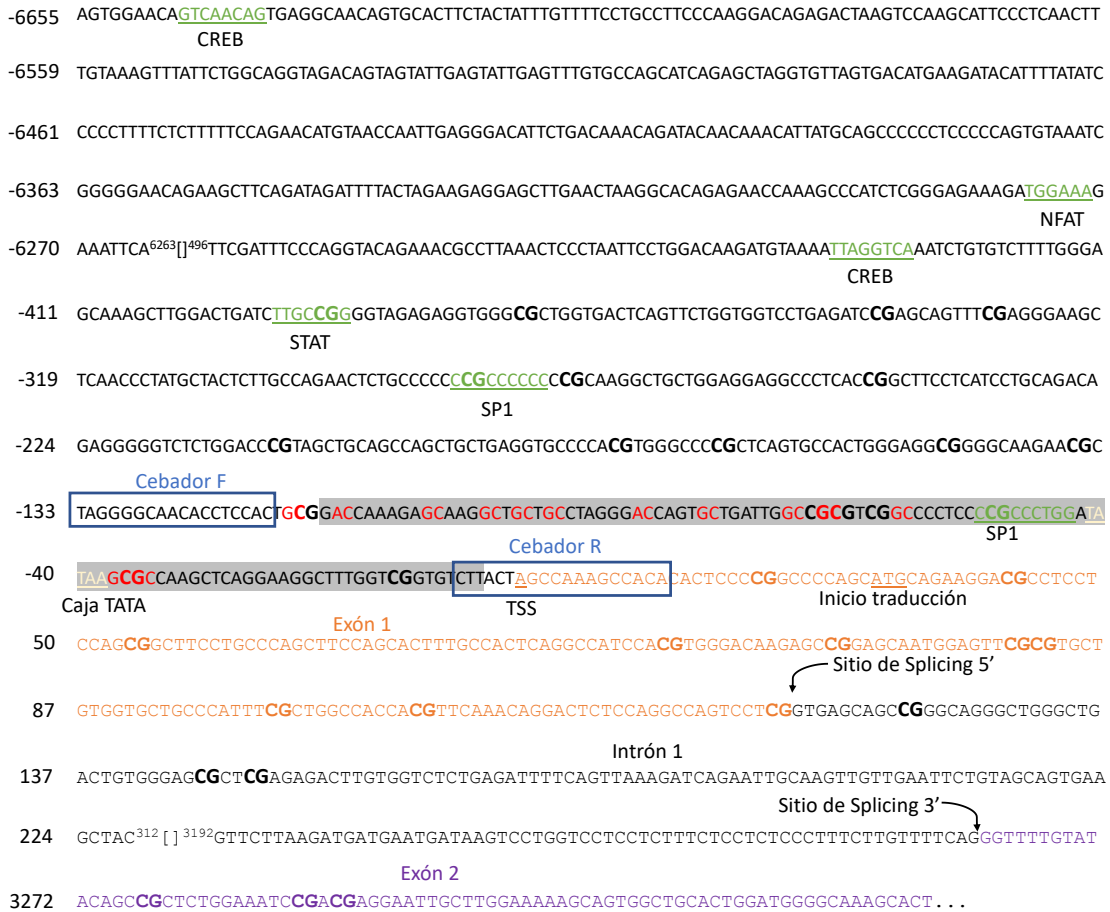
Figura 34: Localización de zonas ricas en islas CpGs mediante el programa informático Methprimer de la secuencia correspondiente al primer tercio del gen y 1000 pares de bases *upstream* del gen de la CSE de rata. Sombreado en azul se muestra la zona rica en sitios CpG (ID Secuencia: ref|NC_005101.4| de *Rattus norvegicus*).

Methprimer sugiere cebadores óptimos para la determinación del nivel de metilación usando la técnica de bisulfito o usando enzimas de restricción dependientes de metilación que no son McrBc. Por esta razón, y dada la necesidad de encontrar cebadores óptimos para nuestro caso, la secuencia correspondiente a la isla CpG fue introducida en el programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) especificando los parámetros óptimos requeridos para los cebadores: tamaño del cebador, longitud del producto de amplificación, temperatura de anillamiento, etc. Sin embargo, Primer3 no localiza la diana de McrBC (5'AC(Nn)GC3'), por lo que debimos comprobar si 1) la secuencia de los cebadores sugeridos por el programa, amplificaban zonas en las que dicha secuencia diana estuviera presente y 2) que dicha secuencia diana no apareciera en la secuencia de los cebadores. Teniendo en cuenta todo esto se seleccionaron como óptimos los cebadores que figuran en la Tabla 10. Además, para asegurarnos que la concentración del ADN tratado con McrBC y del ADN control no tratado, y que no se habían producido roturas inespecíficas en la misma, se diseñaron unos cebadores que flanqueaban zonas del genoma libres de la diana de McrBC (Oakes et al., 2006). Estos cebadores amplifican una región del gen del receptor de glucocorticoides (GR) (Tabla 10) y se aceptaron como correctas muestras que no tuvieran una diferencia de Ct entre la muestra de ADN tratado con McrBC y el ADN control no tratado superior a ± 0.3 ciclos (Oakes et al., 2006).

Tabla 10: Cebadores utilizados para la medida de la metilación del ADN del promotor del gen de la CSE

| Gen | Secuencia Forward | Secuencia Reverse | Tamaño amplicón (pb) | Tm |
|------------|---------------------|------------------------|----------------------|----|
| CSE | TAGGGGCAACACCTCCACT | AGTGTGTGGCTTTGGCTAGTAA | 150 | 60 |
| GR | TCTGTTTCCCCTTCTGGTC | CCAGGAATGAACATGGAATG | 150 | 60 |

Una descripción de la región promotora del gen de la CSE en la que se muestran los sitios de unión de diferentes factores de transcripción, la región de islas CpG, las dianas de McrBC (5'AC(Nn)GC3' con posibles citosinas metiladas), la zona flanqueada por los cebadores específicos, el origen de transcripción y traducción y los dos primeros exones se encuentra en la Figura 35.



ii. PCR a tiempo real de la metilación específica de promotores

La cuantificación de la metilación específica de promotores se realizó por PCR a tiempo real utilizando un equipo de CFX96® Touch (Bio-Rad, California, EEUU). Los volúmenes de reactivos que se utilizaron en cada muestra fueron: 10 µL de SYBR *Premix Ex Taq* (Takara Bio Inc., Japón), 1 µL de cebador F 10 µM (IDT Technologies, EEUU), 1 µL de cebador R 10 µM (IDT Technologies, EEUU), 2 µL de la muestra de ADN y 6 µL de agua mili-Q estéril. El ADN utilizado se encontraba a una concentración de 20 ng/µL y se midieron en paralelo en la misma placa de 96 pocillos la misma muestra tratada con McrBc y la muestra control sin tratar. Como control positivo se utilizó una muestra de ADN a 20 ng/µL y como control negativo agua ultrapura esteril.

El protocolo general utilizado para llevar a cabo la amplificación de cada región del ADN para el equipo CFX96® Touch (Bio-Rad, California, EEUU) aparece descrito en la Tabla 11.

Materiales y métodos generales

Tabla 11: Protocolo de PCR a tiempo real para la medida de metilación de promotores.

| Preincubación | | 1 ciclo |
|-----------------|--|-----------------|
| 95°C | | 3 minutos |
| Amplificación | | 40 ciclos |
| 95°C | | 10 segundos |
| 60°C | | 30 segundos |
| | | Medida |
| Curva de fusión | | 1 ciclo |
| 65°C | | |
| 95°C | | 5 segundos |
| | | Medida continua |

iii. Cálculo del porcentaje de metilación

El porcentaje de metilación de la región promotora se determinó por el cambio del valor de Cp entre las muestras tratadas con McrBC y las muestras sin tratar. Este cálculo se basa en el principio de que cada ciclo de amplificación de PCR genera el doble de producto de ADN. Esto indicaría que un cambio de 1,0 de Cp, entre la muestra tratada con McrBC y la muestra sin tratar, significaría que un 50% de la muestra tratada se encontraría digerida y que un incremento de 2,0 de Cp un 75% de degradación y así sucesivamente. El cálculo del porcentaje de metilación se realiza utilizando la ecuación (Oakes et al., 2006):

$$\% \text{ Metilación} = 100 (1 - e^{-0,7\Delta Ct})$$

En la Figura 36 se muestra la amplificación entre una muestra tratada con McrBc y muestra sin tratar utilizando tanto los cebadores control (gen GR) como los cebadores que amplifican la zona posiblemente digerida por McrBc en el promotor de la CSE. Como puede verse, con los cebadores de la región control casi no existen diferencias de Cp entre la muestra tratada y la muestra sin tratar (Figura 36A). En cambio, cuando se amplifica la región del promotor de la CSE con dianas para McrBC la Cp de la muestra tratada es mayor que la de la muestra control sin tratar (Figura 36B). Esto es debido a que McrBc ha degradado el ADN en esa región y como consecuencia la polimerasa no es capaz de amplificar la región delimitada por los cebadores.

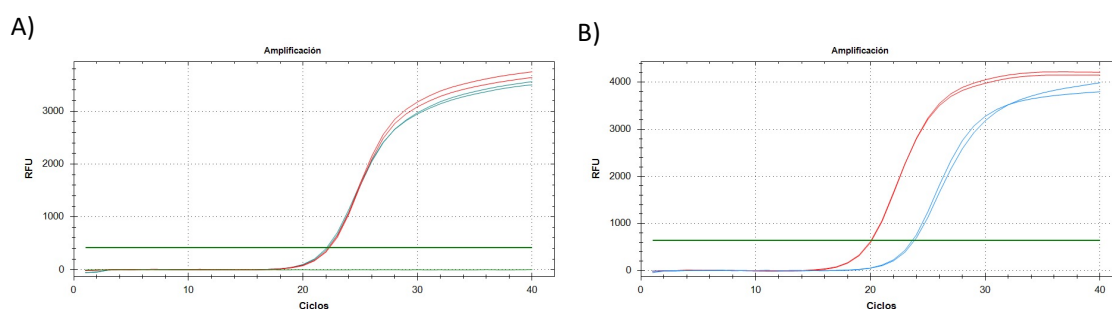


Figura 36: Curvas de amplificación por PCR a tiempo real de una muestra de ADN usando A) los cebadores control GR y B) los cebadores que amplifican una zona del promotor de la CSE.

4. Parámetros relacionados con el estrés oxidativo

4.1. Determinación de la concentración de MDA

La concentración de malondialdehído (MDA), un producto de oxidación lipídica, se realizó mediante la técnica descrita por Wong y col (Wong et al., 1987) con modificaciones. Brevemente, para llevar a cabo las medidas en tejido (hígado, placenta y tejido adiposo lumbar) 100 mg fueron homogenados con 1,2 mL de PBS. Tras una centrifugación durante 30 minutos a 4°C y 10000 rpm, al sobrenadante se le añadieron 10 µL de BHT 200 mM/mL, para evitar la oxidación lipídica. A continuación, a 50 µL de plasma u homogenado de tejido se le añadieron 750 µL de ácido fosfórico 0,44 M. El ácido fosfórico hidroliza los peróxidos de lípidos y forma MDA. Tras esto, se formó un complejo fluorescente MDA-TBA al adicionar 250 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 42 mM. La mezcla se diluyó con agua destilada hasta un volumen final de 1,5 mL y se incubó a 95°C durante una hora en termobloque. Después de enfriarse, se precipitaron las proteínas con 500 µL de una mezcla metanol-NaOH y estas fueron separadas por centrifugación a 9500 g durante 5 minutos. Se tomaron 250 µL del sobrenadante, por duplicado, a una placa de 96 pocillos para medir la fluorescencia del complejo MDA-TBA. Para ello, se utilizó un equipo FLUOstar® Omega (BMG Labtech, Alemania) a 515(excitación)/553(emisión) nm. Para realizar la cuantificación se utilizaron diluciones de tetraetoxipropano (TEP) desde 0 a 40,5 µM. El TEP genera por hidrólisis cantidades estequiométricas de MDA.

4.2. Determinación de carbonilos de proteínas.

Para medir los carbonilos de proteínas se siguió el método basado en la capacidad de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) en reaccionar con estos grupos carbonilo generando aductos dinitrofenilhidrazona que pueden ser detectados a 340 nm (Levine et al., 1990).

Las medidas en tejido (hígado, tejido adiposo lumbar y placenta) se hicieron creando un homogenado con 100 mg de tejido y 500 µL de PBS. Tras una centrifugación durante 30 minutos a 4°C y 10000 rpm los sobrenadantes fueron recogidos para su análisis. Para ello, se incubó un mínimo de 0,5 mg de proteína de las diferentes muestras a analizar con 4 volúmenes de DNPH 10 mM en HCl 2M durante una hora a temperatura ambiente y protegido de la luz. De manera paralela, se realizó un blanco de cada una de las muestras incubándola sin DNPH, pero con HCl 2M, ya que el HCl por si solo puede producir la precipitación de las proteínas. A continuación, se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético al 20% en hielo y se aislaron por centrifugación. El precipitado, que contenía las proteínas, se lavó 3 veces con 1 mL de etanol:acetato de etilo 1:1 y, posteriormente, fue resuspendido con 500 µL de guanidina 6M a pH 2,5. Finalmente, se midió la absorbancia en un lector de placas SpectroStar® Nano (BMG Labtech, Alemania) a 340 nm.

Para obtener los valores de grupos carbonilo en la muestra los valores de absorbancia de las muestras fueron corregidos por los respectivos valores de sus blancos y la concentración se determinó mediante el coeficiente de extinción molar ($22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Además, los datos

Materiales y métodos generales

se expresaron en base a las proteínas finales presentes en las muestras para lo que se utilizó el *kit Protein in urine and CSF* (Rojo de pirogalol, Spinreact, Gerona, España).

4.3. Determinación de enzimas antioxidantes

Las medidas de la actividad de enzimas antioxidantes en tejido (hígado, placenta y tejido adiposo lumbar) se hicieron con un homogenado en un tampón que contenía TRIS 0,25 mM, Sacarosa 0,2 M y DTT 5 mM pH 7,4 pesando 100 mg de tejido en 500 μ L de tampón. A continuación, se centrifugaron las muestras a 16128 g durante 30 minutos y a 5°C y los sobrenadantes se recogieron para hacer las medidas posteriores.

a) Glutation reductasa

La actividad de la glutatión reductasa (GR) se determinó siguiendo el protocolo propuesto por Delides y col (Delides et al., 1976), según el cual el glutatión oxidado es reducido por la glutatión reductasa gracias a la oxidación del cofactor NADPH a NADP⁺. Esta velocidad de oxidación es proporcional a la actividad de la glutatión reductasa.

La medida se realizó en cubeta utilizando un equipo SpectroStar® Nano (BMG Labtech, Alemania). Para ello, 0,8 mL de tampón fosfato 50 mM pH 7, 34 μ L de EDTA 15 mM, 34 μ L de glutatión oxidado 65,3 mM (Sigma, EEUU) y 50 μ L de muestra se añadieron a la cubeta y se realizó un blanco. A continuación, se adicionó 20 μ L de NADPH (Panreact, EEUU) 9,6 mM para iniciar la reacción y se incubó durante 2 minutos a 37°C, midiendo su desaparición en ese tiempo. Para calcular la actividad enzimática se calculó la diferencia de absorbancia por minuto entre el t=0 y el t=2 minutos y la siguiente fórmula:

$$mU\ GR / mg\ proteína = \frac{DO \times \left(\frac{Vt}{Vm}\right) \times \left(\frac{1}{tmin \times \epsilon}\right) \times 1000 \times Dilución}{mg\ proteína}$$

DO: variación de densidad óptica en el tiempo de medición. Vt: volumen total en la cubeta en mL. Vm: volumen de muestra en mL. tmin: Tiempo en minutos. ϵ : Coeficiente de extinción molar (6,022 microunidades/mL).

b) Glutation peroxidasa

La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) se midió mediante la oxidación del glutatión reducido por la glutatión peroxidasa, el glutatión oxidado que se forma es de nuevo reducido por la GR gracias a la oxidación del cofactor NADPH a NADP⁺. De esta manera la velocidad de oxidación del NADPH será proporcional a la actividad de la GPx (Günzler et al., 1974).

Para ello, se utilizó una cubeta de cuarzo y un equipo SpectroStar® Nano (BMG Labtech, Alemania). A la cubeta se le adicionaron 870 μ L de tampón fosfato 50 mM pH 7, 20 μ L de glutatión reducido (Sigma, EEUU), 20 μ L de GR 50 U/mL (Sigma, EEUU), 20 μ L de NADPH (Panreact, EEUU) 9,6 mM y 50 μ L de muestra. Tras ello, se monitorizó durante 2 minutos la desaparición de NADPH a 340 nm y 37°C y así agotar los posibles restos peróxido presentes en la muestra para que no interfieran con la medida de la actividad de la GPx. A continuación, se adicionó 20 μ L de terc-butilhidroperóxido 30 mM (Sigma, EEUU) para iniciar las dos reacciones acopladas y la desaparición del NADPH a 340 nm a 37°C durante 2 minutos. Para calcular la

actividad enzimática se calculó la diferencia de absorbancia por minuto entre la primera y la segunda medida y la siguiente fórmula:

$$U \text{ GPx} / \text{mg proteína} = \frac{\left(\frac{DO \times Vt}{\varepsilon \times Vm}\right) \times \left(\frac{1}{t \text{ min}}\right) \times 2 \times \text{Dilución}}{\text{mg proteína}}$$

DO: variación de densidad óptica entre la primera y la segunda medida. Vt: volumen total en la cubeta en mL. Vm: volumen de muestra en mL. tmin: Tiempo en minutos. ε : Coeficiente de extinción molar (6,022 microunidades/mL). El resultado se multiplica por 2, ya que se gastan 2 moléculas de glutatión reducido por cada molécula de NADPH.

c) Catalasa

Para medir la actividad catalasa (Cat) se lleva a cabo la medida de la velocidad de descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la enzima a 240 nm (Aebi, 1984).

La determinación se llevó a cabo en una cubeta de cuarzo y un equipo SpectroStar® Nano (BMG Labtech, Alemania). A la cubeta se le adicionaron 800 μL de tampón fosfato 50 mM pH 7 y 100 μL de muestra, tras lo cual se realizó el blanco. Para desencadenar la reacción se adicionaron 100 μL de H_2O_2 30 mM y se monitorizó la reacción durante 1 minuto a 37°C a 240 nm. Para calcular la actividad catalasa se utilizó la siguiente fórmula:

$$mU \text{ Cat} / \text{mg proteína} = \frac{Vt}{Vm} \times \left(\frac{2,3}{t \text{ min}}\right) \times \log \left(\frac{\text{Abs } t0}{\text{Abs } t1}\right) \times \text{Dilución}$$

Vt: volumen total en la cubeta en mL. Vm: volumen de muestra en mL. tmin: Tiempo en minutos. Abs t0: Absorbancia a 240 nm a tiempo 0 minuto. Abs t1: Absorbancia a 240 nm a tiempo 1 minuto.

d) Superóxido dismutasa total, tipo 1 y tipo 2

Para determinar la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se utilizó el kit comercial SOD Assay Kit (Sigma, EEUU) el cual se basa en las siguientes reacciones (Figura 37) que permiten detectar la actividad de la SOD de manera indirecta. De esta manera la absorbancia se mide a 440 nm, máximo de absorción del WST-1 formazán, que se forma por reacción del WST-1 con el anión superóxido (O_2^-). En presencia de la SOD se inhibe la formación del producto coloreado debido a la eliminación del O_2^- , así se determina la inhibición de la actividad por disminución de color a 440 nm.

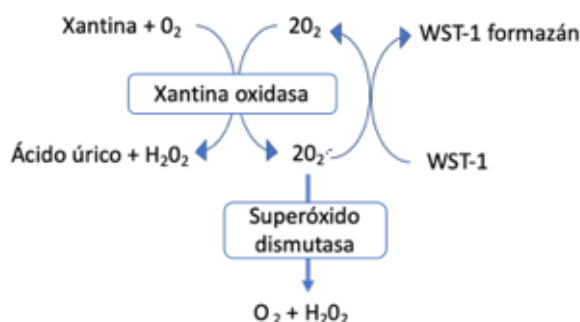


Figura 37: Principio del SOD Assay Kit

Para llevar a cabo la medida se siguieron las especificaciones indicadas por el proveedor y se utilizó un lector de placas SpectroStar® Nano (BMG Labtech, Alemania) para medir la

Materiales y métodos generales

absorbancia a 440nm. Todas las muestras fueron ensayadas por duplicado. Además, para transformar las medidas de absorbancia en unidades de actividad se generó una recta de calibrado usando concentraciones crecientes y conocidas de SOD (*Superoxide Dismutase from bovine erythrocytes* $\geq 3,000$ units/mg protein, Sigma, EEUU), por lo que los resultados de absorbancia de las muestras fueron interpolados en dicha recta y expresados como U SOD/mg de proteína.

Finalmente, para discernir entre la actividad SOD tipo 1 (SOD1) y tipo 2 (SOD2) se llevaron a cabo dos ensayos en paralelo de la misma muestra. Por un lado, se analizó la muestra sin tratar, lo que permitió medir la actividad SOD total. El segundo ensayo permitió medir únicamente la actividad de la SOD2, ya que se realizó un tratamiento de la muestra con cianuro potásico (KCN, Sigma, EEUU) 11mM, el cual inhibe únicamente a la SOD1. La actividad SOD se determinó por diferencia entre la SOD total y la SOD2.

5. Determinación de sulfuro de hidrógeno (H₂S).

5.1. Determinación de la concentración de H₂S en plasma.

Para llevar a cabo la medida del H₂S en plasma se utilizó el método del azul de metileno (di Villa Bianca et al., 2013) con modificaciones. Según este protocolo el H₂S, un gas, es precipitado con acetato de zinc transformándolo en sulfato de zinc. A continuación, este sulfato es capaz de reaccionar con el ion N,N-dimetil-p-fenilendiamonio (DPD) en un medio altamente ácido y gracias a un agente oxidante, el tricloruro de hierro (FeCl₃), para formar azul de metileno (Figura 38). El azul de metileno puede detectarse espectrofotométricamente a una longitud de onda de 670 nm. Así, la intensidad de color formada será directamente proporcional a la cantidad de H₂S en la muestra.

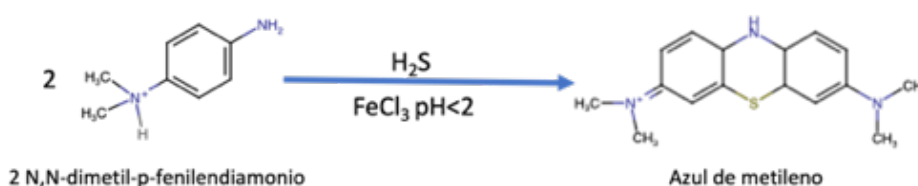


Figura 38: Fundamento del método de detección de H₂S en plasma por el método del azul de metileno. La cantidad de azul de metileno formada es directamente proporcional a la cantidad de H₂S en la muestra.

Brevemente, 200 μL de plasma fueron tratados con 150 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% para precipitar las proteínas, las cuales pueden interferir en el ensayo. Para retirarlas se llevó a cabo una centrifugación a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recogieron 250 μL de sobrenadante a los que se le adicionó 150 μL de Acetato de zinc 1% (Fluorochem, UK), 100 μL de DPD (Fluorochem, UK) 20 mM en HCl 7.2 M y 133 μL de FeCl₃ (Panreac, EEUU) 30 mM en HCl 1.2 M. Tras ello, las muestras fueron agitadas vigorosamente e incubadas a temperatura ambiente protegidas de la luz durante 20 minutos. Se transvasaron 250 μL del medio reacción,

por duplicado, a una placa de 96 pocillos y la absorbancia fue medida a 670 nm en un lector de placas SpectroStar® Nano (BMG Labtech, Alemania). Para obtener los valores de concentración en la muestra se generó una recta de calibrado con concentraciones crecientes y conocidas de NaSH (Fluorochem, UK) y fue tratado igual que las muestras. Los diferentes puntos de la recta fueron: 0; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100; 150 y 200 μM .

5.2. Determinación de la producción de H_2S en tejido

a) Principio del método

Para determinar la capacidad de producción de H_2S en tejido se utilizó el método del sulfato de plomo propuesto por Hine y col (Hine et al., 2015; Hine & Mitchell, 2017). Este método se basa en la capacidad para formar H_2S a partir de cisteína (Cys) y usando piridoxal-5'-fosfato (PLP) como coenzima a 37°C. El H_2S , al tratarse de un gas, entra en contacto con papeles Whatman® n°2 tratados con acetato de plomo dentro de un ambiente cerrado. La reacción del H_2S con el acetato de plomo genera sulfato de plomo, el cual es un precipitado de color marrón. De esta manera, la cantidad de precipitado de sulfato de plomo será directamente proporcional a la capacidad de producción de H_2S del tejido estudiado.

Una modificación de dicho protocolo permite determinar la capacidad de producción de H_2S por el tejido de manera enzimática (por acción de la CSE, la CBS y la 3MST) y no enzimática (proceso catalizado por el hierro) (J. Yang et al., 2019).

b) Protocolo seguido para determinar la producción de H_2S (protocolo general)

El protocolo seguido para medir la producción de H_2S fue el siguiente. Homogenados de los diferentes tejidos (hígado, tejido adiposo lumbar e íleon) fueron generados pesando aproximadamente 100 mg de hígado o íleon y adicionando 1,2 mL de PBS. En el caso del tejido adiposo se pesaron 250 mg de tejido en 0,5 mL de PBS. Los tejidos fueron homogenados utilizando un TissueLyser® (Qiagen, EEUU) con oscilaciones a 50 Hzs durante 30 segundos y 1 minuto en hielo, repetidas 6 veces. Tras esto, las muestras fueron centrifugadas y se recogió el sobrenadante. En dicho sobrenadante se midió la cantidad de proteínas utilizando el *kit Pierce® BCA Protein Assay* (ThermoFisher Scientific, EEUU). Para ello, se realizó una dilución 1/20 de las muestras y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. La absorbancia se midió a 562 nm en un lector de placas SpectroStar® Nano (BMG Labtech, Alemania).

Para generar los papeles impregnados en acetato de plomo se recortaron papeles Whatman® n°2 (Merck, EEUU) con la forma de una tapa de una placa de 96 pocillos. Estos se sumergieron en una solución de acetato de plomo (Sigma, EEUU) 20 mM y a continuación se secaron a vacío en un secageles (SBAL Gel dryer Modelo GD2000 HOEFER®). Los papeles fueron tratados justo antes de llevar a cabo cada ensayo.

Conocida la cantidad de proteína en las muestras se pipeteó en cada pocillo por duplicado la cantidad de muestra necesaria para añadir 200 μg (hígado e íleon) o 300 μg (tejido adiposo) de proteína. A continuación, se incubaron con cisteína 10 mM L-Cys (Sigma, EEUU), PLP (Sigma, EEUU) 20 μM (para los hígados e íleon) o PLP 2 mM (para el tejido adiposo) y se completó a volumen final con PBS. Rápidamente, la placa de 96 pocillos se cubrió con el

Materiales y métodos generales

papel tratado con acetato de plomo y se cerró completamente para evitar la salida del H₂S con una tapa. La reacción fue incubada a 37°C durante el tiempo suficiente para observar precipitados de sulfato de plomo en forma de punto en la membrana sin que dicho precipitado llegara a saturación. En el caso del hígado la incubación fue de 2h, en el íleon de 4 horas y en el tejido adiposo de 6 horas. Tras ello, la membrana fue retirada del sistema y los puntos fueron densitometrados en un densitómetro *BioRad Densitometer G-800* (EEUU) para su cuantificación. Los resultados de densidad óptica fueron corregidos por un blanco que correspondía a la posición de un pocillo en el que solo se adicionó agua. Un esquema del protocolo seguido puede verse en la Figura 39.

A la hora de transformar los resultados de densidad óptica de cada muestra en concentración de H₂S se ha utilizado una recta de calibrado por cada ensayo y membrana. Dicha recta se ha generado con NaSH (Fluorochem, UK) que disuelto en agua libera H₂S que reacciona con el acetato de plomo del papel de la misma manera que las muestras. Los puntos de la recta utilizados fueron los siguientes: 0; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 750 y 1000 μM.

Los resultados de concentración de H₂S se corrigieron por la cantidad de proteínas presentes en la muestra y el tiempo de incubación necesario para la formación de precipitados de sulfato de plomo.

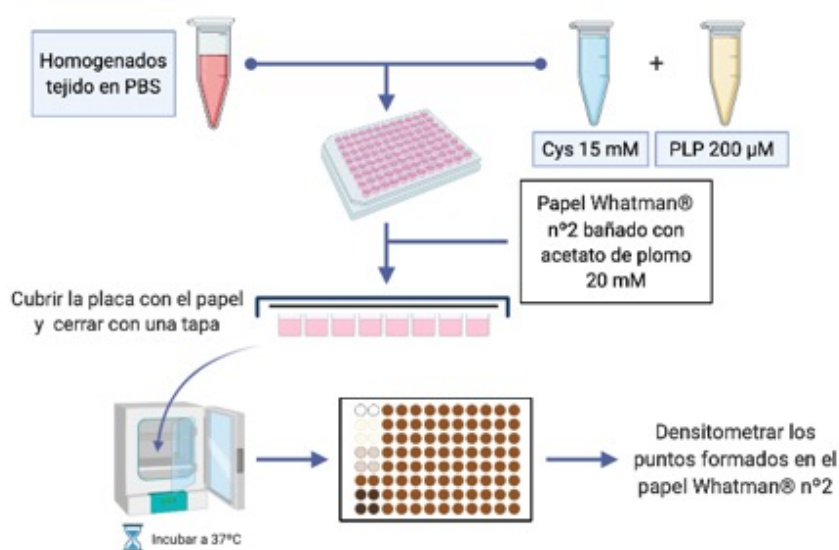


Figura 39: Esquema del protocolo seguido para determinar la formación de H₂S en tejido mediante el método del sulfato de plomo. Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

c) Modificación de la determinación de la producción de H₂S en tejido para diferenciar la producción no enzimática y enzimática de H₂S

El protocolo seguido se llevó a cabo en base al método descrito por Yang y col (J. Yang et al., 2019).

i. Producción no enzimática de H₂S

El organismo es capaz de generar H₂S sin implicación enzimática gracias al PLP y al hierro mediante una reacción química descrita por Yang y col (J. Yang et al., 2019). Para determinar

únicamente la producción no enzimática de H_2S se llevaron a cabo dos tipos de determinaciones.

En primer lugar, homogenados en PBS de hígado, tejido adiposo e íleon fueron tratados con proteínasa K (Sigma, EE. UU) $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ e incubados 1h a 37°C . La proteínasa K degrada todas las proteínas de la muestra, por lo que al someter a la muestra tratada con proteínasa K al protocolo general (descrito en el apartado anterior) la formación de H_2S es únicamente debida a la producción no enzimática por parte del tejido. Para comprobar que la proteínasa K había degradado completamente las proteínas de la muestra, tras la incubación se sometió a parte de esta a una electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior tinción con Coomassie. En la Figura 40 puede observarse el resultado de dicho gel en el que pueden compararse las muestras sin tratar y las tratadas con proteínasa K. Las muestras tratadas no presentan bandas correspondientes a la presencia de proteínas, lo cual indica que el tratamiento con proteínasa K ha degradado completamente las proteínas de la muestra.

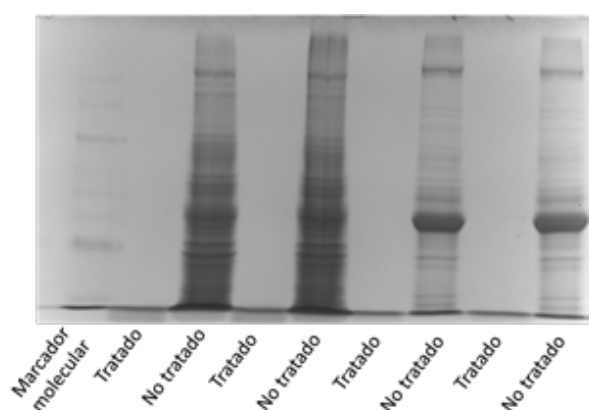


Figura 40: Gel de electroforesis de poliacrilamida de los homogenados en PBS de tejido tratados o no con proteínasa K y posterior tinción con Coomassie. Las muestras tratadas no presentan bandas correspondientes a la presencia de proteínas, lo cual indica que el tratamiento con proteínasa K ha conseguido degradar las proteínas de la muestra.

La segunda modificación del protocolo general descrito en el apartado anterior para llevar a cabo la medida exclusiva de la producción de H_2S no enzimático se basó en el uso de D-Cisteína en lugar de L-Cisteína. La D-Cisteína no puede ser utilizada como sustrato por las enzimas de la transulfuración, pero sí que permite la formación de H_2S de manera no enzimática (J. Yang et al., 2019). De esta manera, se llevó a cabo el mismo protocolo que el seguido en el protocolo general descrito en el apartado anterior, pero añadiendo D-Cisteína 10 mM (Fluorochem, UK) en lugar de L-Cisteína a la reacción.

ii. Producción enzimática de H_2S

Para comprobar la formación de H_2S de manera exclusiva por las enzimas de la transulfuración es necesario quelar el hierro presente en los homogenados, ya que este es el catalizador de la reacción no enzimática. Para ello, y siguiendo el protocolo propuesto por Yang y col (J. Yang et al., 2019), los homogenados en PBS de hígado, íleon y tejido adiposo fueron tratados con EDTA 15 mM (Sigma, EE. UU), previamente a ser añadidos a la reacción.

Materiales y métodos generales

Como consecuencia, el EDTA quela el hierro presente en los homogenados evitando que este sea utilizado como catalizador junto con la L-Cisteína y el PLP para llevar a cabo la reacción no enzimática. Los homogenados tratados con EDTA fueron sometidos al mismo protocolo de determinación de H₂S general descrito en el apartado anterior. Debido a la implicación de la formación de H₂S no enzimático en el tejido adiposo, el tratamiento con EDTA condujo a una reducción muy significativa de la formación de precipitados de sulfato de plomo, por lo que para que fuera posible el densitometrado de los precipitados fue necesario aumentar el tiempo de incubación de la reacción a 24 horas.

d) Puesta a punto del método

Para asegurarnos de que el método era fiable y que los resultados obtenidos eran válidos se llevó a cabo una puesta a punto del mismo analizando la linealidad, reproducibilidad, repetitividad y modificaciones de la concentración de proteínas.

i. Linealidad

En primer lugar, se comprobó que el incremento de una cantidad conocida de NaSH daba lugar a resultados crecientes de densidad óptica de los precipitados de sulfato de plomo y como consecuencia podía generarse una recta de calibrado. Como puede verse en la Figura 41 cuanto mayor es la concentración de NaSH mayor es la densidad óptica de los precipitados de sulfato de plomo obtenidos (Figura 41B), con ello se ha conseguido generar una recta de calibrado (Figura 41C) creciente y lineal. Esta recta de calibrado llega a saturarse en el punto de 1000 μM, por lo que dicho punto no será incluido para la recta de calibrado de las muestras.

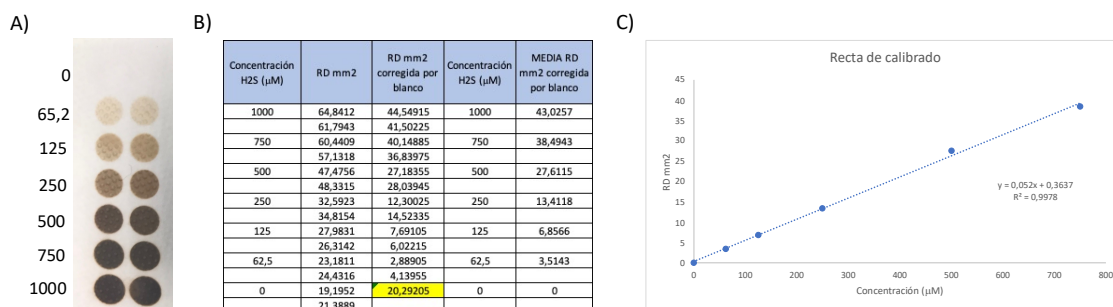


Figura 41: Estudio de la linealidad del método de sulfato de plomo para la detección de la producción de H₂S en tejido. A) Resultado del papel tratado con acetato de plomo después de ser incubado con concentraciones crecientes y conocidas de NaSH B) Resultados de la densidad óptica de cada uno de los puntos obtenidos a incubar el papel con acetato de plomo con concentraciones crecientes y conocidas de NaSH. C) Recta de calibrado generada con los valores de concentración (mM) de NASH y la densidad óptica de los puntos.

ii. Repetitividad y reproducibilidad

Para asegurarse de que el método daba lugar a resultados repetibles y reproducibles se llevó a cabo el siguiente procedimiento. Homogenados de dos muestras de hígado fueron tratados como figura en el apartado "Protocolo seguido para determinar la producción de H₂S (protocolo general)". Dichas muestras se analizaron en el mismo día por duplicado para

estudiar la repetitividad del método (Figura 42A). Dos días después se siguió de nuevo el mismo protocolo con las mismas muestras y se compararon los resultados de concentración de ambos días para el estudio de la reproducibilidad (Figura 42B). En ambos días se generó la respectiva recta de calibrado para cada una de las membranas. Como puede verse en la Figura 42 los resultados de las muestras son muy similares entre los duplicados analizados en el mismo día, al igual que los resultados de concentración obtenidos después de la interpolación en la respectiva recta de calibrado en días diferentes.

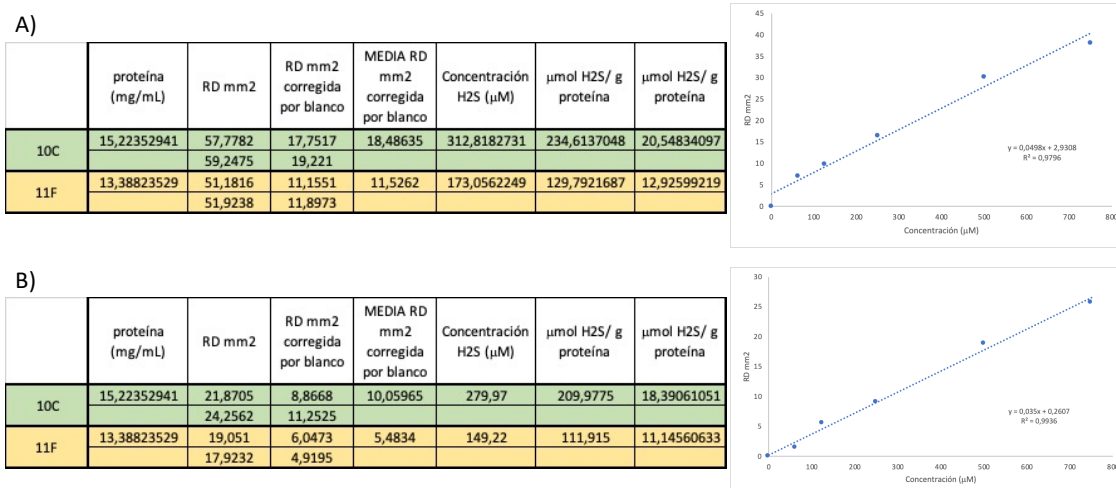


Figura 42: Estudio de la repetitividad y reproducibilidad del método de sulfato de plomo para la detección de la producción de H₂S en tejido. A) Estudio realizado en los homogenados de hígado de las muestras 10C y 11F el día 18/07/2018. Las muestras fueron analizadas por duplicado para evaluar la repetitividad. B) Estudio realizado en los homogenados de hígado de las muestras 10C y 11F el día 20/07/2018 para estudiar la reproducibilidad en días diferentes del método.

iii. Modificaciones en la concentración de proteínas

Con la intención de determinar si la incubación de diferentes concentraciones de proteínas de la misma muestra (100, 200 y 300 μg) conducía a concentraciones de sulfato de plomo crecientes cuando el tiempo de incubación a 37°C era el mismo se llevó a cabo el siguiente ensayo. Homogenados del hígado de tres muestras fueron incubados como figura en el apartado “Protocolo seguido para determinar la producción de H₂S (protocolo general)” por duplicado, pero se pipetaron en cada pocillo cantidades de muestra que correspondían a 100, 200 y 300 μg de proteína, tras añadir Cys y PLP se incubaron a 37°C durante 2 horas. Como puede observarse en la Figura 43 cuanto mayor concentración de proteína se incuba mayor es la intensidad de los puntos de sulfato de plomo formados (Figura 43A), lo cual se corresponde con una mayor densidad óptica después del densitometrado y mayor concentración de H₂S formado (Figura 43B) tras la interpolación en la recta de calibrado (Figura 43C). Estos resultados son lógicos, ya que cuanto mayor cantidad de proteína sea añadida a la mezcla de reacción, mayor cantidad de enzimas de la transulfuración formarán H₂S tras la incubación a 37°C y, como consecuencia, mayor precipitado de sulfato de plomo será generado.

Materiales y métodos generales

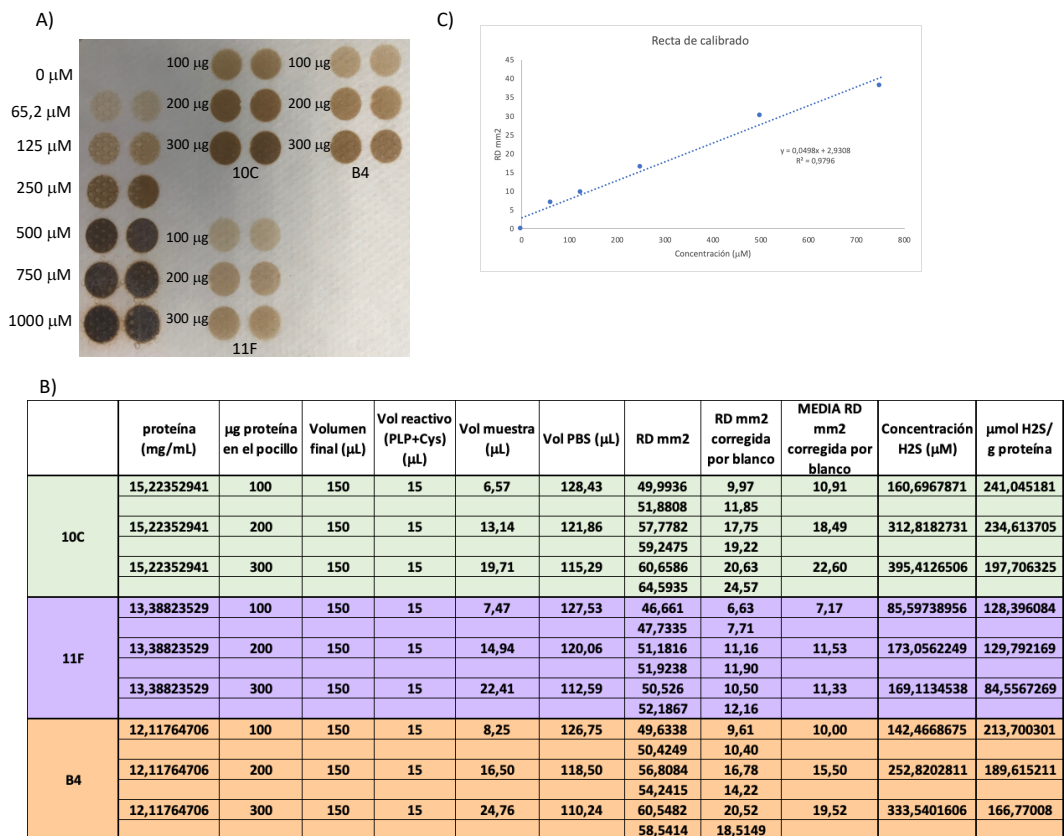


Figura 43: Estudio de los cambios en la concentración de proteínas añadidas al ensayo del método de sulfato de plomo para la detección de la producción de H₂S en tejido. A) Membrana obtenida tras la incubación de las muestras. B) Resultados de la concentración de H₂S de cada muestra después de densitometrar los puntos e interpolar en la recta de calibrado. C) Recta de calibrado de este ensayo.

6. Análisis estadístico

Los resultados se expresarán como la media +/- el error estándar. Los grupos experimentales estarán formados por un mínimo de seis animales de camadas diferentes, para evitar el “efecto camada”.

Para los animales de los procedimientos 1 y 2, las diferencias estadísticamente significativas se analizaron mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA), utilizando el programa estadístico SPSS. Cuando el efecto del tratamiento sea estadísticamente significativo ($P < 0.05$), las diferencias entre las medias fueron probados mediante el test de Tukey.

En el caso de los animales del procedimiento 3, las diferencias estadísticamente significativas se analizaron mediante el análisis de la varianza de doble vía (ANOVA), utilizando el programa estadístico SPSS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. Los estadísticos del ANOVA de doble vía figuran en el Anexo 2.

Capítulo 1: La protección de FGF21 frente a la acumulación lipídica y el estrés oxidativo inducidos por la fructosa está influenciada por la nutrición materna en la descendencia macho.

1. Introducción

La fructosa presente en azúcares añadidos tales como la sacarosa y el jarabe de maíz rico en fructosa (HFCS) se ha relacionado con el desarrollo de obesidad y síndrome metabólico (Johnson et al., 2009). En este sentido, estudios en animales de experimentación han demostrado que la fructosa genera el cuadro típico de alteraciones características de síndrome metabólico, mientras que la glucosa no lo hace (Johnson et al., 2009). De hecho, dietas que contienen fructosa en un 10% (p/v) en el agua de bebida inducen hipertrigliceridemia e hígado graso (Roglans et al., 2002). Es más, aunque algunos ensayos clínicos usando fructosa y otros carbohidratos han mostrado que ninguno tiene un efecto peor que otro, muchos otros han demostrado que la fructosa produce síndrome metabólico (Chiavaroli et al., 2015; de Koning et al., 2012; Heden et al., 2014; Stanhope et al., 2011). Todo esto hace que el debate sobre el consumo de fructosa y el desarrollo de síndrome metabólico siga abierto.

Además, se ha observado como situaciones que provocan alteraciones metabólicas, tales como la nutrición materna, durante la etapa pre y postnatal del desarrollo modulan el riesgo de aparición de enfermedades metabólicas en la descendencia una vez adulta, a través de un mecanismo conocido como programación fetal (Koletzko et al., 2005; Vickers et al., 2005). Sin embargo, a pesar de la relación establecida en numerosos estudios entre el elevado consumo de fructosa en bebidas azucaradas y la epidemia global de obesidad y síndrome metabólico (Rodríguez et al., 2013; Vilà et al., 2011), el consumo de estas bebidas y alimentos ricos en fructosa no está contraindicado durante la gestación.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado cómo fetos de madres que consumieron fructosa en la gestación presentaron una alterada transducción de la señal de leptina y esteatosis hepática (Rodríguez et al., 2013). En cambio, estos efectos no se vieron en los fetos de madres que consumieron glucosa demostrando así que los datos observados eran específicos de este azúcar. Incluso hemos observado que la fructosa durante la gestación tiene efectos a largo plazo en la descendencia macho adulta, presentando una alterada respuesta a insulina e hiperinsulinemia (Rodríguez et al., 2016b).

Por otro lado, también es importante señalar que la fructosa es mucho más reactiva que la glucosa participando en reacciones que generan radicales libres (Takagi et al., 1995). Además, se ha demostrado previamente que la administración de fructosa durante un corto periodo de tiempo a ratas macho produce cambios en muchos marcadores de estrés oxidativo, así como en los sistemas antioxidantes (Castro et al., 2011; Francini et al., 2010; Rebolledo et al., 2008), tanto en hígado como en tejido adiposo. En consonancia con estos resultados, nosotros hemos descrito cómo la administración de fructosa durante la gestación genera un aumento en el estrés oxidativo en los fetos (Rodrigo et al., 2016) y posteriormente en la edad adulta de la descendencia. Es más, hemos encontrado unos elevados niveles de productos de oxidación de proteínas en la descendencia macho de gestantes que consumieron fructosa (Rodríguez et al., 2015). En este sentido, Ching y col. han visto cómo dietas ricas en fructosa durante la gestación y la lactancia comprometen el estatus antioxidante hepático en la descendencia macho adulta (Ching et al., 2011).

Con la finalidad de estudiar si la descendencia macho nacida de madres que consumieron fructosa durante la gestación, comparado con las que consumieron glucosa,

Capítulo 1

mostraba una diferente respuesta a la ingesta de fructosa en la edad adulta, evaluamos el metabolismo lipídico y glucídico en el hígado y plasma y valoramos la homeostasis redox en el hígado y tejido adiposo de estos animales. Para ello, desarrollamos un diseño experimental en el que estudiamos la descendencia macho de madres que consumieron agua sin aditivo o suplementada con fructosa o con glucosa durante la gestación y posteriormente sometimos estos machos a una dieta de 3 semanas con fructosa líquida.

2. Materiales y métodos

2.1. Animales y diseño experimental

Brevemente, como se ha descrito con anterioridad (Rodríguez et al., 2016a; Rodríguez et al., 2016b), ratas Sprague-Dawley hembra se alimentaron *ad libitum* con comida estándar de rata. Tras quedar preñadas, se dividieron en 3 grupos: control, fructosa y glucosa. Las ratas control recibieron agua sin aditivo mientras que las ratas fructosa y glucosa tomaron agua con un 10% (p/v) de fructosa o de glucosa, respectivamente. Tras el parto se ajustó la camada a 9 crías, madres y crías se alimentaron con dieta estándar de rata *ad libitum* y agua sin aditivo. El día 21 se finalizó el periodo de lactancia y las crías se separaron por géneros. El día 240 de edad, a una parte de la progenie macho se les comenzó a administrar comida estándar y agua suplementada con un 10 % de fructosa (p/v) hasta el día 261 de edad. Además, se incluyó un cuarto grupo experimental en el cual las madres y la descendencia únicamente bebieron agua sin aditivo. El día 261 tras el parto se sacrificó a los machos y se recogieron el plasma, el hígado y el tejido adiposo.

Un esquema del procedimiento experimental puede verse en la Figura 22. Una descripción más completa de los animales y el diseño experimental se incluye en el apartado Materiales y Métodos Generales.

2.2. Determinaciones plasmáticas y tisulares

Se utilizaron alícuotas de plasma para medir glucosa, lactato, colesterol, triglicéridos (Sprinreact, Gerona, España) y NEFA (Wako, Japón) mediante kits enzimáticos colorimétricos a tiempo final. Los niveles de insulina (Mercodia, Suecia), leptina (Biovendor, República Checa) y FGF21 (R&D Systems, EEUU) se determinaron mediante kit de ELISA específicos para rata. El índice de sensibilidad a insulina (ISI) se determinó como el cociente: $2/[(\text{insulina } \mu\text{M} \times \text{glucosa } \mu\text{M}) + 1]$.

Para medir colesterol y triglicéridos en tejido se llevó a cabo una extracción de lípidos por el método de Folch (Folch et al., 1957) tal y como aparece descrito en la sección Materiales y Métodos Generales y posteriormente se utilizaron kits enzimáticos colorimétricos específicos (Sprinreact, Gerona, España). Además, se realizaron homogenados de hígado en PBS que fueron previamente desproteínizados para medir a continuación los niveles de glucosa y lactato mediante kits enzimáticos colorimétricos a tiempo final (Sprinreact, Gerona, España).

2.3. Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real

El ARN total de hígado y tejido adiposo lumbar fue extraído mediante el kit Ribopure™ (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). Dicho ARN se trató con DNaseI usando el kit DNA free (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). Tras ello, se sintetizó el ADNc mediante retrotranscripción con Superscript II (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). La PCR a tiempo real se llevó a cabo utilizando un termociclador LightCycler 1.5 (Roche, Alemania). Los volúmenes de reactivos que se utilizaron en cada muestra fueron: 10 µL de SYBR *Premix Ex Taq* (Takara Bio Inc., Japón), 1 µL de cebador F 10 µM (IDT Technologies, EEUU), 1 µL de cebador R 10 µM (IDT Technologies, EEUU), 2 µL de la muestra de ADNc y 6 µL de agua mili-Q estéril.

Los parámetros programados para cada gen fueron los indicados por la base de datos de secuencias de cebadores *RT-PCR Primer Sequences for Atlas Nylon Arrays* (Clontech, EEUU) o la aplicación para el diseño de cebadores Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) (Anexo 1). El protocolo general utilizado para llevar a cabo la amplificación de cada gen en el *Light Cycler 1.5* (Roche, Alemania) figura en la Tabla 6. El análisis de la cuantificación relativa de la expresión de los genes es realizado por el *Software Light Cycler 4.05* que se basa en el método de $2^{-\Delta Ct}$ o método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Como gen de referencia (gen cuya expresión no varía en función de las condiciones experimentales) se utilizó RPS29.

2.4. Determinación de marcadores de estrés oxidativo

Como marcador de peroxidación lipídica se determinó la concentración de MDA en homogeandos en PBS de hígado y tejido adiposo mediante la técnica descrita por Wong y col. (Wong et al., 1987). Los complejos MDA-ácido tiobarbitúrico se midieron por fluorescencia a una longitud de onda excitación 515 nm/ emisión 553 nm. Los niveles de carbonilos de proteínas se usaron como marcador de estrés oxidativo de proteínas siguiendo el método descrito por Levine y col. (Levine et al., 1990). Los niveles de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH) se determinaron en tejido mediante electroforesis capilar acoplada a UV-DAD siguiendo el método descrito por Maeso y col. (Maeso et al., 2005).

La actividad de la glutatión reductasa (GR) se cuantificó siguiendo el protocolo propuesto por Delides y col. (Delides et al., 1976), según el cual el glutatión oxidado es reducido por la GR gracias a la oxidación del cofactor NADPH a NADP⁺. Esta velocidad de oxidación del NADPH es proporcional a la actividad de la glutatión reductasa.

La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) se midió mediante la oxidación del glutatión reducido por la GPx, el glutatión oxidado que se forma es de nuevo reducido por la GR gracias a la oxidación del cofactor NADPH a NADP⁺. De esta manera la velocidad de oxidación del NADPH será proporcional a la actividad de la GPx.

Para cuantificar la actividad catalasa (Cat) se lleva a cabo la medida de la velocidad de descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por la enzima a 240 nm (Aebi, 1984).

Para determinar la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se utilizó el kit comercial SOD Assay Kit (Sigma, EEUU). Además, para discernir entre la actividad SOD tipo 1 (SOD1) y tipo 2 (SOD2) se llevaron a cabo dos ensayos en paralelo de la misma muestra. Por un lado, se analizó la muestra sin tratar, lo que permitió medir la actividad SOD total. El segundo ensayo

Capítulo 1

permitió medir únicamente la actividad de la SOD2, realizando un tratamiento de la muestra con cianuro potásico (KCN, Sigma, EEUU) 11mM, el cual inhibe únicamente a la SOD1. La actividad SOD1 se determinó por diferencia entre la SOD total y la SOD2.

Una descripción más completa de cada uno de los métodos aparece descrita en el apartado Materiales y Método Generales.

2.5. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media +/- el error estándar. Los grupos experimentales están formados por seis animales de camadas diferentes, para evitar el “efecto camada”. Las diferencias estadísticamente significativas se analizaron mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA), utilizando el programa estadístico SPSS. Cuando el efecto del tratamiento fue estadísticamente significativo ($P < 0.05$), las diferencias entre las medias fueron evaluadas mediante el test de Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes.

3. Resultados

En estudios previos encontramos que los machos descendientes de madres-fructosa mostraron una alterada transducción de la señal de la insulina e hiperinsulinemia (Rodríguez et al., 2016b). Por consiguiente, antes de exponer a los machos a un consumo de fructosa en la edad adulta quisimos evaluar los niveles plasmáticos de diversos metabolitos (glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos) y el peso de la descendencia de madres control, fructosa o glucosa. Como puede verse en la Tabla 12 el consumo materno de fructosa no condujo a cambios en el peso corporal de los animales con 240 días de edad en comparación con los otros 2 grupos. La glucemia no presentó diferencias significativas entre los 3 grupos de estudio, al igual que en estudios nuestro previos (Rodríguez et al., 2016b). Los niveles de insulina plasmática tienden a ser mayores en los descendientes de madres-fructosa frente a los controles, llegando a ser significativos frente a los descendientes de madres-glucosa (Tabla 12). Los niveles de leptina muestran un perfil similar a los de insulina, pero las diferencias no son significativas. Finalmente, los niveles de triglicéridos y colesterol tienden a ser mayores en los machos de madres-glucosa frente a los machos de madres control y fructosa (Tabla 12).

Tabla 12: Peso corporal y parámetros plasmáticos de la descendencia macho a día 240 de edad de madres control, fructosa y glucosa.

| | Control | Fructosa | Glucosa |
|-----------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Peso corporal (g) | 587,4±20,5 | 563,7±29,7 | 563,4±37,6 |
| Glucosa (mg/dL) | 129,4±2,0 | 126,0±2,2 | 136,1±8,1 |
| Insulina (µg/dL) | 1,21±0,09 ^{AB} | 1,50±0,25 ^B | 0,90±0,14 ^A |
| Leptina (ng/mL) | 13,2±2,0 | 25,7±5,3 | 17,0±3,6 |
| Triglicéridos (mg/dL) | 49,8±5,5 | 43,3±3,8 | 86,4±17,7 |
| Colesterol (mg/dL) | 62,9±4,4 | 55,7±4,1 | 71,7±5,3 |

Los datos se muestran como media ± error estándar para 5-6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes ($p < 0,05$).

Como puede verse en la Tabla 13, los machos que consumieron fructosa en la edad adulta mostraron un marcado incremento en la cantidad de líquido ingerido y, en compensación, una reducción en la ingesta de comida sólida. Sin embargo, no mostraron cambios significativos en el peso corporal después de los 21 días de exposición a fructosa líquida (Tabla 13). Sorprendentemente, la cantidad de líquido consumido y la reducción en el consumo de dieta sólida tiene la misma proporción que la previamente reportada por Vilá y col. (Vilà et al., 2011). A pesar de esto, no se observaron cambios significativos en la energía total consumida entre los grupos que consumieron fructosa y el grupo control (CC) (4289,4±23,1; 4863,9±251; 4642,7±481,7; 4528,4±539,3 Kcal/21 días/ 2 ratas para CC, CF, FF, GF respectivamente). En los tres grupos experimentales (CF, FF, GF) tratados con fructosa en la edad adulta en torno al 25% de la energía total consumida procedía de la fructosa, al igual que lo publicado previamente por Vilá y col. (Vilà et al., 2011).

A pesar de que la glucemia tiende a ser menor en los grupos CF y FF, no se observan diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales estudiados. En cambio, los niveles de insulina en el grupo FF son mayores en comparación con los restantes grupos alcanzando valores significativos *versus* los grupos CC y GF (Tabla 13). Sin embargo, el índice de sensibilidad a insulina (ISI) fue similar entre los grupos CF y FF comparado con el grupo control (CC) y únicamente el grupo GF mostró valores superiores frente a los otros grupos, pero sin llegar a ser significativos (Tabla 13). La leptinemia mostró valores paralelos a la insulinemia, pero sin llegar a ser significativos (Tabla 13). Sorprendentemente, a pesar de que es conocida la capacidad de la fructosa de producir hiperlipidemia (Roglans et al., 2002), solo mostraron incrementos en plasma el grupo CF para los triglicéridos y los grupos CF y GF para el colesterol y NEFA frente al grupo CC (Tabla 13). Ello indicaría que la lipemia no se ve afectada por el consumo de fructosa en el grupo FF. Estos datos ponen de manifiesto que el consumo materno de fructosa durante la gestación condiciona los efectos inducidos por la fructosa en el metabolismo de la glucosa y los lípidos de la descendencia macho.

En cuanto a la expresión génica hepática, los niveles de ARNm de genes lipogénicos, como SREBP1c, la ATP citrato liasa o la piruvato quinasa hepática (L-PK), tienden a estar regulados positivamente por la insulina (Tabla 13). En cambio, los genes del catabolismo de ácidos grasos, como la CPT1, aparecen bajo el control negativo de la insulina (Tabla 13). Estos datos están en concordancia con otros trabajos en los que se describen los efectos mediados por la insulina en estas rutas metabólicas (Dentin et al., 2005). A pesar de todo, ChREBP, otro gen lipogénico, no se encuentra afectado (Tabla 13). Por otro lado, la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, tales como la proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGFBP1; del inglés: *insulin-like growth factor-binding protein 1*) y la PEPCCK se comportan de manera paralela a la glucemia y no a la insulinemia (Tabla 13). Es más, otros genes que se ha demostrado que están afectados por el consumo de fructosa; como ABCG5 (Apro et al., 2015), PPAR α y esteatoril-CoA desaturasa de tipo 1 (SCD1) (Roglans et al., 2007), mostraron una disminución no significativa en el caso de ABCG5 en los grupos que consumieron fructosa en comparación con el grupo control (Tabla 13), y no mostraron diferencias entre los cuatro grupos experimentales en el caso de PPAR α y SCD1 (Tabla 13).

Capítulo 1

Tabla 13: Peso corporal, ingestas de comida sólida y líquida, parámetros plasmáticos y expresión génica hepática de la descendencia macho a día 261 de edad tratados con fructosa y descendientes de madres-fructosa (FF), glucosa (GF) y control (CF). El grupo CC son machos controles de madres control.

| | CC | CF | FF | GF |
|---|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Peso corporal (g) | 578,3±15,0 | 602,4±19,4 | 579,1±31,9 | 576,7±42,3 |
| Incremento de peso (g) | 2,58±1,25 ^A | 14,96±2,19 ^B | 15,30±5,01 ^{AB} | 17,01±5,14 ^{AB} |
| Consumo de dieta sólida (g/21 días/2 ratas) | 1140,2±6,1 | 884,2±71,3 | 843,4±31,2 | 947,6±112,8 |
| Consumo de líquido (mL/21 días/2 ratas) | 1255,3±154,4 | 3844,2±1297,5 | 3674,2±911,1 | 2409,0±287,0 |
| Glucosa (mg/dL) | 173,6±9,6 | 145,8±4,2 | 139,0±5,9 | 163,2±14,3 |
| Insulina (µg/dL) | 1,90±0,22 ^{AB} | 2,10±0,20 ^{BC} | 2,86±0,18 ^C | 1,26±0,18 ^A |
| ISI | 0,50±0,04 | 0,49±0,02 | 0,43±0,03 | 0,66±0,06 |
| Leptina (ng/mL) | 17,02±1,93 | 18,51±2,37 | 32,79±8,21 | 23,41±4,12 |
| Triglicéridos (mg/dL) | 69,9±2,3 ^{AB} | 83,0±7,2 ^B | 53,5±4,5 ^A | 61,9±4,9 ^A |
| Colesterol (mg/dL) | 53,0±3,4 ^{AB} | 59,4±3,5 ^{AB} | 48,3±1,6 ^A | 69,1±5,9 ^B |
| NEFA (mmol/L) | 0,26±0,02 ^{AB} | 0,34±0,02 ^B | 0,19±0,05 ^A | 0,33±0,02 ^B |
| Lactato (mg/dL) | 28,8±6,3 | 26,3±2,2 | 30,1±4,4 | 38,0±4,1 |
| ARNm Expresión génica hepática | | | | |
| SREBP1c | 4,19±0,42 ^{AB} | 2,62±0,48 ^A | 5,53±0,83 ^B | 3,83±0,73 ^{AB} |
| ATP citrato liasa | 0,86±0,15 | 0,95±0,11 | 1,55±0,28 | 1,11±0,09 |
| LPK | 2,70±0,97 | 3,06±0,40 | 3,71±0,46 | 2,38±0,44 |
| CPT1 | 1,01±0,13 | 0,90±0,14 | 0,75±0,09 | 1,33±0,26 |
| ChREBP | 1,81±0,16 | 1,36±0,26 | 1,54±0,12 | 1,42±0,22 |
| PEPCK | 1,11±0,32 | 0,63±0,24 | 0,52±0,14 | 1,42±0,22 |
| IGFBP1 | 3,41±1,49 | 1,34±0,22 | 1,49±0,16 | 2,66±0,42 |
| SCD1 | 3,34±0,90 | 3,02±0,50 | 2,50±0,44 | 2,86±0,75 |
| PPARα | 1,25±0,14 | 1,36±0,28 | 1,19±0,17 | 1,49±0,22 |
| ABCG5 | 3,33±0,90 | 1,09±0,23 | 1,03±0,15 | 1,30±0,19 |

Los valores se expresan como media ± error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes ($p < 0,05$). ISI: índice de sensibilidad a insulina; NEFA: Ácidos grasos no esterificados; SREBP1c: Proteína de unión al elemento respuesta a esteroides 1c; LPK: Piruvato quinasa hepática; CPT1: Carnitina palmitoil transferasa 1; ChREBP: Proteína de unión al elemento respuesta a carbohidratos; PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; IGFBP1: Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1; SCD1: Esteatoril-CoA desaturasa de tipo 1; PPARα: Receptor activado por proliferadores peroxisomales alpha; ABCG5: *ATP binding cassette G5*.

Se ha demostrado que la fructosa estimula la expresión de FGF21 en el hígado (Fisher et al., 2017) e incluso aumenta sus niveles plasmáticos, tanto en roedores como en humanos (Dushay et al., 2015; Fisher et al., 2017). Por esa razón, medimos la expresión de FGF21 en nuestro modelo experimental. Como puede verse en la Figura 44A, los 3 grupos experimentales de animales que consumieron fructosa en la edad adulta mostraron un incremento en la expresión hepática de FGF21, siendo este aumento más acusado y llegando a ser significativo en los machos procedentes de madres que consumieron fructosa en la gestación (FF) en comparación con el grupo control (CC). En paralelo, los niveles plasmáticos de FGF21, mostraron un perfil muy similar a la expresión de FGF21, presentando un aumento en los grupos de animales que consumieron fructosa, que alcanzó valores significativos en los grupos CF y FF frente al CC (Figura 44B).

FGF21 es una hormona que se expresa fundamentalmente en el hígado que funciona como un regulador del metabolismo glucídico y lipídico y controla la homeostasis energética. Su papel protector frente a la esteatosis y el estrés oxidativo ha sido propuesto en situaciones que cursan con acumulación lipídica y un desequilibrio del estado redox, tales como dietas ricas en fructosa y grasa (Chukijrungroat et al., 2017), el consumo de etanol (Desai et al., 2017), las dietas obesogénicas (Xu et al., 2009), la diabetes tipo 2 (Chavez et al., 2009), la obesidad y el síndrome metabólico (Gómez-Sámamo et al., 2017; Tanaka et al., 2015). De hecho, FGF21 se considera una hormona de respuesta al estrés en humanos y roedores (Gómez-Sámamo et al., 2017). Por esa razón, decidimos medir el contenido lipídico, los marcadores de estrés oxidativo y la actividad de enzimas antioxidantes en el hígado de los machos que consumieron fructosa.

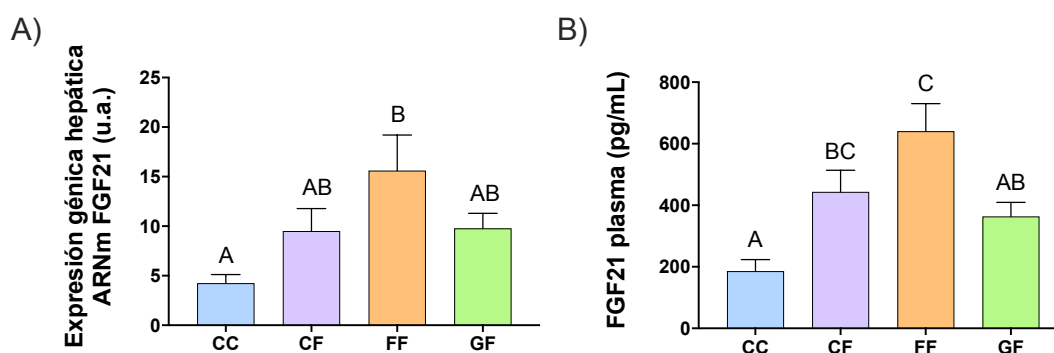


Figura 44: La ingesta de fructosa en la gestación exacerba la producción de FGF21 inducida por el consumo de fructosa en la descendencia macho adulta. A) expresión hepática de FGF21 y B) niveles plasmáticos de FGF21 en la descendencia macho alimentada con fructosa descendiente de madres control (CF: barras moradas), fructosa (FF: barras naranjas) y glucosa (GF: barras verdes). CC: Machos control de 261 día de edad procedentes de madres control (barras azules). Los valores se expresan como media \pm error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes ($p < 0,05$). FGF21: factor de crecimientos de fibroblastos 21.

Como puede verse en la Tabla 14, el peso del hígado tiende a ser mayor en el grupo CF. Además, el consumo de fructosa produce un aumento del peso hepático, cuando este se corrige por el peso del animal, sólo en los machos descendientes de madres control (CF), siendo significativa esta diferencia frente al grupo CC y GF. A pesar de todo, el contenido hepático de lípidos totales es mayor en el grupo GF, siendo significativo frente a los dos otros grupos que consumieron fructosa (CF y FF). Es más, el mismo perfil se observa en el caso de los triglicéridos y colesterol hepáticos (Tabla 14). Curiosamente, el contenido de glucosa disminuye y el de lactato y glucógeno aumentan en los hígados de los machos que consumieron fructosa y que eran descendientes de madres control (CF) y fructosa (FF), siendo significativo en comparación con el grupo CC (Tabla 14). Estos hallazgos demuestran que la fructosa ingerida por la descendencia sigue diferentes rutas (síntesis de lípidos frente a la producción de glucógeno o lactato) (Herman & Samuel, 2016) en función del carbohidrato que han recibido sus madres durante la gestación.

Capítulo 1

Tabla 14: Peso del hígado y parámetros hepáticos a día 261 de edad de los machos tratados con fructosa descendientes de madres-fructosa (FF), glucosa (GF) o control (CF). El grupo CC son machos controles de madres control.

| | CC | CF | FF | GF |
|---|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>Peso del hígado (g)</i> | 17,5±0,6 | 20,2±0,9 | 18,0±0,8 | 17,5±1,7 |
| <i>Peso del hígado (g/kg peso corporal)</i> | 30,2±0,6 ^A | 33,4±0,7 ^B | 31,3±1,0 ^{AB} | 30,1±0,8 ^A |
| <i>Lípidos totales (mg/g tejido)</i> | 26,6±1,4 ^{AB} | 25,2±1,0 ^A | 24,4±1,0 ^A | 30,1±1,1 ^B |
| <i>Triglicéridos (mg/mg proteína)</i> | 0,107±0,015 | 0,112±0,002 | 0,102±0,007 | 0,136±0,016 |
| <i>Colesterol (mg/mg proteína)</i> | 8,7±0,6 ^{AB} | 9,1±0,2 ^{AB} | 8,6±0,3 ^A | 10,1±0,3 ^B |
| <i>Glucosa (mg/mg proteína)</i> | 0,42±0,04 ^B | 0,24±0,02 ^A | 0,24±0,01 ^A | 0,30±0,01 ^{AB} |
| <i>Lactato (mg/mg proteína)</i> | 0,49±0,04 ^A | 0,80±0,08 ^B | 0,76±0,06 ^B | 0,63±0,03 ^{AB} |
| <i>Glucógeno (mg/mg proteína)</i> | 198,7±32,0 ^A | 292,8±26,8 ^B | 280,9±17,6 ^{AB} | 242,9±7,5 ^{AB} |

Los valores se expresan como media ± error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes ($p < 0,05$).

En cuanto a los marcadores de estrés oxidativo, los niveles hepáticos de MDA y carbonilos de proteínas no se encontraron incrementados por el consumo de fructosa e incluso mostraron una disminución en la descendencia macho procedente de madres que consumieron fructosa (FF) en comparación con los otros tres grupos evaluados (Figura 45). Para investigar el mecanismo involucrado en este inesperado efecto antioxidante, se llevó a cabo la medida de diferentes sistemas antioxidantes, tales como el contenido de glutatión y la actividad de las enzimas catalasa, GR, GPx y SOD. Como puede verse en la Tabla 15, mientras que la catalasa, la GR y la SOD1 apenas presentan cambios, la actividad de la GPx disminuye y la de la SOD2 aumenta significativamente en la progenie macho que consumió fructosa, independientemente de la dieta materna. Por otro lado, los niveles de glutatión reducido se encuentran aumentados por la ingesta de fructosa, excepto en los machos procedentes de madres-fructosa (Tabla 15), en consonancia con los resultados obtenidos en los marcadores de estrés oxidativo (Figura 45).

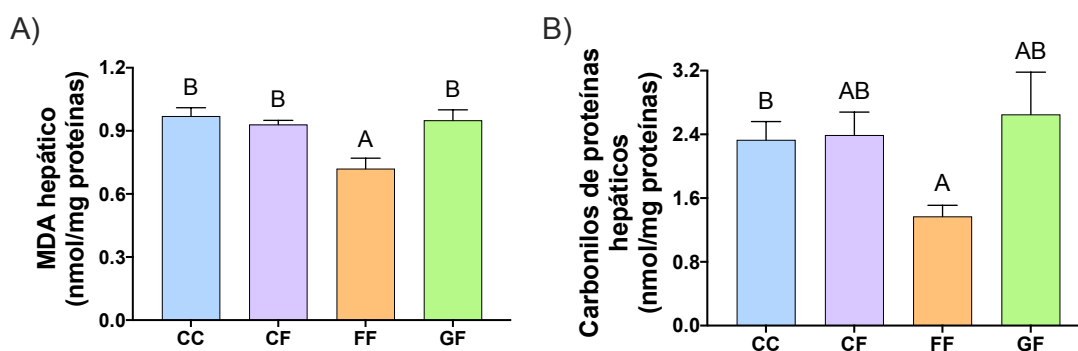


Figura 45: La inducción de FGF21 por el consumo de fructosa en la gestación evita el estrés oxidativo hepático en la descendencia macho que consumió fructosa. A) Niveles de MDA y B) de carbonilos de proteínas hepáticos en la descendencia macho alimentada con fructosa descendiente de madres control (CF: barras moradas), fructosa (FF: barras naranjas) y glucosa (GF: barras verdes). CC: Machos control de 261 día de edad procedentes de madres control (barras azules). Los valores se expresan como media ± error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes ($p < 0,05$).

Tabla 15: Sistema antioxidante hepático a día 261 de edad de los machos tratados con fructosa descendientes de madres-fructosa (FF), glucosa (GF) o control (CF). El grupo CC son machos controles de madres control.

| | CC | CF | FF | GF |
|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>Catalasa (mU/mg proteína)</i> | 914,4±59,7 | 862,0±37,5 | 956,6±43,0 | 974,1±51,0 |
| <i>GPx (U/ m gproteína)</i> | 3,97±0,25 ^B | 2,63±0,19 ^A | 2,54±0,08 ^A | 3,02±0,16 ^A |
| <i>GR (mU/mg proteína)</i> | 83,1±4,1 | 73,6±5,5 | 68,1±2,1 | 69,9±3,7 |
| <i>SOD1 (U/mg proteína)</i> | 1,93±0,42 | 1,87±0,19 | 2,06±0,20 | 1,83±0,16 |
| <i>SOD2 (U/mg proteína)</i> | 8,30±0,18 ^A | 11,74±0,23 ^B | 11,05±0,16 ^B | 11,65±0,28 ^B |
| <i>GSH (mM/g tejido)</i> | 8,28±0,33 ^{AB} | 9,17±0,21 ^B | 7,46±0,21 ^A | 8,94±0,25 ^B |

Los valores se expresan como media ± error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes (p<0,05). Gpx: glutation peroxidasa; GR: Glutation reductasa; SOD: Superóxido dismutasa; GSH: Glutation reducido.

El tejido adiposo se ha propuesto como un importante tejido diana de FGF21 (Kim & Lee, 2014; Luo & McKeehan, 2013). Por esa razón, se llevó a cabo el análisis en dos tipos de tejido adiposo blanco (lumbar y epididimal) y la medida de enzimas antioxidantes y marcadores de estrés oxidativo en tejido adiposo lumbar de los machos sometidos a una dieta con fructosa.

Como puede verse en la Tabla 16, el peso del tejido adiposo blanco tiende a ser mayor en el grupo FF tanto en la localización lumbar como epididimal. En cambio, no se observan cambios en el tejido adiposo marrón entre los tres grupos que consumieron fructosa ni en comparación con el grupo control (Tabla 16). Aunque el contenido total de lípidos expresados en mg/g de tejido en ambos tipos de tejido adiposo blanco no mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos, la cantidad total de lípidos del tejido adiposo resulta ser mayor, aunque sin llegar a ser significativo, en el grupo FF tanto en su localización lumbar (5,12±0,56; 5,04±0,71; 7,76±1,77; 6,8±1,24 g por órgano para el grupo CC, CF, FF y GF respectivamente) como en la epididimal (4,06±0,38; 5,00±0,25; 6,03±0,73; 5,41±0,79 g por órgano para el grupo CC, CF, FF y GF respectivamente).

Los efectos de FGF21 sobre la lipólisis en el tejido adiposo son complejos. De hecho, se ha propuesto que el FGF21 ejerce un papel en el control del ciclo fútil denominado ciclo de triglicéridos/ácidos grasos para explicar por qué se ha descrito en diferentes trabajos que FGF21 estimula o reprime la lipólisis en el tejido adiposo blanco (Dutchak et al., 2012). Mientras que FGF21 induce la hidrólisis y movilización de los triglicéridos, también induce los genes implicados en la recaptación de los NEFA (mediada por trasportadores de ácidos grasos como CD36) (Schlein et al., 2016) y la reesterificación con glicerol (mediada por el gen principal de la gliceroneogénesis, la PEPCK) (Dutchak et al., 2012). Es más, se ha demostrado que FGF21 reduce la expresión de genes relacionados con la lipogénesis (como la ATP citrato liasa) (Geller et al., 2019). Curiosamente, en el presente estudio, aunque FGF21 se encuentre aumentado en los 3 grupos de machos alimentados con fructosa, la lipólisis en tejido adiposo lumbar (medida como niveles de NEFA en plasma, Tabla 13), y la recaptación y reesterificación de los NEFA (Tabla 16) sólo se encuentran aumentadas en los grupos GF y CF, siendo esta última más pronunciada en los machos CF. En cambio, la lipogénesis se encuentra significativamente aumentada en el grupo FF en comparación con el grupo control (CC) y CF (Tabla 16).

Capítulo 1

Tabla 16: Peso y parámetros del tejido adiposo y expresión génica del tejido adiposo lumbar a día 261 de edad de los machos tratados con fructosa descendientes de madres-fructosa (FF), glucosa (GF) o control (CF). El grupo CC son machos controles de madres control.

| | CC | CF | FF | GF |
|---|---|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>Peso del tejido adiposo lumbar (g)</i> | 6,22±0,60 | 6,06±0,80 | 9,10±2,13 | 7,62±1,19 |
| <i>Peso del tejido adiposo lumbar (g/peso corporal)</i> | 10,7±0,9 | 9,9±0,9 | 15,0±2,8 | 12,8±1,1 |
| <i>Lípidos totales (mg/g tejido)</i> | 820,4±24,1 | 842,2±24,8 | 855,5±22,2 | 872,5±38,2 |
| <i>Peso del tejido adiposo epididimal (g)</i> | 7,11±1,01 | 7,26±0,97 | 8,90±1,12 | 7,40±0,60 |
| <i>Peso del tejido adiposo epididimal (g/peso corporal)</i> | 12,1±1,4 | 11,8±1,2 | 15,1±1,3 | 12,9±0,9 |
| <i>Lípidos totales (mg/g tejido)</i> | 662,7±17,2 | 721,1±24,0 | 693,7±50,0 | 726,9±73,1 |
| <i>Peso del tejido adiposo marrón (g)</i> | 1,17±0,06 | 0,98±0,03 | 1,04±0,12 | 0,93±0,07 |
| <i>Peso del tejido adiposo marrón (g/peso corporal)</i> | 2,0±0,1 | 1,6±0,0 | 1,8±0,2 | 1,6±0,0 |
| | Expresión génica tejido adiposo lumbar (u.a.) | | | |
| <i>PEPCK</i> | 0,12±0,05 | 0,28±0,07 | 0,07±0,01 | 0,14±0,08 |
| <i>CD36</i> | 0,20±0,04 ^{AB} | 0,44±0,13 ^B | 0,06±0,02 ^A | 0,11±0,04 ^{AB} |
| <i>ATP citrato liasa</i> | 0,23±0,03 ^A | 0,027±0,09 ^A | 0,66±0,14 ^B | 0,41±0,09 ^{AB} |

Los valores se expresan como media ± error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes ($p < 0,05$). PEPCK: Fosfenolpiruvato carboxiquinasa.

En cuanto a los marcadores de estrés oxidativo, el contenido de MDA en el tejido adiposo tiende a reducirse por el consumo de fructosa en los grupos CF y GF, mientras que el efecto es opuesto en el grupo FF. Como puede verse en la Figura 46A, los valores de MDA son significativamente mayores en los machos FF en comparación con los otros dos grupos que recibieron fructosa en la edad adulta. A pesar de esto, el consumo de fructosa indujo un aumento en el contenido de carbonilos de proteínas de manera similar en todos los grupos que consumieron fructosa, llegando a ser significativo en los grupos FF y GF frente al grupo CC (Figura 46B). Para investigar más a fondo los mecanismos detrás de los efectos pro-oxidantes de la fructosa, observados principalmente en machos de madres que consumieron fructosa, medimos diferentes componentes del sistema antioxidante en el tejido adiposo. Como puede verse en la Figura 46C, mientras que la actividad de la catalasa se encuentra disminuida por el consumo de fructosa en los grupos CF y FF, la de la GPx aparece significativamente disminuida en los tres grupos que consumieron fructosa en comparación con los machos control (CC) (Figura 46D). Sorprendentemente, la actividad GR y la SOD2 presentaron perfiles similares en respuesta a la ingesta de fructosa y en consonancia con los valores encontrados de peróxidos de lípidos (MDA, Figura 46A). Así, mientras el consumo de fructosa promueve un aumento en la actividad de la GR y la SOD2 en los machos procedentes de madres control y glucosa, estas enzimas no se ven alteradas en los machos que consumieron fructosa y que eran procedentes de madres-fructosa (FF), conservando unos valores similares a los de las ratas control (CC) (Figura 46 E y F). Estos resultados refuerzan la idea de que el consumo materno de fructosa afecta a los efectos inducidos por la fructosa sobre la acumulación lipídica y el estrés oxidativo,

tanto en el hígado como en el tejido adiposo y posiblemente este efecto esté mediado por FGF21.

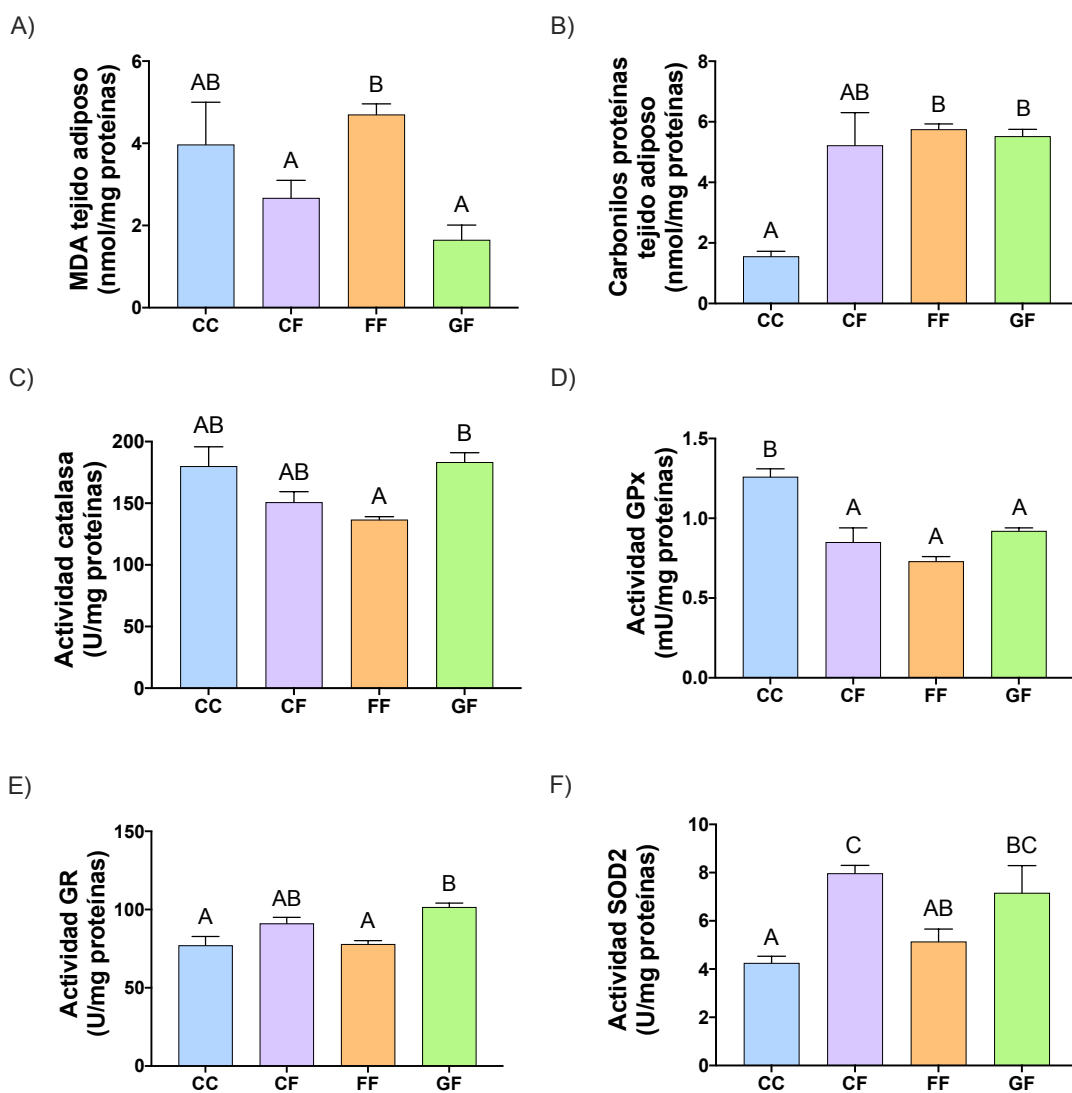


Figura 46: La inducción de FGF21 por el consumo de fructosa en la gestación mejora el estrés oxidativo en el tejido adiposo lumbar en la descendencia macho adulta procedente de madres control, pero no en los descendientes de madres fructosa. A) valores de MDA, B) carbonilos de proteína, C) catalasa, D) GPx, E) GR, F) SOD2 del tejido adiposo lumbar de la descendencia macho alimentada con fructosa descendiente de madres control (CF: barras moradas), fructosa (FF: barras naranjas) y glucosa (GF: barras verdes). CC: Machos control de 261 día de edad procedentes de madres control (barras azules). Los valores se expresan como media \pm error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes ($p < 0,05$). Gpx: glutation peroxidasa; GR: Glutation reductasa; SOD2: Superóxido dismutasa 2.

4. Discusión

En un estudio previo (Rodríguez et al., 2013), observamos como el consumo materno de fructosa conducía en los fetos a una alterada transducción de señal hepática de leptina y esteatosis hepática. Posteriormente, demostramos que estas alteraciones metabólicas eran responsables de una programación fetal de la descendencia. Describimos que el consumo materno de fructosa, pero no el de glucosa, provocaba en la descendencia macho hiperinsulinemia y una alterada respuesta a insulina (Rodríguez et al., 2015; Rodríguez et al., 2016b). Así, en el presente estudio la descendencia macho a día 240 de edad procedente de madres-fructosa antes de someterla al consumo de fructosa en la edad adulta mostró unos mayores niveles de insulina plasmática que los descendientes de madres control y glucosa (Tabla 12). A pesar de esto, la glucemia era similar independientemente de si los machos procedían de madres control, glucosa o fructosa.

Por esta razón, teniendo en cuenta las alteraciones metabólicas de la descendencia macho de madres que consumieron fructosa en la gestación y queriendo descubrir si este fenotipo se mantiene o se agrava con el consumo de fructosa en agua de bebida en un corto periodo de tiempo (3 semanas) en estos animales, sometimos a la descendencia macho de madres control, fructosa o glucosa a la ingesta de fructosa líquida y determinamos si la ingesta materna de fructosa condiciona la respuesta a fructosa en la descendencia adulta.

Múltiples estudios experimentales y clínicos han mostrado diversos efectos metabólicos adversos asociados al consumo de fructosa (Brinton, 2016; de Koning et al., 2012; Johnson et al., 2007; Rodríguez et al., 2013; Tappy & Lê, 2010; Vilà et al., 2011). Los principales efectos asociados al consumo de fructosa son, entre otros, la obesidad, la resistencia a insulina, la inducción de la lipogénesis, la elevación de los triglicéridos plasmáticos, hígado graso e, incluso, inflamación hepática (Brinton, 2016). En el presente estudio, el 25% de la cantidad total de calorías consumidas por las ratas macho adultas procedían de la fructosa, siendo estos datos similares a otros previamente descritos por otros autores (Vilà et al., 2011). Conviene destacar que este consumo es similar a la ingesta calórica diaria observada en grandes consumidores de bebidas azucaradas en la población (20-25%) (Rodrigo et al., 2016). Debido a este elevado consumo de calorías en forma de azúcares simples y, a pesar de que la ingesta energética total fue similar entre los animales que consumieron fructosa y los animales control (CC), puede observarse un claro aumento en el peso corporal en los 3 grupos de machos que consumieron fructosa, frente a los control, independientemente de la dieta que consumieron sus madres durante la gestación. Sorprendentemente, a pesar de que la insulinemia se encontraba aumentada en los machos adultos procedentes de madres-fructosa después de recibir fructosa en la edad adulta (FF), la sensibilidad a la insulina no se encontraba afectada en comparación con los otros grupos. En concordancia con estos datos, los genes lipogénicos en el hígado tienden a estar aumentados en estos animales. A pesar de esto, curiosamente se observó un efecto hiperlipidémico mediado por la ingesta de fructosa en los machos procedentes de madres control y glucosa, pero no en los machos de madres-fructosa.

De manera paralela a estudios previos en animales y en humanos (Dushay et al., 2015; Fisher & Maratos-Flier, 2016), el consumo de fructosa estimuló la expresión hepática e incrementó los niveles en sangre de FGF21 en los machos de los 3 grupos.

Sorprendentemente, el valor más alto se encontró en los machos descendientes de madres-fructosa, seguido de los de madres control. Así, hemos demostrado por primera vez que la producción de FGF21 inducida por la ingesta materna de fructosa en la descendencia adulta, se ve influenciada por la dieta recibida por sus madres. Cada vez más evidencias sugieren que FGF21 ejerce efectos beneficiosos en el metabolismo de la glucosa y las grasas. Por ello, estos altos niveles de FGF21 en plasma observados en el grupo FF podrían estar relacionados con el posible efecto protector de FGF21 en situaciones con alteraciones en los lípidos y carbohidratos (Chavez et al., 2009; Chukijrunroat et al., 2017; Desai et al., 2017; Gómez-Sámano et al., 2017; Tanaka et al., 2015; Xu et al., 2009). De hecho, la acumulación lipídica hepática inducida por la fructosa, sólo se observó en los machos procedentes de madres glucosa. Es más, la actividad plasmática de la alanina-amino transferasa (ALT), una enzima relacionada con la funcionalidad hepática y que se ha demostrado que se ve reducida por acción de FGF21 (W. F. Wang et al., 2015), se encontró significativamente aumentada en el grupo GF en comparación con los otros tres grupos evaluados ($80,8 \pm 9,1^{AB}$; $72,3 \pm 8,4^A$; $68,4 \pm 4,4^A$; $126,4 \pm 20,0^B$ U/L, para CC, CF, FF, and GF, respectivamente). Sorprendentemente, el consumo de fructosa en los machos de madres control y fructosa provocó una acumulación de glucógeno, junto con una disminución en la glucosa hepática, paralelamente a la glucemia, pudiendo estar ambos efectos mediados por FGF21. Se ha demostrado que FGF21 reduce la liberación hepática de glucosa mediante el incremento en el contenido hepático de glucógeno y la inhibición de la gluconeogénesis (J. Liu et al., 2019), y estos efectos estarían en consonancia con nuestros resultados obtenidos en la expresión génica de la PEPCK y el contenido hepático de lactato en los grupos CF y FF.

Curiosamente, a pesar de que se ha demostrado que el consumo de fructosa promueve el estrés oxidativo (Castro et al., 2011; Francini et al., 2010; Rebolledo et al., 2008; Rodrigo et al., 2016), los machos alimentados con fructosa no mostraron aumentos ni en la peroxidación lipídica hepática (medida como niveles de MDA) ni en la oxidación de proteínas (medida como carbonilos de proteínas). Incluso se observó una disminución significativa en estos parámetros en los machos descendientes de madres-fructosa (FF). Estudios recientes han demostrado que un incremento de FGF21 protege a los tejidos de un entorno con un elevado estrés oxidativo (Gómez-Sámano et al., 2017; Planavila et al., 2015; Y. Yu et al., 2015), por consiguiente, el papel de FGF21 en los machos que consumieron fructosa no debe descartarse. Es más, se ha propuesto a la SOD2 como un gen diana de FGF21 (Gómez-Sámano et al., 2017; Planavila et al., 2015) y, a pesar de que otras enzimas de los sistemas de defensa antioxidante no cambian (catalasa, SOD1 y glutatión reductasa) o incluso se reducen (glutatión peroxidasa) tras la ingesta de fructosa en la edad adulta, la SOD2 se encuentra claramente inducida en los tres grupos de machos que consumieron fructosa. Además conviene resaltar que, mientras que el contenido de glutatión oxidado se encuentra reducido en los tres grupos, en consonancia con la falta de regeneración de glutatión asociada a una disminuida actividad de la glutatión peroxidasa en los machos que consumieron fructosa; el contenido de glutatión reducido es especialmente bajo en el grupo FF, lo que refleja una mayor utilización de este importante antioxidante y ello explicaría los hallazgos observados en los niveles de MDA y carbonilos de proteínas en este grupo.

Capítulo 1

El tejido adiposo parece ser otro importante tejido diana para FGF21 (Gómez-Sámano et al., 2017; Kim & Lee, 2014; Luo & McKeethan, 2013). A través de su acción sobre este tejido, FGF21 contribuye a corregir los niveles de triglicéridos y glucosa en plasma, la sensibilidad a insulina y la adiposidad. Por el contrario, la ingesta de fructosa se ha relacionado con un exceso de tejido adiposo intraperitoneal y visceral (Brinton, 2016). En el presente estudio, la adiposidad inducida por la fructosa se observa en el tejido adiposo lumbar (para el grupo FF y, en menor medida, GF) y epididimal (para el grupo FF). Dado a que el grupo FF es el que presenta los mayores niveles de FGF21, esta mayor adiposidad indica posiblemente una falta de respuesta del tejido adiposo blanco a esta hormona. En consonancia con estos resultados, la acumulación de lípidos y los marcadores de estrés oxidativo en el tejido adiposo de los machos FF también sugieren una posible resistencia a FGF21. Así, la lipólisis, la expresión de CD36 y de la PEPCK (rutas/genes regulados positivamente por FGF21) (Dutchak et al., 2012; Schlein et al., 2016) se encuentran aumentados en los grupos CF y GF, pero no en el FF, y encontramos el efecto opuesto para la ATP citrato liasa (el cual es regulado negativamente por FGF21) (Geller et al., 2019). Es más, la peroxidación lipídica se encuentra disminuida en los machos que consumieron fructosa y que eran procedentes de madres control y glucosa, pero no en los de madres-fructosa. Esta situación de menor estrés oxidativo podría estar relacionada con la actividad antioxidante de la glutatión reductasa y, principalmente, la SOD2 (un gen diana de FGF21), las cuales se encuentran elevadas en todos los machos que tomaron fructosa, a excepción de los descendientes de madres-fructosa (FF).

Conviene resaltar que nosotros y otros autores (Furukawa et al., 2004; Rodrigo et al., 2016) hemos demostrado que los niveles plasmáticos de peróxidos de lípidos reflejan los niveles de peroxidación lipídica en el tejido adiposo blanco, pero no en el hígado. Esta es la situación que aparece en el presente estudio, la baja cantidad de productos de peroxidación lipídica encontrada en el tejido adiposo lumbar del grupo CF y GF (Figura 46A) muestra un perfil similar a sus niveles en plasma ($65,5 \pm 3,9^B$; $46,9 \pm 9,2^{AB}$; $75,5 \pm 21,9^{AB}$; $36,7 \pm 4,3^A$ $\mu\text{mol MDA}/\text{mmol NEFA}$, para el grupo CC, CF; FF y GF, respectivamente).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, estos hallazgos ponen de manifiesto que la ingesta materna de fructosa afecta a la función del FGF21 por la fructosa en el metabolismo glucídico y lipídico en la descendencia. Así, en machos de madres control (CF), FGF21 parece proteger el hígado y el tejido adiposo contra los efectos inducidos por la ingesta de fructosa en términos de la acumulación lipídica y el estrés oxidativo. En cambio, en machos procedentes de madres que tomaron glucosa (GF), FGF21 es incapaz de evitar la esteatosis hepática inducida por fructosa, y en los descendientes de madres que ingirieron fructosa (FF), FGF21 no es capaz de prevenir la adiposidad y el estrés oxidativo en tejido adiposo promovidos por la ingesta de fructosa.

La expresión de FGF21 y sus niveles plasmáticos aumentan en respuesta a una gran variedad de agentes estresantes metabólicos, como el ejercicio, el frío, el ayuno o un exceso de nutrientes. En algunos casos, este incremento de FGF21 es beneficioso y supone una respuesta metabólica adaptativa (Gimeno & Moller, 2014; Kim & Lee, 2014). Y posiblemente, esta es la situación que se produce en los machos de madres control cuando fueron expuestos a una sobrecarga de fructosa (CF). A pesar de esto, se han observado incrementos en FGF21 en numerosas alteraciones metabólicas en humanos (Chavez et al., 2009; Gómez-Sámano et al.,

2017), así como en ratones obesos y diabéticos donde la señal de FGF21 se encuentra alterada en el hígado y en el tejido adiposo blanco (Fisher et al., 2010), sugiriendo la existencia de una situación de resistencia a FGF21 (Kim & Lee, 2014). Por consiguiente, el papel clave del FGF21 endógeno inducido por la obesidad y otras alteraciones metabólicas sigue siendo controvertido. Esta podría ser la situación observada en este estudio en los machos procedentes de madres-fructosa y glucosa (FF y GF) cuando se les somete al consumo de fructosa.

FGF21 se ha propuesto como un agente terapéutico prometedor para el tratamiento de la obesidad y la resistencia a insulina. Se ha demostrado cómo la administración exógena de FGF21 conduce a una mejora en las alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad, por lo que sus efectos beneficiosos en el metabolismo parecen irrefutables (Kim & Lee, 2014). A pesar de esto, algunos estudios han demostrado una reducida respuesta al tratamiento agudo de FGF21 en condiciones de diabetes asociada a obesidad en varios tejidos, incluyendo el hígado, tejido adiposo y los islotes del páncreas (So & Leung, 2016). De esta manera, los hallazgos del presente estudio sugieren precaución en el uso de FGF21 y sus análogos como agente terapéutico y refuerzan la necesidad de estudios adicionales que definan mejor el papel y mecanismo de acción de FGF21 en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas.

Finalmente, dada la implicación de FGF21 en los efectos aquí observados, estos hallazgos necesitan ser confirmados mediante estudios más directos (por ejemplo, usando ratones *knockout* para FGF21 procedentes de madres que consumieron fructosa). En conclusión, el resultado más relevante del presente trabajo es que la ingesta materna de carbohidratos determina la producción y función del FGF21 inducido por la fructosa en la descendencia macho adulta. El abundante y extendido consumo de fructosa en bebidas azucaradas en todo el mundo por adultos jóvenes, incluyendo personas en edad reproductiva, refuerza la notable relevancia clínica de los resultados obtenidos en este estudio. Por consiguiente, debería ser recomendada una reducción del consumo de bebidas azucaradas con fructosa, especialmente durante la gestación.

Capítulo 2: El consumo materno de fructosa incrementa la síntesis hepática de H₂S, pero exacerba la reducción inducida por la fructosa en la descendencia hembra.

1. Introducción

Numerosos estudios demuestran que alteraciones metabólicas durante la etapa prenatal y postnatal modulan el riesgo de sufrir enfermedades metabólicas en la edad adulta (Koletzko et al., 2005). La alimentación materna es uno de los factores más importantes que afectan a la salud de la descendencia (Vickers et al., 2005). La fructosa se usa como azúcar añadido en forma de sacarosa o jarabe de maíz rico en fructosa para edulcorar una gran variedad de alimentos procesados y bebidas azucaradas. Desgraciadamente, la fructosa se ha relacionado en numerosas ocasiones con el desarrollo de obesidad, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares (Johnson et al., 2009). Múltiples estudios en animales de experimentación han mostrado que la fructosa puede provocar la aparición de las alteraciones características del síndrome metabólico, mientras que esto no sucede con la glucosa (Johnson et al., 2009). De hecho, nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente que el consumo materno de fructosa provoca en la descendencia macho adulta, pero no en la hembra, una alterada respuesta a insulina e hiperinsulinemia (Rodríguez et al., 2016b). Sorprendentemente, la descendencia hembra de madres que consumieron fructosa presentó una respuesta exacerbada al consumo de fructosa en la edad adulta mostrando hiperinsulinemia y esteatosis hepática (Rodríguez et al., 2016b), mientras que estos efectos relacionados con el síndrome metabólico no se observaron en las descendientes de madres control o glucosa.

A pesar de que pueda existir una conexión entre el elevado consumo de fructosa en bebidas azucaradas y la epidemia global de obesidad y síndrome metabólico (Rodríguez et al., 2013; Vilà et al., 2011), el consumo de estas bebidas y zumos de frutas sigue estando permitido durante la gestación. Posiblemente, la razón de este hecho se deba a que el debate sobre la relación entre la fructosa y el desarrollo de síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares sigue abierto. Así pues, todavía existe cierta controversia, dado que mientras que múltiples estudios muestran que existe una relación entre ambos hechos, otros no encuentran dicha conexión (Chiavaroli et al., 2015; de Koning et al., 2012; Heden et al., 2014; Stanhope et al., 2011).

La enfermedad cardiovascular es una de las enfermedades más prevalentes en humanos y de hecho, se mantiene como una de las principales causas de muerte en el mundo (Nichols et al., 2014). Es importante destacar que la mayoría de los ensayos clínicos o estudios en animales de experimentación se realizan en hombres o animales macho, siendo minoritarios los estudios en mujeres o animales hembra. Sorprendentemente, diversas alteraciones como la dislipemia diabética o la enfermedad cardiovascular asociada a la diabetes mellitus tipo 2 son más prevalentes en mujeres (Rydén et al., 2007). En relación a esto, las mujeres, pero no los hombres, presentan una relación entre el consumo de fructosa y un mayor riesgo de desarrollo de diabetes de tipo 2 (Schulze et al., 2004). Es más, en un documento reciente del Centro para la prevención de las enfermedades crónicas y la promoción de la salud (del inglés: *Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion*) se ha descrito como las enfermedades cardíacas son la causa principal de muerte en las mujeres estadounidenses en 2017.

Capítulo 2

La homocisteína (HCys) es un aminoácido no proteico que se ha reconocido como un factor de riesgo de hipertensión, disfunción cardiovascular y enfermedad cardiovascular cuando se encuentra elevado en plasma (Hwang et al., 2013; Laha et al., 2019). En situación de salud, los niveles de homocisteína plasmática se mantienen mediante la eliminación del exceso a través de dos vías: la ruta de remetilación produciendo metionina y la vía de la transulfuración para generar cisteína y sulfuro de hidrógeno (H₂S) (Hwang et al., 2013). Curiosamente, el H₂S es una molécula soluble en agua que actúa como un gasotransmisor (Wang, 2014) que ha despertado gran interés en la comunidad científica debido a su poder neuro y cardioprotector (Hwang et al., 2013). De hecho, mientras que la HCys se considera como un factor de riesgo aterogénico, el H₂S es protector en la patogénesis de la aterosclerosis (Ma et al., 2020). Resulta interesante mencionar que en un estudio previo de nuestro grupo de investigación detectamos unos menores niveles de ácido fólico en hembras descendientes de madres que consumieron fructosa, en comparación con la descendencia de madres control y glucosa (Rodrigo et al., 2018) y, en general, los niveles de ácido fólico en plasma están inversamente relacionados con los de HCys (Jacob et al., 1998; Laha et al., 2019).

El hígado juega un papel fundamental en el metabolismo de la HCys y el H₂S y es, además, sensible a desequilibrios nutricionales (Hwang et al., 2013). Por ejemplo, dietas ricas en grasa inducen esteatosis, estrés oxidativo e inflamación, siendo estas características típicas del hígado graso no alcohólico que es una de las manifestaciones hepáticas del síndrome metabólico (Hwang et al., 2013). A pesar de esto, existe cierta controversia sobre los efectos de las dietas ricas en grasa y el metabolismo de la HCys y la síntesis de H₂S. Así, Hwang y col. han mostrado que las dietas ricas en grasa estimulan el metabolismo de la HCys mediante la ruta de la transulfuración, generando H₂S y disminuyendo la homocisteinemia (Hwang et al., 2013). En cambio, Peh y col. han mostrado como la dieta rica en grasa reduce el metabolismo del H₂S (Peh et al., 2014). Sorprendentemente, estas alteraciones asociadas con el síndrome metabólico (esteatosis, estrés oxidativo...) también se han descrito en animales de experimentación alimentados con fructosa (Rodríguez et al., 2016a; Rodríguez et al., 2016b; Roglans et al., 2002; Roglans et al., 2007). Sin embargo, los efectos directos de la fructosa en el metabolismo de la HCys y el H₂S están escasamente documentados (Jin et al., 2015). Además, también faltan estudios que determinen el efecto de la ingesta materna de la fructosa en las rutas de la homocisteína y el H₂S de la descendencia.

Con el objetivo de investigar si la ingesta materna de fructosa programa el metabolismo de la HCys y la síntesis de H₂S en la descendencia hembra, se determinaron diferentes parámetros relacionados con estas rutas y algunos factores de riesgo de síndrome metabólico en las hembras descendientes de gestantes que consumieron agua, fructosa o glucosa durante la gestación. A continuación, con el propósito de conocer si el consumo materno de fructosa modificaba la respuesta a la ingesta de fructosa en las descendientes hembra adultas en comparación con las hembras procedentes de madres control y glucosa, llevamos a cabo un estudio del metabolismo de la HCys y el H₂S en el hígado y plasma de hembras adultas que consumieron fructosa en agua de bebida durante tres semanas y que descendían de madres control, fructosa y glucosa.

2. Materiales y métodos

2.1. Animales y diseño experimental

Brevemente, como se ha descrito con anterioridad (Rodríguez et al., 2016a; Rodríguez et al., 2016b), ratas Sprague-Dawley hembra se alimentaron *ad libitum* con comida estándar de rata. Tras quedar preñadas, se dividieron en 3 grupos: control, fructosa y glucosa. Las ratas control recibieron agua sin aditivo mientras que las ratas fructosa y glucosa tomaron agua con un 10% (p/v) de fructosa o de glucosa, respectivamente. Tras el parto se ajustó la camada a 9 crías, madres y crías se alimentaron con dieta estándar de rata *ad libitum* y agua sin aditivo. El día 21 se finalizó el periodo de lactancia y las crías se separaron por sexos. El día 240 de edad, una parte de la progenie hembra se separó aleatoriamente. El día 261 de vida se llevó a cabo el sacrificio de estas hembras y se recogió la sangre y tejidos que se almacenaron a -80°C. Estos animales no recibieron agua con ningún tipo de aditivo a lo largo de su vida.

A la otra parte de la descendencia hembra, el día 240 de edad se extrajo una alícuota de sangre de la cola y se pesaron. A partir de entonces se administró a estos animales comida estándar y agua suplementada con un 10 % de fructosa (p/v) hasta el día 261 de edad independientemente del grupo experimental de madres del que procedieran. Además, se incluyó un cuarto grupo experimental, en el cual las madres y la descendencia únicamente bebieron agua sin aditivo. El día 261 se realizó el sacrificio, asegurándose de que todas las hembras se encontraban en la misma fase del ciclo mediante frotis vaginal. La sangre se recogió en tubos de EDTA-Na₂ para aislar el plasma, que se almacenó a -80°C para su análisis y se extrajo el hígado y el tejido adiposo lumbar que se congeló a -80°C hasta su análisis.

Un esquema del procedimiento experimental puede verse en la Figura 22. Una descripción más completa de los animales y el diseño experimental aparece detallada en los Materiales y Métodos Generales.

2.2. Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real

El ARN total de hígado y tejido adiposo lumbar fue extraído mediante el kit Ribopure™ (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). Dicho ARN se trató con DNaseI usando el kit DNA free (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). Tras ello, el ADNc se sintetizó mediante retrotranscripción con Superscript II (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). La PCR a tiempo real se llevó a cabo utilizando un termociclador LightCycler 1.5 (Roche, Alemania). Los volúmenes de reactivos que se utilizaron en cada muestra fueron: 10 µL de SYBR *Premix Ex Taq* (Takara Bio Inc., Japón), 1 µL de cebador F 10 µM (IDT Technologies, EEUU), 1 µL de cebador R 10 µM (IDT Technologies, EEUU), 2 µL de la muestra de ADNc y 6 µL de agua mili-Q estéril.

Los parámetros programados para cada gen fueron los indicados por la base de datos de secuencias de cebadores *RT-PCR Primer Sequences for Atlas Nylon Arrays* (Clontech, EEUU) o la aplicación para el diseño de cebadores Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) (Anexo 1). El protocolo general utilizado para llevar a cabo la amplificación de cada gen en *el Light Cycler 1.5* (Roche, Alemania) figura en la Tabla 6. El análisis de la cuantificación relativa de la expresión de los genes es realizado por el *Software Light Cycler 4.05* que se basa en el método de 2-ΔCt o

Capítulo 2

método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Como gen de referencia, gen cuya expresión no varía en función de las condiciones experimentales, se utilizó RPS29.

2.3. Determinaciones plasmáticas

Alícuotas de plasma se utilizaron para medir homocisteína usando un kit enzimático colorimétrico (Spinreact, Gerona, España) y ácido fólico por un inmunoensayo quimioluminiscente (Architect, Abbot, Irlanda).

Los niveles de H₂S plasmáticos se determinaron por el método de azul de metileno (di Villa Bianca et al., 2013). Una explicación más detallada del método se explica en el apartado Materiales y Métodos Generales.

2.4. Determinaciones en hígado y tejido adiposo

La producción de H₂S en hígado y tejido adiposo se realizó por el método del sulfato de plomo como se ha descrito anteriormente con modificaciones (Hine & Mitchell, 2017). El protocolo aparece descrito de manera detallada en el apartado Materiales y Métodos Generales.

La concentración de MDA se determinó como marcador de peroxidación lipídica mediante la técnica descrita por Wong y col (Wong et al., 1987) en homogenados de hígado y tejido adiposo en PBS. Los complejos MDA-ácido tiobarbitúrico se midieron por fluorescencia a una longitud de onda excitación 515 nm/ emisión 553 nm. Los niveles de carbonilos de proteínas se usaron como marcador de estrés oxidativo de proteínas siguiendo el método descrito por Levine y col (Levine et al., 1990).

Los niveles de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH) se determinaron en tejido mediante electroforesis capilar acoplada a UV-DAD siguiendo el método descrito por Maeso y col (Maeso et al., 2005).

2.5. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media +/- el error estándar. Los grupos experimentales estuvieron formados por un mínimo de seis animales de camadas diferentes, para evitar el "efecto camada". Las diferencias estadísticamente significativas se analizaron mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA), utilizando el programa estadístico SPSS. Cuando el efecto del tratamiento fue estadísticamente significativo (P<0.05), las diferencias entre las medias fueron probadas mediante el test de Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes.

3. Resultados

3.1. El consumo materno de fructosa aumenta la producción de H₂S en la descendencia hembra

En un artículo recientemente publicado por nuestro grupo de investigación (Rodrigo et al., 2018), vimos que el consumo materno de fructosa provocaba una reducción en los niveles plasmáticos de ácido fólico en la descendencia hembra adulta ($39,6 \pm 1,7^B$; $27,6 \pm 1,4^A$ y $36,2 \pm 7,2^{AB}$ ng/mL para la descendencia hembra de madres control, fructosa y glucosa, respectivamente). En relación con este hallazgo, se ha descrito que los niveles en plasma de folato presentan una correlación inversa con los de homocisteína (Jacob et al., 1998). Por esta razón, en el presente estudio medimos la HCys plasmática en la descendencia hembra de madre control, fructosa y glucosa. Como era esperado, la descendencia de madres-fructosa presentó incrementos casi significativos ($p=0,075$) en los niveles de HCys frente a los otros dos grupos (Figura 47A).

La HCys es un aminoácido no proteico y sus niveles están regulados por dos rutas metabólicas: la transulfuración y la remetilación a metionina (Ma et al., 2020). La remetilación está mediada por dos enzimas: la metionina sintasa (MTR) y la betaína:homocisteína metiltransferasa (BHMT) (Figura 16). Como se puede ver en la Figura 47, la descendencia hembra de madres-fructosa presenta una menor expresión de la BHMT, que es significativa frente a las hembras de madre glucosa (Figura 47B). En cambio, no existen diferencias en la expresión de la MTR entre los tres grupos experimentales estudiados (Figura 47C). Además, los menores niveles de ácido fólico encontrados en las descendientes de madres-fructosa podrían conducir a una menor remetilación de la HCys usando el ácido fólico como dador de grupos metilo.

En cuanto a la transulfuración, esta ruta la llevan a cabo principalmente dos enzimas: la cistationina β -sintasa (CBS) y la cistationina γ -liasa (CSE) (Figura 16). Como puede verse en la Figura 47, la expresión génica de ambas enzimas se encuentra significativamente aumentada en la descendencia hembras de madres-fructosa frente a las descendientes de madres control y glucosa (Figura 47D para la CBS y Figura 47E para la CSE). De esta manera, la transulfuración se encuentra claramente activada por el consumo materno de fructosa, ya que estos animales desde el nacimiento no han recibido ningún tipo de azúcar añadido en el agua de bebida.

El H₂S se produce en la ruta de la transulfuración y, consecuentemente, se ha relacionado con el metabolismo de la HCys. Por este motivo, se determinaron los niveles plasmáticos de H₂S y, como puede observarse en la Figura 48A, la descendencia hembra de madres-fructosa tiende a presentar unos mayores niveles plasmáticos de H₂S frente a los otros dos grupos, sin alcanzar valores significativos. Sorprendentemente, la producción hepática de H₂S, el principal órgano productor de H₂S (Norris et al., 2011), es significativamente mayor en las descendientes de madres-fructosa frente a las de madres control y glucosa (Figura 48B), en consonancia con los resultados obtenidos de expresión de la CBS y la CSE (Figura 47D y E).

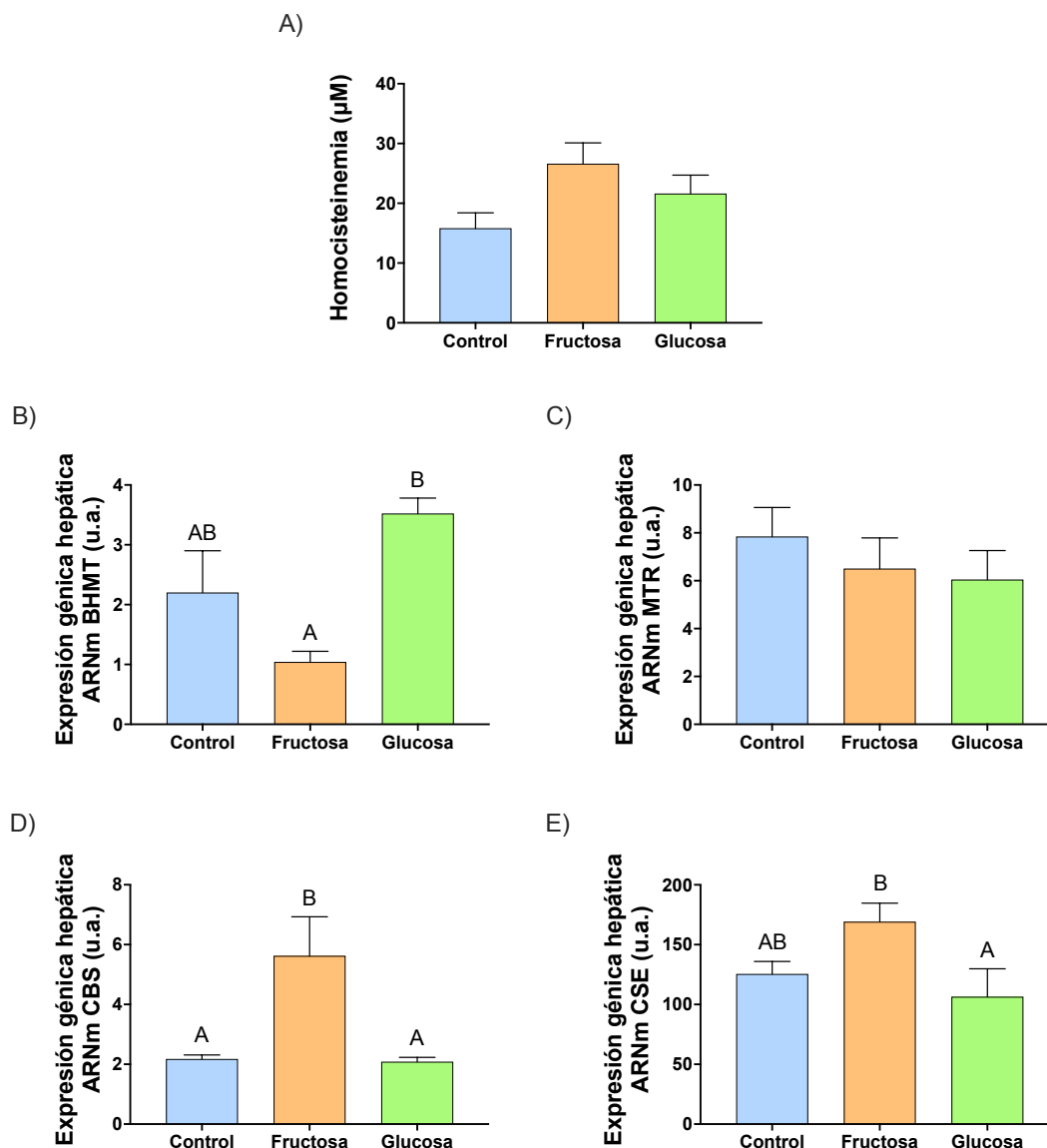


Figura 47: El consumo materno de fructosa afecta al metabolismo de la HCys en la descendencia hembra adulta. A) Homocisteína plasmática. Expresión hepática de los genes de la ruta de la remetilación: B) BHMT y C) MTR; y la transulfuración: D) CBS y E) CSE en la descendencia hembra de madres control (barras azules), fructosa (barras naranjas) y glucosa (barras verdes). La expresión génica se midió por PCR a tiempo real, los valores fueron normalizado por Rps29 y expresados en unidades arbitrarias (u.a.). Los valores se expresan como media \pm error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes ($p < 0,05$). BHMT: betaína:homocisteína metiltransferasa; MTR: metionina sintasa ; CBS: cistationina β -sintasa; CSE: cistationina γ -liasa.

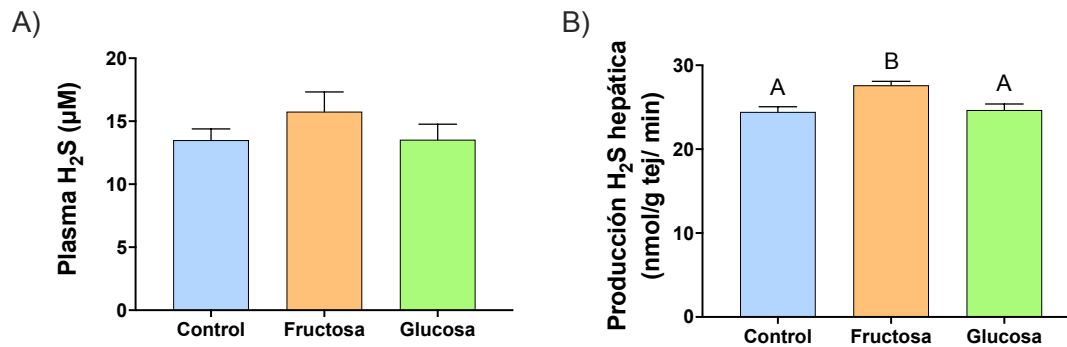


Figura 48: El consumo de fructosa en la gestación afecta a los niveles plasmáticos de H₂S debido a una alterada producción hepática. A) Niveles de H₂S en plasma y B) producción de H₂S hepática de la descendencia hembra de madres control (barras azules), fructosa (barras naranjas) y glucosa (barras verdes). Los valores se expresan como media ± error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes (p<0,05).

Se ha descrito que la activación de la transulfuración y la consecuente mayor producción de H₂S podría desempeñar un papel adaptativo frente a una situación de estrés oxidativo (Hwang et al., 2013). En consonancia con esto, las hembras procedentes de madres que consumieron fructosa presentaron una menor peroxidación lipídica (medida como niveles de MDA) en el hígado, en comparación con los otros dos grupos, siendo significativa frente a las hembras de madres control. Curiosamente, mientras que la oxidación lipídica se encuentra disminuida en las hembras de madres-fructosa, se encontró un incremento de la oxidación de proteínas (medido como carbonilos de proteínas) en la descendencia de madres-fructosa y glucosa, llegando a ser significativo el cambio cuando se comparan las hembras de madres control frente a las de madres-fructosa (Tabla 17). Sin embargo, el contenido hepático de metilglioxal, un inductor del estrés oxidativo y de carbonilación de proteínas, no presenta diferencias entre los grupos estudiados. Es más, mientras que el glutatión reducido (GSH), uno de los principales compuestos que amortiguan el estrés oxidativo en el hígado, se mantiene similar entre los tres grupos experimentales (Tabla 17), la actividad de una de las principales enzimas antioxidantes hepáticas, la superóxido dismutasa 2 (SOD2) aparece aumentada en las descendientes de madres-fructosa, siendo significativo el aumento frente a las hembras procedentes de madres-glucosa (Tabla 17). En relación con estos resultados, se ha descrito que el H₂S reduce el estrés oxidativo en cardiomiocitos de ratón a través de una inducción en la expresión de la SOD2 (Liu et al., 2017). En consonancia, la concentración de una importante sustancia prooxidante en el hígado, el ácido úrico, tiende a reducirse en las hembras de madres-fructosa (Tabla 17).

Capítulo 2

Tabla 17: Marcadores de estrés oxidativo y sistemas antioxidantes en las hembras descendientes de madres control, fructosa o glucosa.

| | Control | Fructosa | Glucosa |
|---|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| MDA (nmol/mg proteína) | 1,10 ± 0,03 ^B | 0,93 ± 0,03 ^A | 1,00 ± 0,01 ^{AB} |
| Carbonilos de proteínas (nmol/mg protein) | 2,23 ± 0,05 ^A | 4,62 ± 0,26 ^B | 3,70 ± 0,49 ^{AB} |
| Metilgloxal (nmol/mg proteína) | 13,7 ± 0,5 | 15,8 ± 1,9 | 15,5 ± 0,4 |
| GSH (μM/g de tejido) | 7,92 ± 0,51 | 7,99 ± 0,39 | 8,80 ± 0,30 |
| Actividad SOD2 (IU/mg proteína) | 4,19 ± 0,14 ^{AB} | 4,64 ± 0,17 ^B | 3,88 ± 0,06 ^A |
| Ácido úrico (mg/g de tejido) | 0,106 ± 0,008 | 0,089 ± 0,005 | 0,110 ± 0,016 |

Los valores se expresan como media ± error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes ($p < 0,05$). MDA: Malondialdehído, GSH: Glutatión reducido; SOD2: Soperóxido dismutasa 2.

Se han descrito numerosas moléculas como reguladoras de la expresión y actividad de la CSE. Diversos factores de transcripción tales como Sp1, Nrf2, ATF4 y Elk1, regulan la transcripción de la CSE por unión directa o indirecta a su promotor (Figura 17) (Zhao et al., 2014). A pesar de esto, la expresión génica de ATF4, TNF α y la calmodulina (una proteína relacionada con los niveles de calcio) no muestran diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio (Tabla 18). TNF α y el calcio parecen regular la expresión génica de la CSE estimulando la unión de Sp1 al promotor de la CSE (Zhao et al., 2014). Por otro lado, Nrf2 es un factor de transcripción implicado en la respuesta antioxidante y promueve la expresión de genes, como la CSE (Zhao et al., 2014). Se ha demostrado, y nosotros lo hemos podido corroborar recientemente (Rodrigo et al., 2016), que la interacción entre XBP1u (del inglés: *unspliced X-box-binding protein 1*) y la histona desacetilasa 3 (HDAC3) modula el estrés oxidativo a través de la estabilización de Nrf2 (Martin et al., 2014). Así, aunque la expresión de HDAC3 no muestra cambios entre ninguno de los grupos estudiados, la expresión de XBP1u se encuentra claramente aumentada en el hígado de las hembras cuyas madres consumieron fructosa comparado con los otros dos grupos (Tabla 18), coincidiendo con el aumento en la actividad de la SOD2 en este grupo experimental (Tabla 17). Por otro lado, se han identificado en el promotor de la CSE varios sitios posibles de unión a los miembros de la familia del factor nuclear de células T activadas (NFAT, del inglés: *Nuclear Factor of Activated T cells*) (Bosc et al., 2017). En consonancia con estos datos, los niveles de ARNm de varios genes diana de NFAT5 (SLC6A6, SLC6A12, la aldosa reductasa y la sorbitol deshidrogenasa) se presentan aumentados en las ratas hembra procedentes de madres que consumieron fructosa en la gestación alcanzando valores significativos en los genes SLC6A6 y la aldosa reductasa en comparación con las descendientes de madres control (Tabla 18).

Con todos estos datos, podemos afirmar que la ingesta materna de fructosa provoca una clara inducción de la ruta de la transulfuración en el hígado con la consecuente mayor producción de H₂S en la descendencia hembra adulta, mientras que los descendientes de madres control y glucosa no muestran estos efectos.

Tabla 18: Reguladores de la expresión de la CSE y la producción del H₂S. Expresión génica hepática de factores de transcripción y/o sus genes diana en la descendencia hembra de madres control, fructosa o glucosa.

| | Control | Fructosa | Glucosa |
|--------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>ATF4</i> | 1,12±0,19 | 1,61±0,29 | 1,26±0,15 |
| <i>TNFα</i> | 1,04±0,38 | 0,99±0,04 | 0,62±0,25 |
| <i>Calmodulina3</i> | 1,07±0,11 | 1,29±0,08 | 1,13±0,06 |
| <i>HDAC3</i> | 2,10±0,14 | 2,38±0,10 | 2,35±0,19 |
| <i>XBP1u</i> | 0,59±0,04 ^A | 0,86±0,02 ^B | 0,61±0,17 ^{AB} |
| <i>SLC6A6</i> | 5,75±0,69 ^A | 10,42±0,63 ^B | 6,03±1,35 ^A |
| <i>SLC6A12</i> | 3,00±0,32 | 3,98±0,47 | 2,44±0,66 |
| <i>Aldosa reductasa</i> | 12,7±0,8 | 16,3±1,3 | 13,5±2,5 |
| <i>Sorbitol deshidrogenasa</i> | 7,67±0,71 ^A | 11,93±1,01 ^B | 8,77±1,23 ^{AB} |

Los valores se expresan como media ± error estándar. La expresión génica de ARNm se determinó por PCR a tiempo real, los resultados fueron normalizados usando RPS29 como gen de referencia y los resultados se expresaron como unidades arbitrarias (u.a.). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes ($p < 0,05$). ATF4: Factor de transcripción activador 4; TNF α : Factor de necrosis tumoral alpha; HDAC3: histona desacetilasa 3; XBP1u: *unspliced X-box-binding protein 1*; SLC6A6: Solute carrier family 6 member 6; SLC6A12: Solute carrier family 6 member 12.

3.2. El consumo de fructosa durante la gestación exacerba la represión inducida por la fructosa en la producción hepática de H₂S en la descendencia hembra adulta

Teniendo en cuenta los cambios metabólicos observados en la descendencia hembra procedente de madres que consumieron fructosa en la gestación, quisimos conocer si este genotipo se conserva o se revierte después de administrar fructosa a estas hembras durante un corto periodo de tiempo (3 semanas). De esta manera, se administró fructosa en agua de bebida a las descendientes hembra de madres que consumieron agua, fructosa o glucosa durante la gestación, para conocer si la ingesta materna de fructosa modula la respuesta de la descendencia hembra al consumo de fructosa en la edad adulta.

Como puede verse en la Figura 49A, la homocisteinemia no se encuentra afectada por el consumo de fructosa, aunque tiende a disminuir en la descendencia de madres-fructosa y glucosa. Sorprendentemente, la ingesta de fructosa en la descendencia hembra adulta provocó una disminución en los niveles de ácido fólico, sin importar el tratamiento materno (43,1±3,7; 20,2±1,6; 23,7±2,2; and 24,4±3,6 ng/mL para CC, CF, FF, y G/F, respectivamente; $p < 0,05$, para los tres grupos que consumieron fructosa frente al control CC). En cuanto a la expresión génica de las enzimas que regulan los niveles de ácido fólico y homocisteína, los niveles de ARNm de la BHMT tienden a ser mayores en el grupo FF, aunque sin llegar a ser significativos (Figura 49B); y la expresión de MTR no se encuentra modificada por el consumo de fructosa, aunque aparece una tendencia a la disminución en el grupo CF en comparación con el resto (Figura 49C). Sorprendentemente, la fructosa afecta a la ruta de la transulfuración en las hembras. De hecho, mientras que la CBS se encuentra significativamente aumentada por el consumo de fructosa solo en las hembras descendientes de madres-glucosa (Figura 49D), la expresión de la CSE se encuentra reprimida en los 3 grupos que consumieron fructosa y esta disminución es claramente dependiente del tratamiento materno (Figura 49E). Así, el

Capítulo 2

consumo de fructosa produce una reducción de la expresión de la CSE de una manera mucho más acusada en la descendencia de madres que consumieron fructosa en la gestación (FF), llegando a ser significativo frente al grupo CC y GF.

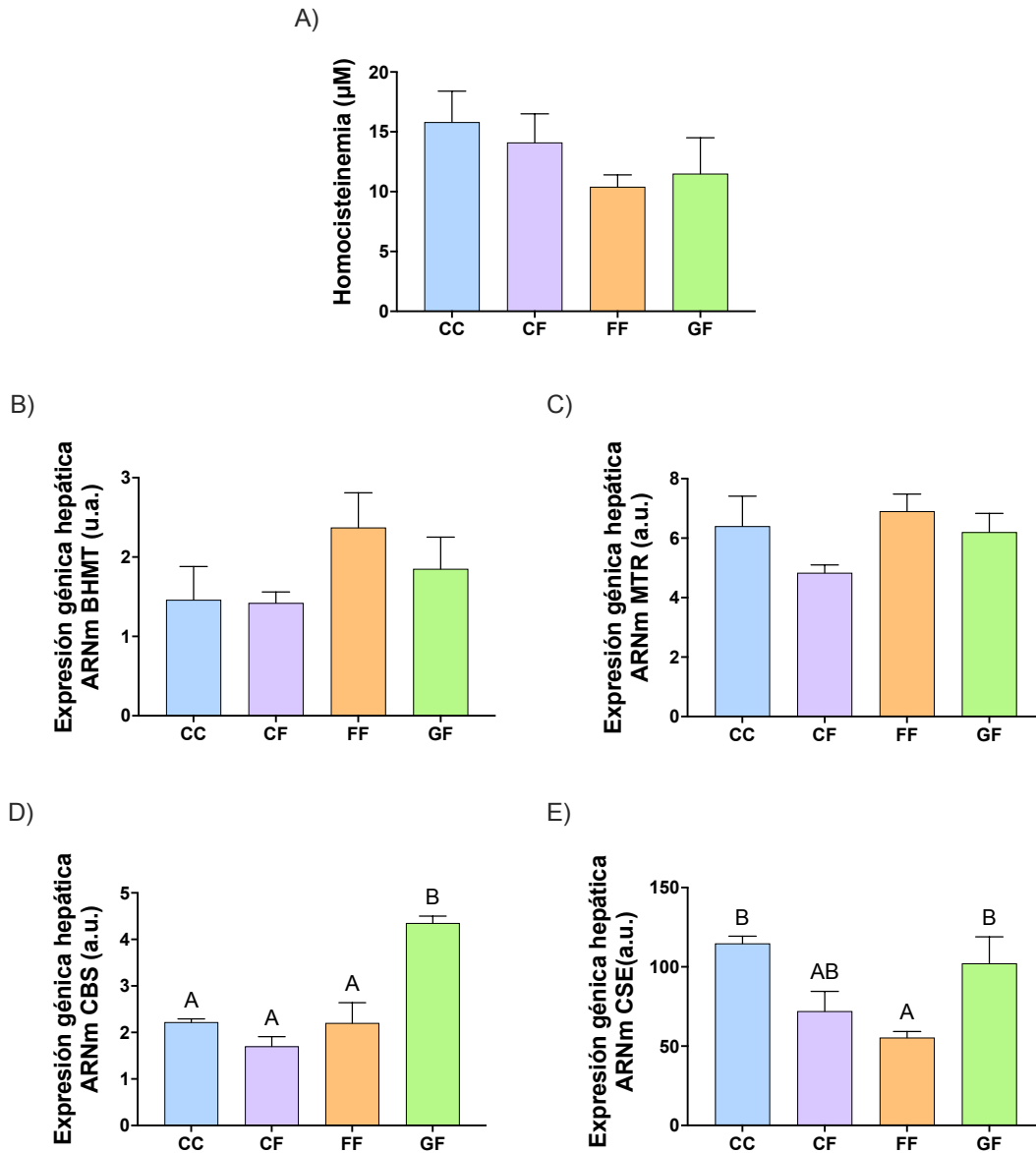


Figura 49: El consumo materno de fructosa exacerba la represión de la expresión de la CSE debida al consumo de fructosa en la descendencia hembra adulta. A) Homocisteína plasmática. Expresión hepática de los genes de la ruta de la remetilación: B) BHMT y C) MTR; y la transulfuración: D) CBS y E) CSE en la descendencia hembra adulta suplementada con fructosa y procedente de madres control (grupo CF: barras moradas), fructosa (grupo FF: barras naranjas) y glucosa (grupo GF: barras verdes). Grupo CC: hembras procedentes de madres control que no recibieron ningún suplemento en el agua de bebida (barras azules). La expresión génica se midió por PCR a tiempo real, los valores fueron normalizados por Rps29 y expresados en unidades arbitrarias (u.a.). Los valores se expresan como media \pm error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes ($p < 0,05$). BHMT: betaína:homocisteína metiltransferasa; MTR: metionina sintasa ; CBS: cistationina β -sintasa; CSE: cistationina γ -liasa.

Es ampliamente reconocido que la CSE principalmente, y la CBS en menor medida, regulan la producción de H₂S en el hígado (Kabil et al., 2011). Por ello, decidimos determinar la síntesis de H₂S en el hígado de los cuatro grupos experimentales usando HCys y cisteína (Cys) como sustrato. Cuando se usa Cys, la producción de H₂S está mediada por la CSE y la CBS, mientras que si se usa HCys solo está implicada la CSE (Kabil et al., 2011). De esta manera, y en consonancia con los resultados obtenidos en la expresión de la CSE (Figura 49E), el consumo de fructosa disminuye la producción hepática de H₂S y su efecto es dependiente de la nutrición materna. Como puede verse en la Figura 50A, tiene lugar una reducción, inducida por la fructosa, en la producción de H₂S en los tres grupos experimentales de hembras que consumieron fructosa, siendo esta disminución mucho más pronunciada en las hembras descendientes de madres-fructosa. Esta bajada es significativa en los grupos FF y CF, y casi significativa ($p=0,068$) para el grupo GF, frente al grupo CC. Es más, cuando se usa HCys como sustrato, también se mantiene la reducción de la síntesis de H₂S inducida por la fructosa (Figura 50B), y las diferencias llegan a ser significativas para los grupos FF y GF frente al control (CC).

A pesar de esto, los niveles plasmáticos de H₂S no se encuentran afectados por la ingesta de fructosa (Figura 50C), aunque se observa una tendencia al aumento en el grupo GF. Los niveles plasmáticos de H₂S reflejan la producción de este gasotransmisor no sólo en el hígado, sino en otros muchos tejidos, como los pulmones, el riñón y el tejido adiposo (Feng et al., 2009; Peh et al., 2014). De hecho, la producción de H₂S por el tejido adiposo lumbar apenas se encuentra afectada por el consumo de fructosa (Figura 50D).

En cuanto a parámetros relacionados con el estrés oxidativo, las ratas que consumieron fructosa mostraron, sorprendentemente, una menor peroxidación lipídica (medida como niveles de MDA) en comparación con el grupo control (CC), llegando a ser significativo en la descendencia de madres-fructosa (FF) y glucosa (GF). Sin embargo, ni los niveles hepáticos de glutatión reducido ni la actividad hepática de la SOD2 se vieron afectadas por la ingesta de fructosa (Tabla 19). Curiosamente, la oxidación de proteínas (medida como carbonilos de proteínas) muestra un perfil opuesto al de la oxidación lipídica. De esta manera, los tres grupos de hembras que consumieron fructosa presentaron mayores niveles de carbonilos de proteínas frente al control (CC), siendo significativo en las hembras que consumieron fructosa y eran descendientes de madres-fructosa (FF). Acorde con estos resultados, la expresión génica de la hemooxigenasa-1 (HO-1), una potente enzima antioxidante endógena (Rodrigo et al., 2016), se encuentra reducida por el consumo de fructosa (Tabla 19), efecto que llega a ser significativo para el grupo CF y GF y casi significativo ($p=0,099$) para el FF frente al grupo CC. Es más, a pesar de que los niveles de metilglioxal, marcador de carbonilación de proteínas, no muestran diferencias entre los tres grupos, la concentración de ácido úrico, molécula con acción prooxidante, tiende a ser mayor en el grupo FF (Tabla 19), en paralelo con la uricemia que previamente se había descrito en estos animales (Rodríguez et al., 2016a).

Capítulo 2

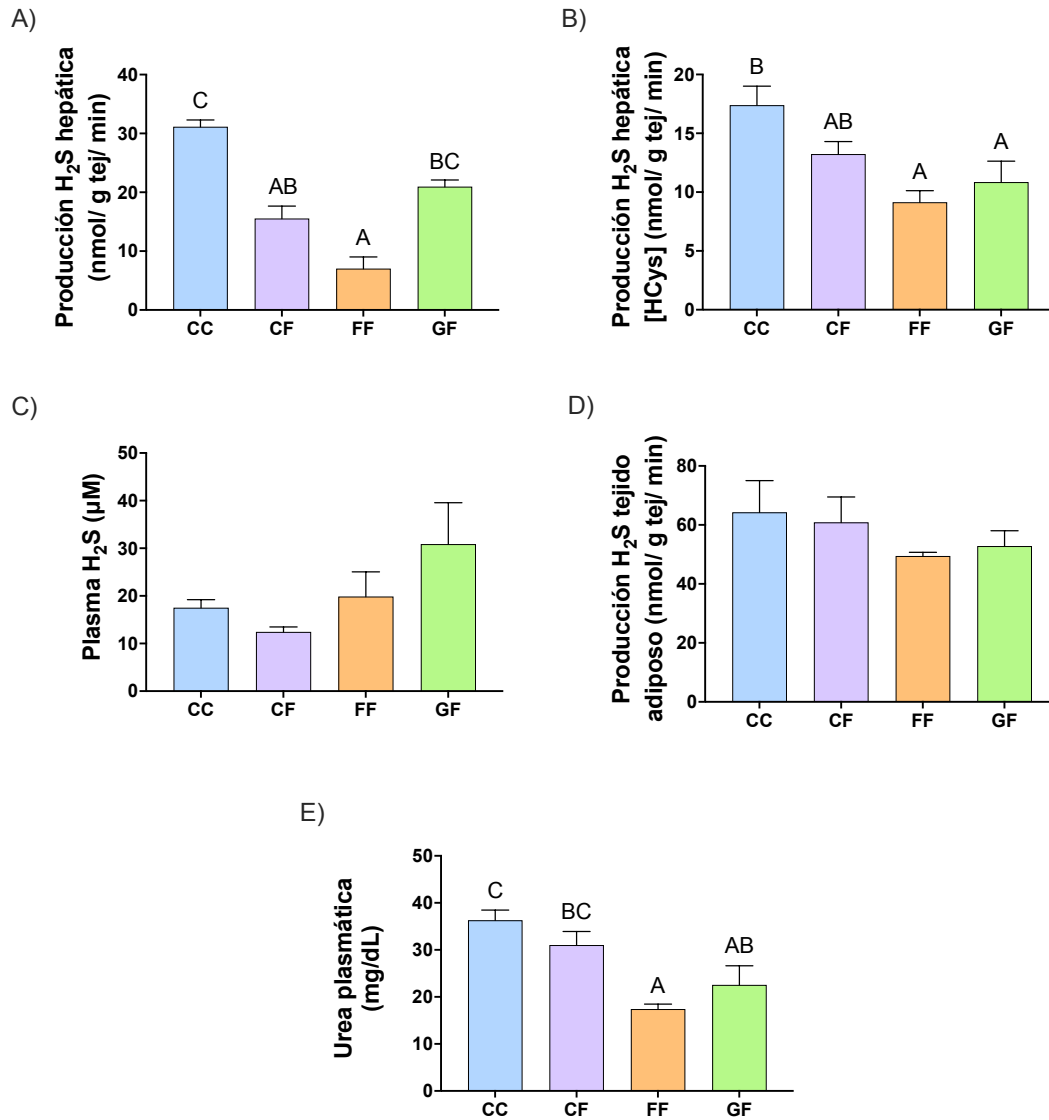


Figura 50: El consumo materno de fructosa en la gestación exagera la represión de la producción hepática de H₂S debida al consumo de fructosa en la descendencia hembra adulta. A) producción hepática de H₂S a partir de Cys, B) producción hepática de H₂S a partir de HCys, C) niveles plasmáticos de H₂S D) producción de H₂S en el tejido adiposo a partir de Cys y E) urea plasmática en la descendencia hembra adulta suplementada con fructosa y procedente de madres control (grupo CF: barras moradas), fructosa (grupo FF: barras naranjas) y glucosa (grupo GF: barras verdes). Grupo CC: hembras procedentes de madres control que no recibieron ningún suplemento en el agua de bebida (barras azules). Los valores se expresan como media ± error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes (p < 0,05).

Finalmente, dado que el amonio (NH₃) se genera en la transulfuración junto con el H₂S (Figura 16), se ha propuesto la existencia de una interacción entre ambos gasotransmisores (Wang, 2014). Así, teniendo en cuenta que el amonio producido en la transulfuración participa en la síntesis de urea en el hígado (De Las Heras et al., 2017) de manera paralela a la reducción observada en la síntesis de H₂S en las hembras que consumieron fructosa (Figura 50A y B), también encontramos una disminución en los niveles de urea plasmáticas (Figura 50E), llegando a ser significativa la diferencia en el grupo FF y GF frente al grupo control CC. De hecho, hallamos una correlación significativa entre los niveles de urea plasmática y la

producción de H₂S en el hígado (r=0,617; p<0,006 usando HCys como sustrato y r=0,647; p<0,004 usando Cys como sustrato).

Tabla 19: Marcadores de estrés oxidativo y sistemas antioxidantes en las hembras que consumieron fructosa y son descendientes de madres control (CF), fructosa (FF) o glucosa (GF). CC: hembras control descendientes de madres control.

| | CC | CF | FF | GF |
|---|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| MDA (nmol/mg proteína) | 1.10 ± 0.03 ^B | 0.98 ± 0.03 ^{AB} | 0.83 ± 0.04 ^A | 0.87 ± 0.04 ^A |
| GSH (µM/g de tejido) | 7.92 ± 0.51 | 8.50 ± 0.10 | 8.14 ± 0.15 | 8.77 ± 0.72 |
| Actividad SOD2 (IU/mg proteína) | 4.19 ± 0.14 | 5.27 ± 0.13 | 4.63 ± 0.33 | 4.45 ± 0.35 |
| Carbonilos de proteína (nmol/mg proteína) | 2.23 ± 0.05 ^A | 2.45 ± 0.17 ^{AB} | 3.09 ± 0.08 ^B | 3.07 ± 0.31 ^{AB} |
| Expresión génica HO-1 (u.a.) | 3.22 ± 0.21 ^B | 1.83 ± 0.19 ^A | 2.46 ± 0.26 ^{AB} | 2.20 ± 0.17 ^A |
| Metilglioxal (nmol/mg proteína) | 13.7 ± 0.5 | 17.8 ± 1.9 | 15.0 ± 0.4 | 13.8 ± 0.9 |
| Ácido úrico (mg/g de tejido) | 0.106 ± 0.008 | 0.112 ± 0.013 | 0.127 ± 0.011 | 0.108 ± 0.009 |

La expresión génica se midió por PCR a tiempo real, los valores fueron normalizado por Rps29 y expresados en unidades arbitrarias (u.a.). Los valores se expresan como media ± error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes (p<0,05). MDA: Malondialdehído; GSH: Glutacion reducido; SOD2: Superóxido dismutasa; HO-1: Hemoxigenasa 1.

Posteriormente, analizamos desde un punto de vista molecular la disminución inducida por la fructosa en la síntesis de H₂S y la expresión hepática de la CSE, para esclarecer por qué este efecto era más pronunciado en las hembras FF. Así, determinamos la expresión génica de factores de transcripción que regulan la transcripción de la CSE de manera directa o indirecta (Figura 17) (Zhao et al., 2014). Como puede verse en la Tabla 20, no aparecen diferencias en la expresión de ATF4 y se observa una tendencia similar a la reducción sin llegar a ser significativa en la expresión de TNFα en los tres grupos que recibieron fructosa. Por otro lado, se ha propuesto el FXR, receptor activado por los ácidos biliares, como un activador de la transcripción de la CSE (Graham et al., 1997). En relación con esto, los niveles en plasma de ácidos biliares se encuentran alterados en las hembras que consumieron fructosa en una manera dependiente de la dieta materna (25,6±3,7; 15,1±3,4; 17,2±2,4; y 33,2±7,3 µM para CC, CF, FF, y GF, respectivamente; p<0.05, para CF frente GF, y casi significativo, p=0.077, para FF frente a GF). Estos resultados nos llevaron a determinar la expresión de varios genes diana de FXR y genes involucrados en el metabolismo de ácidos biliares. Así, en consonancia con los niveles de ácidos biliares observados en plasma y los cambios descritos en la expresión de la CSE (Figura 49E), la expresión de Shp, LRH1 (del inglés: *Liver receptor homolog 1*) y SLC6A6 (del inglés: *Solute carrier protein 6A6*) muestran perfiles similares en respuesta al consumo de fructosa, mostrando una reducción más pronunciada en los grupos FF y CF (Tabla 20). Curiosamente, uno de los pocos factores capaces de afectar a la expresión y la actividad de la CSE y a la producción de H₂S, aunque con un efecto bifásico, es el calcio (Zhao et al., 2014), lo que nos motivó a determinar la expresión de múltiples genes que responden al calcio. Así, la expresión de la calreticulina, CHOP (del inglés: *C/EBP homologous protein*), Grp78 (proteína relacionada con la glucosa de 78 KDa) y la calmodulina muestran un perfil similar en respuesta a la ingesta de fructosa, presentando un aumento en los grupos FF y GF frente los otros dos

Capítulo 2

grupos (Tabla 20). Por consiguiente, podemos afirmar que la ingesta de fructosa modifica claramente la expresión y la actividad de la CSE en las hembras de madres-fructosa (FF) afectando la actividad transcripcional de FXR y la expresión de proteínas sensibles al calcio.

Tabla 20: Reguladores de la expresión de la CSE y la producción del H₂S. Expresión génica hepática de factores de transcripción y/o sus genes diana en las hembras que consumieron fructosa y que son descendientes de madres control (CF), fructosa (FF) o glucosa (GF). CC: hembras control descendientes de madres control.

| | CC | CF | FF | GF |
|----------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>ATF4</i> | 1.12 ± 0.19 | 1.08 ± 0.08 | 1.20 ± 0.11 | 1.47 ± 0.12 |
| <i>TNFα</i> | 1.04 ± 0.38 | 0.49 ± 0.09 | 0.42 ± 0.07 | 0.53 ± 0.09 |
| <i>Shp</i> | 4.63 ± 1.00 ^{AB} | 3.87 ± 0.62 ^{AB} | 4.06 ± 0.63 ^A | 8.54 ± 1.50 ^B |
| <i>LRH1</i> | 11.36 ± 1.30 | 9.51 ± 1.30 | 9.60 ± 0.57 | 12.59 ± 1.21 |
| <i>SLC6A6</i> | 5.75 ± 0.69 ^B | 2.11 ± 0.25 ^A | 2.03 ± 0.41 ^A | 3.46 ± 0.37 ^A |
| <i>Calreticulina</i> | 244.8 ± 29.7 ^{AB} | 208.0 ± 4.0 ^A | 286.6 ± 18.9 ^B | 301.5 ± 19.9 ^B |
| <i>CHOP</i> | 1.66 ± 0.26 ^{AB} | 1.56 ± 0.23 ^A | 2.23 ± 0.12 ^{AB} | 2.67 ± 0.37 ^B |
| <i>Grp78</i> | 2.36 ± 0.15 ^A | 2.29 ± 0.06 ^A | 3.03 ± 0.21 ^{AB} | 3.27 ± 0.27 ^B |
| <i>Calmodulina 3</i> | 1.07 ± 0.11 ^{AB} | 0.95 ± 0.08 ^A | 1.34 ± 0.03 ^B | 1.29 ± 0.07 ^B |

La expresión génica se midió por PCR a tiempo real, los valores fueron normalizados por Rps29 y expresados en unidades arbitrarias (u.a.). Los valores se expresan como media ± error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes (p<0,05). ATF4: Factor de transcripción activador 4; TNFα: Factor de necrosis tumoral alpha; SHP: Small heterodimer partner; LRH1: *Liver receptor homolog 1*; SLC6A6: Solute carrier family 6 member 6; CHOP: Proteína homóloga a C/EBP; Grp78: Proteína regulada por la glucosa 78.

4. Discusión

La HCys es un aminoácido sulfurado no proteico habitualmente presente en pequeñas cantidades en plasma. La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedades vasculares (Clarke et al., 1991; Graham et al., 1997). Este riesgo, además, es proporcional a la concentración de HCys (Gerhard & Duell, 1999), de manera similar a la relación existente entre la hipercolesterolemia y la enfermedad coronaria. Las causas de la hiperhomocisteinemia son multifactoriales, incluyendo causas genéticas, la edad, el género, la función renal, la nutrición, ciertas enfermedades y algunos medicamentos (Mayer et al., 1996). Sus niveles pueden reducirse consumiendo ácido fólico en forma de suplementos dietéticos (Achón et al., 2000), aunque su acción protectora sobre los efectos adversos de la hiperhomocisteinemia todavía no está clara (Partearroyo et al., 2010).

Los niveles de HCys en plasma se mantienen constantemente dentro de un margen estrecho gracias a la estricta regulación de dos rutas principales que se encargan de su eliminación (Figura 16). Una de estas rutas es la transulfuración, cuya primera enzima es la CBS y la segunda la CSE. Tras la acción de estas dos enzimas la homocisteína se transforma en cisteína, H₂S, α-cetobutirato y amonio. Ambas enzimas son dependientes de PLP (Chiku et al., 2009). Por otro lado, la HCys puede eliminarse mediante otra ruta que consiste en su remetilación a metionina, lo cual puede producirse por dos vías: en el hígado la BHMT remetila a la HCys usando betaína como donador del grupo metilo; y en la mayoría de tejidos la

remetilación es catalizada por la MTR que usa vitamina B12 como cofactor y 5-metiltetrahidrofolato como dador de grupos metilo (Refsum et al., 1998).

Curiosamente, un producto de la transulfuración, el H₂S, es un gasotransmisor con potencial para mediar una gran variedad de efectos beneficios a nivel fisiológico, tales como la resistencia al estrés, la longevidad, la vasodilatación, la neurodegeneración y la aterosclerosis, entre otros. Es más, el H₂S también se ha visto involucrado en el desarrollo de tumores (Hine et al., 2015; Ma et al., 2020; Weber & Birsoy, 2019). Es un hecho reconocido que la dieta es capaz de afectar a la producción de H₂S (Hine et al., 2015). Sin embargo, todavía no se ha elucidado qué requerimientos nutricionales y qué nutrientes están involucrados en la producción endógena de H₂S.

La dieta rica en grasa, con cantidades elevadas de grasas saturadas y colesterol, promueve la acumulación lipídica en el hígado, el estrés oxidativo y la inflamación (Hwang et al., 2013). Esta dieta es capaz de modificar la ruta de transulfuración en varios tejidos alterando, además, la homocisteinemia (Hwang et al., 2013; Peh et al., 2014). Nuestro grupo de investigación y otros autores hemos demostrado que dietas ricas en fructosa pueden provocar muchas de las alteraciones características del síndrome metabólico, tales como las que se han mencionado anteriormente en animales alimentados con dietas ricas en grasa (Castro et al., 2011; Ching et al., 2011; Fauste et al., 2020c; Rodríguez et al., 2016a; Roglans et al., 2007). A pesar de esto, los estudios sobre los efectos del consumo de fructosa y el metabolismo de la HCys y el H₂S son muy limitados.

En el presente trabajo, hembras nacidas de madres alimentadas con fructosa durante la gestación presentaron mayores niveles de HCys en plasma que las descendientes de madres control o glucosa. Este hallazgo inesperado podría deberse a una disminuida capacidad de estas hembras de madres-fructosa de remetilizar la HCys en el hígado. Esta alteración se confirmó, tanto en la vía de remetilación usando betaína al encontrar una reducción en la expresión de la BHMT, como en la remetilación con folatos, ya que, aunque la MTR no se encuentre alterada, los niveles en plasma de ácido fólico se encuentran reducidos. Por el contrario, la otra ruta para la eliminación de la HCys, la transulfuración, se encuentra claramente activada por la ingesta materna de fructosa en la descendencia hembra. Ambas, la CBS y la CSE, presentan incrementos en su expresión hepática en las hembras de madres alimentadas con fructosa. Es posible que la activación de la transulfuración sea un mecanismo compensatorio para corregir los elevados niveles de HCys en plasma encontrados en este grupo experimental. En consonancia con estos resultados, se ha descrito que la HCys promueve la actividad de la CSE de manera dependiente a su concentración (Kabil et al., 2011), aunque otros autores también han encontrado el efecto opuesto (Manna et al., 2014). Es más, otros estudios previos han mostrado una respuesta opuesta entre la BHMT y la CBS, confirmando así nuestros resultados. Así, ratones *knock-out* para la CBS presentaron una mayor expresión de la BHTM que los ratones *wild-type* (Niculescu & Zeisel, 2002).

En la transulfuración, la CBS y la CSE generan H₂S. En el hígado, esta producción parece estar mediada fundamentalmente por la CSE (Kabil et al., 2011; Manna et al., 2014). Es interesante destacar que varios autores han mostrado como el H₂S puede mejorar los efectos negativos de la hiperhomocisteinemia (L. Chang et al., 2008; Ma et al., 2020). En el presente estudio hemos demostrado por primera vez que la ingesta materna de fructosa provoca un

Capítulo 2

incremento en los niveles plasmáticos de H₂S y, más importante, una activación en la producción hepática de H₂S en la descendencia hembra adulta en comparación con las descendientes de madres control y glucosa. Esta aumentada producción de H₂S se corresponde con una mayor expresión de la CSE y la CBS en las hembras descendientes de madres-fructosa. Curiosamente, este efecto parece ser específico del hígado, ya que en el tejido adiposo lumbar no se produce este aumento (1,47±0,21; 1,03±0,07; and 0,68±0,03 nmol/g de tejido/min para las hembras descendientes de madres control, fructosa o glucosa, respectivamente; p < 0.05, para las hijas de madres glucosa frente a las de madres-fructosa).

Sorprendentemente, en línea con los efectos beneficiosos del H₂S frente a la aterosclerosis, el hígado graso no alcohólico y otras características del síndrome metabólico, el H₂S se ha relacionado con una reducción en el desarrollo de inflamación, esteatosis y el estrés oxidativo (Hwang et al., 2013; Ma et al., 2020; Manna et al., 2014; Peh et al., 2014). En las descendientes de madres que consumieron fructosa, el contenido de triglicéridos hepáticos (Rodríguez et al., 2016b), la expresión de TNF α (Tabla 18) y los niveles en plasma de la ALT (66,7±17,0; 79,1±9,2; 67,0±7,6 U/L para las hembras descendientes de madres control, fructosa o glucosa, respectivamente), parámetros relacionados con la esteatosis y la inflamación, respectivamente, no se ven afectados en las hembras descendientes de madres-fructosa. A pesar de esto, la peroxidación lipídica se encuentra disminuida y la actividad de la SOD2, relacionada con la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS), se muestra aumentada en la descendencia hembra de madres-fructosa. Estos datos pueden encontrarse en consonancia con estudios previos que mostraban como el H₂S promueve estos efectos y reduce la generación de ROS (Liu et al., 2017; Sodhi et al., 2015).

La regulación del sistema H₂S/CSE es complejo e implica numerosos factores (Zhao et al., 2014). Por ejemplo, se ha demostrado que la insulina y la glucosa afectan a la expresión de la CSE en células. A pesar de esto, los datos de glucemia e insulinemia en estos animales hembra descendientes de madres control, fructosa o glucosa (Rodríguez et al., 2016b) no mostraron diferencias ni se correlacionan con la expresión de la CSE. Se observó una situación similar para varios receptores nucleares y factores que modulan la transcripción de la CSE (Zhao et al., 2014) tales como Akt (Rodríguez et al., 2016b), ATF4, TNF α o el calcio (Tabla 18). La CSE se ha propuesto como un gen diana de FXR (Renga et al., 2009). Sin embargo, no se han observado efectos en la descendencia debidos a la dieta materna en varios genes diana de FXR (Rodrigo et al., 2018). Por ello, el aumento en la ruta de la transulfuración y en la producción de H₂S hallado específicamente en el hígado de hembras descendientes de madres-fructosa podría estar relacionado con los cambios observados en las rutas reguladas por Nrf2 y NFAT. Así, con el fin de elucidar el mecanismo de acción, se llevó a cabo el estudio de la expresión de XBP1u y HDAC3, ya que se ha demostrado que ambas están involucradas en la formación de un complejo que estabiliza Nrf2, y se ha propuesto que este factor de transcripción regula la expresión de la CSE (Martin et al., 2014; Zhao et al., 2014). Así, observamos que la expresión de XBP1u se encuentra claramente aumentada en la descendencia hembra de madres-fructosa (Tabla 18), por lo que podría estar promoviendo la formación del complejo XBP1u/HDAC3, que estabilizaría Nrf2 y aumentaría su actividad transcripcional. Por otro lado, se han identificado recientemente sitios de unión de los factores de transcripción NFAT al promotor de la CSE

(Bosc et al., 2017). En concordancia con este hallazgo, la expresión de varios genes diana de NFAT5, incluyendo la CSE (Figura 48E), se encuentran aumentados (Tabla 18) en las hembras descendientes de madres-fructosa. No obstante, además de la posible implicación de Nrf2 y NFAT en la expresión de la CSE en las hembras de madres-fructosa, no se debería descartar el posible papel de la dieta materna sobre el estado de metilación del promotor de la CSE, de manera similar a lo observado por nuestro grupo de investigación en los promotores de LXR y CPT1 en estos animales (Rodrigo et al., 2018).

También son interesantes e inesperados los resultados que se han encontrado en las hembras de madres control, fructosa y glucosa que se les administró fructosa en la edad adulta. Mientras que la homocisteinemia tiende a disminuir tras la ingesta de fructosa en los grupos FF y GF, los niveles de ácido fólico son notablemente menores después de 21 días de consumo de fructosa, sin importar la dieta materna. Los niveles plasmáticos de folato están influenciados por la dieta, y nosotros previamente hemos visto que estas hembras reducen la ingesta calórica total procedente de la dieta sólida a aproximadamente la mitad (alrededor del 52%) consumiendo fructosa en el agua de bebida (Rodríguez et al., 2016a). Por ello, estos menores niveles de ácido fólico en las ratas suplementadas con fructosa podrían deberse mayoritariamente a una menor ingesta de vitaminas en la comida.

Posiblemente, en un intento de compensar la reducida remetilación de HCys usando folato (debido a la falta de sustrato) para generar metionina, la remetilación usando betaína a través de la BHTM tiende a estar aumentada en el grupo FF y la eliminación de HCys mediante la transulfuración (a través de la CSE) se mostró reducida en las ratas que consumieron fructosa, principalmente en los grupos FF y CF. De nuevo, la BHMT y la transulfuración presentan respuestas opuestas. Curiosamente, la CBS no se encuentra afectada por la ingesta de fructosa, a excepción del grupo GF donde se encuentra incrementada. Peh y col. han demostrado utilizando dietas ricas en grasa que la CBS presenta una respuesta a la dieta diferente a la CSE (Peh et al., 2014) y han atribuido estos efectos a mecanismos compensatorios. También se ha descrito una situación similar en el corazón de ratones diabéticos después de un tratamiento de 15 meses con un 30% de fructosa (Jin et al., 2015). Sin embargo, estos autores han relacionado la disminución de la expresión de la CSE y el aumento de la CBS con la hiperglucemia e hiperhomocisteinemia, respectivamente, observada en estos ratones diabéticos. En nuestro modelo experimental no se encontraron ninguna de estas dos alteraciones (Rodríguez et al., 2016a) en las hembras que consumieron fructosa.

En consonancia con la función de la CSE como principal responsable de la síntesis de H₂S en el hígado (Kabil et al., 2011; Manna et al., 2014), la producción hepática de H₂S se ve claramente disminuida en los tres grupos que consumieron fructosa, siendo esta reducción más pronunciada en la descendencia de madres-fructosa. Jin y col. (Jin et al., 2015), aunque midieron los niveles endógenos de H₂S, en lugar de su producción, también observaron una menor cantidad de H₂S en el corazón de ratas viejas y diabéticas y en cardiomiocitos sometidos a altas dosis de glucosa. No obstante, esta es la primera vez que se describe que la ingesta materna de fructosa modifica la respuesta a una dieta rica en fructosa en la producción hepática de H₂S.

Aunque la producción hepática de H₂S es claramente menor, los niveles plasmáticos de H₂S no se ven afectados por la ingesta de fructosa. Otros autores, en animales sometidos a

Capítulo 2

dietas ricas en grasa, han visto como los niveles en plasma de H₂S no reflejan los cambios observados en la expresión génica o la actividad hepática (Peh et al., 2014). De hecho, los niveles en plasma de H₂S se deben a la suma de su producción en numerosos tejidos: el hígado, el riñón, los pulmones, el tejido adiposo etc. Sin embargo, a diferencia de Peh y col. que observaron una reducción en la cantidad de H₂S en tejidos extrahepáticos en los animales sometidos a dieta rica en grasa (Peh et al., 2014), nosotros no encontramos ningún cambio en la síntesis de H₂S en el tejido adiposo lumbar de nuestros animales.

Múltiples autores han relacionado la activación de la producción endógena del H₂S (o su administración exógena) con efectos beneficiosos en la mejora de varios factores de riesgo de desarrollo de síndrome metabólico, como la acumulación lipídica, la inflamación del tejido (Ma et al., 2020) y el estrés oxidativo (Hwang et al., 2013; Jin et al., 2015; Manna et al., 2014). En nuestras ratas, aunque la inflamación tiende a estar reducida, de manera no significativa (expresión génica de TNF α , Tabla 20, y ALT plasmática 66,7 \pm 17,0; 42,5 \pm 2,7; 47,4 \pm 2,7; y 49,2 \pm 4,4 U/L para CC, CF, FF, y GF, respectivamente), y la peroxidación lipídica (contenido hepático de MDA) muestra una disminución en los animales que consumieron fructosa, la oxidación de proteínas está aumentada y la expresión de la HO-1, una potente enzima antioxidante, se redujo tras el consumo de fructosa (Tabla 19). Corroborando estos resultados, el H₂S presenta un efecto protector frente a la formación de ROS en cardiomicitos debido a una mayor expresión de la sirtuina 1 (Liu et al., 2017). Por tanto, la clara reducción en la producción del H₂S hepático observado en los animales suplementados con fructosa podría explicar el incremento en la oxidación de proteínas encontrado en estos animales. Es más, Sodhi y col. han visto que la reducción de la HO-1, el estrés oxidativo y la disminución de la sirtuina 1 generados por la ingesta de fructosa inducen una acumulación de lípidos (Sodhi et al., 2015). De acuerdo con esto, nosotros hemos visto previamente que la ingesta de fructosa durante la gestación exacerba la dislipemia producida por la fructosa provocando esteatosis hepática en la descendencia hembra (Rodríguez et al., 2016a). También se ha sugerido que el H₂S de manera directa o indirecta suprime la expresión de ChREBP (Okamoto et al., 2013) y nosotros hemos descrito previamente un incremento en la expresión de ChREBP, factor de transcripción lipogénico, y sus genes diana en las descendientes que consumieron fructosa, principalmente en el grupo FF (Rodríguez et al., 2016a).

El H₂S es una molécula gaseosa que se produce en la ruta de la transulfuración junto con otro gasotransmisor, el amonio (NH₃) (Wang, 2014). El amonio procedente de la transulfuración, junto con el producido en el catabolismo de aminoácidos, se transforma en urea. Varios estudios han demostrado que la urea plasmática presenta una relación inversamente proporcional a la esteatosis hepática (De Las Heras et al., 2017; Liu et al., 2013). En este estudio, la administración de fructosa redujo la urea plasmática y este efecto es más pronunciado en las hembras FF, las cuales muestran, además, una menor expresión de la CSE, una reducida producción de H₂S y una mayor acumulación de lípidos en el hígado (Rodríguez et al., 2016a).

Numerosos factores pueden estar involucrados en el efecto del consumo de fructosa sobre la expresión de la CSE y la producción de H₂S en el hígado, y en la influencia de la dieta materna que hemos observado en el presente estudio. Sin embargo, alguno de estos factores, como ATF4, no presentan cambios en los tres grupos que recibieron fructosa frente al grupo

CC o bien no mostraron diferencias en respuesta a la ingesta de fructosa entre los 3 grupos tal y como se observó con Akt, la insulinemia (Rodríguez et al., 2016a), TNF α (Tabla 20) o Nrf2 (dado que la expresión de la HO-1 estaba reducida de forma similar en los grupos suplementados con fructosa, Tabla 19). Por otro lado, otro factor clave posiblemente implicado en los efectos aquí observados podría ser el diferente estatus de metilación del promotor de la CSE entre los tres grupos que recibieron fructosa. Sin embargo, la expresión de LXR y CPT1, genes en los cuales se han descrito diferentes grados de metilación del promotor entre hembras procedentes de madres control, fructosa y glucosa no mostró diferencias entre los 3 grupos (Rodrigo et al., 2018). Sorprendentemente, los niveles de ácidos biliares en plasma y la actividad hepática de FXR presentan una respuesta similar a la ingesta de fructosa, con descensos más pronunciados en los grupos CF y FF, en consonancia con los resultados obtenidos en otro gen diana de FXR, como es la CSE (Renga et al., 2009). Posiblemente, una menor llegada de ácidos biliares al hígado podría mantener inactivo a FXR, al igual que a sus genes diana (incluida la CSE), y como consecuencia disminuya la expresión de la CSE y la síntesis de H₂S. No conocemos las causas de las diferencias observadas en los ácidos biliares en plasma, pero es posible que algún componente del ciclo enterohepático, esté implicado, tal y como hemos sugerido anteriormente (Rodrigo et al., 2018). Por otro lado, el calcio es uno de los factores que pueden regular la expresión y actividad de la CSE y, como consecuencia, la producción de H₂S (Zhao et al., 2014). Sin embargo, los efectos del calcio parecen ser bifásicos y dependientes tanto del tipo celular como de la concentración intracelular de calcio. Existe controversia respecto a los efectos del calcio sobre la expresión/actividad de la CSE, encontrando autores que han descrito que el calcio muestra un efecto promotor sobre la CSE y otros autores han demostrado el efecto contrario (Bosc et al., 2017; Ishii et al., 2004; Mikami et al., 2013). En nuestro modelo, la fructosa podría estar promoviendo la liberación de calcio del retículo endoplasmático tanto de manera directa como indirecta (Prasad & Dhar, 2014) y es conocido que la disminución de la concentración de calcio en el retículo endoplasmático activa una respuesta de estrés del retículo endoplasmático aumentando, entre otras, la producción de chaperonas como la calreticulina, CHOP y Grp78 (Gallego-Sandín et al., 2011; Waser et al., 1997). Además, un incremento en la concentración citoplasmática de calcio puede afectar a proteínas sensibles a calcio, como la calmodulina (Chin & Means, 2000). Así, se observaron aumentos en la expresión génica en todas estas proteínas relacionadas con el calcio en los grupos FF y GF, pero no en el CF (Tabla 20). Estos resultados podrían indicar que el calcio está ejerciendo un efecto negativo en la expresión y actividad de la CSE del grupo FF en consonancia con los resultados de Mikami y col. (Mikami et al., 2013). En el caso del grupo GF el calcio modifica de manera efectiva la actividad de la CSE, pero no su expresión. En cualquier caso, es notable la capacidad de la ingesta de fructosa de afectar los niveles de ácidos biliares y la actividad de FXR, además de las proteínas relacionadas con el calcio, de manera exclusiva en el grupo de hembras descendientes de madres-fructosa que consumieron fructosa en la edad adulta (FF). Y, posiblemente esta es la razón, por la cual la fructosa provoca una reducción más pronunciada en la expresión y la actividad de la CSE.

En resumen, hemos demostrado que la ingesta materna de fructosa promueve en la descendencia hembra adulta, la producción hepática de H₂S, un gasotransmisor con efectos beneficiosos demostrados frente a la aterosclerosis y el síndrome metabólico. Además, uno de

Capítulo 2

los resultados más relevantes de este estudio es que la ingesta materna de fructosa agrava la reducción de la síntesis hepática de H_2S asociada al consumo de fructosa en las descendientes hembras adultas. La posible conexión entre la marcada reducción en la producción de este beneficioso gasotransmisor y el desarrollo de esteatosis hepática y estrés oxidativo sugiere la necesidad de reducir el consumo de bebidas azucaradas con fructosa, sobre todo durante la gestación. Es más, es muy notable el hecho de que, como nosotros y otros autores han demostrado (di Villa Bianca et al., 2013; Rodrigo et al., 2016; Sodhi et al., 2015), la ingesta de fructosa actúe de manera negativa en los sistemas implicados en la producción endógena de NO , CO , H_2S y NH_3 , todas ellas moléculas reconocidas como gasotransmisores (Wang, 2014). Así, teniendo en cuenta el potencial beneficioso de estos gases en mejorar muchas enfermedades no transmisibles, como la aterosclerosis y el síndrome metabólico, nos gustaría remarcar la relevancia clínica de las observaciones descritas en el presente estudio.

Capítulo 3: El metabolismo lipídico y del colesterol es influenciado tanto por la ingesta de tagatosa como por una dieta de fructosa y colesterol de manera diferente según la dieta materna

1. Introducción

La elevada ingesta de grasas, sal y azúcares añadidos son las principales características de la dieta occidental (Myles, 2014). Desde su introducción durante la Revolución Industrial hasta nuestros días el uso de aceites y azúcares refinados, asociado a una vida cada vez más sedentaria, ha provocado un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético que se ha asociado al incremento exponencial del desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad, la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares o la hipertensión (Carrera-Bastos et al., 2011; Hossain et al., 2007; Kopp, 2019). La Organización Mundial de la Salud (OMS) engloba a estas patologías en lo que se conoce como enfermedades no transmisibles, las cuales son consideradas como la primera causa de muerte en el mundo (WHO, 2019). Además, resulta preocupante la aparición de estas patologías asociadas a la dieta occidental en edades cada vez más tempranas (Weiss et al., 2013).

El incremento en el consumo de azúcar ha hecho que este llegue a suponer del 10 al 20% de la ingesta calórica diaria, superando las recomendaciones proporcionadas por la OMS (Tappy, 2018). La fructosa, azúcar presente en la sacarosa y en el jarabe de maíz rico en fructosa (HFCS, del inglés: *High-Fructose Corn Syrup*), ha sido uno de los azúcares añadidos que más controversia ha generado (White & Nicklas, 2016). De esta manera, ha habido autores que la han relacionado con el desarrollo de obesidad (White et al., 2015), síndrome metabólico (Lim et al., 2010), hígado graso no alcohólico (Alwahsh & Gebhardt, 2017) y la resistencia a insulina (Catena et al., 2003), mientras que otros no han visto tal relación (Heden et al., 2014). La fructosa estimula la lipogénesis debido a que en su metabolismo a través de la fructólisis, la fructosa se salta las principales etapas de regulación de la glucólisis, dando lugar a la generación de triosas fosfato de manera descontrolada las cuales pueden ser destinadas a la síntesis de lípidos (Tappy, 2018). Además, se ha visto que favorece en la síntesis de ácido úrico (Lanaspa et al., 2011), induce una alterada respuesta a leptina (Sangüesa et al., 2019) y promueve una situación de estrés oxidativo (Rodrigo et al., 2016; Y. Yang et al., 2018).

En un intento de reducir la ingesta calórica, pero manteniendo la necesidad, que llega a adicción en algunos casos, del consumo de productos dulces, la industria ha desarrollado edulcorantes no calóricos o bajos en calorías (Mooradian et al., 2017). Estos compuestos presentan diferente naturaleza desde edulcorantes no calóricos, como el aspartamo y la sacarina, hasta alcoholes de azúcares, como el xilitol y el sorbitol (Mooradian et al., 2017). En los últimos años, el grupo de los azúcares raros ha generado gran interés en la comunidad científica, ya que presentan bajo valor calórico, sin producir sabor desagradable posterior (Mooradian et al., 2017; Nagata et al., 2018). Entre ellos se encuentra la tagatosa, un epímero de la fructosa con un poder edulcorante similar a la sacarosa, pero que solo se absorbe en el intestino en un 20%, siendo el resto metabolizado por la microbiota intestinal a ácidos grasos de cadena corta (Guerrero-Wyss et al., 2018; Roy et al., 2018). La fracción absorbida es metabolizada por la cetohexoquinasa, de la misma manera que la fructosa, generando tagatosa 1-fosfato (Roy et al., 2018). Aunque estudios en animales de experimentación y en humanos parecen indicar que la tagatosa consigue reducir las alteraciones metabólicas asociadas al consumo de azúcares (Ensor et al., 2015; Police et al., 2009), hay autores que han descrito efectos asociados a su consumo similares a los asociados a la fructosa (Buemann et

Capítulo 3

al., 2000). Por tanto, son necesarios un mayor número de estudios para conocer en profundidad los efectos a corto y a largo plazo del consumo de tagatosa y otros azúcares raros.

La elevada ingesta de azúcares suele ir asociada a una mayor ingesta de grasa (Cena & Calder, 2020). Numerosos estudios en animales de experimentación han mostrado cómo el elevado consumo de lípidos favorece el desarrollo de hígado graso no alcohólico y la aparición de obesidad, diabetes tipo 2 y alteraciones cardiovasculares (Carrera-Bastos et al., 2011). Es más, la asociación de dietas ricas en grasa y fructosa empeora los efectos metabólicos de cada una por separado (Lozano et al., 2016). De entre todos los lípidos de la dieta, el consumo de colesterol ha suscitado gran interés en la comunidad científica debido a su relación con el desarrollo de enfermedad cardiovascular en animales de experimentación (Lee et al., 2017) y en humanos (McGill, 1979). Es más, dietas ricas en colesterol se han relacionado con la aparición de esteatosis hepática y dislipemia en modelos animales (Wang et al., 2011; Xie et al., 2011). Esto es debido a que la acumulación hepática de colesterol conlleva la inducción del eje LXR-SREBP1c que provoca la activación de la síntesis *de novo* de lípidos en un intento de asegurar suficientes ácidos grasos para formar colesterol esterificado (Nakamuta et al., 2009).

La programación fetal es un mecanismo según el cual distintas señales por parte de la madre condicionan el correcto desarrollo del individuo, siendo la dieta materna una de ellas. Como consecuencia, la dieta materna durante la gestación condiciona la aparición de alteraciones metabólicas en la descendencia en la etapa adulta (Howie et al., 2009; Vickers et al., 2000). Así, se ha descrito que el consumo de fructosa en la gestación produce resistencia a la insulina, estrés oxidativo e hiperinsulinemia en la descendencia macho (Rodríguez et al., 2015; Rodríguez et al., 2016b), lo cual indica algún tipo de programación fetal inducido por la fructosa. Es más, estas alteraciones se agravan cuando a dicha descendencia se le reexpone a una dieta con fructosa en la edad adulta (capítulo 1 de la presente tesis doctoral) (Fauste et al., 2020c).

Con estos antecedentes, nos propusimos conocer si el consumo de fructosa en la bebida durante la gestación afectaba al metabolismo lipídico de la descendencia macho en una edad temprana (3 meses), y si además el consumo de fructosa por dichos descendientes empeoraba su situación. Además, dado el creciente uso de edulcorantes no calóricos, como los azúcares raros, quisimos conocer si estos efectos, en caso de producirse, son exclusivos del consumo de fructosa o si la administración de tagatosa también conducía a efectos similares. Finalmente, usamos un modelo de dieta occidental (*Western diet*) basada en una dieta rica en colesterol asociada a fructosa en la bebida, la cual se administró a los machos descendientes de madres control y fructosa con el propósito de evidenciar si la asociación de ambos componentes dietéticos conducía a efectos más potenciados que el consumo de fructosa de forma aislada.

2. Materiales y métodos

2.1. Animales y diseño experimental

Se cruzaron ratas hembra Sprague-Dawley con machos y a lo largo de toda la gestación, se les permitió el acceso libre a agua sin aditivo (grupo madres control, C) y agua suplementada con un 10% de fructosa (p/v) (grupo madres fructosa, F) (generación F0). Tras parir, se realizó un ajuste de las camadas a 9 crías y se les administró agua sin aditivo durante la lactancia. Cuando las crías alcanzaron los 20 días de edad se destetaron, se separaron por género y se les dejó crecer, permitiéndoles el acceso a agua sin aditivo (generación F1). Los machos F1, procedentes de madres control o fructosa, se separaron en 4 grupos a día 90 de vida según el tratamiento dietético recibido (como se describe en la Figura 24): agua sin aditivos (C), agua suplementada con fructosa al 10% (p/v) (F), agua suplementada con tagatosa al 10% (p/v) (T) y la asociación de fructosa en el agua de bebida al 10% (p/v) con una dieta sólida con un 2% de colesterol (*Tecklad Custome Diets*, TD.07841, Envigo, EEUU) (FCol). Este tratamiento se realizó durante 3 semanas, tras el cual las ratas fueron sacrificadas. La sangre se recogió en tubos de EDTA (Vacutainer[®]) para aislar a continuación el plasma, que se almacenó a -80°C para su posterior análisis. Además, se extrajeron el hígado y el íleon y se tomaron las dos últimas heces contenidas en el recto. Todos los tejidos y muestras recogidos se pesaron y fueron almacenados a -80°C hasta su análisis.

Una descripción más completa del procedimiento experimental se recoge en los Materiales y Métodos Generales.

2.2. Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real

El ARN total de hígado, íleon y tejido adiposo lumbar fue extraído mediante el kit Ribopure[™] (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). Dicho ARN se trató con DNaseI usando el kit DNA free (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). Tras ello, el ADNc se sintetizó mediante retrotranscripción con Superscript II (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). La PCR a tiempo real se llevó a cabo utilizando un termociclador CFX96 Touch (BioRad, EEUU). Los volúmenes de reactivos que se utilizaron en cada muestra fueron: 10 µL de SYBR *Premix Ex Taq* (Takara Bio Inc., Japón), 1 µL de cebador F 10 µM (IDT Technologies, EEUU), 1 µL de cebador R 10 µM (IDT Technologies, EEUU), 2 µL de la muestra de ADNc y 6 µL de agua mili-Q estéril. Para asegurarnos de que los valores de Cp de las muestras, para todos los genes se encontraban dentro de la recta de calibrado y no superaban un valor de 33 ciclos, las muestras de ADNc sw hígado e íleon fueron diluidas 1/30, trabajando con una concentración final de ADNc de 5 ng/µL.

Los parámetros programados para cada gen fueron los indicados por la base de datos de secuencias de cebadores *RT-PCR Primer Sequences for Atlas Nylon Arrays* (Clontech, EEUU) o la aplicación para el diseño de cebadores Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) (Anexo 1). El protocolo general utilizado para llevar a cabo la amplificación de cada gen en CFX96 Touch (BioRad, EEUU) figura en la Tabla 7. El análisis de la cuantificación relativa de la expresión de los genes fue realizado mediante el software *CFX Maestro 2.0* que se basa en el método de 2-

Capítulo 3

Δ Ct o método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Como gen de referencia, gen cuya expresión no varía en función de las condiciones experimentales, se utilizó RPS29.

2.3. Determinaciones en plasma

Se utilizaron alícuotas de plasma para la medida de triglicéridos, colesterol, colesterol en HDL, ácidos biliares (Spinreact, España) y NEFAS (Wako, Japón) mediante kits enzimáticos colorimétricos a punto final utilizando el autoanalizador Saturno 150 (Crony Instruments Inc., Italia). El colesterol no-HDL se determinó como la diferencia entre el colesterol total y el colesterol en HDL. Para determinar el riesgo de sufrir aterosclerosis se determinó el índice de riesgo coronario (CRI=CT/HDLc) y el índice aterogénico del plasma [AIP=log (TG/HDLc)] (Jemil et al., 2017).

2.4. Determinaciones en hígado, íleon y heces

Para la determinación de lípidos totales, triglicéridos y colesterol en hígado, íleon y heces se llevó a cabo una extracción de lípidos por el método de Folch (Folch et al., 1957), como aparece recogido en el apartado Materiales y Métodos Generales. Los extractos fueron completamente evaporados y los lípidos totales se midieron por diferencia de pesada. Los triglicéridos y colesterol se determinaron por kits enzimáticos colorimétricos a punto final (Spinreact, España) según lo descrito en el apartado Materiales y Métodos Generales.

En hígado e íleon se utilizaron homogenados en PBS para la medida de ácidos biliares mediante un kit enzimático colorimétrico (Spinreact, España). En el caso de las heces, se llevó a cabo una extracción de los ácidos biliares con metanol y, posteriormente, se utilizó el mismo kit para la medida de los ácidos biliares.

Una descripción completa de las determinaciones realizadas en tejido aparece descrita en el apartado Materiales y Métodos Generales.

2.5. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media +/- el error estándar. Los grupos experimentales están formados por 7-8 animales procedentes de madres diferentes, para evitar el "efecto camada". Las diferencias estadísticamente significativas se analizaron mediante el análisis de la varianza de doble vía (2way ANOVA), utilizando el programa estadístico SPSS. Se considera que el efecto del tratamiento es estadísticamente significativo cuando las diferencias alcanzan una $P < 0.05$. Estas diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (*) cuando se producen entre los machos F1 que han recibido tratamientos diferentes en la edad adulta pero que proceden de madres que recibieron el mismo tratamiento y con almohadillas (#) cuando las diferencias se encuentran en machos F1 que recibieron el mismo tratamiento en la edad adulta, pero el tratamiento de sus madres fue diferente. Los estadísticos del ANOVA de doble vía para cada uno de los resultados aparecen recogidos en el Anexo 2.

3. Resultados

3.1. El consumo de fructosa líquida, pero no de tagatosa, provoca un aumento en la ingesta de líquido en la descendencia macho de madres control y fructosa.

La adición de fructosa (10% p/v) al agua de bebida durante 21 días en machos jóvenes de 3 meses de edad, condujo a un aumento significativo en el volumen de líquido ingerido frente a los machos que tomaron agua sin aditivos (Figura 51A). Sorprendentemente, la ingesta de líquido en aquellos machos procedentes de madres-fructosa resultó significativamente menor que en los de madres control (Figura 51A). Para comprobar si los efectos observados se debían únicamente a la fructosa se utilizó tagatosa. Como puede verse en la Figura 51A, los machos que consumieron tagatosa, independientemente del régimen dietético materno, no modifican el volumen de líquido consumido durante los 21 días del estudio frente a los machos que tomaron agua sin aditivos. Por consiguiente, consumen significativamente menos volumen de líquido que los machos que tomaron agua con fructosa (Figura 51A). En un intento de compensar las Kcal procedentes de la fructosa en la bebida, los machos suplementados con fructosa en la edad adulta y procedentes de madres control y fructosa reducen la ingesta de comida sólida de manera significativa frente a los machos control (Figura 51B). En cambio, los machos que tomaron tagatosa no modifican el consumo de dieta sólida frente a los machos control (Figura 51B), si bien si se ve una disminución, aunque no significativa, en los descendientes de madres-fructosa. A pesar de esto, las Kcal totales ingeridas por los machos que consumieron fructosa en el agua de bebida son significativamente mayores en comparación con los machos que tomaron agua sin aditivos o suplementada con tagatosa (Figura 51C), independientemente de qué habían ingerido sus madres, de acuerdo con lo observado en la ingesta de bebida (Figura 51A). Además, se observa una tendencia casi significativa ($p=0,057$) a la disminución en la ingesta calórica de los machos suplementados con fructosa procedentes de madres-fructosa comparados con los descendientes de madres control (Figura 51C). De esas Kcal totales en los machos que tomaron fructosa descendientes de madres control, un 47% proceden de la fructosa, mientras que en el caso de los machos de madres-fructosa ese porcentaje desciende al 41%.

Curiosamente, la mayor ingesta calórica de los machos que tomaron fructosa no supone, en ningún caso, cambios significativos en el incremento de peso a lo largo de los 21 días de tratamiento frente a los machos que consumieron agua sin aditivo (Figura 51D). En cambio, en los machos que consumieron tagatosa sí que se observan cambios, ya que muestran un menor incremento de peso en comparación con los otros dos grupos experimentales, llegando a ser significativo en los machos de madres-fructosa (Figura 51D). No obstante, el peso corporal al final del estudio no resultó diferente entre los tres grupos experimentales en estos descendientes de madres-fructosa ($418,52 \pm 18,51$; $433,7 \pm 11,53$; $407,49 \pm 7,50$ gramos para FC; FF; FT).

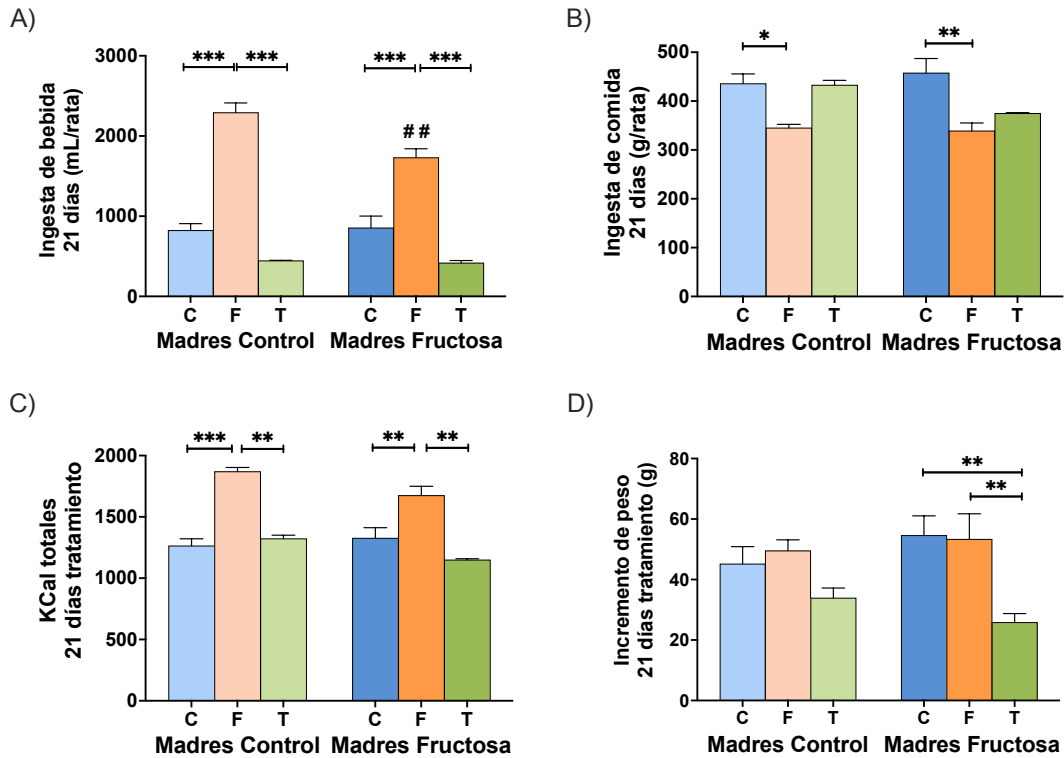


Figura 51: Ingesta de bebida (A), comida sólida (B), Kcal totales (C) e incremento de peso (D) en los 21 días de estudio de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) o agua con un 10% (p/v) de tagatosa (T, barras verdes). Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta

Se observó que la cantidad de líquido ingerida por los machos de madres control o fructosa que recibieron fructosa y una dieta sólida con colesterol, mostró un perfil similar al de los machos que sólo consumieron fructosa. Así, estos machos tanto de madres control como fructosa aumentan significativamente el volumen de líquido ingerido frente a los machos control, pero, en este caso, la disminución del consumo de líquido en los machos de madres-fructosa comparado con los de madres control no llega a ser significativa (Figura 52A). Sorprendentemente, el efecto compensatorio en la ingesta de dieta sólida no se ve en los machos que consumieron fructosa y colesterol procedentes de madres control (Figura 52B). Como consecuencia, las Kcal totales consumidas por los machos de madres control que tomaron fructosa y colesterol es significativamente mayor frente a los machos controles y los que sólo tomaron fructosa (Figura 52C). Inesperadamente, los machos procedentes de madres-fructosa que tomaron una dieta con fructosa y colesterol, sí que tienden a reducir el consumo de dieta sólida frente a los machos controles (Figura 52B). Al igual que sucedía con los machos que sólo tomaron fructosa, las Kcal totales en los machos que consumieron fructosa y colesterol procedentes de madres-fructosa siguen siendo significativamente mayores que los machos control, pero ya no aparecen diferencias con respecto a los que sólo

consumieron fructosa (Figura 52C). Además, se observa una disminución significativa de las Kcal totales consumidas por los machos de madres-fructosa frente a los machos de madres control que consumieron fructosa y colesterol (Figura 52C). De estas Kcal totales, las procedentes de la fructosa en los machos de madres control que consumieron fructosa y colesterol suponen un 45%, mientras que en los descendientes de madres-fructosa, representan un 42,5% de la ingesta calórica total. A pesar de todo esto, ni el consumo de fructosa en agua de bebida solo o en combinación con una dieta rica en colesterol durante 21 días en machos descendientes de madres control o fructosa condujo a cambios en el incremento de peso de los animales (Figura 52D).

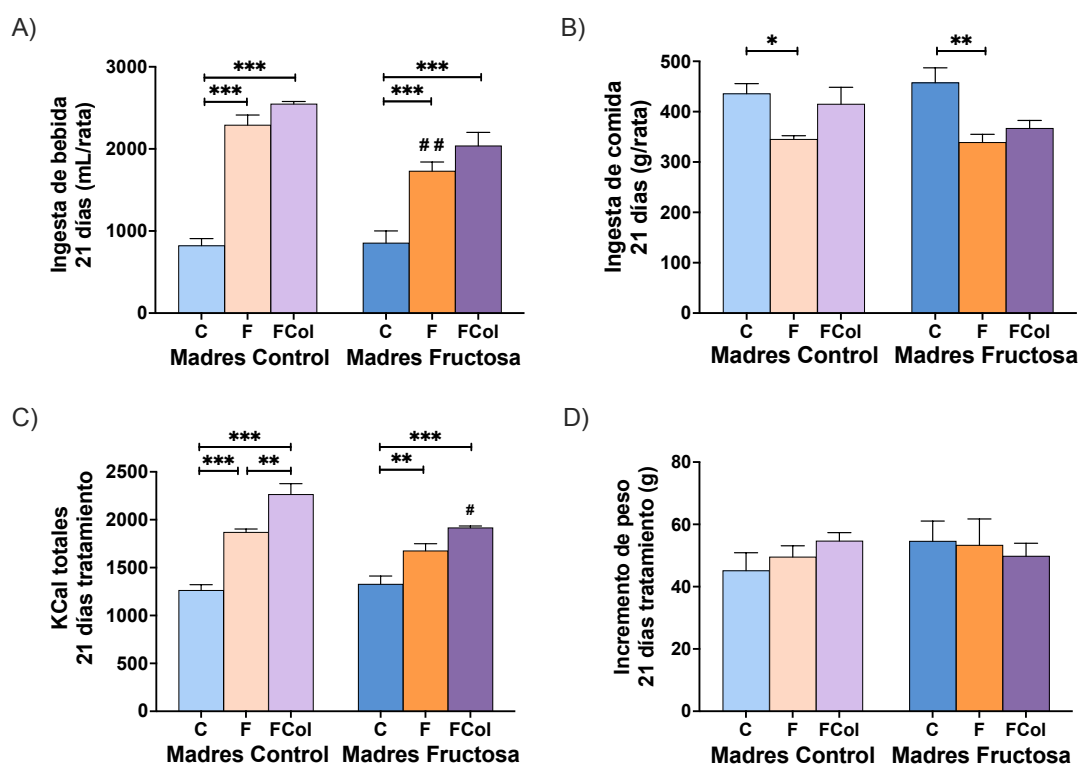


Figura 52: Ingesta de bebida (A), comida sólida (B), Kcal totales (C) e incremento de peso (D) en los 21 días de estudio de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) o agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

3.2. El consumo de tagatosa en machos jóvenes descendientes de madres-fructosa afecta la absorción intestinal de ácidos biliares.

Está ampliamente descrita en la bibliografía la capacidad de la fructosa de aumentar los niveles de triglicéridos en plasma (Tappy & Lê, 2015). En el presente estudio, el consumo de fructosa durante 21 días condujo, tanto en los descendientes de madres control como fructosa, a una tendencia al aumento de la trigliceridemia (Figura 53A) que en ningún caso resultó significativa. Sorprendentemente, un perfil similar se observó también en los machos que consumieron tagatosa, sin importar el régimen dietético materno (Figura 53A) e incluso aunque la cantidad de tagatosa ingerida fuera mucho menor que la de fructosa (Figura 51A). En cambio, los triglicéridos hepáticos no muestran diferencias significativas en los descendientes de madres control ni cuando se les administra fructosa ni tagatosa (Figura 53B). Sin embargo, encontramos una tendencia a una mayor acumulación de triglicéridos hepáticos en los machos de madres-fructosa tras la ingesta de tagatosa, frente a los otros dos grupos experimentales (Figura 53B). En cuanto a los niveles de colesterol, el consumo de fructosa no condujo a cambios en los niveles de colesterol plasmático (Figura 53C) ni hepático (Figura 53D). En cambio, los descendientes de madres control que tomaron tagatosa presentaron un aumento significativo en la colesterolemia frente a los machos control y fructosa, efecto que no se observa en los descendientes de madres-fructosa que tomaron tagatosa (Figura 53C). El consumo de tagatosa tampoco provocó cambios en el colesterol hepático, no importando el tratamiento materno (Figura 53D).

En un intento de explicar las tendencias observadas en la trigliceridemia (Figura 53A) y los triglicéridos hepáticos (Figura 53B) y dadas las múltiples evidencias que demuestran que la fructosa es capaz de activar la lipogénesis y disminuir la oxidación de ácidos grasos (Tappy & Lê, 2015), y la escasez de trabajos que evalúen los efectos de la tagatosa, se llevó a cabo un estudio de la expresión de los principales genes lipogénicos (FAS y SCD1) y catabólicos (CPT1). Como puede verse en la Tabla 21, la fructosa provoca aumento en la expresión de las enzimas FAS y SCD1 de manera significativa en los descendientes de madres control, pero en los descendientes de madres-fructosa ese incremento solo es significativo en el caso de la SCD1. En cambio, la tagatosa no consigue aumentar significativamente la expresión de ninguno de los dos genes, independientemente del tratamiento materno (Tabla 21). En cuanto al catabolismo, puede observarse que mientras que la fructosa promueve una disminución no significativa en la expresión de CPT1 en los hijos de madres control, pero no en los procedentes de madres-fructosa, la tagatosa parece incrementar de manera no significativa la expresión de la CPT1 frente a los machos control y fructosa, tanto en descendientes de madres control como en los descendientes de madres-fructosa (Tabla 21). En consecuencia, parece que la fructosa afecta a la trigliceridemia por aumento de la lipogénesis y disminución de la β -oxidación, pero la tagatosa no lo realiza de esta manera. Es más, la expresión de MTTP (enzima que participa en la formación de VLDL) presenta un aumento casi significativo de su expresión en los descendientes de madres control que tomaron fructosa frente a los machos control, mientras que en los descendientes de madres-fructosa no se observan diferencias (Tabla 21). En cambio, el consumo de tagatosa no condujo a cambios en la expresión de MTTP, independientemente del tratamiento materno (Tabla 21).

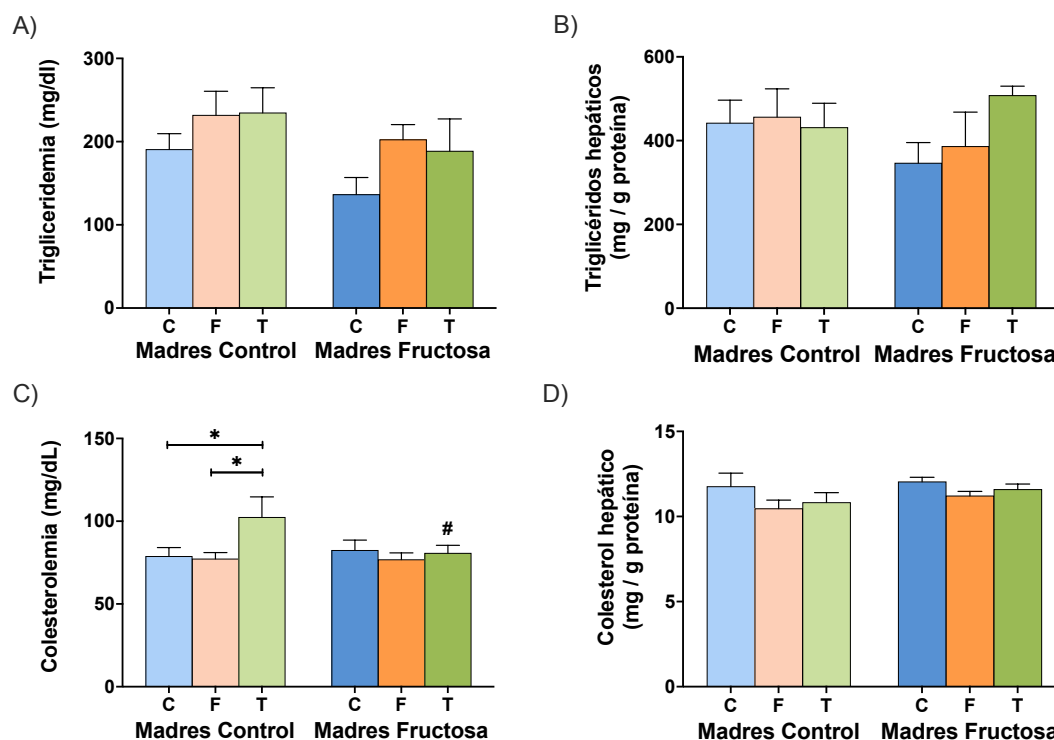


Figura 53: Trigliceridemia (A), contenido de triglicéridos hepáticos (B), colesterolemia (C) y contenido de colesterol hepático (D) en los 21 días de estudio de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) o agua con un 10% (p/v) de tagatosa (T, barras verdes). Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

Tabla 21: Expresión génica hepática de genes lipogénicos (FAS y SCD1), de oxidación de ácidos grasos (CPT1) y encargados de la formación de VLDL (MTTP) de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda) y madres-fructosa (derecha) tratados con agua sin aditivos (Control), agua con un 10% (p/v) de fructosa (Fructosa) y agua con un 10% (p/v) de tagatosa (Tagatosa).

| | MADRES CONTROL | | | | MADRES FRUCTOSA | | | |
|-------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|-------------------|------------------|---|
| | CONTROL | FRUCTOSA | TAGATOSA | p | CONTROL | FRUCTOSA | TAGATOSA | p |
| FAS (u.a.) | 16,37 \pm 2,81 | 43,87 \pm 7,44 | 34,67 \pm 5,76 | *(CvsF) p= 0,02 | 25,85 \pm 5,16 | 43,91 \pm 10,92 | 34,29 \pm 7,48 | |
| SCD1 (u.a.) | 1,06 \pm 0,14 | 2,24 \pm 0,22 | 1,51 \pm 0,29 | ** (CvsF) p= 0,007 | 1,53 \pm 0,32 | 2,74 \pm 0,36 | 1,16 \pm 0,18 | ** (CvsF) p= 0,008 *** (FvsT) p= 0,000 |
| CPT1 (u.a.) | 1,04 \pm 0,35 | 0,65 \pm 0,13 | 1,36 \pm 0,51 | | 0,58 \pm 0,12 | 0,60 \pm 0,09 | 1,50 \pm 0,34 | |
| MTTP (u.a.) | 1,02 \pm 0,08 | 1,24 \pm 0,08 | 1,14 \pm 0,05 | (CvsF) p= 0,08 | 0,97 \pm 0,04 | 1,18 \pm 0,10 | 1,05 \pm 0,01 | |

La expresión génica se determinó por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. FAS: ácido graso sintasa; SCD1: esteroil CoA desaturasa 1; CPT1: carnitina palmitoil transferasa 1; MTTP: proteína microsomal transportadora de triglicéridos.

Estos datos nos llevaron a cuestionarnos e investigar qué otros mecanismos podrían encontrarse implicados en el caso de la tagatosa. Los ácidos biliares son moléculas que forman parte de la bilis y favorecen la absorción de las grasas. En el presente estudio, la concentración de ácidos biliares en heces no se vio modificada en los grupos fructosa y tagatosa de los descendientes de madres control frente a los machos que no tomaron azúcares (grupo C). Sin embargo, los ácidos biliares tienden a aumentar en los grupos fructosa y tagatosa de las descendientes de madres-fructosa, siendo este incremento superior en los animales que recibieron tagatosa (Figura 54A). Paralelamente, el contenido de ácidos biliares en hígado aumenta significativamente en los machos de madres-fructosa que consumieron tagatosa frente a los controles y los que tomaron fructosa, pero no se vieron diferencias entre los tres grupos experimentales de hijos de madres control (Figura 54B).

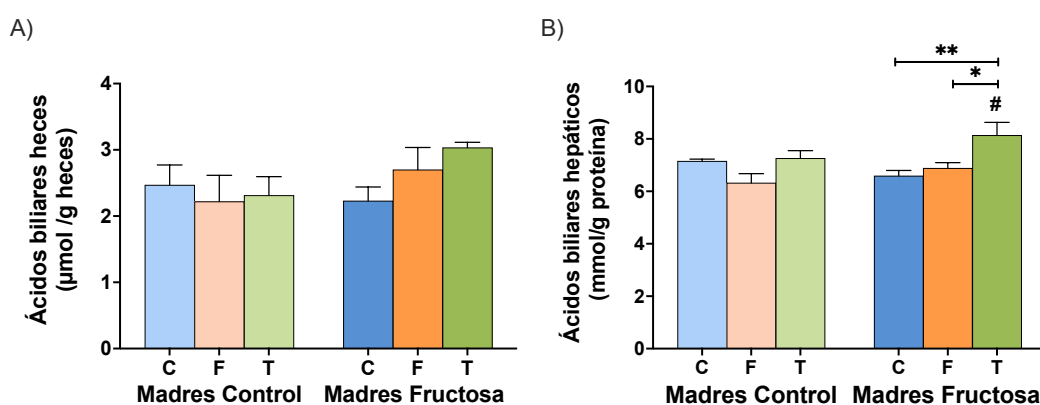


Figura 54: Concentración de ácidos biliares en heces (A) e hígado (B) tras 21 días de tratamiento de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, gráficas en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) o agua con un 10% (p/v) de tagatosa (T, barras verdes). Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

Las diferencias observadas en la concentración de ácidos biliares podrían deberse a una mayor absorción intestinal de estos ácidos biliares. De hecho, todos los genes implicados en este proceso (Figura 55A) se encuentran sobreexpresados en los machos de madres-fructosa en comparación con los de madres control cuando se les alimenta con tagatosa (Figura 55). Estos aumentos son significativos en el caso de la ASBT y OST β (Figura 55B y E) y casi significativos para IBABP ($p=0,076$) (Figura 55C), mientras que en OST α (Figura 55D) solo se observa una tendencia. Estos incrementos en los machos de madres-fructosa que tomaron tagatosa también son significativos (OST α y OST β) o casi significativos (ASBT, $p=0,054$) frente al grupo control y sólo en el caso de la IBABP frente al grupo fructosa (Figura 55). Curiosamente, estas diferencias no se observaron entre los tres grupos descendientes de madres control (Figura 55). Por lo tanto, la ingesta de tagatosa en los descendientes de las madres-fructosa provocaría una mayor entrada de ácidos biliares al intestino (ASBT), con un

trasiego por el tejido favorecido por IBABP y una salida incrementada a la sangre a través de OST (Figura 55A). Esta mayor capacidad de absorción intestinal de los ácidos biliares en los machos de madres-fructosa que recibieron tagatosa en la edad adulta, se confirma al observarse también un aumento significativo en los niveles de ácidos biliares plasmáticos de manera exclusiva en este grupo, frente a los machos control (Figura 56).

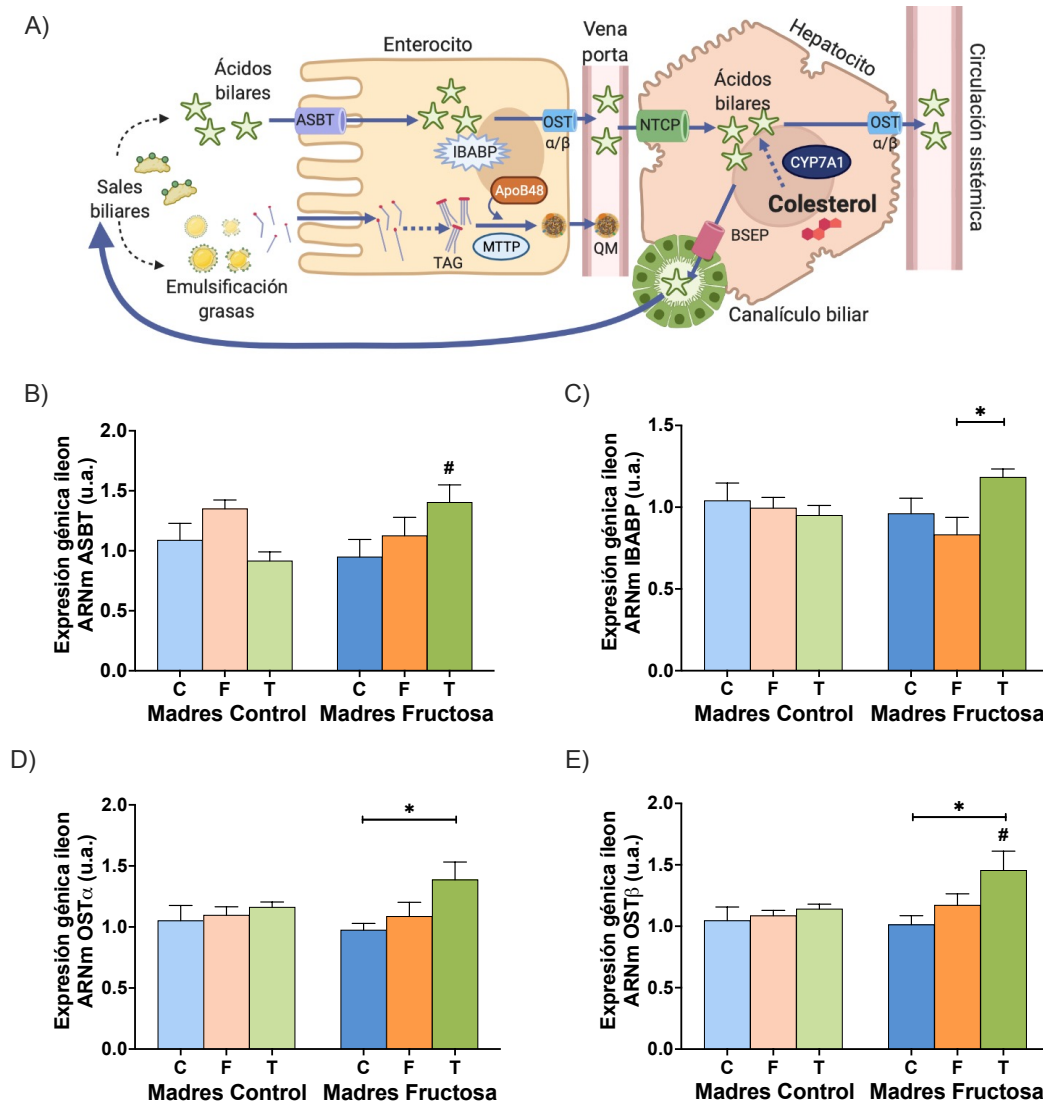


Figura 55: Esquema de la circulación enterohepática de los ácidos biliares y absorción de ácidos grasos en el intestino (A). Expresión génica de los genes implicados en la absorción intestinal de los ácidos biliares en íleon: ASBT (B), IBABP (C), OST α (D) y OST β (E) tras 21 días de estudio de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) o agua con un 10% (p/v) de tagatosa (T, barras verdes). La expresión génica se determinó por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. ASBT: Transportador apical sodio-ácido biliar; IBABP: Proteína de unión ileal de ácidos biliares; OST: Transportador de solutos orgánicos. Panel A: imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

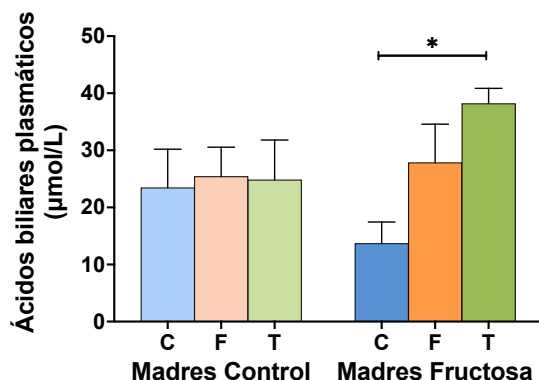


Figura 56: Niveles de ácidos biliares plasmáticos en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) o agua con un 10% (p/v) de tagatosa (T, barras verdes). Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

Esta mayor presencia de ácidos biliares en heces, hígado y plasma junto con una mayor absorción intestinal podrían sugerir una mayor recirculación de estas moléculas potenciada por la tagatosa en los descendientes de madres-fructosa. Por ello, quisimos conocer si ese mismo perfil también se observaba en la absorción de lípidos. Así, como puede verse en la Figura 57A, los niveles de triglicéridos en heces no cambian entre los tres grupos experimentales de machos de madres control. Sin embargo, en los descendientes de madres-fructosa, los animales que tomaron tagatosa mostraron una menor concentración de triglicéridos en heces que alcanzó valores significativos frente al control. Es necesario añadir que estos resultados podrían deberse a las diferencias observadas, aunque no significativas (Figura 51B), en la ingesta de comida sólida entre los grupos control y tagatosa. Sin embargo, como se puede ver en la Figura 57B y C, los lípidos totales y el contenido de colesterol en heces no experimentó cambios entre los diferentes grupos experimentales independientemente de la procedencia materna. También es necesario señalar que, aunque la expresión de MTTP, proteína implicada en el ensamblaje de los quilomicrones en intestino (Figura 55A), no muestra cambios en la expresión en los descendientes de madres control, sí exhibe un incremento significativo de la expresión en los descendientes de madres-fructosa que tomaron tagatosa frente a los controles (Figura 57D).

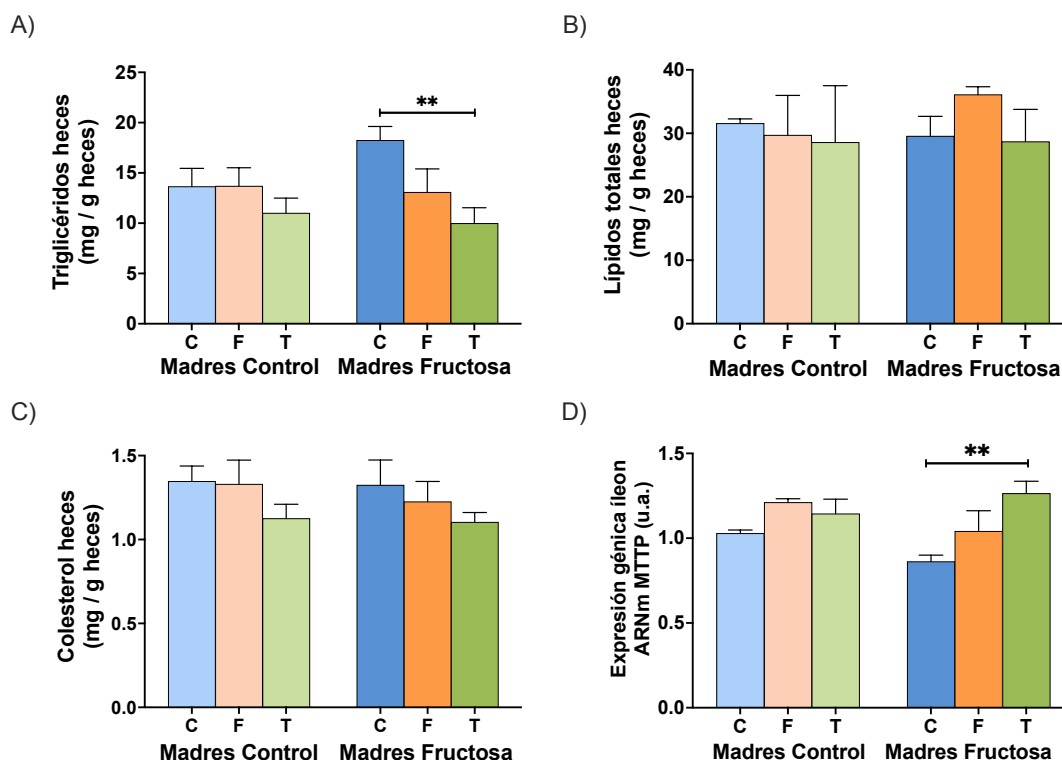


Figura 57: Triglicéridos en heces (A), lípidos totales (B), colesterol (C) y expresión génica en ileon de MTPP (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) o agua con un 10% (p/v) de tagatosa (T, barras verdes). La expresión génica se determinó por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. MTPP: Proteína microsomal transportadora de triglicéridos.

3.3. El consumo de colesterol agrava la dislipemia provocada por la fructosa en la descendencia independientemente del régimen nutricional de la madre

Como era de esperar, el consumo de colesterol en la dieta condujo a un aumento significativo de la colesterolemia y el colesterol hepático frente a los grupos control y fructosa en los machos jóvenes que recibieron una dieta con fructosa en el agua de bebida y colesterol al 2% en la comida sólida, no importando el tratamiento materno (Figura 58). Además, aunque los machos descendientes de madres-fructosa presentan una menor ingesta calórica que los de madres control (Figura 52C), no aparecen diferencias entre ambos grupos en cuanto a los niveles de colesterol plasmático y hepático. No obstante, aunque la fructosa pueda aportar sustrato colesterogénico, esta menor ingesta calórica se debe más a una menor ingesta de fructosa líquida (Figura 52A) que a un consumo menor de la dieta enriquecida en colesterol (Figura 52B).

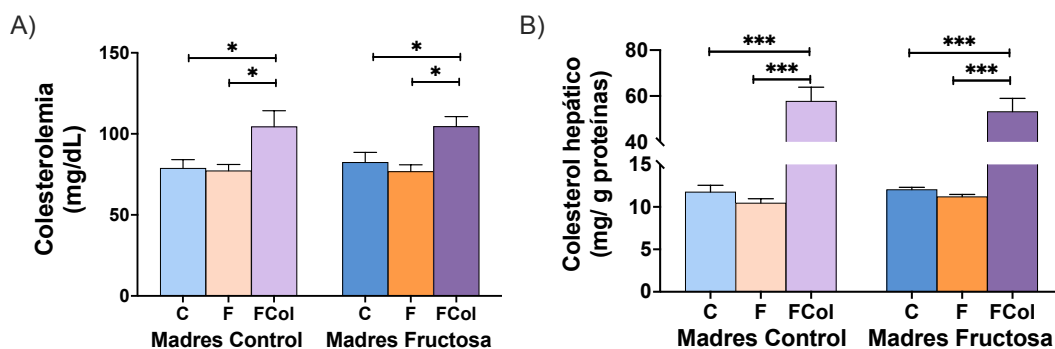


Figura 58: Colesterolemia (A) y colesterol hepático (B) de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) o agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

En cuanto a la distribución del colesterol en las diferentes lipoproteínas, observamos que el consumo de colesterol conlleva un aumento significativo del colesterol no-HDL en estos grupos, en comparación con el grupo control y el grupo fructosa (Figura 59A). Sorprendentemente, el colesterol HDL aparece reducido en los animales que fueron suplementados con colesterol y fructosa (Figura 59B). Así, los descendientes de madres control que consumieron fructosa y colesterol presentan una reducción significativa y casi significativa ($p=0,059$) del colesterol en HDL frente a los controles y fructosa, respectivamente (Figura 59B). En cambio, en los descendientes de madres-fructosa se observó una reducción del colesterol en HDL tanto en los animales que recibieron sólo fructosa como los que consumieron fructosa en combinación con colesterol, en comparación con los controles, si bien dicha reducción sólo llega a ser significativa en el grupo de fructosa y colesterol (Figura 59B). En consecuencia, la asociación del consumo de fructosa y colesterol supone un aumento en el riesgo de sufrir aterosclerosis en el presente modelo experimental, tal y como muestran los resultados del índice de riesgo coronario ($CRI=CT/HDLc$) (Figura 59C) y el índice aterogénico del plasma [$AIP=\log(TG/HDLc)$] (Figura 59D) (Jemil et al., 2017), los cuales aparecen significativamente aumentados frente a los grupos control y fructosa, independientemente de qué madre proceden. No obstante, hay que resaltar que el índice aterogénico del plasma en los descendientes de madres-fructosa que tomaron fructosa exclusivamente, también presentan un incremento significativo del riesgo aterogénico frente al grupo control (Figura 59D).

Es más, en consonancia con lo observado en el colesterol no-HDL, pero no tanto con los resultados en colesterol HDL, la expresión del receptor de LDL (LDLR) y SR-B1 (del inglés: *Scavenger receptor class B type 1*) en hígado, receptores encargados de la captación de LDL y HDL, respectivamente, se encuentra disminuida en los machos que tomaron fructosa y colesterol frente a los controles, siendo este efecto más evidente en los hijos de madres control (Tabla 22) y menos marcado en los descendientes de madres-fructosa (Tabla 22).

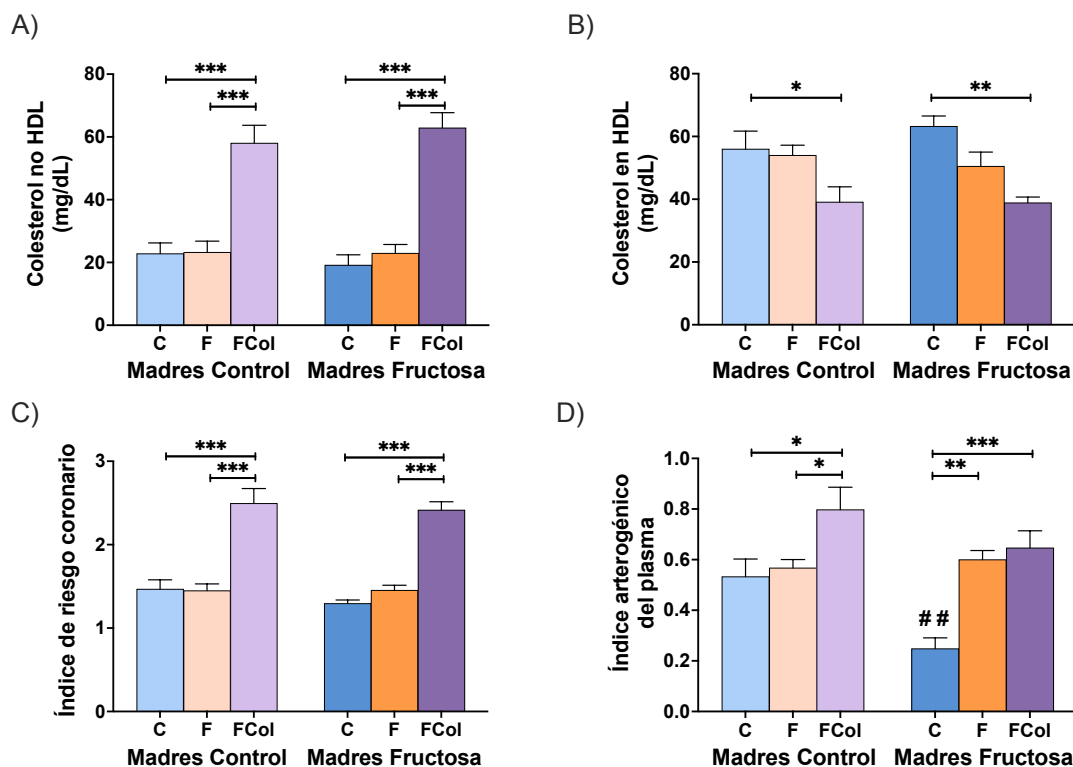


Figura 59: Colesterol no-HDL (A) y colesterol en HDL (B) e índices de riesgo de aterosclerosis: índice de riesgo coronario (C) e índice aterogénico del plasma (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, gráficas moradas). Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. HDL: Lipoproteínas de alta densidad. CRI=CT/HDLc; AIP=log (TG/HDLc).

Considerando los datos obtenidos en el índice aterogénico del plasma, que también tiene en cuenta la trigliceridemia, observamos que el consumo de fructosa produjo un aumento en los niveles plasmáticos de triglicéridos, siendo más acusado en los descendientes de madres-fructosa que en los de madres control. Es más, la administración conjunta de fructosa y colesterol provocó un incremento más pronunciado en la trigliceridemia que cuando se administró la fructosa sola, y nuevamente el efecto fue más acentuado en los descendientes de madres fructosa. No obstante, ninguno de estos cambios alcanzó valores estadísticamente significativos (Figura 60A). Un perfil similar se observó en los niveles de ácidos grasos no esterificados (NEFA) en plasma (Figura 60B). Esta tendencia a unos niveles incrementados de triglicéridos en plasma asociados al consumo de fructosa y colesterol concuerdan con un aumento significativo de los triglicéridos hepáticos en los machos que tomaron fructosa y colesterol frente a los grupos control y fructosa, no importando el tratamiento materno (Figura 60C).

Capítulo 3

Tabla 22: Expresión génica hepática de genes lipogénicos (SREBP1c, FAS, SCD1, ACYL), de oxidación de ácidos grasos (CPT1), receptores de lipoproteínas (LDLR y SR-B1) y de la síntesis de ácidos biliares (CYP7A1) de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control y madres-fructosa tratados con agua sin aditivos, agua con un 10% (p/v) de fructosa o agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol.

| | MADRES CONTROL | | | | MADRES FRUCTOSA | | | |
|----------------|----------------|------------|----------------------|---|------------------------|-------------|----------------------|---|
| | CONTROL | FRUCTOSA | FRUCTOSA+ COLESTEROL | p | CONTROL | FRUCTOSA | FRUCTOSA+ COLESTEROL | p |
| SREBP1c (u.a.) | 1,80±0,27 | 2,21±0,51 | 4,86±1,10 | *(CvsFCol) p= 0,05 | 1,75±0,23 | 2,10±0,36 | 5,67±1,61 | *(CvsFCol) p= 0,012 *(FvsFCol) p= 0,017 |
| FAS (u.a.) | 16,37±2,81 | 43,87±7,44 | 29,95±6,85 | *(CvsF) p= 0,03 | 25,85±5,16 | 43,91±10,92 | 34,26±10,57 | |
| SCD1 (u.a.) | 1,06±0,14 | 2,24±0,22 | 2,83±0,25 | ** (CvsF) p= 0,01 *** (CvsFCol) p= 0,000 | 1,53±0,32 | 2,74±0,36 | 3,48±0,41 | ** (CvsF) p= 0,01 *** (CvsFCol) p= 0,000 |
| ACYL (u.a.) | 1,13±0,21 | 1,74±0,21 | 0,92±0,15 | | 1,56±0,26 | 2,23±0,41 | 1,45±0,30 | |
| CPT1 (u.a.) | 1,04±0,35 | 0,65±0,13 | 0,84±0,16 | | 0,58±0,12 | 0,60±0,09 | 0,55±0,11 | |
| LDLR (u.a.) | 1,04±0,12 | 0,99±0,12 | 0,68±0,03 | *(CvsFCol) p= 0,05 | 0,95±0,11 | 0,96±0,11 | 0,80±0,08 | |
| SR-B1 (u.a.) | 1,01±0,06 | 0,82±0,06 | 0,78±0,06 | (CvsFCol) p= 0,08 | 0,80±0,08 [#] | 0,87±0,10 | 0,69±0,06 | |
| CYP7A1 (u.a.) | 3,78±1,26 | 1,14±0,26 | 2,73±0,88 | (CvsF) p= 0,054 | 1,96±0,43 | 1,83±0,10 | 3,32±0,57 | |

La expresión génica se determinó por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

La acumulación hepática de triglicéridos observada (Figura 60C) se corresponde con un aumento significativo en la expresión de SREBP1c en los machos que consumieron fructosa y colesterol frente a los controles, no importando la dieta materna (Tabla 22)

Por el contrario, el consumo de fructosa por sí sola no aumenta la expresión de SREBP1c frente al control, llegando incluso en los descendientes de madres-fructosa a observarse un aumento significativo de la expresión en los machos que tomaron fructosa y colesterol frente a los que solo tomaron fructosa (Tabla 22). A pesar de esto, los datos de expresión génica de otras proteínas sugieren que el consumo de fructosa sí que conlleva una aumentada lipogénesis, ya que la expresión de los principales genes lipogénicos (FAS, SCD1 y ACYL) se encuentra aumentada en los machos que tomaron fructosa en comparación con los machos control, llegando a ser significativa en el caso de la SCD1 en descendientes de madres control y fructosa y en la FAS en descendientes de madres control (Tabla 22).

Sorprendentemente, aunque SREBP1c se encuentre sobreexpresado (Tabla 22) y los niveles de triglicéridos en hígado muy aumentados (Figura 60C) en los machos que tomaron fructosa y colesterol, de las 3 enzimas lipogénicas estudiadas únicamente la expresión de la SCD1 se encuentra elevada de forma significativa frente a los machos control y de forma no significativa frente a los que sólo tomaron fructosa, no importando el tratamiento materno (Tabla 22). De hecho, mientras que la FAS en los machos de fructosa y colesterol presenta una expresión similar a los machos que sólo consumieron fructosa, la ACYL muestra unos valores próximos a la de los machos control tanto en los descendientes de madres control como en los de madres-fructosa (Tabla 22). Por otro lado, la expresión de la CPT1, enzima que interviene en

el transporte de ácidos grasos necesario para la β -oxidación, muestra una tendencia a la disminución en los machos descendientes de madres control que tomaron fructosa y los que tomaron fructosa y colesterol frente a los controles (Tabla 22). También se observa que el consumo materno de fructosa durante la gestación conduce a una tendencia a la reducción de la expresión de la CPT1 en todos sus descendientes, no importando el tratamiento posterior (Tabla 22).

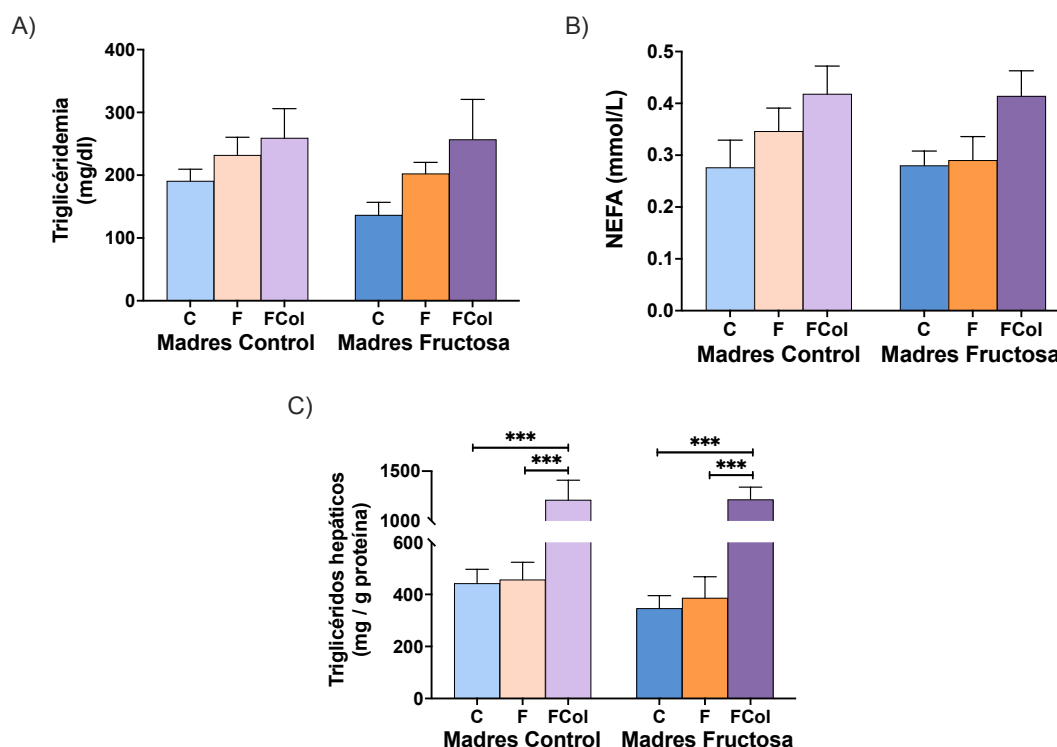


Figura 60: Trigliceridemia (A), niveles plasmáticos de NEFA (B) en plasma y concentración de triglicéridos hepáticos (C) de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, gráficas en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) o agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. NEFA: Ácidos grasos no esterificados.

Dentro de los posibles mecanismos que presenta el organismo para deshacerse del exceso de colesterol está su transformación hepática en ácidos biliares, su salida junto con dichas sales biliares en la bilis y posterior eliminación intestinal y la excreción transintestinal de colesterol (del inglés: TICE: *transintestinal cholesterol excretion*) (Figura 61) (Grefhorst et al., 2019). Dada la elevada acumulación hepática de colesterol (Figura 58B) y de triglicéridos (Figura 60C) observada en los animales alimentados con fructosa y colesterol, nos planteamos conocer si alguno de estos mecanismos se encontraba alterado en este modelo experimental.

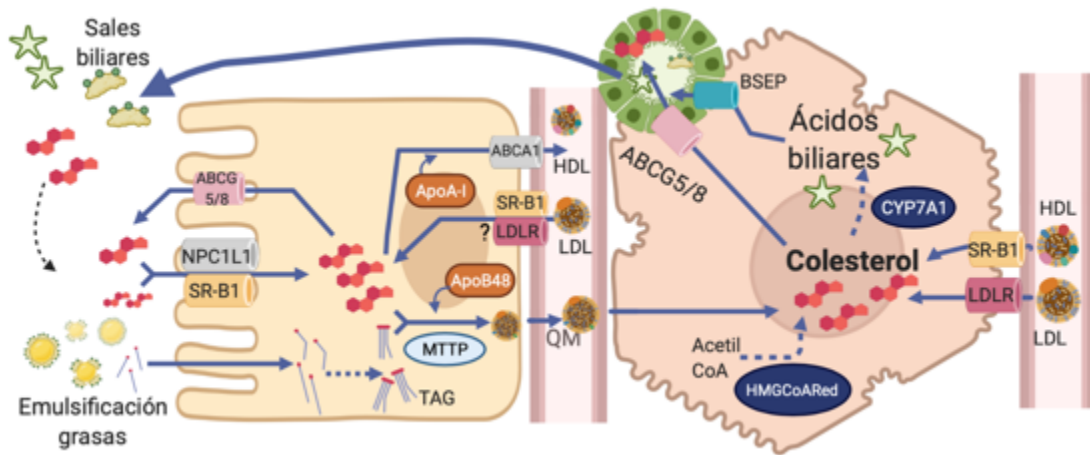


Figura 61: Mecanismos que presenta el organismo para deshacerse de los excesos de colesterol: transformación hepática en ácidos biliares, salida junto con dichas sales biliares en la bilis y posterior eliminación intestinal y la excreción transintestinal de colesterol (del inglés: TICE: *transintestinal cholesterol excretion*). Imagen realizada con BioRender (disponible en: www.biorender.com).

Así con el fin de estudiar cómo estaba afectada la vía de transformación de colesterol en ácidos biliares, medimos el contenido hepático de ácidos biliares y encontramos que baja significativamente en los animales que consumieron fructosa y colesterol frente a los grupos control y fructosa (Figura 62A). Este descenso es mucho más acusado en los descendientes de madres-fructosa que en los de madres control (Figura 62A). La reducida concentración de ácidos biliares en el hígado podría ser debida a una mayor eliminación por bilis de estos ácidos biliares y, de hecho, los ácidos biliares en heces de los animales que consumieron fructosa y colesterol se encuentran aumentados, alcanzando valores significativos frente al grupo fructosa en los descendientes de madres control y frente al grupo control en los descendientes de madres-fructosa (Figura 62B). Otra proteína que podría ayudar a explicar los resultados observados, tanto en la concentración de colesterol como en el contenido hepático de ácidos biliares es la CYP7A1, principal enzima encargada de utilizar colesterol para llevar a cabo la síntesis hepática de ácidos biliares. Sin embargo, los datos de expresión de este gen y la concentración de ácidos biliares en hígado no parecen corresponder. Así, se observa en los machos descendientes de madres control que los animales que tomaron fructosa y colesterol presentaron unos valores similares al grupo control y los animales que sólo tomaron fructosa experimentaron una reducción casi significativa frente a los machos control (Tabla 22). En los descendientes de madres-fructosa, la expresión de CYP7A1 tiende a aumentar en los machos que consumieron fructosa y colesterol frente a los grupos control y fructosa (Tabla 22).

Otra vía que estudiamos fue la salida del colesterol hacia la bilis y en concordancia con estudios anteriores, observamos que, el consumo de fructosa conduce a una reducción de la expresión de ABCG5, transportador implicado en la salida de colesterol hacia los canalículos biliares, que es significativa en el caso de los descendientes de madres control y casi significativa ($p=0,064$) en los de madres-fructosa (Figura 63). Cuando además de fructosa se administra una dieta con colesterol, se observa también una la reducción significativa de la

expresión frente a los machos control en los descendientes de madres control, mientras que no se encontraron diferencias en los machos descendientes de madres-fructosa (Figura 63).

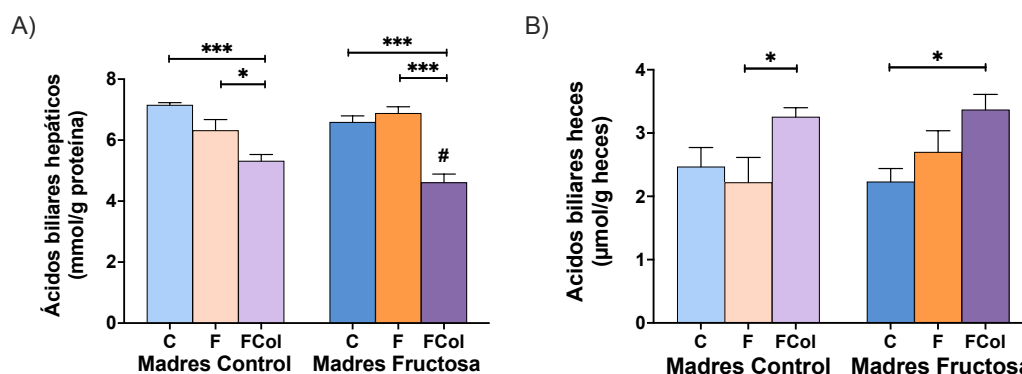


Figura 62: Concentración de ácidos biliares hepáticos (A) y en heces (B) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). Los datos se expresan como media ± error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

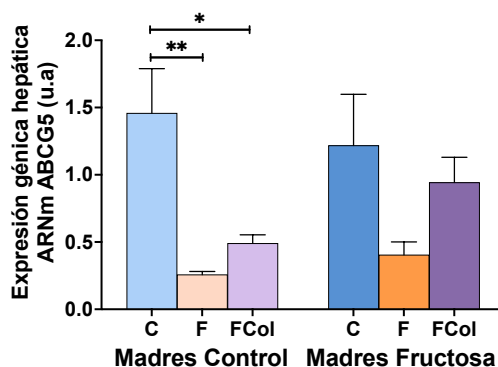


Figura 63: Expresión génica hepática de ABCG5 en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). La expresión génica ha sido determinada por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los datos se expresan como media ± error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. ABCG5: *ATP binding cassette G5*.

El intestino juega un papel fundamental en el manejo de los niveles de colesterol no sólo por su implicación en la absorción desde la luz intestinal, sino también por su salida a la misma desde los enterocitos (Figura 61). De esta manera, el principal transportador encargado en la

absorción intestinal de colesterol, NPC1L1 (del inglés: *Niemann-Pick C1-Like 1*) no muestra diferencias significativas entre ninguno de los grupos estudiados, aunque sí que aparece una tendencia a una menor expresión en los descendientes de madres control que tomaron fructosa y colesterol frente a los machos control y fructosa (Figura 64A). Sorprendentemente, otro transportador que se ha relacionado con la absorción intestinal de colesterol, SR-B1, se encuentra sobreexpresado en los descendientes de madres control que consumieron fructosa, mientras que en los descendientes de madres-fructosa no aparecen cambios asociados al consumo de fructosa frente al grupo control (Figura 64B). A diferencia de lo que ocurría con NPC1L1 (Figura 64A), el consumo de fructosa y colesterol en machos descendientes de madres control provoca una tendencia a aumentar la expresión de SR-B1 (Figura 64B). Este incremento se observa también, y de manera significativa, en los descendientes de madres-fructosa que tomaron fructosa y colesterol frente a los grupos control o fructosa (Figura 64B).

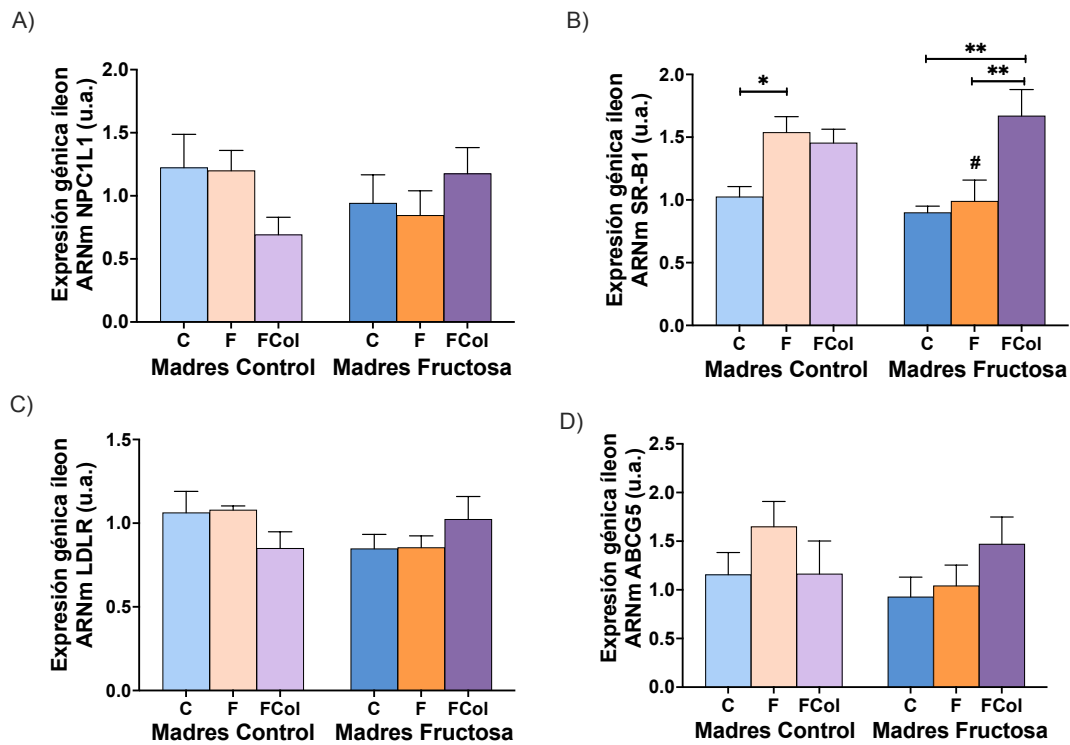


Figura 64: Expresión génica en íleon de los transportadores implicados en la absorción intestinal de colesterol: NPC1L1 (A) y SR-B1 (B), y el transporte transintestinal de colesterol (TICE): LDLR (C) y ABCG5 (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). La expresión génica ha sido determinada por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. NPC1L1: *Niemann-Pick C1-Like 1*; SR-B1: *Scavenger receptor class B type 1*; LDLR: Receptor de lipoproteínas de baja densidad; ABCG5: *ATP binding cassette G5*.

Aunque no se conocen los transportadores exactos implicados en el TICE, se cree que juegan un papel fundamental el LDLR (Figura 64C) y ABCG5 (Figura 64D), el primero encargado de transportar el colesterol del torrente sanguíneo al íleon y el segundo de su salida a la luz intestinal (Figura 61) (Grefhorst et al., 2019). Sin embargo, ninguno de los dos transportadores presenta diferencias significativas en su expresión en ninguno de los grupos estudiados. Además, la disminución en ABCG5 asociada al consumo de fructosa que se ve en el hígado (Figura 63) no aparece en el íleon (Figura 64D). De hecho, los descendientes de madres control que tomaron fructosa y los descendientes de madres-fructosa que tomaron fructosa y colesterol tienden a aumentar la expresión de ABCG5 en el íleon (Figura 64D).

La dieta estándar de rata utilizada en el presente diseño experimental no contiene colesterol (Tabla 3), por lo que el colesterol presente en las heces de los grupos de machos control y fructosa proviene del colesterol eliminado por bilis o el TICE y que no ha vuelto a ser reabsorbido a nivel intestinal. Como se puede ver en la Figura 65A, no aparecen diferencias en el contenido de colesterol en heces entre los grupos control y fructosa, independientemente del tratamiento materno. En cambio, al administrar una dieta con fructosa y un 2% de colesterol (Tabla 4) la concentración de colesterol en heces aumenta muy significativamente frente a los grupos control y fructosa (Figura 65A). Sorprendentemente, los machos descendientes de madres-fructosa que consumen fructosa y colesterol, aunque ingieren algo menos de dieta sólida que los descendientes de madres control (Figura 52B), presentan un contenido mayor de colesterol en heces que los de madres control (Figura 65A). De manera paralela, y posiblemente relacionado con los datos de colesterol en heces, la concentración de colesterol en el íleon muestra un aumento casi significativo ($p=0,089$) en los descendientes de madres-fructosa frente a los procedentes de madres control (Figura 65B). Es más, mientras que no aparecen diferencias entre los tres grupos descendientes de madres control, en los descendientes de madres-fructosa se observa un aumento significativo en el contenido de colesterol en el íleon en los machos que tomaron fructosa y colesterol frente a los machos que tomaron agua sin aditivos (Figura 65B).

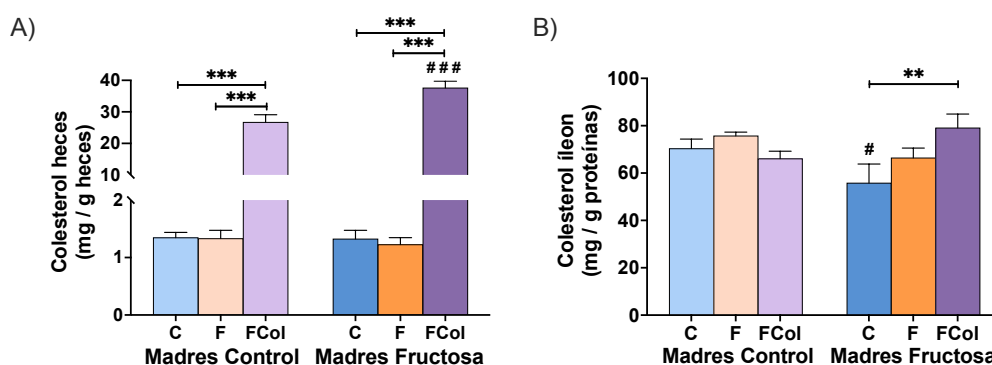


Figura 65: Contenido de colesterol en heces (A) e íleon (B) de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) o agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

4. Discusión

En el presente estudio, el consumo de fructosa en machos jóvenes condujo a un aumento en la ingesta de bebida y una reducción en la comida sólida que, sin embargo, no fue capaz de contrarrestar una mayor ingesta calórica provocada por la ingesta de fructosa (Figura 51 y 52). Esto concuerda con lo descrito anteriormente en estudios realizados en ratas alimentadas con fructosa (Miranda et al., 2019; Rebollo et al., 2014). Sorprendentemente, el porcentaje de kilocalorías totales procedente de la fructosa es superior en estos animales al registrado en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación (Capítulo 1 de la presente tesis doctoral) (Fauste et al., 2020c) y por otros autores (Rebollo et al., 2014; Vilà et al., 2011). Estas diferencias pueden ser debidas a la edad de los animales, ya que, en este caso, se han usado ratas jóvenes de 3 meses de edad. De hecho, se ha descrito que la administración de una solución de sacarosa al 10% a 2 grupos de ratas de diferente edad, condujo a un incremento significativo de la cantidad de sacarosa ingerida por las jóvenes comparado con las adultas (Wilmouth & Spear, 2009). Es de resaltar que el consumo de bebidas azucaradas y azúcares simples es mayoritario entre niños y adolescentes en comparación con los adultos en estudios realizados en varios países (Amoutzopoulos et al., 2020; Rosinger et al., 2017; Ruiz et al., 2017). Además, la adolescencia es un periodo donde es más susceptible la aparición de adicciones y, de hecho, se ha constatado que el consumo de bebidas azucaradas produce adicción en este grupo de población (Falbe et al., 2019). Sorprendentemente, en el presente estudio, los machos descendientes de madres-fructosa que consumieron fructosa con o sin dieta rica en colesterol disminuyen la ingesta de líquido frente a sus homólogos descendientes de madres control (Figura 52A). A pesar de esto, las kilocalorías procedentes de la fructosa suponen en todos los casos un porcentaje entre un 40% y un 50% de la ingesta calórica total. Sin embargo, este mayor consumo de kilocalorías asociadas al consumo de fructosa con o sin colesterol durante 21 días, no supone cambios en el incremento de peso de los animales, no importando el tratamiento materno (Figura 52D), tal y como ha sido descrito previamente por otros autores en modelos animales con dietas ricas en fructosa (Roglans et al., 2007).

Inesperadamente, los animales a los que se les administró agua suplementada con tagatosa redujeron la cantidad de líquido ingerido frente a los animales que tomaron agua con fructosa (Figura 51A), posiblemente, porque el poder edulcorante de la tagatosa es próximo al de la sacarosa (0,9) y no tan elevado como el de la fructosa (1,7) (Roy et al., 2018; Tappy & Lê, 2010). Esto, asociado al hecho de que la tagatosa aporta aproximadamente 1,5 Kcal/g, en lugar de las 4 Kcal/g que aporta la fructosa (Roy et al., 2018), hace que se produzca un descenso de las kilocalorías totales ingeridas en los animales que consumieron tagatosa, así como una disminución en el incremento de peso de los animales en comparación con los que consumieron fructosa (Figura 51C y D), de la misma manera que han reportado otros autores (Durante et al., 2021; Police et al., 2009). No obstante, esto no se reflejó en el peso corporal final, que no varió entre los diferentes grupos experimentales.

La capacidad de la fructosa para inducir un aumento de los niveles de triglicéridos plasmáticos y hepáticos ha sido ampliamente descrita en la bibliografía tanto en animales de experimentación como en humanos (Lanaspa et al., 2012a; Rebollo et al., 2014; Stanhope et al., 2011). En el presente diseño experimental, el consumo de fructosa provocó una tendencia

al aumento de la trigliceridemia en los descendientes de madres control y fructosa, aunque el contenido de triglicéridos en hígado no se encontró alterado frente al grupo control (Figura 53A y B). Sorprendentemente, el consumo de tagatosa condujo a una elevación de la trigliceridemia similar a la provocada por la fructosa (Figura 53A), incluso aunque la ingesta de tagatosa en el agua de bebida fuera significativamente menor a la de fructosa en los descendientes de madres control y fructosa (Figura 51A). El efecto de los azúcares raros, como la tagatosa, en el metabolismo de lípidos, está escasamente descrito en la bibliografía. De hecho, hay autores que han visto que el consumo de tagatosa no consigue aumentar la trigliceridemia de una manera tan acusada como lo hacen otros carbohidratos tales como la fructosa o la sacarosa (Durante et al., 2021; Police et al., 2009). En cambio, en otros estudios han demostrado cómo el consumo de tagatosa consigue aumentar la trigliceridemia, exclusivamente en ratas macho, de una manera dependiente a la dosis administrada (Kruger et al., 1999). Curiosamente, en el presente estudio, la concentración de triglicéridos hepáticos tiende a ser mayor en los descendientes de madres-fructosa que tomaron tagatosa comparado con el grupo control y fructosa (Figura 53B) lo que implicaría una mayor acumulación hepática de triglicéridos. En nuestro conocimiento, no existen estudios hasta el momento que hayan evaluado el efecto del consumo de tagatosa en descendientes de madres que tomaron fructosa en la gestación. Sin embargo, en los descendientes de madres control, no observamos este efecto sobre los triglicéridos hepáticos. De acuerdo a este último hallazgo, Nagata y col. han observado cómo ni la tagatosa ni la fructosa añadidas a una dieta sólida conducen a cambios en los triglicéridos hepáticos (Nagata et al., 2018). Estos resultados sugieren que la dieta materna con fructosa en la gestación podría agravar las alteraciones en el metabolismo de triglicéridos asociadas al consumo de tagatosa.

Por otro lado, observamos que, aunque la fructosa no modificó la colesterolemia ni en los descendientes de madres control ni fructosa, la tagatosa provocó una clara hipercolesterolemia en los descendientes de madres control (Figura 53C). Otros autores también han descrito efectos similares sobre la colesterolemia asociados al consumo de tagatosa en animales de experimentación comparado con animales que recibieron una dieta estándar (Police et al., 2009). En el presente trabajo, ni el consumo de tagatosa ni el de fructosa condujeron a cambios en la concentración de colesterol hepático, no importando el tratamiento materno (Figura 53D). La ausencia de diferencias en los niveles de colesterol tanto en plasma como en hígado tras el consumo de fructosa ha sido previamente descrita por nosotros y otros autores, tanto en descendientes de madres control como de madres-fructosa (Fauste et al., 2020; Hutter et al., 2015).

Se ha demostrado que los efectos sobre la trigliceridemia asociados al consumo de fructosa son debidos a la capacidad de este carbohidrato para activar la lipogénesis, reducir el catabolismo de lípidos y favorecer la formación de VLDL en el hígado, promoviendo así una hipertrigliceridemia y esteatosis hepática (Hutter et al., 2015; Rebollo et al., 2014; Taghibiglou et al., 2000). De hecho, en el presente modelo experimental, aunque el aumento de la trigliceridemia asociada al consumo de fructosa no llegó a ser significativo, puede observarse cómo los machos que consumieron fructosa presentaron un aumento en la expresión de los principales genes lipogénicos frente a los machos control, no importando el tratamiento de la madre (Tabla 21). Sorprendentemente, el consumo de tagatosa no condujo al aumento en la

expresión de ninguno de estos genes e, incluso, aparece una tendencia a una mayor expresión de la enzima implicada en el catabolismo de ácidos grasos, la CPT1 (Tabla 21), de manera similar a lo descrito previamente por otros autores utilizando dietas sólidas con tagatosa (Nagata et al., 2018). Como consecuencia, el mecanismo por el cual la ingesta de tagatosa y de la fructosa conducen a una elevación similar de la trigliceridemia tanto en descendientes de madres control y fructosa, así como a un acúmulo hepático de triglicéridos en los machos de madres-fructosa que tomaron tagatosa, parece no ser el mismo en ambos carbohidratos.

Las alteraciones intestinales, tales como flatulencias, dolor intestinal y náuseas, derivadas del consumo de tagatosa han sido ampliamente estudiadas en la bibliografía, y se han asociado a la mala capacidad de absorción de este azúcar, lo que favorece su metabolismo por la microbiota intestinal (Boesch et al., 2001; Buemann et al., 1999; Roy et al., 2018). Por esa razón, decidimos estudiar si a nivel intestinal el consumo de tagatosa producía alguna alteración asociada al metabolismo de lípidos que pudiera explicar los efectos observados en el plasma que no se correspondían con el metabolismo lipídico a nivel hepático.

Los ácidos biliares son moléculas generadas en el hígado a partir del colesterol que se liberan a los canalículos biliares donde forman la bilis, la cual favorece la absorción de las grasas de la dieta en el intestino (Zhou & Hylemon, 2014). Sorprendentemente, los ácidos biliares se encuentran aumentados en las heces de los machos descendientes de madres-fructosa que tomaron tagatosa frente a sus homólogos de madres control y este efecto resultó ser similar al observado en su contenido en hígado (Figura 54). Esto podría sugerir una menor reabsorción de estos ácidos biliares asociados al consumo de tagatosa en descendientes de madres-fructosa, pero todos los genes implicados en la reabsorción intestinal de ácidos biliares se encuentran sobreexpresados en este grupo experimental (Figura 55). Además, encontramos un aumento significativo de los niveles de ácidos biliares en plasma de los descendientes de madres-fructosa que tomaron tagatosa comparado con el grupo control (Figura 56). Como consecuencia, el consumo de tagatosa en machos descendientes de madres-fructosa parece estar provocando una mayor circulación enterohepática de ácidos biliares. Y este hecho podría estar favoreciendo una mayor absorción de lípidos de la dieta, como ha sido ya previamente descrito con dietas ricas en grasa (J. Huang et al., 2018). De hecho, los niveles de triglicéridos en heces en los machos de madres-fructosa que tomaron tagatosa fueron menores que en los machos control (Figura 57B), lo cual no puede achacarse a diferencias en la ingesta sólida de ambos grupos (Figura 51A) dado que el contenido de lípidos totales o de colesterol en heces no se veían modificados de igual manera (Figura 57B y C). En cambio, en los descendientes de madres control no aparecen estas diferencias en los triglicéridos en heces en los grupos fructosa y tagatosa frente al grupo control (Figura 57A). La ausencia de diferencias *versus* el grupo control en el contenido de triglicéridos en heces de animales descendientes de madres control y tratados con fructosa o tagatosa ha sido previamente descrita (Nagata et al., 2018). Es necesario resaltar que esta es la primera vez que se observa como únicamente los descendientes de madres-fructosa que toman tagatosa presentan un disminuido contenido de triglicéridos en heces asociado a un aumento en la concentración de ácidos biliares y su recaptación intestinal. Apoyando estos resultados encontramos que la MTTP, proteína encargada de ensamblar la Apoproteína B48 con los lípidos intestinales para formar quilomicrones, se encuentra significativamente aumentada en el grupo que tomó tagatosa

descendiente de madres-fructosa (Figura 57D). Aumentos en la expresión de MTTP se han relacionado con una mayor liberación postprandial de quilomicrones, lo que se ha asociado a su vez con aumentos en la trigliceridemia y en la acumulación hepática de lípidos asociados al consumo de fructosa en hámster (Haidari et al., 2002). De hecho, animales que no expresan MTTP en el intestino y son sometidos a una dieta rica en fructosa consiguen no presentar esteatosis hepática, a pesar de que la expresión de los principales genes lipogénicos en hígado sí que se encuentra aumentada por el consumo de fructosa (Xie et al., 2019).

En relación con el metabolismo del colesterol, tal y como se ha explicado anteriormente, la fructosa por sí sola no modificó ni la colesterolemia ni el contenido hepático de colesterol comparado con el grupo control sin importar la dieta materna (Figura 58). Aunque en algunos trabajos se ha descrito que el consumo de fructosa conduce a cambios en los niveles de colesterol plasmático y hepáticos (Lanaspa et al., 2012a), nosotros y otros autores no hemos observado previamente alteraciones en los niveles de colesterol asociadas al consumo de fructosa, ni tampoco en descendientes de madres-fructosa sometidos a una dieta con fructosa en la edad adulta (Alzamendi et al., 2016; Baena et al., 2017; Fauste et al., 2020c; Hutter et al., 2015) (Capítulo 1 de la presente Tesis Doctoral). Aunque no hay cambios en el colesterol total, los machos descendientes de madres-fructosa que tomaron fructosa sí que muestran una tendencia a unos reducidos niveles de colesterol en HDL (Figura 59B), lo que provoca, junto con una ligeramente mayor trigliceridemia (Figura 60A), que el índice aterogénico de estos animales sea significativamente mayor al de las ratas control descendientes de madres que tomaron fructosa (Figura 59D). De manera paralela, de Castro y col. han observado en ratas macho jóvenes cómo los niveles de colesterol total asociados al consumo de fructosa no se ven modificados, pero los niveles de colesterol en HDL sí que aparecen reducidos (de Castro et al., 2013). En consecuencia, es posible que exista un mayor riesgo de aterosclerosis asociado al consumo de fructosa de la descendencia cuando las madres tomaron fructosa durante la gestación.

Las ratas son animales resistentes al desarrollo de aterosclerosis debido a que la mayoría del colesterol plasmático se encuentra en forma de HDL, tienen una elevada capacidad de transformar el colesterol a ácidos biliares y no presentan en plasma la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP, del inglés: *Cholesteryl ester transfer protein*). Por ello, sólo se consigue provocarles dislipemia con dietas altas en colesterol y/o grasa que contengan ácido cólico (Xiangdong et al., 2011). Sorprendentemente, y a pesar de que la dieta con un 2% de colesterol administrada a los animales no contenía ácido cólico (Tabla 4), los machos descendientes de madres control y fructosa a los cuales se les administró una dieta con colesterol y agua suplementada con fructosa presentan una muy marcada hipercolesterolemia (Figura 58A), acumulación hepática de colesterol (Figura 58B), elevados valores de colesterol no-HDL (Figura 59A) y disminuidos de colesterol en HDL (Figura 59B). De hecho, muchos estudios han observado resultados similares en dietas ricas en colesterol, pero sin fructosa, en las que en todos los casos se les ha suplementado con ácido cólico en la dieta (Suanarunsawat et al., 2011; Wang et al., 2011; Xie et al., 2011). En cambio, parece que cuando se administra una dieta rica en fructosa y colesterol, aparece una acumulación de colesterol en plasma y un perfil más proaterogénico en rata sin necesidad de la adición de ácido cólico (Collino et al., 2010; Deng et al., 2007; Donaldson et al., 2019). Es más, los índices aterogénicos se

Capítulo 3

encuentran significativamente aumentados en los machos de madres control y fructosa que tomaron fructosa y colesterol (Figura 59 C y D), lo cual indicaría un mayor riesgo de sufrir aterosclerosis.

La dislipemia asociada con relación a los niveles de colesterol y al consumo de fructosa y colesterol se confirma en estos animales al observarse también unos aumentados niveles de triglicéridos y NEFA en sangre frente a los machos que tomaron sólo fructosa y sobre todo frente a los machos control, independientemente de la dieta materna (Figura 60A y B). Además, muestran una muy marcada acumulación de triglicéridos en hígado que conduce a esteatosis hepática (Figura 60C), tal y como se ha descrito en estudios previos (Collino et al., 2010; Donaldson et al., 2019). Estos resultados pueden sorprender en un principio, ya que el organismo no es capaz de degradar el colesterol a acetilCoA para generar posteriormente triglicéridos (Nelson et al., 2008), pero se ha demostrado que el colesterol es uno de los principales causantes de hígado graso no alcohólico y dislipemia debido a su capacidad de activar el eje LXR-SREBP1c (Nakamuta et al., 2009). De hecho, los animales que consumieron fructosa y colesterol presentan una sobreexpresión de SREBP1c en hígado frente a los machos control y fructosa independientemente de lo que hubieran tomado sus madres (Tabla 22). Este efecto sobre SREBP1c ha sido descrito en pacientes con hígado graso no alcohólico (Nakamuta et al., 2009) y en ratas sometidas a una dieta rica en colesterol, grasa y fructosa (Aragno et al., 2009; Baena et al., 2017), pero, en nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se describe cuando el consumo es exclusivo de fructosa y colesterol. En consecuencia, y aunque la fructosa *per se* es capaz de activar los principales genes lipogénicos (Tabla 22), este efecto aparece también, e incluso se agrava, al asociar a la fructosa una dieta rica en colesterol. Estos efectos podrían ser consecuencia de un mecanismo compensatorio dirigido a evitar la toxicidad del colesterol libre generando ésteres de colesterol (Nakamuta et al., 2009).

El correcto mantenimiento de los niveles de colesterol en el organismo es fundamental para prevenir los efectos de su potencial toxicidad y capacidad proaterogénica, por lo que el organismo ante una situación de exceso de colesterol recurre a varios mecanismos compensatorios, tales como su transformación en ácidos biliares y su eliminación, ya sea a través de la bilis (como tal o como ácidos biliares) o bien a través del TICE (Grefhorst et al., 2019). Así, alteraciones en estos mecanismos conllevan una acumulación de colesterol en el organismo que se ha relacionado muy estrechamente con el desarrollo de hígado graso no alcohólico (Enjoji et al., 2012).

En cuanto a la transformación del colesterol en ácidos biliares en el hígado (Chiang & Ferrell, 2019), de acuerdo a lo que han descrito previamente otros autores en modelos animales suplementados con dietas ricas en grasa (La Frano et al., 2017; Okushin et al., 2020), los machos que consumieron fructosa, presentan un disminuido contenido hepático de ácidos biliares, siendo este efecto más acusado en los descendientes de madres-fructosa (Figura 62A). Esto contrasta con el hecho de que la expresión de la principal enzima hepática implicada en la síntesis de ácidos biliares (CYP7A1) tiende a estar aumentada tras el consumo de fructosa y colesterol en los descendientes de madres-fructosa (Tabla 22), pero es posible que lo que esté sucediendo es que se estén eliminando los ácidos biliares en mayor medida por heces. De hecho, los niveles de ácidos biliares en heces aumentan en estos grupos frente a los dos otros no importando la dieta materna (Figura 62B). Este efecto sobre los ácidos biliares en heces ha

sido previamente descrito, pero utilizando dietas ricas en grasa (Murakami et al., 2016; Pierre et al., 2016). De hecho, se ha demostrado como el bloqueo parcial de BSEP, implicado en la salida de los ácidos biliares a los canalículos biliares, consigue reducir la esteatosis producida por una dieta rica en grasa (Okushin et al., 2020). Es posible, que en los animales del presente estudio tenga lugar un círculo que se retroalimenta en el cual la dieta con colesterol favorece la eliminación de ácidos biliares al intestino, en un intento de eliminar el colesterol, pero estos ácidos biliares facilitan a su vez en el intestino una mayor absorción de lípidos de la dieta.

Por otro lado, diversos autores han demostrado como la eliminación del colesterol por el intestino también puede verse alterada por el consumo de azúcares o dietas ricas en grasa (Apro et al., 2015; Pang et al., 2021). La salida del colesterol desde el hígado hacia los canalículos biliares esta mediada por el heterodímero ABCG5/ABCG8. Nosotros y otros autores hemos visto cómo la expresión hepática de estos genes se encuentra disminuida por el consumo de azúcares, tales como la sacarosa y la fructosa asociados o no a una dieta rica en grasa (Apro et al., 2015; Briand et al., 2012; Rodrigo et al., 2018). Este mismo efecto se observa en el presente modelo experimental en los descendientes de madres control y fructosa que consumieron fructosa (Figura 63). Es más, esta reducida expresión de ABCG5 se aprecia también tras la ingesta conjunta de colesterol y fructosa en los descendientes de madres control, pero resulta curioso que ya no se observa en los descendientes de madres-fructosa (Figura 63). Esto podría indicar que estos animales son capaces de eliminar colesterol en mayor medida hacia las heces y, de hecho, el contenido de colesterol en heces en los descendientes de madres-fructosa que consumieron fructosa y colesterol es significativamente mayor que en los de madres control (Figura 65A).

Con el fin de valorar los efectos de la administración de fructosa y colesterol sobre la ruta del TICE, determinamos la expresión en el intestino de 2 de las proteínas implicadas, ABCG5 y LDLR (Grefhorst et al., 2019). Así, en el íleon encontramos un perfil de expresión de ABCG5 diferente al observado en el hígado, tal y como Apro y col. han visto previamente utilizando dietas ricas en sacarosa (Apro et al., 2015). Pudimos comprobar además que este mecanismo no parece encontrarse alterado en nuestro modelo, dado que no observamos cambios en la expresión ni en ABCG5 ni en LDLR (Figura 64). El efecto de las dietas ricas en grasa y/o fructosa sobre el TICE sigue siendo controvertido, ya que hay autores que no han observado diferencias (Pang et al., 2021), mientras que otros han visto una incrementada excreción de colesterol mediante esta vía (Briand et al., 2012; van der Velde et al., 2008). Aunque, sorprendentemente, se ha demostrado como una dieta rica exclusivamente en colesterol parece no conducir a cambios en el TICE (van der Velde et al., 2008).

Finalmente, evaluamos la capacidad del intestino para absorber colesterol. Tradicionalmente, el transportador implicado en este mecanismo ha sido NPC1L1, sin embargo, en el presente estudio, no se encuentra modificada su expresión ni tras el consumo de fructosa por sí sola ni de fructosa asociada a una dieta rica en colesterol (Figura 64A). Además, en los últimos años se ha estudiado la implicación de SR-B1 en la absorción de colesterol, aunque con cierta controversia, ya que se ha descrito que su sobreexpresión parece aumentar la absorción de colesterol (Bietrix et al., 2006), pero sin embargo su inhibición no la reduce (Mardones et al., 2001). Curiosamente, el consumo de fructosa se ha relacionado en varios trabajos con una mayor expresión de este transportador en intestino, así como con una

Capítulo 3

mayor producción y liberación de quilomicrones (Haidari et al., 2002; Hayashi et al., 2011; Lino et al., 2015). De acuerdo con esto, en el presente modelo experimental, el consumo de fructosa en los descendientes de madres control conduce a una sobreexpresión de SR-B1, pero en los descendientes de madres-fructosa este efecto no se produce (Figura 64B). En cambio, cuando se administra fructosa y colesterol la expresión de SR-B1 aumenta no importando el tratamiento materno. No obstante, como también se ha descrito la presencia de SR-B1 en el lado basolateral del enterocito (Figura 61), mediando la entrada de colesterol desde el plasma al enterocito, no podemos discernir claramente cuál es el papel de los resultados aquí encontrados en la expresión de este transportador sobre la absorción o excreción intestinal de colesterol (van der Wulp et al., 2013).

En conclusión, la fructosa es capaz de favorecer una mayor lipogénesis hepática, lo cual conduciría a un incremento de la trigliceridemia, este efecto en la trigliceridemia. Por otro lado, el aumento observado en la trigliceridemia asociado al consumo de tagatosa no parece atribuirse a una mayor síntesis hepática de triglicéridos. Este efecto, en el caso de los descendientes de madres-fructosa, puede ser debido a una mayor recirculación enterohepática de ácidos biliares y una mayor reabsorción intestinal triglicéridos, que favorecería la acumulación hepática de triglicéridos y una mayor trigliceridemia. En cuanto al consumo de fructosa y una dieta rica en colesterol, la dislipemia se encuentra muy agravada en comparación con el consumo exclusivo de fructosa debido, entre otros factores a una elevada lipogénesis. Además, estos animales presentan una mayor eliminación de ácidos biliares al intestino, lo cual, unido posiblemente a una mayor absorción intestinal de colesterol, favorecería la absorción de lípidos de la dieta, agravando la dislipemia. Curiosamente, aunque los descendientes de madres-fructosa consuman algo menos de ingesta sólida y presentan mayor cantidad de colesterol en heces, su hipercolesterolemia y acumulación hepática de colesterol no difería de los hijos de madres control.

Capítulo 4: El consumo de colesterol acentúa la
disminución mediada por la fructosa en la
producción de H₂S, específicamente en el hígado.

1. Introducción

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es un gas tóxico con olor a huevos podridos que ha mostrado poseer actividad como gasotransmisor (Wang, 2002). Sorprendentemente, tejidos como el hígado, el intestino, el cerebro, el riñón y el tejido adiposo son capaces de generar H_2S en la ruta de la transulfuración (Feng et al., 2009; Kabil et al., 2011; Zhao et al., 2003). Las enzimas encargadas de esta ruta son: la cistationina γ -liasa (CSE), la cistationina β -sintasa (CBS) y la 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa (3MST) y su función es la transformación de homocisteína en cisteína y H_2S (Kabil et al., 2011; Predmore et al., 2012). De entre todos los tejidos, el hígado es el que presenta mayor capacidad de producción de H_2S y se cree que es el que se encarga principalmente de mantener los niveles circulantes constantes del gasotransmisor (Zhao et al., 2003). La CSE y la CBS, principales enzimas de la ruta, presentan una expresión y actividad diferentes en función del tejido, siendo la CSE la principal enzima encargada de la ruta en el hígado, riñón, intestino y tejido adiposo (Fang et al., 2009; Fiorucci et al., 2005; Kabil et al., 2011), mientras que la CBS lo es en el cerebro (Kabil et al., 2011; Zhao et al., 2003).

La concentración de H_2S en plasma y en los diversos tejidos debe estar estrictamente controlada dentro de unos valores óptimos, ya que a altas concentraciones, el H_2S inhibe la cadena respiratoria, generando efectos tóxicos (Bouillaud & Blachier, 2011). De esta manera, la CBS presenta una regulación a nivel postraduccional, mientras que la CSE tiene un control más complejo a distintos niveles (Figura 17) (Sbodio et al., 2019). Esta regulación está mediada por diversos factores de transcripción como son: Nrf2 (Hassan et al., 2012), Sp1 (Zhang et al., 2011), FXR (Renga et al., 2009), ATF4 (Harding et al., 2003) y NFAT (Bosc et al., 2017). Además, se han descrito regulaciones a nivel epigenético, tanto en la metilación del promotor (Giannakopoulou et al., 2017) como en la acción de diversos miARN, como miR-30 (Shen et al., 2015b), miR-21 (Cindrova-Davies et al., 2013) y miR-22 (L. Wang et al., 2015). A nivel postraduccional la CSE se activa en situaciones de estrés oxidativo, estrés del retículo e inflamación (Sbodio et al., 2019).

El efecto del H_2S sobre las alteraciones cardiovasculares fue uno de los primeros descritos para esta molécula señal (Shen et al., 2015b). Así, este gasotransmisor presenta una acción vasodilatadora, proangiogénica y cardioprotectora tras un fallo cardíaco (Wu et al., 2018). En los últimos años, además, se ha descrito que disminuciones en los niveles de H_2S y en la actividad enzimática de la CSE y CBS se han relacionado con otras patologías tales como la diabetes tipo 2, la resistencia a la insulina, la hipertensión y la obesidad tanto en pacientes como en animales de experimentación (Jain et al., 2010; Sun et al., 2007; Suzuki et al., 2017; Whiteman et al., 2010). Sin embargo, existen discrepancias en la comunidad científica en cuanto al papel beneficioso del H_2S en relación con la resistencia a la insulina y el desarrollo de la obesidad. Así, algunos autores han descrito cómo este gasotransmisor empeora la progresión de la resistencia a la insulina (Feng et al., 2009; Gheibi et al., 2019) y estimula la adipogénesis (Cai et al., 2016), mientras que otros han observado efectos opuestos (Bitar et al., 2018; Velmurugan et al., 2015; Xue et al., 2013). Por otro lado, el H_2S es capaz de reducir el

Capítulo 4

estrés oxidativo por activación de Nrf2 (Xie et al., 2016) reduciendo así las complicaciones asociadas a nivel cardiovascular y hepático (Padiya et al., 2014; D. Wu et al., 2015).

La resistencia a la insulina, la hipertensión, la obesidad y las alteraciones cardiovasculares son alteraciones características del síndrome metabólico según la definición armonizada (Unger et al., 2019). Todas ellas se engloban dentro de lo que se conoce como enfermedades no transmisibles, y se ha establecido que constituyen la principal causa de muerte en el mundo según la OMS (WHO, 2019). Relacionado con todo esto, la dieta es un factor fundamental en el desarrollo de las patologías asociadas al síndrome metabólico. Estudios en humanos y en animales de experimentación han mostrado cómo la dieta occidental, rica en azúcares simples, sal y grasas, se relaciona con una mayor probabilidad de aparición de síndrome metabólico (Kopp, 2019; Myles, 2014). La occidentalización de la dieta está favoreciendo que aparezca diabetes tipo 2, hígado graso no alcohólico, obesidad y dislipemias cada vez a edades más tempranas (Weiss et al., 2013). La obesidad es el principal detonante de síndrome metabólico en la infancia y adolescencia (Bussler et al., 2017). Es más, se ha establecido una correlación entre la presencia de obesidad infantil o durante la adolescencia con el desarrollo de enfermedad cardiovascular y síndrome metabólico en la edad adulta (J. Kim et al., 2017; Weihrauch-Blüher et al., 2019).

La fructosa es uno de los azúcares simples más utilizados en los últimos años, ya sea en forma de jarabe de maíz rico en fructosa o en forma de sacarosa, para edulcorar bebidas azucaradas y otros alimentos procesados (Tappy & Lê, 2010; Walker et al., 2014). El debate sobre los efectos metabólicos negativos de la fructosa sigue todavía abierto. Así, algunos autores no han observado una peor respuesta ante el consumo de fructosa frente a la de otros azúcares (Chiavaroli et al., 2015; Heden et al., 2014). En cambio, nosotros y otros autores hemos demostrado que la fructosa es capaz de inducir la aparición de síndrome metabólico, hígado graso no alcohólico, alteraciones cardiovasculares y un incremento en el estrés oxidativo (Hutter et al., 2015; Hwang et al., 1987; Lanaspa et al., 2011; Rodríguez et al., 2015; Roglans et al., 2002; Roglans et al., 2007). Dada la relación existente entre los efectos beneficiosos del H₂S en la enfermedad cardiovascular, el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina (Comas & Moreno-Navarrete, 2021) no resulta sorprendente que las enzimas de la transulfuración y los niveles de H₂S en diversos tejidos, como el hígado y los vasos sanguíneos, se puedan ver reducidos tras el consumo de fructosa (Ling et al., 2012; Padiya et al., 2011). Es más, se ha visto que la administración de compuestos o alimentos como el ajo, que liberan H₂S, consiguen reducir las alteraciones metabólicas asociadas al consumo de dietas ricas en grasa o azúcar, tales como el estrés oxidativo, la acumulación lipídica y la resistencia a la insulina (Mani et al., 2013; Padiya et al., 2011; D. Wu et al., 2015).

La etapa perinatal es una etapa clave para el correcto desarrollo del individuo. Así, la dieta materna durante la gestación se ha visto que condiciona la aparición de alteraciones metabólicas en la descendencia una vez adulta (Howie et al., 2009; Vickers et al., 2000). De hecho, nuestro grupo de investigación ha demostrado como el consumo de fructosa durante la gestación, y no el de glucosa, causa en la descendencia macho adulta hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y estrés oxidativo (Rodríguez et al., 2015; Rodríguez et al., 2016b). Además, estos efectos se veían agravados cuando a esos machos se les exponía a fructosa en la edad adulta, y dicha alteración estaba mediada por una resistencia a FGF21 (capítulo 1 de la

presente tesis doctoral) (Fauste et al., 2020c). Estos animales presentaron además una reducida producción hepática de H₂S asociada al consumo de fructosa (Fauste et al., 2020b).

Teniendo en cuenta los antecedentes previamente expuestos, en el presente estudio nos planteamos demostrar si la fructosa en agua de bebida (10% p/v) es capaz, en ratas macho jóvenes (3 meses), de alterar la producción de H₂S y si el consumo materno de fructosa durante la gestación influye en la respuesta de la descendencia macho. Para comprobar si, de haberlo, era un efecto específico de la fructosa, usamos su epímero (la tagatosa) en paralelo. Además, hemos querido conocer si la asociación de fructosa en agua de bebida y una dieta rica en colesterol, como modelo de dieta occidental, tendría repercusiones en la transulfuración. Finalmente, nos propusimos determinar los posibles mecanismos implicados en la regulación de la expresión y actividad de las enzimas de esta ruta que nos ayudarían a explicar los resultados obtenidos.

2. Materiales y métodos

2.1. Animales y diseño experimental

Se cruzaron ratas hembra Sprague-Dawley con machos y a lo largo de toda la gestación, se les permitió el acceso libre a agua sin aditivo (grupo de madres control, C), o bien agua suplementada con un 10% de fructosa (p/v) (grupo de madres fructosa, F) (generación F0). Tras parir, se realizó un ajuste de las camadas a 9 crías a las que se les administró agua sin aditivo durante la lactancia. Cuando las crías alcanzaron los 20 días de edad se destetaron, se separaron por género y se les dejó crecer, permitiéndoles el acceso a agua sin aditivo (generación F1). Los machos F1, procedentes de madres control o fructosa, se separaron en 4 grupos experimentales a día 90 de vida según el tratamiento dietético recibido (como se describe en la Figura 24): agua sin aditivos (control, C), agua suplementada con fructosa al 10% (p/v) (F), agua suplementada con tagatosa al 10% (p/v) (T) y agua suplementada con fructosa al 10% (p/v) junto con dieta sólida enriquecida con un 2% de colesterol (*Tecklad Custome Diets*, TD.07841, Envigo, EEUU) (FCol). El tratamiento se realizó durante 3 semanas, tras el cual las ratas fueron sacrificadas. La sangre se recogió en tubos de EDTA (Vacutainer[®]) para aislar a continuación el plasma, que se almacenó a -80°C para su posterior análisis. Además, se extrajo el hígado, el tejido adiposo lumbar y el íleon, los cuales fueron pesados y almacenados a -80°C hasta su análisis.

Una descripción más detallada del procedimiento experimental viene recogida en los Materiales y Métodos Generales.

2.2. Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real

El ARN total de hígado, íleon y tejido adiposo lumbar (TAL) fue extraído mediante el kit Ribopure[™] (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). Dicho ARN se trató con DNaseI usando el kit DNA free (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). Tras ello, se sintetizó el ADNc mediante retrotranscripción con Superscript II (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). La PCR a tiempo real

Capítulo 4

se llevó a cabo utilizando un termociclador CFX96 Touch (BioRad, EEUU). Los volúmenes de reactivos que se utilizaron en cada muestra fueron: 10 μL de SYBR *Premix Ex Taq* (Takara Bio Inc., Japón), 1 μL de cebador F 10 μM (IDT Technologies, EEUU), 1 μL de cebador R 10 μM (IDT Technologies, EEUU), 2 μL de la muestra de ADNc y 6 μL de agua mili-Q estéril. Para asegurarnos de que los valores de Cp de las muestras para todos los genes se encontraran dentro de la recta de calibrado y no superaran Cps mayores de 33 ciclos (la amplificación pierde eficiencia y hay mayor probabilidad de encontrar productos de amplificación inespecíficos) las muestras de ADNc fueron diluidas 1/30 hígado e íleon y 1/5 para TAL consiguiendo trabajar con un ADNc a una concentración de 5 ng/ μL .

Los parámetros programados para cada gen fueron los indicados por la base de datos de secuencias de cebadores *RT-PCR Primer Sequences for Atlas Nylon Arrays* (Clontech, EEUU) o la aplicación para el diseño de cebadores mediante el programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). El protocolo general utilizado para llevar a cabo la amplificación de cada gen en el termociclador CFX96 Touch (BioRad, EEUU) figura en la Tabla 7. El análisis de la cuantificación relativa de la expresión de los genes se realizó mediante el software *CFX Maestro 2.0* que se basa en el método de $2^{-\Delta\text{Ct}}$ o método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Como gen de referencia, gen cuya expresión no varía en función de las condiciones experimentales, se utilizó RPS29 para hígado e íleon y HPRT1 para tejido adiposo lumbar.

2.3. Extracción de miARN, RT-PCR de miARN y determinación de la expresión de miARN por PCR a tiempo real

La medida de miARN se realizó durante una estancia en el grupo Control Nutricional del Epigenoma bajo la supervisión de la Dra. Lidia Daimiel Ruiz en el Instituto IMDEA Alimentación (Madrid, España).

La extracción del ARN total y de los miARN en hígado y tejido adiposo lumbar se realizó mediante el kit miRNeasy Mini[®] (Qiagen, EEUU). Los miARN fueron específicamente retrotranscritos y cuantificados gracias al sistema miScript[®] (Qiagen, EEUU) tal y como se detalla en la sección Materiales y Métodos Generales. Para ello, se llevó a cabo la retrotranscripción de 500 ng de ARN mediante el kit RT miScript[®] (Qiagen, EEUU).

El kit *miScript SYBR Green PCR* (Qiagen, EEUU) permite la detección del ADNc de miARN maduros generados con el kit RT miScript[®] (Qiagen, EE.UU.). Para realizar la PCR a tiempo real de los miARN se utilizó un equipo de PCR a tiempo real QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems[™], ThermoFisher., EEUU) en placas de 384 pocillos. Los volúmenes de reactivos que se utilizaron en cada muestra fueron: 5 μL de 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, EE.UU.), 1 μL de cebador específico 10 μM (IDT Technologies, EEUU) (Tabla 8), 1 μL de 10x cebador universal miScript 10 μM (Qiagen, EE.UU.), 2 μL de la muestra de ADNc y 1 μL de agua mili-Q estéril. Para asegurarnos de que los valores de Cp de las muestras para todos los genes se encontraran dentro de la recta de calibrado y no superaran Cps mayores de 33 ciclos las muestras de ADNc fueron diluidas 1/5 trabajando así con ADNc a una concentración de 5 ng/ μL . La presencia de la secuencia diana de miR21 y miR22 en el gen Sp1 y de miR30c en el gen de la CSE fue determinada con la base de datos TargetScan (Agarwal et al., 2015).

2.4. Determinación del porcentaje de metilación del promotor de la CSE en hígado

La extracción de ADN de hígado se llevó a cabo mediante el kit DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. El porcentaje de metilación se determinó por tratamiento del ADN con McrBC (Takara, Japón), una enzima de restricción dependiente de metilación, tal y como aparece descrito en la sección Materiales y Métodos Generales. De esta manera, 1 µg de ADN se trató con 1 µL de McrBC, 2 µL de *buffer* 10X, 2µL de seroalbúmina bovina (BSA) 0,1%, 0.2 µl de GTP 100 mM y agua ultrapura estéril hasta completar el volumen a 20µl. La mezcla se incubó 16 h a 37°C y, posteriormente, se inactivó a 56°C durante 20 minutos. En paralelo, se tomó una alícuota de las muestras en la cual, en lugar de adicionarle la enzima se le añadió 1 µL *buffer* 10X para usarla como control no tratado.

La cuantificación de la metilación específica del promotor de la CSE se realizó por PCR a tiempo real utilizando un equipo de CFX96® Touch (Bio-Rad, California, EEUU) y usando cebadores específicos que amplifican una región rica en islas CpG del promotor de la CSE. Los volúmenes de reactivos que se utilizaron en cada muestra fueron: 10 µL de SYBR *Premix Ex Taq* (Takara Bio Inc., Japón), 1 µL de cebador F 10 µM (IDT Technologies, EEUU), 1 µL de cebador R 10 µM (IDT Technologies, EEUU), 2 µL de la muestra de ADN y 6 µL de agua mili-Q estéril. El ADN utilizado se encontraba a una concentración de 20 ng/µL y se midió en paralelo en la misma placa de 96 pocillos, la misma muestra tratada con McrBC y la muestra control sin tratar. Para asegurarnos de que la enzima había realizado cortes específicos se utilizaron unos cebadores control que amplificaban en otra región del genoma libre de dianas para McrBC.

El porcentaje de metilación de la región promotora se determinó por la diferencia del valor de Cp entre las muestras tratadas con McrBC y las muestras control sin tratar. El cálculo del porcentaje de metilación se realiza utilizando la ecuación (Oakes et al., 2006):

$$\% \text{ Metilación} = 100 (1 - e^{-0,7\Delta Ct}).$$

2.5. Determinaciones en plasma, hígado, íleon y TAL

Se utilizaron diversas alícuotas de plasma para determinar la concentración de leptina (Biovendor, República Checa) y adiponectina (Merck, Millipore, EEUU) mediante kit ELISA específicos para rata y siguiendo las indicaciones del fabricante.

La medida de la producción de H₂S en tejido se realizó por el método del sulfato de plomo en homogenados de hígado, íleon y tejido adiposo lumbar en PBS, tal y como se ha descrito anteriormente incluyendo algunas modificaciones (Hine & Mitchell, 2017). Además, se llevó a cabo la medida de la producción de H₂S enzimática y no enzimática por este método siguiendo el protocolo propuesto por Yang y col. (J. Yang et al., 2019).

Por otro lado, se utilizaron homogenados de hígado en PBS para medir ácidos biliares en tejido mediante un kit enzimático colorimético (Spinreact, Gerona, España). Para determinar la actividad de la superóxido dismutasa tipo 2 (SOD2) se utilizó el kit comercial SOD Assay Kit (Sigma, EEUU) inhibiendo la actividad SOD1 con un tratamiento previo de la muestra con cianuro potásico (KCN, Sigma, EEUU) 11mM.

Capítulo 4

El contenido de lípidos en TAL se llevó a cabo mediante una extracción de estos por el método de Folch (Folch et al., 1957). El contenido en lípidos totales fue determinado por diferencia de pesada y el de los triglicéridos gracias a un kit enzimático colorimético (Spinreact, Gerona, España), siguiendo el protocolo descrito por Carr y col (Carr et al., 1993).

Una descripción más completa de cada uno de los métodos aparece descrita en el apartado Materiales y Método Generales.

2.6. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media +/- el error estándar. Los grupos experimentales estuvieron formados por 7-8 animales procedentes de madres diferentes, para evitar el “efecto camada”. Las diferencias estadísticamente significativas se analizaron mediante el análisis de la varianza de doble vía (2way ANOVA), utilizando el programa estadístico SPSS. Se consideró que el efecto del tratamiento era estadísticamente significativo cuando las diferencias alcanzaron una $P < 0.05$. Estas diferencias estadísticamente significativas se indican con asteriscos (*) cuando aparecen entre tratamientos diferentes de los machos F1 en la edad adulta, pero con el mismo tratamiento materno; y con almohadillas (#) cuando las diferencias se encuentran en los machos F1 adultos que seguían el mismo tratamiento en la edad adulta, pero que procedían de madres con diferente tratamiento. Los estadísticos del ANOVA de doble vía de cada uno de los resultados aparecen recogidos en el Anexo 2.

3. Resultados

3.1. El consumo de fructosa afecta diferencialmente según el tejido a la producción de H₂S.

La transulfuración es una ruta metabólica que permite la transformación de la homocisteína a cisteína y H₂S. La CSE y la CBS, principales enzimas de esta ruta, se expresan en numerosos tejidos como el hígado, el intestino, el tejido adiposo, el riñón y el cerebro (Feng et al., 2009; Zhao et al., 2003). Además, se ha descrito recientemente que el H₂S puede también generarse en diversos tejidos de manera no enzimática en una reacción catalizada por el hierro y el PLP (J. Yang et al., 2019). Así, en el presente estudio encontramos que la producción de H₂S en el hígado de los machos de tres meses de edad descendientes de madres control o fructosa es principalmente debida a la acción enzimática, ya que al usar D-Cisteína, la cual no es sustrato de las enzimas de la transulfuración (J. Yang et al., 2019), la producción de H₂S quedaba inhibida, mientras que al quelar el hierro (catalizador de la reacción no enzimática) con EDTA, la intensidad de los precipitados de sulfato de plomo formados resultó prácticamente idéntica a cuando se medía la producción de H₂S total (Figura 66). En cambio, al tratar con proteínasa K, la cual degrada todas las proteínas de la muestra, la producción de H₂S se veía sustancialmente reducida con respecto a la muestra sin tratar (L-Cisteína) (Figura 66). En el caso del íleon, puede observarse una implicación prácticamente igual de la producción enzimática y no enzimática de H₂S, ya que la intensidad de los precipitados formados es similar al usar D-Cisteína, proteínasa K o EDTA, pero menor a la producción total (L-Cisteína) (Figura

66). El efecto de los diferentes tratamientos en el TAL es aparentemente opuesto al observado en hígado. De esta manera, la producción de H₂S es principalmente no enzimática, ya que la intensidad de los precipitados de sulfato de plomo formados al tratar la muestra con proteínasa K o al llevar a cabo la reacción con D-Cisteína son prácticamente idénticos a la producción de H₂S total (L-Cisteína). Además, la producción de H₂S se inhibe por completo al tratar los homogenados de TAL con EDTA (Figura 66).

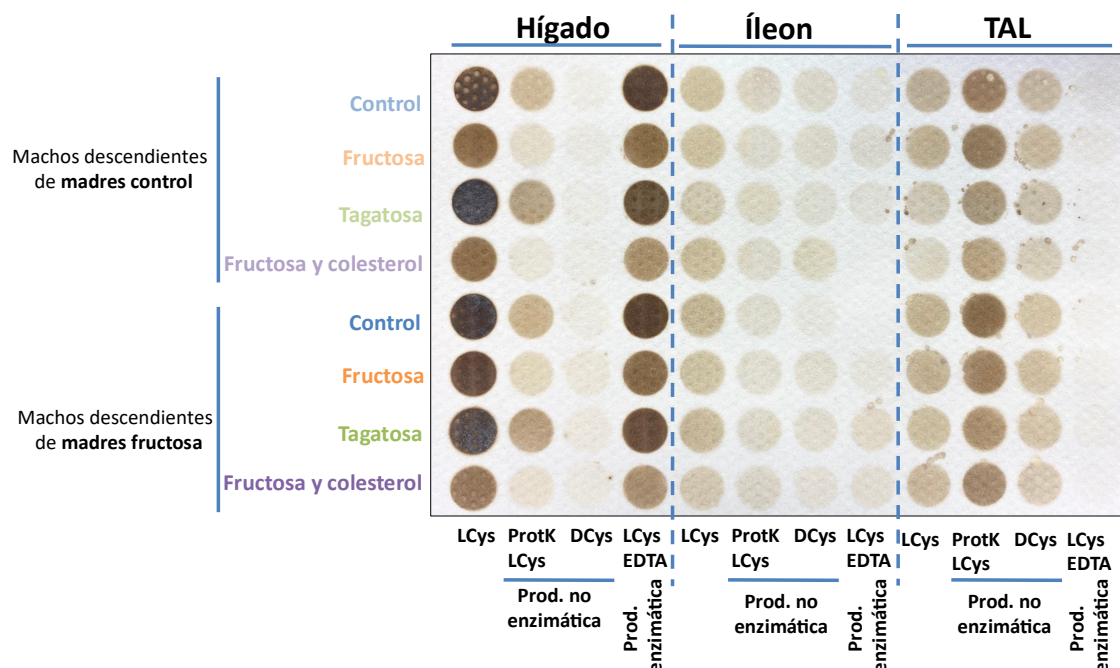


Figura 66: Producción enzimática y no enzimática de H₂S en el hígado, íleon y tejido adiposo lumbar (TAL) en machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (parte superior) y madres-fructosa (parte inferior) tratados con agua sin aditivos (azul), agua con un 10% (p/v) de fructosa (naranja), agua con un 10% (p/v) de tagatosa (verde) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (morado). La producción de H₂S se determinó por el método del sulfato de plomo en homogenados en PBS. La producción total se midió usando L-Cisteína (LCys), la producción no enzimática mediante el tratamiento previo de la muestra con proteínasa K (ProtK LCys) o usando D-Cisteína (DCys) y la producción enzimática tratando a los homogenados con EDTA antes de incubarlos con LCys (LCys). En todos los casos se utilizó piridoxal 5-fosfato (PLP) como cofactor y se incubaron todas las muestras a la vez durante 6 horas.

Como puede observarse en la Figura 66, el consumo de fructosa afecta a la producción de H₂S de una forma dependiente de tejido, ya que se aprecia que sólo en el hígado se observa un descenso claro en la producción de H₂S asociado al consumo de fructosa, mientras que en el resto de los tejidos no se observa dicho cambio, ni en la producción enzimática ni en la no enzimática. En consecuencia, nos propusimos estudiar más en profundidad los efectos del consumo de fructosa sobre la producción de H₂S en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres-fructosa o control, sometidos o no a una dieta rica en fructosa durante la edad adulta y el efecto de la asociación de fructosa en agua de bebida y una dieta sólida rica en colesterol, como modelo de dieta occidental. Además, quisimos comprobar si los

efectos de la fructosa eran específicos de este azúcar comparando los resultados obtenidos con los de animales tratados con un epímero de la fructosa: la tagatosa.

El hígado es el principal órgano encargado de la transulfuración en el organismo (Zhao et al., 2003) y como puede verse en la Figura 67A, la fructosa produce una disminución significativa en la producción de H₂S hepática en los machos que consumieron fructosa frente a los controles siendo esta reducción independiente del tratamiento materno. Este efecto es específico de la fructosa, ya que el consumo de tagatosa no modifica a la producción de H₂S comparado con los machos control (Figura 67A). En el caso del íleon no se observaron diferencias significativas en la producción de H₂S en ninguno de los grupos estudiados (Figura 67B), mientras que el TAL presenta una capacidad de producción de H₂S claramente dependiente del tratamiento materno. Así, los machos de madres-fructosa, sin importar el tratamiento recibido a los 3 meses, mostraron incrementos significativos en la producción de H₂S en TAL frente a los machos procedentes de madres control (Figura 67C).

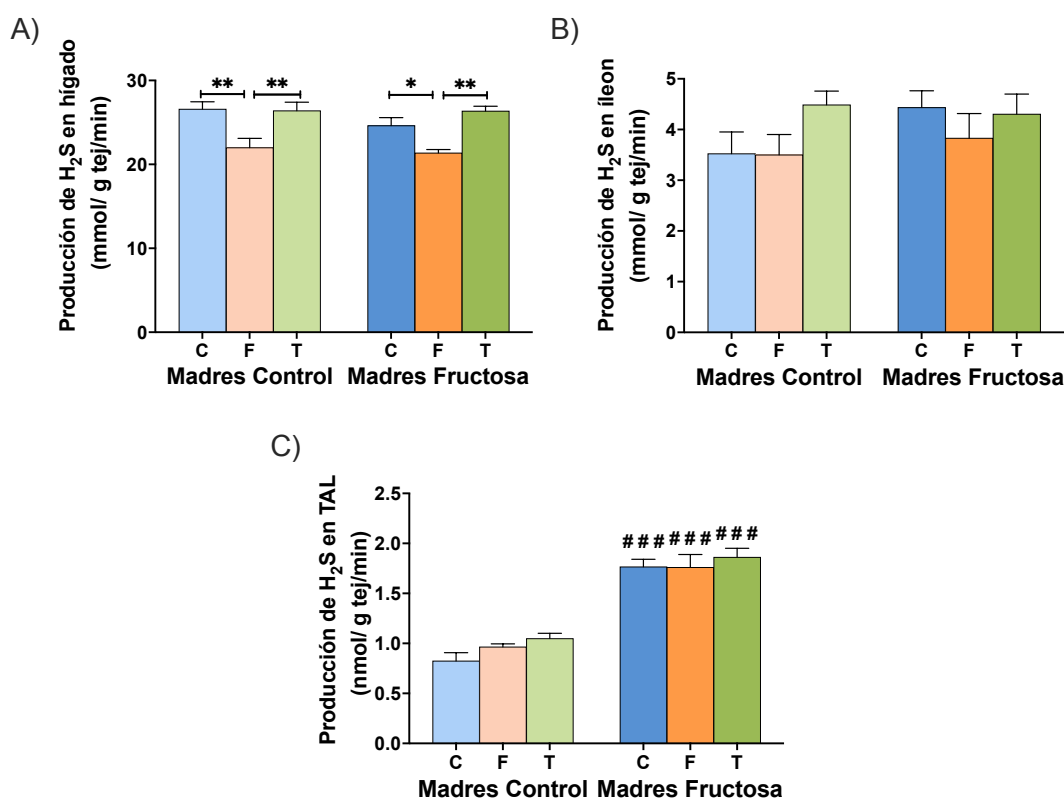


Figura 67: Producción total de H₂S en hígado (A) íleon (B) y en tejido adiposo lumbar (TAL) (C) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de tagatosa (T, barras verdes). Los datos se expresan como media ± error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, P < 0.05; ##, P < 0.01; ###, P < 0.001) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

Cuando se combina el consumo de fructosa en el agua de bebida con una dieta rica en colesterol, la producción hepática de H₂S se ve todavía más reducida que cuando se consume únicamente fructosa en la bebida (Figura 68A). De esta manera, puede observarse una reducción significativa en la producción hepática de H₂S en los machos, tanto de madres control como de madres-fructosa, que consumieron fructosa y colesterol, frente a los grupos control y fructosa (Figura 68A). De nuevo, y como ocurría en el íleon de los machos que sólo tomaron fructosa o tagatosa (Figura 67B), no se observaron cambios en la producción de H₂S cuando a los descendientes de madres control o de madres-fructosa se les administra fructosa y colesterol (Figura 68B). Curiosamente, en el TAL de los machos descendientes de madres control que consumieron fructosa y colesterol aparece un aumento significativo de la producción de H₂S frente a los controles (Figura 68C). Ese comportamiento, sin embargo, no se observó entre los descendientes de madres-fructosa. De la misma manera que observamos en la Figura 67C, aunque no aparezcan cambios entre los diferentes tratamientos en los hijos de madres-fructosa, sí que aparece una mayor producción de H₂S en TAL en todos los grupos de madres-fructosa frente a los descendientes de madres control (Figura 68C).

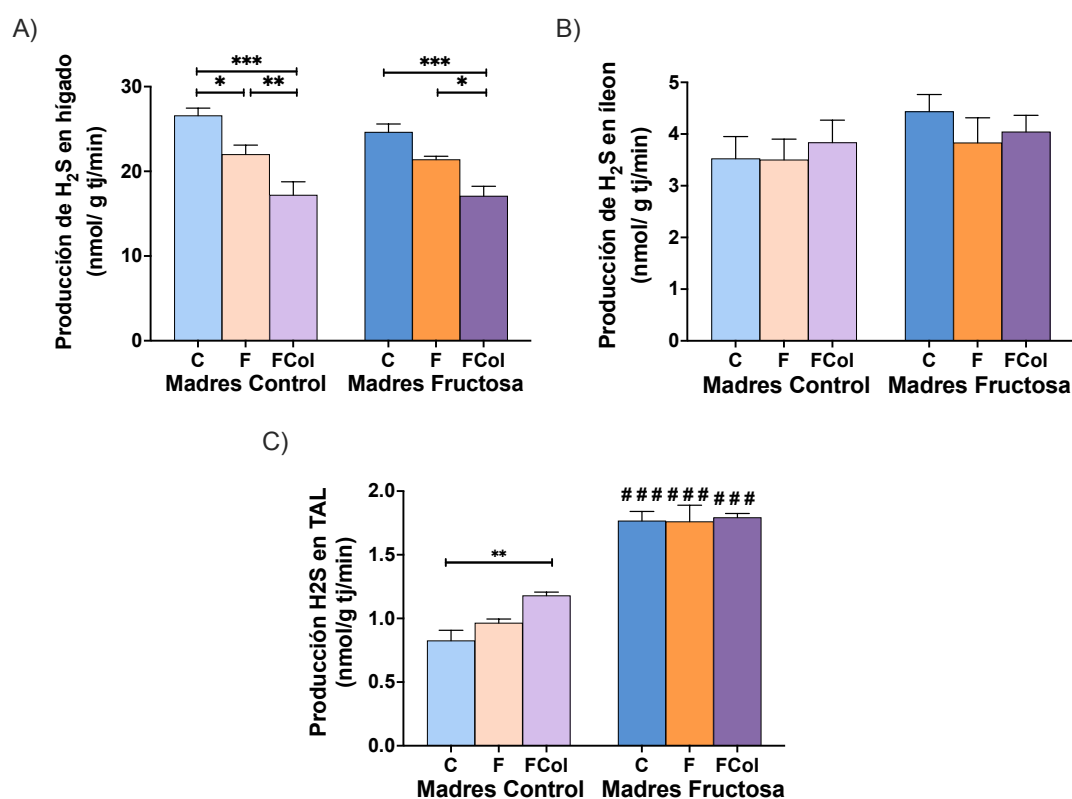


Figura 68: Producción total de H₂S en hígado (A) íleon (B) y en tejido adiposo lumbar (TAL) (C) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). Los datos se expresan como media ± error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, P < 0.05; ##, P < 0.01; ###, P < 0.001) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

3.2. La fructosa reduce la ruta de la transulfuración en el hígado.

Dado que habíamos observado que la fructosa conducía a una reducción significativa en la producción de H₂S en el hígado, efecto que no se observa tras el consumo de tagatosa ni en los otros tejidos estudiados (Figura 67), llevamos a cabo un estudio de la expresión génica de las enzimas directamente implicadas en la ruta de la transulfuración, así como de los diferentes mecanismos que la regulan.

Estudios previos realizados por Yang y col. han demostrado que la producción hepática de H₂S es principalmente de tipo enzimático (J. Yang et al., 2019). Dicha aseveración ha sido confirmada en el presente modelo experimental (Figura 66). De hecho, la producción de H₂S, previo tratamiento de la muestra con EDTA para evitar la producción no enzimática (Figura 69A), presenta un perfil y una capacidad de producción prácticamente iguales a la producción total de H₂S en hígado (Figura 67A). No obstante, es reseñable que se observara un efecto más amortiguado, en la reducción en el grupo fructosa frente al control, en los descendientes de madres-fructosa, el cual podría ser debido al efecto del EDTA sobre otros cationes (por ejemplo, el calcio) o por una menor ingesta de fructosa por parte de dichos animales (Figura 51A). Dicho hecho no se observa, sin embargo, en la producción total de H₂S en el hígado (Figura 67A). El estudio de la expresión génica de las enzimas de la transulfuración concuerda con estos datos, ya que tanto la CSE (Figura 69B), la CBS (Figura 69C), como la 3MST (Figura 69D) muestran un perfil de expresión parejo a la producción hepática de H₂S. De esta manera, los descendientes de madres control que consumieron fructosa muestran una reducción significativa en la expresión de la CSE (frente a los machos control y tagatosa), la CBS (frente a los machos tagatosa) y la 3MST (frente a los machos control). En el caso de los descendientes de madres-fructosa, el descenso en la expresión de las enzimas de la transulfuración asociada al consumo de fructosa no llega a ser significativo frente a los grupos control y tagatosa, pero sí que se observan tendencias muy claras (Figura 69B, C y D).

En el hígado, la CSE es la principal enzima implicada en la transulfuración (Kabil et al., 2011). Esta está finamente regulada por diferentes factores de transcripción, la metilación del promotor y por diversos miARNs (Giannakopoulou et al., 2017; Hackfort & Mishra, 2016; Sbodio et al., 2019). Ambos hechos, unidos a la clara reducción de su expresión hepática únicamente en los machos que consumieron fructosa (Figura 69B), nos hizo plantearnos estudiar los mecanismos (Figura 17) que conducían a dicho efecto exclusivo del hígado y que parecía estar provocado de forma específica por el consumo de la fructosa, ya que la tagatosa no generaba tales cambios (Figura 69B).

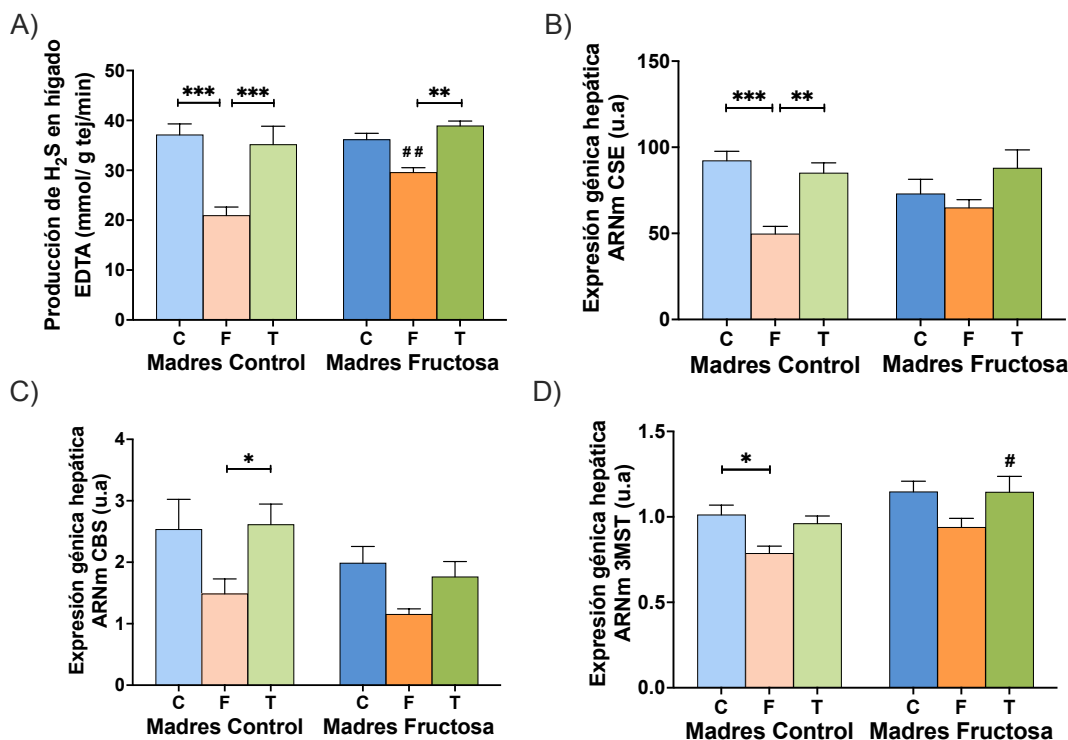


Figura 69: Producción enzimática de H₂S en hígado tras tratar el homogenado con EDTA (A) y expresión génica hepática (ARNm) de las enzimas de la transulfuración: CSE (B), CBS (C) y 3MST (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de tagatosa (T, barras verdes). Los datos se expresan como media ± error estándar de 7-8 animales. La expresión génica se determinó por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, P < 0.05; ##, P < 0.01; ###, P < 0.001) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. CSE: cistationina γ -liasa; CBS: la cistationina β -sintasa; 3MST: 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa.

Como puede verse en la Tabla 23, la expresión del factor de transcripción ATF4 no presenta diferencias significativas entre los grupos que consumieron fructosa, tagatosa y el control. La HO-1 y la SOD2 son dos potentes enzimas antioxidantes diana de Nrf2 (Rodrigo et al., 2016). El consumo de tagatosa en los machos de madres control provocó un aumento significativo en la expresión de la HO-1 frente a los machos control y fructosa, efecto que no se observa en los descendientes de madres-fructosa (Tabla 23). Dado que en la actividad hepática de la SOD2 tampoco se observan cambios entre los diferentes grupos experimentales, tanto de madres control como de madres-fructosa, podemos asumir que el factor de transcripción Nrf2 no está implicado en los efectos de la fructosa sobre la expresión de la CSE. En el promotor del gen de la CSE se han descrito sitios de unión para NFAT que indicarían que este factor de transcripción puede también regular su expresión génica (Bosc et al., 2017) (Figura 17). De hecho, nosotros hemos identificado la secuencia específica de unión de NFAT5 en una región *upstream* del promotor del gen de la CSE de rata (Figura 35). Sin embargo, la expresión de

Capítulo 4

NFAT5 no muestra diferencias en el hígado de descendientes de madres control ni fructosa sometidos a dieta con fructosa o tagatosa comparado con el control (Tabla 23).

Tabla 23: Mecanismos que regulan la expresión de la CSE en hígado de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda) y madres-fructosa (derecha) tratados con agua sin aditivos (Control), agua con un 10% (p/v) de fructosa (Fructosa) y agua con un 10% (p/v) de tagatosa (Tagatosa).

| | MADRES CONTROL | | | | MADRES FRUCTOSA | | | |
|-----------------------------------|----------------|------------|------------|-----------------------------------|-----------------|------------|------------------------|--------------------------------------|
| | CONTROL | FRUCTOSA | TAGATOSA | p | CONTROL | FRUCTOSA | TAGATOSA | p |
| <i>ATF4</i> (u.a.) | 1,045±0,11 | 1,27±1,16 | 1,33±0,08 | | 0,99±0,06 | 1,12±0,08 | 1,30±0,08 | |
| <i>HO-1</i> (u.a.) | 0,91±0,07 | 1,01±0,13 | 1,51±0,18 | *(CvsT) p= 0,01 *(FvsT) p=0,05 | 0,92±0,10 | 0,95±0,22 | 1,08±0,06 [#] | |
| Actividad SOD2 (U/mg proteína) | 24,80±3,88 | 23,66±1,43 | 18,79±3,52 | | 20,91±2,51 | 25,54±4,20 | 24,94±1,45 | |
| <i>NFAT5</i> (u.a.) | 0,95±0,08 | 0,96±0,13 | 0,92±0,07 | | 1,07±0,03 | 0,90±0,04 | 1,05±0,05 | |
| <i>miR30c</i> (u.a.) | 1,06±0,14 | 0,76±0,08 | 0,91±0,09 | | 0,86±0,08 | 0,84±0,08 | 1,28±0,21 [#] | |
| <i>miR21</i> (u.a.) | 1,05±0,13 | 0,99±0,13 | 1,18±0,09 | | 1,12±0,21 | 0,91±0,1 | 1,50±0,2 | *(FvsT) p=0,03 |
| <i>miR22</i> (u.a.) | 1,07±0,15 | 0,78±0,05 | 1,12±0,04 | | 0,93±0,12 | 0,87±0,04 | 1,25±0,11 | *(FvsT) p=0,04 |
| <i>CHOP</i> (u.a.) | 1,03±0,1 | 0,91±0,07 | 0,91±0,09 | | 1,14±0,09 | 1,15±0,13 | 0,76±0,08 | |
| <i>Calm3</i> (u.a.) | 1,01±0,06 | 1,02±0,06 | 1,19±0,08 | | 0,99±0,07 | 0,95±0,1 | 1,03±0,06 | |
| Ácidos biliares (mmol/g proteína) | 7,15±0,08 | 6,32±0,36 | 7,26±0,29 | | 6,59±0,21 | 6,88±0,21 | 8,13±0,50 [#] | ** (CvsT) p= 0,008 *(FvsT) p=0,02 |
| % metilación promotor CSE | 6,99±3,19 | 14,06±8,09 | 3,45±1,29 | | n.d. | n.d. | n.d. | |

La expresión génica se determinó por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia y para la expresión de miARN se utilizó RNU6. Los datos se expresan como media ± error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, P < 0.05; ##, P < 0.01; ###, P < 0.001) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. n.d.: no detectable.

El calcio es otro de los importantes reguladores de la expresión de la CSE, ya que es capaz de estabilizar Sp1 y favorecer su unión al promotor de la CSE (Zhao et al., 2014). Dos de las principales enzimas cuya expresión es regulada por el calcio, la calmodulina 3 y CHOP (Chin & Means, 2000), tampoco presentan cambios en ninguno de los grupos estudiados (Tabla 23). Además, Sp1 está controlado a nivel epigenético por miR21 y miR22 (Cindrova-Davies et al., 2013; L. Wang et al., 2015). La complementariedad de la secuencia semilla de ambos miARN es completa en el ARNm de Sp1, en base a los datos obtenidos en TargetScan (Agarwal et al., 2015), por lo que su unión conllevaría la degradación de ARNm del factor de transcripción. Como puede observarse en la Tabla 23, el consumo de fructosa no supuso cambios en los niveles de expresión hepática de miR21 y miR22 en los descendientes de madres control y de madres-fructosa en comparación con los otros dos grupos. En cambio, en los descendientes de madres-fructosa sometidos al tratamiento dietético con tagatosa, se observa un aumento significativo de la expresión de miR21 y miR22 con respecto a los que tomaron fructosa (Tabla 23). Otro de los miARN implicados en la regulación de la CSE es miR30, en este caso por unión directa y completa al ARNm de la CSE (Shen et al., 2015b). La secuencia semilla de miR30c se une de manera completa a una región 3'-UTR del mensajero de la CSE de rata, según los

estudios realizados en TargetScan (Agarwal et al., 2015). Como puede verse en la Tabla 23, no aparecen diferencias significativas en la expresión de miR30c en ninguno de los grupos estudiados dentro del mismo tratamiento materno. En cambio, los machos que consumieron tagatosa descendientes de madres-fructosa presentan una mayor expresión de miR30c que los machos descendientes de madres control.

Por otro lado, los niveles de ácidos biliares hepáticos no se vieron modificados en los descendientes de madres control que tomaron fructosa o tagatosa, pero sí aparece un aumento significativo en dicho parámetro en los descendientes de madres-fructosa que tomaron tagatosa frente al grupo control y al grupo fructosa (Tabla 23). Como consecuencia, FXR, un factor de transcripción activado por ácidos biliares (Chiang & Ferrell, 2019), no parece encontrarse implicado en los efectos observados asociados al consumo de fructosa sobre la expresión de la CSE en el hígado (Figura 69B).

En cuanto al nivel de metilación del promotor de la CSE, se observa una tendencia a una mayor metilación en los descendientes de madres control que consumieron fructosa frente a los controles o los que tomaron tagatosa (Tabla 23), lo que podría estar influyendo en la menor expresión de la CSE observada en este grupo (Figura 69B). Desafortunadamente, no fue posible detectar de manera fiable la metilación específica del promotor de la CSE en los machos descendientes de madres-fructosa (Tabla 23).

El metabolismo de la fructosa es uno de los principales factores causantes de las patologías asociadas a su consumo y, además, se ha demostrado que la fructosa es capaz de activar su propio metabolismo (Tappy & Lê, 2010). Por ello no sorprende ver un aumento en la expresión de la KHK y la aldolasa B en hígado de los machos que tomaron fructosa. Este aumento es significativo para la KHK en los descendientes de madres control que tomaron fructosa en comparación con los machos controles y los que ingirieron tagatosa (Figura 70A). También fue significativo para la aldolasa B en este mismo grupo de animales frente a los controles (Figura 70B). De hecho, enzimas cuya expresión se sabe que se ve afectada por el metabolismo de la fructosa y que se han relacionado con el desarrollo de síndrome metabólico asociado al consumo de fructosa, se encuentran únicamente alteradas en los grupos de machos que consumieron fructosa (Tabla 24). Al igual que ocurre con estas enzimas, es posible que el propio metabolismo hepático de la fructosa también sea capaz de alterar la expresión de la CSE (Figura 69B), inhibiéndola y reduciendo la producción hepática de H₂S (Figura 67A y Figura 69A). Sin embargo, los descendientes de madres-fructosa presentan únicamente tendencias a una mayor expresión de la KHK y la aldolasa B hepáticas asociadas al consumo de fructosa frente a los machos controles y que tomaron tagatosa (Figura 70A y B) y, curiosamente, en este grupo la expresión de la CSE no se llega a reducir de una manera significativa con respecto a los otros dos grupos (Figura 69B).

Capítulo 4

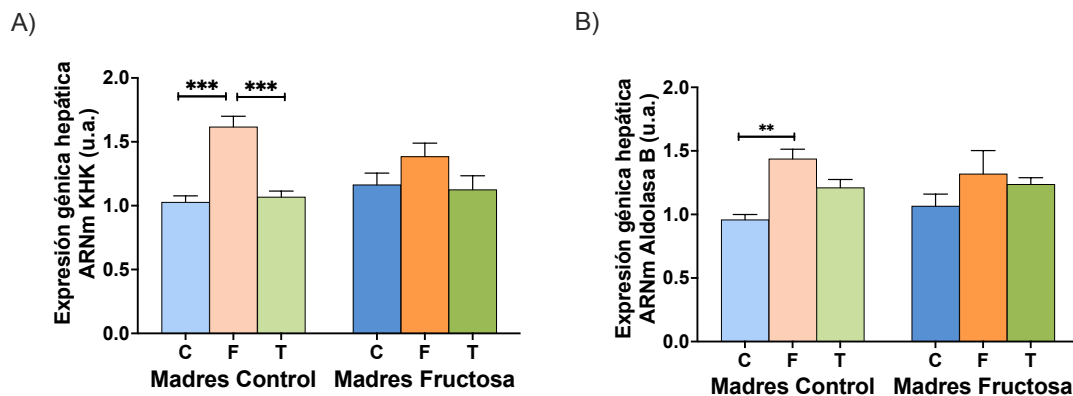


Figura 70: Expresión génica (ARNm) de la KHK (A) y la aldolasa B (B) en hígado en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de tagatosa (T, barras verdes). La expresión génica ha sido se determinó por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. KHK: cetohecoquinasa.

Tabla 24: Enzimas del metabolismo alteradas por el consumo de fructosa y su metabolismo en hígado de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda) y madres-fructosa (derecha) tratados con agua sin aditivos (Control), agua con un 10% (p/v) de fructosa (Fructosa) y agua con un 10% (p/v) de tagatosa (Tagatosa).

| | MADRES CONTROL | | | | MADRES FRUCTOSA | | | |
|--------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|-------------------|------------------|---|
| | CONTROL | FRUCTOSA | TAGATOSA | p | CONTROL | FRUCTOSA | TAGATOSA | p |
| FAS (u.a.) | 16,37 \pm 2,81 | 43,87 \pm 7,44 | 34,67 \pm 5,76 | *(CvsF) p= 0,02 | 25,85 \pm 5,16 | 43,91 \pm 10,92 | 34,29 \pm 7,48 | |
| SCD1 (u.a.) | 1,06 \pm 0,14 | 2,24 \pm 0,22 | 1,51 \pm 0,29 | ** (CvsF) p= 0,007 | 1,53 \pm 0,32 | 2,74 \pm 0,36 | 1,16 \pm 0,18 | ** (CvsF) p= 0,008 *** (FvsT) p= 0,000 |
| CPT1 (u.a.) | 1,04 \pm 0,35 | 0,65 \pm 0,13 | 1,36 \pm 0,51 | | 0,58 \pm 0,12 | 0,60 \pm 0,09 | 1,50 \pm 0,34 | |
| ABCG5 (u.a.) | 1,46 \pm 0,33 | 0,26 0,02 | 1,01 \pm 0,34 | ** (CvsF) p= 0,008 | 1,06 \pm 0,29 | 0,40 \pm 0,1 | 0,69 \pm 0,13 | |

La expresión génica se determinó por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

Finalmente, para confirmar el efecto que pudiera tener el metabolismo de la fructosa sobre la expresión de la CSE, se estudió esta posible relación en el íleon, ya que se saben que el intestino también es capaz de metabolizar la fructosa eficientemente por acción de la KHK y la aldolasa B (Jang et al., 2018) y además produce H₂S de una manera relevante por acción enzimática (Martin et al., 2010; Zhao et al., 2003). Como se ha descrito anteriormente, la producción de H₂S en íleon no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados

(Figura 67B) ni en los descendientes de madres control ni en los de madres-fructosa, por lo que la fructosa no provoca el mismo efecto sobre este tejido que en el hígado. Es más, curiosamente la expresión de la CSE en el íleon presenta un aumento significativo de su expresión en los descendientes de madres control que consumieron fructosa en comparación con los que tomaron tagatosa (Figura 71A). En cambio, en los descendientes de madres-fructosa no aparecen diferencias entre de los grupos estudiados (Figura 71A). Además, en el íleon se observa que la expresión de la KHK y la aldolasa B no se ven modificadas por el consumo de fructosa ni en los descendientes de madres control ni fructosa, aunque sí por el de tagatosa (Figura 71B y C).

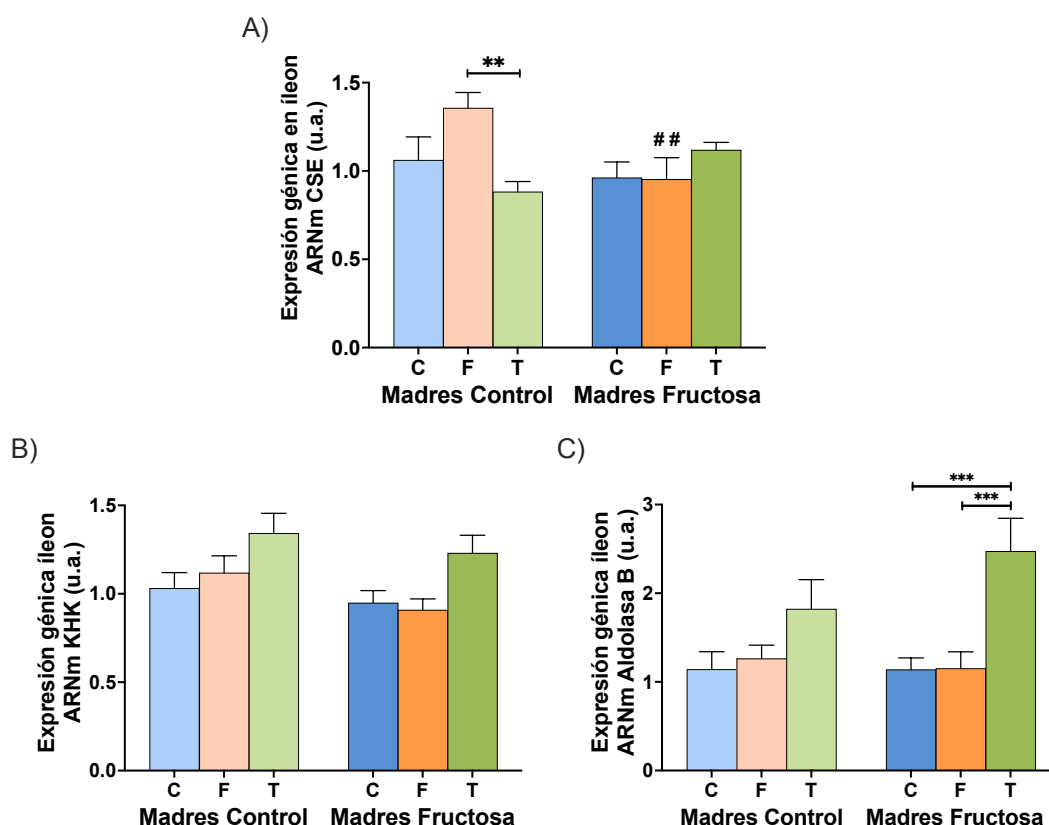


Figura 71: Expresión génica (ARNm) de la CSE (A), la KHK (B) y la aldolasa B (C) en íleon en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, gráficas en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de tagatosa (T, barras verdes). La expresión génica ha sido determinada por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. CSE: cistationina γ -liasa; KHK: cetohecoquinasa.

3.3. El consumo de colesterol acentúa la menor producción de H₂S hepática asociada al consumo de fructosa y es mediado por ácidos biliares.

Como se aprecia en la Figura 68A, en los descendientes de madres control y madres-fructosa, tanto si únicamente se administra fructosa, como si se administra fructosa acompañada de una dieta rica en colesterol observamos una reducción en la producción de H₂S comparado con el grupo control y de manera exclusiva en el hígado. Esta producción total de H₂S es significativamente menor tras el consumo de fructosa y colesterol frente a cuando se consume únicamente fructosa, por lo que una dieta tipo *Western* empeora el fenotipo generado por la fructosa por sí sola (Figura 68A). Cuando se mide la producción hepática de H₂S de manera enzimática, encontramos un perfil similar, aunque la reducción es significativa en los descendientes de madres control y madre-fructosa que consumieron fructosa y colesterol únicamente en comparación con los descendientes control (Figura 72A). La expresión de la CSE se corresponde fielmente con la producción enzimática de H₂S (Figura 72B), lo cual concuerda con los estudios que afirman que ésta es la principal enzima implicada en la transulfuración en el hígado (Kabil et al., 2011). Así, la expresión de la CSE disminuye significativamente en los grupos de machos que recibieron fructosa y colesterol frente a los machos control no importando el tratamiento materno, pero solamente se observa una disminución significativa entre los animales que consumieron fructosa y colesterol y los que sólo tomaron fructosa en los machos descendientes de madres-fructosa (Figura 72B). Sorprendentemente, en los machos que consumieron fructosa y colesterol no se observó una reducción en la expresión de la CBS, como sí ocurre en los machos que sólo han consumido fructosa comparado con los controles. De hecho, los descendientes de madres-fructosa que consumieron fructosa y colesterol presentan una mayor expresión de la CBS en comparación con los que sólo tomaron fructosa (Figura 72C). En el caso de la 3MST, se observa un efecto dependiente de la dieta materna, ya que los descendientes de madres control que consumieron fructosa y colesterol no muestran cambios frente al grupo control como ocurría con la expresión de la CBS (Figura 72C), pero los descendientes de madres-fructosa alimentados con fructosa y colesterol reducen significativamente la expresión de la enzima en comparación con los machos que recibieron agua (Figura 72D).

Estos resultados obtenidos en los machos a los que se les asoció una dieta rica en fructosa y colesterol nos confirman que es la CSE la enzima que se encuentra inhibida por acción del consumo de fructosa y que, además, es esta enzima la que refleja preferentemente la capacidad de producción de H₂S por parte del hígado, por lo que de nuevo estudiamos los diferentes mecanismos que podían estar controlando la expresión de la CSE para determinar la causa de la menor producción del gasotransmisor cuando se administra conjuntamente fructosa y colesterol (Figura 68A).

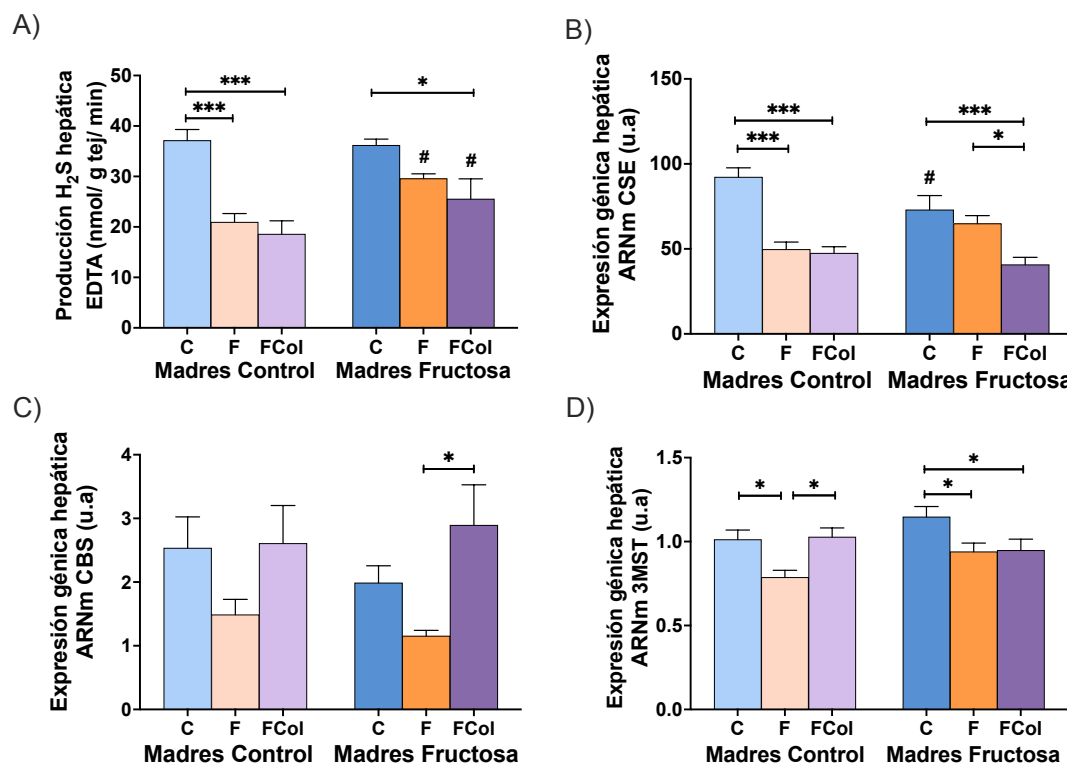


Figura 72: Producción enzimática de H₂S en hígado tras tratar el homogenado con EDTA (A) y expresión génica hepática (ARNm) de las enzimas de la transulfuración: CSE (B), CBS (C) y 3MST (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, gráficas en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). La expresión génica ha sido medida por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los datos se expresan como media ± error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, P < 0.05; ##, P < 0.01; ###, P < 0.001) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. CSE: cistationina γ -liasa; CBS: la cistationina β -sintasa; 3MST: 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa.

Como puede verse en la Tabla 25, los principales mecanismos reguladores de la expresión génica de la CSE, tales como Nrf2, Sp1, NFAT5 o los mecanismos epigenéticos mediados por miARN y metilación del promotor, no muestran diferencias en los machos que consumieron fructosa y colesterol en comparación con los restantes de grupos. No obstante, en los descendientes de madres control, la expresión de ATF4 presenta un aumento en los machos que consumieron fructosa y colesterol frente a los controles (Tabla 25), lo cual no explicaría la disminución de la expresión de la CSE observada en el hígado de estos animales (Figura 72B) dado que es un factor de transcripción que ejerce un papel activador sobre la CSE.

Capítulo 4

Tabla 25: Mecanismos que regulan la expresión de la CSE en hígado de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda) y madres-fructosa (derecha) tratados con agua sin aditivos (Control), agua con un 10% (p/v) de fructosa (Fructosa) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (Fructosa+Colesterol).

| | MADRES CONTROL | | | | MADRES FRUCTOSA | | | |
|---------------------------------------|----------------|------------|-------------------------|-------------------|-----------------|------------|-------------------------|---|
| | CONTROL | FRUCTOSA | FRUCTOSA+ COLESTEROL | p | CONTROL | FRUCTOSA | FRUCTOSA+ COLESTEROL | p |
| <i>ATF4 (u.a.)</i> | 1,045±0,11 | 1,27±1,16 | 1,46 0,14 | *(CvsFCo) p= 0,03 | 0,99±0,06 | 1,12±0,08 | 1,31±0,05 | |
| <i>HO-1 (u.a.)</i> | 0,91±0,07 | 1,01±0,13 | 1,03±0,18 | | 0,92±0,10 | 0,95±0,22 | 1,03±0,1 | |
| <i>Actividad SOD2 (U/mg proteína)</i> | 24,80±3,88 | 23,66±1,43 | 20,71±3,35 | | 20,91±2,51 | 25,54±4,20 | 21,61±3,36 | |
| <i>NFAT5 (u.a.)</i> | 0,95±0,08 | 0,96±0,13 | 1,16±0,06 | | 1,07±0,03 | 0,90±0,04 | 1,07±0,12 | |
| <i>miR30c (u.a.)</i> | 1,06±0,14 | 0,76±0,08 | 0,88±0,09 | | 0,86±0,08 | 0,84±0,08 | 0,84±0,09 | |
| <i>miR21 (u.a.)</i> | 1,05±0,13 | 0,99±0,13 | 1,03±0,1 | | 1,12±0,21 | 0,91±0,1 | 1,08±0,1 | |
| <i>miR22 (u.a.)</i> | 1,07±0,15 | 0,78±0,05 | 1,07±0,12 | | 0,93±0,12 | 0,87±0,04 | 0,89±0,03 | |
| <i>CHOP (u.a.)</i> | 1,03±0,1 | 0,91±0,07 | 1,00±0,03 | | 1,14±0,09 | 1,15±0,13 | 1,29±0,15 | |
| <i>Calm3 (u.a.)</i> | 1,01±0,06 | 1,02±0,06 | 1,03±0,07 | | 0,99±0,07 | 0,95±0,1 | 1,03±0,06 | |
| % metilación promotor CSE | 6,99±3,19 | 14,06±8,09 | 3,27±2,13 | | n.d. | n.d. | 20,81±9,65 [#] | |

La expresión génica se determinó por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia y para la expresión de miARN se utilizó RNU6. Los datos se expresan como media ± error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, P < 0.05; ##, P < 0.01; ###, P < 0.001) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. n.d.: no detectable.

Al igual que habíamos observado en los machos que solo consumen fructosa, la expresión de la KHK (Figura 73A) y la aldolasa B (Figura 73B) en hígado se encontraron aumentadas en los animales que consumieron fructosa y colesterol en comparación con los controles. En el caso de la KHK, esta diferencia es significativa en los descendientes de madres control, pero sólo aparecen tendencias en los descendientes de madres-fructosa (Figura 73A). En cambio, la aldolasa B aumenta significativamente su expresión, no importando el tratamiento materno, en los descendientes que tomaron fructosa y colesterol frente a los controles (Figura 73B). Estos perfiles observados en la KHK y la aldolasa B, claramente inversos a los observados en la CSE, reforzarían la hipótesis de que el metabolismo de la fructosa a través la fructólisis es clave y podría estar implicado en la disminución de la expresión de la CSE y la producción de H₂S mediados por el consumo de fructosa. De nuevo y como ocurría en los machos que sólo tomaron fructosa, la asociación de fructosa con una dieta rica en colesterol condujo a cambios en la expresión de enzimas del metabolismo relacionadas con las alteraciones metabólicas asociadas al consumo de fructosa y su metabolismo (Tabla 26).

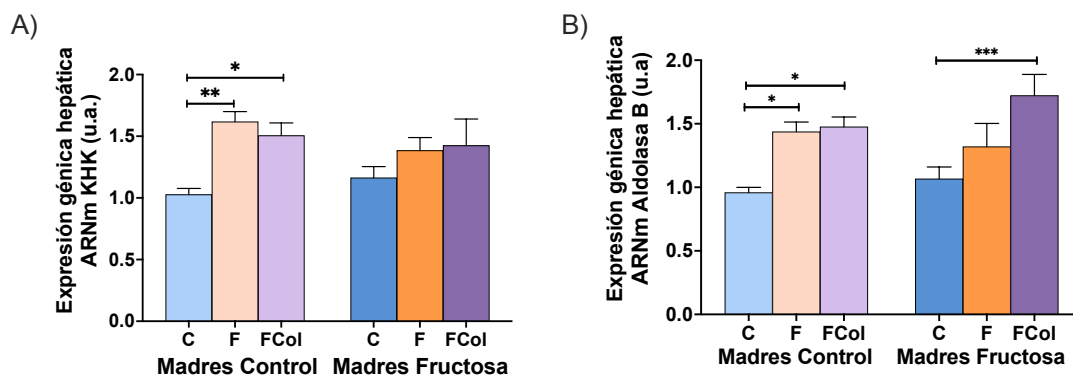


Figura 73: Expresión génica (ARNm) de la cetoheixoquinasa (KHK) (A) y la aldolasa B (B) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). La expresión génica ha sido se determinó por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

Tabla 26: Enzimas del metabolismo alteradas por el consumo de fructosa y su metabolismo en hígado de los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda) y madres-fructosa (derecha) tratados con agua sin aditivos (Control), agua con un 10% (p/v) de fructosa (Fructosa) y una dieta con un 2% de colesterol (Fructosa+Colesterol).

| | MADRES CONTROL | | | | MADRES FRUCTOSA | | | |
|---------------------|------------------|------------------|----------------------|---|------------------|-------------------|----------------------|---|
| | CONTROL | FRUCTOSA | FRUCTOSA+ COLESTEROL | p | CONTROL | FRUCTOSA | FRUCTOSA+ COLESTEROL | p |
| <i>FAS (u.a.)</i> | 16,37 \pm 2,81 | 43,87 \pm 7,44 | 29,95 \pm 6,85 | *(CvsF) p= 0,03 | 25,85 \pm 5,16 | 43,91 \pm 10,92 | 34,26 \pm 10,57 | |
| <i>SCD1 (u.a.)</i> | 1,06 \pm 0,14 | 2,24 \pm 0,22 | 2,83 \pm 0,25 | ** (CvsF) p= 0,01 *** (CvsFCol) p= 0,000 | 1,53 \pm 0,32 | 2,74 \pm 0,36 | 3,48 \pm 0,41 | ** (CvsF) p= 0,01 *** (CvsFCol) p= 0,000 |
| <i>CPT1 (u.a.)</i> | 1,04 \pm 0,35 | 0,65 \pm 0,13 | 0,84 \pm 0,16 | | 0,58 \pm 0,12 | 0,60 \pm 0,09 | 0,55 \pm 0,11 | |
| <i>ABCG5 (u.a.)</i> | 1,46 \pm 0,33 | 0,26 \pm 0,02 | 0,49 \pm 0,06 | ** (CvsF) p= 0,002 ** (CvsFCol) p= 0,02 | 1,06 \pm 0,29 | 0,40 \pm 0,1 | 0,94 \pm 0,19 | * (CvsF) p= 0,06 |

La expresión génica se determinó por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

En el íleon, la asociación de fructosa y colesterol como ya habíamos comprobado con la ingesta de fructosa sola no produce cambios en la producción de H₂S (Figura 68B), así como tampoco se observan cambios en la expresión de la CSE (Figura 74A) independientemente del tratamiento materno. De nuevo, y de manera confirmatoria de la implicación del metabolismo hepático de la fructosa en la inhibición hepática de la CSE, la expresión de la KHK y la aldolasa B no se vieron modificadas en el íleon de los machos que consumieron fructosa y colesterol en comparación con el resto de los grupos estudiados (Figura 74B y C).

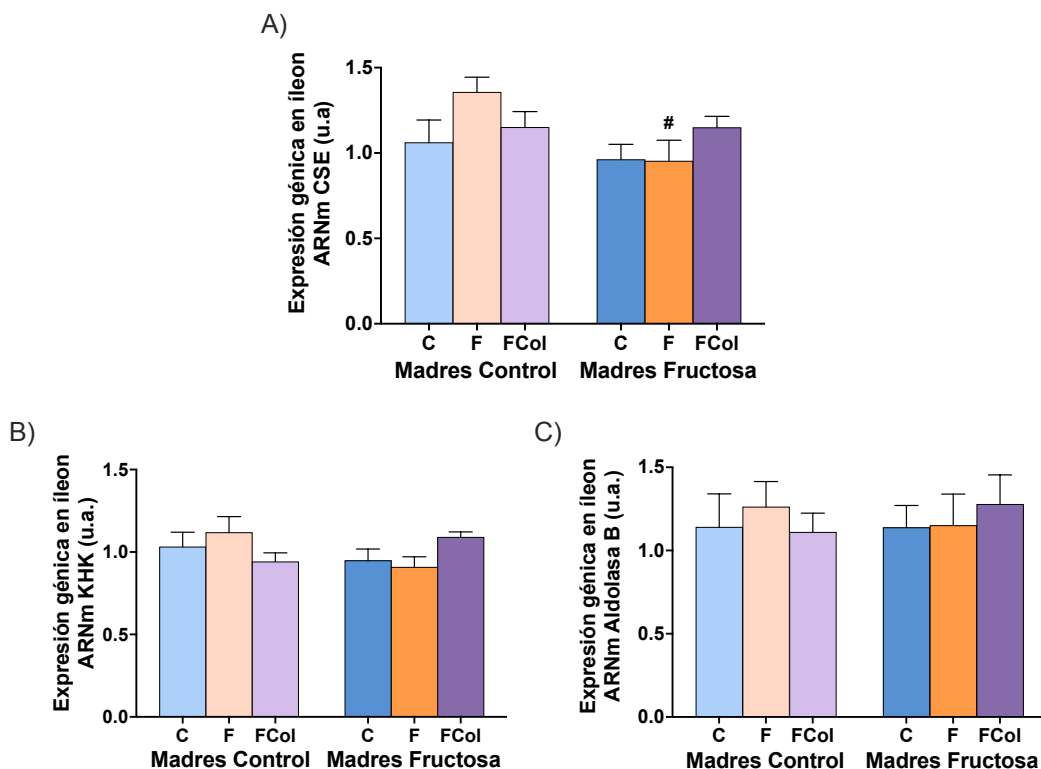


Figura 74: Expresión génica (ARNm) de la CSE (A) la KHK (B) y la aldolasa B (C) en íleon en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, gráficas en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). La expresión génica se determinó por PCR a tiempo real usando RPS29 como gen de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. CSE: cistationina γ -liasa; KHK: cetohecoquinasa.

Finalmente, uno de los mecanismos que tiene el organismo para eliminar el exceso de colesterol es transformarlo en ácidos biliares y eliminar estos ácidos por la bilis (Chiang & Ferrell, 2019). Es de resaltar que la concentración hepática de estos ácidos biliares en los machos que consumieron fructosa y colesterol se encuentra reducida en comparación con los machos control o que tomaron fructosa, independientemente de la dieta materna (Figura 75). Además, el contenido hepático de ácidos biliares en los animales que tomaron fructosa y colesterol fue inferior en los machos descendientes de madres-fructosa en comparación con los machos de madres control (Figura 75). A tenor de estos resultados, podría ser que el factor de transcripción FXR, que es activado por los ácidos biliares (Chiang & Ferrell, 2019), en ausencia de dichos activadores en el hígado, no se podría unir a sus sitios de unión en el promotor de la CSE (Renga et al., 2009) y, por tanto, ello favorecería una reducción en la expresión de la CSE (Figura 72B). Como consecuencia, la fructosa es capaz de inhibir la producción de H_2S en el hígado por inhibición de la CSE, pero cuando se asocia a una dieta rica

en colesterol la reducción resulta más acusada debido a una disminución en la concentración hepática de ácidos biliares.

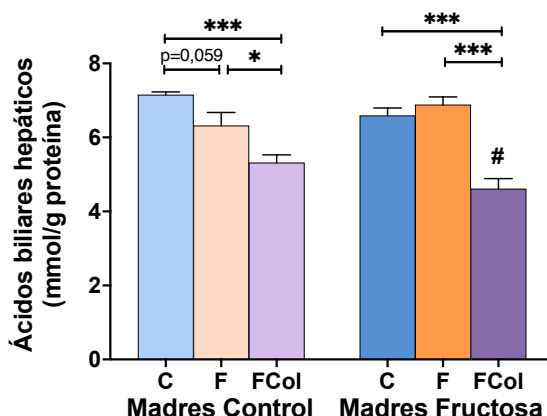


Figura 75: Ácidos biliares hepáticos en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, gráficas en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

3.4. El consumo materno de fructosa provoca un aumento en la producción de H₂S en TAL.

En el TAL se observó un efecto muy llamativo sobre la producción de H₂S, que resultó ser dependiente de la dieta materna y no del tratamiento que recibía la descendencia (Figura 67C), siendo además la producción de H₂S, principalmente no enzimática (Figura 66). De hecho, para poder conocer la implicación de la producción enzimática en el TAL fue necesario incrementar el tiempo de incubación de las muestras tratadas con EDTA hasta las 24 horas para obtener precipitados de acetato de plomo que pudieran ser detectados adecuadamente por densitometría (Figura 76).

La mayor producción de H₂S en los machos descendientes de madres-fructosa frente a los descendientes de madres control resultó ser debida a un aumento significativo tanto de la acción no enzimática (Figura 77A y Figura 78A) como enzimática (Figura 77B y Figura 78B) no importando el tipo de dieta que recibieron una vez adultos. Sin embargo, la producción enzimática de H₂S no se corresponde con la expresión de la CSE ni de la 3MST en TAL ni en los descendientes de madres control ni en los de madres-fructosa sometidos a las diferentes dietas (Figura 77C y D y Figura 78C y D). Este hecho podría ser debido a que la CSE presentara modificaciones postranscripcionales que pudieran provocar diferencias entre la expresión génica y la actividad enzimática final (Sbodio et al., 2019). Por otro lado, aunque otros autores han descrito la expresión de la CBS en tejido adiposo (Feng et al., 2009; G. Yang et al., 2018), nosotros no fuimos capaces de detectarla por PCR a tiempo real.

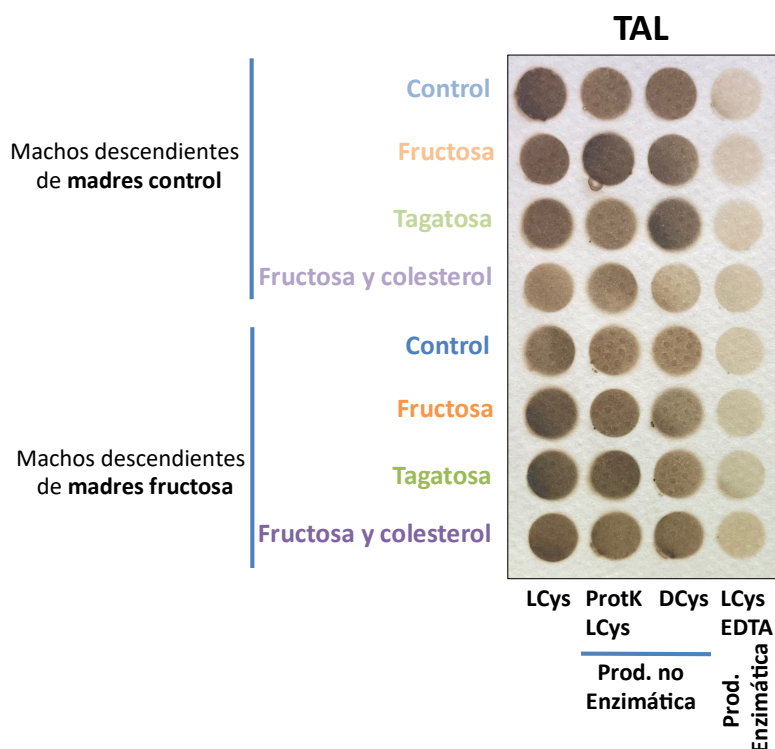


Figura 76: Producción enzimática y no enzimática de H₂S en tejido adiposo lumbar (TAL) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (parte superior) y madres-fructosa (parte inferior) tratados con agua sin aditivos (azul), agua con un 10% (p/v) de fructosa (naranja), agua con un 10% (p/v) de tagatosa (verde) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (morado). La producción de H₂S se determinó por el método del sulfato de plomo en homogenados en PBS. La producción total se midió usando L-Cisteína (LCys), la producción no enzimática mediante el tratamiento previo de la muestra con proteínasa K (ProtK LCys) o usando D-Cisteína (DCys) y la producción enzimática tratando a los homogenados con EDTA antes de incubarlos con LCys (LCys EDTA). En todos los casos se utilizó piridoxal 5-fosfato (PLP) como cofactor y se incubaron todas las muestras a la vez durante 24 horas para conseguir un precipitado detectable por densitometría en las muestras tratadas con EDTA.

Según todo esto, a diferencia de lo encontrado en la producción de H₂S, se observa una disminución significativa de la expresión de la CSE y la 3MST en los machos de madres-fructosa que consumieron fructosa en comparación con los machos con esa misma dieta, pero de madres control (Figura 77C y D). En cambio, en los machos que consumieron tagatosa, sí que aparece una tendencia al aumento de la expresión de la CSE en los descendientes de madres-fructosa frente a los de madres control (Figura 77C), mientras que la 3MST no presenta diferencias (Figura 77D). En cuanto a la asociación del consumo de fructosa en la bebida y colesterol en la dieta podemos ver cómo de nuevo la producción de H₂S es mayor en los descendientes de madres-fructosa, pero ni la expresión de la CSE ni de la 3MST mostraron diferencias significativas entre los descendientes de madres control y los de madres-fructosa sometidos a dicho tratamiento (Figura 78C y D).

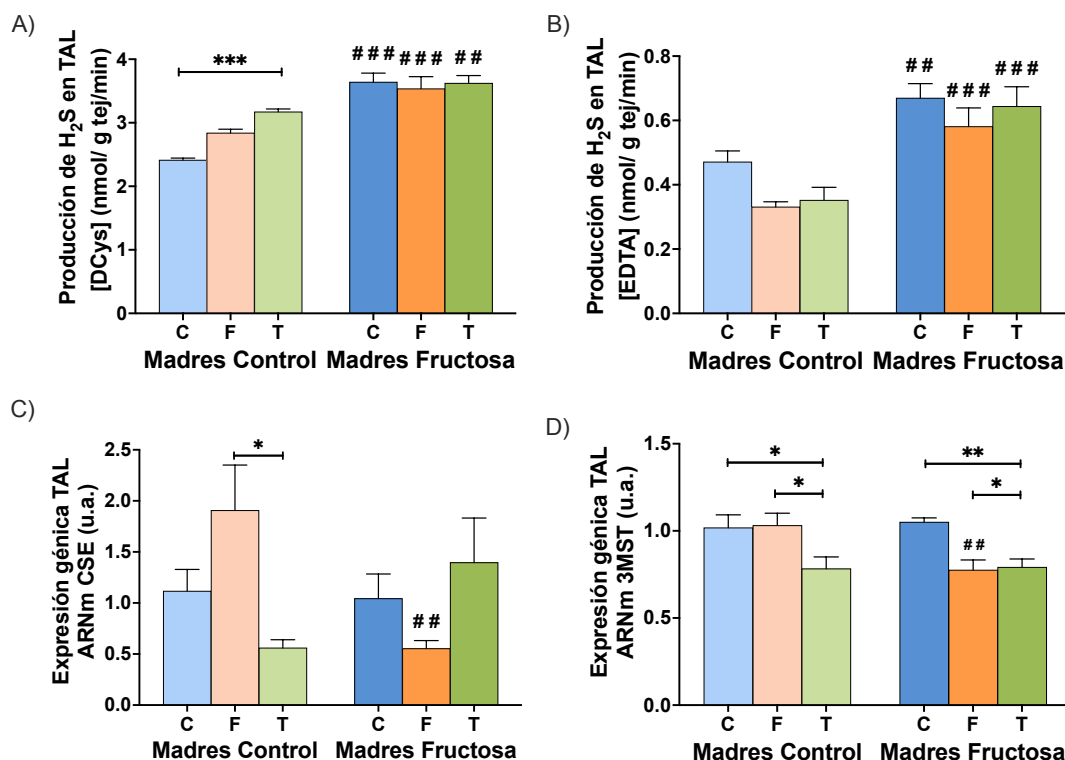


Figura 77: Producción de H₂S en tejido adiposo lumbar (TAL) tras tratar el homogenado con con D-Cisteína (DCys) (no enzimática) (A) o con EDTA y L-Cisteína (enzimática) (B). Expresión génica (ARNm) en TAL de las enzimas de la transulfuración: CSE (C) y 3MST (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de tagatosa (T, barras verdes). Los datos se expresan como media ± error estándar de 7-8 animales. La producción de H₂S no enzimática se incubó 6 horas y la producción enzimática 24 horas a 37°C. La expresión génica se determinó por PCR a tiempo real usando HPRT como gen de referencia. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, P < 0.05; ##, P < 0.01; ###, P < 0.001) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. CSE: cistationina γ -liasa; 3MST: 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa.

En tejido adiposo, el H₂S se ha relacionado con una mayor adiposidad y una mayor acumulación de lípidos (Cai et al., 2016). Por ello, llevamos a cabo una evaluación del peso del TAL, así como de su contenido lipídico. Como puede verse en la Figura 79A, el consumo materno de fructosa se relaciona con una mayor cantidad de TAL en los descendientes que tomaron agua sin aditivo o fructosa en comparación con los machos de madres control sometidos las mismas dietas. Dado que no se observan cambios en la cantidad ni de lípidos totales (Figura 79B) ni de triglicéridos (Figura 79C) podemos asumir que el consumo de fructosa en la gestación genera una mayor cantidad de adipocitos en la descendencia, pero estos no se cargan más de lípidos. Para confirmar la alteración del TAL en los machos descendientes de madres-fructosa se midieron en plasma la concentración de leptina y adiponectina, dos hormonas generadas en el tejido adiposo. Como puede apreciarse en la Figura 79D y E, se observa una clara tendencia a una mayor concentración de las dos adipoquinas en plasma de los descendientes de madres-fructosa, que se hace más evidente

Capítulo 4

para la adiponectina en el grupo control, en comparación con los descendientes de madres control que recibieron el mismo tratamiento. Por otro lado, el consumo de tagatosa no condujo a un mayor peso del TAL asociado al consumo materno de fructosa (Figura 79A). Tampoco aparecen cambios en los lípidos totales ni en los triglicéridos en TAL (Figura 79B y C) ni en la concentración de leptina (Figura 79D), pero sí que se observa un aumento significativo en la concentración de adiponectina (Figura 79E) en los animales que tomaron tagatosa descendientes de madres-fructosa frente a los descendientes de madres control que consumieron el mismo azúcar.

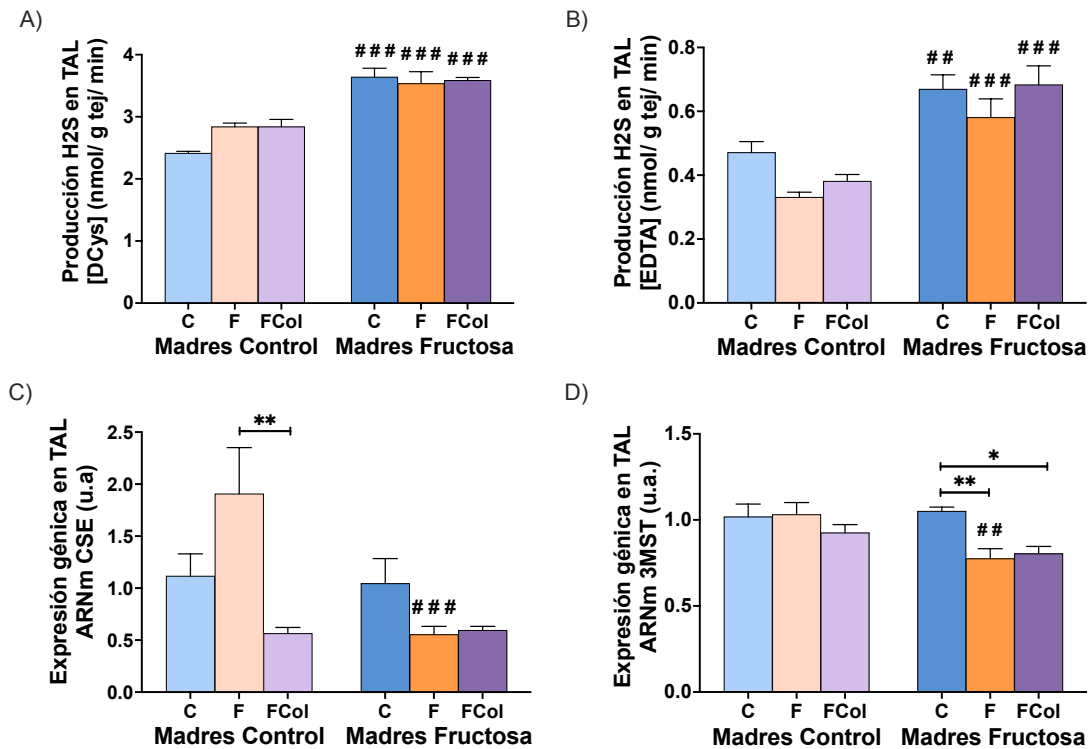


Figura 78: Producción de H₂S en tejido adiposo lumbar (TAL) tras tratar el homogenado con con D-Cisteína (DCys) (no enzimática) (A) o con EDTA y L-Cisteína (enzimática) (B). Expresión génica (ARNm) en TAL de las enzimas de la transulfuración: CSE (C) y 3MST (D) en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). La expresión génica ha sido se determinó por PCR a tiempo real usando HPRT como gen de referencia. Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. La producción de H₂S no enzimática se incubó 6 horas y la producción enzimática 24 horas a 37°C. La expresión génica se determinó por PCR a tiempo real usando HPRT como gen de referencia. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, P < 0.05; ##, P < 0.01; ###, P < 0.001) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta. CSE: cistationina γ -liasa; 3MST: 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa.

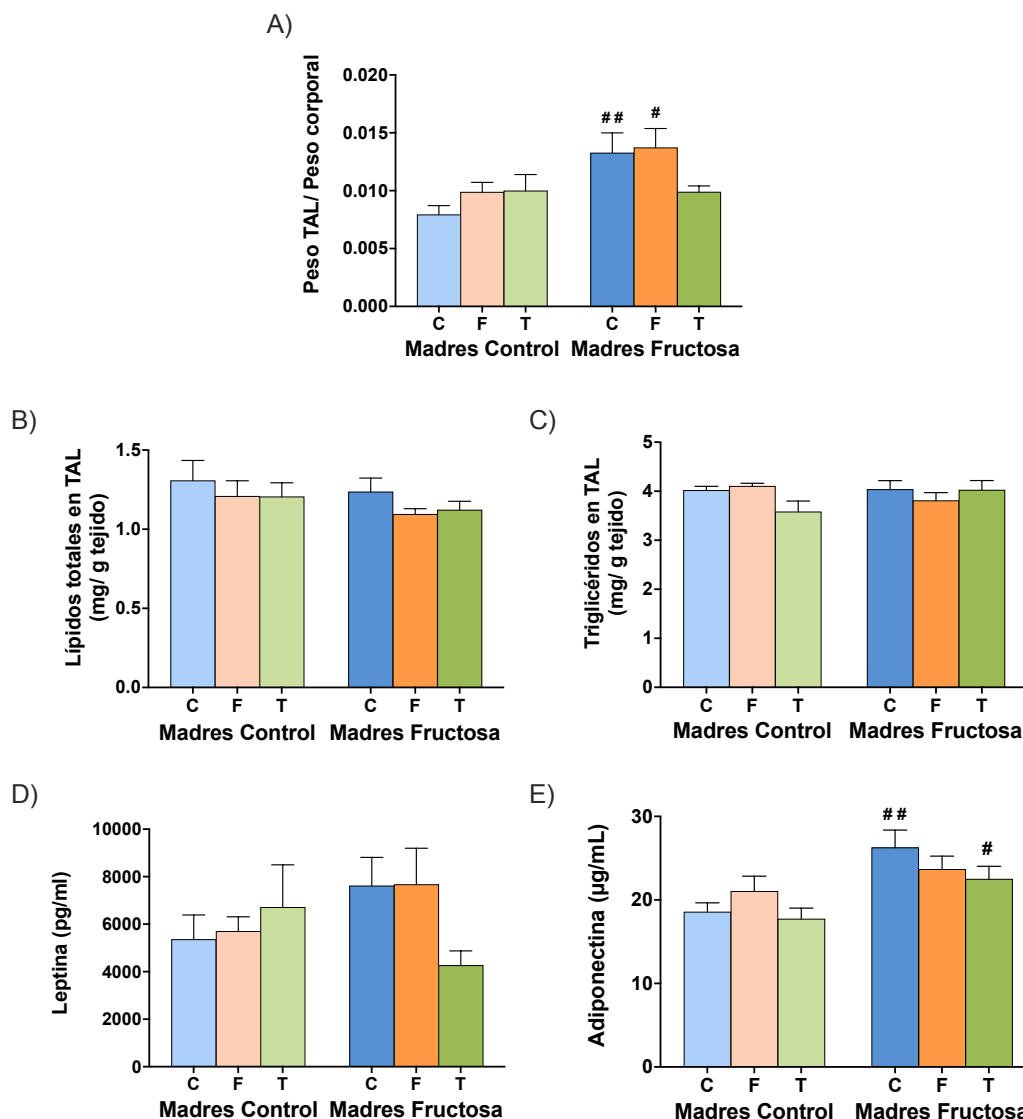


Figura 79: Peso del tejido adiposo lumbar (TAL) (A), lípidos totales (B) y triglicéridos (C) en el TAL y leptina (D) y adiponectina (E) plasmática en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (barras, gráficas en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de tagatosa (T, barras verdes). Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

Se observó un incremento similar en el peso del TAL en los descendientes de madres-fructosa que consumieron fructosa y colesterol, aunque en este caso el aumento en la cantidad de TAL no llegó a ser significativo frente a los machos de madres control alimentados con la misma dieta (Figura 80A). De nuevo, no aparecen cambios en el contenido de lípidos totales ni de triglicéridos en TAL (Figura 80B y C). En cuanto a la concentración plasmática de leptina y adiponectina, los descendientes de madres-fructosa muestran tendencias a una mayor cantidad de ambas adipoquinas, que sólo en el caso de la adiponectina llega a ser

Capítulo 4

significativa frente a los machos control y que consumieron fructosa y colesterol (Figura 80D y E).

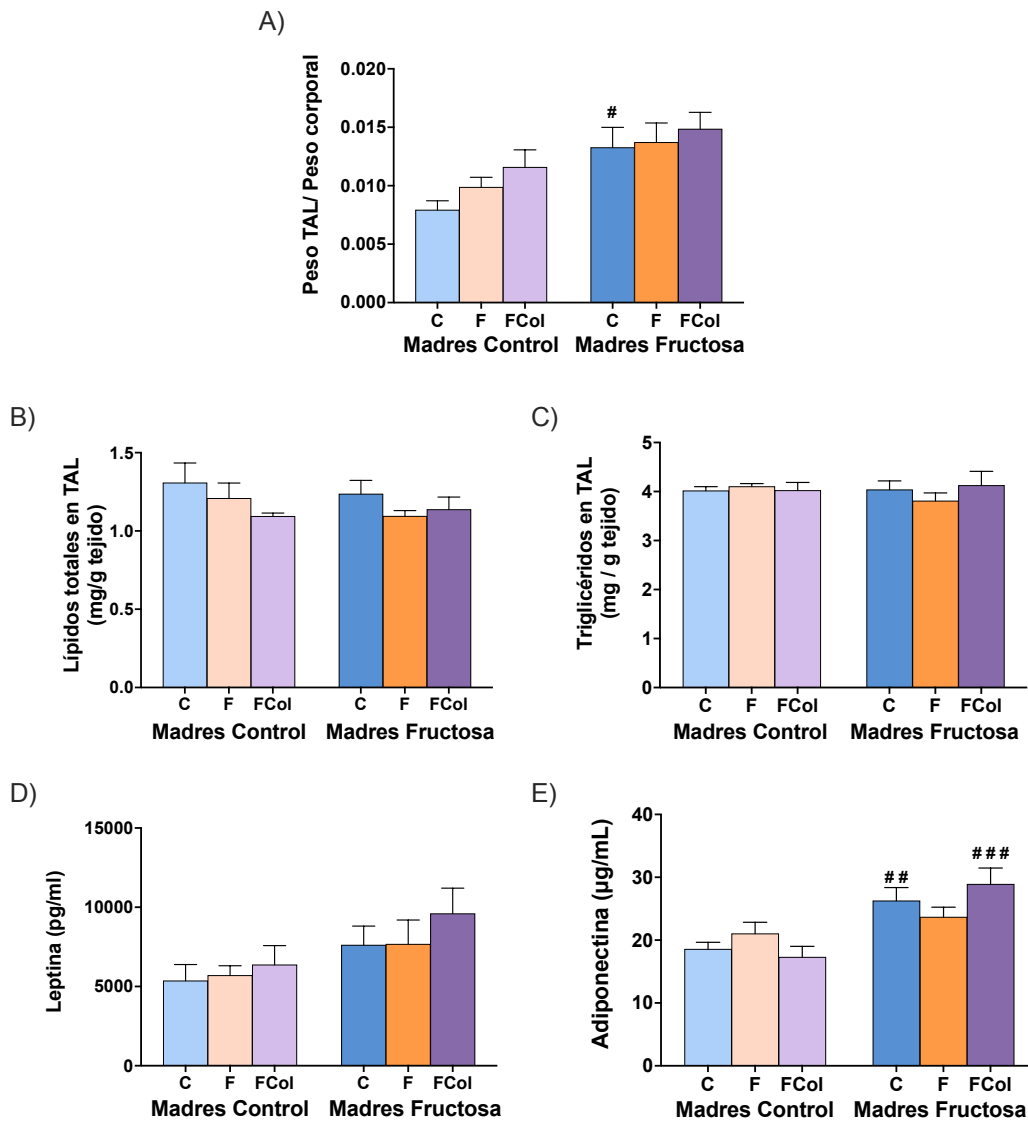


Figura 80: Peso del tejido adiposo lumbar (TAL) (A), lípidos totales (B) y triglicéridos (C) en el TAL y leptina (D) y adiponectina (E) plasmática en los machos de 3 meses de edad descendientes de madres control (izquierda, barras en tonos claros) y madres-fructosa (derecha, barras en tonos oscuros) tratados con agua sin aditivos (C, barras azules), agua con un 10% (p/v) de fructosa (F, barras naranjas) y agua con un 10% (p/v) de fructosa y una dieta con un 2% de colesterol (FCol, barras moradas). Los datos se expresan como media \pm error estándar de 7-8 animales. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) entre machos tratados con diferente dieta en la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron la misma dieta. Las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas (#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$) entre machos tratados con la misma dieta durante la edad adulta, pero que proceden de madres que recibieron diferente dieta.

4. Discusión

El H₂S se genera en la transulfuración como un mecanismo para transformar la homocisteína en cisteína y H₂S (Predmore et al., 2012). Numerosos tejidos son capaces de generar este gasotransmisor, pero el hígado presenta un papel central debido a su mayor capacidad de expresión de las enzimas de la transulfuración frente a otros tejidos (Kabil et al., 2011). En el presente estudio, hemos descrito una disminución importante y significativa de la producción total hepática de H₂S en ratas macho jóvenes que consumieron fructosa, no importando si sus madres habían recibido o no fructosa en la gestación. Sorprendentemente, este efecto es exclusivo del hígado, ya que otros tejidos como el íleon no presentaban tales cambios. Otro ejemplo de cambios dependientes de tejido en la transulfuración ha sido recientemente descrito por Bithi y col. (Bithi et al., 2021). Así, la restricción calórica aumenta la producción de H₂S en el hígado y el riñón de manera dependiente de la CSE, mientras que otros tejidos no se ven afectados por la dieta o la expresión de la enzima (Bithi et al., 2021). Es más, nosotros también hemos visto una correlación entre la expresión de la CSE y la producción enzimática de H₂S en hígado, ya que los machos que consumieron fructosa y colesterol aunque no vieron afectada la expresión de la CBS y la 3MST en hígado frente a los machos control, la inhibición de la CSE conllevaba una paralela disminución de la producción de H₂S en hígado, lo cual es lógico ya que es conocida la mayor actividad de la CSE frente a la CBS en el hígado (Kabil et al., 2011). Efectos opuestos en la expresión de la CSE y la CBS hepática han sido previamente descritos en dietas ricas en grasa como posible mecanismo compensatorio (Peh et al., 2014). A pesar de esto, esta es la primera vez en la que se describe que el consumo de colesterol acentúa la disminución de la producción de H₂S en el hígado asociada al consumo de fructosa no importando si son descendientes de madres que han consumido fructosa durante la gestación o no. Además, es importante señalar que este efecto parece ser exclusivo de la inhibición de la CSE por parte de la fructosa, ya que la administración de tagatosa no afecta ni a la expresión la CSE ni a la producción de H₂S.

La inhibición de la CSE por la fructosa ha sido previamente descrita por nosotros y otros autores a nivel hepático y cardiovascular, así como la mejora del estrés oxidativo y de la resistencia a la insulina asociada a la administración de H₂S (Fauste et al., 2020a; Fauste et al., 2020b; Ling et al., 2012; Padiya et al., 2014; Padiya et al., 2011). A pesar de la relación existente entre el consumo de fructosa y el desarrollo de síndrome metabólico y alteraciones cardiovasculares (Tappy & Lê, 2010), pocos estudios han valorado los mecanismos que podrían estar implicados en la inhibición de la transulfuración por parte de la fructosa. Además, es posible que la afectación en la producción de H₂S esté implicada en los efectos negativos asociados al consumo de este azúcar, como ocurre con los efectos beneficiosos de la restricción calórica (Hine et al., 2015). En un estudio previo, vimos en ratas hembra adultas que tomaron fructosa y cuyas madres habían consumido o no fructosa, que la inhibición de la CSE en el hígado podría estar mediada por la afectación de FXR o los niveles de calcio [Capítulo 2 de la presente tesis doctoral] (Fauste et al., 2020a). En esta ocasión, nos propusimos ahondar también en los mecanismos que regulan la expresión de la CSE y que podrían estar controlados por la fructosa y el colesterol.

La expresión de la CSE se encuentra regulada de una manera compleja por numerosos factores de transcripción (Sbodio et al., 2019). Dos de ellos son ATF4 y Nrf2, factores de transcripción que además de la CSE, presentan como genes diana numerosas enzimas antioxidantes. Ambos han mostrado estar implicados en la regulación de la transulfuración mediada por la CSE en situaciones relacionadas con la dieta y el manejo del estrés oxidativo (Jonsson et al., 2021; Li et al., 2016). En este estudio, ni la expresión de ATF4 ni la de la HO1 o la actividad de la SOD2, dos de los principales genes diana de Nrf2, se vieron modificados por el consumo de fructosa, aunque ATF4 se encuentra incrementado en los descendientes de madres control que consumieron fructosa y colesterol, lo cual no se podría relacionar con la reducción observada en la expresión de la CSE. Esto implicaría que, aunque se haya descrito que la fructosa es capaz de activar el estrés oxidativo en mayor medida que la glucosa (Rodrigo et al., 2016; Y. Yang et al., 2018), en este modelo animal de ratas jóvenes sometidas a una dieta con fructosa, no se produce un desequilibrio redox. De hecho, ni la actividad de otras enzimas antioxidantes ni marcadores de estrés oxidativo en hígado se encontraron alterados en ninguno de los grupos estudiados (datos no mostrados). Estos resultados podrían deberse a la edad de las ratas, de hecho, se ha descrito previamente que ratas jóvenes sometidas tanto a fructosa en agua de bebida al 10% como al 60%, no presentan cambios en el estrés oxidativo hepático (Giban et al., 2015; Nestorov et al., 2014).

Otro importante regulador de la CSE es el calcio, ya que es capaz de estabilizar Sp1, favoreciendo la expresión de la CSE (Zhao et al., 2014), aunque hay autores que postulan los efectos bifásicos de este compuesto sobre la actividad de la CSE (Bosc et al., 2017; Ishii et al., 2004; Mikami et al., 2013). En nuestro modelo, no aparecen modificaciones en la expresión de proteínas sensibles al calcio como son la CHOP o la calmodulina 3 (Chin & Means, 2000) debidas al consumo de fructosa sola o asociada a colesterol, lo cual es sorprendente debido al claro efecto del calcio que se observó en las ratas hembra adultas descendientes de madres-fructosa sometidas a una dieta enriquecida con fructosa [Capítulo 2 de la presente tesis doctoral] (Fauste et al., 2020a). El factor de transcripción Sp1 se encuentra también regulado a nivel epigenético por miR21 y miR22, favoreciendo su degradación (Cindrova-Davies et al., 2013; Yang et al., 2012). Además, miR30 es capaz de actuar sobre el ARNm de la CSE de manera directa (Shen et al., 2015b). Estudios que utilizaban dietas ricas en grasa o azúcares han descrito cambios en la expresión de estos miARN (Hu et al., 2020; Rodrigues et al., 2017; Sud et al., 2017), pero en el presente modelo experimental no se encuentran alterados ni ayudan a explicar la disminución de la expresión de la CSE asociada al consumo de fructosa con o sin una dieta rica en colesterol.

El metabolismo hepático de la fructosa está mediado por la cetohecoquinasa (KHK), una enzima que fosforila la fructosa a fructosa-1-fosfato, y la aldolasa B que transforma ésta en triosas fosfato que entran en la glucólisis saltándose sus principales puntos de regulación (Tappy & Lê, 2010). La fructosa es capaz de activar su propio metabolismo potenciando el desarrollo de las alteraciones asociadas a su consumo. De hecho, se ha demostrado que la inhibición de la KHK consigue reducir muchas alteraciones provocadas por la ingesta de fructosa (Gutierrez et al., 2021; Ishimoto et al., 2012; Lanaspá et al., 2018; Lanaspá et al., 2012a). Esto es debido a que dicha inhibición evita la formación de productos secundarios del metabolismo de la fructosa, como el ácido úrico o la fructosa 1-fosfato (Ishimoto et al., 2012;

Lanaspa et al., 2018). En el presente estudio, el consumo de fructosa o de fructosa y colesterol consigue activar la expresión de la KHK y la aldolasa B únicamente en el hígado, mientras que la tagatosa no lleva a cabo ese efecto. Aunque previamente se han descrito disminuciones de los niveles de H₂S asociados al consumo de fructosa y una mejora del síndrome metabólico tras administrar compuestos que liberan H₂S (Padiya et al., 2011), esta es la primera vez que se ha establecido una relación tan clara entre la disminución de la expresión hepática de la CSE asociada al consumo de fructosa y las principales enzimas encargadas del metabolismo de esta. De hecho, otras enzimas también estrechamente relacionadas con el metabolismo hepático de la fructosa se encuentran alteradas en el presente modelo experimental (FAS, SCD1, CPT1, ABCG5) de manera similar a la CSE hepática. Numerosos estudios han relacionado el consumo de fructosa y su metabolismo hepático con el desarrollo de síndrome metabólico e hígado graso no alcohólico tanto en animales de experimentación (Loza-Medrano et al., 2020; Miyazaki et al., 2004; Roglans et al., 2007) como en humanos (Perez-Pozo et al., 2010). Efectos similares relacionados con la acumulación lipídica hepática y el estrés oxidativo que se han asociado al consumo de fructosa, también aparecen en situaciones en las que la producción de H₂S se ha visto reducida en el hígado (Luo et al., 2014). Incluso la administración de H₂S en ratones alimentados con una dieta rica en grasa consigue reducir la acumulación lipídica hepática (D. Wu et al., 2015).

Para confirmar que la inhibición de la CSE hepática está mediada por el metabolismo hepático de la fructosa llevamos a cabo el estudio de la expresión de la KHK y la aldolasa B en íleon, ya que es un tejido capaz de metabolizar la fructosa por acción de las dos enzimas (Diggle et al., 2009). Y pudimos constatar que el efecto observado en hígado sobre la producción de H₂S asociado al consumo de fructosa con o sin una dieta rica en colesterol, se perdía en este tejido. Los resultados obtenidos son sorprendentes, ya que la expresión de la KHK o los niveles de proteína en intestino se han visto incrementados tras el consumo de fructosa en animales de experimentación, así como otras enzimas relacionadas con el metabolismo de la fructosa (Jang et al., 2020; Patel et al., 2015), pero nosotros no hemos visto diferencias significativas en la expresión de la KHK o la aldolasa B en íleon asociadas al consumo de fructosa. Estas diferencias podrían deberse a que los estudios de Jang y Patel fueron realizados en yeyuno y no en íleon. Estos resultados corroboran la relación existente entre la expresión de la CSE y el metabolismo de la fructosa, ya que cuando la KHK y la aldolasa B no se encuentran alteradas, tampoco se observan cambios en la expresión de la CSE ni en la producción de H₂S y viceversa.

Los efectos del consumo de fructosa sobre la transulfuración hepática aún se agravan más cuando esta se asocia a una dieta rica en colesterol así, no importando el tratamiento materno, estos grupos presentan una disminuida producción de H₂S hepática que se corresponde con una menor expresión de la CSE, que es significativa frente a los machos control o que tomaron fructosa. Este efecto puede ser debido a que, unido al mayor metabolismo de la fructosa por parte de la KHK y la aldolasa B en el hígado, se observa una disminución significativa de los niveles de ácidos biliares hepáticos en los machos que consumieron fructosa y colesterol, no importando el tratamiento materno. Aunque la función mejor conocida de los ácidos biliares es la de favorecer la absorción de las grasas en el intestino, en los últimos años han adquirido gran importancia como moléculas reguladoras del

metabolismo, ya que son capaces de activar a FXR y TGR5 (o GPBAR1), un factor de transcripción y un receptor de membrana, respectivamente, claves en el metabolismo lipídico y de carbohidratos (Chiang & Ferrell, 2019). El promotor de la CSE presenta secuencias diana para FXR (Renga et al., 2009), por lo que la activación de este factor de transcripción por unos niveles aumentados de ácidos biliares intracelulares conlleva un aumento en la expresión de la CSE (Fiorucci et al., 2017). De hecho, ratones KO para FXR presentan una menor expresión de la CSE, efecto que también se ve asociado a la cirrosis hepática y que es revertido en esta patología con la administración de ligandos de FXR (Renga et al., 2009). El exceso de colesterol debido a la dieta puede estar siendo eliminado por bilis en forma de ácidos biliares, hecho que ha sido previamente descrito por otros autores (Yasuda et al., 2008). Esta hipótesis parece estar confirmada en el presente estudio debido que la concentración de ácidos biliares en heces de los animales que recibieron fructosa y colesterol aumenta significativamente con respecto a los animales, tanto en descendientes de madres control como de madres-fructosa (Figura 62B). Como consecuencia, la mayor eliminación de ácidos biliares asociada al consumo de fructosa y colesterol supondría un descenso significativo de los niveles de ácidos biliares hepáticos que podría suponer una menor activación de FXR, provocando una inhibición todavía mayor de la expresión de la CSE y, como consecuencia, una reducida producción de H₂S. Dada la importancia de la transulfuración hepática en el control de los niveles de H₂S en el organismo (Zhao et al., 2014), el consumo de fructosa y colesterol en animales jóvenes podría implicar una mayor probabilidad de desarrollo de afectaciones cardiovasculares y empeoramiento del síndrome metabólico asociado al consumo de fructosa (Tappy & Lê, 2010) siendo este efecto independiente de la dieta materna.

En tejido adiposo, se ha demostrado la capacidad de expresión tanto de la CSE, la CBS y la 3MST (Feng et al., 2009), pero nosotros no hemos sido capaces de medir la expresión de la CBS en este modelo experimental. Posiblemente, se debería a que la enzima principal implicada en la transulfuración en el tejido adiposo parece ser la CSE y que la CBS se expresa en mucha menor medida (Feng et al., 2009). A pesar de la capacidad de producción enzimática de H₂S, en el presente estudio hemos podido comprobar que en el TAL la producción de este gasotransmisor es mayoritariamente no enzimática. Poco se sabe de la generación no enzimática de H₂S en el organismo, pero se ha descrito recientemente que depende de PLP y hierro, además de que en función del tejido analizado su implicación parece ser más o menos importante (J. Yang et al., 2019). En nuestro conocimiento esta es la primera vez que se evidencia en TAL la relevancia de la producción no enzimática de H₂S.

Sorprendentemente, en TAL hemos encontrado un efecto en la producción de H₂S que es dependiente de la dieta materna. De esta manera, los machos descendientes de madres-fructosa muestran una mayor producción de H₂S en TAL que los descendientes de madres control. Dicho efecto es debido a un aumento, tanto de la producción no enzimática como la enzimática, y es independiente del tratamiento que recibieron los machos a los 3 meses de edad. Aunque se haya descrito que el H₂S presenta efectos beneficiosos en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular y evita la aparición de alteraciones relacionadas con el síndrome metabólico (Shen et al., 2015b; D. Wu et al., 2015), en tejido adiposo su papel parece más controvertido. De hecho, se ha descrito que el H₂S promueve la adipogénesis por activación de PPAR γ por S-sulfhidración (Cai et al., 2016; Guangdong Yang et al., 2018). Es más, dietas ricas

en grasa han mostrado incrementos en la producción de H₂S en tejido adiposo blanco asociados a un mayor peso del tejido debido a una mayor S-sulfhidración de PPAR γ (G. Yang et al., 2018). En el presente modelo experimental, no se han observado diferencias en el incremento de peso de los machos asociado al consumo de fructosa con o sin una dieta rica en colesterol (Figura 52D), pero sí que encontramos un incremento del peso del TAL dependiente del tratamiento materno. Así, los descendientes de madres-fructosa que recibieron en la edad adulta agua sin aditivos, agua con fructosa y agua con fructosa y una dieta rica en colesterol muestran incrementos en el peso del TAL comparado con los respectivos descendientes de madres control y dichos efectos se corresponde con la mayor producción de H₂S en este tejido. El consumo de fructosa durante la gestación se ha asociado previamente con una mayor acumulación de tejido adiposo en la descendencia, así como con el mayor tamaño de los adipocitos en el tejido (Alzamendi et al., 2016; Tobar-Bernal et al., 2021). Se ha descrito en animales con una dieta rica en grasa que el tejido adiposo genera más H₂S, lo cual provoca un mayor tamaño de los adipocitos, pero que al inhibir la CSE el tamaño disminuye (G. Yang et al., 2018). Los resultados aquí encontrados nos indicarían que el consumo de fructosa durante la gestación provocaría una alteración en el tejido adiposo de la descendencia a una edad temprana, probablemente mediado por una mayor producción de H₂S.

En resumen, en el presente estudio se ha demostrado por primera vez que la fructosa es capaz de inhibir la producción H₂S al reducir la expresión de la CSE de manera exclusiva en el hígado de ratas macho jóvenes descendientes de madres control y madres-fructosa. Además, esta inhibición de la CSE parece estar mediada por el propio metabolismo hepático de la fructosa que se encuentra activado en estos animales, ya que en otros tejidos no se observan diferencias ni en la CSE ni en el metabolismo del carbohidrato. Esta menor producción hepática de H₂S está más acentuada cuando al consumo de fructosa se le asocia una dieta rica en colesterol, en este caso debido a una reducción en los niveles de ácidos biliares hepáticos que reducirían la actividad de FXR, factor de transcripción que regula la CSE. La menor expresión de la CSE y de la producción del gasotransmisor en el hígado podrían conducir a alteraciones cardiovasculares y al desarrollo de síndrome metabólico asociado al consumo de fructosa. Por otro lado, se ha puesto de manifiesto la importancia de la producción no enzimática de H₂S en TAL. Además, el consumo de fructosa durante la gestación provoca un aumento en la producción del gasotransmisor en TAL de la descendencia macho y que podría estar relacionado con una mayor adipogénesis y cantidad de tejido. Es destacable el hecho que estos efectos sobre la transulfuración se observan desde una edad temprana de estos animales, lo cual podría verse agravado en la edad adulta, así como sus consecuencias a nivel sistémico. A pesar de todo, para confirmar estos resultados, sería necesario ahondar en mayor profundidad en los mecanismos que regulan la CSE en hígado y tejido adiposo para describir cómo la fructosa consigue estos efectos, así como bloquear la KHK y/o la aldolasa B, enzimas que parecen las principales implicadas en el proceso de regulación de la CSE en el hígado.

Capítulo 5: La gestación es suficiente para provocar efectos perjudiciales en las descendientes de madres-fructosa y en sus fetos.

1. Introducción

Durante la gestación la salud de la madre es fundamental para el correcto desarrollo de la descendencia. De hecho, numerosos estudios han mostrado como una nutrición inadecuada y/o la presencia de enfermedades, como la obesidad y la diabetes, durante el embarazo pueden causar alteraciones cardiovasculares y metabólicas en la descendencia una vez adulta (Gaillard, 2015). El mecanismo que explica estos efectos se conoce como programación fetal (Perrone et al., 2016). En este proceso, la placenta desempeña un papel fundamental, porque controla la correcta llegada de nutrientes y protege al feto asegurando su correcto desarrollo (Desoye et al., 2011). Tanto la malnutrición como la sobrenutrición materna pueden provocar efectos deletéreos en la descendencia, como una alterada respuesta hormonal, estrés oxidativo y modificaciones epigenéticas (Kwon & Kim, 2017; Symonds et al., 2009). Es más, se ha descrito que existe un mayor riesgo de sufrir alteraciones cardiovasculares y diabetes en los descendientes de madres obesas o diabéticas (Agarwal et al., 2018; Neri & Edlow, 2015).

Según la hipótesis de la respuesta adaptativa predictiva aquellos animales cuyas madres han consumido dietas ricas en sacarosa deberían exhibir un perfil metabólico más favorable tras la ingesta de este tipo de dietas en la edad adulta. Sin embargo, numerosos artículos han mostrado que la ingesta materna de dietas ricas en azúcar no protege a la progenie de las alteraciones metabólicas inducidas por el consumo de azúcares en la descendencia (Kendig et al., 2015; Sedová et al., 2007). Es más, la programación fetal permanece activa de generación en generación cuando la exposición al agente estresante ocurre durante periodos críticos de la vida, tales como la gestación y la lactancia (Portha et al., 2019). Durante dichos períodos, cuando las gestantes F0 están expuestas a un agente estresante, sus descendientes hembra F1, en la etapa fetal, también están en contacto con ese factor. Cuando estas hembras F1 se quedan preñadas, tanto si se exponen de nuevo al agente estresante, como si no, la salud metabólica de sus descendientes (F2) ya se encuentra afectada, y así sucesivamente (Seong et al., 2019; Song et al., 2017). A pesar de esto, los estudios en animales roedores evaluando a largo plazo la descendencia una vez adulta y su posterior gestación son todavía escasos.

La fructosa en forma de jarabe de maíz rico en fructosa se ha utilizado de forma extensiva como azúcar añadido en bebidas azucaradas y alimentos procesados debido a su mayor capacidad edulcorante y su mayor solubilidad en agua. Incluso, en EEUU ha llegado a sustituir a la sacarosa como principal azúcar añadido (White & Nicklas, 2016). Múltiples estudios han establecido una relación estrecha entre el consumo de fructosa y el aumento en la incidencia de obesidad, síndrome metabólico, hígado graso no alcohólico y resistencia a la insulina (Alwahsh & Gebhardt, 2017; Bray et al., 2004; Catena et al., 2003; Lim et al., 2010). Es más, nosotros y otros autores hemos demostrado en animales de experimentación que el consumo de fructosa durante la gestación conduce a alteraciones metabólicas en la descendencia, incluso cuando esta llega a ser adulta (Li et al., 2015; Rodríguez et al., 2015; Rodríguez et al., 2016a; Rodríguez et al., 2016b; A. F. Saad et al., 2016; Tain et al., 2014). A pesar de esto, el consumo de bebidas azucaradas y alimentos ricos en fructosa siguen estando permitidos durante la gestación.

Los efectos del consumo de fructosa durante la gestación han sido previamente estudiados usando dietas ricas en sacarosa. Así, el consumo de sacarosa (frente a una cantidad

equiparable de almidón de maíz) generó una situación de hipertrigliceridemia materna que pudo contribuir al efecto negativo de la sacarosa en los fetos (Rodríguez et al., 2013). Estudios en roedores han demostrado que la fructosa durante la gestación puede también reducir de manera significativa el peso de la placenta (Vickers et al., 2011). El efecto del consumo materno de azúcares en la obesidad, la resistencia a insulina y la enfermedad cardiovascular en la descendencia y en las gestantes ha sido previamente estudiado. De esta manera, varios estudios en animales de experimentación han encontrado que el consumo materno de dietas con un 75% de dextrosa y maltodextrina conlleva un aumento en el peso corporal y una situación de resistencia a insulina en las madres y los fetos cuando se compara con madres que consumen una dieta compuesta por un 35% de carbohidratos simples. Es más, estos autores han propuesto que una dieta materna rica en fructosa administrada durante la gestación tiene unos efectos negativos similares en la salud materna y fetal a las dietas ricas en dextrosa/maltodextrina (Kereliuk et al., 2017). En cambio, en un estudio que compara el consumo de glucosa *versus* fructosa concluye que durante la gestación es más la cantidad que el tipo de carbohidrato, lo que determina el correcto desarrollo fetal y postnatal (Fergusson & Koski, 1990).

Previamente, nuestro grupo de investigación ha descrito como el consumo de fructosa durante la gestación genera hipertrigliceridemia, acumulación hepática de triglicéridos y una deficiente respuesta a leptina en las gestantes, junto con una alterada respuesta a leptina y esteatosis hepática en los fetos (Rodríguez et al., 2013). Posteriormente observamos que el consumo materno de fructosa provocó en la descendencia macho una vez adulta una alteración en la señal de la insulina e hipoadiponectinemia. Sorprendentemente, la descendencia hembra de madres-fructosa no presentaba estas alteraciones (Rodríguez et al., 2016b). Estos resultados nos llevaron a establecer la hipótesis de que estas hembras en realidad mantenían un fenotipo programado oculto. Esta hipótesis se confirmó al observar que cuando esas hembras descendientes de madres-fructosa fueron expuestas al consumo de fructosa en la edad adulta, presentaron una clara dislipemia y esteatosis hepática en comparación con las descendientes de madres control o con descendientes no suplementadas con fructosa en la edad adulta (Rodríguez et al., 2016a).

Teniendo en cuenta todos los antecedentes anteriormente descritos, en el presente estudio nos planteamos responder a las siguientes cuestiones: 1) teniendo en cuenta que la gestación es un estado fisiológico en el cual se producen cambios muy importantes en el metabolismo lipídico y glucídico y en la respuesta a la insulina y la leptina en las gestantes, ¿sería posible que la gestación *per se* fuera capaz de revelar el fenotipo programado que se encontraba inicialmente oculto en las hembras descendientes de madres que consumieron fructosa? y, 2) dado que previamente observamos en las descendientes hembra no gestantes de madres-fructosa que la reexposición a fructosa conseguía mostrar el fenotipo desfavorable (Rodríguez et al., 2016a), ¿qué efectos produciría esta reexposición a fructosa cuando las descendientes estaban preñadas?. Es más, nos planteamos conocer si esta situación pudiera afectar también a sus fetos y estudiamos el papel de la placenta en todo el proceso.

2. Materiales y métodos

2.1. Animales y diseño experimental

Ratas hembra Sprague-Dawley con un peso entre 200 a 240 g fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta estándar de rata (Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Envigo, USA), y se matuvieron bajo unas condiciones controladas de luz y temperatura (12h de ciclos de luz-oscuridad; $22\pm 1^{\circ}\text{C}$). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Investigación Animal de la Universidad San Pablo-CEU (números de referencia 10/206458.9/13 and 10/042445.9/19). Los animales fueron cruzados y el día 0 de gestación se confirmó por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal. El protocolo experimental al que se sometieron las ratas gestantes (generación F0) fue el mismo que el previamente descrito por nuestro grupo de investigación (Rodríguez et al., 2013). Brevemente, ratas gestantes se distribuyeron de forma aleatoria en 2 grupos: un grupo control (que recibió agua sin aditivo) y un grupo fructosa (que recibió agua suplementada con un 10% p/v de fructosa) durante toda la gestación (existiendo un total de cinco ratas por grupo). A las gestantes se les dejó parir y ese día se llevó a cabo el ajuste de camadas a 9 crías por madre. Después del nacimiento, tanto las madres como sus crías se mantuvieron con agua y dieta estándar *ab libitum*. El día 21 de edad, la descendencia se separó por género y se realizó el destete. La descendencia hembra se mantuvo con una dieta sólida estándar y agua sin aditivos.

Cuando la descendencia hembra (generación F1) de madres control y fructosa tuvo 8 semanas de edad se cruzaron con machos controles y el día 0 de gestación se confirmó por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal. Posteriormente, las ratas gestantes descendientes de madres control se mantuvieron con comida sólida estándar y agua sin aditivo durante toda la gestación. A este grupo de animales se le denominó grupo control (CC). Por otro lado, las gestantes procedentes de madres-fructosa se distribuyeron al azar en dos grupos. Para minimizar el “efecto camada”, los animales pertenecientes a un mismo grupo experimental proceden de camadas diferentes. Así, un grupo de ratas gestantes recibió dieta estándar y agua sin aditivo (grupo FC) y el otro grupo de ratas gestantes consumió agua suplementada con un 10% de fructosa (p/v) (grupo FF) durante toda la gestación (5 animales por grupo).

Las ratas gestantes fueron decapitadas el día 21 de gestación a las 10h de la mañana habiendo retirado previamente la comida a las 8h. Se recogió la sangre en tubos con EDTA para aislar posteriormente el plasma por centrifugación que se almacenó a -20°C hasta su análisis. Se diseccionó el conceptus, y después de ser pesado, se aislaron y pesaron los fetos. También se extrajeron el hígado y la placenta que fueron pesados y congelados. Los fetos (generación F2) fueron decapitados y se recogieron en un mismo tubo con EDTA varias alícuotas de sangre de todos los fetos procedentes de la misma madre. Se extrajeron también los hígados de los fetos y todos los que procedían de la misma madre se agruparon y se introdujeron en nitrógeno líquido para ser almacenados posteriormente a -80°C hasta su posterior análisis.

Una segunda tanda de animales fue sometida al mismo protocolo mencionado anteriormente y en la mañana del día 20 de gestación, 5 animales por grupo (CC, FC y FF)

Capítulo 5

fueron sometidos a un Test de Tolerancia Oral a la Glucosa (OGTT, del inglés: *Oral Glucose Tolerance Test*) en una situación de ayuno (12 h). Para ello, se tomó una muestra de sangre de la vena de la cola para determinar los valores basales y posteriormente se administró a los animales un bolo de glucosa (2 g/kg) por vía oral. A continuación, se recogieron muestras de sangre de la cola en tubos de EDTA a los 7,5; 15; 22,5; 30 y 60 minutos tras la administración de la glucosa.

Un esquema del protocolo experimental se recoge en la Figura 23 y una descripción más completa del procedimiento experimental se recoge en los Materiales y Métodos Generales.

2.2. Determinaciones plasmáticas

Se utilizaron alícuotas de plasma para medir glucosa, colesterol y triglicéridos (Spinreact, Gerona, España) y ácidos grasos no esterificados (NEFA) (Wako, Japón) mediante kits comerciales. Se emplearon ELISAS específicos de rata para medir insulina (Mercodia, Siecia), leptina (Biovendor, República Checa) y adiponectina (Merck-Millipore, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. El índice de sensibilidad a insulina (ISI) se calculó como el cociente: $[2 / (\text{insulina plasmática } \mu\text{M} \times \text{glucosa plasmática } \mu\text{M}) + 1]$ (Vilà et al., 2011).

2.3. Determinaciones en hígado y placenta

Para la determinación de lípidos totales, triglicéridos y colesterol en hígado y placenta se llevó a cabo una extracción de lípidos por el método de Folch (Folch et al., 1957) como aparece recogido en el apartado Materiales y Métodos Generales. Los extractos fueron completamente evaporados y los lípidos totales se midieron por diferencia de pesada. Los triglicéridos y colesterol se determinaron por kits enzimáticos colorimétricos a punto final (Spinreact, España) según lo descrito en el apartado Materiales y Métodos Generales.

Homogenados en PBS fueron desproteínizados y utilizados para la medida de glucosa en hígado y placenta mediante un kit enzimático colorimétrico (Spinreact, España). Los mismos homogenados en PBS sin desproteínizar fueron utilizados para la medida de malondialdehído (MDA) como marcador de peroxidación lipídica como ha sido previamente descrito (Wong et al., 1987).

Una descripción más completa de todos estos procedimientos aparece descrita en el apartado Materiales y Métodos Generales.

2.4. Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real

El ARN total de hígado de madres y fetos y las placentas fue extraído mediante el kit Ribopure™ (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). El ARN se trató con DNaseI mediante el kit DNA free (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU) y el ADNc se sintetizó mediante retrotranscripción con Superscript II (Invitrogen, ThermoFisher., EEUU). Un termociclador LightCycler 1.5 (Roche, Alemania) fue utilizado para la realización de la PCR a tiempo real utilizando para cada muestra: 10 μL de SYBR *Premix Ex Taq* (Takara Bio Inc., Japón), 1 μL de cebador F 10 μM (IDT

Technologies, EEUU), 1 μL de cebador R 10 μM (IDT Technologies, EEUU), 2 μL de la muestra de ADNc a 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 6 μL de agua mili-Q estéril.

Los parámetros programados para cada gen fueron los indicados por la base de datos de secuencias de cebadores *RT-PCR Primer Sequences for Atlas Nylon Arrays* (Clontech, EEUU) o la aplicación para el diseño de cebadores Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) (Anexo 1). El protocolo general utilizado para llevar a cabo la amplificación de cada gen en *el Light Cycler 1.5* (Roche, Alemania) figura en la Tabla 6. La cuantificación relativa de la expresión de los genes se realizó con el *Software Light Cycler 4.05* basado en el método de $2^{-\Delta\text{Ct}}$ o método de Pfaffl (Pfaffl, 2001) y como gen de referencia se utilizó RPS29.

2.5. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se analizaron mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA), utilizando el programa estadístico SPSS. Cuando el efecto del tratamiento fue estadísticamente significativo ($P < 0.05$), las diferencias entre las medias fueron analizadas mediante el test de Tukey. Cuando no existió homogeneidad de la varianza se llevó a cabo un análisis *post hoc* de Tamhane. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con letras diferentes.

3. Resultados

3.1. La gestación en las descendientes de madres fructosa, suplementadas o no con fructosa durante su gestación, altera la sensibilidad a insulina, la respuesta a leptina y el contenido lipídico en hígado y placenta.

Como se ha descrito previamente (Rodríguez et al., 2016a; Rodríguez et al., 2013; Vickers et al., 2011), el consumo de fructosa condujo a un aumento significativo en la ingesta de líquidos y una reducción no significativa del consumo de dieta sólida (Tabla 27), lo que condujo a un incremento significativo en la ingesta total de energía en las gestantes que tomaron fructosa (FF) frente los otros dos grupos (Tabla 27). Curiosamente, en un estudio previo usando descendientes de madres control, el consumo de fructosa en la gestación provocó el mismo efecto que el observado en el presente estudio, pero la energía total consumida no fue significativamente diferente frente al grupo control (CF *versus* CC) (Rodríguez et al., 2013). Sorprendentemente, en el presente estudio, aunque el peso corporal al comienzo del experimento fue significativamente menor en las descendientes de madres fructosa frente a las procedentes de madres control (FC y FF *versus* CC), no se observaron diferencias en el incremento de peso durante la gestación (peso sin *conceptus*) entre los tres grupos experimentales (Tabla 27). Es más, a pesar del mayor consumo de calorías en el grupo FF, no aparecieron diferencias ni en el peso del *conceptus*, ni en el peso de los fetos, ni en su número en comparación con las gestantes CC y FC (Tabla 27).

Capítulo 5

Tabla 27: Peso corporal, ingesta de comida sólida y bebida en ratas gestantes descendientes de madres que consumieron fructosa sometidas (FF) o no (FC) a fructosa durante su gestación y en las ratas gestantes control (CC).

| | CC | FC | FF |
|---|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Peso corporal madres a día 0 (g) | 203,2±0,2 ^B | 180,0±5,7 ^A | 176,5±1,5 ^A |
| Peso corporal madres a día 21 (g) | 364,0±6,1 | 339,4±7,1 | 334,8±8,3 |
| Incremento de peso (libre de conceptus) (g) | 161,0±5,0 | 159,4±5,6 | 156,1±7,7 |
| Peso del conceptus (g) | 87,6±8,1 | 87,2±4,7 | 79,8±5,8 |
| Número de fetos | 11,8±1,2 | 11,3±1,0 | 10,8±1,0 |
| Peso de los fetos (g) | 5,6±0,1 | 5,9±0,4 | 5,6±0,1 |
| AUC dieta consumida (g/días por rata) | 449,6±16,6 | 437,1±12,5 | 371,1±18,5 |
| AUC líquido ingerido (ml/21 días por rata) | 635,0±41,7 ^A | 699,4±48,2 ^A | 1479,7±139,7 ^B |
| Energía total consumida (Kcal/21 días por rata) | 1304,0 ±48,2 ^A | 1267,4±36,3 ^A | 1668,2±28,7 ^B |

Los datos se expresan como media ± error estándar. n=5 ratas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (p<0,05). AUC: área bajo la curva.

Para estudiar la relación insulina-glucosa, se llevó a cabo un Test de Tolerancia Oral a la Glucosa (OGTT) el día 20 de gestación. Como puede ver en la Figura 81A, los niveles de glucosa plasmática son muy similares en todos los puntos del estudio entre el grupo CC y FC, pero las gestantes del grupo FF presentan una tendencia al aumento de los niveles de glucosa plasmática cuando se compara con los otros dos grupos. Es más, estos aumentos llegan a ser significativos a los 7,5 y 15 minutos del OGTT (Figura 81A). Por consiguiente, el grupo FF presenta un incremento en el área bajo la curva de la concentración de glucosa en plasma que llega a ser significativo frente al grupo FC (Figura 81B). En consonancia con los resultados de glucosa plasmática en el grupo FF, los niveles de insulina plasmática se mantienen elevados en este grupo experimental en todos los puntos de medida del OGTT frente a los otros dos grupos (Figura 81C). Sorprendentemente, el grupo FC también muestra una tendencia a unos mayores niveles de insulina en plasma en comparación con las gestantes CC (Figura 81C). De manera paralela, el área bajo la curva de los niveles de insulina confirma estos perfiles encontrados en los diferentes puntos del OGTT en las gestantes FC y FF (Figura 81D).

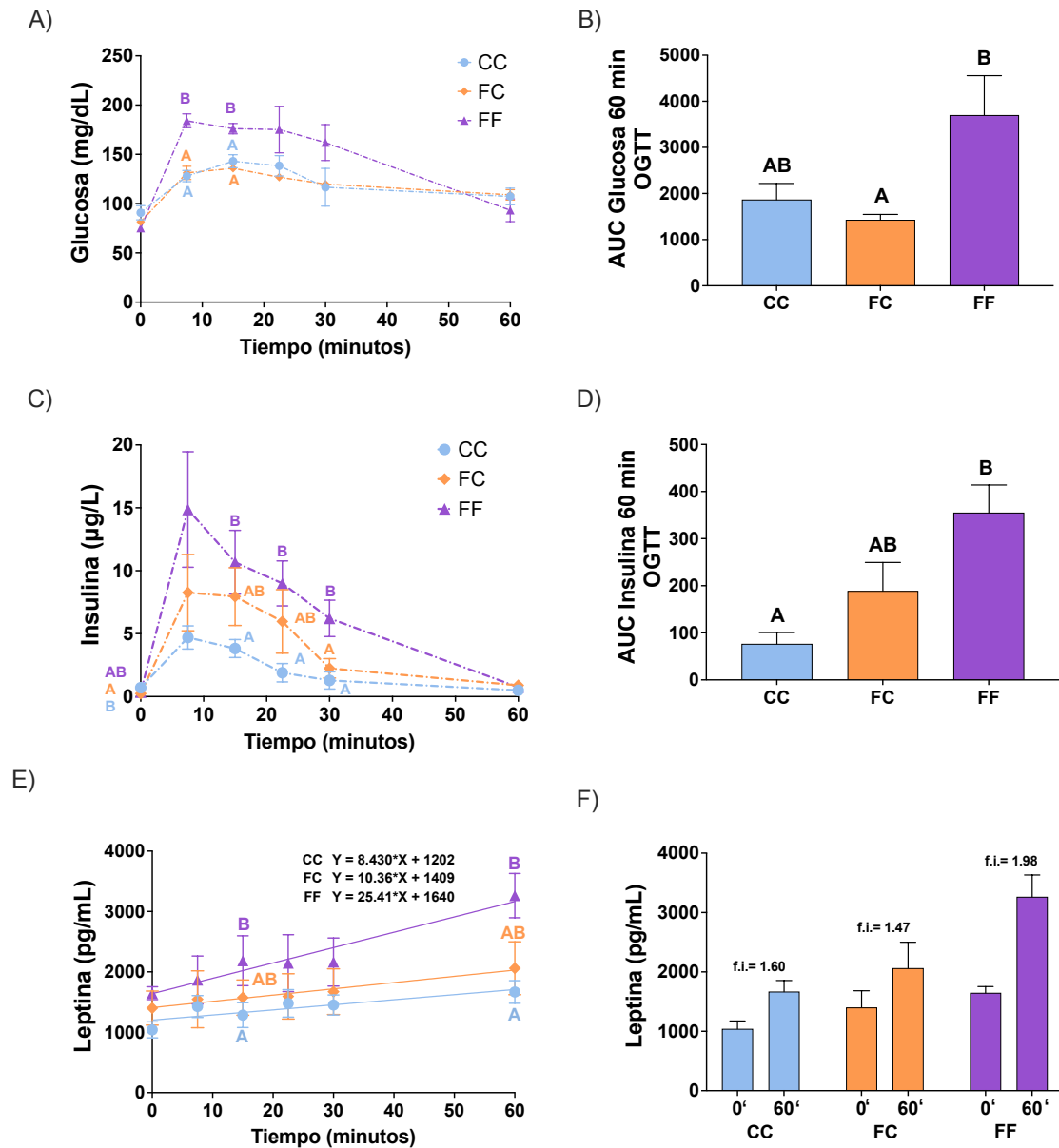


Figura 81: La ingesta de una solución de fructosa al 10% p/vol durante la gestación en ratas gestantes procedentes de madres alimentadas con fructosa deteriora la respuesta a la insulina y leptina. En la mañana del día 20 de gestación, los animales fueron sometidos a un Test de Tolerancia Oral a la Glucosa (OGTT) en condiciones de ayuno (12 h de ayuno). Después de extraer una muestra de sangre basal de la vena de la cola, se administró un bolo de glucosa (2 g/kg de peso corporal) por vía oral a las ratas. Posteriormente, se recogieron muestras de sangre a las 7,5, 15, 22,5, 30 y 60 min después de la administración de glucosa. Tras realizar el análisis plasmático de glucosa e insulina se calculó el área bajo la curva (AUC) para ambos parámetros. Niveles de glucosa en plasma (A), área bajo la curva de glucosa (B), niveles de insulina en plasma (C), área bajo la curva de insulina (D), niveles de leptina en plasma (E), niveles de leptina antes (t=0') y a los 60 minutos (t=60') (F) tras la realización de un test de tolerancia a la glucosa el día 20 de gestación a las gestantes procedentes de madres control (CC, barras y círculos azules) o de madres-fructosa que consumieron agua sin aditivos (FC, barras y rombos naranjas) o suplementada con fructosa (FF, barras y triángulos morados) durante su gestación. Las ecuaciones corresponden a la regresión lineal de los diferentes valores para cada grupo experimental. Los datos se expresan como media ± error estándar. n=5 ratas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (p<0,05).

En un estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación encontramos un hallazgo inesperado al observar como el consumo de fructosa durante la gestación provocaba una disminuida respuesta de la leptina al ayuno y la realimentación (Rodríguez et al., 2013). De hecho, en consonancia con estos resultados, otros estudios han mostrado como la fructosa genera hiperleptinemia (Dekker et al., 2010) y resistencia a la leptina (Sangüesa et al., 2019). En consecuencia, medimos de los niveles de leptina en los animales utilizados para el OGTT con el fin de investigar si presentaban alguna alteración en la señal de leptina. Como puede verse en Figura 81E y F, los niveles de leptina tras un periodo de ayuno nocturno de 12 horas no mostraron diferencias entre los tres grupos experimentales al comienzo del experimento ($t=0$ min). En cambio, a los diferentes tiempos de medida tras la administración de un bolo de glucosa (2 g/kg) mientras que en las gestantes CC y FC la leptinemia aumenta de manera paralela (pendiente=8,43 y pendiente=10,36; respectivamente), en el grupo FF la leptinemia se incrementó más del doble en comparación con los otros dos grupos (pendiente=25,41, lo que supone un incremento medio de 25,41 pg/mL por minuto) (Figura 81E). En consecuencia, a los 60 minutos tras la administración del bolo de glucosa, la leptinemia muestra un aumento similar en los grupos CC y FC (cambio similar al descrito previamente para el grupo CC (Rodríguez et al., 2013)), en cambio las gestantes FF duplican los niveles de leptina (Figura 81F).

Los parámetros en plasma analizados en el día 21 de gestación muestran tendencias similares a las encontradas el día 20. Así, aunque la glucemia no muestre diferencias entre los tres grupos experimentales estudiados (Figura 82A), los dos grupos de descendientes de madres-fructosa (FC y FF) mostraron un aumento claro, pero sin llegar a ser significativo, en los niveles de insulina plasmática en comparación con las gestantes CC (Figura 82B). De hecho, cuando se calculó el índice de sensibilidad a la Insulina (ISI), tanto las gestantes FC como las FF mostraron un descenso evidente en comparación con el grupo CC, llegando a ser significativo en las gestantes FF frente a las CC (Figura 82C).

Sorprendentemente, a pesar de que los niveles de leptina no son diferentes entre el grupo CC y FC en las gestantes después del ayuno y la realimentación (Figura 81E y F), la leptinemia en el día 21 de gestación tiende a aumentar en el grupo FC y es significativamente mayor en las gestantes FF cuando se comparan con las gestantes control (CC) (Figura 82D). Los niveles plasmáticos de otra adipocina, la adiponectina, muestran un perfil similar al de la leptina (Figura 82E), pero en este caso los efectos son significativos para ambos grupos de gestantes descendientes de madres-fructosa (FC y FF) frente a las gestantes control (CC). En consecuencia, la relación leptina/adiponectina (LAR), un parámetro que se ha relacionado con situaciones de resistencia a insulina y síndrome metabólico (Finucane et al., 2009; Norata et al., 2007), es mayor en las gestantes descendientes de madres-fructosa (FC y FF) en comparación con el grupo control (CC) (Figura 82F).

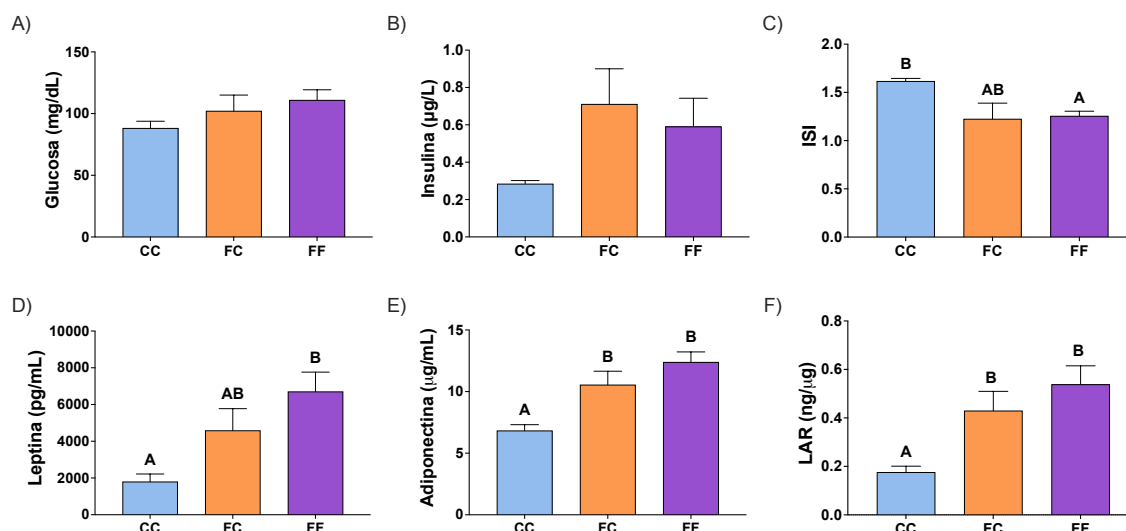


Figura 82: La gestación en las descendientes de madres alimentadas con fructosa y la ingesta de fructosa al 10% p/vol durante la gestación afecta a la respuesta a la leptina y la insulina. Niveles plasmáticos de glucosa (A), insulina (B), ISI (C), leptina (D), adiponectina (E) y LAR (F) en el día 21 de gestación de ratas procedentes de madres control (CC, barras azules) o de madres-fructosa que consumieron agua sin aditivos (FC, barras naranjas) o suplementada con fructosa (FF, barras moradas) durante su gestación. Los datos se expresan como media \pm error estándar. $n=5$ ratas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$). ISI: índice de resistencia a insulina; LAR: relación leptina/adiponectina.

Por otro lado, es importante destacar que ambos grupos de gestantes descendientes de madres-fructosa (un reconocido sustrato lipogénico) tanto las que consumieron fructosa durante su gestación (FF), como las que no recibieron esta suplementación con fructosa (FC), mostraron una marcada y estadísticamente significativa esteatosis hepática (Figura 83A) (medida como lípidos totales) en comparación con las gestantes control (CC). Sin embargo, mientras que la esteatosis en el grupo FF se debe a un incremento tanto en los niveles de triglicéridos como de colesterol (Figura 83B y C), en las gestantes FC la esteatosis está provocada por un incremento únicamente en los niveles de colesterol (Figura 83C). Estos efectos se encuentran en consonancia con una mayor expresión génica hepática de factores de transcripción y enzimas relacionados con la lipogénesis en el grupo FC y, de manera más pronunciada, en el FF (Tabla 28). Así, la expresión de la Proteína de Unión al Elemento Respuesta a Esteroles 1c (SREBP1c), un factor de transcripción regulador de la lipogénesis, tiende a encontrarse aumentado en ambos grupos de gestantes descendientes de madres-fructosa, pero sin llegar a alcanzar valores significativos. Como consecuencia, la expresión de genes lipogénicos, tales como la estearil CoA desaturasa (SCD1), la ácido graso sintasa (FAS) y la ATP citrato liasa, tienden a encontrarse aumentados en las gestantes descendientes de madres-fructosa (Tabla 28), siendo los efectos más pronunciados en el grupo FF, y en consonancia con los resultados observados en los triglicéridos hepáticos (Figura 83B). Es más, en relación con estos datos, las gestantes FF, pero no las FC, presentan una reducción significativa en la expresión de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) en comparación con los otros dos grupos, indicando un reducido catabolismo hepático de ácidos grasos hepáticos (Tabla 28). Por otro lado, y en relación con los resultados obtenidos en la concentración hepática de colesterol (Figura 83C), la expresión hepática de la principal enzima limitante en la

síntesis de colesterol, la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, es mayor en las gestantes FC, llegando a ser significativo en comparación con el grupo FF (Tabla 28).

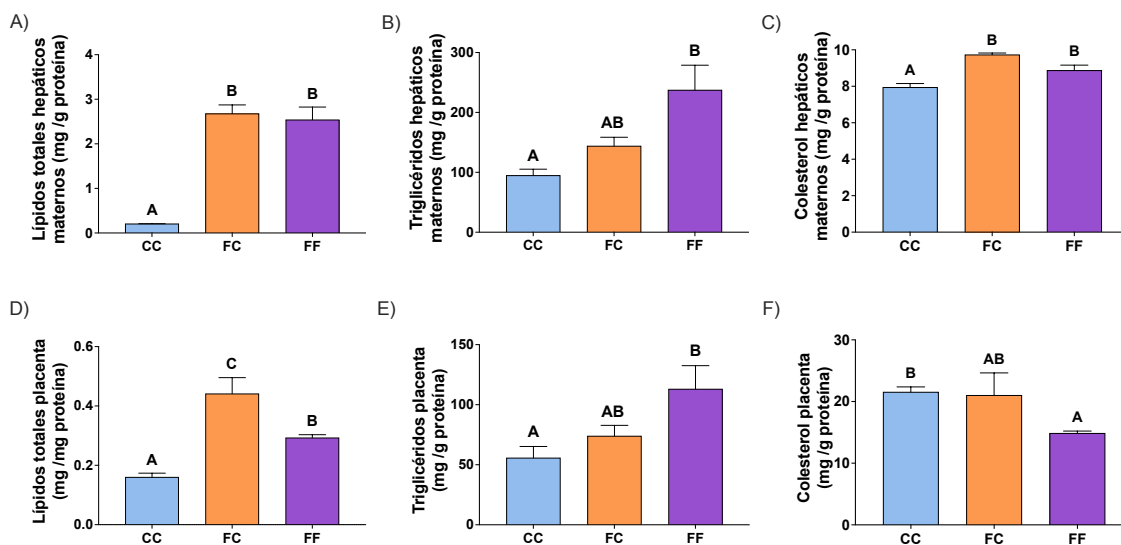


Figura 83: La gestación en las descendientes de madres alimentadas con fructosa y la ingesta de fructosa al 10% p/v durante la gestación afecta al contenido de lípidos en el hígado materno y en la placenta. Contenido hepático de lípidos totales (A), triglicéridos (B) y colesterol (C) en el día 21 de gestación de las ratas gestantes procedentes de madres control (CC, barras azules) o de madres-fructosa que consumieron agua sin aditivos (FC, barras naranjas) o suplementada con fructosa (FF, barras moradas) durante su gestación. Contenido en placenta de lípidos totales (D), triglicéridos (E) y colesterol (F) en el día 21 de gestación de las ratas gestantes procedentes de madres control (CC, barras azules) o de madres-fructosa que consumieron agua sin aditivos (FC, barras naranjas) o suplementada con fructosa (FF, barras moradas) durante su gestación. Los datos se expresan como media \pm error estándar. n=5 ratas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

De manera similar a los resultados encontrados en hígado, las ratas gestantes procedentes de madres que consumieron fructosa mostraron una clara acumulación lipídica (medida como lípidos totales) en la placenta (Figura 83D), siendo más evidente para el grupo FC que para el FF. Este depósito de lípidos es debido principalmente a una acumulación de triglicéridos, ya que su contenido se ve incrementado en ambos grupos de gestantes FF y FC, llegando a ser significativo en el grupo FF cuando se compara con el CC (Figura 83E). Por otro lado, el contenido de colesterol no se encuentra modificado en el grupo FC frente al CC y, sorprendentemente, se observa una reducción en las gestantes FF (Figura 83F). En relación con estos datos, la expresión génica de genes lipogénicos parece estar relacionada con los resultados de lípidos totales en placenta (Figura 83D), ya que se observa también un aumento en el grupo FC en comparación con los otros dos grupos, sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas (Tabla 28). Además, la CPT1, relacionada con la oxidación de ácidos grasos, tiende a una reducida expresión en las gestantes descendientes de madres-fructosa (FC y FF) y, en cambio, la expresión de la HMG-CoA Reductasa, relacionada con la síntesis de colesterol, muestra una tendencia a una mayor expresión en las gestantes FC y FF frente a las CC (Tabla 28).

Tabla 28: Expresión génica en el hígado y en la placenta en ratas gestantes descendientes de madres-fructosa sometidas (FF) o no (FC) a una suplementación con fructosa durante su gestación y en las ratas gestantes control (CC).

| | CC | FC | FF |
|-------------------|---|--------------------------|-----------------------------|
| | Expresión génica ARNm hígados madre (a.u.) | | |
| SREBP1c | 0,94 ± 0,2 | 1,21 ± 0,36 | 1,52 ± 0,46 |
| FAS | 18,89 ± 2,06 | 25,68 ± 5,77 | 38,04 ± 11,8 |
| ATP citrato liasa | 0,230 ± 0,041 | 0,463 ± 0,106 | 0,536 ± 0,175 |
| SCD1 | 0,79 ± 0,08 | 1,34 ± 0,41 | 2,31 ± 0,75 |
| CPT1 | 0,76 ± 0,025 ^{AB} | 0,9 ± 0,239 ^B | 0,2725 ± 0,063 ^A |
| HMG-CoA Reductasa | 0,59 ± 0,1 ^{AB} | 1,03 ± 0,32 ^B | 0,32 ± 0,02 ^A |
| | Expresión génica ARNm placenta (a.u.) | | |
| SREBP1c | 0,14 ± 0,016 | 0,175 ± 0,01 | 0,112 ± 0,02 |
| FAS | 0,568 ± 0,01 | 0,735 ± 0,12 | 0,526 ± 0,06 |
| ATP citrato liasa | 0,056 ± 0,002 | 0,060 ± 0,004 | 0,060 ± 0,004 |
| SCD1 | 0,0015 ± 0,0003 | 0,0035 ± 0,001 | 0,0011 ± 0,0001 |
| CPT1 | 0,044 ± 0,007 | 0,033 ± 0,005 | 0,026 ± 0,003 |
| HMG-CoA Reductasa | 0,070 ± 0,0071 | 0,095 ± 0,0096 | 0,106 ± 0,0645 |

Los datos se expresan como media ± error estándar. n=5 ratas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

3.2. La gestación en las descendientes de madres-fructosa suplementadas o no con fructosa durante su gestación modifica la respuesta a insulina y leptina, el contenido lipídico y el estrés oxidativo de sus fetos.

Después de demostrar que el consumo materno de fructosa puede afectar, de manera directa (FF) e indirecta (FC) a la respuesta a insulina y a leptina y a la acumulación lipídica, quisimos conocer si sus fetos también se encontraban afectados.

De esta manera, aunque aparece una ligera reducción en la glucemia de los fetos de madres FC y FF, no se observan cambios significativos cuando se compara con los fetos de madres CC (Figura 84A). A pesar de esto, la insulinemia se encuentra significativamente aumentada en los fetos de las gestantes FC y FF (Figura 84B). En consecuencia, el índice de sensibilidad a insulina (ISI) se ve reducido de una manera significativa en los fetos de las gestantes descendientes de madres-fructosa (FC y FF) frente a los fetos de las gestantes control (CC) (Figura 84C). En cuanto a la leptinemia, a pesar de que aparece una tendencia al aumento en los fetos de gestantes FC y FF, este efecto solo es significativo en los fetos FF (Figura 84D), y este perfil coincide con el encontrado en la leptinemia de sus respectivas madres gestantes (Figura 82D). Este efecto puede deberse a que esta hormona es capaz de atravesar la placenta (Forhead & Fowden, 2009). Además, la adiponectina presenta un incremento no significativo en los fetos de las gestantes FC y FF frente al grupo control (CC) (Figura 84E). Teniendo en cuenta los valores de leptina y adiponectina, el LAR muestra un perfil similar al de la leptinemia, es decir, un aumento significativo en el grupo FF, mientras

Capítulo 5

que el incremento en los fetos de gestantes FC no llega a ser estadísticamente significativo frente a los fetos CC (Figura 84F).

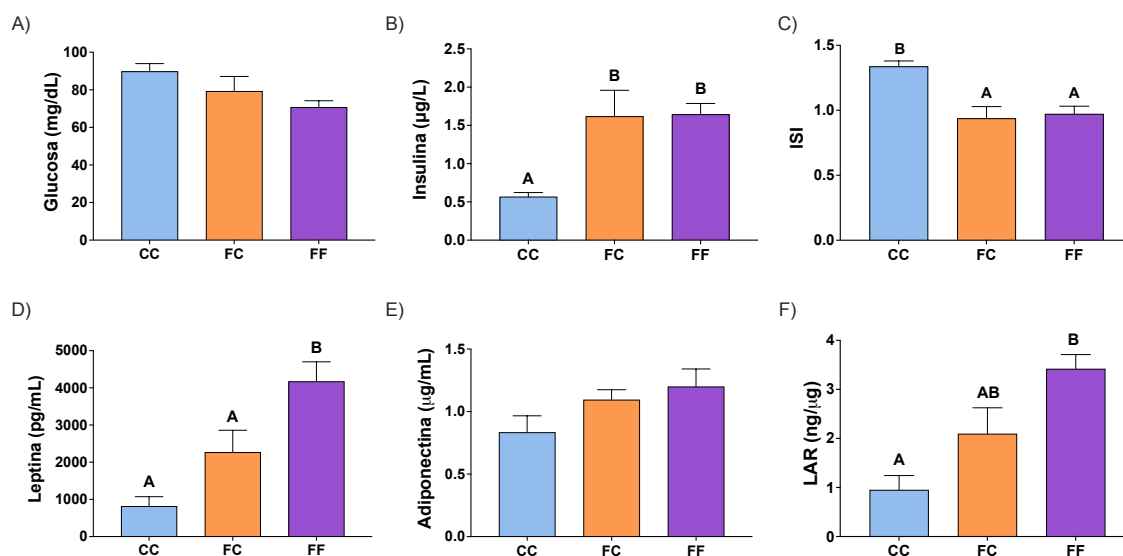


Figura 84: La gestación en las descendientes de madres alimentadas con fructosa y la ingesta de una solución de fructosa al 10% p/vol. durante la gestación afecta la respuesta a la insulina y la leptina en los fetos. Glucosa (A), insulina (B), ISI (C), leptina (D), adiponectina (E) y LAR (F) en el plasma de los fetos de ratas gestantes en el día 21 de gestación procedentes de madres control (CC, barras azules) o de madres-fructosa que consumieron agua sin aditivos (FC, barras naranjas) o suplementada con fructosa (FF, barras moradas) durante su gestación. Los datos se expresan como media ± error estándar. n=5 de *pools* (mezcla de alícuotas) de plasma de los fetos procedentes de la misma madre. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (p<0,05). ISI: índice de sensibilidad a insulina; LAR: relación leptina/adiponectina.

Sorprendentemente, y de manera paralela con los resultados obtenidos en sus respectivas madres, el hígado de los fetos de gestantes descendientes de madres-fructosa (FC y FF) presentó una acumulación de lípidos. De esta manera, se encontró un valor significativamente mayor en el contenido de lípidos totales hepáticos en los fetos de las gestantes FC y FF en comparación con los fetos de las gestantes CC (Figura 85A). También, la concentración hepática de triglicéridos y colesterol se encuentra aumentada en el hígado de los fetos de las gestantes FC y FF, aunque sólo el contenido de colesterol llega a ser significativamente mayor en ambos grupos comparado con el grupo control CC (Figura 85B y C). Es más, el contenido hepático de glucosa en los fetos de gestantes FC y FF se muestra elevado, pero curiosamente sólo llega a ser significativamente mayor en el grupo FC frente a los fetos de gestantes CC (Figura 85D). Estos resultados refuerzan la idea de que los hígados de los fetos de gestantes cuyas madres han tomado fructosa en la gestación se encuentran claramente alterados, no importando el tratamiento que recibieron las madres de los fetos durante su propia gestación (FC y FF).

En relación con los resultados previamente descritos, la trigliceridemia y los niveles de ácidos grasos libres (NEFA) en el plasma de los fetos muestran valores opuestos a los encontrados en la concentración hepática de lípidos en los fetos (Figura 85A y B). De esta manera, los triglicéridos y NEFA en plasma tienden a estar reducidos, pero sin alcanzar valores

significativos, en los fetos de las gestantes descendientes de madres-fructosa (FC y FF) (Tabla 29). En cambio, la colesterolemia no muestra ningún cambio entre los tres grupos de fetos estudiados (Tabla 29). En un estudio previo ya habíamos observado como los fetos de madres que consumieron fructosa en la gestación (CF) mostraban una tendencia a una hipotrigliceridemia (Rodríguez et al., 2013). En cuanto a la expresión génica hepática, mientras que los niveles de ARNm de SREBP1c se mantienen inalterados en los tres grupos de fetos estudiados, la expresión de las enzimas lipogénicas FAS, ATP citrato liasa y SCD1 tienden a aumentar en los fetos de gestantes cuyas madres tomaron fructosa en la gestación (FC y FF), aunque sin alcanzar valores significativos (Tabla 29). En cambio, la expresión de la CPT1, relacionada con el catabolismo de ácidos grasos, tiende a estar reducida (Tabla 29) en los fetos procedentes de gestantes FC y FF. Todos estos resultados de expresión génica se encuentran en consonancia con la esteatosis hepática previamente descrita en los fetos de gestantes FC y FF (Figura 85A y B). A pesar del mayor contenido de colesterol hepático encontrado en el hígado de los fetos de madres FC y FF (Figura 83C) la expresión génica de la HMG-CoA Reductasa no muestra diferencias entre los tres grupos estudiados (Tabla 29).

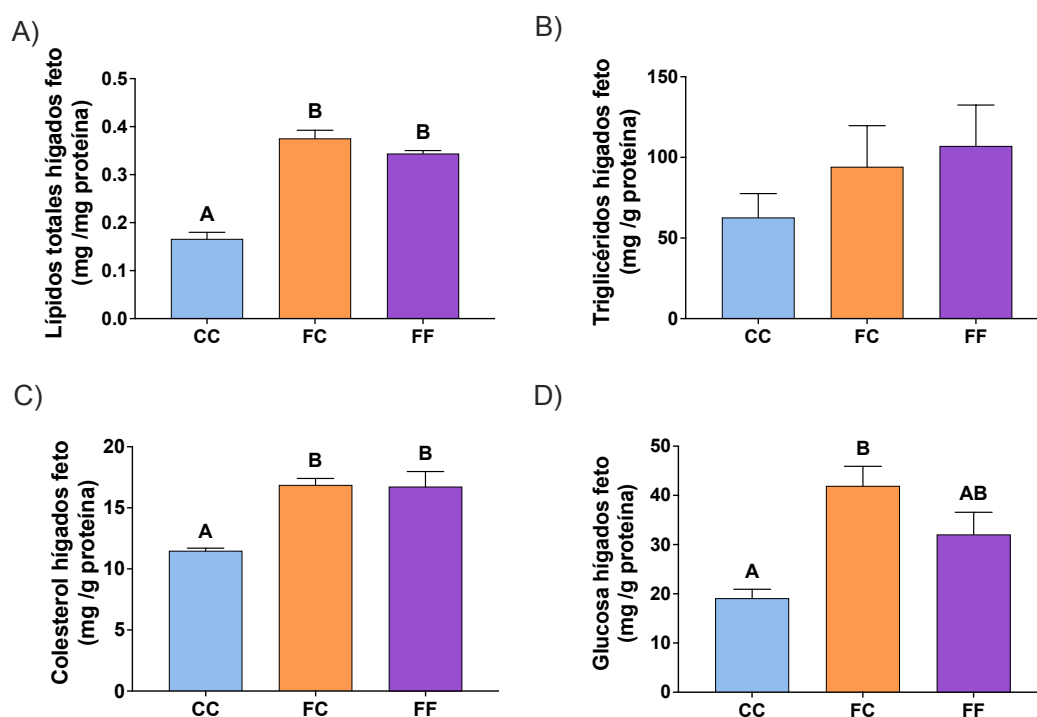


Figura 85: La gestación en las descendientes de madres alimentadas con fructosa y la ingesta de una solución de fructosa al 10% p/vol. durante la gestación afecta a la acumulación de lípidos y el contenido de glucosa en el hígado de los fetos. Concentración de lípidos totales (A), triglicéridos (B), colesterol (C) y glucosa (D) en el hígado de los fetos de ratas gestantes en el día 21 de gestación procedentes de madres control (CC, barras azules) o de madres-fructosa que consumieron agua sin aditivos (FC, barras naranjas) o suplementada con fructosa (FF, barras moradas) durante su gestación. Los datos se expresan como media \pm error estándar. n=5 de *pools* (mezcla de alícuotas) de hígados de los fetos procedentes de la misma madre. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$).

Capítulo 5

Tabla 29: Valores plasmáticos de varios analitos y expresión génica hepática en los fetos de ratas gestantes descendientes de madres que consumieron fructosa sometidas (FF) o no (FC) a fructosa durante su gestación y en las ratas gestantes control (CC).

| | CC | FC | FF |
|-------------------------|--|---------------|---------------|
| | Niveles plasmáticos fetales | | |
| Trigliceridemia (mg/dL) | 16,3 ± 4,4 | 12,2 ± 1,2 | 10,2 ± 1,8 |
| Colesterolemia (mg/dL) | 58,8 ± 2,1 | 61,5 ± 3,5 | 60,4 ± 3,5 |
| NEFA (mmol/L) | 0,084 ± 0,014 | 0,064 ± 0,010 | 0,053 ± 0,005 |
| | Expresión génica ARNm hígados feto (u.a.) | | |
| SREBP1c | 0,510 ± 0,062 | 0,545 ± 0,081 | 0,506 ± 0,043 |
| FAS | 4,20 ± 0,87 | 4,68 ± 1,70 | 4,85 ± 0,35 |
| ATP citrato liasa | 0,158 ± 0,022 | 0,170 ± 0,037 | 0,170 ± 0,009 |
| SCD1 | 0,088 ± 0,008 | 0,138 ± 0,058 | 0,143 ± 0,010 |
| CPT1 | 0,436 ± 0,111 | 0,333 ± 0,085 | 0,302 ± 0,024 |
| HMG-CoA Reductasa | 0,628 ± 0,148 | 0,663 ± 0,221 | 0,614 ± 0,035 |

Los datos se expresan como media ± error estándar. n=5 de *pools* (mezcla de alícuotas) de plasma o de hígado de los fetos procedentes de la misma madre. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (p<0,05).

Es de resaltar, un resultado inesperado que encontramos en los productos de oxidación lipídica medidos como niveles de MDA. Así, se observó una peroxidación lipídica hepática significativamente mayor en los fetos de gestantes FC en comparación con los otros dos grupos estudiados (CC y FF). Estos resultados son una clara evidencia de que los hígados de los fetos de ratas gestantes descendientes de madres que consumieron fructosa en la gestación se encuentran ya alterados, incluso sin haber sometido a sus madres a una reexposición con fructosa durante su gestación (FC).

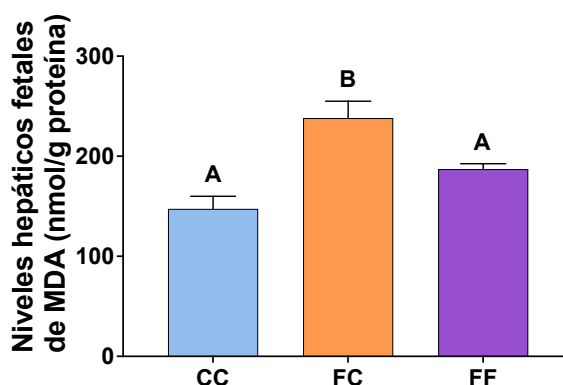


Figura 86: La gestación en las descendientes de madres alimentadas con fructosa produce un mayor estrés oxidativo hepático fetal que la ingesta de una solución de fructosa al 10% p/vol. durante la gestación de las ratas descendientes de madres fructosa. Concentración hepática de MDA en los fetos de ratas gestantes en día 21 de gestantes procedentes de madres control (CC, barras azules) o de madres-fructosa que consumieron agua sin aditivos (FC, barras naranjas) o suplementada con fructosa (FF, barras moradas) durante su gestación. Los datos se expresan como media ± error estándar. n=5 de *pools* (mezcla de varias alícuotas) de hígados de los fetos procedentes de la misma madre. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (p<0,05). MDA: Malondialdehído.

4. Discusión

En estudios previos, hemos observado que mientras que el consumo de fructosa en la gestación producía hiperinsulinemia y una alterada respuesta a insulina en la descendencia macho, estos efectos no aparecían en las descendientes hembra (Rodríguez et al., 2015). En cambio, cuando estas descendientes hembra eran reexpuestas a fructosa se observó una marcada dislipemia y esteatosis hepática (Rodríguez et al., 2016a). Es un hecho ampliamente reconocido que la gestación es un estado fisiológico en el cual se producen cambios muy importantes en el metabolismo lipídico y glucídico, y en la señalización de la insulina y la leptina. En consecuencia, en el presente estudio, quisimos conocer si la gestación pudiera ser suficiente para inducir las alteraciones metabólicas en estas hembras descendientes de madres-fructosa, de manera similar a lo que observamos después de la reexposición a fructosa.

Como se ha descrito previamente, el consumo de fructosa en agua de bebida durante la gestación causó un incremento en el consumo de líquido, junto con una disminución de la ingesta de comida sólida, con el fin de compensar la ingesta calórica total (Olaniyi et al., 2020; Rodríguez et al., 2013). Curiosamente, en el presente estudio, a pesar de que las calorías totales ingeridas por las gestantes FF durante la gestación fueron mayores que las ingeridas por los grupos CC y FC, el peso en el día 21 de gestación y el incremento de peso corporal durante la gestación no mostró diferencias entre los tres grupos estudiados. Se han descrito en roedores unos resultados similares mostrando una mayor ingesta de líquidos y de calorías asociadas al consumo de fructosa durante la gestación sin encontrarse cambios en el peso corporal materno (Olaniyi et al., 2020; Vickers et al., 2011). Sorprendentemente, no observamos cambios ni en el consumo de comida sólida, ni en la ingesta de bebida, ni en el peso corporal durante la gestación en las gestantes FC en comparación con el grupo control CC, lo que indicaría que el consumo materno de fructosa no afectaría a la progresión de la gestación en la descendencia. De hecho, ninguna de las gestantes descendientes de madres-fructosa mostraron cambios en el peso del *conceptus*, el número de fetos o el peso corporal fetal, independientemente del tipo de tratamiento que recibieron durante su propia gestación (FC y FF). Školníková y col. (Školníková et al., 2020) tampoco observaron cambios en el peso fetal ni en el número de fetos en un estudio previo intergeneracional utilizando una dieta sólida con sacarosa al 70%.

En cuanto al Test de Tolerancia Oral a la Glucosa (OGTT) y el estudio de sensibilidad a la insulina, encontramos dos resultados interesantes. 1) La fructosa al 10% (p/v), una concentración que se asemeja a la presente en las bebidas azucaradas y los zumos (Walker et al., 2014; White et al., 2015), provocó una alteración clara en el OGTT dado que las gestantes FF requirieron una mayor producción de insulina en respuesta al bolo de glucosa para controlar sus niveles de glucosa en sangre. Curiosamente, nosotros observamos en un estudio previo (Rodríguez et al., 2013) en descendientes de madres control que la ingesta de fructosa durante la gestación (CF) no produjo diferencias en la tolerancia a glucosa y la sensibilidad a insulina frente al grupo control (CC). En consonancia con los resultados obtenidos en el presente estudio, Song y col. (Song et al., 2017) administraron un 10% de fructosa en agua de bebida antes y durante la gestación y durante la lactancia a ratas gestantes y a sus

descendientes, cuando se quedaron preñadas. Estos autores encontraron que el consumo de fructosa provocó hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en mayor medida en la F1 que en la F0. 2) Sorprendentemente, el área bajo la curva de la insulina plasmática durante el OGTT fue mayor en ambos grupos de gestantes descendientes de madres-fructosa (FC y FF) frente al control CC, lo cual indica que es necesaria la producción de una mayor cantidad de insulina en respuesta al bolo de glucosa, pero mientras que las gestantes FC son capaces de controlar los niveles de glucosa, el grupo FF no lo es. Es más, en el día 21 de gestación, los niveles de insulina mostraron una tendencia a aumentar y como consecuencia, el ISI estaba disminuido en las gestantes FC y FF en comparación con el grupo control CC. En consecuencia, la gestación supone un cambio suficientemente grande como para afectar a la sensibilidad a insulina en las descendientes de madres-fructosa. Incluso, se observó hiperinsulinemia y una alterada respuesta a insulina en las gestantes FC y FF, y de manera más marcada, en sus fetos. Estos resultados ponen de manifiesto que el consumo materno de fructosa no solo afecta a la descendencia hembra durante su gestación, sino que también sus fetos se encuentran afectados. Además, es importante remarcar que estos efectos se observan en la descendencia hembra de madres-fructosa que no ha sido expuesta a fructosa a lo largo de toda su vida (FC) revelando el papel fundamental de la programación fetal de la fructosa, cuyos efectos negativos aparecen cuando la descendencia hembra queda preñada.

En un estudio previo (Rodríguez et al., 2013), encontramos que el consumo de fructosa durante la gestación provocó una deficiente señal de leptina en las gestantes en respuesta a la realimentación y, por esa razón, se midieron los niveles de leptina en el OGTT del presente estudio. Así, los tres grupos muestran una leptinemia similar en ayunas, pero mientras que los niveles de leptina de las gestantes FC mostraron un perfil en paralelo al grupo control CC en respuesta a la realimentación, la producción de leptina es mucho más exacerbada en las gestantes FF. Curiosamente, el consumo materno de fructosa en las gestantes descendientes de madres control (CF, nuestro estudio previo (Rodríguez et al., 2013)) provocó una elevada leptinemia asociada al ayuno y una ausencia de respuesta a la realimentación y, por el contrario, el consumo materno de fructosa en descendientes de madres-fructosa (FF, estudio actual) provocó una respuesta exacerbada al bolo de glucosa. Estos datos significan que el consumo de fructosa durante la gestación debe de producir en la descendencia hembra algún tipo de modificación que hace que estas ratas, cuando llegan a ser adultas, generen una respuesta mucho más pronunciada a la leptina tras la realimentación. A pesar de todo, Levy y col. (Levy et al., 2000) defienden que tanto la falta de respuesta como una exagerada respuesta de secreción de leptina son reacciones inadecuadas. De hecho, una falta de respuesta puede, por ejemplo, conducir a la aparición de obesidad, mientras que la respuesta exacerbada podría indicar una situación de resistencia a leptina. Es un hecho reconocido que la fructosa produce hiperleptinemia y resistencia a leptina (Dekker et al., 2010; Sangüesa et al., 2019). Sin embargo, nosotros no hemos visto cambios previamente en la leptinemia en la descendencia hembra no gestante de madres-fructosa independientemente de si fueron sometidas o no a una suplementación con fructosa en la edad adulta (Rodríguez et al., 2016a; Rodríguez et al., 2016b). Es más, en el día 21 de gestación, las gestantes descendientes de madres-fructosa presentaron elevados niveles de leptina frente al grupo CC. Así, dado que la leptinemia en ayunas se ha relacionado con los depósitos de grasa corporal, la hiperleptinemia

observada en los grupos FC y FF no podría atribuirse a una mayor adiposidad, ya que la leptinemia en ayunas fue similar en los tres grupos estudiados. Por lo tanto, podría estar más relacionada con la menor sensibilidad a la insulina encontrada en los grupos FC y FF frente al control CC. Nuestro grupo de investigación ha descrito previamente varios ejemplos de desregulación del eje adipoinsular en descendientes de madres-fructosa (Rodríguez et al., 2015; Rodríguez et al., 2016b). Sorprendentemente, los niveles de adiponectina, otra adipocina, se encuentran aumentados en las ratas gestantes descendientes de madres-fructosa, sin importar el tratamiento que ellas recibieron durante su gestación. A pesar de que la disminución en los niveles de adiponectina se ha relacionado con la resistencia a la insulina en animales que recibieron dietas ricas en fructosa o grasa (Song et al., 2017; White et al., 2015), nosotros hemos descrito previamente aumentos en los niveles de adiponectina tanto en ratas gestantes que consumieron fructosa como en los descendientes no gestantes de madres-fructosa reexpuestos o no a fructosa en la edad adulta (Rodríguez et al., 2016a; Rodríguez et al., 2013; Rodríguez et al., 2016b). Dado que se ha demostrado que la adiponectina es capaz de mejorar la sensibilidad a insulina (Walker et al., 2014), nosotros atribuimos este incremento en la adiponectinemia a un intento de preservar la sensibilidad a la insulina en el hígado de estos animales. Además, la tendencia a unos mayores niveles de leptina en sangre observada en los grupos FC y FF también se presentó en sus fetos. Dado que la placenta parece ser permeable a la leptina, es lógico encontrar que los niveles de esta hormona en la circulación fetal reflejen los encontrados en sus respectivas madres (Forhead & Fowden, 2009).

La fructosa es un sustrato lipogénico ampliamente reconocido, por lo que resulta sorprendente encontrar una clara acumulación de lípidos en el hígado y la placenta de las gestantes descendientes de madres-fructosa, independientemente de si consumieron (FF) o no (FC) fructosa durante su gestación. Esta acumulación de lípidos es debida en el caso del grupo FC a un incremento en el contenido de colesterol, mientras que en el grupo FF es debida claramente a una mayor cantidad de triglicéridos. En consonancia con estos resultados, la expresión génica de enzimas lipogénicas y factores de transcripción (SREBP1c, FAS, ATP citrato liasa y SCD1) tiende a aumentar en los grupos FC y FF de manera similar al contenido de triglicéridos. Mientras que la expresión génica de la HMGCoA reductasa coincide con los datos encontrados de concentración de colesterol en el hígado. En relación con estos resultados, es un hecho conocido que la insulina inhibe normalmente la gluconeogénesis y activa la lipogénesis en el hígado (Czech, 2017), pero en una situación de resistencia a la insulina, la glucosa se produce de manera continua, pero la síntesis de lípidos no aparece comprometida (Weickert & Pfeiffer, 2006). De hecho, el contenido hepático de glucosa se encuentra significativamente aumentado en las gestantes FC y FF ($34,32 \pm 1,87$; $48,35 \pm 2,74$; y $48,36 \pm 2,05$ mg/g de proteína en los grupos CC, FC y FF, respectivamente; $p < 0.05$ para FC y FF frente al grupo CC).

Sorprendentemente, la acumulación lipídica se observó también en el hígado de los fetos de las gestantes descendientes de madres-fructosa, no importando si recibieron fructosa o no durante su propia gestación. Es importante destacar que esta acumulación de lípidos hepáticos aparece tanto en los fetos de las gestantes que consumieron fructosa en su gestación (FF) como también en aquellos cuyas madres sólo tomaron agua en su gestación

(FC). En consonancia con estos datos, la expresión génica de varias enzimas lipogénicas y de otra enzima relacionada con la oxidación de ácidos grasos explicarían la acumulación de lípidos observada en el hígado fetal procedentes de las madres FC y FF. Estos hallazgos estarían relacionados con la menor sensibilidad a la insulina encontrada en los fetos de gestantes procedentes de madres fructosa (FC y FF). Se ha propuesto que la leptina es capaz de controlar la homeostasis intracelular de triglicéridos promoviendo la oxidación de ácidos grasos y disminuyendo la síntesis de ácidos grasos y la acumulación de triglicéridos (Unger et al., 1999; Zhou et al., 1999). Sin embargo, en los fetos de las gestantes FF que presentaban un aumento en los niveles de leptina plasmática, no se observaron ninguno de los efectos anteriormente descritos atribuibles a la leptina, sino más bien lo contrario, es decir, una acumulación de lípidos en los hígados de esos animales. Todo ello sugiere una posible situación de resistencia a leptina.

Numerosos estudios sugieren que un desequilibrio en el aporte de vitaminas, tales como un estado inadecuado de cobalamina, o una deficiencia en folatos durante la gestación podrían provocar alteraciones en los mecanismos de programación fetal generando resistencia a insulina tanto en los fetos como en sus madres (Rizzo et al., 2016). Es interesante mencionar que ciertos derivados del inositol se han clasificado como sensibilizadores de la insulina y parece que contrarrestan enfermedades metabólicas relacionadas con la resistencia a la insulina con un efecto nutracéutico seguro. De esta manera, la suplementación con derivados del inositol podría actuar en sinergia con otros fármacos sensibilizadores de la insulina y/o nutracéuticos, como el ácido lipoico y la N-acetil cisteína (Paul et al., 2016). En relación con esto, nosotros hemos observado previamente en descendientes no gestantes de madres que consumieron fructosa durante la gestación un descenso en los niveles plasmáticos de ácido fólico y un aumento en la concentración plasmática de homocisteína (Rodrigo et al., 2018). Sin embargo, en el presente estudio, aunque encontramos varias alteraciones características del síndrome metabólico en las ratas gestantes descendientes de madres-fructosa, los niveles plasmáticos de homocisteína no muestran diferencias significativas entre los tres grupos experimentales ($8,7\pm 0,3$; $7,9\pm 0,3$; $8,0\pm 0,6$ μM para CC, FC y FF, respectivamente).

Es importante remarcar, que el consumo de fructosa de las abuelas durante la gestación es suficiente para provocar un efecto claramente perjudicial en los fetos de sus descendientes, incluyendo una mayor acumulación de lípidos en el hígado fetal acompañado de una mayor peroxidación lipídica hepática (medida como MDA) en los fetos de gestantes FC. Coincidiendo con estos resultados de nuestro estudio previo en fetos procedentes de madres alimentadas con fructosa (CF) (Rodrigo et al., 2016) y posiblemente relacionado con la elevada reactividad de la fructosa, los fetos de las gestantes FF mostraron una tendencia a una mayor peroxidación lipídica. Sorprendentemente, el perfil de peróxidos de lípidos en el hígado de los fetos (Figura 86) coincidente claramente con su contenido hepático de glucosa (Figura 85D). En relación a esto, Otero y col. (Otero et al., 2002) demostraron que la glucosa es capaz de acelerar el proceso de peroxidación lipídica y que este efecto es dependiente de la concentración de este azúcar.

En conclusión, en el presente estudio hemos podido confirmar que el consumo de fructosa durante la gestación genera un fenotipo programado en la descendencia que está inicialmente oculto, pero que se vuelve evidente cuando estas descendientes quedan

preñadas, demostrando que la gestación es suficiente para revelar este fenotipo programado. De hecho, la gestación produce efectos perjudiciales en estos descendientes, tales como alteraciones de la señal de leptina e insulina y la acumulación hepática de lípidos. Es más, el consumo de fructosa durante la gestación produce algún tipo de programación fetal que afecta la salud metabólica de la descendencia cuando es adulta y, de manera mucho más preocupante, puede también afectar al desarrollo normal de la gestación en la descendencia. De hecho, sus fetos (futura generación F2) presentan los mismos efectos perjudiciales que los encontrados en sus madres. En nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se describe un efecto intergeneracional del consumo de fructosa al 10% (p/v) sólo durante la gestación. También es importante destacar que, en concordancia con estudios previos de nuestro grupo de investigación, el fenotipo programado inducido por el consumo materno de fructosa puede ser revelado bien por la reexposición a fructosa en descendientes no gestantes o simplemente por la gestación. Los efectos encontrados en las gestantes descendientes de madres-fructosa no sometidas a una reexposición al azúcar (FC) son tan marcados que la administración de fructosa a las descendientes gestantes (FF) solo produce un efecto ligeramente más severo, en la señal de leptina y la esteatosis hepática. Estos resultados confirman el papel clave de la nutrición durante la gestación y la clara relación entre la dieta materna y el desarrollo de enfermedades metabólicas en la descendencia. En futuras investigaciones, sería importante estudiar el perfil metabólico de la generación F2 en la edad adulta para confirmar si los efectos perjudiciales encontrados en los fetos se mantienen cuando llegan a la edad adulta.

Conclusiones generales

Conclusiones generales

A tenor de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- El consumo de fructosa aumenta la producción hepática de FGF21, así como sus niveles en sangre, siendo más evidente este efecto en los hijos de madres que consumieron fructosa durante la gestación.
- La ingesta materna de hidratos de carbono determina la función de FGF21 en la descendencia, así:
 1. En los descendientes de madres control que tomaron fructosa, FGF21 es capaz de ejercer un efecto protector a nivel hepático y del tejido adiposo en relación con la acumulación lipídica y el estrés oxidativo inducidos por la fructosa.
 2. En los descendientes de madres que consumieron glucosa durante la gestación, FGF21 no es capaz de impedir la aparición de esteatosis hepática inducida por la ingesta de fructosa.
 3. En los descendientes de madres que tomaron fructosa en la gestación, FGF21 no impide la acumulación de lípidos ni el mayor estrés oxidativo en tejido adiposo promovidos por la ingesta de fructosa en la edad adulta.
- La falta de efectividad de FGF21 observada, tanto en hijos de madres-glucosa como en los hijos de madres-fructosa, podría indicar una situación de resistencia a FGF21 provocada por la ingesta materna de carbohidratos.
- El consumo materno de fructosa induce un aumento en la producción de H₂S en la descendencia hembra, una vez adulta, pero agrava la disminución en la producción hepática de este gasotransmisor cuando se somete a dicha descendencia al consumo de fructosa.
- La reducida producción hepática de H₂S provocada por la ingesta de fructosa en las hijas de madres-fructosa podría ser responsable de la esteatosis y estrés oxidativo presente en el hígado de estos animales. A su vez, una menor actividad de FXR y unos aumentados niveles de calcio, podrían provocar la disminución observada en la expresión de la CSE, principal enzima de la transulfuración, ocasionando así la reducida producción hepática de dicho gasotransmisor.
- El presente estudio, unido a los resultados descritos por otros autores, pone de manifiesto la existencia de una conexión entre el consumo de fructosa y una menor producción de gasotransmisores (tales como el CO, el NH₃ y el H₂S) que ejercen efectos protectores contra diversas enfermedades metabólicas.

Conclusiones generales

- El consumo materno de fructosa produce en la descendencia macho joven que ingirió tagatosa alteraciones en la absorción intestinal de ácidos biliares y triglicéridos, lo cual favorecería la dislipemia observada en estos animales. Dicho efecto fue específico de la tagatosa, ya que no se observó en los animales que tomaron fructosa.
- La asociación de la ingesta de fructosa líquida con una dieta sólida rica en colesterol conduce a una acusada dislipemia que se manifiesta de forma independiente del tratamiento materno. Estos datos indican que la fructosa, cuando es ingerida conjuntamente con colesterol, es capaz de provocar una alteración grave en el metabolismo de lípidos sin necesidad de administrar una dieta rica en grasa y/o la presencia de colato.
- La dislipemia provocada por el consumo de fructosa y colesterol es debida a:
 1. Una potente activación de SREBP1c, lo cual promovería la lipogénesis.
 2. Una mayor salida de ácidos biliares hacia la luz intestinal que favorecería la absorción intestinal de grasas y colesterol.
- La fructosa disminuye la producción de H₂S en machos jóvenes por inhibición de la expresión de la CSE de manera exclusiva en el hígado, sin importar la dieta que recibió la madre durante la gestación. Este efecto de la fructosa sobre la CSE podría venir derivado del propio metabolismo de la fructosa.
- La ingesta de fructosa líquida y una dieta sólida rica en colesterol exacerba en los descendientes macho jóvenes la reducción en la producción de H₂S hepática, comparado con la observada tras la ingesta de fructosa sola, siendo estos efectos debidos a una menor actividad de FXR, independientemente de la dieta materna.
- El efecto observado en la inhibición de la expresión de la CSE y la reducida producción de H₂S en el hígado es exclusiva de la fructosa, ya que el consumo de otro carbohidrato, como su epímero la tagatosa, no produce dichos efectos.
- El consumo de fructosa durante la gestación conduce a un aumento en la producción de H₂S en tejido adiposo lumbar en la descendencia macho, lo que podría relacionarse con la mayor adiposidad que presentan estos animales.

- El consumo de fructosa durante la gestación genera un fenotipo programado que se hace patente en la descendencia hembra, una vez queda preñada. Así, la gestación induce la aparición de alteraciones hepáticas en la señal de leptina y de insulina y acumulación de lípidos en las descendientes gestantes. Este hecho confirma el impacto de la nutrición materna en el desarrollo de alteraciones metabólicas en la descendencia a través de una programación fetal.
- Los fetos (que constituyen la futura F2) procedentes de las hijas de madres que consumieron fructosa durante la gestación muestran los mismos efectos observados en sus madres, e incluso peores porque presenta además peroxidación lipídica. Esto nos indicaría que el fenotipo programado asociado al consumo de fructosa durante la gestación se mantiene y transmite de una manera intergeneracional.

Conclusiones generales

Bibliografía

Bibliografia

- Aagaard-Tillery, K. M., Grove, K., Bishop, J., Ke, X., Fu, Q., McKnight, R., & Lane, R. H. (2008). Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. *J Mol Endocrinol*, 41(2), 91-102. <https://doi.org/10.1677/JME-08-0025>
- Abhinand, C. S., Raju, R., Soumya, S. J., Arya, P. S., & Sudhakaran, P. R. (2016). VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *J Cell Commun Signal*, 10(4), 347-354. <https://doi.org/10.1007/s12079-016-0352-8>
- Achón, M., Alonso-Aperte, E., Reyes, L., Ubeda, N., & Varela-Moreiras, G. (2000). High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. *Br J Nutr*, 83(2), 177-183.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Elsevier.
- Afman, L., & Müller, M. (2006). Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J Am Diet Assoc*, 106(4), 569-576. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2006.01.001>
- Agarwal, P., Morriseau, T. S., Kereliuk, S. M., Doucette, C. A., Wicklow, B. A., & Dolinsky, V. W. (2018). Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 55(2), 71-101. <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1422109>
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Al-Ozairi, E., Rivard, C. J., Sanchez Lozada, L. G., Lanaspá, M. A., Bjornstad, P., Al Salem, D., Asad, R. A. (2020). Fructose tolerance test in obese people with and without type 2 diabetes. *J Diabetes*, 12(3), 197-204. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12984>
- Alegret, M., & Laguna, J. C. (2012). Opposite fates of fructose in the development of metabolic syndrome. *World J Gastroenterol*, 18(33), 4478-4480. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i33.4478>
- Altaany, Z., Ju, Y., Yang, G., & Wang, R. (2014). The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide. *Sci Signal*, 7(342), ra87. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005478>
- Altaany, Z., Moccia, F., Munaron, L., Mancardi, D., & Wang, R. (2014). Hydrogen sulfide and endothelial dysfunction: relationship with nitric oxide. *Curr Med Chem*, 21(32), 3646-3661. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140706142930>
- Altaany, Z., Yang, G., & Wang, R. (2013). Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells. *J Cell Mol Med*, 17(7), 879-888. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12077>
- Alwahsh, S. M., & Gebhardt, R. (2017). Dietary fructose as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Arch Toxicol*, 91(4), 1545-1563. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1892-7>
- Alzamendi, A., Zubiría, G., Moreno, G., Portales, A., Spinedi, E., & Giovambattista, A. (2016). High Risk of Metabolic and Adipose Tissue Dysfunctions in Adult Male Progeny, Due to Prenatal and Adulthood Malnutrition Induced by Fructose Rich Diet. *Nutrients*, 8(3), 178. <https://doi.org/10.3390/nu8030178>
- Amagase, H. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr*, 136(3 Suppl), 716S-725S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.3.716S>
- Amoutzopoulos, B., Steer, T., Roberts, C., Collins, D., & Page, P. (2020). Free and added sugar consumption and adherence to guidelines: the UK National Diet and Nutrition Survey (2014/15–2015/16). *Nutrients*, 12(2), 393.
- Andrade, L., Lee, K. M., Sylvestsky, A. C., & Kirkpatrick, S. I. (2021). Low-calorie sweeteners and human health: a rapid review of systematic reviews. *Nutr Rev*, 79(10), 1145-1164. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa123>
- Anter, A., Taye, A., & El-Moselhy, M. (2018). NOS activity mediates some pathways in the protective effects of H2S in a model of diabetic nephropathy. *Journal of advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 26-32.

Bibliografía

- Apro, J., Beckman, L., Angelin, B., & Rudling, M. (2015). Influence of dietary sugar on cholesterol and bile acid metabolism in the rat: Marked reduction of hepatic Abcg5/8 expression following sucrose ingestion. *Biochem Biophys Res Commun*, 461(4), 592-597. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.070>
- Aragno, M., Tomasinelli, C. E., Vercellinato, I., Catalano, M. G., Collino, M., Fantozzi, R., Boccuzzi, G. (2009). SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver disease induced by Western-type high-fat diet plus fructose in rats. *Free Radic Biol Med*, 47(7), 1067-1074. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.016>
- Asgari-Taee, F., Zerafati-Shoae, N., Dehghani, M., Sadeghi, M., Baradaran, H. R., & Jazayeri, S. (2019). Association of sugar sweetened beverages consumption with non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr*, 58(5), 1759-1769. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1711-4>
- Asghar, Z. A., Thompson, A., Chi, M., Cusumano, A., Scheaffer, S., Al-Hammadi, N., Moley, K. H. (2016). Maternal fructose drives placental uric acid production leading to adverse fetal outcomes. *Sci Rep*, 6, 25091. <https://doi.org/10.1038/srep25091>
- Atanasovska, E., Jakovski, K., Kostova, E., Petlichkovski, A., Dimitrovski, C., Bitovska, I., Labachevski, N. (2009). Effects of rosiglitazone on metabolic parameters and adiponectin levels in fructose-fed rats. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2(1), 22-29.
- Avena, N. M., Rada, P., & Hoebel, B. G. (2008). Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci Biobehav Rev*, 32(1), 20-39. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.04.019>
- Azaïs-Braesco, V., Sluik, D., Maillot, M., Kok, F., & Moreno, L. A. (2017). A review of total & added sugar intakes and dietary sources in Europe. *Nutr J*, 16(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0225-2>
- Baena, M., Sangüesa, G., Dávalos, A., Latasa, M.-J., Sala-Vila, A., Sánchez, R. M., Alegret, M. (2016). Fructose, but not glucose, impairs insulin signaling in the three major insulin-sensitive tissues. *Scientific reports*, 6, 26149.
- Baena, M., Sangüesa, G., Hutter, N., Beltrán, J. M., Sánchez, R. M., Roglans, N., Laguna, J. C. (2017). Liquid fructose in Western-diet-fed mice impairs liver insulin signaling and causes cholesterol and triglyceride loading without changing calorie intake and body weight. *J Nutr Biochem*, 40, 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.10.015>
- Banerjee, R., & Zou, C.-g. (2005). Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-β-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Archives of biochemistry and biophysics*, 433(1), 144-156.
- Banerjee, S. K., & Maulik, S. K. (2002). Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutr J*, 1, 4. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-1-4>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Basciano, H., Federico, L., & Adeli, K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-5>
- Battson, M. L., Lee, D. M., Weir, T. L., & Gentile, C. L. (2018). The gut microbiota as a novel regulator of cardiovascular function and disease. *J Nutr Biochem*, 56, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.12.010>
- Benatti, R. O., Melo, A. M., Borges, F. O., Ignacio-Souza, L. M., Simino, L. A., Milanski, M., Torsoni, A. S. (2014). Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and microRNA-122 (miR-122) and microRNA-370 (miR-370) expression in offspring. *Br J Nutr*, 111(12), 2112-2122. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000579>
- Benavides, G. A., Squadrito, G. L., Mills, R. W., Patel, H. D., Isbell, T. S., Patel, R. P., Kraus, D. W. (2007). Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(46), 17977-17982. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705710104>
- Bentov, Y. (2014). "A Western diet side story": the effects of transitioning to a Western-type diet on fertility. *Endocrinology*, 155(7), 2341-2342. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1405>
- Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R., & Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*, 23(7), 781-783. <https://doi.org/10.1101/gad.1787609>

- Bernardes, N., Ayyappan, P., De Angelis, K., Bagchi, A., Akolkar, G., da Silva Dias, D., Singal, P. K. (2017). Excessive consumption of fructose causes cardiometabolic dysfunctions through oxidative stress and inflammation. *Can J Physiol Pharmacol*, 95(10), 1078-1090. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0663>
- Beltowski, J. (2015). Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine--An update. *Pharmacol Rep*, 67(3), 647-658. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.01.005>
- Beltowski, J. (2019). Synthesis, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Hydrogen Sulfide: An Overview. *Methods Mol Biol*, 2007, 1-8. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9528-8_1
- Beltowski, J., & Jamroz-Wiśniewska, A. (2014). Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation. *Molecules*, 19(12), 21183-21199. <https://doi.org/10.3390/molecules191221183>
- Bibli, S. I., Yang, G., Zhou, Z., Wang, R., Topouzis, S., & Papapetropoulos, A. (2015). Role of cGMP in hydrogen sulfide signaling. *Nitric Oxide*, 46, 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.12.004>
- Biermann, J., Lagrèze, W. A., Schallner, N., Schwer, C. I., & Goebel, U. (2011). Inhalative preconditioning with hydrogen sulfide attenuated apoptosis after retinal ischemia/reperfusion injury. *Mol Vis*, 17, 1275-1286.
- Bietrix, F., Yan, D., Nauze, M., Rolland, C., Bertrand-Michel, J., Coméra, C., Collet, X. (2006). Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem*, 281(11), 7214-7219. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508868200>
- Bitar, M. S., Nader, J., Al-Ali, W., Al Madhoun, A., Arefanian, H., & Al-Mulla, F. (2018). Hydrogen Sulfide Donor NaHS Improves Metabolism and Reduces Muscle Atrophy in Type 2 Diabetes: Implication for Understanding Sarcopenic Pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 6825452. <https://doi.org/10.1155/2018/6825452>
- Bithi, N., Link, C., Henderson, Y. O., Kim, S., Yang, J., Li, L., Hine, C. (2021). Dietary restriction transforms the mammalian protein persulfidome in a tissue-specific and cystathionine γ -lyase-dependent manner. *Nat Commun*, 12(1), 1745. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22001-w>
- Blasco-Baque, V., Coupé, B., Fabre, A., Handgraaf, S., Gourdy, P., Arnal, J. F., Serino, M. (2017). Associations between hepatic miRNA expression, liver triacylglycerols and gut microbiota during metabolic adaptation to high-fat diet in mice. *Diabetologia*, 60(4), 690-700. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4209-3>
- Boesch, C., Ith, M., Jung, B., Bruegger, K., Erban, S., Diamantis, I., Bär, A. (2001). Effect of oral D-tagatose on liver volume and hepatic glycogen accumulation in healthy male volunteers. *Regul Toxicol Pharmacol*, 33(2), 257-267. <https://doi.org/10.1006/rtph.2001.1470>
- Bonaccio, M., Iacoviello, L., de Gaetano, G., & Moli-Sani Investigators. (2012). The Mediterranean diet: the reasons for a success. *Thromb Res*, 129(3), 401-404. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.10.018>
- Boney, C. M., Verma, A., Tucker, R., & Vohr, B. R. (2005). Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics*, 115(3), e290-296. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1808>
- Bosc, L. V. G., Osmond, J. M., Giermakowska, W. K., Pace, C. E., Riggs, J. L., Jackson-Weaver, O., & Kanagy, N. L. (2017). Vascular Biology and Microcirculation: NFAT regulation of cystathionine γ -lyase expression in endothelial cells is impaired in rats exposed to intermittent hypoxia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 312(4), H791.
- Bouillaud, F., & Blachier, F. (2011). Mitochondria and sulfide: a very old story of poisoning, feeding, and signaling? *Antioxid Redox Signal*, 15(2), 379-391. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3678>
- Bray, G. A., Nielsen, S. J., & Popkin, B. M. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*, 79(4), 537-543. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.4.537>
- Briand, F., Thiéblemont, Q., Muzotte, E., & Sulpice, T. (2012). High-fat and fructose intake induces insulin resistance, dyslipidemia, and liver steatosis and alters in vivo macrophage-to-feces reverse cholesterol transport in hamsters. *J Nutr*, 142(4), 704-709. <https://doi.org/10.3945/jn.111.153197>
- Brinton, E. A. (2016). The time has come to flag and reduce excess fructose intake. *Atherosclerosis*, 253, 262-264. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.040>

Bibliografía

- Buemann, B., Toubro, S., Holst, J. J., Rehfeld, J. F., Bibby, B. M., & Astrup, A. (2000). D-tagatose, a stereoisomer of D-fructose, increases blood uric acid concentration. *Metabolism*, 49(8), 969-976. <https://doi.org/10.1053/meta.2000.7724>
- Buemann, B., Toubro, S., Raben, A., & Astrup, A. (1999). Human tolerance to a single, high dose of D-tagatose. *Regul Toxicol Pharmacol*, 29(2 Pt 2), S66-70. <https://doi.org/10.1006/rtp.1998.1252>
- Burdge, G. C., Hanson, M. A., Slater-Jefferies, J. L., & Lillycrop, K. A. (2007). Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr*, 97(6), 1036-1046. <https://doi.org/10.1017/S0007114507682920>
- Burkitt, D. P. (1973). Some diseases characteristic of modern Western civilization. *Br Med J*, 1(5848), 274-278. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5848.274>
- Burnier, M., & Egan, B. M. (2019). Adherence in Hypertension. *Circ Res*, 124(7), 1124-1140. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313220>
- Bussler, S., Penke, M., Flemming, G., Elhassan, Y. S., Kratzsch, J., Sergeev, E., Kiess, W. (2017). Novel Insights in the Metabolic Syndrome in Childhood and Adolescence. *Horm Res Paediatr*, 88(3-4), 181-193. <https://doi.org/10.1159/000479510>
- Butler, M. J., & Barrientos, R. M. (2020). The impact of nutrition on COVID-19 susceptibility and long-term consequences. *Brain Behav Immun*, 87, 53-54. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.04.040>
- Cai, J., Shi, X., Wang, H., Fan, J., Feng, Y., Lin, X., Xu, G. (2016). Cystathionine γ lyase–hydrogen sulfide increases peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by sulfhydration at C139 site thereby promoting glucose uptake and lipid storage in adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(5), 419-429.
- Cai, W. J., Wang, M. J., Moore, P. K., Jin, H. M., Yao, T., & Zhu, Y. C. (2007). The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation. *Cardiovasc Res*, 76(1), 29-40. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.05.026>
- Calvert, J. W., Jha, S., Gundewar, S., Elrod, J. W., Ramachandran, A., Pattillo, C. B., Lefer, D. J. (2009). Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ Res*, 105(4), 365-374. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.199919>
- Carr, T. P., Andresen, C. J., & Rudel, L. L. (1993). Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin Biochem*, 26(1), 39-42. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(93\)90015-x](https://doi.org/10.1016/0009-9120(93)90015-x)
- Carrera-Bastos, P., Fontes-Villalba, M., O'Keefe, J. H., Lindeberg, S., & Cordain, L. (2011). The western diet and lifestyle and diseases of civilization. *Res Rep Clin Cardiol*, 2(1), 15-35.
- Carter, R. N., & Morton, N. M. (2016). Cysteine and hydrogen sulphide in the regulation of metabolism: insights from genetics and pharmacology. *J Pathol*, 238(2), 321-332. <https://doi.org/10.1002/path.4659>
- Casas-Agustench, P., Fernandes, F. S., Tavares do Carmo, M. G., Visioli, F., Herrera, E., & Dávalos, A. (2015). Consumption of distinct dietary lipids during early pregnancy differentially modulates the expression of microRNAs in mothers and offspring. *PLoS One*, 10(2), e0117858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117858>
- Casas-Agustench, P., Iglesias-Gutiérrez, E., & Dávalos, A. (2015). Mother's nutritional miRNA legacy: Nutrition during pregnancy and its possible implications to develop cardiometabolic disease in later life. *Pharmacol Res*, 100, 322-334. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.017>
- Castro, M. C., Massa, M. L., Del Zotto, H., Gagliardino, J. J., & Francini, F. (2011). Rat liver uncoupling protein 2: changes induced by a fructose-rich diet. *Life Sci*, 89(17-18), 609-614. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.07.024>
- Catalano, P. M., Presley, L., Minium, J., & Hauguel-de Mouzon, S. (2009). Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care*, 32(6), 1076-1080. <https://doi.org/10.2337/dc08-2077>
- Catena, C., Giacchetti, G., Novello, M., Colussi, G., Cavarape, A., & Sechi, L. A. (2003). Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension. *Am J Hypertens*, 16(11 Pt 1), 973-978. [https://doi.org/10.1016/s0895-7061\(03\)01002-1](https://doi.org/10.1016/s0895-7061(03)01002-1)

- Cavarape, A., Feletto, F., Mercuri, F., Quagliaro, L., Damante, G., & Ceriello, A. (2001). High-fructose diet decreases catalase mRNA levels in rat tissues. *Journal of endocrinological investigation*, *24*(11), 838-845.
- Cena, H., & Calder, P. C. (2020). Defining a Healthy Diet: Evidence for The Role of Contemporary Dietary Patterns in Health and Disease. *Nutrients*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/nu12020334>
- Chang, G. Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O., & Leibowitz, S. F. (2008). Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci*, *28*(46), 12107-12119. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-08.2008>
- Chang, L., Geng, B., Yu, F., Zhao, J., Jiang, H., Du, J., & Tang, C. (2008). Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. *Amino Acids*, *34*(4), 573-585. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0011-8>
- Chartoumpakis, D. V., Zaravinos, A., Ziros, P. G., Iskrenova, R. P., Psyrogiannis, A. I., Kyriazopoulou, V. E., & Habeos, I. G. (2012). Differential expression of microRNAs in adipose tissue after long-term high-fat diet-induced obesity in mice. *PLoS One*, *7*(4), e34872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034872>
- Chavez, A. O., Molina-Carrion, M., Abdul-Ghani, M. A., Folli, F., Defronzo, R. A., & Tripathy, D. (2009). Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance. *Diabetes Care*, *32*(8), 1542-1546. <https://doi.org/10.2337/dc09-0684>
- Chen, W. W., Li, L., Yang, G. Y., Li, K., Qi, X. Y., Zhu, W., Boden, G. (2008). Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with Type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, *116*(1), 65-68. <https://doi.org/10.1055/s-2007-985148>
- Chiang, J. Y. L., & Ferrell, J. M. (2019). Bile Acids as Metabolic Regulators and Nutrient Sensors. *Annu Rev Nutr*, *39*, 175-200. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082018-124344>
- Chiavaroli, L., de Souza, R. J., Ha, V., Cozma, A. I., Mirrahimi, A., Wang, D. D., Jenkins, A. L. (2015). Effect of fructose on established lipid targets: a systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials. *Journal of the American Heart Association*, *4*(9), e001700.
- Chiku, T., Padovani, D., Zhu, W., Singh, S., Vitvitsky, V., & Banerjee, R. (2009). H₂S biogenesis by human cystathionine γ -lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(17), 11601-11612.
- Chin, D., & Means, A. R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol*, *10*(8), 322-328. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)01800-6](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01800-6)
- Ching, R. H., Yeung, L. O., Tse, I. M., Sit, W. H., & Li, E. T. (2011). Supplementation of bitter melon to rats fed a high-fructose diet during gestation and lactation ameliorates fructose-induced dyslipidemia and hepatic oxidative stress in male offspring. *J Nutr*, *141*(9), 1664-1672. <https://doi.org/10.3945/jn.111.142299>
- Choi, Y. J., Yoon, Y., Lee, K. Y., Hien, T. T., Kang, K. W., Kim, K. C., Lee, B. H. (2014). Uric acid induces endothelial dysfunction by vascular insulin resistance associated with the impairment of nitric oxide synthesis. *FASEB J*, *28*(7), 3197-3204. <https://doi.org/10.1096/fj.13-247148>
- Chrysant, S. G., & Chrysant, G. S. (2018). The current status of homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: a mini review. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, *16*(8), 559-565. <https://doi.org/10.1080/14779072.2018.1497974>
- Chukijrunroat, N., Khamphaya, T., Weerachayaphorn, J., Songserm, T., & Saengsirisuwan, V. (2017). Hepatic FGF21 mediates sex differences in high-fat high-fructose diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *313*(2), E203-E212. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00076.2017>
- Cindrova-Davies, T., Herrera, E. A., Niu, Y., Kingdom, J., Giussani, D. A., & Burton, G. J. (2013). Reduced cystathionine γ -lyase and increased miR-21 expression are associated with increased vascular resistance in growth-restricted pregnancies: hydrogen sulfide as a placental vasodilator. *Am J Pathol*, *182*(4), 1448-1458. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.001>
- Cirillo, F., Catellani, C., Sartori, C., Lazzaroni, P., Amarri, S., & Street, M. E. (2019). Obesity, Insulin Resistance, and Colorectal Cancer: Could miRNA Dysregulation Play A Role? *Int J Mol Sci*, *20*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20122922>

Bibliografía

- Clarke, R., Daly, L., Robinson, K., Naughten, E., Cahalane, S., Fowler, B., & Graham, I. (1991). Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*, *324*(17), 1149-1155. <https://doi.org/10.1056/NEJM199104253241701>
- Clifton, V. L. (2010). Review: Sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival. *Placenta*, *31 Suppl*, S33-39. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.11.010>
- Coate, K. C., Cha, J., Shrestha, S., Wang, W., Gonçalves, L. M., Almaça, J., Dai, C. (2020). SARS-CoV-2 cell entry factors ACE2 and TMPRSS2 are expressed in the microvasculature and ducts of human pancreas but are not enriched in β cells. *Cell metabolism*, *32*(6), 1028-1040. e1024.
- Coletta, C., Papapetropoulos, A., Erdelyi, K., Olah, G., Módis, K., Panopoulos, P., Szabo, C. (2012). Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(23), 9161-9166. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202916109>
- Collino, M., Aragno, M., Castiglia, S., Miglio, G., Tomasinelli, C., Boccuzzi, G., Fantozzi, R. (2010). Pioglitazone improves lipid and insulin levels in overweight rats on a high cholesterol and fructose diet by decreasing hepatic inflammation. *Br J Pharmacol*, *160*(8), 1892-1902. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00671.x>
- Comas, F., & Moreno-Navarrete, J. M. (2021). The Impact of H₂S on Obesity-Associated Metabolic Disturbances. *Antioxidants*, *10*(5), 633.
- Cordain, L., Miller, J. B., Eaton, S. B., Mann, N., Holt, S. H., & Speth, J. D. (2000). Plant-animal subsistence ratios and macronutrient energy estimations in worldwide hunter-gatherer diets. *Am J Clin Nutr*, *71*(3), 682-692. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.3.682>
- Corella, D., & Ordovas, J. M. (2017). Basic Concepts in Molecular Biology Related to Genetics and Epigenetics. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, *70*(9), 744-753. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2017.05.011>
- Cox, C. L., Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Graham, J. L., Hatcher, B., Griffen, S. C., Keim, N. L. (2012). Consumption of fructose-but not glucose-sweetened beverages for 10 weeks increases circulating concentrations of uric acid, retinol binding protein-4, and gamma-glutamyl transferase activity in overweight/obese humans. *Nutrition & metabolism*, *9*(1), 68.
- Csiszar, A., Wang, M., Lakatta, E. G., & Ungvari, Z. (2008). Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF- κ B. *Journal of applied physiology*, *105*(4), 1333-1341.
- Cuevas-Ramos, D., Almeda-Valdes, P., Aguilar-Salinas, C. A., Cuevas-Ramos, G., Cuevas-Sosa, A. A., & Gomez-Perez, F. J. (2009). The role of fibroblast growth factor 21 (FGF21) on energy balance, glucose and lipid metabolism. *Curr Diabetes Rev*, *5*(4), 216-220. <https://doi.org/10.2174/157339909789804396>
- Czech, M. P. (2017). Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat Med*, *23*(7), 804-814. <https://doi.org/10.1038/nm.4350>
- Davis, C. D., & Ross, S. A. (2007). Dietary components impact histone modifications and cancer risk. *Nutr Rev*, *65*(2), 88-94. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00285.x>
- de Castro, U. G. M., Silva, M. E., de Lima, W. G., Campagnole-Santos, M. J., & Alzamora, A. C. (2013). Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. *Lipids in health and disease*, *12*(1), 1-11.
- de Koning, L., Malik, V. S., Kellogg, M. D., Rimm, E. B., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2012). Sweetened beverage consumption, incident coronary heart disease, and biomarkers of risk in men. *Circulation*, *125*(14), 1735-1741, S1731. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067017>
- De Las Heras, J., Aldámiz-Echevarría, L., Martínez-Chantar, M. L., & Delgado, T. C. (2017). An update on the use of benzoate, phenylacetate and phenylbutyrate ammonia scavengers for interrogating and modifying liver nitrogen metabolism and its implications in urea cycle disorders and liver disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, *13*(4), 439-448. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1262843>
- Debosch, B. J., Chen, Z., Saben, J. L., Finck, B. N., & Moley, K. H. (2014). Glucose transporter 8 (GLUT8) mediates fructose-induced de novo lipogenesis and macrosteatosis. *J Biol Chem*, *289*(16), 10989-10998. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.527002>

- Dekker, M. J., Su, Q., Baker, C., Rutledge, A. C., & Adeli, K. (2010). Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299(5), E685-694. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00283.2010>
- Delbosc, S., Paizanis, E., Magous, R., Araiz, C., Dimo, T., Cristol, J.-P., Azay, J. (2005). Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis*, 179(1), 43-49.
- Delides, A., Spooner, R. J., Goldberg, D. M., & Neal, F. E. (1976). An optimized semi-automatic rate method for serum glutathione reductase activity and its application to patients with malignant disease. *Journal of clinical pathology*, 29(1), 73-77.
- Deng, J. Y., Huang, J. P., Lu, L. S., & Hung, L. M. (2007). Impairment of cardiac insulin signaling and myocardial contractile performance in high-cholesterol/fructose-fed rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(2), H978-987. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01002.2006>
- Dentin, R., Girard, J., & Postic, C. (2005). Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie*, 87(1), 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.008>
- Desai, B. N., Singhal, G., Watanabe, M., Stevanovic, D., Lundasen, T., Mather, M. L., Nasser, I. A. (2017). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is robustly induced by ethanol and has a protective role in ethanol associated liver injury. *Molecular metabolism*, 6(11), 1395-1406.
- Desoye, G., Gauster, M., & Wadsack, C. (2011). Placental transport in pregnancy pathologies. *Am J Clin Nutr*, 94(6 Suppl), 1896S-1902S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.000851>
- di Villa Bianca, R. d. E., Mitidieri, E., Di Minno, M. N., Kirkby, N. S., Warner, T. D., Di Minno, G., Sorrentino, R. (2013). Hydrogen sulphide pathway contributes to the enhanced human platelet aggregation in hyperhomocysteinemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(39), 15812-15817.
- Diggle, C. P., Shires, M., Leitch, D., Brooke, D., Carr, I. M., Markham, A. F., Bonthron, D. T. (2009). Ketohexokinase: expression and localization of the principal fructose-metabolizing enzyme. *J Histochem Cytochem*, 57(8), 763-774. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.953190>
- Donaldson, J., Ngema, M., Nkomozepi, P., & Erlwanger, K. (2019). Quercetin administration post-weaning attenuates high-fructose, high-cholesterol diet-induced hepatic steatosis in growing, female, Sprague Dawley rat pups. *J Sci Food Agric*, 99(15), 6954-6961. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9984>
- Dongó, E., Beliczai-Marosi, G., Dybvig, A. S., & Kiss, L. (2018). The mechanism of action and role of hydrogen sulfide in the control of vascular tone. *Nitric Oxide*, 81, 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.10.010>
- Douard, V., & Ferraris, R. P. (2008). Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(2), E227-237. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90245.2008>
- Du, C., Lin, X., Xu, W., Zheng, F., Cai, J., Yang, J., Xu, G. (2019). Sulfhydrated sirtuin-1 increasing its deacetylation activity is an essential epigenetics mechanism of anti-atherogenesis by hydrogen sulfide. *Antioxidants & redox signaling*, 30(2), 184-197.
- DU, J. T., Li, W., Yang, J. Y., Tang, C. S., Li, Q., & Jin, H. F. (2013). Hydrogen sulfide is endogenously generated in rat skeletal muscle and exerts a protective effect against oxidative stress. *Chin Med J (Engl)*, 126(5), 930-936.
- Ducker, G. S., & Rabinowitz, J. D. (2017). One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab*, 25(1), 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.009>
- Dumortier, O., Hinault, C., Gautier, N., Patouraux, S., Casamento, V., & Van Obberghen, E. (2014). Maternal protein restriction leads to pancreatic failure in offspring: role of misexpressed microRNA-375. *Diabetes*, 63(10), 3416-3427. <https://doi.org/10.2337/db13-1431>
- Durante, M., Sgambellone, S., Lucarini, L., Failli, P., Laurino, A., Collotta, D., Collino, M. (2021). D-Tagatose Feeding Reduces the Risk of Sugar-Induced Exacerbation of Myocardial I/R Injury When Compared to Its Isomer Fructose. *Front Mol Biosci*, 8, 650962. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.650962>

Bibliografía

- Dushay, J., Chui, P. C., Gopalakrishnan, G. S., Varela-Rey, M., Crawley, M., Fisher, F. M., Maratos-Flier, E. (2010). Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, *139*(2), 456-463. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.04.054>
- Dushay, J. R., Toschi, E., Mitten, E. K., Fisher, F. M., Herman, M. A., & Maratos-Flier, E. (2015). Fructose ingestion acutely stimulates circulating FGF21 levels in humans. *Mol Metab*, *4*(1), 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.09.008>
- Dutchak, P. A., Katafuchi, T., Bookout, A. L., Choi, J. H., Ruth, T. Y., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2012). Fibroblast growth factor-21 regulates PPAR γ activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell*, *148*(3), 556-567.
- Eldow, A. G., Vora, N. L., Hui, L., Wick, H. C., Cowan, J. M., & Bianchi, D. W. (2014). Maternal obesity affects fetal neurodevelopmental and metabolic gene expression: a pilot study. *PLoS One*, *9*(2), e88661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088661>
- El-Seweid, M. M., Sadik, N. A., & Shaker, O. G. (2011). Role of sulfurous mineral water and sodium hydrosulfide as potent inhibitors of fibrosis in the heart of diabetic rats. *Arch Biochem Biophys*, *506*(1), 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.10.014>
- Enjoji, M., Yasutake, K., Kohjima, M., & Nakamuta, M. (2012). Nutrition and nonalcoholic Fatty liver disease: the significance of cholesterol. *Int J Hepatol*, *2012*, 925807. <https://doi.org/10.1155/2012/925807>
- Ensor, M., Banfield, A. B., Smith, R. R., Williams, J., & Lodder, R. A. (2015). Safety and Efficacy of D-Tagatose in Glycemic Control in Subjects with Type 2 Diabetes. *J Endocrinol Diabetes Obes*, *3*(1).
- Eren, O. C., Ortiz, A., Afsar, B., Covic, A., Kuwabara, M., Lanaspá, M. A., Kanbay, M. (2019). Multilayered Interplay Between Fructose and Salt in Development of Hypertension. *Hypertension*, *73*(2), 265-272. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12150>
- Eriksson, J. G., Kajantie, E., Osmond, C., Thornburg, K., & Barker, D. J. (2010). Boys live dangerously in the womb. *Am J Hum Biol*, *22*(3), 330-335. <https://doi.org/10.1002/ajhb.20995>
- Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., Pandey, S. K., Pear, M., Monia, B. P. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab*, *3*(2), 87-98. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.005>
- Falbe, J., Thompson, H. R., Patel, A., & Madsen, K. A. (2019). Potentially addictive properties of sugar-sweetened beverages among adolescents. *Appetite*, *133*, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2018.10.032>
- Fang, L., Zhao, J., Chen, Y., Ma, T., Xu, G., Tang, C., Geng, B. (2009). Hydrogen sulfide derived from periaortic adipose tissue is a vasodilator. *J Hypertens*, *27*(11), 2174-2185. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328330a900>
- Fariña, J. P., García, M. E., Alzamendi, A., Giovambattista, A., Marra, C. A., Spinedi, E., & Gagliardino, J. J. (2013). Antioxidant treatment prevents the development of fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. *Clin Sci (Lond)*, *125*(2), 87-97. <https://doi.org/10.1042/CS20120470>
- Faruque, S., Tong, J., Lacmanovic, V., Agbonghae, C., Minaya, D. M., & Czaja, K. (2019). The Dose Makes the Poison: Sugar and Obesity in the United States - a Review. *Pol J Food Nutr Sci*, *69*(3), 219-233. <https://doi.org/10.31883/pjfn/110735>
- Fauste, E., Rodrigo, S., Aguirre, R., Donis, C., Rodríguez, L., Álvarez-Millán, J. J., Bocos, C. (2020). Maternal Fructose Intake Increases Liver H 2 S Synthesis but Exacerbates its Fructose-Induced Decrease in Female Progeny. *Mol Nutr Food Res*, *64*(18), e2000628. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000628>
- Fauste, E., Rodrigo, S., Aguirre, R., Rodríguez, L., Álvarez-Millán, J. J., Panadero, M. I., Bocos, C. (2020). Liquid carbohydrate intake modifies transsulfuration pathway both in pregnant rats and in their male descendants. *Clin Invest Arterioscler*. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2020.10.004>
- Fauste, E., Rodrigo, S., Rodríguez, L., Donis, C., García, A., Barbas, C., Bocos, C. (2020). FGF21-protection against fructose-induced lipid accretion and oxidative stress is influenced by maternal nutrition in male progeny. *Journal of Functional Foods*, *64*, 103676.

- Federation, I. D. (2006). The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. *IDF Communications*, 1-23.
- Feng, X., Chen, Y., Zhao, J., Tang, C., Jiang, Z., & Geng, B. (2009). Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. *Biochem Biophys Res Commun*, 380(1), 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.059>
- Feng, Y. Y., Xu, X. Q., Ji, C. B., Shi, C. M., Guo, X. R., & Fu, J. F. (2014). Aberrant hepatic microRNA expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Physiol Biochem*, 34(6), 1983-1997. <https://doi.org/10.1159/000366394>
- Ferder, L., Ferder, M. D., & Inserra, F. (2010). The role of high-fructose corn syrup in metabolic syndrome and hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 12(2), 105-112. <https://doi.org/10.1007/s11906-010-0097-3>
- Ferey, J. L., Boudoures, A. L., Reid, M., Drury, A., Scheaffer, S., Modi, Z., Thompson, M. D. (2019). A maternal high-fat, high-sucrose diet induces transgenerational cardiac mitochondrial dysfunction independently of maternal mitochondrial inheritance. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 316(5), H1202-H1210.
- Fergusson, M. A., & Koski, K. G. (1990). Comparison of effects of dietary glucose versus fructose during pregnancy on fetal growth and development in rats. *J Nutr*, 120(11), 1312-1319. <https://doi.org/10.1093/jn/120.11.1312>
- Fernandez-Twinn, D. S., Alfaradhi, M. Z., Martin-Gronert, M. S., Duque-Guimaraes, D. E., Piekarz, A., Ferland-McCollough, D., Ozanne, S. E. (2014). Downregulation of IRS-1 in adipose tissue of offspring of obese mice is programmed cell-autonomously through post-transcriptional mechanisms. *Mol Metab*, 3(3), 325-333. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.01.007>
- Fernández Sanjurjo, M., de Gonzalo-Calvo, D., Díez-Robles, S., Dávalos, A., & Iglesias-Gutiérrez, E. (2016). MicroRNA circulantes como reguladores de la respuesta molecular al ejercicio en personas sanas. *Archivos de Medicina del Deporte*.
- Fernández-Hernando, C., Ramírez, C. M., Goedeke, L., & Suárez, Y. (2013). MicroRNAs in metabolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(2), 178-185. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300144>
- Finucane, F. M., Luan, J., Wareham, N. J., Sharp, S. J., O'Rahilly, S., Balkau, B. (2009). Correlation of the leptin:adiponectin ratio with measures of insulin resistance in non-diabetic individuals. *Diabetologia*, 52(11), 2345-2349. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1508-3>
- Fiorucci, S., Antonelli, E., Distrutti, E., Rizzo, G., Mencarelli, A., Orlandi, S., Wallace, J. L. (2005). Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology*, 129(4), 1210-1224. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.07.060>
- Fiorucci, S., Zampella, A., Cirino, G., Bucci, M., & Distrutti, E. (2017). Decoding the vasoregulatory activities of bile acid-activated receptors in systemic and portal circulation: role of gaseous mediators. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 312(1), H21-H32. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00577.2016>
- Fisher, F. M., Chui, P. C., Antonellis, P. J., Bina, H. A., Kharitonenkov, A., Flier, J. S., & Maratos-Flier, E. (2010). Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes*, 59(11), 2781-2789. <https://doi.org/10.2337/db10-0193>
- Fisher, F. M., Kim, M., Doridot, L., Cunniff, J. C., Parker, T. S., Levine, D. M., Herman, M. A. (2017). A critical role for ChREBP-mediated FGF21 secretion in hepatic fructose metabolism. *Mol Metab*, 6(1), 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.11.008>
- Fisher, F. M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E. C., Mepani, R. J., Verdeguer, F., Spiegelman, B. M. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev*, 26(3), 271-281. <https://doi.org/10.1101/gad.177857.111>
- Fisher, F. M., & Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the Physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol*, 78, 223-241. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105339>
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.

Bibliografía

- Forhead, A. J., & Fowden, A. L. (2009). The hungry fetus? Role of leptin as a nutritional signal before birth. *J Physiol*, 587(Pt 6), 1145-1152. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.167072>
- Francini, F., Castro, M. C., Schinella, G., García, M. E., Maiztegui, B., Raschia, M. A., Massa, M. L. (2010). Changes induced by a fructose-rich diet on hepatic metabolism and the antioxidant system. *Life Sci*, 86(25-26), 965-971. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.05.005>
- Francisco, V., Pino, J., Campos-Cabaleiro, V., Ruiz-Fernández, C., Mera, A., Gonzalez-Gay, M. A., Gualillo, O. (2018). Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. *Front Physiol*, 9, 640. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00640>
- Franco, M. o. C., Arruda, R. M., Dantas, A. P., Kawamoto, E. M., Fortes, Z. B., Scavone, C., Nigro, D. (2002). Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovasc Res*, 56(1), 145-153. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(02\)00508-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00508-4)
- Fried, S. K., & Rao, S. P. (2003). Sugars, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 78(4), 873S-880S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.4.873S>
- Fruhwürth, S., Vogel, H., Schürmann, A., & Williams, K. J. (2018). Novel Insights into How Overnutrition Disrupts the Hypothalamic Actions of Leptin. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 89. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00089>
- Fu, T., & Kemper, J. K. (2016). MicroRNA-34a and Impaired FGF19/21 Signaling in Obesity. *Vitam Horm*, 101, 175-196. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.02.002>
- Fu, T., Seok, S., Choi, S., Huang, Z., Suino-Powell, K., Xu, H. E., Kemper, J. K. (2014). MicroRNA 34a inhibits beige and brown fat formation in obesity in part by suppressing adipocyte fibroblast growth factor 21 signaling and SIRT1 function. *Mol Cell Biol*, 34(22), 4130-4142. <https://doi.org/10.1128/MCB.00596-14>
- Fukuto, J. M., Vega, V. S., Works, C., & Lin, J. (2020). The chemical biology of hydrogen sulfide and related hydropersulfides: interactions with biologically relevant metals and metalloproteins. *Curr Opin Chem Biol*, 55, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.11.013>
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 114(12), 1752-1761. <https://doi.org/10.1172/JCI21625>
- Gaillard, R. (2015). Maternal obesity during pregnancy and cardiovascular development and disease in the offspring. *Eur J Epidemiol*, 30(11), 1141-1152. <https://doi.org/10.1007/s10654-015-0085-7>
- Gallego-Sandín, S., Alonso, M. T., & García-Sancho, J. (2011). Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) reduces the calcium content of the endoplasmic reticulum (ER) and triggers ER stress. *Biochem J*, 437(3), 469-475. <https://doi.org/10.1042/BJ20110479>
- Ge, Y., & Moss, R. L. (2012). Nitroxyl, redox switches, cardiac myofilaments, and heart failure: a prequel to novel therapeutics? *Circ Res*, 111(8), 954-956. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.278416>
- Geller, S., Arribat, Y., Netzahualcoyotzi, C., Lagarrigue, S., Carneiro, L., Zhang, L., Pellerin, L. (2019). Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion. *Cell Metab*, 30(4), 833-844.e837. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.004>
- Geng, B., Cai, B., Liao, F., Zheng, Y., Zeng, Q., Fan, X., Tang, C. (2013). Increase or decrease hydrogen sulfide exert opposite lipolysis, but reduce global insulin resistance in high fatty diet induced obese mice. *PLoS one*, 8(9).
- Gerhard, G. T., & Duell, P. B. (1999). Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 10(5), 417-428. <https://doi.org/10.1097/00041433-199910000-00006>
- Gheibi, S., Jeddi, S., Kashfi, K., & Ghasemi, A. (2019). Effects of Hydrogen Sulfide on Carbohydrate Metabolism in Obese Type 2 Diabetic Rats. *Molecules*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/molecules24010190>
- Gheibi, S., Samsonov, A. P., Vazquez, A. B., & Kashfi, K. (2020). Regulation of carbohydrate metabolism by nitric oxide and hydrogen sulfide: Implications in diabetes. *Biochem Pharmacol*, 113819. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113819>

- Giannakopoulou, E., Konstantinou, F., Ragia, G., Tavridou, A., Karaglani, M., Chatzaki, E., Manolopoulos, V. G. (2017). Epigenetics-by-sex interaction for coronary artery disease risk conferred by the cystathionine γ -lyase gene promoter methylation. *Omics: a journal of integrative biology*, *21*(12), 741-748.
- Gillman, M. W., Rifas-Shiman, S., Berkey, C. S., Field, A. E., & Colditz, G. A. (2003). Maternal gestational diabetes, birth weight, and adolescent obesity. *Pediatrics*, *111*(3), e221-226. <https://doi.org/10.1542/peds.111.3.e221>
- Gillman, M. W., Rifas-Shiman, S. L., Fernandez-Barres, S., Kleinman, K., Taveras, E. M., & Oken, E. (2017). Beverage Intake During Pregnancy and Childhood Adiposity. *Pediatrics*, *140*(2). <https://doi.org/10.1542/peds.2017-0031>
- Gimeno, R. E., & Moller, D. E. (2014). FGF21-based pharmacotherapy--potential utility for metabolic disorders. *Trends Endocrinol Metab*, *25*(6), 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.03.001>
- Gliban, A. M., Vasiljević, A., Veličković, N., Nikolić-Kokić, A., Blagojević, D., Matić, G., & Nestorov, J. (2015). The expression and activity of antioxidant enzymes in the liver of rats exposed to high-fructose diet in the period from weaning to adulthood. *J Sci Food Agric*, *95*(11), 2319-2324. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6953>
- Gniuli, D., Calcagno, A., Caristo, M. E., Mancuso, A., Macchi, V., Mingrone, G., & Vettor, R. (2008). Effects of high-fat diet exposure during fetal life on type 2 diabetes development in the progeny. *J Lipid Res*, *49*(9), 1936-1945. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800033-JLR200>
- Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M., & Creager, M. A. (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, *114*(6), 597-605. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854>
- Gonzalez, J. T., & Betts, J. A. (2018). Dietary Fructose Metabolism By Splanchnic Organs: Size Matters. *Cell Metab*, *27*(3), 483-485. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.013>
- Gonzalez-Franquesa, A., & Patti, M. E. (2017). Insulin Resistance and Mitochondrial Dysfunction. *Adv Exp Med Biol*, *982*, 465-520. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_25
- González-Torres, M. C., Betancourt-Rule, M., & Ortiz-Muñiz, R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, *25*(1), 3-9.
- Graham, I. M., Daly, L. E., Refsum, H. M., Robinson, K., Brattström, L. E., Ueland, P. M., Andria, G. (1997). Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA*, *277*(22), 1775-1781. <https://doi.org/10.1001/jama.1997.03540460039030>
- Grefhorst, A., Verkade, H. J., & Groen, A. K. (2019). The TICE Pathway: Mechanisms and Lipid-Lowering Therapies. *Methodist Debakey Cardiovasc J*, *15*(1), 70-76. <https://doi.org/10.14797/mdcj-15-1-70>
- Grigore, D., Ojeda, N. B., & Alexander, B. T. (2008). Sex differences in the fetal programming of cardiovascular disease. *Gender medicine*, *5*(Suppl A), S121.
- Guallar-Castillón, P., Pérez, R. F., López García, E., León-Muñoz, L. M., Aguilera, M. T., Graciani, A., Rodríguez-Artalejo, F. (2014). Magnitude and management of metabolic syndrome in Spain in 2008-2010: the ENRICA study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, *67*(5), 367-373. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2013.08.014>
- Guerrero-Wyss, M., Durán Agüero, S., & Angarita Dávila, L. (2018). D-Tagatose Is a Promising Sweetener to Control Glycaemia: A New Functional Food. *Biomed Res Int*, *2018*, 8718053. <https://doi.org/10.1155/2018/8718053>
- Guo, Q., Feng, X., Xue, H., Jin, S., Teng, X., Duan, X., Wu, Y. (2019). Parental Renovascular Hypertension-Induced Autonomic Dysfunction in Male Offspring Is Improved by Prenatal or Postnatal Treatment With Hydrogen Sulfide. *Front Physiol*, *10*, 1184. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01184>
- Guo, Q., Feng, X., Xue, H., Teng, X., Jin, S., Duan, X., Wu, Y. (2017). Maternal Renovascular Hypertensive Rats Treatment With Hydrogen Sulfide Increased the Methylation of AT1b Gene in Offspring. *Am J Hypertens*, *30*(12), 1220-1227. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpx124>
- Gutierrez, J. A., Liu, W., Perez, S., Xing, G., Sonnenberg, G., Kou, K., Tesz, G. J. (2021). Pharmacologic inhibition of ketohexokinase prevents fructose-induced metabolic dysfunction. *Mol Metab*, *48*, 101196. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101196>
- Guvenc, M., Guvenc, A. N., Yilmaz, Ö., & Tuzcu, M. (2017). Effect of Resveratrol on Fatty Acid Compositons and Lipophilic Vitamins of Fructose Induced Nonalcholic Fatty Liver. *Pakistan Journal of Zoology*, *49*(6).

Bibliografía

- Gälman, C., Lundåsen, T., Kharitononkov, A., Bina, H. A., Eriksson, M., Hafström, I., Rudling, M. (2008). The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPAR α activation in man. *Cell Metab*, 8(2), 169-174. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.014>
- Gómez-Sámamo, M., Grajales-Gómez, M., Zuarth-Vázquez, J. M., Navarro-Flores, M. F., Martínez-Saavedra, M., Juárez-León, Ó., Cuevas-Ramos, D. (2017). Fibroblast growth factor 21 and its novel association with oxidative stress. *Redox Biol*, 11, 335-341. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.024>
- Günzler, W., Kremers, H., & Flohe, L. (1974). An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9.) in blood. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 12(10), 444-448.
- Hackfort, B. T., & Mishra, P. K. (2016). Emerging role of hydrogen sulfide-microRNA crosstalk in cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 310(7), H802-812. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00660.2015>
- Haidari, M., Leung, N., Mahbub, F., Uffelman, K. D., Kohen-Avramoglu, R., Lewis, G. F., & Adeli, K. (2002). Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J Biol Chem*, 277(35), 31646-31655. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200544200>
- Hales, C. N., & Barker, D. J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35(7), 595-601. <https://doi.org/10.1007/bf00400248>
- Hallfrisch, J. (1990). Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J*, 4(9), 2652-2660. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.9.2189777>
- Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*, 87, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001>
- Hanafi, M. Y., Saleh, M. M., Saad, M. I., Abdelkhalik, T. M., & Kamel, M. A. (2016). Transgenerational effects of obesity and malnourishment on diabetes risk in F2 generation. *Mol Cell Biochem*, 412(1-2), 269-280. <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2633-6>
- Hannou, S. A., Haslam, D. E., McKeown, N. M., & Herman, M. A. (2018). Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest*, 128(2), 545-555. <https://doi.org/10.1172/JCI96702>
- Hanousková, B., Neprašová, B., Skálová, L., Maletínská, L., Zemanová, K., Ambrož, M., & Matoušková, P. (2019). High-fructose drinks affect microRNAs expression differently in lean and obese mice. *J Nutr Biochem*, 68, 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.03.001>
- Hardikar, A. A., Satoor, S. N., Karandikar, M. S., Joglekar, M. V., Puranik, A. S., Wong, W., Januszewski, A. S. (2015). Multigenerational undernutrition increases susceptibility to obesity and diabetes that is not reversed after dietary recuperation. *Cell metabolism*, 22(2), 312-319.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calfon, M., Ron, D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 11(3), 619-633. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00105-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00105-9)
- Hassan, M. I., Boosen, M., Schaefer, L., Kozłowska, J., Eisel, F., von Knethen, A., Hamada, F. M. (2012). Platelet-derived growth factor-BB induces cystathionine γ -lyase expression in rat mesangial cells via a redox-dependent mechanism. *British journal of pharmacology*, 166(8), 2231-2242.
- Havel, P. J. (2005). Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev*, 63(5), 133-157. <https://doi.org/10.1301/nr.2005.may.133-157>
- Hayashi, A. A., Webb, J., Choi, J., Baker, C., Lino, M., Trigatti, B., Adeli, K. (2011). Intestinal SR-BI is upregulated in insulin-resistant states and is associated with overproduction of intestinal apoB48-containing lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 301(2), G326-337. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00425.2010>
- Heard, E., & Martienssen, R. A. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell*, 157(1), 95-109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.045>

- Heden, T. D., Liu, Y., Park, Y.-M., Nyhoff, L. M., Winn, N. C., & Kanaley, J. A. (2014). Moderate amounts of fructose-or glucose-sweetened beverages do not differentially alter metabolic health in male and female adolescents. *The American journal of clinical nutrition*, *100*(3), 796-805.
- Herman, M. A., & Birnbaum, M. J. (2021). Molecular aspects of fructose metabolism and metabolic disease. *Cell Metab*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.09.010>
- Herman, M. A., & Samuel, V. T. (2016). The Sweet Path to Metabolic Demise: Fructose and Lipid Synthesis. *Trends Endocrinol Metab*, *27*(10), 719-730. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.06.005>
- Hernández-Díazcouder, A., Romero-Nava, R., Carbó, R., Sánchez-Lozada, L. G., & Sánchez-Muñoz, F. (2019). High Fructose Intake and Adipogenesis. *Int J Mol Sci*, *20*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112787>
- Hine, C., Harputlugil, E., Zhang, Y., Ruckenstein, C., Lee, B. C., Brace, L., Mitchell, J. R. (2015). Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell*, *160*(1-2), 132-144. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.048>
- Hine, C., Kim, H. J., Zhu, Y., Harputlugil, E., Longchamp, A., Matos, M. S., Mitchell, J. R. (2017). Hypothalamic-Pituitary Axis Regulates Hydrogen Sulfide Production. *Cell Metab*, *25*(6), 1320-1333.e1325. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.003>
- Hine, C., & Mitchell, J. R. (2017). Endpoint or Kinetic Measurement of Hydrogen Sulfide Production Capacity in Tissue Extracts. *Bio Protoc*, *7*(13). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2382>
- Hopps, E., Noto, D., Caimi, G., & Averna, M. R. (2010). A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, *20*(1), 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.06.002>
- Hossain, P., Kawar, B., & El Nahas, M. (2007). Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med*, *356*(3), 213-215. <https://doi.org/10.1056/NEJMp068177>
- Howie, G. J., Sloboda, D. M., Kamal, T., & Vickers, M. H. (2009). Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol*, *587*(Pt 4), 905-915. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.163477>
- Hsu, C. N., & Tain, Y. L. (2019). The Good, the Bad, and the Ugly of Pregnancy Nutrients and Developmental Programming of Adult Disease. *Nutrients*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/nu11040894>
- Hu, Y., Liu, H. X., Jena, P. K., Sheng, L., Ali, M. R., & Wan, Y. Y. (2020). Inhibition reduces hepatic steatosis via FGF21 and FGFR1 induction. *JHEP Rep*, *2*(2), 100093. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100093>
- Huang, J., Feng, S., Liu, A., Dai, Z., Wang, H., Reuhl, K., Yang, C. S. (2018). Green Tea Polyphenol EGCG Alleviates Metabolic Abnormality and Fatty Liver by Decreasing Bile Acid and Lipid Absorption in Mice. *Mol Nutr Food Res*, *62*(4). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700696>
- Huang, Y., Yan, Y., Xu, W., Qian, G., Li, C., Zou, H., & Li, Y. (2018). A New Insight into the Roles of miRNAs in Metabolic Syndrome. *Biomed Res Int*, *2018*, 7372636. <https://doi.org/10.1155/2018/7372636>
- Hulsmans, M., De Keyser, D., & Holvoet, P. (2011). MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. *FASEB J*, *25*(8), 2515-2527. <https://doi.org/10.1096/fj.11-181149>
- Hunter, S. R., Reister, E. J., Cheon, E., & Mattes, R. D. (2019). Low Calorie Sweeteners Differ in Their Physiological Effects in Humans. *Nutrients*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/nu11112717>
- Hutter, N., Baena, M., Sangüesa, G., Dávalos, A., Latasa, M. J., Escolà-Gil, J. C., Laguna, J. C. (2015). Liquid fructose supplementation in LDL-R-/- mice fed a western-type diet enhances lipid burden and atherosclerosis despite identical calorie consumption. *IJC Metabolic & Endocrine*, *9*, 12-21.
- Hwang, I. S., Ho, H., Hoffman, B. B., & Reaven, G. M. (1987). Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*, *10*(5), 512-516. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.10.5.512>
- Hwang, S.-Y., Sarna, L. K., Siow, Y. L., & O, K. (2013). High-fat diet stimulates hepatic cystathionine β-synthase and cystathionine γ-lyase expression. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *91*(11), 913-919.
- ISO Sugar Yearbook 2019. Retrieved 3th of April from <https://www.isosugar.org/sugarsector/sugar>

Bibliografía

- Ishii, I., Akahoshi, N., Yu, X. N., Kobayashi, Y., Namekata, K., Komaki, G., & Kimura, H. (2004). Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem J*, 381(Pt 1), 113-123. <https://doi.org/10.1042/BJ20040243>
- Ishimoto, T., Lanaspá, M. A., Le, M. T., García, G. E., Diggie, C. P., Maclean, P. S., Johnson, R. J. (2012). Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(11), 4320-4325. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119908109>
- Itoh, N. (2014). FGF21 as a Hepatokine, Adipokine, and Myokine in Metabolism and Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5, 107. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00107>
- Ilyedjian, P. B. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J*, 293 (Pt 1), 1-13. <https://doi.org/10.1042/bj2930001>
- Jacob, R. A., Gretz, D. M., Taylor, P. C., James, S. J., Pogribny, I. P., Miller, B. J., Swendseid, M. E. (1998). Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr*, 128(7), 1204-1212. <https://doi.org/10.1093/jn/128.7.1204>
- Jacobsen, S. C., Brøns, C., Bork-Jensen, J., Ribel-Madsen, R., Yang, B., Lara, E., Vaag, A. (2012). Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men. *Diabetologia*, 55(12), 3341-3349. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2717-8>
- Jain, S. K., Bull, R., Rains, J. L., Bass, P. F., Levine, S. N., Reddy, S., Bocchini, J. A. (2010). Low levels of hydrogen sulfide in the blood of diabetes patients and streptozotocin-treated rats causes vascular inflammation? *Antioxid Redox Signal*, 12(11), 1333-1337. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2956>
- Jain, S. K., Huning, L., & Micinski, D. (2014). Hydrogen Sulfide Upregulates Glutamate–Cysteine Ligase Catalytic Subunit, Glutamate–Cysteine Ligase Modifier Subunit, and Glutathione and Inhibits Interleukin-1 β Secretion in Monocytes Exposed to High Glucose Levels. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 12(5), 299-302.
- Jain, S. K., Micinski, D., Lieblong, B. J., & Stapleton, T. (2012). Relationship between hydrogen sulfide levels and HDL-cholesterol, adiponectin, and potassium levels in the blood of healthy subjects. *Atherosclerosis*, 225(1), 242-245. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.036>
- Jang, C., Hui, S., Lu, W., Cowan, A. J., Morscher, R. J., Lee, G., Rabinowitz, J. D. (2018). The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab*, 27(2), 351-361.e353. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.016>
- Jang, C., Wada, S., Yang, S., Gosis, B., Zeng, X., Zhang, Z., Rabinowitz, J. D. (2020). The small intestine shields the liver from fructose-induced steatosis. *Nat Metab*, 2(7), 586-593. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0222-9>
- Jasoni, C. L., Sanders, T. R., & Kim, D. W. (2014). Do all roads lead to Rome? The role of neuro-immune interactions before birth in the programming of offspring obesity. *Front Neurosci*, 8, 455. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00455>
- Jemil, I., Abdelhedi, O., Nasri, R., Mora, L., Marrekchi, R., Jamoussi, K., Nasri, M. (2017). Hypolipidemic, antiobesity and cardioprotective effects of sardinelle meat flour and its hydrolysates in high-fat and fructose diet fed Wistar rats. *Life Sci*, 176, 54-66. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.07.012>
- Jensen, B., & Fago, A. (2018). Reactions of ferric hemoglobin and myoglobin with hydrogen sulfide under physiological conditions. *J Inorg Biochem*, 182, 133-140. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.02.007>
- Jeon, T.-I., & Osborne, T. F. (2016). miRNA and cholesterol homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(12), 2041-2046.
- Jiang, H. L., Wu, H. C., Li, Z. L., Geng, B., & Tang, C. S. (2005). [Changes of the new gaseous transmitter H₂S in patients with coronary heart disease]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 25(8), 951-954.
- Jiang, M., Zhang, Y., Liu, M., Lan, M. S., Fei, J., Fan, W., Lu, D. (2011). Hypermethylation of hepatic glucokinase and L-type pyruvate kinase promoters in high-fat diet-induced obese rats. *Endocrinology*, 152(4), 1284-1289. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1162>
- Jin, R., Willment, A., Patel, S. S., Sun, X., Song, M., Mannery, Y. O., Vos, M. B. (2014). Fructose induced endotoxemia in pediatric nonalcoholic Fatty liver disease. *Int J Hepatol*, 2014, 560620. <https://doi.org/10.1155/2014/560620>

- Jin, S., Pu, S. X., Hou, C. L., Ma, F. F., Li, N., Li, X. H., Zhu, Y. C. (2015). Cardiac H₂S Generation Is Reduced in Ageing Diabetic Mice. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 758358. <https://doi.org/10.1155/2015/758358>
- Johnson, R. J., Perez-Pozo, S. E., Sautin, Y. Y., Manitius, J., Sanchez-Lozada, L. G., Feig, D. I., Nakagawa, T. (2009). Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev*, 30(1), 96-116. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0033>
- Johnson, R. J., Segal, M. S., Sautin, Y., Nakagawa, T., Feig, D. I., Kang, D. H., Sánchez-Lozada, L. G. (2007). Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 86(4), 899-906. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.4.899>
- Jonsson, W. O., Margolies, N. S., Mirek, E. T., Zhang, Q., Linden, M. A., Hill, C. M., Anthony, T. G. (2021). Physiologic Responses to Dietary Sulfur Amino Acid Restriction in Mice Are Influenced by Atf4 Status and Biological Sex. *J Nutr*, 151(4), 785-799. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa396>
- Jordan, S. D., Krüger, M., Willmes, D. M., Redemann, N., Wunderlich, F. T., Brönneke, H. S., Brüning, J. C. (2011). Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nat Cell Biol*, 13(4), 434-446. <https://doi.org/10.1038/ncb2211>
- Kabil, O., Vitvitsky, V., Xie, P., & Banerjee, R. (2011). The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H₂S production in murine tissues. *Antioxid Redox Signal*, 15(2), 363-372. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3781>
- Kanagy, N. L., Szabo, C., & Papapetropoulos, A. (2017). Vascular biology of hydrogen sulfide. *Am J Physiol Cell Physiol*, 312(5), C537-C549. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00329.2016>
- Kanbay, M., Jensen, T., Solak, Y., Le, M., Roncal-Jimenez, C., Rivard, C., Johnson, R. J. (2016). Uric acid in metabolic syndrome: From an innocent bystander to a central player. *Eur J Intern Med*, 29, 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2015.11.026>
- Kaneko, Y., Kimura, T., Taniguchi, S., Souma, M., Kojima, Y., Kimura, Y., Niki, I. (2009). Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose. *FEBS letters*, 583(2), 377-382.
- Kang, B., Hong, J., Xiao, J., Zhu, X., Ni, X., Zhang, Y., Wang, Z. (2014). Involvement of miR-1 in the protective effect of hydrogen sulfide against cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia/reperfusion. *Molecular biology reports*, 41(10), 6845-6853.
- Katsouda, A., Szabo, C., & Papapetropoulos, A. (2018). Reduced adipose tissue H₂S. *Pharmacol Res*, 128, 190-199. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.09.023>
- Kavanagh, K., Wylie, A. T., Tucker, K. L., Hamp, T. J., Gharaibeh, R. Z., Fodor, A. A., & Cullen, J. M. (2013). Dietary fructose induces endotoxemia and hepatic injury in calorically controlled primates. *Am J Clin Nutr*, 98(2), 349-357. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.057331>
- Kendig, M. D., Ekayanti, W., Stewart, H., Boakes, R. A., & Rooney, K. (2015). Metabolic Effects of Access to Sucrose Drink in Female Rats and Transmission of Some Effects to Their Offspring. *PLoS One*, 10(7), e0131107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131107>
- Kereliuk, S. M., Brawerman, G. M., & Dolinsky, V. W. (2017). Maternal Macronutrient Consumption and the Developmental Origins of Metabolic Disease in the Offspring. *Int J Mol Sci*, 18(7). <https://doi.org/10.3390/ijms18071451>
- Kesh, S. B., Sarkar, D., & Manna, K. (2016). High-fat diet-induced oxidative stress and its impact on metabolic syndrome: a review. *Asian J Pharm Clin Res*, 9(1), 47-52.
- Kharitonov, A., & Shanafelt, A. B. (2008). Fibroblast growth factor-21 as a therapeutic agent for metabolic diseases. *BioDrugs*, 22(1), 37-44. <https://doi.org/10.2165/00063030-200822010-00004>
- Kharitonov, A., & Shanafelt, A. B. (2009). FGF21: a novel prospect for the treatment of metabolic diseases. *Curr Opin Investig Drugs*, 10(4), 359-364.
- Khitan, Z., & Kim, D. H. (2013). Fructose: a key factor in the development of metabolic syndrome and hypertension. *J Nutr Metab*, 2013, 682673. <https://doi.org/10.1155/2013/682673>

Bibliografía

- Kida, M., Sugiyama, T., Yoshimoto, T., & Ogawa, Y. (2013). Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Eur J Pharm Sci*, *48*(1-2), 211-215. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.11.001>
- Kim, J., Lee, I., & Lim, S. (2017). Overweight or obesity in children aged 0 to 6 and the risk of adult metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical nursing*, *26*(23-24), 3869-3880.
- Kim, J. A., Wei, Y., & Sowers, J. R. (2008). Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res*, *102*(4), 401-414. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.165472>
- Kim, K. H., & Lee, M. S. (2014). FGF21 as a Stress Hormone: The Roles of FGF21 in Stress Adaptation and the Treatment of Metabolic Diseases. *Diabetes Metab J*, *38*(4), 245-251. <https://doi.org/10.4093/dmj.2014.38.4.245>
- Kim, M., Astapova, I. I., Flier, S. N., Hannou, S. A., Doridot, L., Sargsyan, A., Herman, M. A. (2017). Intestinal, but not hepatic, ChREBP is required for fructose tolerance. *JCI insight*, *2*(24).
- Kimura, Y., Goto, Y.-I., & Kimura, H. (2010). Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxidants & redox signaling*, *12*(1), 1-13.
- King, A. L., Polhemus, D. J., Bhushan, S., Otsuka, H., Kondo, K., Nicholson, C. K., Lefer, D. J. (2014). Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(8), 3182-3187. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321871111>
- Klein, A. V., & Kiat, H. (2015). The mechanisms underlying fructose-induced hypertension: a review. *J Hypertens*, *33*(5), 912-920. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000551>
- Kolderup, A., & Svihus, B. (2015). Fructose Metabolism and Relation to Atherosclerosis, Type 2 Diabetes, and Obesity. *J Nutr Metab*, *2015*, 823081. <https://doi.org/10.1155/2015/823081>
- Koletzko, B., Broekaert, I., Demmelmair, H., Franke, J., Hannibal, I., Oberle, D., Project, E. C. O. (2005). Protein intake in the first year of life: a risk factor for later obesity? The E.U. childhood obesity project. *Adv Exp Med Biol*, *569*, 69-79. https://doi.org/10.1007/1-4020-3535-7_12
- Komnenov, D., Levanovich, P. E., & Rossi, N. F. (2019). Hypertension Associated with Fructose and High Salt: Renal and Sympathetic Mechanisms. *Nutrients*, *11*(3). <https://doi.org/10.3390/nu11030569>
- Kondo, K., Bhushan, S., King, A. L., Prabhu, S. D., Hamid, T., Koenig, S., Lefer, D. J. (2013). H₂S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, *127*(10), 1116-1127. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000855>
- Kopp, W. (2019). How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases. *Diabetes Metab Syndr Obes*, *12*, 2221-2236. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S216791>
- Kovačević, S., Nestorov, J., Matić, G., & Elaković, I. (2017). Fructose-enriched diet induces inflammation and reduces antioxidative defense in visceral adipose tissue of young female rats. *Eur J Nutr*, *56*(1), 151-160. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1065-0>
- Kruger, C. L., Whittaker, M. H., Frankos, V. H., & Trimmer, G. W. (1999). 90-Day oral toxicity study of D-tagatose in rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, *29*(2 Pt 2), S1-10. <https://doi.org/10.1006/rtph.1998.1262>
- Kwon, E. J., & Kim, Y. J. (2017). What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. *Obstet Gynecol Sci*, *60*(6), 506-519. <https://doi.org/10.5468/ogs.2017.60.6.506>
- La Frano, M. R., Hernandez-Carretero, A., Weber, N., Borkowski, K., Pedersen, T. L., Osborn, O., & Newman, J. W. (2017). Diet-induced obesity and weight loss alter bile acid concentrations and bile acid-sensitive gene expression in insulin target tissues of C57BL/6J mice. *Nutr Res*, *46*, 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.07.006>
- Laggner, H., Hermann, M., Esterbauer, H., Muellner, M. K., Exner, M., Gmeiner, B. M., & Kapiotis, S. (2007). The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells. *J Hypertens*, *25*(10), 2100-2104. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32829b8fd0>
- Lagoutte, E., Mimoun, S., Andriamihaja, M., Chaumontet, C., Blachier, F., & Bouillaud, F. (2010). Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. *Biochim Biophys Acta*, *1797*(8), 1500-1511. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.04.004>

- Laha, A., Singh, M., George, A. K., Homme, R. P., & Tyagi, S. C. (2019). Dysregulation of 1-carbon metabolism and muscle atrophy: potential roles of forkhead box O proteins and PPAR γ co-activator-1 α . *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 97(11), 1013-1017.
- Lambertz, J., Weiskirchen, S., Landert, S., & Weiskirchen, R. (2017). Fructose: A Dietary Sugar in Crosstalk with Microbiota Contributing to the Development and Progression of Non-Alcoholic Liver Disease. *Front Immunol*, 8, 1159. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01159>
- Lanaspa, M. A., Andres-Hernando, A., Orlicky, D. J., Cicerchi, C., Jang, C., Li, N., Tolan, D. R. (2018). Ketohexokinase C blockade ameliorates fructose-induced metabolic dysfunction in fructose-sensitive mice. *J Clin Invest*, 128(6), 2226-2238. <https://doi.org/10.1172/JCI94427>
- Lanaspa, M. A., Sanchez-Lozada, L. G., Choi, Y. J., Cicerchi, C., Kanbay, M., Roncal-Jimenez, C. A., Johnson, R. J. (2012). Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress: potential role in fructose-dependent and -independent fatty liver. *J Biol Chem*, 287(48), 40732-40744. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.399899>
- Lanaspa, M. A., Sanchez-Lozada, L. G., Cicerchi, C., Li, N., Roncal-Jimenez, C. A., Ishimoto, T., Johnson, R. J. (2012). Uric acid stimulates fructokinase and accelerates fructose metabolism in the development of fatty liver. *PLoS One*, 7(10), e47948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047948>
- Lanaspa, M. A., Tapia, E., Soto, V., Sautin, Y., & Sánchez-Lozada, L. G. (2011). Uric acid and fructose: potential biological mechanisms. *Semin Nephrol*, 31(5), 426-432. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2011.08.006>
- Lee, H. J., & Cha, J. Y. (2018). Recent insights into the role of ChREBP in intestinal fructose absorption and metabolism. *BMB Rep*, 51(9), 429-436.
- Lee, Y. T., Lin, H. Y., Chan, Y. W., Li, K. H., To, O. T., Yan, B. P., Tse, G. (2017). Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. *Lipids Health Dis*, 16(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0402-5>
- Lembede, B. W., Erlwanger, K. H., Nkomozepi, P., & Chivandi, E. (2018). Effect of neonatal orally administered S-allyl cysteine in high-fructose diet fed Wistar rats. *J Dev Orig Health Dis*, 9(2), 160-171. <https://doi.org/10.1017/S2040174417000940>
- Levi, B., & Werman, M. J. (1998). Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats. *J Nutr*, 128(9), 1442-1449. <https://doi.org/10.1093/jn/128.9.1442>
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., Stadtman, E. R. (1990). [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 464-478). Elsevier.
- Levy, J. R., Lesko, J., Krieg, R. J., Adler, R. A., & Stevens, W. (2000). Leptin responses to glucose infusions in obesity-prone rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279(5), E1088-1096. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.5.E1088>
- Li, H., Fang, Q., Gao, F., Fan, J., Zhou, J., Wang, X., Jia, W. (2010). Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride. *J Hepatol*, 53(5), 934-940. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.05.018>
- Li, H., Liu, S., Wang, Z., Zhang, Y., & Wang, K. (2020). Hydrogen sulfide attenuates diabetic neuropathic pain through NO/cGMP/PKG pathway and μ -opioid receptor. *Experimental Biology and Medicine*, 1535370220918193.
- Li, L. C., & Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 18(11), 1427-1431. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.11.1427>
- Li, M., Reynolds, C. M., Sloboda, D. M., Gray, C., & Vickers, M. H. (2015). Maternal taurine supplementation attenuates maternal fructose-induced metabolic and inflammatory dysregulation and partially reverses adverse metabolic programming in offspring. *J Nutr Biochem*, 26(3), 267-276. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.10.015>
- Li, W., Ma, F., Zhang, L., Huang, Y., Li, X., Zhang, A., Zhu, Y. (2016). S-Propargyl-cysteine Exerts a Novel Protective Effect on Methionine and Choline Deficient Diet-Induced Fatty Liver via Akt/Nrf2/HO-1 Pathway. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 4690857. <https://doi.org/10.1155/2016/4690857>

Bibliografía

- Lillicrop, K. A., Phillips, E. S., Torrens, C., Hanson, M. A., Jackson, A. A., & Burdge, G. C. (2008). Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR α promoter of the offspring. *British journal of nutrition*, *100*(2), 278-282.
- Lillicrop, K. A., Slater-Jefferies, J. L., Hanson, M. A., Godfrey, K. M., Jackson, A. A., & Burdge, G. C. (2007). Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *British journal of nutrition*, *97*(6), 1064-1073.
- Lim, D. H., & Maher, E. R. (2010). DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. *The Obstetrician & Gynaecologist*, *12*(1), 37-42.
- Lim, J. S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J. M., & Lustig, R. H. (2010). The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *7*(5), 251-264. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.41>
- Ling, C., & Rönn, T. (2019). Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metab*, *29*(5), 1028-1044. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.009>
- Ling, H. Y., Wang, G., Zhang, W., Li, X., Zhou, S. H., & Hu, B. (2012). Arecoline improves vascular endothelial function in high fructose-fed rats via increasing cystathionine- γ -lyase expression and activating K(ATP) channels. *Acta Pharmacol Sin*, *33*(8), 1023-1029. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.63>
- Lino, M., Farr, S., Baker, C., Fuller, M., Trigatti, B., & Adeli, K. (2015). Intestinal scavenger receptor class B type I as a novel regulator of chylomicron production in healthy and diet-induced obese states. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*.
- Liu, A. J., Li, B., Yang, M., Liu, Y., Liu, Y. L., & Su, J. W. (2017). Sirtuin 1 Mediates Hydrogen Sulfide-induced Cytoprotection Effects in Neonatal Mouse Cardiomyocytes. *Chin Med J (Engl)*, *130*(19), 2346-2353. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.215328>
- Liu, F., Chen, D. D., Sun, X., Xie, H. H., Yuan, H., Jia, W., Chen, A. F. (2014). Hydrogen sulfide improves wound healing via restoration of endothelial progenitor cell functions and activation of angiopoietin-1 in type 2 diabetes. *Diabetes*, *63*(5), 1763-1778. <https://doi.org/10.2337/db13-0483>
- Liu, J., Yang, K., Yang, J., Xiao, W., Le, Y., Yu, F., Hong, T. (2019). Liver-derived fibroblast growth factor 21 mediates effects of glucagon-like peptide-1 in attenuating hepatic glucose output. *EBioMedicine*, *41*, 73-84. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.037>
- Liu, M., Li, Y., Liang, B., Li, Z., Jiang, Z., Chu, C., & Yang, J. (2018). Hydrogen sulfide attenuates myocardial fibrosis in diabetic rats through the JAK/STAT signaling pathway. *Int J Mol Med*, *41*(4), 1867-1876. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3419>
- Liu, Q., Ayoub-Charette, S., Khan, T. A., Au-Yeung, F., Blanco Mejia, S., de Souza, R. J., Sievenpiper, J. L. (2019). Important Food Sources of Fructose-Containing Sugars and Incident Hypertension: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *J Am Heart Assoc*, *8*(24), e010977. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010977>
- Liu, X., Luo, D., Zheng, M., Hao, Y., Hou, L., & Zhang, S. (2010). Effect of pioglitazone on insulin resistance in fructose-drinking rats correlates with AGEs/RAGE inhibition and block of NADPH oxidase and NF kappa B activation. *Eur J Pharmacol*, *629*(1-3), 153-158. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.11.059>
- Liu, X., Zhang, H., & Liang, J. (2013). Blood urea nitrogen is elevated in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatogastroenterology*, *60*(122), 343-345.
- Lo Faro, M. L., Fox, B., Whatmore, J. L., Winyard, P. G., & Whiteman, M. (2014). Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide*, *41*, 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.05.014>
- Longchamp, A., Mirabella, T., Arduini, A., MacArthur, M. R., Das, A., Treviño-Villarreal, J. H., . . . Mitchell, J. R. (2018). Amino Acid Restriction Triggers Angiogenesis via GCN2/ATF4 Regulation of VEGF and H. *Cell*, *173*(1), 117-129.e114. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.001>

- Lotfy, M., Adeghate, J., Kalasz, H., Singh, J., & Adeghate, E. (2017). Chronic complications of diabetes mellitus: a mini review. *Current diabetes reviews*, 13(1), 3-10.
- Low, W. S., Cornfield, T., Charlton, C. A., Tomlinson, J. W., & Hodson, L. (2018). Sex Differences in Hepatic. *Nutrients*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/nu10091263>
- Loza-Medrano, S. S., Baiza-Gutman, L. A., Manuel-Apolinar, L., García-Macedo, R., Damasio-Santana, L., Martínez-Mar, O. A., Díaz-Flores, M. (2020). High fructose-containing drinking water-induced steatohepatitis in rats is prevented by the nicotinamide-mediated modulation of redox homeostasis and NADPH-producing enzymes. *Mol Biol Rep*, 47(1), 337-351. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05136-4>
- Lozano, I., Van der Werf, R., Bietiger, W., Seyfritz, E., Peronet, C., Pinget, M., Dal, S. (2016). High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutr Metab (Lond)*, 13, 15. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0074-1>
- Luo, Y., & McKeehan, W. L. (2013). Stressed Liver and Muscle Call on Adipocytes with FGF21. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 194. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00194>
- Luo, Z. L., Tang, L. J., Wang, T., Dai, R. W., Ren, J. D., Cheng, L., Tian, F. Z. (2014). Effects of treatment with hydrogen sulfide on methionine-choline deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 29(1), 215-222. <https://doi.org/10.1111/jgh.12389>
- Lustig, R. H. (2010). Fructose: metabolic, hedonic, and societal parallels with ethanol. *J Am Diet Assoc*, 110(9), 1307-1321. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.06.008>
- Ma, X., Jiang, Z., Wang, Z., & Zhang, Z. (2020). Administration of metformin alleviates atherosclerosis by promoting H2S production via regulating CSE expression. *J Cell Physiol*, 235(3), 2102-2112. <https://doi.org/10.1002/jcp.29112>
- Maeso, N., García-Martínez, D., Rupérez, F. J., Cifuentes, A., & Barbas, C. (2005). Capillary electrophoresis of glutathione to monitor oxidative stress and response to antioxidant treatments in an animal model. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 822(1-2), 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.05.015>
- Mai, B. H., & Yan, L. J. (2019). The negative and detrimental effects of high fructose on the liver, with special reference to metabolic disorders. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 12, 821-826. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S198968>
- Maia-Ceciliano, T. C., Dutra, R. R., Aguila, M. B., & Mandarim-De-Lacerda, C. A. (2019). The deficiency and the supplementation of vitamin D and liver: Lessons of chronic fructose-rich diet in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 192, 105399. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105399>
- Maithilikarpagaselvi, N., Sridhar, M. G., Swaminathan, R. P., Sripradha, R., & Badhe, B. (2016). Curcumin inhibits hyperlipidemia and hepatic fat accumulation in high-fructose-fed male Wistar rats. *Pharm Biol*, 54(12), 2857-2863. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1187179>
- Maloyan, A., Muralimanoharan, S., Huffman, S., Cox, L. A., Nathanielsz, P. W., Myatt, L., & Nijland, M. J. (2013). Identification and comparative analyses of myocardial miRNAs involved in the fetal response to maternal obesity. *Physiol Genomics*, 45(19), 889-900. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00050.2013>
- Mani, S., Cao, W., Wu, L., & Wang, R. (2014). Hydrogen sulfide and the liver. *Nitric Oxide*, 41, 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.02.006>
- Mani, S., Li, H., Untereiner, A., Wu, L., Yang, G., Austin, R. C., Wang, R. (2013). Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. *Circulation*, 127(25), 2523-2534. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002208>
- Manna, P., Gungor, N., McVie, R., & Jain, S. K. (2014). Decreased cystathionine-γ-lyase (CSE) activity in livers of type 1 diabetic rats and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of type 1 diabetic patients. *Journal of Biological Chemistry*, 289(17), 11767-11778.
- Manna, P., & Jain, S. K. (2011). Hydrogen sulfide and L-cysteine increase phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate (PIP3) and glucose utilization by inhibiting phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein and activating

Bibliografía

- phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/serine/threonine protein kinase (AKT)/protein kinase C ζ / λ (PKC ζ / λ) in 3T3L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 286(46), 39848-39859.
- Mardones, P., Quiñones, V., Amigo, L., Moreno, M., Miquel, J. F., Schwarz, M., VanPatten, S. (2001). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *Journal of lipid research*, 42(2), 170-180.
- Martin, D., Li, Y., Yang, J., Wang, G., Margariti, A., Jiang, Z., Zeng, L. (2014). Unspliced X-box-binding protein 1 (XBP1) protects endothelial cells from oxidative stress through interaction with histone deacetylase 3. *J Biol Chem*, 289(44), 30625-30634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.571984>
- Martin, G. R., McKnight, G. W., Dickey, M. S., Coffin, C. S., Ferraz, J. G., & Wallace, J. L. (2010). Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract. *Dig Liver Dis*, 42(2), 103-109. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2009.05.016>
- Martínez-González, M. A., Salas-Salvadó, J., Estruch, R., Corella, D., Fitó, M., Ros, E., & INVESTIGATORS, P. (2015). Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis*, 58(1), 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2015.04.003>
- Marutani, E., & Ichinose, F. (2020). Emerging pharmacological tools to control hydrogen sulfide signaling in critical illness. *Intensive Care Med Exp*, 8(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40635-020-0296-4>
- Mastrocola, R., Ferrocino, I., Liberto, E., Chiazza, F., Cento, A. S., Collotta, D., Collino, M. (2018). Fructose liquid and solid formulations differently affect gut integrity, microbiota composition and related liver toxicity: a comparative in vivo study. *J Nutr Biochem*, 55, 185-199. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.003>
- Matei, I. V., Li, H., & Yaegaki, K. (2017). Hydrogen sulfide enhances pancreatic β -cell differentiation from human tooth under normal and glucotoxic conditions. *Regen Med*, 12(2), 125-141. <https://doi.org/10.2217/rme-2016-0142>
- Mathieu, P., Lemieux, I., & Després, J. P. (2010). Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Clin Pharmacol Ther*, 87(4), 407-416. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.311>
- Mayer, E. L., Jacobsen, D. W., & Robinson, K. (1996). Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 27(3), 517-527. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(95\)00508-0](https://doi.org/10.1016/0735-1097(95)00508-0)
- McCurdy, C. E., Bishop, J. M., Williams, S. M., Grayson, B. E., Smith, M. S., Friedman, J. E., & Grove, K. L. (2009). Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J Clin Invest*, 119(2), 323-335. <https://doi.org/10.1172/JCI32661>
- McGill, H. C. (1979). The relationship of dietary cholesterol to serum cholesterol concentration and to atherosclerosis in man. *Am J Clin Nutr*, 32(12 Suppl), 2664-2702. <https://doi.org/10.1093/ajcn/32.12.2664>
- Mechanick, J. I., Zhao, S., & Garvey, W. T. (2018). Leptin, An Adipokine With Central Importance in the Global Obesity Problem. *Glob Heart*, 13(2), 113-127. <https://doi.org/10.1016/j.gheart.2017.10.003>
- Medvedeva, Y. A., Khamis, A. M., Kulakovskiy, I. V., Ba-Alawi, W., Bhuyan, M. S., Kawaji, H., Consortium, F. (2014). Effects of cytosine methylation on transcription factor binding sites. *BMC Genomics*, 15, 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-119>
- Mehta, R., Otgonsuren, M., Younoszai, Z., Allawi, H., Raybuck, B., & Younossi, Z. (2016). Circulating miRNA in patients with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease. *BMJ Open Gastroenterol*, 3(1), e000096. <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2016-000096>
- Meng, G., Ma, Y., Xie, L., Ferro, A., & Ji, Y. (2015). Emerging role of hydrogen sulfide in hypertension and related cardiovascular diseases. *Br J Pharmacol*, 172(23), 5501-5511. <https://doi.org/10.1111/bph.12900>
- Meng, X., Li, S., Li, Y., Gan, R. Y., & Li, H. B. (2018). Gut Microbiota's Relationship with Liver Disease and Role in Hepatoprotection by Dietary Natural Products and Probiotics. *Nutrients*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/nu10101457>
- Merino, B., Fernández-Díaz, C. M., Cózar-Castellano, I., & Perdomo, G. (2019). Intestinal Fructose and Glucose Metabolism in Health and Disease. *Nutrients*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/nu12010094>

- Migdal, A., Comte, S., Rodgers, M., Heineman, B., Maratos-Flier, E., Herman, M., & Dushay, J. (2018). Fibroblast growth factor 21 and fructose dynamics in humans. *Obes Sci Pract*, 4(5), 483-489. <https://doi.org/10.1002/osp4.295>
- Mikami, Y., Shibuya, N., Ogasawara, Y., & Kimura, H. (2013). Hydrogen sulfide is produced by cystathionine γ -lyase at the steady-state low intracellular Ca²⁺ concentrations. *Biochemical and biophysical research communications*, 431(2), 131-135.
- Milagro, F., Mansego, M., De Miguel, C., & Martinez, J. (2013). Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progresses and perspectives. *Molecular aspects of medicine*, 34(4), 782-812.
- Minard, A. Y., Tan, S. X., Yang, P., Fazakerley, D. J., Domanova, W., Parker, B. L., James, D. E. (2016). mTORC1 Is a Major Regulatory Node in the FGF21 Signaling Network in Adipocytes. *Cell Rep*, 17(1), 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.086>
- Miranda, C. A., Schönholzer, T. E., Klöppel, E., Sinzato, Y. K., Volpato, G. T., Damasceno, D. C., & Campos, K. E. (2019). Repercussions of low fructose-drinking water in male rats. *An Acad Bras Cienc*, 91(1), e20170705. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920170705>
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Man, W. C., Chu, K., Sampath, H., Kim, H. J., & Ntambi, J. M. (2004). Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 279(24), 25164-25171. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402781200>
- Moccia, F., Bertoni, G., Pla, A. F., Dragoni, S., Pupo, E., Merlino, A., Tanzi, F. (2011). Hydrogen sulfide regulates intracellular Ca²⁺ concentration in endothelial cells from excised rat aorta. *Curr Pharm Biotechnol*, 12(9), 1416-1426. <https://doi.org/10.2174/138920111798281117>
- Mooradian, A. D., Smith, M., & Tokuda, M. (2017). The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. *Clin Nutr ESPEN*, 18, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.01.004>
- Moran, T. H. (2009). Fructose and satiety. *J Nutr*, 139(6), 1253S-1256S. <https://doi.org/10.3945/jn.108.097956>
- Morino, K., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes*, 55 Suppl 2, S9-S15. <https://doi.org/10.2337/db06-S002>
- Mortera, R. R., Bains, Y., & Gugliucci, A. (2019). Fructose at the crossroads of the metabolic syndrome and obesity epidemics. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 24, 186-211. <https://doi.org/10.2741/4713>
- Mukerjee, S., Zhu, Y., Zombok, A., Mauvais-Jarvis, F., Zhao, J., & Lazartigues, E. (2018). Perinatal Exposure to Western Diet Programs Autonomic Dysfunction in the Male Offspring. *Cell Mol Neurobiol*, 38(1), 233-242. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0502-4>
- Muli, S., Goerdten, J., Oluwagbemigun, K., Floegel, A., Schmid, M., & Nöthlings, U. (2021). A Systematic Review of Metabolomic Biomarkers for the Intake of Sugar-Sweetened and Low-Calorie Sweetened Beverages. *Metabolites*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/metabo11080546>
- Munaron, L., Avanzato, D., Moccia, F., & Mancardi, D. (2013). Hydrogen sulfide as a regulator of calcium channels. *Cell Calcium*, 53(2), 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.07.001>
- Murakami, Y., Tanabe, S., & Suzuki, T. (2016). High-fat Diet-induced Intestinal Hyperpermeability is Associated with Increased Bile Acids in the Large Intestine of Mice. *J Food Sci*, 81(1), H216-222. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13166>
- Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S. K., Snyder, S. H. (2009). H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal*, 2(96), ra72. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000464>
- Mustafa, A. K., Sikka, G., Gazi, S. K., Steppan, J., Jung, S. M., Bhunia, A. K., Snyder, S. H. (2011). Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res*, 109(11), 1259-1268. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240242>
- Myles, I. A. (2014). Fast food fever: reviewing the impacts of the Western diet on immunity. *Nutr J*, 13, 61. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-61>

Bibliografía

- Módis, K., Coletta, C., Erdélyi, K., Papapetropoulos, A., & Szabo, C. (2013). Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics. *FASEB J*, 27(2), 601-611. <https://doi.org/10.1096/fj.12-216507>
- Müller, M., & Kersten, S. (2003). Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat Rev Genet*, 4(4), 315-322. <https://doi.org/10.1038/nrg1047>
- Nagata, Y., Mizuta, N., Kanasaki, A., & Tanaka, K. (2018). Rare sugars, d-allulose, d-tagatose and d-sorbose, differently modulate lipid metabolism in rats. *J Sci Food Agric*, 98(5), 2020-2026. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8687>
- Nagpure, B. V., & Bian, J. S. (2016). Interaction of Hydrogen Sulfide with Nitric Oxide in the Cardiovascular System. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 6904327. <https://doi.org/10.1155/2016/6904327>
- Nakagawa, T., Hu, H., Zharikov, S., Tuttle, K. R., Short, R. A., Glushakova, O., Johnson, R. J. (2006). A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290(3), F625-631. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00140.2005>
- Nakamura, M., Fujino, T., Yada, R., Yada, M., Yasutake, K., Yoshimoto, T., Enjoji, M. (2009). Impact of cholesterol metabolism and the LXRA/SREBP-1c pathway on nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*, 23(5), 603-608. <https://doi.org/10.3892/ijmm.00000170>
- Nakao, M. (2001). Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*, 278(1-2), 25-31. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00721-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00721-1)
- NEEL, J. V. (1962). Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet*, 14, 353-362.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Neri, C., & Edlow, A. G. (2015). Effects of Maternal Obesity on Fetal Programming: Molecular Approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(2), a026591. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026591>
- Nestorov, J., Glban, A. M., Mijušković, A., Nikolić-Kokić, A., Elaković, I., Veličković, N., & Matić, G. (2014). Long-term fructose-enriched diet introduced immediately after weaning does not induce oxidative stress in the rat liver. *Nutr Res*, 34(7), 646-652. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.06.006>
- Newsholme, P., Cruzat, V. F., Keane, K. N., Carlessi, R., & de Bittencourt, P. I. (2016). Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J*, 473(24), 4527-4550. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C>
- Ng, M. K., & Cheung, P. (2016). A brief histone in time: understanding the combinatorial functions of histone PTMs in the nucleosome context. *Biochem Cell Biol*, 94(1), 33-42. <https://doi.org/10.1139/bcb-2015-0031>
- Nichols, M., Townsend, N., Scarborough, P., & Rayner, M. (2014). Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J*, 35(42), 2929. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu378>
- Niculescu, M. D., & Zeisel, S. H. (2002). Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr*, 132(8 Suppl), 2333S-2335S. <https://doi.org/10.1093/jn/132.8.2333S>
- Nilsson, E., Matte, A., Perfilyev, A., de Mello, V. D., Käkelä, P., Pihlajamäki, J., & Ling, C. (2015). Epigenetic Alterations in Human Liver From Subjects With Type 2 Diabetes in Parallel With Reduced Folate Levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 100(11), E1491-1501. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3204>
- Norata, G. D., Raselli, S., Grigore, L., Garlaschelli, K., Dozio, E., Magni, P., & Catapano, A. L. (2007). Leptin:adiponectin ratio is an independent predictor of intima media thickness of the common carotid artery. *Stroke*, 38(10), 2844-2846. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.485540>
- Norris, E. J., Culbertson, C. R., Narasimhan, S., & Clemens, M. G. (2011). The liver as a central regulator of hydrogen sulfide. *Shock*, 36(3), 242-250. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3182252ee7>
- Oakes, C. C., La Salle, S., Robaire, B., & Trasler, J. M. (2006). Evaluation of a quantitative DNA methylation analysis technique using methylation-sensitive/dependent restriction enzymes and real-time PCR. *Epigenetics*, 1(3), 146-152. <https://doi.org/10.4161/epi.1.3.3392>

- Ohashi, K., Munetsuna, E., Yamada, H., Ando, Y., Yamazaki, M., Taromaru, N., . . . Teradaira, R. (2015). High fructose consumption induces DNA methylation at PPAR α and CPT1A promoter regions in the rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*, *468*(1-2), 185-189.
- Okamoto, M., Ishizaki, T., & Kimura, T. (2015). Protective effect of hydrogen sulfide on pancreatic beta-cells. *Nitric Oxide*, *46*, 32-36. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.11.007>
- Okamoto, M., Yamaoka, M., Takei, M., Ando, T., Taniguchi, S., Ishii, I., Kimura, T. (2013). Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, *442*(3-4), 227-233. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.023>
- Okushin, K., Tsutsumi, T., Ikeuchi, K., Kado, A., Enooku, K., Fujinaga, H., Koike, K. (2020). Heterozygous knockout of Bile salt export pump ameliorates liver steatosis in mice fed a high-fat diet. *PLoS One*, *15*(8), e0234750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234750>
- Olaniji, K. S., Sabinari, I. W., & Olatunji, L. A. (2020). Oral L-glutamine rescues fructose-induced poor fetal outcome by preventing placental triglyceride and uric acid accumulation in Wistar rats. *Heliyon*, *6*(12), e05863. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05863>
- Ordovas, J. M., & Mooser, V. (2004). Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr Opin Lipidol*, *15*(2), 101-108. <https://doi.org/10.1097/00041433-200404000-00002>
- Otero, P., Herrera, E., & Bonet, B. (2002). Dual effect of glucose on LDL oxidation: dependence on vitamin E. *Free Radic Biol Med*, *33*(8), 1133-1140. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01002-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01002-x)
- Owen, B. M., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2015). Tissue-specific actions of the metabolic hormones FGF15/19 and FGF21. *Trends Endocrinol Metab*, *26*(1), 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.10.002>
- Padiya, R., Chowdhury, D., Borkar, R., Srinivas, R., Pal Bhadra, M., & Banerjee, S. K. (2014). Garlic attenuates cardiac oxidative stress via activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 pathway in fructose-fed diabetic rat. *PLoS One*, *9*(5), e94228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094228>
- Padiya, R., Khatua, T. N., Bagul, P. K., Kuncha, M., & Banerjee, S. K. (2011). Garlic improves insulin sensitivity and associated metabolic syndromes in fructose fed rats. *Nutr Metab (Lond)*, *8*, 53. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-53>
- Palomer, X., Pérez, A., & Blanco-Vaca, F. (2005). Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Medicina Clínica*, *124*(10), 388-395.
- Pang, J., Xu, H., Wang, X., Chen, X., Li, Q., Liu, Q., Ling, W. (2021). Resveratrol enhances trans-intestinal cholesterol excretion through selective activation of intestinal liver X receptor alpha. *Biochem Pharmacol*, *186*, 114481. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114481>
- Papapetropoulos, A., Pyriochou, A., Altaany, Z., Yang, G., Marazioti, A., Zhou, Z., Szabó, C. (2009). Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(51), 21972-21977. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908047106>
- Parada, A., & Pettinelli, P. (2014). Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud: malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico. *Nutrición hospitalaria: Organó oficial de la Sociedad española de nutrición parenteral y enteral*, *29*(3), 491-499.
- Partearroyo, T., Pérez-Miguelsanz, J., Peña-Melián, Á., Maestro-de-Las-Casas, C., Úbeda, N., & Varela-Moreiras, G. (2016). Low and high dietary folic acid levels perturb postnatal cerebellar morphology in growing rats. *Br J Nutr*, *115*(11), 1967-1977. <https://doi.org/10.1017/S0007114516001008>
- Partearroyo, T., Pérez-Miguelsanz, J., Úbeda, N., Valencia-Benítez, M., Alonso-Ápente, E., & Varela-Moreiras, G. (2013). Dietary folic acid intake differentially affects methionine metabolism markers and hippocampus morphology in aged rats. *European journal of nutrition*, *52*(3), 1157-1167.
- Partearroyo, T., Úbeda, N., Alonso-Ápente, E., & Varela-Moreiras, G. (2010). Moderate or supranormal folic acid supplementation does not exert a protective effect for homocysteinemia and methylation markers in growing rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *56*(2), 143-151.

Bibliografía

- Patel, C., Douard, V., Yu, S., Tharabenjasin, P., Gao, N., & Ferraris, R. P. (2015). Fructose-induced increases in expression of intestinal fructolytic and gluconeogenic genes are regulated by GLUT5 and KHK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 309(5), R499-509. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00128.2015>
- Paul, C., Laganà, A. S., Maniglio, P., Triolo, O., & Brady, D. M. (2016). Inositol's and other nutraceuticals' synergistic actions counteract insulin resistance in polycystic ovarian syndrome and metabolic syndrome: state-of-the-art and future perspectives. *Gynecol Endocrinol*, 32(6), 431-438. <https://doi.org/10.3109/09513590.2016.1144741>
- Peh, M. T., Anwar, A. B., Ng, D. S., Atan, M. S., Kumar, S. D., & Moore, P. K. (2014). Effect of feeding a high fat diet on hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in the mouse. *Nitric Oxide*, 41, 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.03.002>
- Perez-Pozo, S. E., Schold, J., Nakagawa, T., Sánchez-Lozada, L. G., Johnson, R. J., & Lillo, J. L. (2010). Excessive fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response. *Int J Obes (Lond)*, 34(3), 454-461. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.259>
- Perna, A. F., Sepe, I., Lanza, D., Capasso, R., Zappavigna, S., Capasso, G., Ingrosso, D. (2013). Hydrogen sulfide reduces cell adhesion and relevant inflammatory triggering by preventing ADAM17-dependent TNF- α activation. *Journal of cellular biochemistry*, 114(7), 1536-1548.
- Perrone, S., Santacroce, A., Picardi, A., & Buonocore, G. (2016). Fetal programming and early identification of newborns at high risk of free radical-mediated diseases. *World J Clin Pediatr*, 5(2), 172-181. <https://doi.org/10.5409/wjcp.v5.i2.172>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Phang, M., Ross, J., Raythatha, J. H., Dissanayake, H. U., McMullan, R. L., Kong, Y., Skilton, M. R. (2020). Epigenetic aging in newborns: role of maternal diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*.
- Pierre, J. F., Martinez, K. B., Ye, H., Nadimpalli, A., Morton, T. C., Yang, J., Yin, D. P. (2016). Activation of bile acid signaling improves metabolic phenotypes in high-fat diet-induced obese mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 311(2), G286-304. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00202.2016>
- Planavila, A., Redondo-Angulo, I., Ribas, F., Garrabou, G., Casademont, J., Giral, M., & Villarroya, F. (2015). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovasc Res*, 106(1), 19-31. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu263>
- Pogribny, I. P., Ross, S. A., Wise, C., Pogribna, M., Jones, E. A., Tryndyak, V. P., Poirier, L. A. (2006). Irreversible global DNA hypomethylation as a key step in hepatocarcinogenesis induced by dietary methyl deficiency. *Mutat Res*, 593(1-2), 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.06.028>
- Polhemus, D., Kondo, K., Bhushan, S., Bir, S. C., Kevil, C. G., Murohara, T., Calvert, J. W. (2013). Hydrogen sulfide attenuates cardiac dysfunction after heart failure via induction of angiogenesis. *Circ Heart Fail*, 6(5), 1077-1086. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000299>
- Polhemus, D. J., Calvert, J. W., Butler, J., & Lefer, D. J. (2014). The cardioprotective actions of hydrogen sulfide in acute myocardial infarction and heart failure. *Scientifica (Cairo)*, 2014, 768607. <https://doi.org/10.1155/2014/768607>
- Police, S. B., Harris, J. C., Lodder, R. A., & Cassis, L. A. (2009). Effect of diets containing sucrose vs. D-tagatose in hypercholesterolemic mice. *Obesity (Silver Spring)*, 17(2), 269-275. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.508>
- Portha, B., Grandjean, V., & Movassat, J. (2019). Mother or Father: Who Is in the Front Line? Mechanisms Underlying the Non-Genomic Transmission of Obesity/Diabetes via the Maternal or the Paternal Line. *Nutrients*, 11(2), 233.
- Potthoff, M. J. (2017). FGF21 and metabolic disease in 2016: A new frontier in FGF21 biology. *Nat Rev Endocrinol*, 13(2), 74-76. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.206>
- Prasad, K., & Dhar, I. (2014). Oxidative stress as a mechanism of added sugar-induced cardiovascular disease. *Int J Angiol*, 23(4), 217-226. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1387169>

- Predmore, B. L., Julian, D., & Cardounel, A. J. (2011). Hydrogen sulfide increases nitric oxide production from endothelial cells by an akt-dependent mechanism. *Front Physiol*, 2, 104. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00104>
- Predmore, B. L., Lefer, D. J., & Gojon, G. (2012). Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxid Redox Signal*, 17(1), 119-140. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4612>
- Price, N. L., Ramírez, C. M., & Fernández-Hernando, C. (2014). Relevance of microRNA in metabolic diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 51(6), 305-320. <https://doi.org/10.3109/10408363.2014.937522>
- Qipshidze, N., Metreveli, N., Mishra, P. K., Lominadze, D., & Tyagi, S. C. (2012). Hydrogen sulfide mitigates cardiac remodeling during myocardial infarction via improvement of angiogenesis. *International journal of biological sciences*, 8(4), 430.
- Ramos Ibarra, M. L., González, C. M. B., Gómez Meda, B. C., & Zamora Pérez, A. L. (2006). Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigación en salud*, 8(1), 7-15.
- Ranasinghe, P., Mathangasinghe, Y., Jayawardena, R., Hills, A. P., & Misra, A. (2017). Prevalence and trends of metabolic syndrome among adults in the asia-pacific region: a systematic review. *BMC Public Health*, 17(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s12889-017-4041-1>
- Rebolledo, O. R., Marra, C. A., Raschia, A., Rodriguez, S., & Gagliardino, J. J. (2008). Abdominal adipose tissue: early metabolic dysfunction associated to insulin resistance and oxidative stress induced by an unbalanced diet. *Horm Metab Res*, 40(11), 794-800. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1081502>
- Rebollo, A., Roglans, N., Baena, M., Sánchez, R. M., Merlos, M., Alegret, M., & Laguna, J. C. (2014). Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells. *Biochim Biophys Acta*, 1841(4), 514-524. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.01.002>
- Rees, W. D., Hay, S. M., Brown, D. S., Antipatis, C., & Palmer, R. M. (2000). Maternal protein deficiency causes hypermethylation of DNA in the livers of rat fetuses. *J Nutr*, 130(7), 1821-1826. <https://doi.org/10.1093/jn/130.7.1821>
- Refsum, H., Ueland, P., Nygård, O., & Vollset, S. (1998). Homocysteine and cardiovascular disease. *Annual review of medicine*, 49(1), 31-62.
- Regnault, T. R., Gentili, S., Sarr, O., Toop, C. R., & Sloboda, D. M. (2013). Fructose, pregnancy and later life impacts. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 40(11), 824-837. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12162>
- Renga, B., Bucci, M., Cipriani, S., Carino, A., Monti, M. C., Zampella, A., Fiorucci, S. (2015). Cystathionine γ -lyase, a H₂S-generating enzyme, is a GPBAR1-regulated gene and contributes to vasodilation caused by secondary bile acids. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 309(1), H114-126. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00087.2015>
- Renga, B., Mencarelli, A., Migliorati, M., Distrutti, E., & Fiorucci, S. (2009). Bile-acid-activated farnesoid X receptor regulates hydrogen sulfide production and hepatic microcirculation. *World J Gastroenterol*, 15(17), 2097-2108. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.2097>
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49(11), 1603-1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Revenko, O., Zaichko, N., Wallace, J., & Zayachkivska, O. (2020). Exogenous hydrogen sulfide for the treatment of mesenteric damage associated with fructose-induced malfunctions via inhibition of oxidative stress. *Ukr.Biochem.J*, 92(2), 86-97. <https://doi.org/https://doi.org/10.15407/ubj92.02.086>
- Rizzello, F., Spisni, E., Giovanardi, E., Imbesi, V., Salice, M., Alvisi, P., Gionchetti, P. (2019). Implications of the Westernized Diet in the Onset and Progression of IBD. *Nutrients*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/nu11051033>
- Rizzo, G., Laganà, A. S., Rapisarda, A. M., La Ferrera, G. M., Buscema, M., Rossetti, P., Vitale, S. G. (2016). Vitamin B12 among Vegetarians: Status, Assessment and Supplementation. *Nutrients*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/nu8120767>

Bibliografía

- Roberts, C. K., Barnard, R. J., Sindhu, R. K., Jurczak, M., Ehdaie, A., & Vaziri, N. D. (2006). Oxidative stress and dysregulation of NAD (P) H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism*, *55*(7), 928-934.
- Robles, R. G., Ramírez, P. A. A., & Velásquez, S. P. P. (2012). Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Revista Ciencias de la Salud*, *10*(1), 59-71.
- Rodrigo, S., Fauste, E., de la Cuesta, M., Rodríguez, L., Álvarez-Millán, J. J., Panadero, M. I., Bocos, C. (2018). Maternal fructose induces gender-dependent changes in both LXR α promoter methylation and cholesterol metabolism in progeny. *J Nutr Biochem*, *61*, 163-172. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.08.011>
- Rodrigo, S., Rodríguez, L., Otero, P., Panadero, M. I., García, A., Barbas, C., Bocos, C. (2016). Fructose during pregnancy provokes fetal oxidative stress: The key role of the placental heme oxygenase-1. *Mol Nutr Food Res*, *60*(12), 2700-2711. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600193>
- Rodrigues, P. M., Afonso, M. B., Simão, A. L., Carvalho, C. C., Trindade, A., Duarte, A., Castro, R. E. (2017). miR-21 ablation and obeticholic acid ameliorate nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Cell Death Dis*, *8*(5), e2825. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.246>
- Rodríguez, L., Otero, P., Panadero, M. I., Rodrigo, S., Álvarez-Millán, J. J., & Bocos, C. (2015). Maternal fructose intake induces insulin resistance and oxidative stress in male, but not female, offspring. *J Nutr Metab*, *2015*, 158091. <https://doi.org/10.1155/2015/158091>
- Rodríguez, L., Panadero, M. I., Rodrigo, S., Roglans, N., Otero, P., Álvarez-Millán, J. J., Bocos, C. (2016). Liquid fructose in pregnancy exacerbates fructose-induced dyslipidemia in adult female offspring. *J Nutr Biochem*, *32*, 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.02.013>
- Rodríguez, L., Panadero, M. I., Roglans, N., Otero, P., Alvarez-Millán, J. J., Laguna, J. C., & Bocos, C. (2013). Fructose during pregnancy affects maternal and fetal leptin signaling. *J Nutr Biochem*, *24*(10), 1709-1716. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.02.011>
- Rodríguez, L., Panadero, M. I., Roglans, N., Otero, P., Rodrigo, S., Álvarez-Millán, J. J., Bocos, C. (2016). Fructose only in pregnancy provokes hyperinsulinemia, hypoadiponectinemia, and impaired insulin signaling in adult male, but not female, progeny. *Eur J Nutr*, *55*(2), 665-674. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0886-1>
- Rodríguez-Monforte, M., Sánchez, E., Barrio, F., Costa, B., & Flores-Mateo, G. (2017). Metabolic syndrome and dietary patterns: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Eur J Nutr*, *56*(3), 925-947. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1305-y>
- Rodríguez-Rodríguez, P., Ramiro-Cortijo, D., Reyes-Hernández, C. G., López de Pablo, A. L., González, M. C., & Arribas, S. M. (2018). Implication of Oxidative Stress in Fetal Programming of Cardiovascular Disease. *Front Physiol*, *9*, 602. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00602>
- Roglans, N., Sanguino, E., Peris, C., Alegret, M., Vázquez, M., Adzet, T., Sánchez, R. M. (2002). Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *J Pharmacol Exp Ther*, *302*(1), 232-239. <https://doi.org/10.1124/jpet.302.1.232>
- Roglans, N., Vilà, L., Farré, M., Alegret, M., Sánchez, R. M., Vázquez-Carrera, M., & Laguna, J. C. (2007). Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPAR α activity in fructose-fed rats. *Hepatology*, *45*(3), 778-788.
- Romao, J. M., Jin, W., He, M., McAllister, T., & Guan, L. L. (2012). Altered microRNA expression in bovine subcutaneous and visceral adipose tissues from cattle under different diet. *PLoS One*, *7*(7), e40605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040605>
- Rosas-Villegas, A., Sánchez-Tapia, M., Avila-Nava, A., Ramírez, V., Tovar, A. R., & Torres, N. (2017). Differential Effect of Sucrose and Fructose in Combination with a High Fat Diet on Intestinal Microbiota and Kidney Oxidative Stress. *Nutrients*, *9*(4). <https://doi.org/10.3390/nu9040393>
- Rosinger, A., Herrick, K. A., Gahche, J. J., & Park, S. (2017). Sugar-sweetened beverage consumption among US youth, 2011-2014.

- Rottiers, V., & Näär, A. M. (2012). MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(4), 239-250. <https://doi.org/10.1038/nrm3313>
- Roy, S., Chikkerur, J., Roy, S. C., Dhali, A., Kolte, A. P., Sridhar, M., & Samanta, A. K. (2018). Tagatose as a Potential Nutraceutical: Production, Properties, Biological Roles, and Applications. *J Food Sci*, 83(11), 2699-2709. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14358>
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132, 365-386. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:365>
- Ruiz, E., Rodriguez, P., Valero, T., Ávila, J. M., Aranceta-Bartrina, J., Gil, Á., Varela-Moreiras, G. (2017). Dietary Intake of Individual (Free and Intrinsic) Sugars and Food Sources in the Spanish Population: Findings from the ANIBES Study. *Nutrients*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/nu9030275>
- Ruiz, E., & Varela-Moreiras, G. (2017). Adequacy of the dietary intake of total and added sugars in the Spanish diet to the recommendations: ANIBES study. *Nutr Hosp*, 34(Suppl 4), 45-52. <https://doi.org/10.20960/nh.1571>
- Rydén, L., Standl, E., Bartnik, M., Berghe, G. V. d., Betteridge, J., de Boer, M.-J., Malmberg, K. (2007). † Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: full text†: The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *European heart journal supplements*, 9(suppl_C), C3-C74.
- Saad, A. F., Dickerson, J., Kechichian, T. B., Yin, H., Gamble, P., Salazar, A., Costantine, M. M. (2016). High-fructose diet in pregnancy leads to fetal programming of hypertension, insulin resistance, and obesity in adult offspring. *Am J Obstet Gynecol*, 215(3), 378.e371-376. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.03.038>
- Saad, M. I., Abdelkhalek, T. M., Haiba, M. M., Saleh, M. M., Hanafi, M. Y., Tawfik, S. H., & Kamel, M. A. (2016). Maternal obesity and malnourishment exacerbate perinatal oxidative stress resulting in diabetogenic programming in F1 offspring. *J Endocrinol Invest*, 39(6), 643-655. <https://doi.org/10.1007/s40618-015-0413-5>
- Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*, 20(2), 12. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
- Samuel, V. T. (2011). Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, 22(2), 60-65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.10.003>
- Sanchez-Lozada, L. G., Andres-Hernando, A., Garcia-Arroyo, F. E., Cicerchi, C., Li, N., Kuwabara, M., . . . Lanaspa, M. A. (2019). Uric acid activates aldose reductase and the polyol pathway for endogenous fructose and fat production causing development of fatty liver in rats. *J Biol Chem*, 294(11), 4272-4281. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006158>
- Sangüesa, G., Montañés, J. C., Baena, M., Sánchez, R. M., Roglans, N., Alegret, M., & Laguna, J. C. (2019). Chronic fructose intake does not induce liver steatosis and inflammation in female Sprague-Dawley rats, but causes hypertriglyceridemia related to decreased VLDL receptor expression. *Eur J Nutr*, 58(3), 1283-1297. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1654-9>
- Sbodio, J. I., Snyder, S. H., & Paul, B. D. (2019). Regulators of the transsulfuration pathway. *Br J Pharmacol*, 176(4), 583-593. <https://doi.org/10.1111/bph.14446>
- Schalkwijk, C. G., Stehouwer, C. D., & van Hinsbergh, V. W. (2004). Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 20(5), 369-382.
- Schlein, C., Talukdar, S., Heine, M., Fischer, A. W., Krott, L. M., Nilsson, S. K., Scheja, L. (2016). FGF21 Lowers Plasma Triglycerides by Accelerating Lipoprotein Catabolism in White and Brown Adipose Tissues. *Cell Metab*, 23(3), 441-453. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.006>
- Schulze, M. B., Manson, J. E., Ludwig, D. S., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2004). Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *Jama*, 292(8), 927-934.
- Searcy, D. G. (1996). HS-: O2Oxidoreductase Activity of Cu, Zn Superoxide Dismutase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 334(1), 50-58.

Bibliografía

- Sedová, L., Seda, O., Kazdová, L., Chylíková, B., Hamet, P., Tremblay, J., Krenová, D. (2007). Sucrose feeding during pregnancy and lactation elicits distinct metabolic response in offspring of an inbred genetic model of metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292(5), E1318-1324. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00526.2006>
- Seong, H. Y., Cho, H. M., Kim, M., & Kim, I. (2019). Maternal High-Fructose Intake Induces Multigenerational Activation of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Hypertension*, 74(3), 518-525. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12941>
- Sharabi, Y., Oron-Herman, M., Kamari, Y., Avni, I., Peleg, E., Shabtay, Z., Shamiss, A. (2007). Effect of PPAR-gamma agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. *Am J Hypertens*, 20(2), 206-210. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2006.08.002>
- Shen, Y., Shen, Z., Luo, S., Guo, W., & Zhu, Y. Z. (2015). The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 925167. <https://doi.org/10.1155/2015/925167>
- Shen, Y., Shen, Z., Miao, L., Xin, X., Lin, S., Zhu, Y., Zhu, Y. Z. (2015). miRNA-30 family inhibition protects against cardiac ischemic injury by regulating cystathionine- γ -lyase expression. *Antioxid Redox Signal*, 22(3), 224-240. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5909>
- Si, Y. F., Wang, J., Guan, J., Zhou, L., Sheng, Y., & Zhao, J. (2013). Treatment with hydrogen sulfide alleviates streptozotocin-induced diabetic retinopathy in rats. *Br J Pharmacol*, 169(3), 619-631. <https://doi.org/10.1111/bph.12163>
- Singh, A. K., Amlal, H., Haas, P. J., Dringenberg, U., Fussell, S., Barone, S. L., Soleimani, M. (2008). Fructose-induced hypertension: essential role of chloride and fructose absorbing transporters PAT1 and Glut5. *Kidney Int*, 74(4), 438-447. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.184>
- Singh, R., Barden, A., Mori, T., & Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44(2), 129-146. <https://doi.org/10.1007/s001250051591>
- Singh, S., & Banerjee, R. (2011). PLP-dependent H₂S biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1814(11), 1518-1527.
- Singh, S., Madzelan, P., & Banerjee, R. (2007). Properties of an unusual heme cofactor in PLP-dependent cystathionine β -synthase. *Natural product reports*, 24(3), 631-639.
- Sivarajah, A., Collino, M., Yasin, M., Benetti, E., Gallicchio, M., Mazzon, E., Thiernemann, C. (2009). Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock*, 31(3), 267-274.
- So, W. Y., & Leung, P. S. (2016). Fibroblast Growth Factor 21 As an Emerging Therapeutic Target for Type 2 Diabetes Mellitus. *Med Res Rev*, 36(4), 672-704. <https://doi.org/10.1002/med.21390>
- Sodhi, K., Puri, N., Favero, G., Stevens, S., Meadows, C., Abraham, N. G., Shapiro, J. I. (2015). Fructose Mediated Non-Alcoholic Fatty Liver Is Attenuated by HO-1-SIRT1 Module in Murine Hepatocytes and Mice Fed a High Fructose Diet. *PLoS One*, 10(6), e0128648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128648>
- Soleimani, M. (2011). Dietary fructose, salt absorption and hypertension in metabolic syndrome: towards a new paradigm. *Acta Physiol (Oxf)*, 201(1), 55-62. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02167.x>
- Song, A., Astbury, S., Hoedl, A., Coursen, N., Dixon, W., Hemmings, D., & Bell, R. (2016). Maternal high-fructose in pregnancy adversely affects morphological aspects of the placenta. *The FASEB Journal*, 30(1_supplement), 287.281-287.281.
- Song, A., Astbury, S., Hoedl, A., Nielsen, B., Symonds, M. E., & Bell, R. C. (2017). Lifetime Exposure to a Constant Environment Amplifies the Impact of a Fructose-Rich Diet on Glucose Homeostasis during Pregnancy. *Nutrients*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/nu9040327>
- Stanhope, K. L., Bremer, A. A., Medici, V., Nakajima, K., Ito, Y., Nakano, T., Menorca, R. I. (2011). Consumption of fructose and high fructose corn syrup increase postprandial triglycerides, LDL-cholesterol, and apolipoprotein-B in young men and women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(10), E1596-E1605.

- Stanhope, K. L., & Havel, P. J. (2008). Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*, 19(1), 16-24. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282f2b24a>
- Statovci, D., Aguilera, M., MacSharry, J., & Melgar, S. (2017). The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces. *Front Immunol*, 8, 838. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00838>
- Stevanovic, D., Hebert, A. J., Desai, B. N., Singhal, G., Adams, A. C., Flier, J. S., & Maratos-Flier, E. (2020). Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) creates sugar-specific taste aversion to fructose through action in the brain in mice. *bioRxiv*.
- Strakovsky, R. S., Zhang, X., Zhou, D., & Pan, Y. X. (2011). Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats. *J Physiol*, 589(Pt 11), 2707-2717. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.203950>
- Suanarunsawat, T., Ayutthaya, W. D., Songsak, T., Thirawarapan, S., & Pongshompoo, S. (2011). Lipid-lowering and antioxidative activities of aqueous extracts of *Ocimum sanctum* L. leaves in rats fed with a high-cholesterol diet. *Oxid Med Cell Longev*, 2011, 962025. <https://doi.org/10.1155/2011/962025>
- Sud, N., Zhang, H., Pan, K., Cheng, X., Cui, J., & Su, Q. (2017). Aberrant expression of microRNA induced by high-fructose diet: implications in the pathogenesis of hyperlipidemia and hepatic insulin resistance. *J Nutr Biochem*, 43, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.02.003>
- Sun, N. L., Xi, Y., Yang, S. N., Ma, Z., & Tang, C. S. (2007). [Plasma hydrogen sulfide and homocysteine levels in hypertensive patients with different blood pressure levels and complications]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 35(12), 1145-1148.
- Suzuki, K., Olah, G., Modis, K., Coletta, C., Kulp, G., Gerö, D., Szabo, C. (2011). Hydrogen sulfide replacement therapy protects the vascular endothelium in hyperglycemia by preserving mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(33), 13829-13834. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105121108>
- Suzuki, K., Sagara, M., Aoki, C., Tanaka, S., & Aso, Y. (2017). Clinical implication of plasma hydrogen sulfide levels in Japanese patients with type 2 diabetes. *Internal Medicine*, 56(1), 17-21.
- Swanson, J. E., Laine, D. C., Thomas, W., & Bantle, J. P. (1992). Metabolic effects of dietary fructose in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, 55(4), 851-856. <https://doi.org/10.1093/ajcn/55.4.851>
- Symonds, M. E., Sebert, S. P., Hyatt, M. A., & Budge, H. (2009). Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nat Rev Endocrinol*, 5(11), 604-610. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.195>
- Szabo, C. (2012). Roles of hydrogen sulfide in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal*, 17(1), 68-80. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4451>
- Szabo, C. (2017). Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol*, 312(1), C3-C15. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00282.2016>
- Søberg, S., Sandholt, C. H., Jespersen, N. Z., Toft, U., Madsen, A. L., von Holstein-Rathlou, S., Grarup, N. (2017). FGF21 Is a Sugar-Induced Hormone Associated with Sweet Intake and Preference in Humans. *Cell Metab*, 25(5), 1045-1053.e1046. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.009>
- Taghibiglou, C., Carpentier, A., Van Iderstine, S. C., Chen, B., Rudy, D., Aiton, A., Adeli, K. (2000). Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J Biol Chem*, 275(12), 8416-8425. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8416>
- Tai, I. H., Sheen, J. M., Lin, Y. J., Yu, H. R., Tiao, M. M., Chen, C. C., Tain, Y. L. (2016). Maternal N-acetylcysteine therapy regulates hydrogen sulfide-generating pathway and prevents programmed hypertension in male offspring exposed to prenatal dexamethasone and postnatal high-fat diet. *Nitric Oxide*, 53, 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.12.006>

Bibliografía

- Tain, Y. L., Hsu, C. N., Lee, C. T., Lin, Y. J., & Tsai, C. C. (2016). N-Acetylcysteine Prevents Programmed Hypertension in Male Rat Offspring Born to Suramin-Treated Mothers. *Biol Reprod*, *95*(1), 8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.139766>
- Tain, Y. L., Leu, S., Wu, K. L., Lee, W. C., & Chan, J. Y. (2014). Melatonin prevents maternal fructose intake-induced programmed hypertension in the offspring: roles of nitric oxide and arachidonic acid metabolites. *J Pineal Res*, *57*(1), 80-89. <https://doi.org/10.1111/jpi.12145>
- Takagi, Y., Kashiwagi, A., Tanaka, Y., Asahina, T., Kikkawa, R., & Shigeta, Y. (1995). Significance of fructose-induced protein oxidation and formation of advanced glycation end product. *J Diabetes Complications*, *9*(2), 87-91. [https://doi.org/10.1016/1056-8727\(94\)00022-g](https://doi.org/10.1016/1056-8727(94)00022-g)
- Tanaka, N., Takahashi, S., Zhang, Y., Krausz, K. W., Smith, P. B., Patterson, A. D., & Gonzalez, F. J. (2015). Role of fibroblast growth factor 21 in the early stage of NASH induced by methionine- and choline-deficient diet. *Biochim Biophys Acta*, *1852*(7), 1242-1252. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.02.012>
- Tang, G., Yang, G., Jiang, B., Ju, Y., Wu, L., & Wang, R. (2013). H2S is an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Antioxidants & redox signaling*, *19*(14), 1634-1646.
- Tang, G., Zhang, L., Yang, G., Wu, L., & Wang, R. (2013). Hydrogen sulfide-induced inhibition of L-type Ca²⁺ channels and insulin secretion in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia*, *56*(3), 533-541. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2806-8>
- Tang, Y., Zheng, J., Sun, Y., Wu, Z., Liu, Z., & Huang, G. (2009). MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2. *Int Heart J*, *50*(3), 377-387. <https://doi.org/10.1536/ihj.50.377>
- Taniguchi, S., Kimura, T., Umeki, T., Kimura, Y., Kimura, H., Ishii, I., Niki, I. (2012). Protein phosphorylation involved in the gene expression of the hydrogen sulphide producing enzyme cystathionine γ -lyase in the pancreatic β -cell. *Molecular and cellular endocrinology*, *350*(1), 31-38.
- Tappy, L. (2018). Fructose-containing caloric sweeteners as a cause of obesity and metabolic disorders. *J Exp Biol*, *221*(Pt Suppl 1). <https://doi.org/10.1242/jeb.164202>
- Tappy, L., & Lê, K. A. (2010). Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev*, *90*(1), 23-46. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2009>
- Tappy, L., & Lê, K. A. (2015). Health effects of fructose and fructose-containing caloric sweeteners: where do we stand 10 years after the initial whistle blowings? *Curr Diab Rep*, *15*(8), 54. <https://doi.org/10.1007/s11892-015-0627-0>
- Tappy, L., Lê, K. A., Tran, C., & Paquot, N. (2010). Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition*, *26*(11-12), 1044-1049. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.02.014>
- Tarrade, A., Panchenko, P., Junien, C., & Gabory, A. (2015). Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. *J Exp Biol*, *218*(Pt 1), 50-58. <https://doi.org/10.1242/jeb.110320>
- Taskinen, M. R., Packard, C. J., & Borén, J. (2019). Dietary Fructose and the Metabolic Syndrome. *Nutrients*, *11*(9). <https://doi.org/10.3390/nu11091987>
- Tezze, C., Romanello, V., & Sandri, M. (2019). FGF21 as Modulator of Metabolism in Health and Disease. *Front Physiol*, *10*, 419. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00419>
- Thomou, T., Mori, M. A., Dreyfuss, J. M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., Kahn, C. R. (2017). Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*, *542*(7642), 450-455. <https://doi.org/10.1038/nature21365>
- Tobar-Bernal, F. A., Zamudio, S. R., & Quevedo-Corona, L. (2021). The high-fructose intake of dams during pregnancy and lactation exerts sex-specific effects on adult rat offspring metabolism. *J Dev Orig Health Dis*, *12*(3), 411-419. <https://doi.org/10.1017/S2040174420000501>
- Tomita, M., Nagahara, N., & Ito, T. (2016). Expression of 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase in the Mouse. *Molecules*, *21*(12). <https://doi.org/10.3390/molecules21121707>

- Tomita, T. (2016). Apoptosis in pancreatic β -islet cells in Type 2 diabetes. *Bosn J Basic Med Sci*, 16(3), 162-179. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2016.919>
- Tran, H. Q., Bretin, A., Adeshirlarijaney, A., Yeoh, B. S., Vijay-Kumar, M., Zou, J., Gewirtz, A. T. (2020). "Western Diet"-Induced Adipose Inflammation Requires a Complex Gut Microbiota. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 9(2), 313-333. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.09.009>
- Tran, L. T., MacLeod, K. M., & McNeill, J. H. (2009). Endothelin-1 modulates angiotensin II in the development of hypertension in fructose-fed rats. *Mol Cell Biochem*, 325(1-2), 89-97. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-0023-z>
- Tran, L. T., Yuen, V. G., & McNeill, J. H. (2009). The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem*, 332(1-2), 145-159. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0184-4>
- Turek-Plewa, J., & Jagodziński, P. P. (2005). The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett*, 10(4), 631-647.
- Unger, A. L., Torres-Gonzalez, M., & Kraft, J. (2019). Dairy Fat Consumption and the Risk of Metabolic Syndrome: An Examination of the Saturated Fatty Acids in Dairy. *Nutrients*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/nu11092200>
- Unger, R. H., Zhou, Y. T., & Orci, L. (1999). Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5), 2327-2332. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2327>
- Untereiner, A., & Wu, L. (2018). Hydrogen Sulfide and Glucose Homeostasis: A Tale of Sweet and the Stink. *Antioxid Redox Signal*, 28(16), 1463-1482. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7046>
- Untereiner, A. A., Fu, M., Módis, K., Wang, R., Ju, Y., & Wu, L. (2016). Stimulatory effect of CSE-generated H₂S on hepatic mitochondrial biogenesis and the underlying mechanisms. *Nitric Oxide*, 58, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.06.005>
- Untereiner, A. A., Wang, R., Ju, Y., & Wu, L. (2016). Decreased Gluconeogenesis in the Absence of Cystathionine Gamma-Lyase and the Underlying Mechanisms. *Antioxid Redox Signal*, 24(3), 129-140. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6369>
- Vahid, F., Zand, H., Nosrat-Mirshakarlou, E., Najafi, R., & Hekmatdoost, A. (2015). The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: a review. *Gene*, 562(1), 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.045>
- van der Velde, A. E., Vriens, C. L., van den Oever, K., Seemann, I., Oude Elferink, R. P., van Eck, M., Groen, A. K. (2008). Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 295(1), G203-G208. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90231.2008>
- van der Wulp, M. Y., Verkade, H. J., & Groen, A. K. (2013). Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*, 368(1-2), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.007>
- van Dijk, S. J., Feskens, E. J., Bos, M. B., Hoelen, D. W., Heijligenberg, R., Bromhaar, M. G., Afman, L. A. (2009). A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr*, 90(6), 1656-1664. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27792>
- van Straten, E. M., Bloks, V. W., Huijkman, N. C., Baller, J. F., Meer, H. v., Lütjohann, D., Plösch, T. (2010). The liver X-receptor gene promoter is hypermethylated in a mouse model of prenatal protein restriction. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(2), R275-R282.
- Varma, S. D., Kovtun, S., Hegde, K., Yin, J., & Ramnath, J. (2012). Effect of high sugar levels on miRNA expression. Studies with galactosemic mice lenses. *Mol Vis*, 18, 1609-1618.
- Veeranki, S., & Tyagi, S. C. (2015). Role of hydrogen sulfide in skeletal muscle biology and metabolism. *Nitric Oxide*, 46, 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.11.012>
- Velmurugan, G. V., Huang, H., Sun, H., Candela, J., Jaiswal, M. K., Beaman, K. D., White, C. (2015). Depletion of H₂S during obesity enhances store-operated Ca²⁺ entry in adipose tissue macrophages to increase cytokine production. *Sci Signal*, 8(407), ra128. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aac7135>

Bibliografia

- Verdam, F. J., Rensen, S. S., Driessen, A., Greve, J. W., & Buurman, W. A. (2011). Novel evidence for chronic exposure to endotoxin in human nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*, *45*(2), 149-152. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3181e12c24>
- Vickers, M. H., Breier, B. H., Cutfield, W. S., Hofman, P. L., & Gluckman, P. D. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *279*(1), E83-87. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.279.1.E83>
- Vickers, M. H., Clayton, Z. E., Yap, C., & Sloboda, D. M. (2011). Maternal fructose intake during pregnancy and lactation alters placental growth and leads to sex-specific changes in fetal and neonatal endocrine function. *Endocrinology*, *152*(4), 1378-1387. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1093>
- Vickers, M. H., Gluckman, P. D., Coveny, A. H., Hofman, P. L., Cutfield, W. S., Gertler, A., Harris, M. (2005). Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology*, *146*(10), 4211-4216. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0581>
- Vienberg, S., Geiger, J., Madsen, S., & Dalgaard, L. T. (2017). MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiol (Oxf)*, *219*(2), 346-361. <https://doi.org/10.1111/apha.12681>
- Vilà, L., Roglans, N., Perna, V., Sánchez, R. M., Vázquez-Carrera, M., Alegret, M., & Laguna, J. C. (2011). Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose. *J Nutr Biochem*, *22*(8), 741-751. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.06.005>
- Vlassara, H., & Palace, M. R. (2002). Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med*, *251*(2), 87-101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.00932.x>
- Volynets, V., Louis, S., Pretz, D., Lang, L., Ostaff, M. J., Wehkamp, J., & Bischoff, S. C. (2017). Intestinal barrier function and the gut microbiome are differentially affected in mice fed a western-style diet or drinking water supplemented with fructose. *The Journal of nutrition*, *147*(5), 770-780.
- von Holstein-Rathlou, S., BonDurant, L. D., Peltekian, L., Naber, M. C., Yin, T. C., Claflin, K. E., Potthoff, M. J. (2016). FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver. *Cell Metab*, *23*(2), 335-343. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.003>
- Walker, R. W., Dumke, K. A., & Goran, M. I. (2014). Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup. *Nutrition*, *30*(7-8), 928-935. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.04.003>
- Wang, C., Han, J., Xiao, L., Jin, C. E., Li, D. J., & Yang, Z. (2014). Role of hydrogen sulfide in portal hypertension and esophagogastric junction vascular disease. *World J Gastroenterol*, *20*(4), 1079-1087. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i4.1079>
- Wang, G., Li, W., Chen, Q., Jiang, Y., Lu, X., & Zhao, X. (2015). Hydrogen sulfide accelerates wound healing in diabetic rats. *Int J Clin Exp Pathol*, *8*(5), 5097-5104.
- Wang, K., Ahmad, S., Cai, M., Rennie, J., Fujisawa, T., Crispi, F., Ahmed, A. (2013). Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine γ -lyase contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia. *Circulation*, *127*(25), 2514-2522. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001631>
- Wang, L., Tang, Z. P., Zhao, W., Cong, B. H., Lu, J. Q., Tang, X. L., Ni, X. (2015). MiR-22/Sp-1 Links Estrogens With the Up-Regulation of Cystathionine γ -Lyase in Myocardium, Which Contributes to Estrogenic Cardioprotection Against Oxidative Stress. *Endocrinology*, *156*(6), 2124-2137. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1362>
- Wang, R. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J*, *16*(13), 1792-1798. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0211hyp>
- Wang, R. (2014). Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochem Sci*, *39*(5), 227-232. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.03.003>
- Wang, R. (2018). *Gasotransmitters*. Royal Society of Chemistry.
- Wang, W. F., Li, S. M., Ren, G. P., Zheng, W., Lu, Y. J., Yu, Y. H., Li, D. S. (2015). Recombinant murine fibroblast growth factor 21 ameliorates obesity-related inflammation in monosodium glutamate-induced obesity rats. *Endocrine*, *49*(1), 119-129. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0433-5>

- Wang, X., Ding, H., Huang, L., & Huang, Q. (2013). Regulatory effect of hydrogen sulfide on adiponectin secretion in fatty liver adipocytes. *Chinese Journal of Clinical Nutrition*, 21(4), 225-228.
- Wang, X., Hasegawa, J., Kitamura, Y., Wang, Z., Matsuda, A., Shinoda, W., Kimura, K. (2011). Effects of hesperidin on the progression of hypercholesterolemia and fatty liver induced by high-cholesterol diet in rats. *J Pharmacol Sci*, 117(3), 129-138. <https://doi.org/10.1254/jphs.11097fp>
- Waser, M., Mesaeli, N., Spencer, C., & Michalak, M. (1997). Regulation of calreticulin gene expression by calcium. *J Cell Biol*, 138(3), 547-557. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.3.547>
- Weber, R., & Birsoy, K. (2019). The Transsulfuration Pathway Makes, the Tumor Takes. *Cell Metab*, 30(5), 845-846. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.10.009>
- Weickert, M. O., & Pfeiffer, A. F. (2006). Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia*, 49(8), 1732-1741. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0295-3>
- Weihrauch-Blüher, S., Schwarz, P., & Klusmann, J. H. (2019). Childhood obesity: increased risk for cardiometabolic disease and cancer in adulthood. *Metabolism*, 92, 147-152. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.12.001>
- Weiss, R., Bremer, A. A., & Lustig, R. H. (2013). What is metabolic syndrome, and why are children getting it? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1281(1), 123.
- West, I. C. (2000). Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med*, 17(3), 171-180. <https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2000.00259.x>
- White, J. S., Hobbs, L. J., & Fernandez, S. (2015). Fructose content and composition of commercial HFCS-sweetened carbonated beverages. *Int J Obes (Lond)*, 39(1), 176-182. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.73>
- White, J. S., & Nicklas, T. A. (2016). High-fructose corn syrup use in beverages: composition, manufacturing, properties, consumption, and health effects. In *Beverage impacts on health and nutrition* (pp. 285-301). Springer.
- Whiteman, M., Gooding, K., Whatmore, J., Ball, C., Mawson, D., Skinner, K., Shore, A. (2010). Adiposity is a major determinant of plasma levels of the novel vasodilator hydrogen sulphide. *Diabetologia*, 53(8), 1722-1726.
- WHO. (2015). Guideline: Sugars Intake for Adults and Children. In. <https://doi.org/NBK285537>
- Wierzbicki, A. S. (2007). Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 4(2), 143-149.
- Willeit, P., Skrobilin, P., Moschen, A. R., Yin, X., Kaudewitz, D., Zampetaki, A., Mayr, M. (2017). Circulating MicroRNA-122 Is Associated With the Risk of New-Onset Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 66(2), 347-357. <https://doi.org/10.2337/db16-0731>
- Wilmouth, C. E., & Spear, L. P. (2009). Hedonic sensitivity in adolescent and adult rats: taste reactivity and voluntary sucrose consumption. *Pharmacol Biochem Behav*, 92(4), 566-573. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.02.009>
- Wong, S., Knight, J., Hopfer, S., Zaharia, O., Leach Jr, C. N., & Sunderman Jr, F. W. (1987). Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical chemistry*, 33(2), 214-220.
- Wright, L. S., Rifas-Shiman, S. L., Oken, E., Litonjua, A. A., & Gold, D. R. (2018). Prenatal and Early Life Fructose, Fructose-Containing Beverages, and Midchildhood Asthma. *Ann Am Thorac Soc*, 15(2), 217-224. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201707-530OC>
- Wu, D., Gao, B., Li, M., Yao, L., Wang, S., Chen, M., Li, Y. (2016). Hydrogen sulfide mitigates kidney injury in high fat diet-induced obese mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Wu, D., Hu, Q., Liu, X., Pan, L., Xiong, Q., & Zhu, Y. Z. (2015). Hydrogen sulfide protects against apoptosis under oxidative stress through SIRT1 pathway in H9c2 cardiomyocytes. *Nitric Oxide*, 46, 204-212.
- Wu, D., Hu, Q., & Zhu, D. (2018). An Update on Hydrogen Sulfide and Nitric Oxide Interactions in the Cardiovascular System. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 4579140. <https://doi.org/10.1155/2018/4579140>

Bibliografía

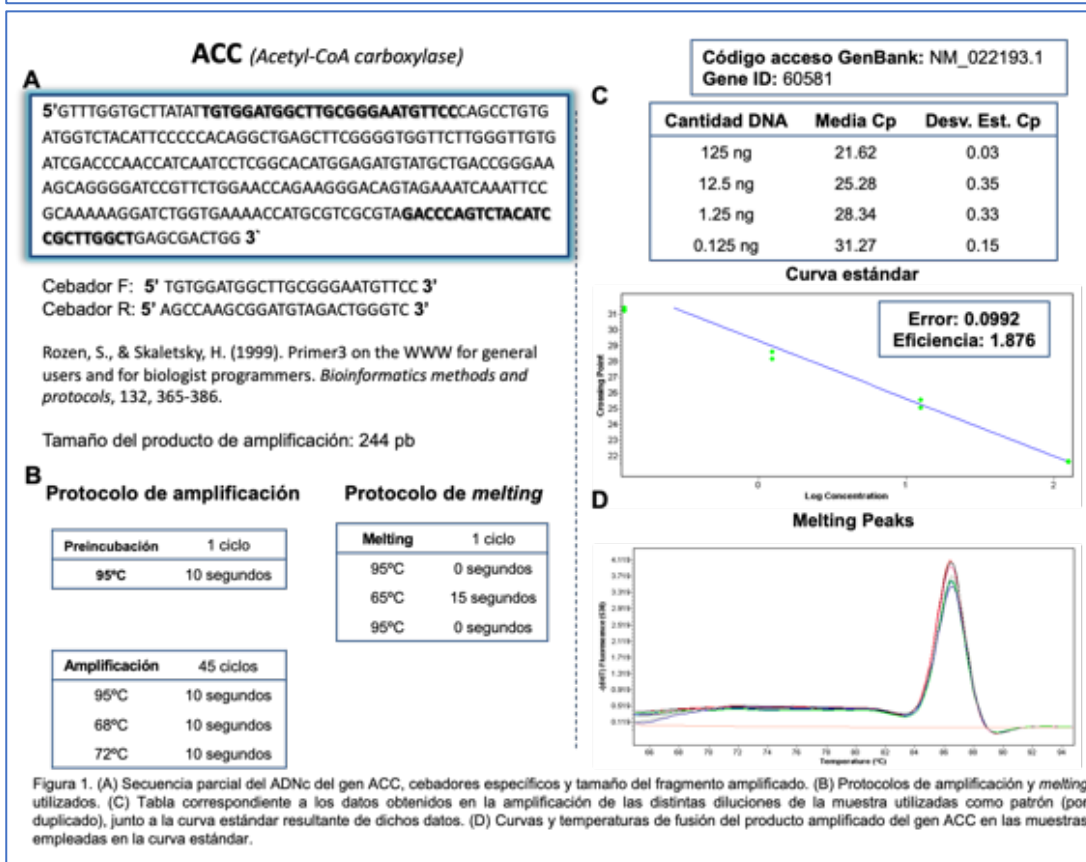
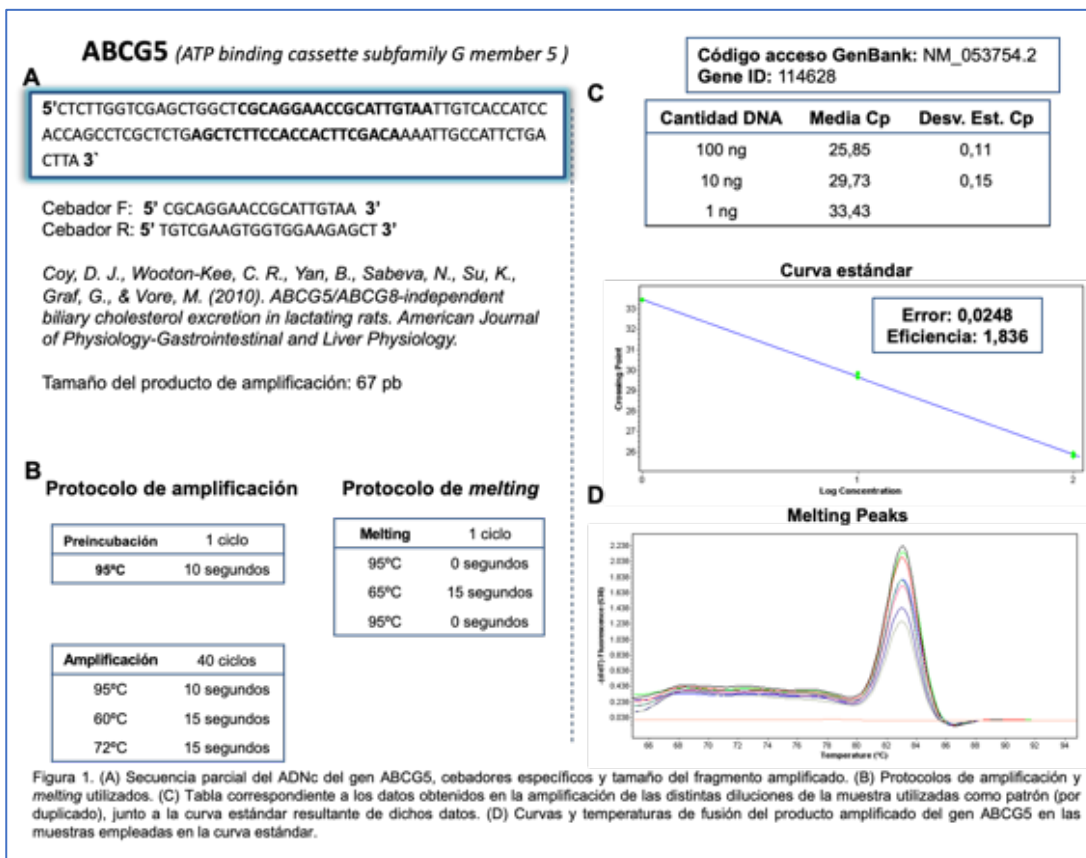
- Wu, D., Zheng, N., Qi, K., Cheng, H., Sun, Z., Gao, B., Li, Y. (2015). Exogenous hydrogen sulfide mitigates the fatty liver in obese mice through improving lipid metabolism and antioxidant potential. *Med Gas Res*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13618-014-0022-y>
- Xiangdong, L., Yuanwu, L., Hua, Z., Liming, R., Qiuyan, L., & Ning, L. (2011). Animal models for the atherosclerosis research: a review. *Protein Cell*, 2(3), 189-201. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1016-3>
- Xie, N., Cui, Y., Yin, Y. N., Zhao, X., Yang, J. W., Wang, Z. G., Lu, F. G. (2011). Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. *BMC Complement Altern Med*, 11, 53. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-53>
- Xie, Y., Matsumoto, H., Kennedy, S., Newberry, E. P., Moritz, W., DeBosch, B. J., Davidson, N. O. (2019). Impaired Chylomicron Assembly Modifies Hepatic Metabolism Through Bile Acid-Dependent and Transmissible Microbial Adaptations. *Hepatology*, 70(4), 1168-1184. <https://doi.org/10.1002/hep.30669>
- Xie, Z. Z., Liu, Y., & Bian, J. S. (2016). Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 6043038. <https://doi.org/10.1155/2016/6043038>
- Xu, J., Lloyd, D. J., Hale, C., Stanislaus, S., Chen, M., Sivits, G., Véniant, M. M. (2009). Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 58(1), 250-259. <https://doi.org/10.2337/db08-0392>
- Xu, M., Hua, Y., Qi, Y., Meng, G., & Yang, S. (2019). Exogenous hydrogen sulphide supplement accelerates skin wound healing via oxidative stress inhibition and vascular endothelial growth factor enhancement. *Exp Dermatol*, 28(7), 776-785. <https://doi.org/10.1111/exd.13930>
- Xue, R., Hao, D. D., Sun, J. P., Li, W. W., Zhao, M. M., Li, X. H., Zhu, Y. C. (2013). Hydrogen sulfide treatment promotes glucose uptake by increasing insulin receptor sensitivity and ameliorates kidney lesions in type 2 diabetes. *Antioxid Redox Signal*, 19(1), 5-23. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5024>
- Yan, X., Huang, Y., Zhao, J. X., Rogers, C. J., Zhu, M. J., Ford, S. P., Du, M. (2013). Maternal obesity downregulates microRNA let-7g expression, a possible mechanism for enhanced adipogenesis during ovine fetal skeletal muscle development. *Int J Obes (Lond)*, 37(4), 568-575. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.69>
- Yang, G. (2014). Protein S-sulfhydration as a major sources of H₂S bioactivity. *Receptors & Clinical Investigation*, 1.
- Yang, G., Ju, Y., Fu, M., Zhang, Y., Pei, Y., Racine, M., Wu, L. (2018). Cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulfide system is essential for adipogenesis and fat mass accumulation in mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(2), 165-176.
- Yang, G., Ju, Y., Fu, M., Zhang, Y., Pei, Y., Racine, M., Wu, L. (2018). Cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulfide system is essential for adipogenesis and fat mass accumulation in mice. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1863(2), 165-176. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.11.008>
- Yang, G., Pei, Y., Cao, Q., & Wang, R. (2012). MicroRNA-21 represses human cystathionine gamma-lyase expression by targeting at specificity protein-1 in smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 227(9), 3192-3200. <https://doi.org/10.1002/jcp.24006>
- Yang, G., & Wu, L. (2017). Trend in H₂S Biology and Medicine Research-A Bibliometric Analysis. *Molecules*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/molecules22122087>
- Yang, G., Yang, W., Wu, L., & Wang, R. (2007). H₂S, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells. *J Biol Chem*, 282(22), 16567-16576. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700605200>
- Yang, J., Minkler, P., Grove, D., Wang, R., Willard, B., Dweik, R., & Hine, C. (2019). Non-enzymatic hydrogen sulfide production from cysteine in blood is catalyzed by iron and vitamin B. *Commun Biol*, 2, 194. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0431-5>
- Yang, R., Jia, Q., Ma, S. F., Wang, Y., Mehmood, S., & Chen, Y. (2019). Exogenous H₂S mitigates myocardial fibrosis in diabetic rats through suppression of the canonical Wnt pathway. *Int J Mol Med*, 44(2), 549-558. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4237>
- Yang, W., Yang, G., Jia, X., Wu, L., & Wang, R. (2005). Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *The Journal of physiology*, 569(2), 519-531.

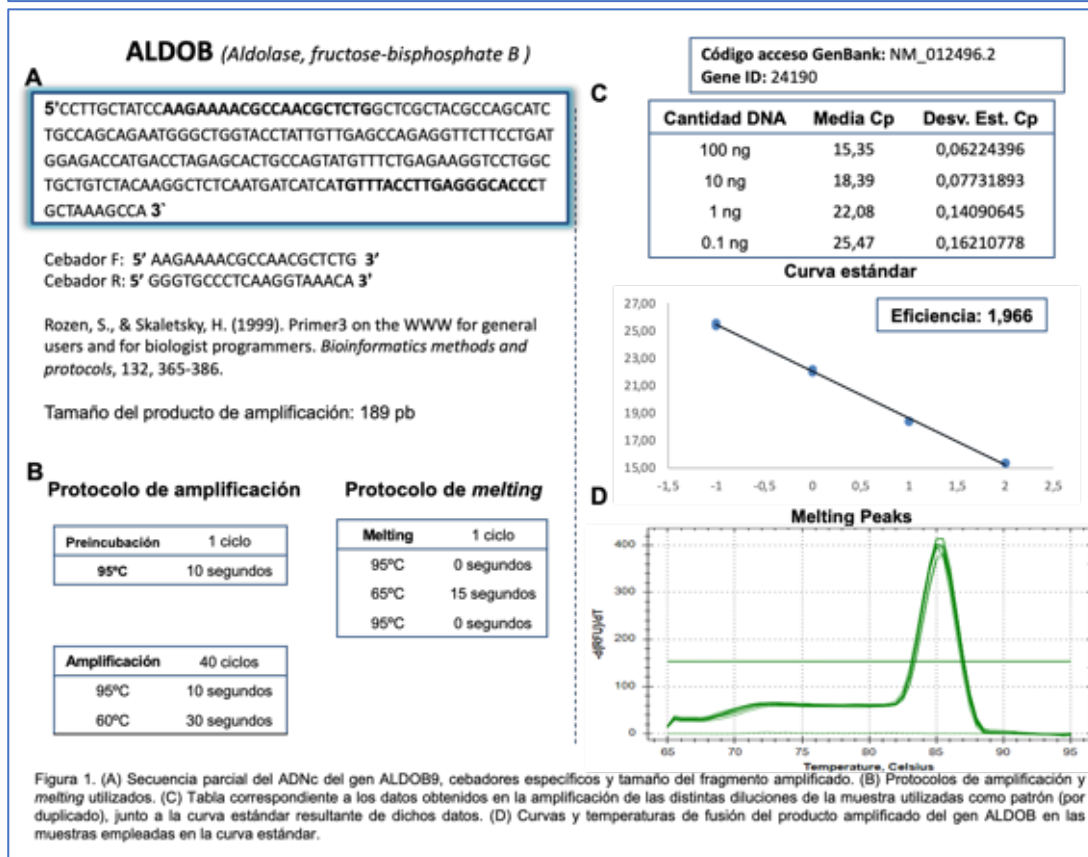
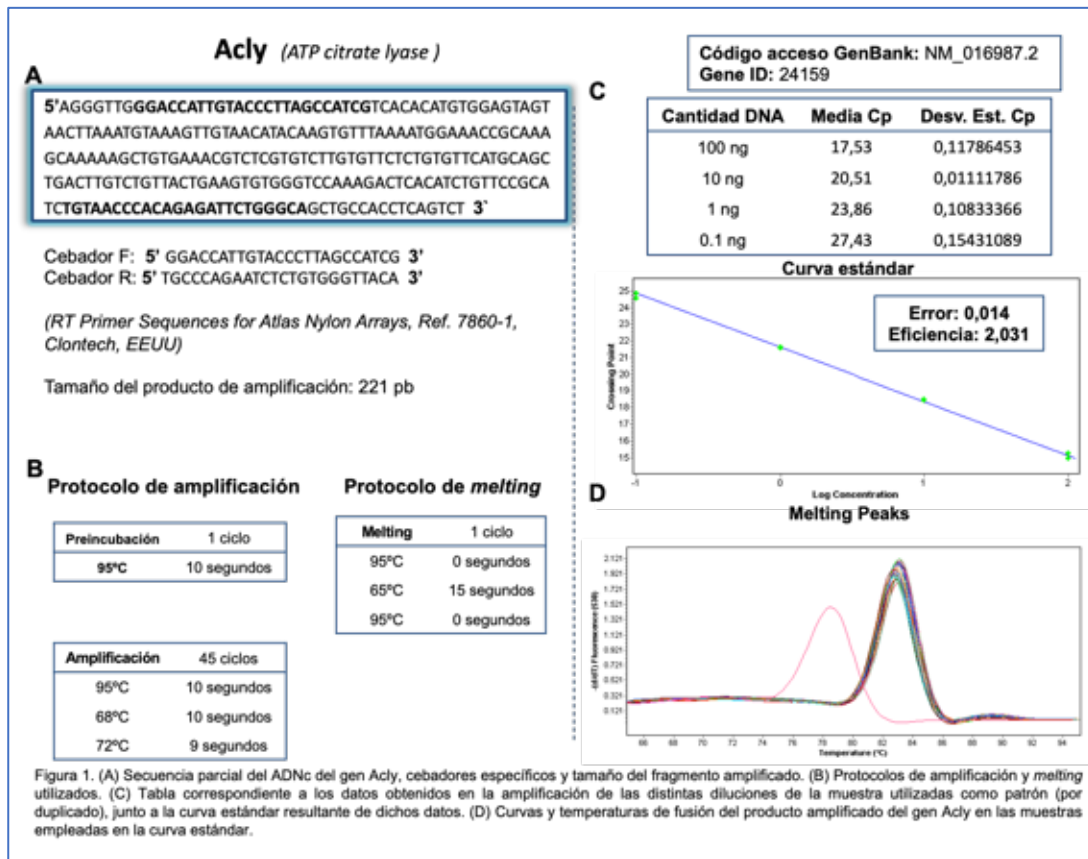
- Yang, Y., Wang, J., Zhang, Y., Li, J., & Sun, W. (2018). Black sesame seeds ethanol extract ameliorates hepatic lipid accumulation, oxidative stress, and insulin resistance in fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of agricultural and food chemistry*, *66*(40), 10458-10469.
- Yaribeygi, H., Atkin, S. L., & Sahebkar, A. (2019). A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress. *J Cell Physiol*, *234*(2), 1300-1312. <https://doi.org/10.1002/jcp.27164>
- Yasuda, A., Natsume, M., Sasaki, K., Baba, S., Nakamura, Y., Kanegae, M., & Nagaoka, S. (2008). Cacao procyanidins reduce plasma cholesterol and increase fecal steroid excretion in rats fed a high-cholesterol diet. *Biofactors*, *33*(3), 211-223. <https://doi.org/10.1002/biof.5520330307>
- Yerlikaya, A., Dagele, T., King, C., Kuwabara, M., Lanaspá, M. A., Andres-Hernando, A., Kanbay, M. (2017). Dietary and commercialized fructose: Sweet or sour? *Int Urol Nephrol*, *49*(9), 1611-1620. <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1544-8>
- Yerlikaya, F. H., & Mehmet, Ö. (2019). Aberrant expression of miRNA profiles in high-fat and high-sucrose fed rats. *Clinical Nutrition Experimental*.
- Yong, Q. C., Hu, L. F., Wang, S., Huang, D., & Bian, J. S. (2010). Hydrogen sulfide interacts with nitric oxide in the heart: possible involvement of nitroxyl. *Cardiovasc Res*, *88*(3), 482-491. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq248>
- Yoshida, E., Toyama, T., Shinkai, Y., Sawa, T., Akaike, T., & Kumagai, Y. (2011). Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide-producing enzyme in Mammalian cells. *Chem Res Toxicol*, *24*(10), 1633-1635. <https://doi.org/10.1021/tx200394g>
- Yu, H.-L., Dong, S., Gao, L.-F., Li, L., Xi, Y.-D., Ma, W.-W., Xiao, R. (2015). Global DNA methylation was changed by a maternal high-lipid, high-energy diet during gestation and lactation in male adult mice liver. *British Journal of Nutrition*, *113*(7), 1032-1039.
- Yu, Y., Bai, F., Wang, W., Liu, Y., Yuan, Q., Qu, S., Ren, G. (2015). Fibroblast growth factor 21 protects mouse brain against D-galactose induced aging via suppression of oxidative stress response and advanced glycation end products formation. *Pharmacol Biochem Behav*, *133*, 122-131. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.03.020>
- Yuan, P., Xue, H., Zhou, L., Qu, L., Li, C., Wang, Z., Lu, L. (2011). Rescue of mesangial cells from high glucose-induced over-proliferation and extracellular matrix secretion by hydrogen sulfide. *Nephrol Dial Transplant*, *26*(7), 2119-2126. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq749>
- Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P. M., Bautista, C. J., Deás, M., Guillén, L., Rodríguez-González, G. L., . . . Nathanielsz, P. W. (2005). Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol*, *566*(Pt 1), 225-236. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.086462>
- Zhang, G.-Y., Lu, D., Duan, S.-F., Gao, Y.-R., Liu, S.-Y., Hong, Y., Wang, D.-Y. (2018). Hydrogen sulfide alleviates lipopolysaccharide-induced diaphragm dysfunction in rats by reducing apoptosis and inflammation through ROS/MAPK and TLR4/NF-κB signaling pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2018*.
- Zhang, H., Huang, Y., Chen, S., Tang, C., Wang, G., Du, J., & Jin, H. (2020). Hydrogen sulfide regulates insulin secretion and insulin resistance in diabetes mellitus, a new promising target for diabetes mellitus treatment?-A review. *Journal of Advanced Research*.
- Zhang, J., Zhang, F., Didelot, X., Bruce, K. D., Cagampang, F. R., Vatish, M., Byrne, C. D. (2009). Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. *BMC Genomics*, *10*, 478. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-478>
- Zhang, L., Yang, G., Tang, G., Wu, L., & Wang, R. (2011). Rat pancreatic level of cystathionine γ-lyase is regulated by glucose level via specificity protein 1 (SP1) phosphorylation. *Diabetologia*, *54*(10), 2615.
- Zhang, L., Yang, G., Untereiner, A., Ju, Y., Wu, L., & Wang, R. (2013). Hydrogen sulfide impairs glucose utilization and increases gluconeogenesis in hepatocytes. *Endocrinology*, *154*(1), 114-126. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1658>

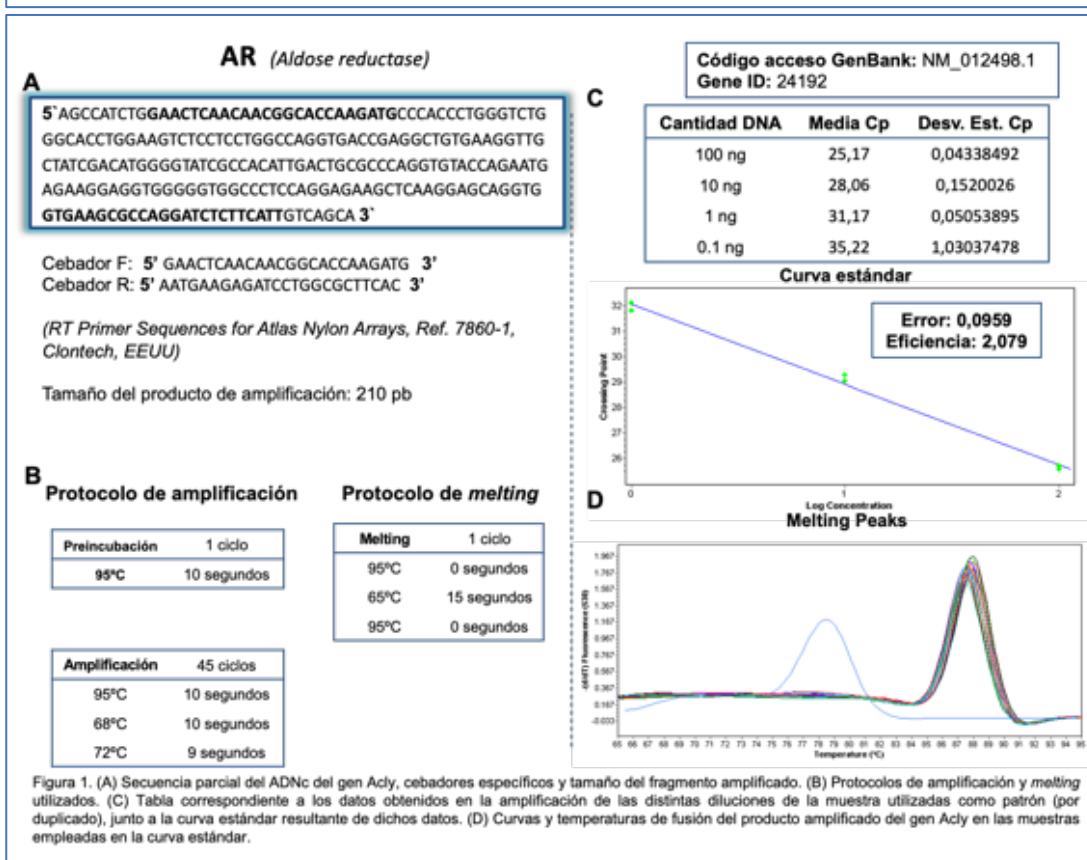
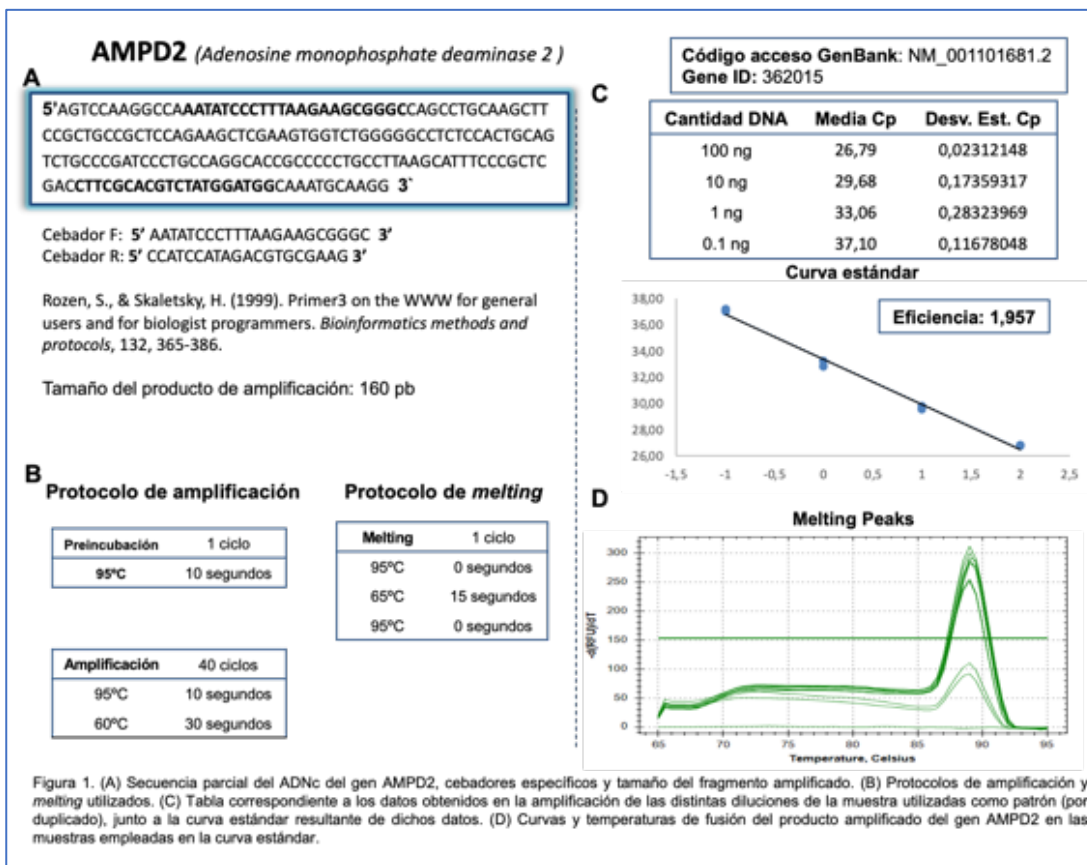
Bibliografia

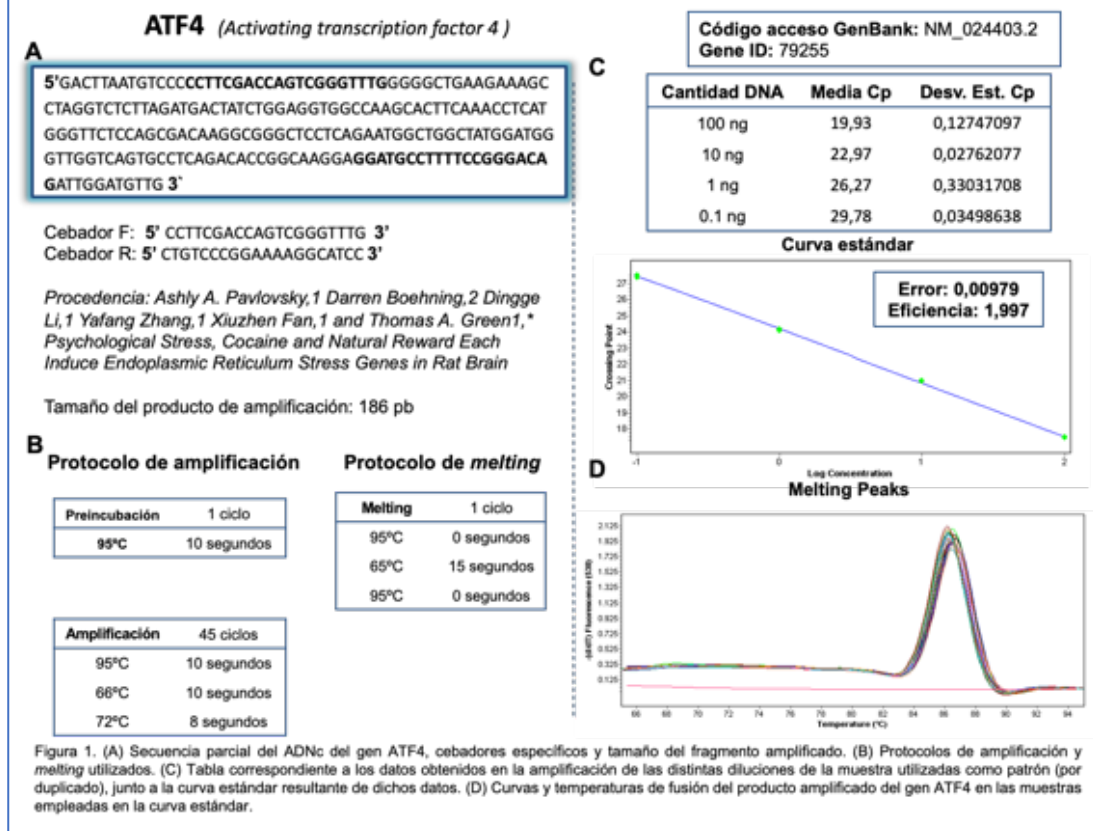
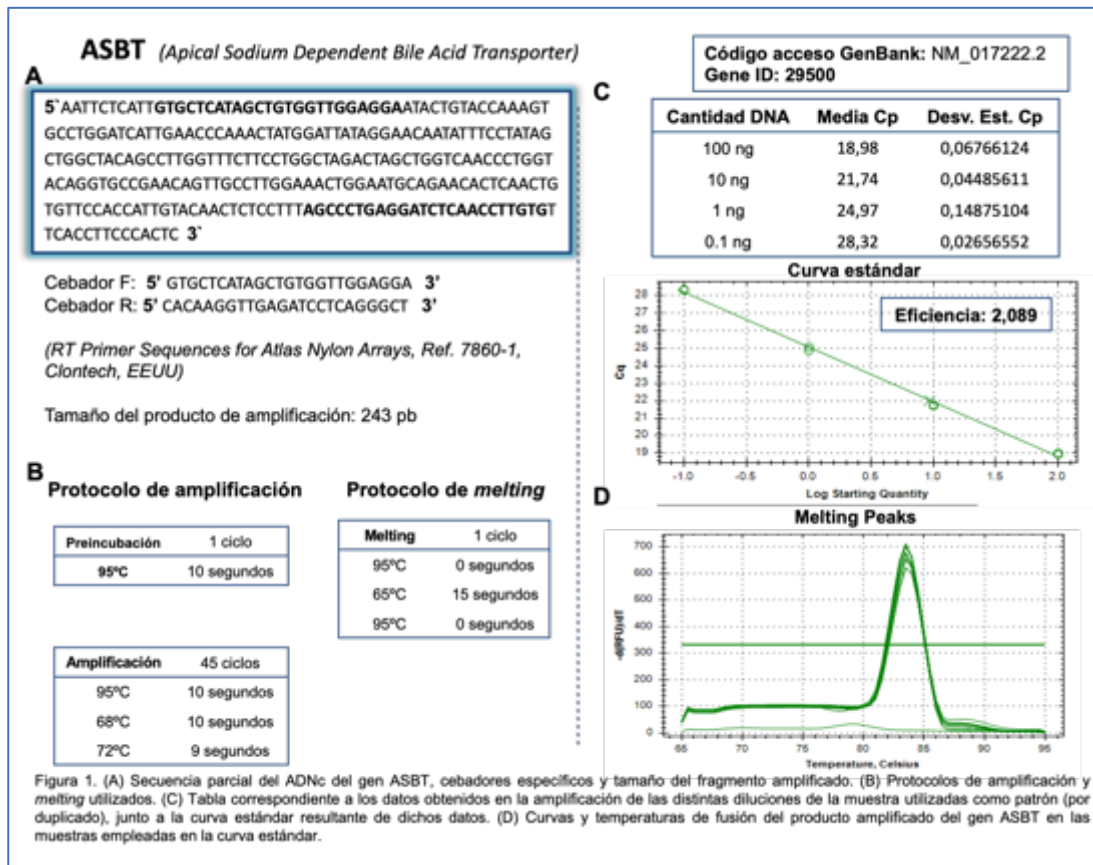
- Zhang, N. (2015). Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. *Anim Nutr*, 1(3), 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.09.002>
- Zhang, X., Yeung, D. C., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z. G., Liu, F., Xu, A. (2008). Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes*, 57(5), 1246-1253. <https://doi.org/10.2337/db07-1476>
- Zhang, Y. H., An, T., Zhang, R. C., Zhou, Q., Huang, Y., & Zhang, J. (2013). Very high fructose intake increases serum LDL-cholesterol and total cholesterol: a meta-analysis of controlled feeding trials. *J Nutr*, 143(9), 1391-1398. <https://doi.org/10.3945/jn.113.175323>
- Zhao, K., Li, H., Li, S., & Yang, G. (2014). Regulation of cystathionine gamma-lyase/H₂S system and its pathological implication. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 19, 1355-1369. <https://doi.org/10.2741/4286>
- Zhao, W., Ndisang, J. F., & Wang, R. (2003). Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues. *Can J Physiol Pharmacol*, 81(9), 848-853. <https://doi.org/10.1139/y03-077>
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., & Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *The EMBO journal*, 20(21), 6008-6016.
- Zheng, J., Zhang, Q., Mul, J. D., Yu, M., Xu, J., Qi, C., Xiao, X. (2016). Maternal high-calorie diet is associated with altered hepatic microRNA expression and impaired metabolic health in offspring at weaning age. *Endocrine*, 54(1), 70-80. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-0959-9>
- Zheng, Y. F., Dai, D. Z., & Dai, Y. (2010). NaHS ameliorates diabetic vascular injury by correcting depressed connexin 43 and 40 in the vasculature in streptozotocin-injected rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(5), 615-621.
- Zhou, H., & Hylemon, P. B. (2014). Bile acids are nutrient signaling hormones. *Steroids*, 86, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.04.016>
- Zhou, Y. T., Wang, Z. W., Higa, M., Newgard, C. B., & Unger, R. H. (1999). Reversing adipocyte differentiation: implications for treatment of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5), 2391-2395. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2391>
- Zinkhan, E. K., Yu, B., & Schlegel, A. (2018). Prenatal Exposure to a Maternal High Fat Diet Increases Hepatic Cholesterol Accumulation in Intrauterine Growth Restricted Rats in Part Through MicroRNA-122 Inhibition of Cyp7a1. *Front Physiol*, 9, 645. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00645>
- Zou, W., Yuan, J., Tang, Z. J., Wei, H. J., Zhu, W. W., Zhang, P., Tang, X. Q. (2017). Hydrogen sulfide ameliorates cognitive dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: involving suppression in hippocampal endoplasmic reticulum stress. *Oncotarget*, 8(38), 64203-64216. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19448>
- Školníková, E., Šedová, L., & Šeda, O. (2020). Grandmother's Diet Matters: Early Life Programming with Sucrose Influences Metabolic and Lipid Parameters in Second Generation of Rats. *Nutrients*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/nu12030846>
- Word Health Organization (WHO). (2015) Guideline: Sugars Intake for Adults and Children. Geneva
- Word Health Organization (WHO). (2017). Noncommunicable Diseases Progress Monitor 2017. Geneva
- Word Health Organization (WHO). (2018a). Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI) Factsheet. Highlights 2015–17. *Testo disponibile al sito: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0006/372426/WH14_COSI_factsheets_v2.pdf (16/03/2019).*
- Word Health Organization (WHO). (2018b). Noncommunicable diseases country profiles 2018.

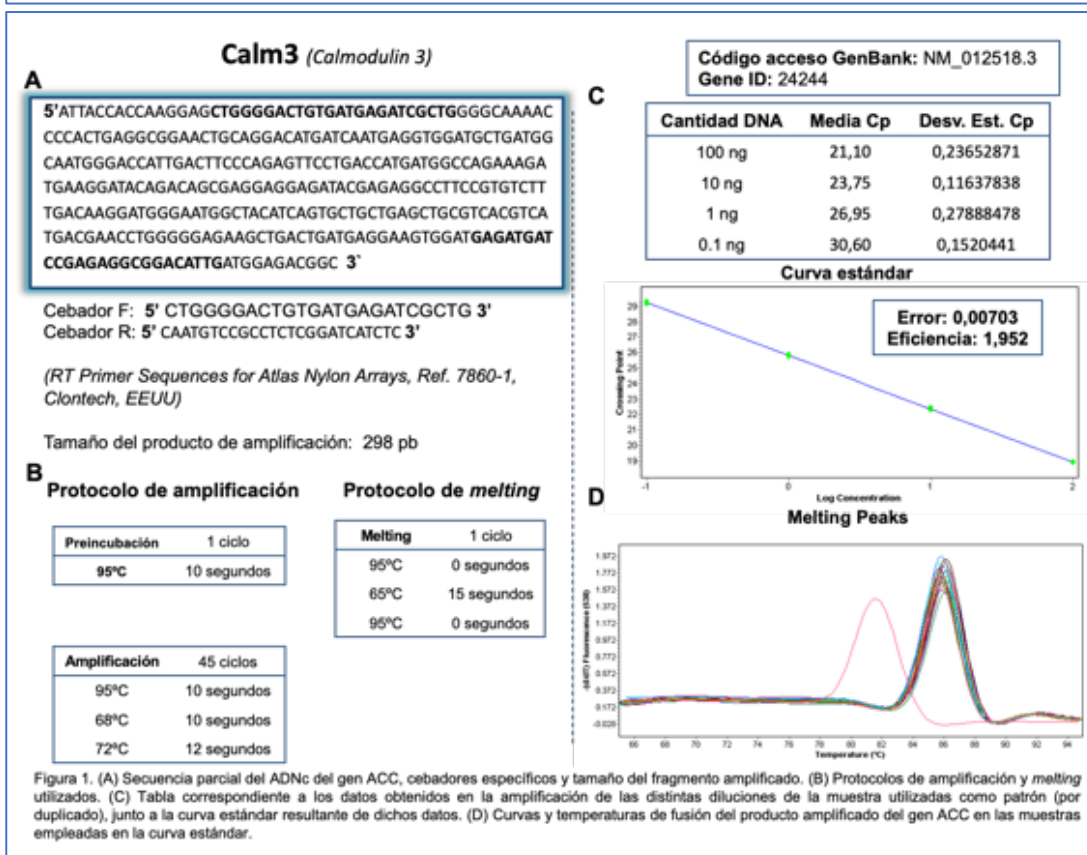
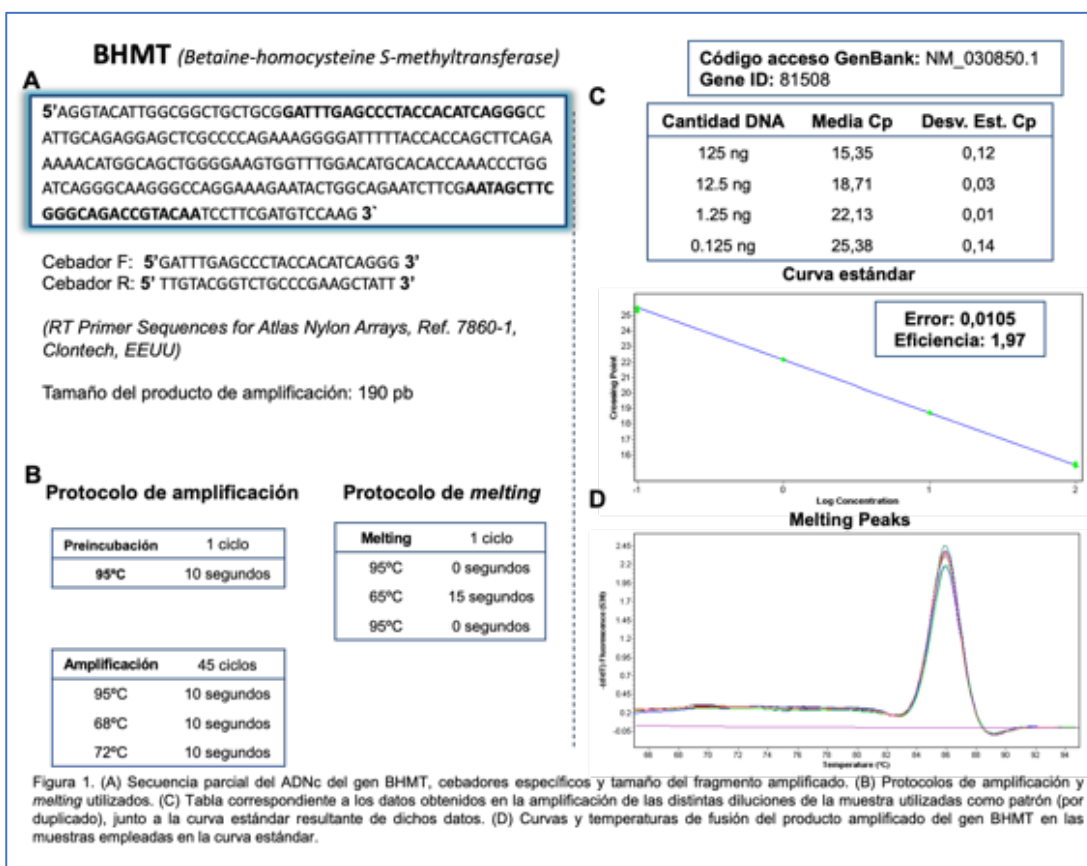
Anexo 1: Lista de cebadores

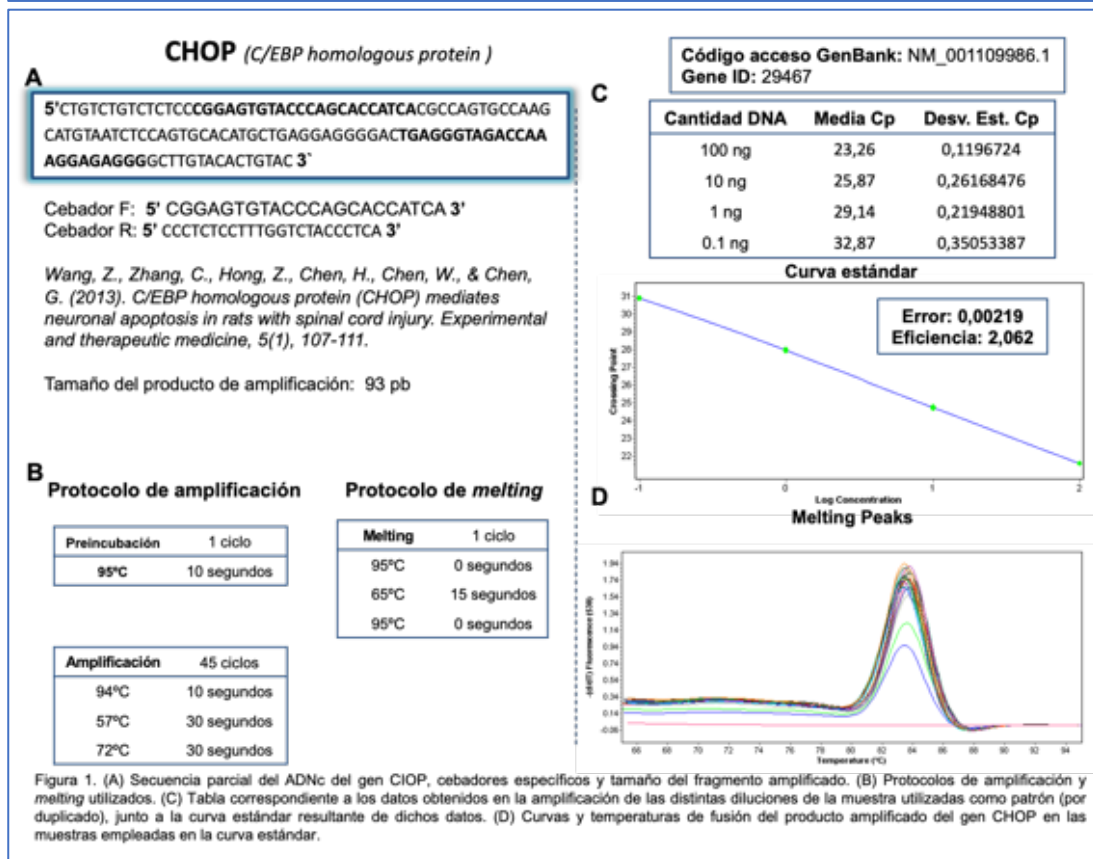
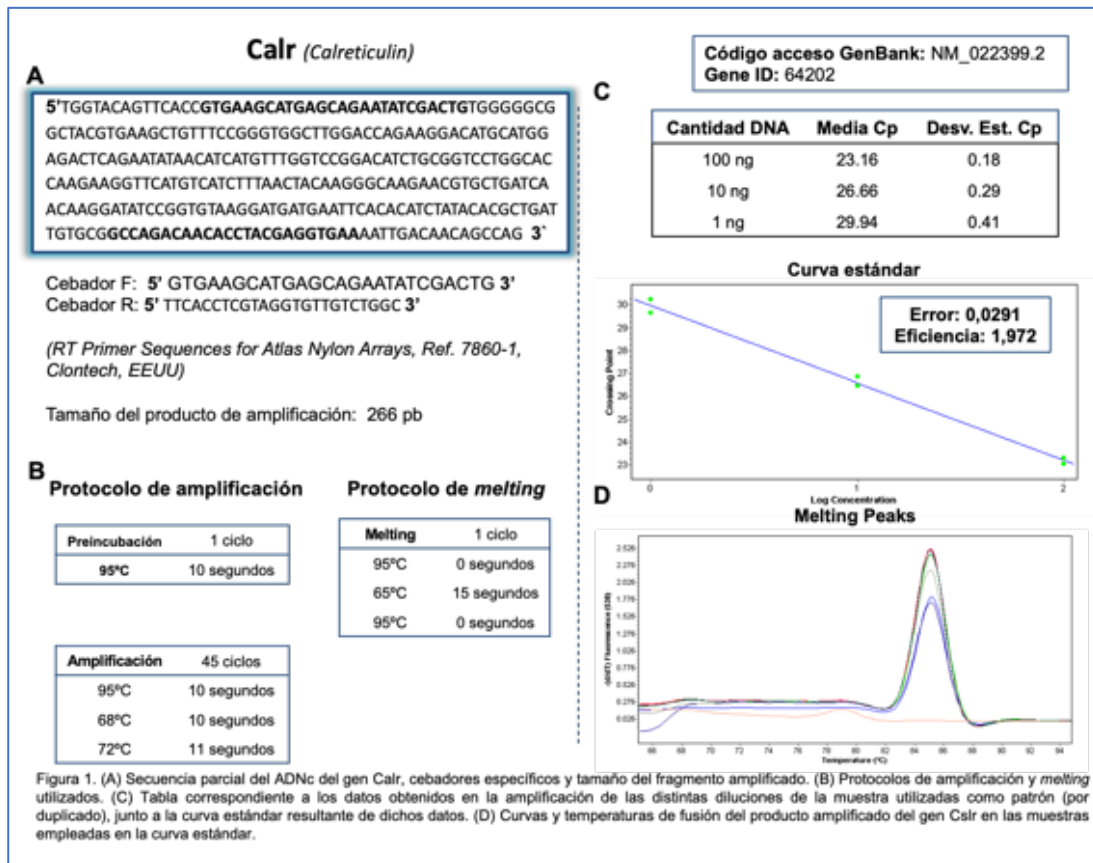












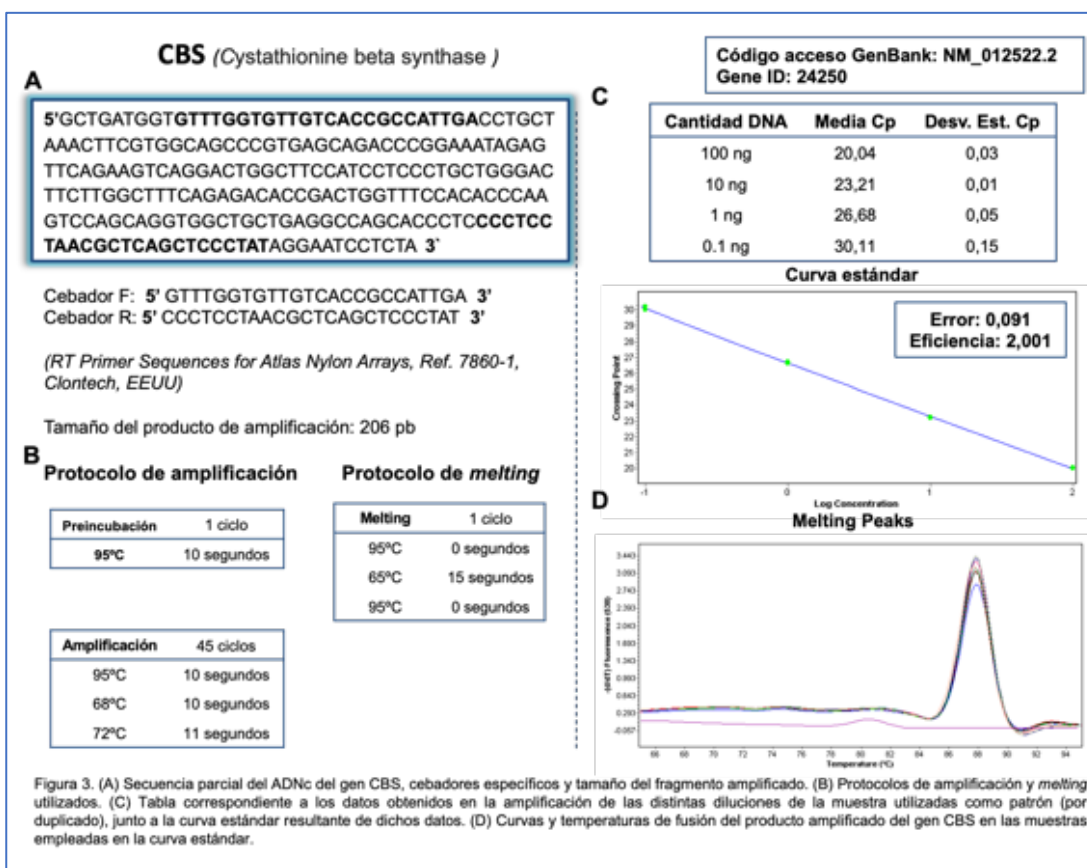


Figura 3. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen CBS, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen CBS en las muestras empleadas en la curva estándar.

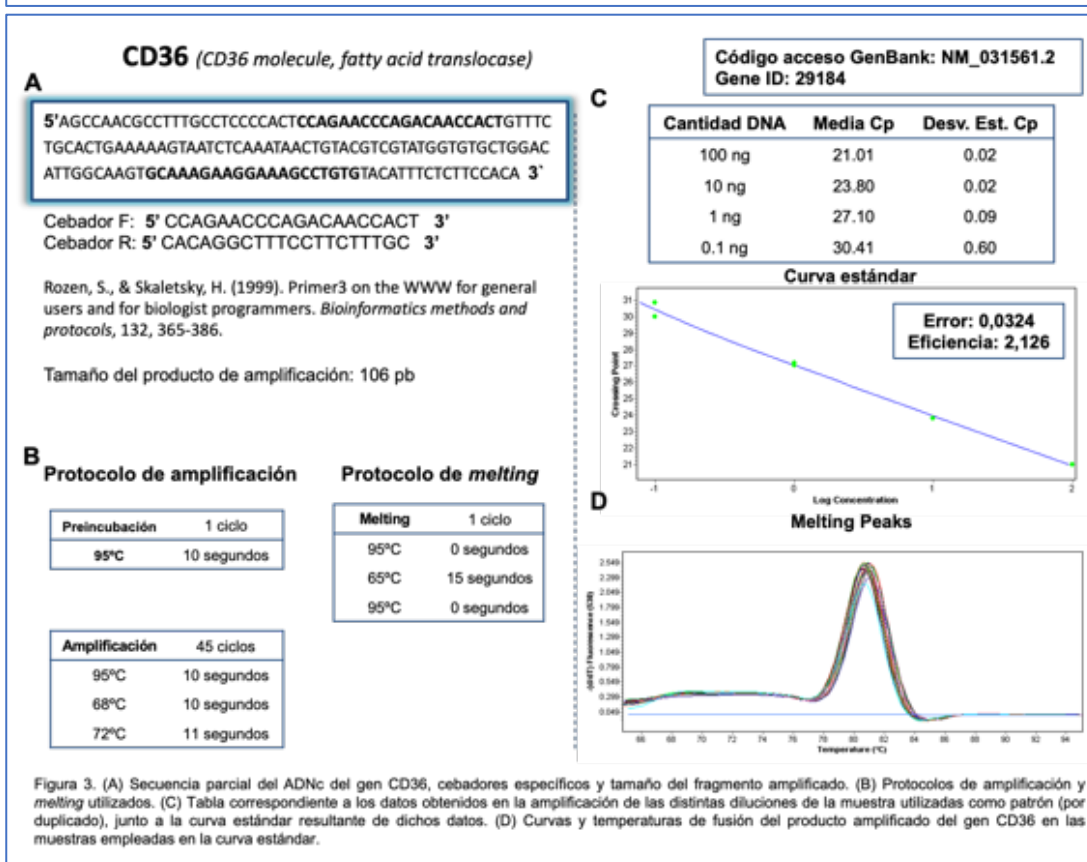
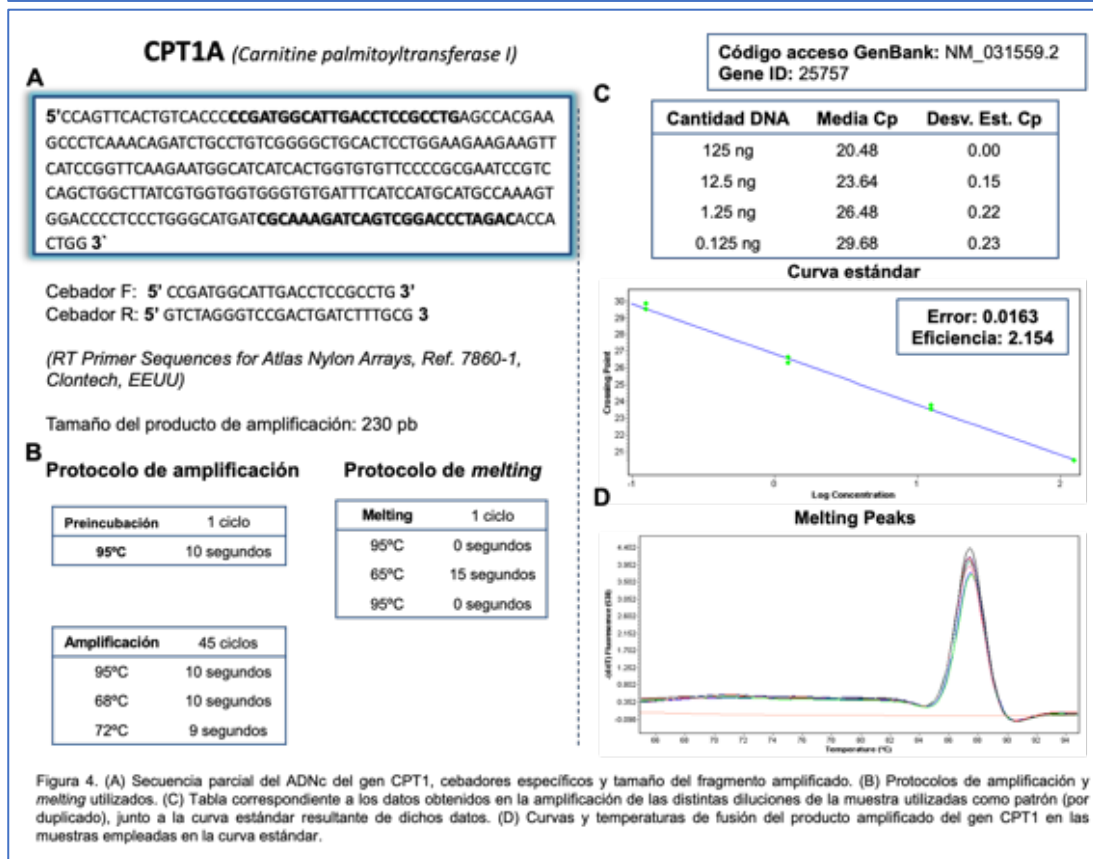
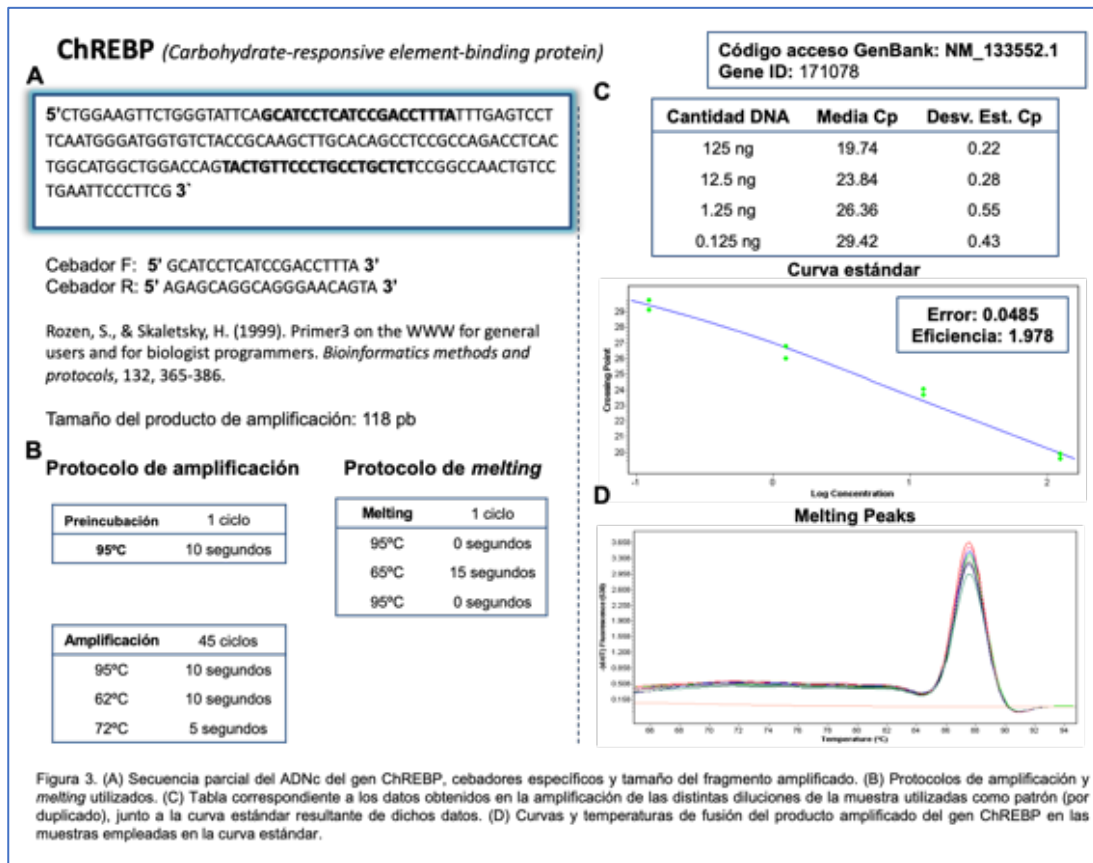
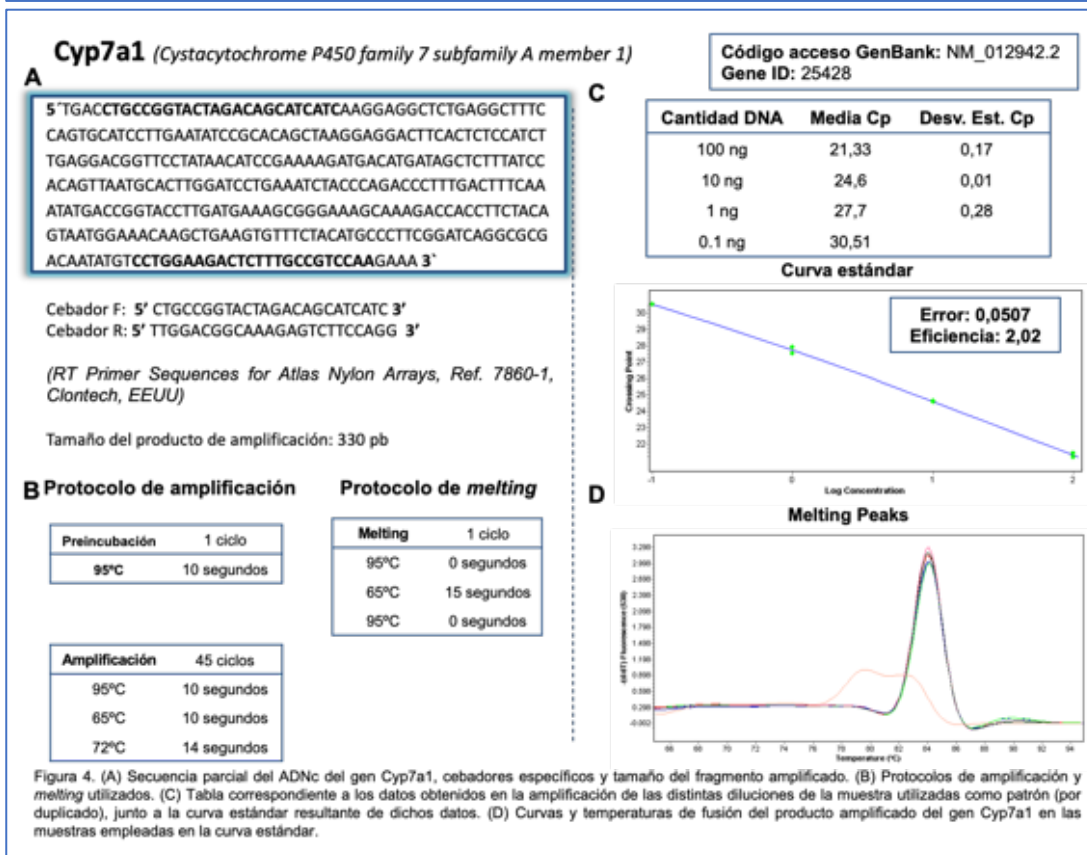
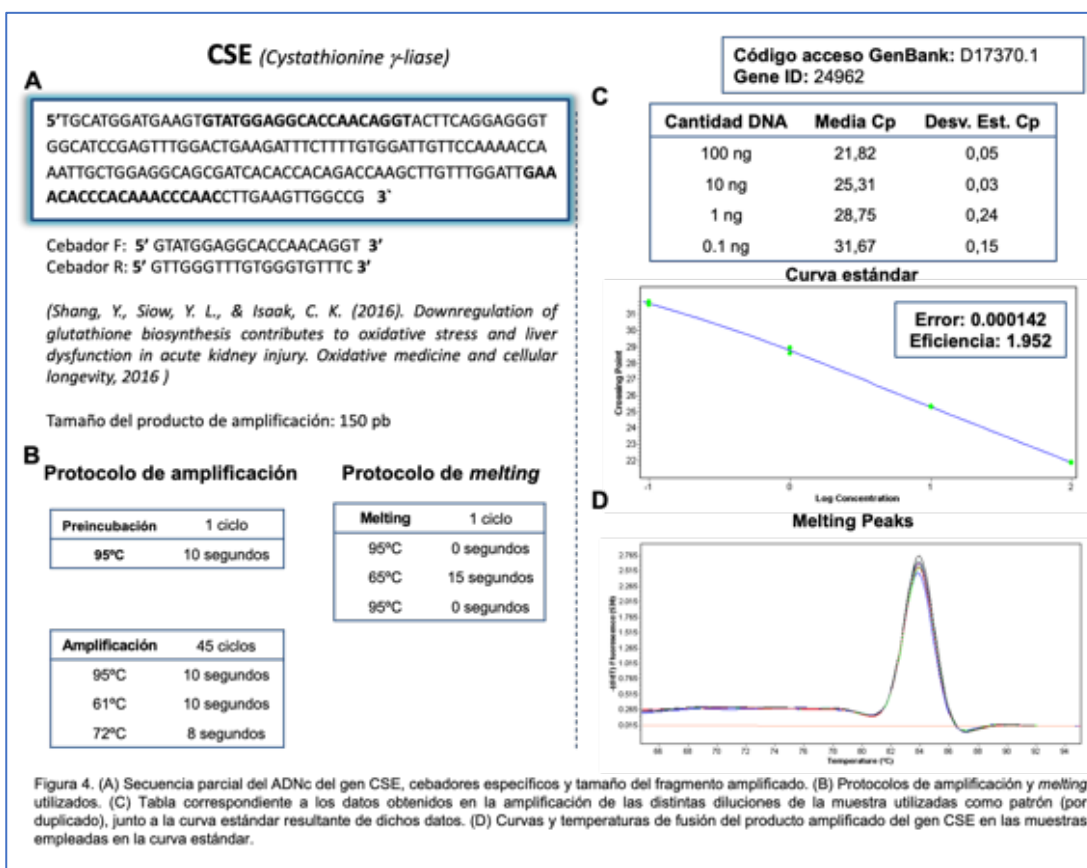
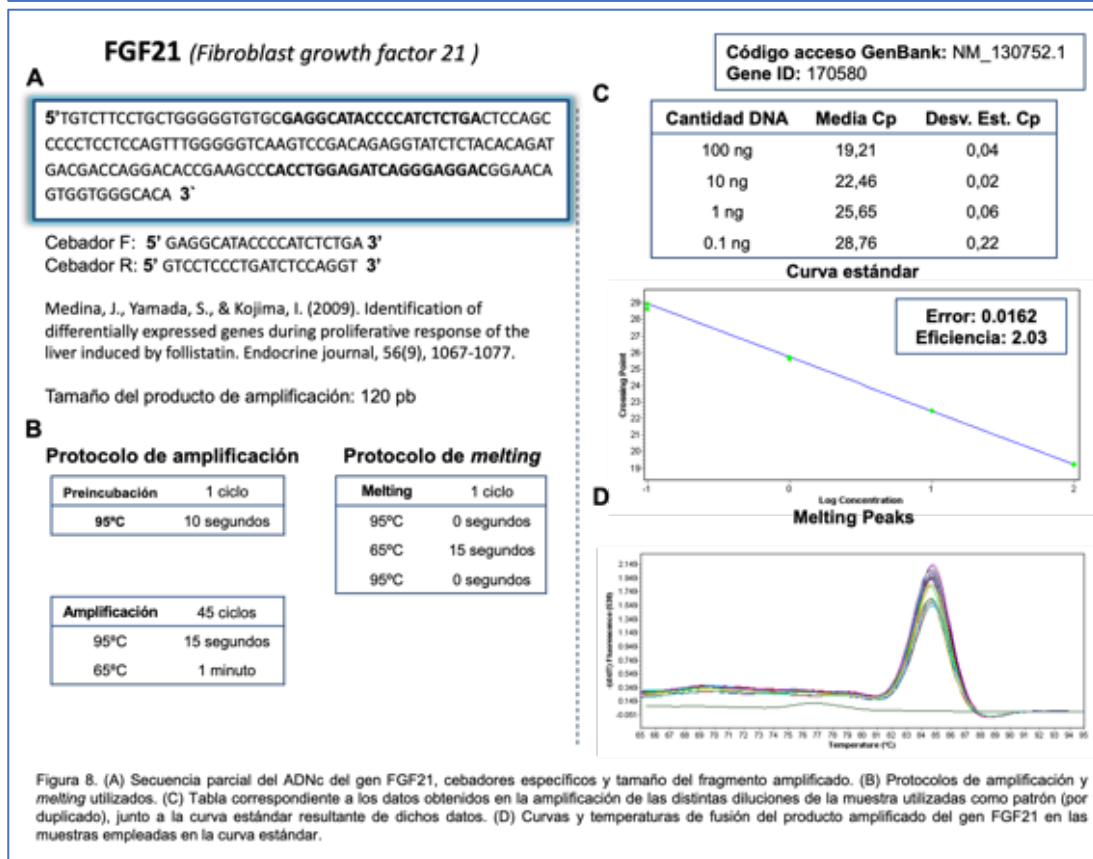
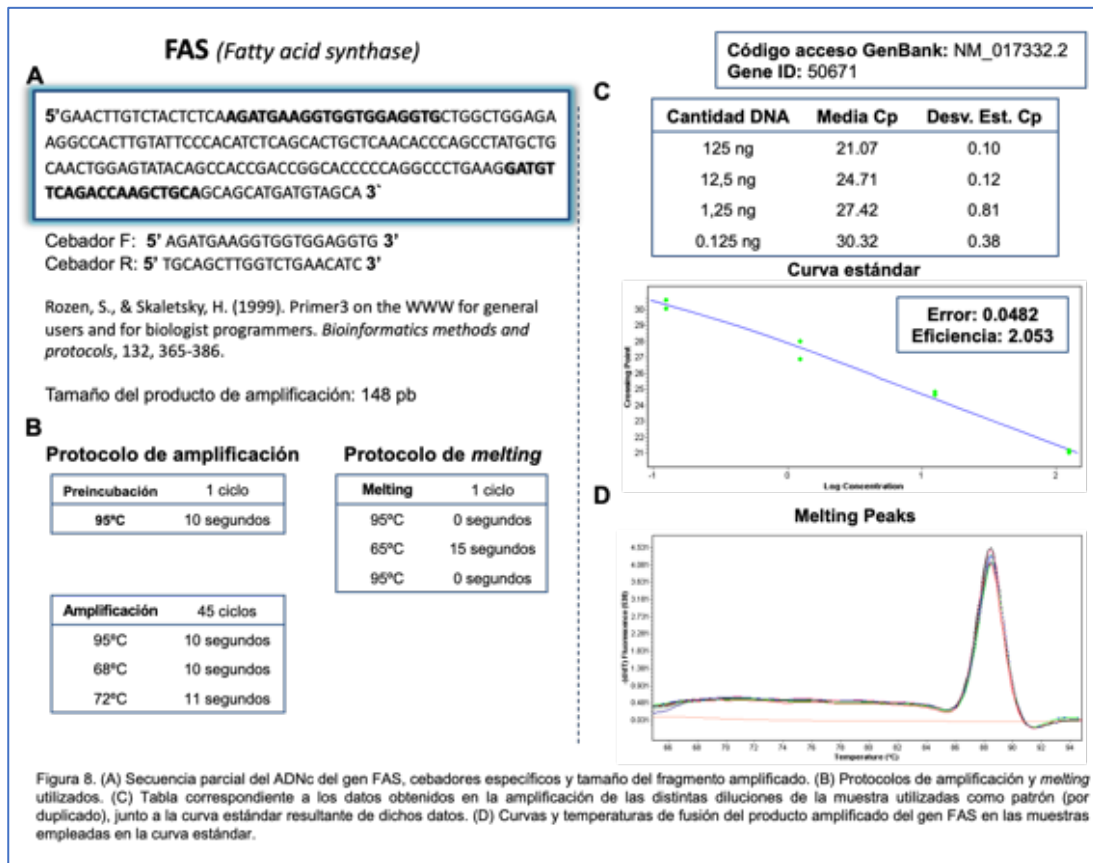


Figura 3. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen CD36, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen CD36 en las muestras empleadas en la curva estándar.







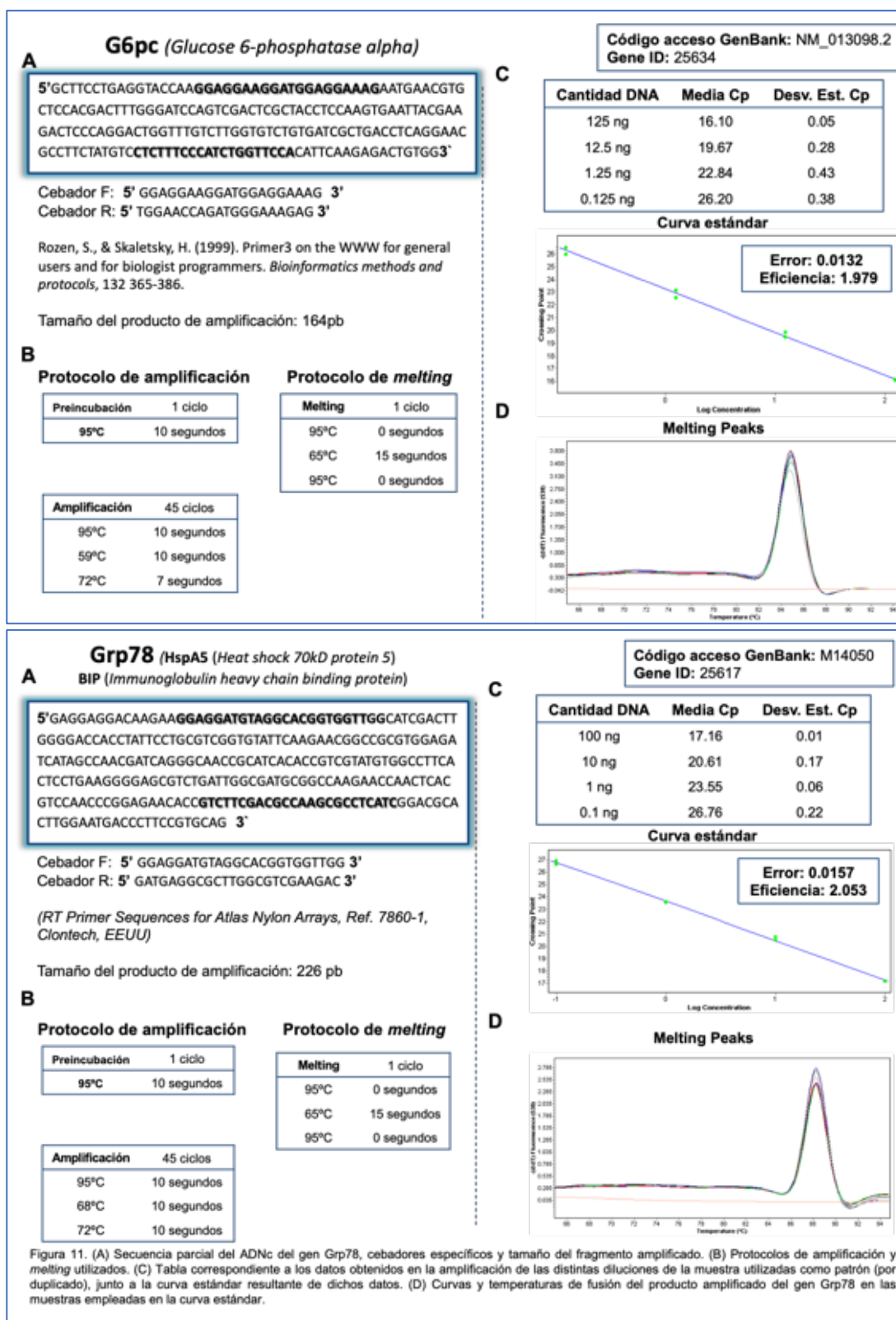


Figura 11. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen Grp78, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen Grp78 en las muestras empleadas en la curva estándar.

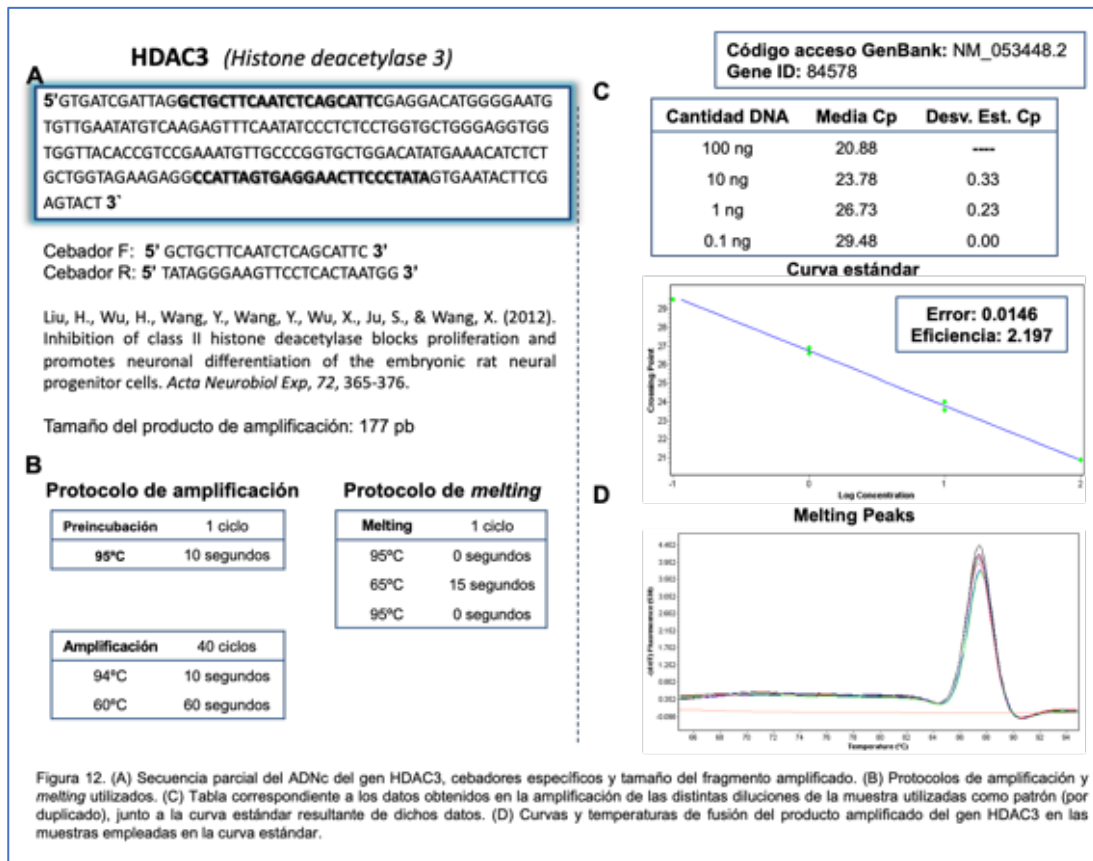


Figura 12. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen HDAC3, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen HDAC3 en las muestras empleadas en la curva estándar.

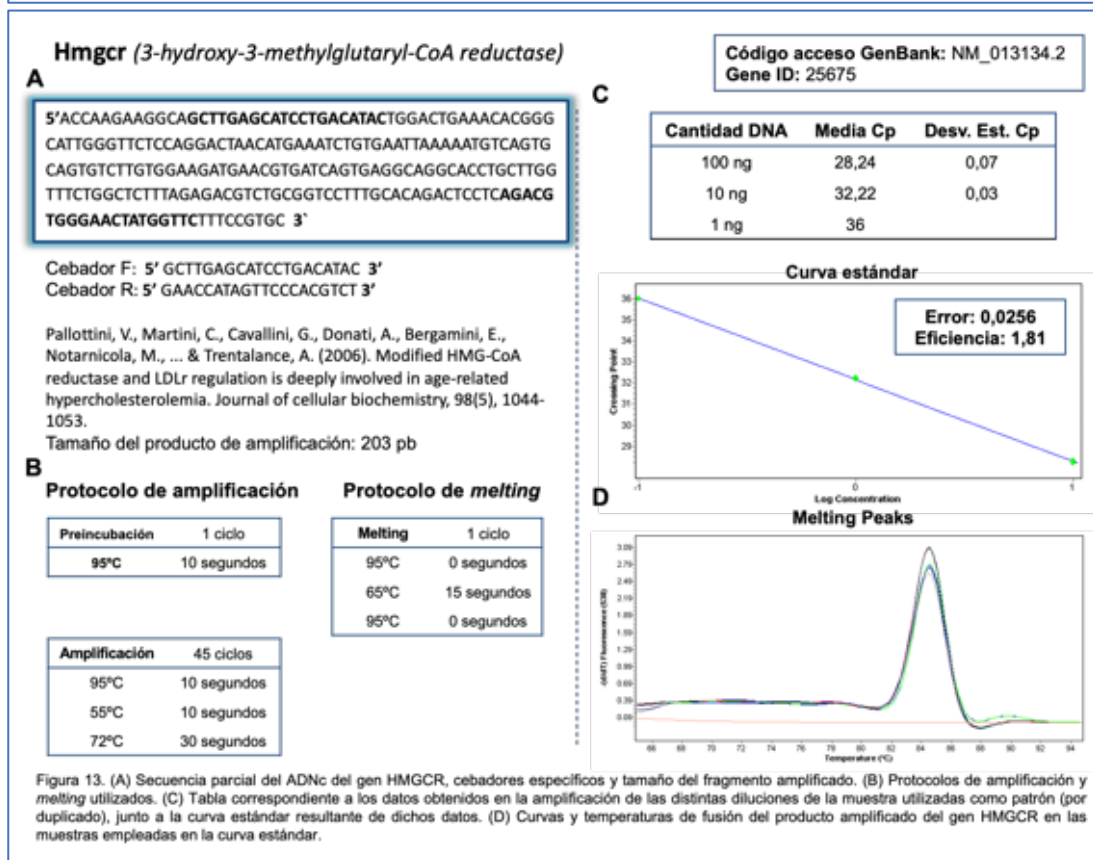


Figura 13. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen HMGCR, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen HMGCR en las muestras empleadas en la curva estándar.

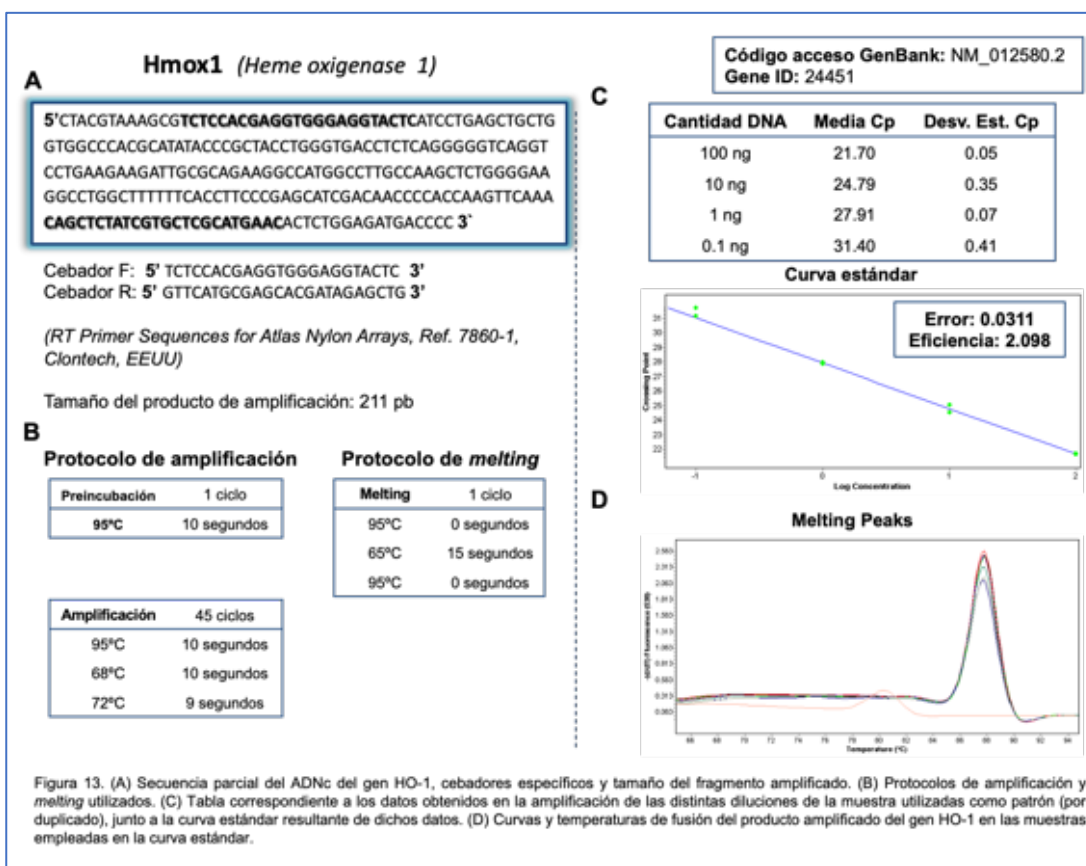


Figura 13. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen HO-1, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen HO-1 en las muestras empleadas en la curva estándar.

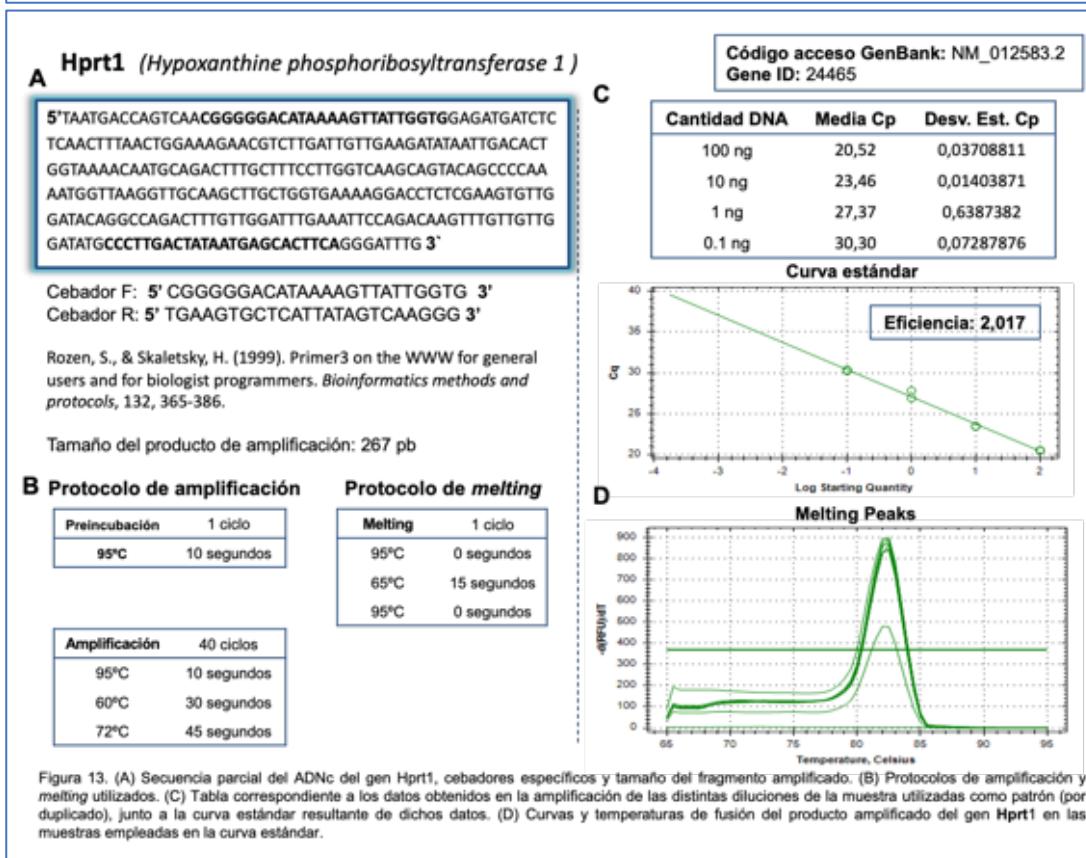
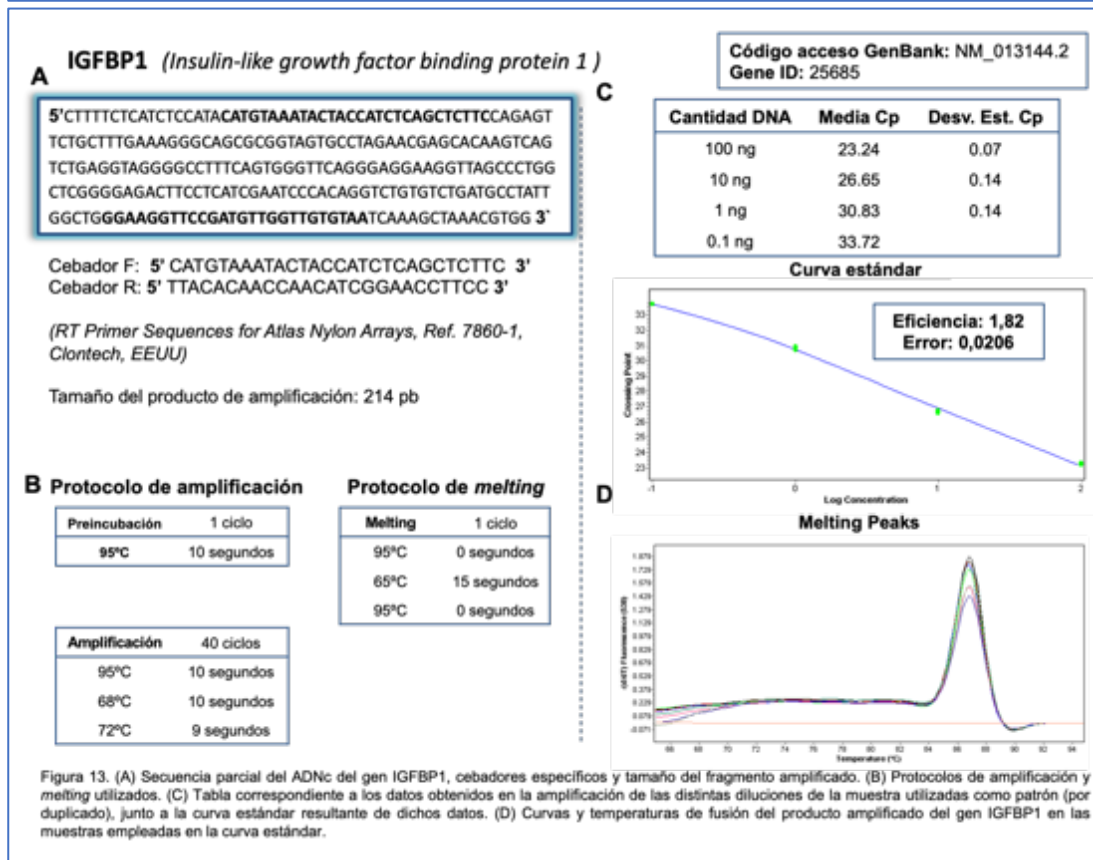
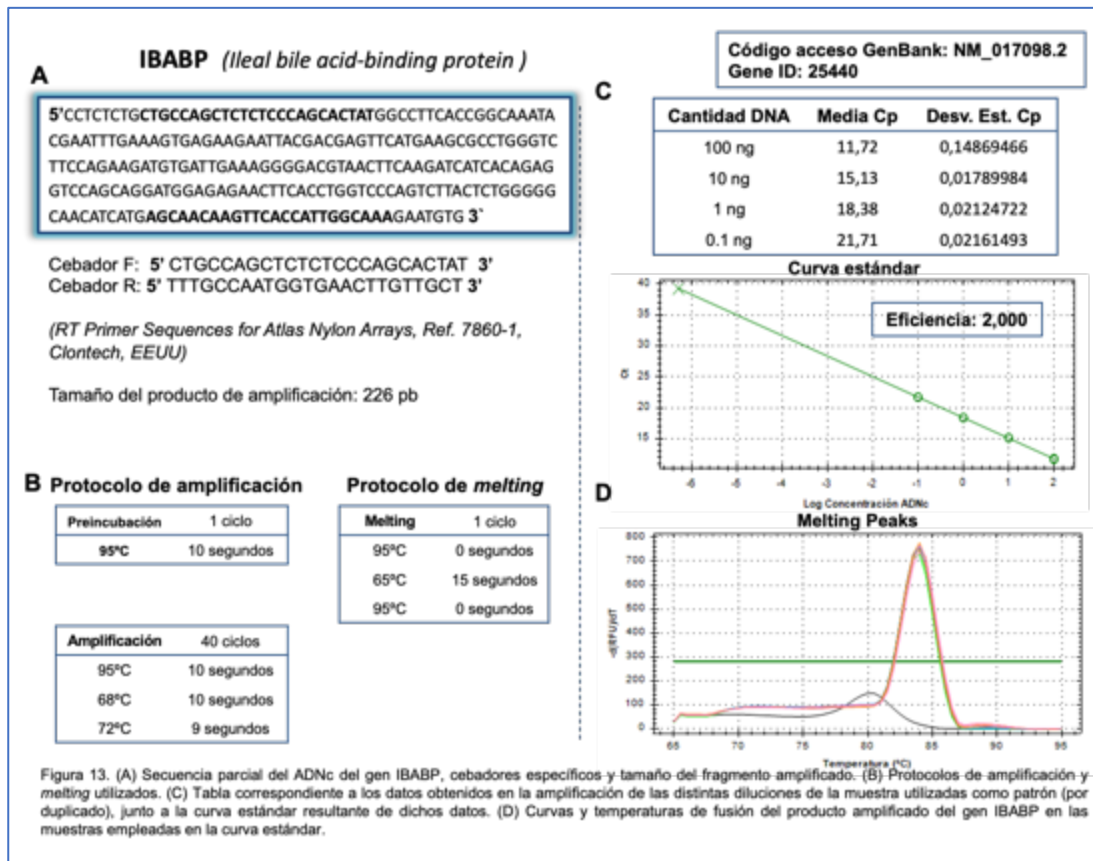


Figura 13. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen Hprt1, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen Hprt1 en las muestras empleadas en la curva estándar.



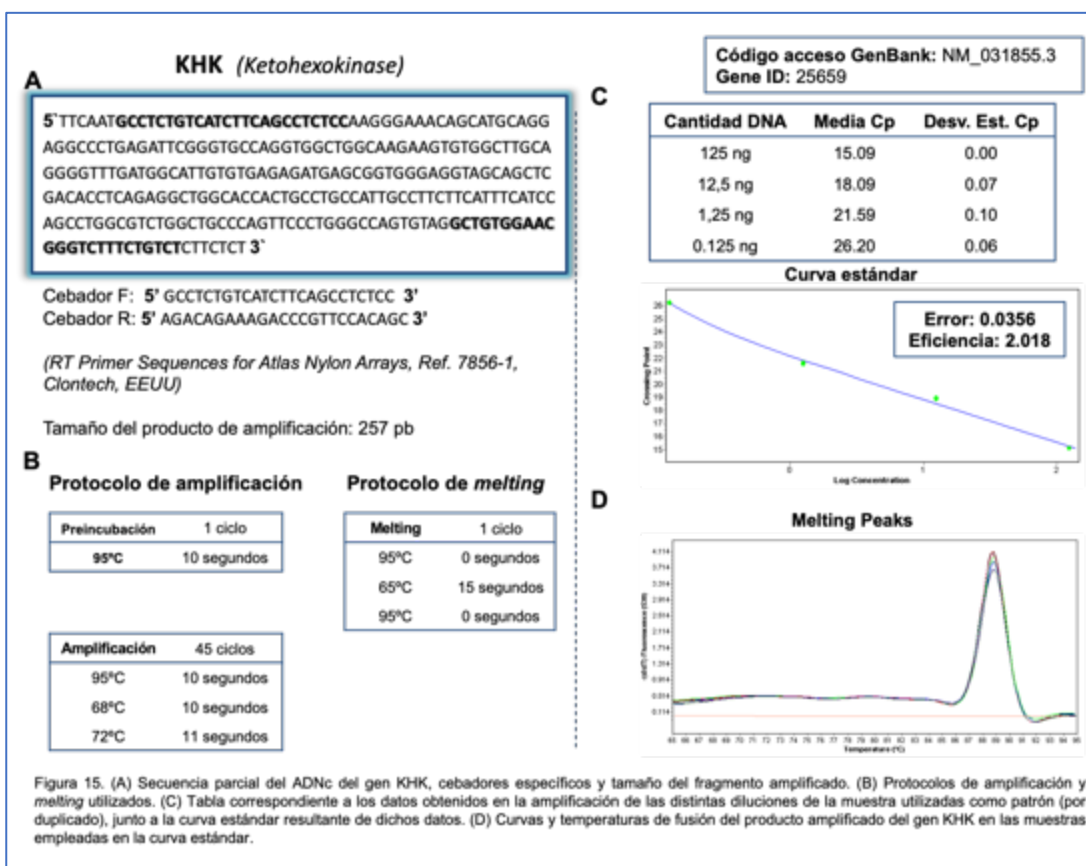


Figura 15. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen KHK, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen KHK en las muestras empleadas en la curva estándar.

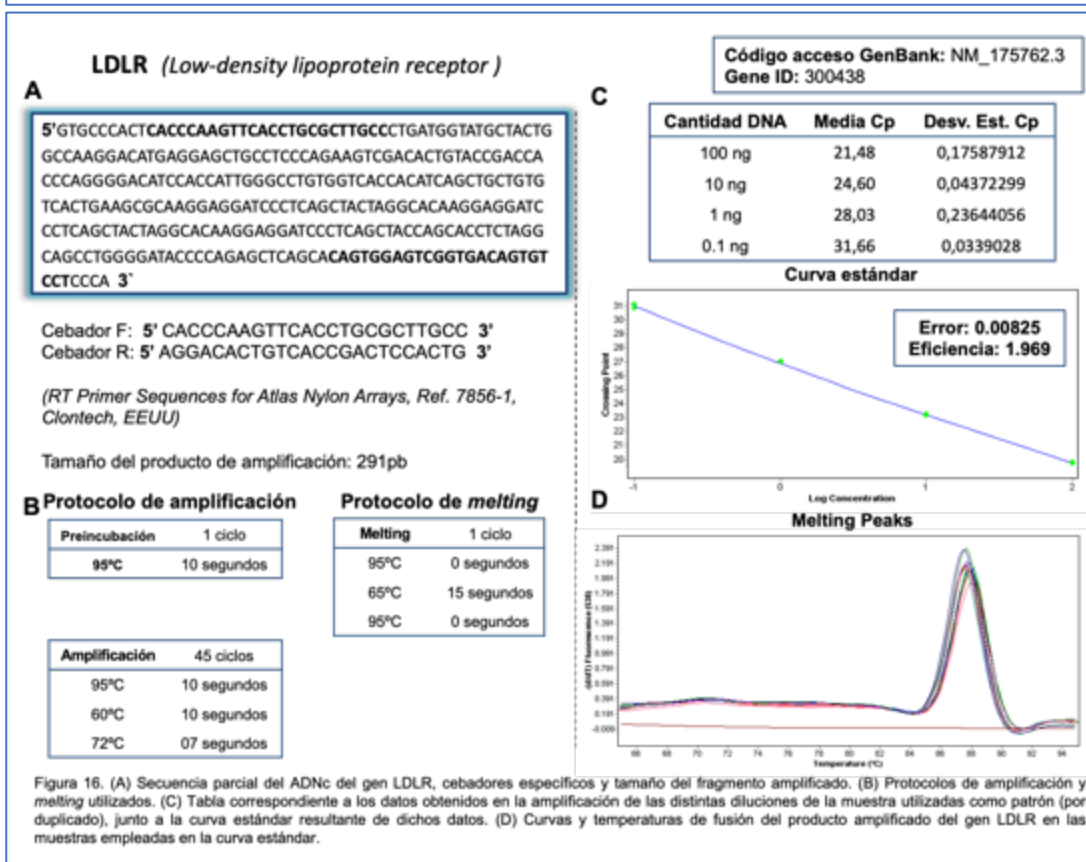


Figura 16. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen LDLR, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen LDLR en las muestras empleadas en la curva estándar.

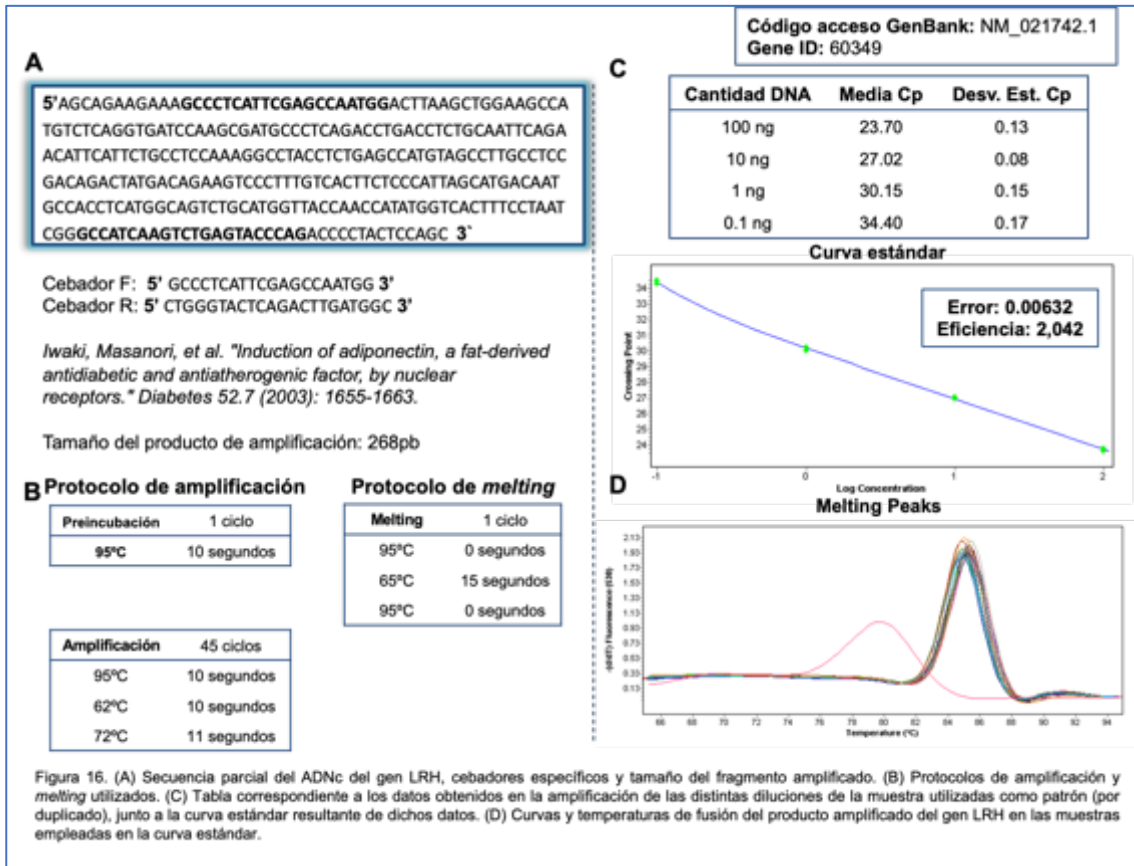


Figura 16. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen LRH, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen LRH en las muestras empleadas en la curva estándar.

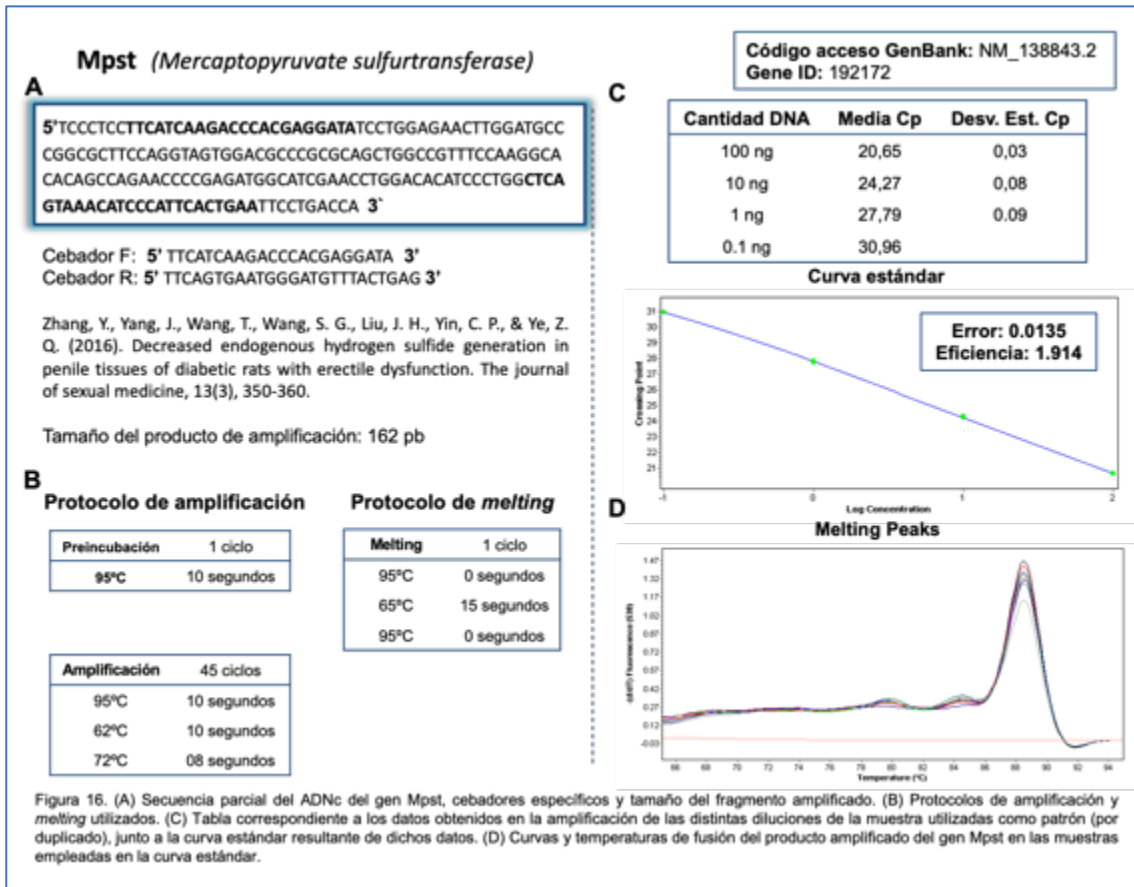
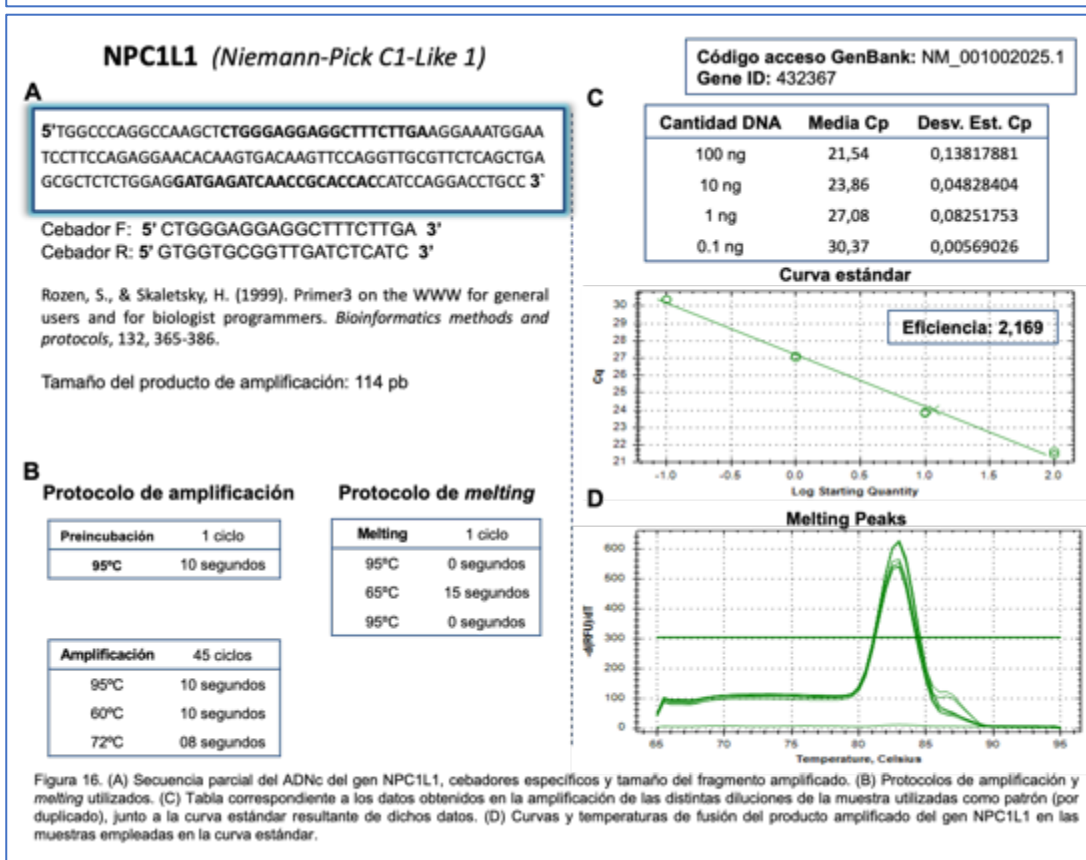
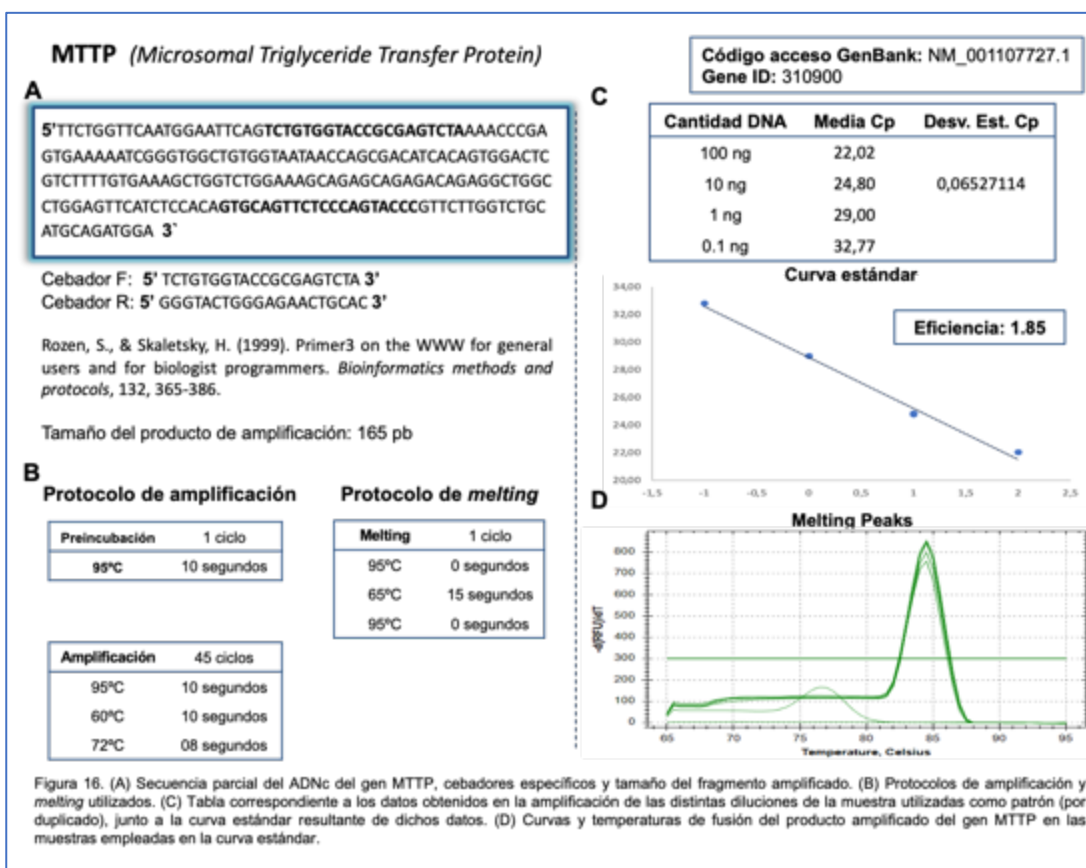


Figura 16. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen Mpst, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen Mpst en las muestras empleadas en la curva estándar.



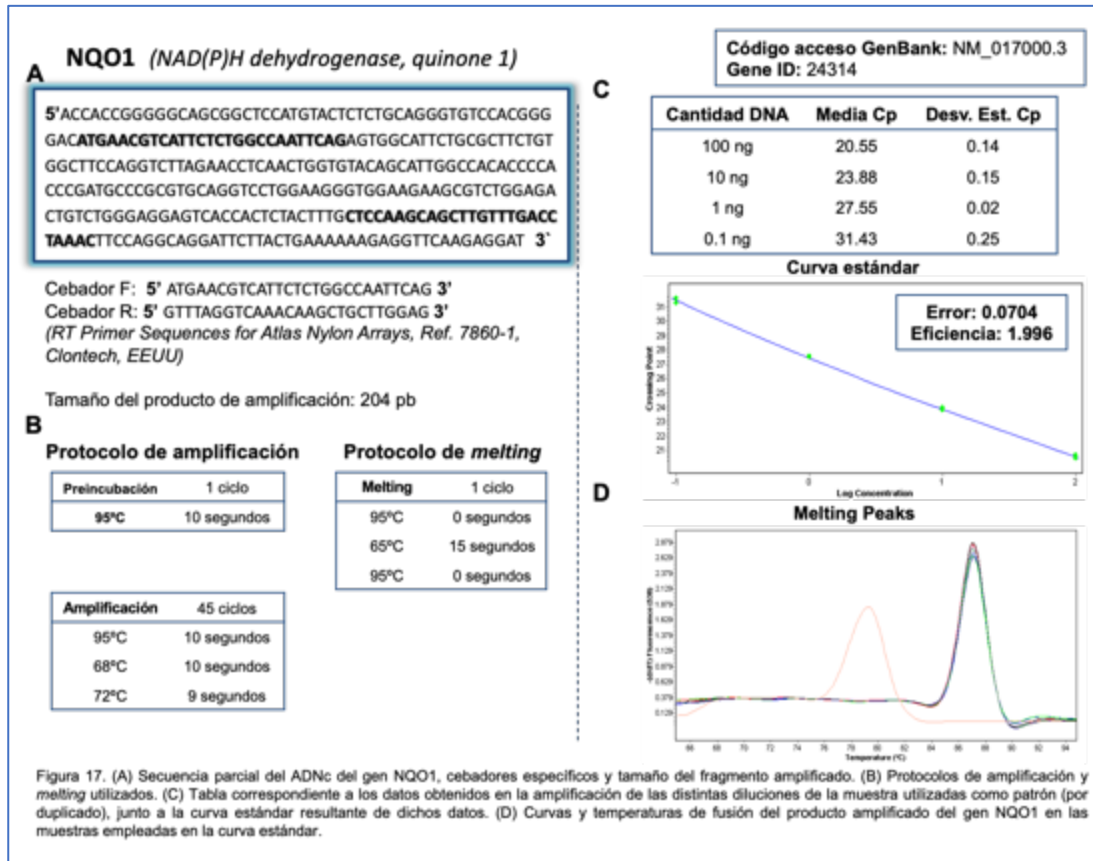


Figura 17. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen NQO1, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen NQO1 en las muestras empleadas en la curva estándar.

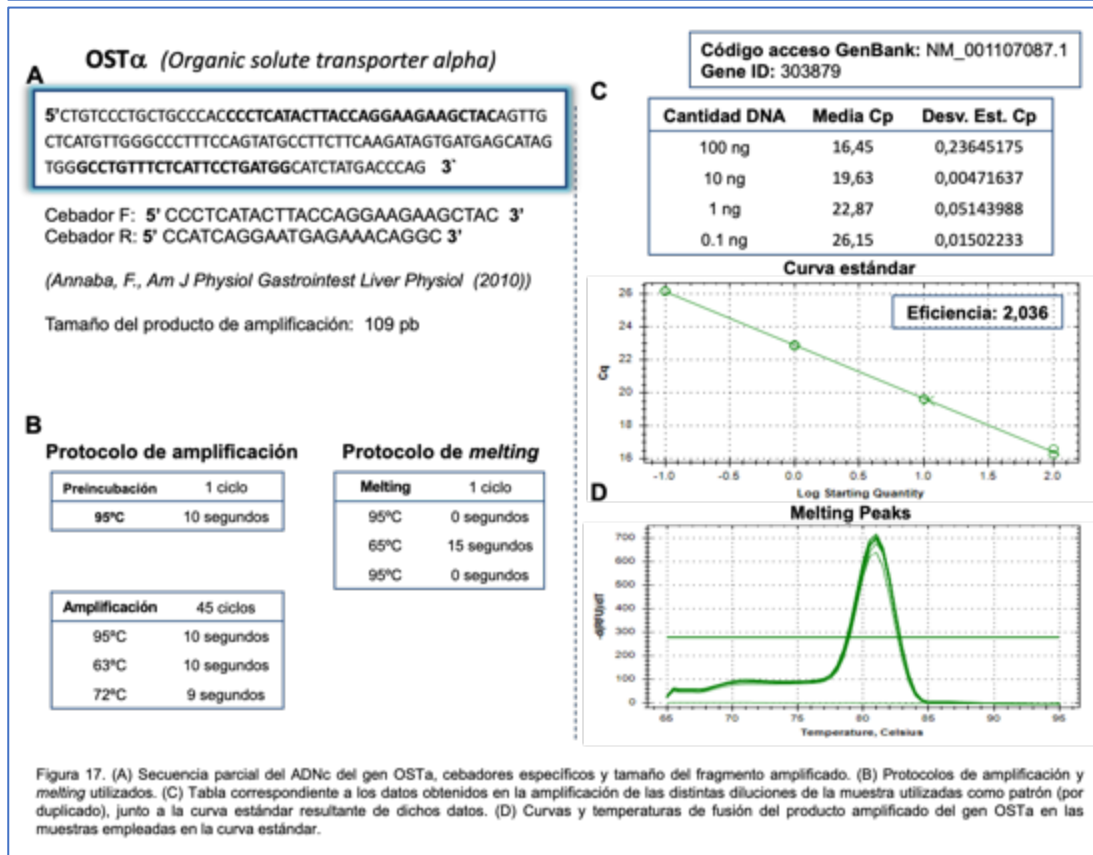
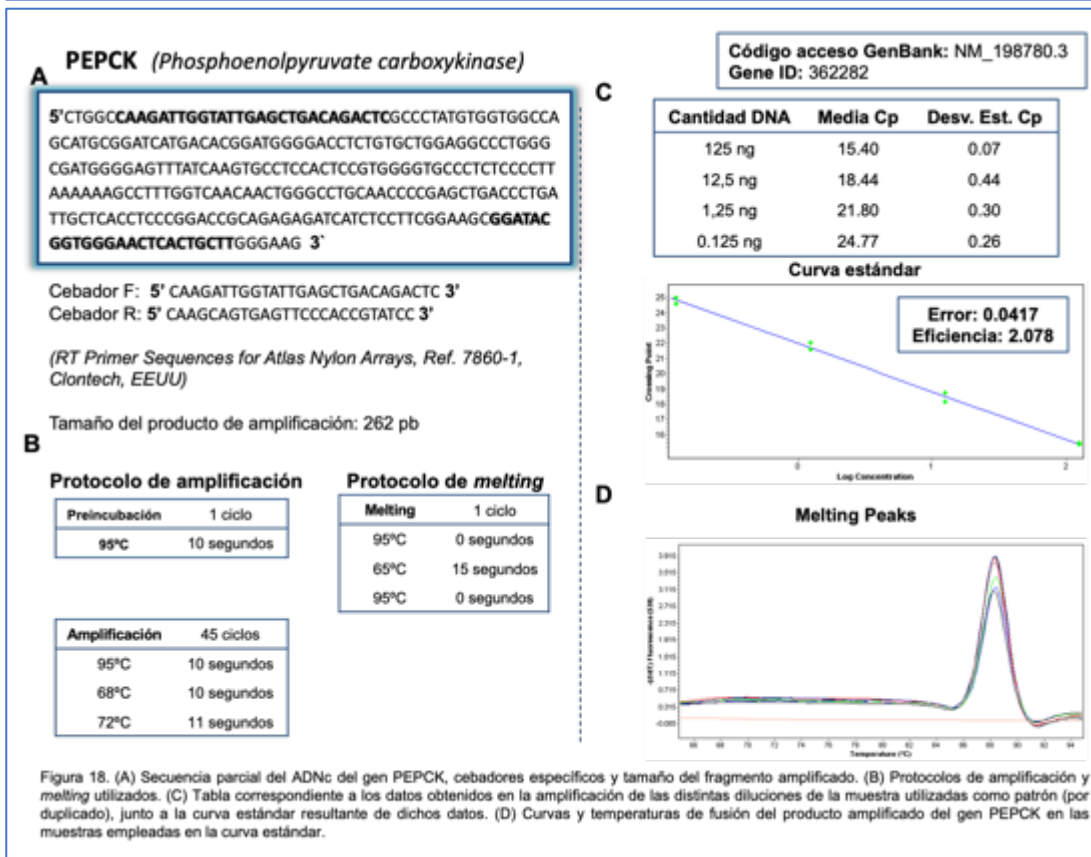
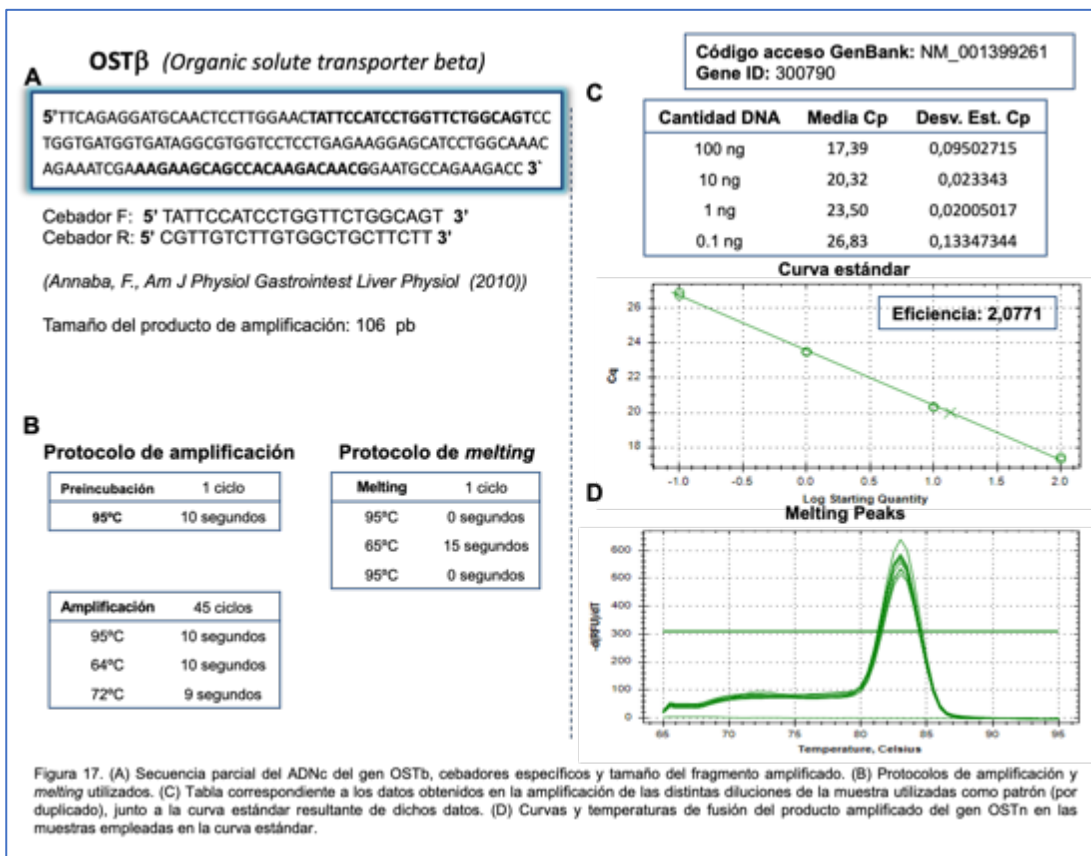


Figura 17. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen OST α , cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen OST α en las muestras empleadas en la curva estándar.



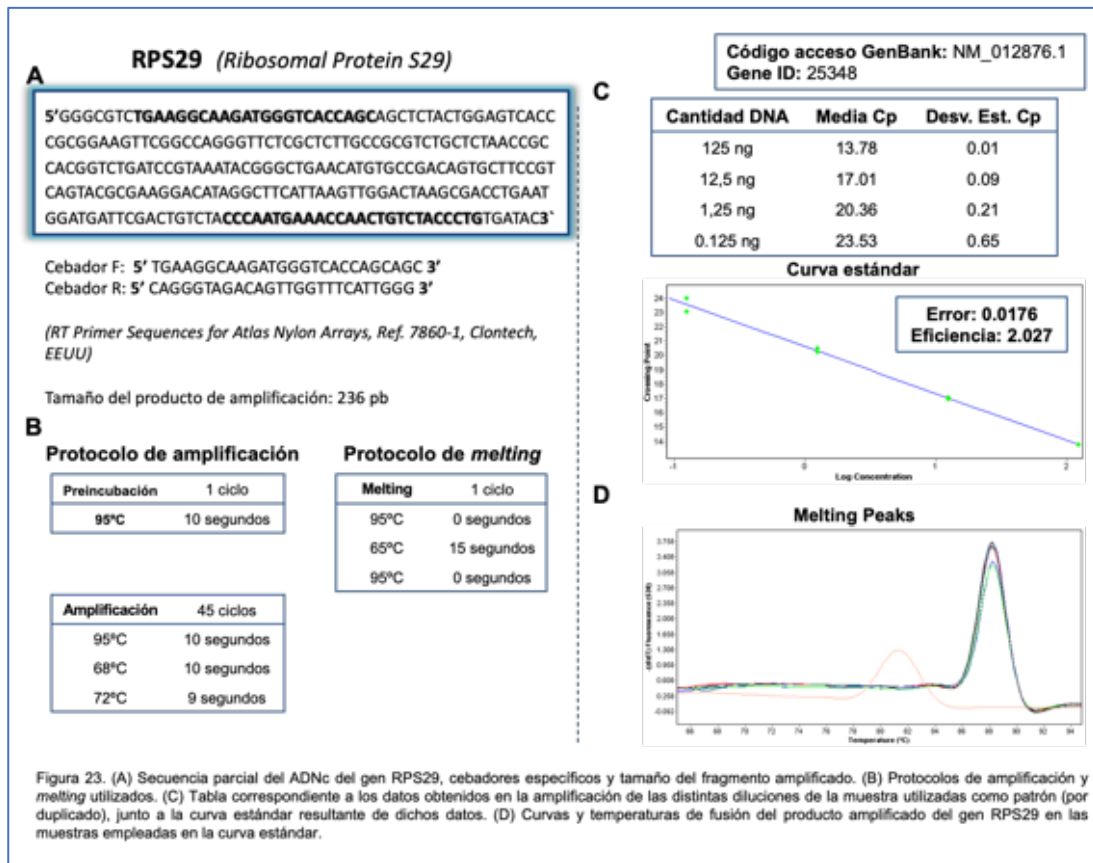


Figura 23. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen RPS29, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen RPS29 en las muestras empleadas en la curva estándar.

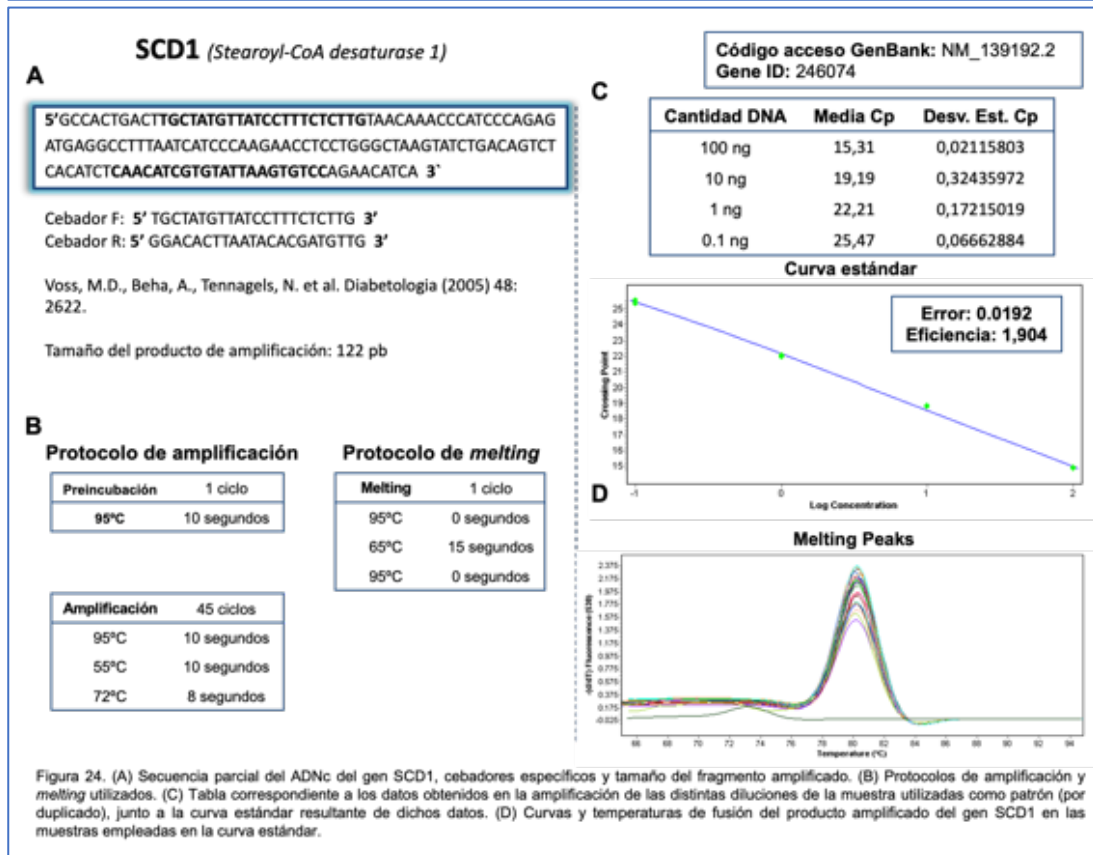


Figura 24. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen SCD1, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen SCD1 en las muestras empleadas en la curva estándar.

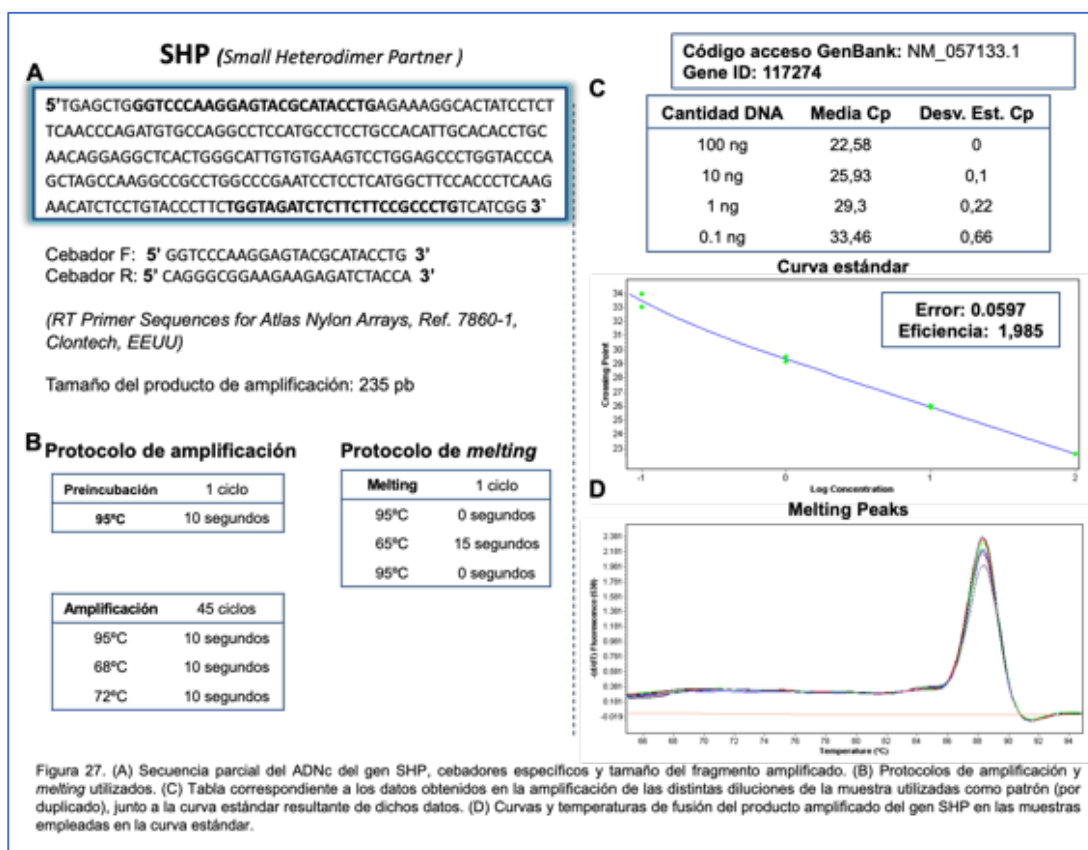


Figura 27. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen SHP, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen SHP en las muestras empleadas en la curva estándar.

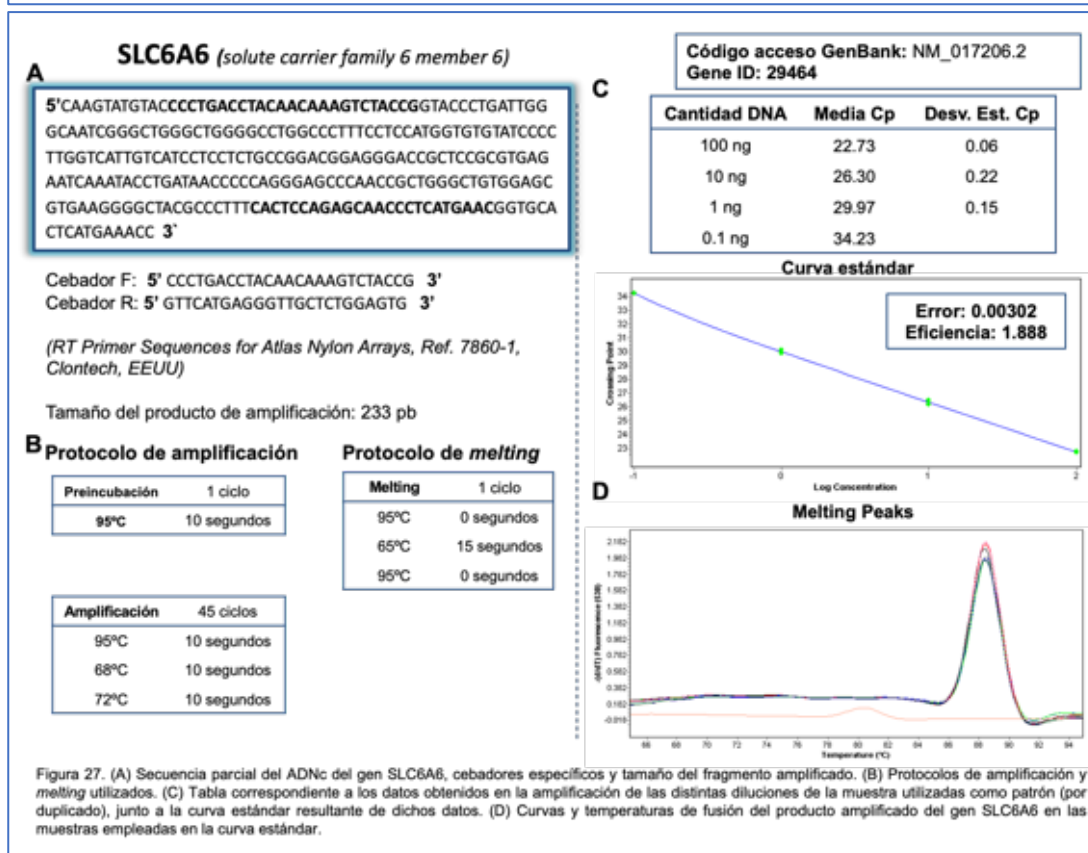


Figura 27. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen SLC6A6, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen SLC6A6 en las muestras empleadas en la curva estándar.

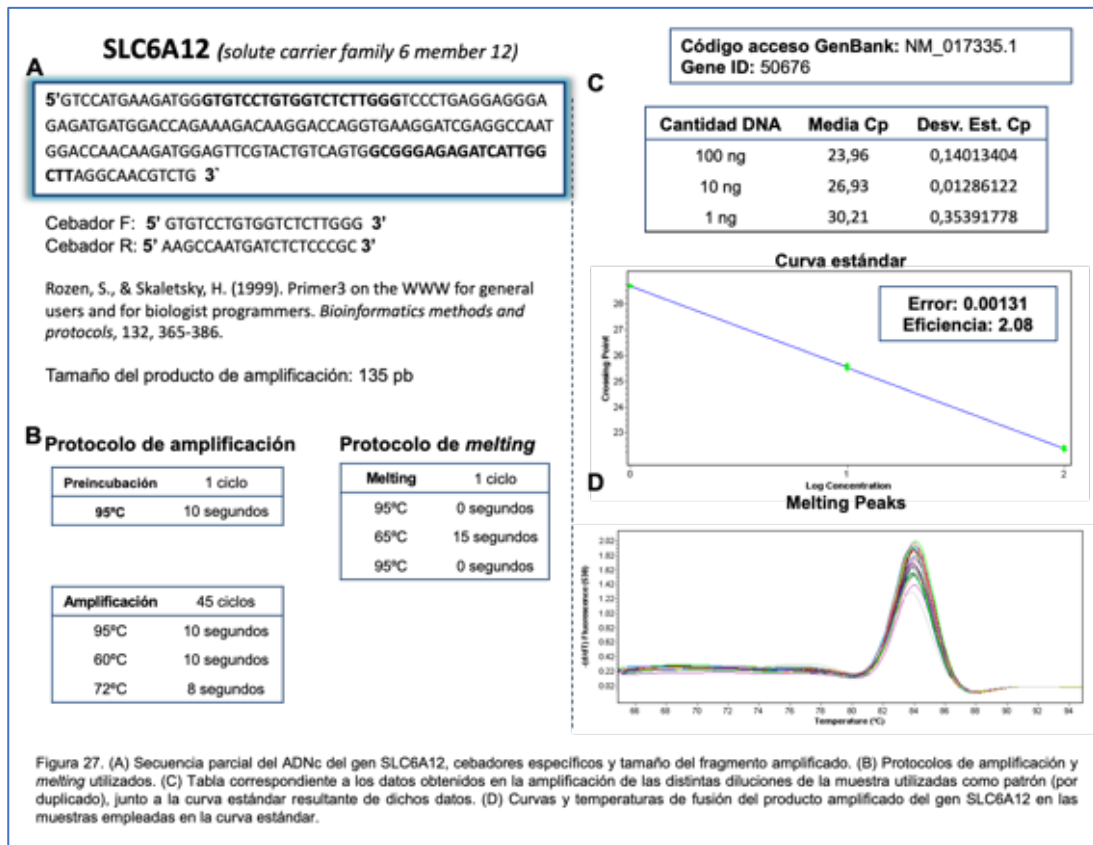


Figura 27. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen SLC6A12, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen SLC6A12 en las muestras empleadas en la curva estándar.

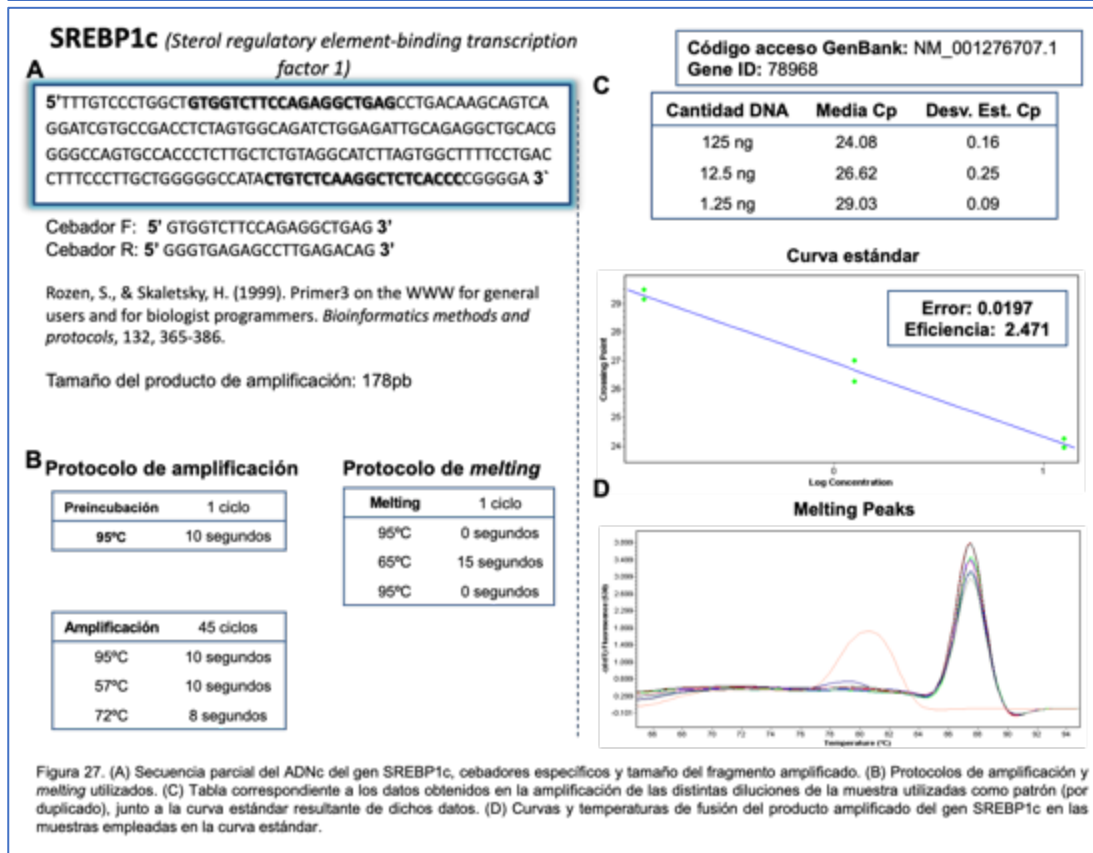
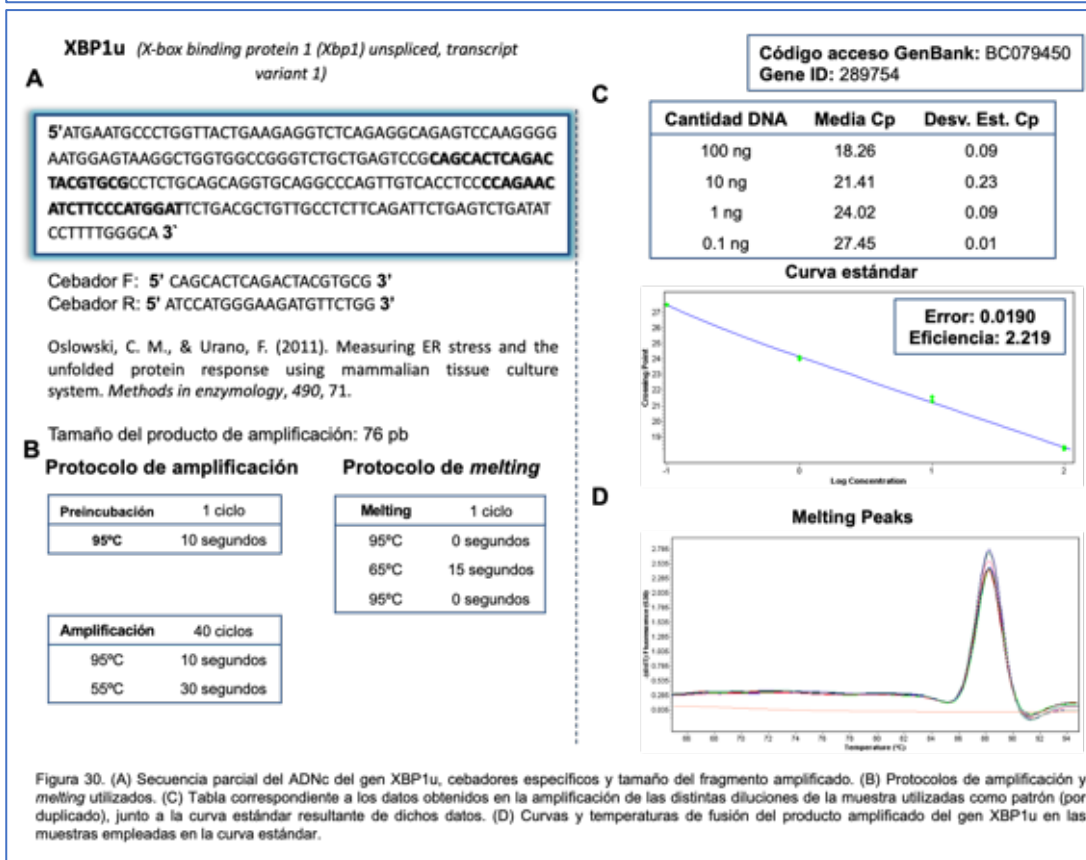
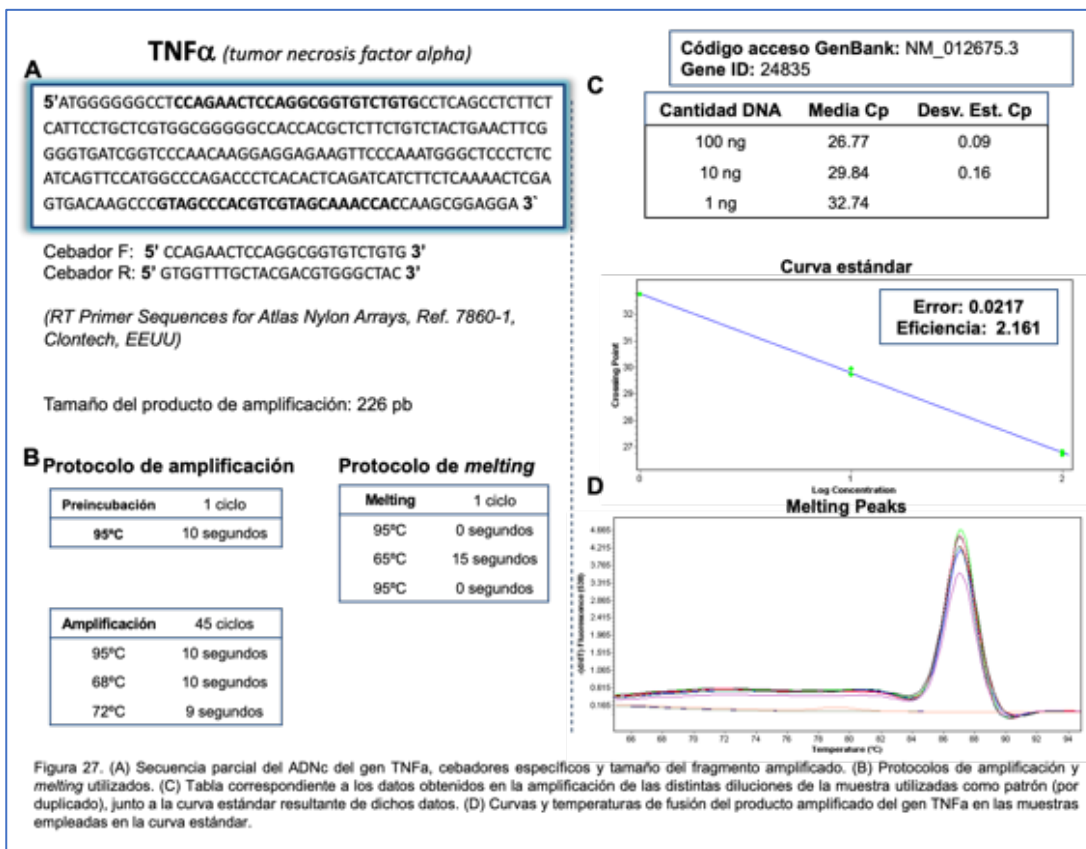


Figura 27. (A) Secuencia parcial del ADNc del gen SREBP1c, cebadores específicos y tamaño del fragmento amplificado. (B) Protocolos de amplificación y melting utilizados. (C) Tabla correspondiente a los datos obtenidos en la amplificación de las distintas diluciones de la muestra utilizadas como patrón (por duplicado), junto a la curva estándar resultante de dichos datos. (D) Curvas y temperaturas de fusión del producto amplificado del gen SREBP1c en las muestras empleadas en la curva estándar.



Anexo 2: Estadísticos 2WAY-ANOVA machos F1

1. MACHOS F1 CONTROL, FRUCTOSA Y FRUCTOSA + COLESTEROL

| 2-way ANOVA | Bebida (mL) | | Comida (g) | | Kcal totales | | Incremento de peso | | Peso TAL/peso corporal | |
|-------------|-------------|----------|------------|----------|--------------|----------|--------------------|----------|------------------------|----------|
| | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 |
| M | 0,404 | 0,019 | 0,490 | 0,014 | 0,689 | 0,005 | 0,296 | 0,031 | 0,001 | 0,283 |
| D | 0,074 | 0,134 | 0,707 | 0,020 | 0,122 | 0,110 | 0,442 | 0,046 | 0,153 | 0,099 |
| MxD | 0,302 | 0,064 | 0,267 | 0,072 | 0,158 | 0,097 | 0,560 | 0,033 | 0,723 | 0,018 |

| 2-way ANOVA | Coesterolemia (mg/dL) | | Coesterol HDL (mg/dL) | | Coesterol no HDL (mg/dL) | | Índice de riesgo coronario | | Índice aterogénico del plasma | |
|-------------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|--------------------------|----------|----------------------------|----------|-------------------------------|----------|
| | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 |
| M | 0,832 | 0,001 | 0,742 | 0,003 | 0,928 | 0,000 | 0,338 | 0,027 | 0,013 | 0,167 |
| D | 0,000 | 0,381 | 0,000 | 0,390 | 0,000 | 0,773 | 0,000 | 0,790 | 0,000 | 0,455 |
| MxD | 0,939 | 0,003 | 0,438 | 0,045 | 0,570 | 0,032 | 0,691 | 0,022 | 0,052 | 0,160 |

| 2-way ANOVA | Trigliceridemia (mg/dL) | | NEFA (mg/dL) | | Adiponectina (mg/mL) | | Leptina (pg/mL) | | HIG SOD2 (U/mg prot) | |
|-------------|-------------------------|----------|--------------|----------|----------------------|----------|-----------------|----------|----------------------|----------|
| | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 |
| M | 0,341 | 0,025 | 0,636 | 0,006 | 0,000 | 0,389 | 0,019 | 0,143 | 0,891 | 0,001 |
| D | 0,043 | 0,156 | 0,018 | 0,196 | 0,905 | 0,005 | 0,433 | 0,045 | 0,592 | 0,028 |
| MxD | 0,775 | 0,014 | 0,793 | 0,012 | 0,067 | 0,136 | 0,869 | 0,008 | 0,642 | 0,024 |

| 2-way ANOVA | HIG prod. H ₂ S (nmol/g tj/min) | | HIG prod. H ₂ S [EDTA] (nmol/g tj/min) | | HIG TG (mg/g prot) | | HIG Col (mg/g prot) | | HIG Ac bili (mmol/g prot) | |
|-------------|--|----------|---|----------|--------------------|----------|---------------------|----------|---------------------------|----------|
| | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 |
| M | 0,304 | 0,029 | 0,020 | 0,145 | 0,528 | 0,012 | 0,690 | 0,005 | 0,257 | 0,038 |
| D | 0,000 | 0,635 | 0,000 | 0,531 | 0,000 | 0,700 | 0,000 | 0,857 | 0,000 | 0,675 |
| MxD | 0,670 | 0,021 | 0,129 | 0,111 | 0,887 | 0,007 | 0,712 | 0,019 | 0,025 | 0,194 |

| 2-way ANOVA | HIG SREBP1c (ua) | | HIG ABCG5 (ua) | | HIG CYP7A1 (ua) | | HIG FAS (ua) | | HIG SCD1 (ua) | |
|-------------|------------------|----------|----------------|----------|-----------------|----------|--------------|----------|---------------|----------|
| | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 |
| M | 0,759 | 0,003 | 0,536 | 0,011 | 0,783 | 0,002 | 0,462 | 0,016 | 0,027 | 0,128 |
| D | 0,000 | 0,357 | 0,001 | 0,356 | 0,121 | 0,114 | 0,014 | 0,216 | 0,000 | 0,547 |
| MxD | 0,836 | 0,010 | 0,347 | 0,060 | 0,210 | 0,085 | 0,814 | 0,012 | 0,946 | 0,003 |

| 2-way ANOVA | HIG ACYL (ua) | | HIG CPT1 (ua) | | HIG LDLR (ua) | | HIG SR-B1 (ua) | | HIG KHK (ua) | |
|-------------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|----------------|----------|--------------|----------|
| | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 |
| M | 0,041 | 0,117 | 0,116 | 0,069 | 0,973 | 0,000 | 0,167 | 0,052 | 0,566 | 0,010 |
| D | 0,018 | 0,211 | 0,645 | 0,025 | 0,035 | 0,170 | 0,082 | 0,130 | 0,004 | 0,283 |
| MxD | 0,986 | 0,001 | 0,600 | 0,029 | 0,548 | 0,033 | 0,185 | 0,090 | 0,342 | 0,063 |

Anexo 2

| 2-way ANOVA | HIG NFAT5 (ua) | | HIG AldoB (ua) | | HIG CSE (ua) | | HIG CBS (ua) | | HIG 3MST (ua) | |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|---------------|----------------|
| | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² |
| M | 0,917 | 0,000 | 0,420 | 0,018 | 0,421 | 0,018 | 0,592 | 0,008 | 0,142 | 0,057 |
| D | 0,186 | 0,103 | 0,000 | 0,411 | 0,000 | 0,593 | 0,010 | 0,227 | 0,002 | 0,288 |
| MxD | 0,502 | 0,043 | 0,310 | 0,063 | 0,010 | 0,224 | 0,630 | 0,025 | 0,089 | 0,123 |

| 2-way ANOVA | HIG CHOP (ua) | | HIG Calm3 (ua) | | HIG ATF4 (ua) | | HIG HO1 (ua) | | % metilación CSE | |
|-------------|---------------|----------------|----------------|----------------|---------------|----------------|--------------|----------------|------------------|----------------|
| | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² |
| M | 0,019 | 0,146 | 0,417 | 0,018 | 0,218 | 0,044 | 0,863 | 0,001 | 0,792 | 0,002 |
| D | 0,559 | 0,033 | 0,689 | 0,020 | 0,013 | 0,225 | 0,719 | 0,019 | 0,270 | 0,079 |
| MxD | 0,688 | 0,021 | 0,850 | 0,009 | 0,876 | 0,008 | 0,960 | 0,002 | 0,014 | 0,233 |

| 2-way ANOVA | HIG miR30c (ua) | | HIG miR21 (ua) | | HIG miR22 (ua) | | HECES Col (mg/g heces) | | HECES AB (μmol/g heces) | |
|-------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------------|----------------|-------------------------|----------------|
| | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² |
| M | 0,522 | 0,011 | 0,911 | 0,000 | 0,404 | 0,021 | 0,005 | 0,243 | 0,620 | 0,011 |
| D | 0,308 | 0,063 | 0,611 | 0,026 | 0,232 | 0,085 | 0,000 | 0,956 | 0,004 | 0,382 |
| MxD | 0,369 | 0,054 | 0,837 | 0,010 | 0,451 | 0,047 | 0,001 | 0,405 | 0,496 | 0,059 |

| 2-way ANOVA | TAL prod. H ₂ S (nmol/g tj/min) | | TAL prod. H ₂ S [EDTA] (nmol/g tj/min) | | TAL prod. H ₂ S [DCys] (nmol/g tj/min) | | TAL LT (g/g tj) | | TAL TG (mg/g tj) | |
|-------------|--|----------------|---|----------------|---|----------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|
| | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² |
| M | 0,000 | 0,835 | 0,000 | 0,584 | 0,000 | 0,738 | 0,529 | 0,012 | 0,701 | 0,005 |
| D | 0,043 | 0,169 | 0,038 | 0,166 | 0,268 | 0,090 | 0,207 | 0,088 | 0,800 | 0,013 |
| MxD | 0,094 | 0,130 | 0,476 | 0,040 | 0,068 | 0,174 | 0,677 | 0,023 | 0,507 | 0,040 |

| 2-way ANOVA | TAL CSE (ua) | | TAL 3MST (ua) | | ILE prod. H ₂ S (nmol/g tj/min) | | ILE Colesterol (mg/g prot) | | ILE CSE (ua) | |
|-------------|--------------|----------------|---------------|----------------|--|----------------|----------------------------|----------------|--------------|----------------|
| | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² |
| M | 0,027 | 0,139 | 0,019 | 0,144 | 0,544 | 0,011 | 0,410 | 0,021 | 0,060 | 0,098 |
| D | 0,037 | 0,182 | 0,012 | 0,216 | 0,141 | 0,109 | 0,146 | 0,110 | 0,302 | 0,066 |
| MxD | 0,014 | 0,228 | 0,047 | 0,156 | 0,562 | 0,033 | 0,027 | 0,196 | 0,159 | 0,100 |

| 2-way ANOVA | ILE NPC1L1 (ua) | | ILE SR-B1 (ua) | | ILE LDLR (ua) | | ILE ABCG5 (ua) | | ILE KHK (ua) | | ILE AldoB (ua) | |
|-------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|--------------|----------------|----------------|----------------|
| | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² |
| M | 0,771 | 0,002 | 0,184 | 0,050 | 0,307 | 0,031 | 0,406 | 0,019 | 0,441 | 0,017 | 0,895 | 0,000 |
| D | 0,780 | 0,014 | 0,001 | 0,346 | 0,961 | 0,002 | 0,427 | 0,045 | 0,929 | 0,004 | 0,909 | 0,005 |
| MxD | 0,111 | 0,115 | 0,032 | 0,179 | 0,112 | 0,121 | 0,222 | 0,078 | 0,081 | 0,134 | 0,712 | 0,019 |

2. MACHOS F1 CONTROL, FRUCTOSA Y TAGATOSA

| 2-way ANOVA | Bebida (mL) | | Comida (g) | | Kcal totales | | Incremento de peso | | Peso TAL/peso corporal | |
|-------------|-------------|----------|------------|----------|--------------|----------|--------------------|----------|------------------------|----------|
| | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 |
| M | 0,109 | 0,144 | 0,478 | 0,030 | 0,133 | 0,127 | 0,706 | 0,004 | 0,004 | 0,205 |
| D | 0,000 | 0,905 | 0,000 | 0,622 | 0,000 | 0,797 | 0,001 | 0,331 | 0,326 | 0,060 |
| MxD | 0,041 | 0,313 | 0,313 | 0,128 | 0,139 | 0,207 | 0,297 | 0,065 | 0,078 | 0,132 |

| 2-way ANOVA | Trigliceridemia (mg/dL) | | Coesterolemia (mg/dL) | | Plasma AB (mmol/L) | | Adiponectina (mg/mL) | | Leptina (pg/mL) | |
|-------------|-------------------------|----------|-----------------------|----------|--------------------|----------|----------------------|----------|-----------------|----------|
| | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 |
| M | 0,054 | 0,097 | 0,267 | 0,033 | 0,674 | 0,005 | 0,000 | 0,290 | 0,552 | 0,010 |
| D | 0,094 | 0,120 | 0,097 | 0,118 | 0,091 | 0,124 | 0,288 | 0,067 | 0,573 | 0,030 |
| MxD | 0,893 | 0,006 | 0,146 | 0,099 | 0,152 | 0,100 | 0,284 | 0,068 | 0,107 | 0,117 |

| 2-way ANOVA | HIG Colesterol (mg/g prot) | | HIG TG (mg/g prot) | | HIG prod. H ₂ S (nmol/g tj/min) | | HIG prod. H ₂ S [EDTA] (nmol/g tj/min) | | HIG SOD2 (U/mg prot) | |
|-------------|----------------------------|----------|--------------------|----------|--|----------|---|----------|----------------------|----------|
| | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 |
| M | 0,131 | 0,064 | 0,557 | 0,011 | 0,220 | 0,040 | 0,030 | 0,136 | 0,608 | 0,008 |
| D | 0,091 | 0,128 | 0,483 | 0,044 | 0,000 | 0,476 | 0,000 | 0,564 | 0,708 | 0,020 |
| MxD | 0,851 | 0,009 | 0,352 | 0,063 | 0,522 | 0,035 | 0,073 | 0,147 | 0,317 | 0,064 |

| 2-way ANOVA | HIG FAS (ua) | | HIG SCD1 (ua) | | HIG CPT1 (ua) | | HIG MTP (ua) | | HIG CSE (ua) | |
|-------------|--------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|
| | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 |
| M | 0,596 | 0,008 | 0,332 | 0,025 | 0,625 | 0,007 | 0,275 | 0,034 | 0,944 | 0,000 |
| D | 0,008 | 0,237 | 0,000 | 0,422 | 0,032 | 0,174 | 0,013 | 0,219 | 0,000 | 0,371 |
| MxD | 0,722 | 0,018 | 0,200 | 0,083 | 0,607 | 0,027 | 0,964 | 0,002 | 0,053 | 0,154 |

| 2-way ANOVA | HIG CBS (ua) | | HIG ATF4 (ua) | | HIG HO1 (ua) | | HIG NFAT5 (ua) | | HIG CHOP (ua) | |
|-------------|--------------|----------|---------------|----------|--------------|----------|----------------|----------|---------------|----------|
| | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 |
| M | 0,036 | 0,119 | 0,335 | 0,026 | 0,169 | 0,053 | 0,348 | 0,028 | 0,404 | 0,020 |
| D | 0,010 | 0,233 | 0,020 | 0,195 | 0,028 | 0,185 | 0,647 | 0,027 | 0,034 | 0,176 |
| MxD | 0,730 | 0,018 | 0,824 | 0,011 | 0,273 | 0,072 | 0,439 | 0,050 | 0,130 | 0,110 |

| 2-way ANOVA | HIG KHK (ua) | | HIG AldoB (ua) | | HIG 3MST (ua) | | HIG ABCG5 (ua) | | HIG Calm3 (ua) | |
|-------------|--------------|----------|----------------|----------|---------------|----------|----------------|----------|----------------|----------|
| | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 | p | η^2 |
| M | 0,850 | 0,001 | 0,950 | 0,000 | 0,002 | 0,228 | 0,533 | 0,012 | 0,102 | 0,072 |
| D | 0,000 | 0,472 | 0,003 | 0,287 | 0,001 | 0,311 | 0,003 | 0,295 | 0,150 | 0,100 |
| MxD | 0,095 | 0,133 | 0,512 | 0,037 | 0,916 | 0,005 | 0,653 | 0,025 | 0,790 | 0,013 |

Anexo 2

| 2-way ANOVA | % metilación CSE | | HIG AB (mmol/g prot) | | HIG miR30c (ua) | | HIG miR21 (ua) | | HIG miR22 (ua) | |
|-------------|------------------|----------------|----------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² |
| M | 0,004 | 0,250 | 0,265 | 0,036 | 0,439 | 0,017 | 0,406 | 0,019 | 0,760 | 0,003 |
| D | 0,265 | 0,085 | 0,003 | 0,288 | 0,079 | 0,132 | 0,058 | 0,146 | 0,006 | 0,258 |
| MxD | 0,265 | 0,085 | 0,082 | 0,137 | 0,094 | 0,123 | 0,427 | 0,046 | 0,388 | 0,054 |

| 2-way ANOVA | TAL prod. H ₂ S (nmol/g tj/min) | | TAL prod. H ₂ S [EDTA] (nmol/g tj/min) | | TAL prod. H ₂ S [DCys] (nmol/g tj/min) | | TAL LT (g/g tj) | | TAL TG (mg/g tj) | |
|-------------|--|----------------|---|----------------|---|----------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|
| | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² |
| M | 0,000 | 0,824 | 0,000 | 0,548 | 0,000 | 0,701 | 0,254 | 0,038 | 0,676 | 0,005 |
| D | 0,151 | 0,102 | 0,051 | 0,152 | 0,010 | 0,264 | 0,376 | 0,056 | 0,381 | 0,055 |
| MxD | 0,609 | 0,028 | 0,584 | 0,029 | 0,006 | 0,287 | 0,973 | 0,002 | 0,092 | 0,131 |

| 2-way ANOVA | TAL CSE (ua) | | TAL 3MST (ua) | | ILE KHK (ua) | | ILE AldoB (ua) | | ILE CSE (ua) | |
|-------------|--------------|----------------|---------------|----------------|--------------|----------------|----------------|----------------|--------------|----------------|
| | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² |
| M | 0,436 | 0,018 | 0,159 | 0,054 | 0,075 | 0,083 | 0,370 | 0,022 | 0,281 | 0,032 |
| D | 0,716 | 0,019 | 0,001 | 0,314 | 0,004 | 0,262 | 0,000 | 0,369 | 0,237 | 0,077 |
| MxD | 0,005 | 0,272 | 0,041 | 0,162 | 0,766 | 0,014 | 0,260 | 0,072 | 0,012 | 0,218 |

| 2-way ANOVA | ILE ASBT (ua) | | ILE IBABP (ua) | | ILE OST α (ua) | | ILE OST β (ua) | | ILE MTTP (ua) | |
|-------------|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|----------------|----------------------|----------------|---------------|----------------|
| | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² |
| M | 0,696 | 0,004 | 0,969 | 0,000 | 0,595 | 0,008 | 0,140 | 0,061 | 0,256 | 0,039 |
| D | 0,242 | 0,076 | 0,237 | 0,077 | 0,047 | 0,161 | 0,032 | 0,179 | 0,005 | 0,277 |
| MxD | 0,019 | 0,198 | 0,077 | 0,133 | 0,323 | 0,062 | 0,215 | 0,084 | 0,098 | 0,131 |

| 2-way ANOVA | ILE prod. H ₂ S (nmol/g tj/min) | | HECES LT (mg/g) | | HECES Col (mg/g) | | HECES AB (μ mol/g) | | HECES TG (mg/g) | |
|-------------|--|----------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|-------------------------|----------------|-----------------|----------------|
| | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² | p | η ² |
| M | 0,288 | 0,031 | 0,775 | 0,003 | 0,600 | 0,009 | 0,202 | 0,067 | 0,494 | 0,016 |
| D | 0,214 | 0,082 | 0,786 | 0,016 | 0,136 | 0,125 | 0,532 | 0,051 | 0,011 | 0,258 |
| MxD | 0,403 | 0,049 | 0,804 | 0,015 | 0,924 | 0,005 | 0,269 | 0,104 | 0,208 | 0,099 |

