



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

Los efectos del ácido araquidónico *in vivo* a corto y largo  
plazo en humanos y ratones.

Tesis que presenta:

**Carmen de la Rocha Martín del Campo**

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

En la Especialidad de

**Biología de Plantas**

Directora de Tesis:

Dra. Gertrud Lund

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN – Unidad Irapuato, Departamento de Ingeniería Genética. Laboratorio de Epigenética en conjunto con la Universidad de Guanajuato, Campus León, Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias de la Salud y Campus Guanajuato, Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas bajo la dirección de la Dra. Gertrud Lund, gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con la beca para estudios de doctorado no 346984.

Este trabajo fue realizado del 01 de septiembre de 2012 al 28 de febrero de 2019.

Miembros del Comité de Asesores:

Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez

Dr. Luis Eugenio González de la Vara

Dr. Rafael Montiel Duarte

Dr. Silvio Zaina

## **Agradecimientos**

El presente trabajo no se hubiera logrado sin el apoyo de muchas personas que me acompañaron, ayudaron, orientaron y alentaron durante todo el camino.

Agradezco a mi esposo y compañero de vida Gerardo, que ha sido mi pilar en todo el proceso, acompañándome, ayudándome, queriéndome y creyendo.

Agradezco a mis papás que me dieron todas las herramientas y amor para llegar a donde estoy.

A mi hermana, que siempre me acompaña, me escucha y me aconseja.

A mis sobrinos Guillermo y Roberto, que me llenan de alegría.

A mis cuñados Guillermo, Roberto, Alfredo y Daniel, y a mis suegros Lulú y Gerardo, siempre presentes.

A mi directora de tesis, la Dra. Gertrud Lund, por las enseñanzas, la paciencia y la constante guía, así como por darme la oportunidad de trabajar con ella en su grupo de investigación.

A la B.Q. Dalia Rodríguez Ríos por su asesoría durante el desarrollo del apartado experimental de este proyecto, así como por los ensayos de expresión realizados por ella.

Al M.C. Enrique Ramírez Chávez, por su asesoría y ayuda en la determinación de perfil de ácidos grasos.

Al doctor Jorge Molina Torres, por su valiosa colaboración en la determinación de perfil de ácidos grasos.

A Pedro Galván Chía, por su ayuda en el cuidado de los ratones.

Al Dr. Luis Manuel Orozco Castellanos por su amable colaboración, permitiéndonos realizar los experimentos con ratones en el bioterio de Universidad de Guanajuato.

A la Dra. Yolanda Alvarado Caudillo por su asesoría durante el desarrollo del apartado experimental de este proyecto.

A los miembros de mi comité, la Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez, el Dr. Luis Eugenio González de la Vara, el Dr. Rafael Montiel Duarte y el Dr. Silvio Zaina, por sus valiosas aportaciones durante el doctorado y por la disponibilidad que siempre mostraron de contribuir al proyecto. Al Dr. Silvio Zaina, por su invaluable apoyo y

enseñanzas en el manejo de ratones y técnicas de laboratorio, así como sus siempre acertadas opiniones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca nacional de doctorado con número de apoyo 346984.

Al Centro de Investigación de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Irapuato, por la formación recibida en el programa de Doctorado en Biotecnología de Plantas. A todo el personal académico, administrativo y de mantenimiento del CINVESTAV, parte indispensable del centro.

A mis compañeros del laboratorio; Fabiola, Guillermo, Pilar, Eduardo y Dalia, por todo su apoyo y colaboración, y por hacer los días de trabajo muy agradables.

## Índice

Abreviaturas .....	10
1 Resumen .....	12
1 Abstract .....	13
2 Introducción .....	14
2.1 El medio ambiente y el riesgo de enfermedad .....	15
2.2 Origen de la enfermedad en el desarrollo temprano. ....	16
2.2.1 Estudios en humanos .....	16
2.2.2 Estudios controlados en animales .....	19
2.3 Efectos acumulativos de dietas modificadas en el porcentaje y tipo de grasa .....	19
2.4 Mecanismos moleculares: la mADN.....	21
2.5 Ácidos grasos y mADN .....	24
2.5.1 Evidencia <i>in vivo</i> .....	25
2.5.2 Evidencia <i>in vitro</i> .....	25
2.6 El AA: un ácido graso poliinsaturado y su metabolismo.....	26
3 Hipótesis.....	30
4 Objetivos.....	30
4.1 Objetivo general .....	30
4.2 Objetivos específicos .....	30
5 Estrategia experimental .....	31
5.1 Análisis en humanos .....	31
5.2 Estudios en ratones.....	32
5.2.1 Suplementación transgeneracional de AA.....	33
5.2.2 Análisis de la progenie F1, F2 y F3 .....	34
5.3 Cálculo de exposición acumulativa .....	35
5.4 Extracción de lípidos totales en hígado.....	36
5.5 Medición de ácidos grasos.....	36
5.6 Extracción de ADN .....	37
5.7 Análisis de mADN .....	38
5.8 Análisis de mADN en genes específicos.....	38
5.9 Análisis de expresión .....	39

5.10	Análisis estadístico.....	39
6	Resultados.....	40
6.1	Estudios en la cohorte humana.....	40
6.1.1	Asociaciones entre la mADN y AG a lo largo de un día en ayuno o un día postprandial .....	40
6.1.2	Diferencias en la mADN y AG específicos durante los días experimentales .....	40
6.1.3	La mADN, AG y el IMC.....	42
6.2	Estudios en ratones machos y hembras expuestos a AA por tres generaciones.....	44
6.2.1	El efecto de la suplementación con AA sobre parámetros reproductivos .....	44
6.2.2	El AA está asociado con un incremento en el peso corporal a través de las generaciones en ratones de un mes de edad .....	45
6.2.3	El incremento en el peso corporal a un mes de edad es dependiente de la dosis de AA acumulado a través de generaciones .....	48
6.2.4	Correlaciones entre mg de AA, la mADN y AG en tejidos específicos .. ..	50
6.2.5	Efectos de AA sobre el peso y la mADN de órganos específicos.....	50
6.2.6	Correlaciones entre AG específicos observados y el peso órgano-específico, mg de AG suplementados o la mADN .....	51
6.2.7	El peso del hígado y la mADN en la progenie masculina se asocia negativamente con la mADN en el promotor de Scd1 .....	55
7	Discusión .....	58
7.1	La mADN está relacionada con el IMC en humanos y el contenido de los PUFA en sangre.....	58
7.2	El suplemento de AA en ratones.....	58
7.2.1	El aumento transgeneracional en peso del hígado y mADN es lábil dentro de las generaciones.....	59
7.2.2	Diferencias específicas del tejido en el contenido de AG y mADN después de la suplementación de AA y SBO .....	61
7.2.3	Diferencias sexo-específicas en el contenido de los AG y en los perfiles de mADN en el hígado .....	61
7.2.4	La mADN y el aumento intergeneracional inducido por AA en el peso corporal y del hígado .....	62
8	Conclusiones y perspectivas .....	65

9	Referencias .....	67
10	ANEXOS.....	77
11	Publicaciones durante el programa .....	87

## **Contenido de Figuras**

**Figura 1.** Efecto multigeneracional y transgeneracional.

**Figura 2.** mADN y demetilación del ADN.

**Figura 3.** mADN estable o transitoria en respuesta a un estímulo.

**Figura 4.** Metabolismo de los PUFA n-6 y n-3.

**Figura 5.** Toma de muestras en cohorte de humanos adultos.

**Figura 6.** Esquematización del suplemento materno y paterno de AA transgeneracional.

**Figura 7.** Determinación de los mg suplementados en ratones acumulativamente.

**Figura 8.** Tendencias de la mADN a lo largo del período de muestreo en humanos.

**Figura 9.** mADN en humanos con diferentes IMC.

**Figura 10.** Distribución de AG de acuerdo al IMC y mADN en humanos adultos.

**Figura 11.** Cambios en peso corporal relativo a la progenie no suplementada.

**Figura 12.** Diagrama esquemático de las vías de síntesis de los AG.

**Figura 13.** Diferencias específicas por sexo en el metabolismo de AG de la progenie expuesta a AA y SBO.

**Figura 14.** Vías de señalización propuestas que explican la correlación entre el mADN inducido por AA y la acumulación de C16: 1n9.

## **Contenido de Tablas**

**Tabla 1** Perfil de AG en el alimento para roedor de laboratorio 5001 y aceite de soya Nutrioli®.

**Tabla 2** Asociación entre mADN y AG específicos en un modelo de regresión lineal.

**Tabla 3.** Demografía de la muestra por tratamiento.

**Tabla 4.** Demografía de la progenie por tratamiento.

**Tabla 5.** Correlación entre los mg suplementados de AG y el peso de la progenie.

**Tabla 6.** Correlación entre los mg suplementados de AG y el peso y mADN órgano-específico.

**Tabla 7.** Correlación entre los mg de AG suplementados, el peso del hígado y la mADN con los AG en tejido.

**Tabla 8.** Correlación entre los mg de AG suplementado, el peso del cerebro y la mADN con los AG en tejido.

**Tabla 9.** Correlación entre los mg de AG suplementado, el peso del testículo y la mADN con los AG en tejido.

**Tabla 10.** Correlación entre los mg de AG suplementado, el peso del órgano y la mADN con los AG en tejido de ratón a los 5 meses de edad.

**Tabla 11.** Correlación entre mgAA suplementados, peso del órgano y mADN con AG individuales.

## **Contenido de Anexos**

**ANEXO 1.** Cambio de peso corporal en progenie suplementada con AG relativo al de la progenie no suplementada en hembras y machos a través de las generaciones

**ANEXO 2.** Correlación entre los mg suplementados de AG e indicadores de fertilidad

**ANEXO 3.** Peso de los órganos de la progenie de ratones suplementados con AG a 1 y 5 meses de vida

**ANEXO 4.** Metilación total (mADN) órgano-específica a la edad de 1 y 5 meses.

**ANEXO 5.** AG en ratones de 1 mes, en hígado, cerebro y testículos.

**ANEXO 6.** AG ratones de 5 meses en hígado, cerebro y testículos.

**ANEXO 7.** Lípidos totales en hígado de ratones de 1 mes.

**ANEXO 8.** Frecuencia de correlaciones por grupo de estudio/órgano/suplemento

**ANEXO 9.** Metilación gen-específica en promotores en hígado de ratones de 1 mes de edad.

**ANEXO 10.** Correlaciones entre mp *Scd1*/ o mp *Ppargc1a*, mg de AG suplementado, peso del hígado y los AG específicos.

**ANEXO 11.** Análisis de expresión génica.

## Abreviaturas

- AA:** Ácido araquidónico
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- AG:** Ácidos grasos
- ANOVA:** Análisis de varianza
- ARN:** Ácido ribonucleico
- Cpt1a:** Carnitina palmitoiltransferasa 1a
- DHA:** Ácido docosahexaenoico
- DNMT:** ADN metiltransferasas
- DS:** Desviación estándar
- ECA:** Ácido eicosenoico
- ECV:** Enfermedades cardiovasculares
- EETs:** Ácidos epoxieicosatrienos
- ENT:** Enfermedades no transmisibles
- EPA:** Ácido eicosapentaenoico
- Fads2:** Desaturasas de ácidos grasos 2
- gAA/gSBO.:** Estimulo en línea germinal de araquidónico/aceite de soya
- GPCR:** Receptores acoplados a proteínas G, por sus siglas en inglés
- GWAS:** Estudios del genoma amplio por sus siglas en inglés
- HDAC4:** Histona deacetilasa 4
- HETEs:** Ácidos hidroxieicosatetraenoicos
- HFD:** Dietas altas en grasas por sus siglas en inglés
- IMC:** Índice de masa corporal
- MAA/MSBO:** Suministro materno de AA o de SBO
- mADN:** Metilación de ADN
- mg:** Miligramos
- MUFA:** Ácidos grasos monoinsaturados, por sus siglas en inglés
- NS:** No suplementados
- PAA/PSBO:** Suministro paterno de AA o de SBO
- pb:** Pares de bases
- PDK4:** Piruvato deshidrogenasa cinasa

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés

**PG:** Prostaglandinas

**PPARG** (Pparpgc1a): Proliferador de peroxisomas

***Ppargc1 α***: Ppar-gamma, coactivador 1 alfa

**PUFA:** Ácidos grasos poliinsaturados, por sus siglas en inglés

**SBO:** Aceite de soya, por sus siglas en inglés

***Scd1***: Desaturasa esteroil-Coenzima A 1

**SFA:** Ácidos grasos saturados, por sus siglas en inglés

**tAA o tSBO tSBO:** Estimulo total de araquidónico/aceite de soya

**UFR:** Unidades de fluorescencia relativa

## 1 Resumen

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso altamente bioactivo implicado en procesos inflamatorios y juega un papel en el desarrollo óptimo en las etapas tempranas de la vida. Además, se sabe que en cultivo celular el AA es un modificador de la metilación de ADN (mADN), tanto global como gen-específica, que está asociado con un incremento de lipogénesis *de novo*. Sin embargo, la relevancia de estas observaciones - tanto con respecto a los efectos a corto como a largo plazo de AA *in vivo* - es desconocida.

Para este fin se analizó si existe una asociación entre la exposición a AA y la mADN global como de genes específicos en una cohorte de hombres mexicanos metabólicamente sanos divididos por índice de masa corporal (IMC) y en un modelo experimental de ratón de la cepa BALB/C. En ambos estudios se analizó si existen correlaciones entre la mADN, ácidos grasos específicos y el peso corporal o el peso órgano específico. Respecto a lo anterior, en humanos se analizaron muestras de sangre periférica tomadas durante 8 horas en intervalos de 2 horas después de ingesta de una dieta representativa occidental (día postprandial) o en ayuno. En ratones, se analizó hígado, cerebro y testículos después de una exposición a una dosis moderada de AA durante el periodo periconceptual por tres generaciones.

El trabajo experimental demostró que el AA es un importante modulador de la mADN *in vivo*. Las conclusiones principales fueron: 1) el AA está asociado con un incremento en la mADN en sangre periférica de humanos y en el hígado de ratones; 2) en ratones el AA está asociado con un aumento de peso corporal, hígado y del cerebro, acumulativo a través de las generaciones, aunque transitorio; 3) el peso del hígado correlaciona con la mADN global y cis-7-hexadecenoico, un ácido graso que se acumula de manera preferencial en las gotas de lípidos; 4) en ratones machos las asociaciones descritas en el inciso 3) dependen de la mADN de la región promotora de la *desaturasa esteroil-Coenzima A 1*.

## 1 Abstract

Arachidonic acid (AA) is a highly bioactive fatty acid that is implicated in inflammatory processes and plays a role in optimal development during early stages of life. In addition, in cell culture AA is a known modifier of both global and gene-specific DNA methylation (DNAm) that is associated with *de novo* lipogenesis. However, the relevance of these observations - both with respect to short and long-term effects of AA exposure *in vivo* - is unknown.

To this end, we asked whether AA exposure affects global and/or gene-specific DNAm, either in an obesity-discordant cohort of metabolically healthy Mexican men or in an experimental mouse model of the BALB/C strain. In both studies, we probed for correlations between DNAm, specific fatty acids, whole body and tissue-specific weights. With respect to the latter, in humans we analyzed peripheral blood samples taken at 2-hour intervals during an 8-hour period after either a single Western diet-representative meal (post-prandial) or no meal (fasting). In mouse, we analyzed liver, brain and testes following maternal and paternal exposure to a moderate dose of AA for three consecutive generations during the periconceptual period.

The experimental work showed that AA is an important modulator of DNAm *in vivo*. The main conclusions were: 1) AA is associated with an increase in DNAm in human peripheral blood and mouse liver; 2) AA exposure is associated with a cumulative, albeit transient, increase of whole body, liver and brain weight in mice across three generations; 3) liver weight correlates with global DNAm and the anti-inflammatory *cis*-7-hexadecenoic fatty acid, an anti-inflammatory fatty acid that preferentially accumulates in lipid droplets; and 4) in male mice the associations described in point 3) correlate with DNAm of the promoter region of *desaturase stearyl-Coenzyme A* 1.

## 2 Introducción

Los mecanismos epigenéticos están íntimamente asociados con el proceso de la regulación de la transcripción. Las modificaciones epigenéticas incluyen la metilación del ADN (mADN) y modificaciones a los extremos N-terminales de las histonas y ambas son reversibles. Estas modificaciones pueden variar de manera tejido-específica durante el desarrollo y en la enfermedad. De hecho, todas las enfermedades no transmisibles (ENT) - como por ejemplo el cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 - muestran cambios en la mADN. A nivel mundial y en México, las ENT representan las primeras causas de muerte y/o discapacidad y sus factores de riesgo principales son factores modificables como la dieta y la actividad física. Dado que la epigenética funciona como un vínculo entre el ambiente y el fenotipo, entender los efectos epigenéticos de elementos nutricionales individuales puede ayudar a bajar o prevenir las incidencias de ENT dentro y a través de generaciones.

Respecto a la prevención, la teoría de Barker, conocida también como programación fetal o metabólica, fue la primera en proponer el origen fetal de las ENT [1]. El crecimiento y el desarrollo del feto están determinados por factores ambientales y biológicos, como el estado nutricional de la mujer embarazada, la función placentaria y la capacidad del feto para utilizar los nutrientes [2]. A nivel molecular, se supone que el período periconceptual representa un momento muy vulnerable para inducir cambios en la mADN, dado que estas modificaciones son “reprogramadas” casi por completo durante la preimplantación en mamíferos [3,4]; es decir, casi toda la mADN se borra y se restablece durante este periodo. De hecho, estudios con dietas controladas en ratones muestran que la dieta materna y paterna durante periodos periconceptuales están asociadas con cambios epigenéticos y metabólicos en la progenie adulta dentro y a través de generaciones [5–11].

Los ácidos grasos (AG) son un componente importante de la dieta, y nosotros estamos interesados en el papel que tienen como modificadores de la mADN a corto y al largo plazo. En lo particular, hemos mostrado que los ácidos araquidónico (AA), oleico y eláidico, inducen cambios rápidos y específicos en la mADN en cultivos celulares [12,13]. El AA y el ácido eláidico promueven la hipermetilación, mientras

que el ácido oleico produce hipometilación. Además, para el ácido elaídico se corroboró que su efecto hipometilante se mantiene a largo plazo *in vivo* [13]. Es decir, el efecto de un suplemento de elaídico durante el embarazo o la lactancia, produce un cambio en la mADN global y del contenido de AG específicos en el tejido adiposo de la progenie adulta.

En conjunto, estos trabajos muestran que AG específicos juegan un papel importante en la mADN. Entre ellos está el AA que tiene un papel importante en varios procesos biológicos, como ejemplo la síntesis de agentes anti y proinflamatorios y en el desarrollo temprano. Sin embargo, se desconocen los efectos de estos AG sobre la mADN a corto o largo plazo *in vivo*.

Para este fin se analizó si existe una asociación entre la exposición a AA a concentraciones fisiológicas y la mADN global y gen-específica en una cohorte de hombres mexicanos y un modelo experimental de ratones. En ambos estudios se analizó si existen correlaciones entre la mADN, AG específicos y el peso corporal y el peso de tejidos específicos.

El trabajo experimental resultó en dos artículos de investigación que muestran que el AA es un importante modulador de la mADN *in vivo* en humanos y en ratones [14,15]. En el ratón, observamos que una dosis moderada de AA está asociada con un incremento transitorio en el peso corporal y el peso de tejidos específicos de manera transgeneracional. Esto es interesante ya que “imita” la realidad de la epidemiológica actual en el mundo y ayuda a la reflexión de la importancia del contenido de AA en la dieta.

## **2.1 El medio ambiente y el riesgo de enfermedad**

Muchas décadas de estudios tanto moleculares como epidemiológicos muestran un impacto significativo del ambiente en la etiología de enfermedades que no pueden ser explicadas únicamente por factores genéticos. Por ejemplo, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) en estudios a lo largo del genoma (GWAS, por sus siglas en inglés) usualmente explican menos del 20% de la variación fenotípica [16]. De igual manera, la discordancia en enfermedades entre gemelos monocigóticos y el incremento dramático de la incidencia de enfermedades

no transmisibles (ENT), muestran cómo el componente ambiental puede tener un gran peso en la etiología de dichas enfermedades [17].

En México, el perfil de la salud pública evolucionó en las últimas décadas, pasando de estar caracterizado por una alta mortalidad asociada a enfermedades infecciosas, a otro en la cual las principales causas de muerte se deben a ENT [18]. La Organización Mundial de la Salud atribuye esta transición en parte a cambios en la dieta, al sedentarismo y la obesidad [19].

La composición de la dieta tiene repercusiones directas en la salud, tanto a corto (dentro de una generación) y a largo (a través de generaciones) plazo. Existen una gran variedad de estudios que asocian el riesgo cardiovascular con el tipo y la cantidad de lípidos en la dieta [20]. Un ejemplo es la dieta mediterránea, caracterizada por el alto consumo de granos enteros, una alta relación de AG monoinsaturados/saturados (respectivamente MUFA y SFA, por sus siglas en inglés) y el moderado consumo de lácteos y bajo consumo de carnes. Se sabe que las poblaciones que viven en las regiones mediterráneas que tienen apego a esta dieta muestran una menor incidencia de eventos vasculares [21]. El beneficio de la dieta mediterránea respecto a enfermedades cardiovasculares y otras ENT está también comprobado por intervenciones dietéticas, en particular intervenciones que sustituyen los SFA por los AG poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) [22]. Otro enfoque en la nutrición es el papel de la relación entre los PUFA omega 6/omega 3 (n-6/n-3). Las recomendaciones nutricionales indican que esta relación debe ser alrededor de uno [23–26]

Otros estudios epidemiológicos en humanos o con dietas controladas en mamíferos inferiores, muestran que el tipo y/o cantidad de la nutrición durante fases tempranas del desarrollo afecta al riesgo de enfermedad adulta, del individuo expuesto y de manera transgeneracional [27]. A continuación, se discutirán algunos estudios tanto en humanos como en ratones que respaldan lo anterior.

## **2.2 Origen de la enfermedad en el desarrollo temprano.**

### **2.2.1 Estudios en humanos**

La programación se describe como el proceso en que un estímulo beneficioso o dañino durante un periodo crítico del desarrollo tiene efectos duraderos a lo largo

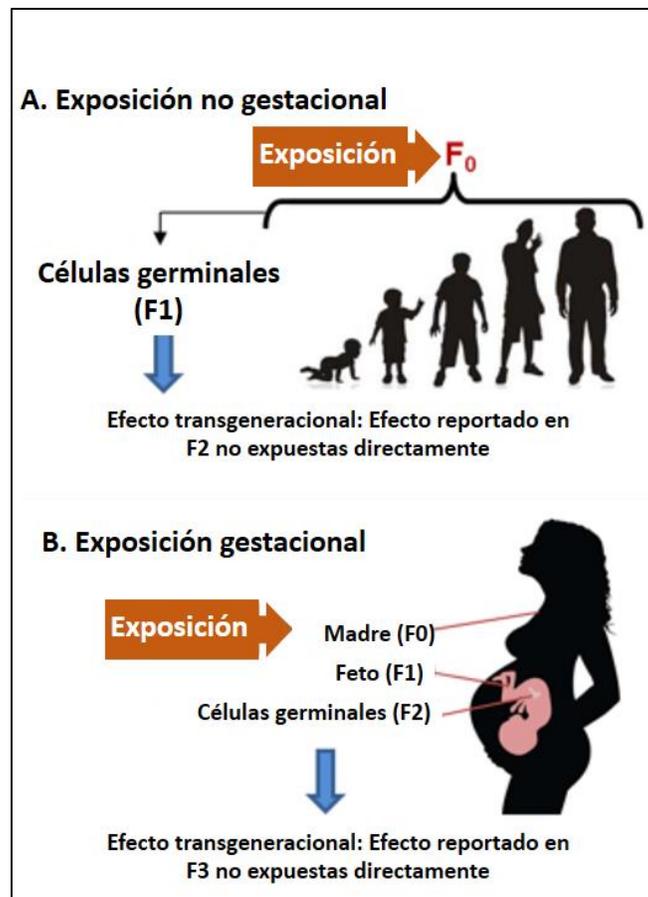
de la vida [1]. Las primeras evidencias de programación fueron publicadas por Forsdahl, quien reportaba que la pobreza durante la adolescencia seguida por prosperidad, se correlaciona positivamente con muerte asociada a enfermedad cardíaca en la vida adulta [28]. A su vez, Barker encontró una correlación entre el bajo peso al nacer y riesgo de ECV en la vida adulta [29], así como un incremento en el síndrome metabólico de hasta 10 veces. Éste síndrome, se caracteriza por intolerancia a la glucosa, hipertensión e hiperlipidemia [30]. Muchos estudios en diferentes partes del mundo han confirmado estas observaciones [31].

Colectivamente, los estudios pioneros de Forsdahl y Barker generaron la hipótesis Forsdahl-Barker que sugiere que un suministro nutricional desfavorable intrauterino, tiene una influencia metabólica en el feto, que conduce a un peso reducido al nacer y a enfermedades metabólicas en la vida adulta. Esta hipótesis condujo al desarrollo de una nueva rama de conocimiento científico conocida como “origen de la salud y enfermedad en el desarrollo” (DOHaD; por las siglas en inglés de *Developmental Origins of Health and Disease*) [32,33].

Un ejemplo son los estudios de los efectos de la hambruna en Holanda durante el fin de la segunda guerra mundial. Los investigadores utilizaron datos perinatales de la prole de mujeres que estuvieron expuestas a la inanición durante el embarazo durante los años 1944-1945. Las separaron de acuerdo al periodo que se dio la carencia (embarazo temprano, medio y tardío) y posteriormente analizaron parámetros metabólicos como glucosa, lípidos, antropometría y presión arterial de la prole adulta. De manera muy interesante encontraron que existe una correlación entre el tiempo de exposición *in utero* y el trastorno metabólico presente en la vida adulta: la exposición durante la gestación temprana se asoció con mayor incidencia de intolerancia a la glucosa; durante la gestación media con enfermedades de obstrucción de vías respiratorias; y durante el embarazo tardío con ECV [34–38].

En el contexto de programación es importante recordar que la programación fetal en mamíferos puede también repercutir en las siguientes generaciones (Figura 1). Por ejemplo, durante el embarazo se producen las células germinales primarias en el feto y por consecuencia un estímulo durante este periodo puede afectar tres

generaciones (F0, F1 y F2). Por otro lado, los estímulos que ocurren en estado no gestante (F0), de igual manera pueden repercutir a la siguiente generación (F1), ya que hay exposición directa de las células germinales, tanto para mujeres como para hombres. Esto indica que la exposición a un estímulo por varias generaciones puede resultar en efectos acumulativos en el fenotipo a través de generaciones. Implica también que para poder postular que un estímulo tiene un impacto sobre un fenotipo de manera transgeneracional, éste debe estar presente en la generación no expuesta (F3 para exposición en etapa gestante, y F2 para la exposición no gestacional como es la paterna) (**Figura 1**) [39,40].



**Figura 1. Efecto multigeneracional y transgeneracional.** A, en un individuo no gestante, macho o hembra, un estímulo repercute dos generaciones por la línea germinal, y si el fenotipo trasciende a la F<sub>2</sub> entonces es un efecto transgeneracional (panel izquierdo). B, en un individuo hembra gestante el estímulo tiene contacto directo con F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>, si el fenotipo está presente en F<sub>3</sub>, se dice que es un efecto transgeneracional (adaptado de [39,40]).

Algunos estudios epidemiológicos han revelado evidencia de una programación transgeneracional por la vía paterna [41,42]. Con la ayuda de estadísticas históricas de agricultura y economía de Suecia del inicio del siglo XX, Bygren y sus colaboradores calcularon la ingesta alimentaria en base a la disposición y precios de los alimentos de la época. Concluyeron que si el abuelo paterno tuvo una abundancia de alimentos entre la edad de 9-12 años, entonces la tercera generación tuvo una esperanza de vida más corta, mientras que en la línea materna los resultados no fueron concluyentes [42]. De igual manera, una réplica del estudio antes mencionado concluyó que si el abuelo tuvo un buen acceso a los alimentos, el nieto varón tiene un mayor riesgo de morir a causa de cualquier tipo de cáncer, aunque esto no fue cierto para las nietas [43]. En conjunto, estos estudios proponen que un estímulo en la etapa prepuberal, puede repercutir de manera duradera y heredada por la línea paterna en parámetros de salud como la esperanza de vida.

### **2.2.2 Estudios controlados en animales**

Experimentos en modelos animales, en especial en ratas y ratones, respaldan la teoría de programación fetal y la herencia transgeneracional. La mayoría de ellos describe los efectos de la restricción calórica (global o por bajo contenido de proteína) o dietas altas en grasa (HFD, por las siglas en inglés de *high fat diet*) e hipercalóricas durante el embarazo sobre los factores de riesgo de ECV y diabetes, que incluyen: hipertensión, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, y obesidad [10,31,44,45]. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre los efectos de los AG individuales. Como nuestro estudio está relacionado con efectos acumulativos de AA a través de generaciones, a continuación, se discutirán ejemplos de estudios similares usando HFD o dietas con variaciones en las proporciones n-6/n-3.

### **2.3 Efectos acumulativos de dietas modificadas en el porcentaje y tipo de grasa**

Li y colaboradores analizaron el impacto de una dieta HFD (60% de la ingesta calórica) sobre cambios metabólicos y epigenéticos, y esteatosis hepática en la progenie masculina de ratones durante tres generaciones [46]. La progenie de los ratones que recibieron HFD sin cesar por las generaciones, presentó un incremento

en la obesidad a los tres meses de edad a través de las generaciones. Esto fue acompañada por un aumento gradual de esteatosis hepática, la cual se asoció con niveles altos de insulina y leptina. A nivel molecular se detectaron cambios en la mADN de histonas y en la expresión de la metiltransferasa de histonas H3K9 en hígado.

Se han realizado también esfuerzos para entender si la calidad de la grasa influye más que la cantidad, por ejemplo realizando ensayos variando la proporción de los PUFA n-3 y n-6 o con cantidades elevadas de AG totales [47,48]. Massiera y colaboradores alimentaron ratones con una dieta “occidental” alta en lípidos (35% de la energía de grasas totales y relación 28:1 de ácido linoleico [18:2 n-6]: $\alpha$ -linolénico [18:3 n-3]) durante cuatro generaciones [49]. De manera interesante, los cambios fueron graduales a lo largo de las generaciones: 1) Los ratones fueron más obesos y presentaron hiperinsulinemia; 2) se observó un aumento de AA y disminución de ácido docosahexaenoico (DHA; C22:6, n-3) en plasma y tejido adiposo con respecto al control.

Por otro lado, Masuyama y sus colaboradores publicaron en 2015 un estudio sobre los efectos multigeneracionales de una HFD antes y durante el embarazo en ratones hembras [50]. Como era de esperarse, la progenie mostró un fenotipo característico de la HFD: peso corporal alto y trastorno de metabolismo de la glucosa, entre otros. Los autores analizaron también cuántas generaciones se requerían para revertir los efectos acumulativos de la HFD y encontraron que después de tres generaciones sin HFD los fenotipos presentes (aumento de masa grasa, resistencia a la insulina), se recuperan.

En otro estudio se suplementaron ratones Kunming con aceite de pescado (enriquecido en AG n-3) o aceite de soya (enriquecido en AG n-6) durante tres generaciones [51]. Se observó que en el grupo suplementado con n-3, había una disminución en la tasa de ovulación y en el tamaño de la camada en las generaciones F1 y F2. La baja fertilidad estaba asociada con niveles bajos de AA y su metabolito prostaglandina E<sub>2</sub> así como a la actividad enzimática de ciclooxigenasa-2 que convierte AA en prostaglandina E<sub>2</sub> [51].

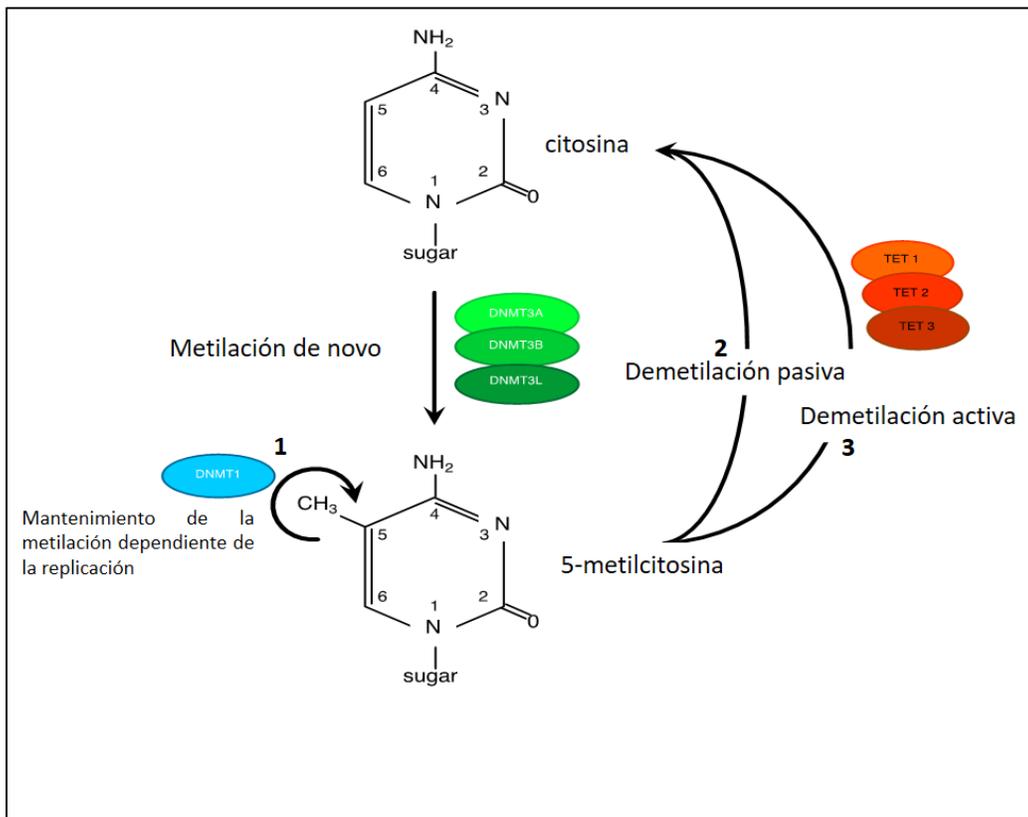
## 2.4 Mecanismos moleculares: la mADN

Los mecanismos potenciales subyacentes a la programación metabólica pueden ser las modificaciones epigenéticas que incluyen la mADN y las modificaciones de histonas [52]. En conjunto estas modificaciones determinan el epigenoma, mientras que la distribución de la mADN a lo largo del genoma es conocido como el metiloma. Para entender las funciones de la mADN se requiere considerar su distribución a través del genoma. La mayor parte de la mADN se encuentra en dinucleótidos CpG de secuencias repetidas y del cuerpo del gen, definido como la región desde el inicio de la transcripción hasta el sitio de terminación de la transcripción. La mADN en secuencias repetidas tiene como función suprimir la expresión de elementos transponibles y así mantener la estabilidad del genoma [53]. La mayoría de los promotores se encuentran hipometilados, a pesar que se caracterizan por una alta densidad de CpG. Estas regiones son conocidas como islas CpG, las cuales también se encuentran en el cuerpo del gen o entre genes, donde pueden funcionar como promotores intragénicos o distales [54].

El efecto de la mADN sobre la transcripción ha sido ampliamente estudiado, y se ha encontrado una asociación inversa entre la mADN en las regiones promotoras y la expresión génica mientras que se observa lo contrario en el cuerpo del gen [55,56]. En cuanto a la mADN en las regiones promotoras, la inhibición de la transcripción resulta de la preferencia de la mayoría de los factores de transcripción a los sitios no metilados [57]. Aún no se sabe con certeza la función de la mADN en el cuerpo del gen; podría estar involucrada en el uso del promotor diferencial y/o en el alargamiento de la transcripción, así como del *splicing* alternativo [58].

Las enzimas que catalizan la transferencia del grupo metilo al carbono 5 de la citosina, produciendo 5-metilcitosina (5mC), se conocen como ADN metiltransferasas (DNMT, por sus siglas en inglés) (Figura 2). La DNMT1 tiene afinidad por sitios CpG hemimetilados generados durante la replicación del ADN y de esta manera copia patrones de mADN preexistentes en la cadena de ADN recién sintetizada [59]. Por otro lado la mADN *de novo* se lleva a cabo por las metiltransferasas DNMT3A, DNMT3B, DNMT3C y por la catalíticamente inactiva

DNMT3L [60]. Los mecanismos de demetilación pueden llevarse a cabo de manera pasiva y activa. La demetilación pasiva se observa cuando la replicación del ADN rebasa la capacidad de mantenimiento de la mADN, resultando en la dilución de la 5mC. La demetilación activa se lleva a cabo por una serie de reacciones que involucran la oxidación de la 5mC por proteínas TET y posterior modificación de estos compuestos oxidados dependientes de replicación, o bien por mecanismo de reparación de bases [61].



**Figura 2. La mADN y demetilación del ADN.** 1. La naturaleza palindrómica de la replicación del dinucleótido CpG crea ADN hemimetilado. DNMT1 (círculo azul) restaura el ADN hemimetilado a la mADN completa. 2. La demetilación pasiva se produce en ausencia de la maquinaria DNMT1 y ADN no metilado después de una ronda posterior de división celular. 3. Posibles vías de demetilación activa: una demetilasa directa que convierte 5mC a citosina es, hasta la fecha, especulativa TET (adaptado de [50]).

La mADN es “reprogramada” durante la preimplantación y nuevamente durante la generación de células germinales primarias [62–64]. Dicha reprogramación consiste

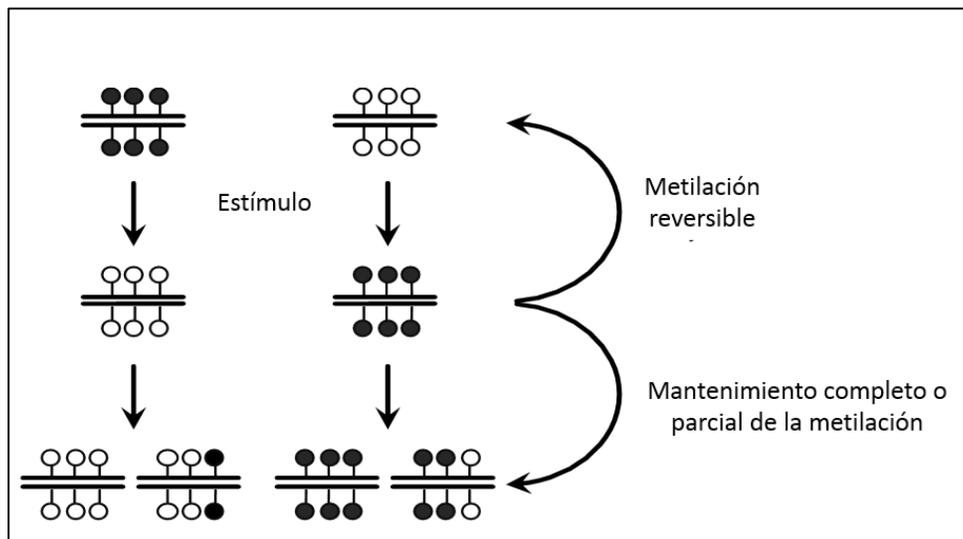
en la eliminación de una gran parte de los patrones de mADN preexistentes y la imposición de nuevos patrones célula-específicos asociados con la diferenciación celular, la constitución de los tejidos somáticos en el embrión y de los gametos en la línea germinal. Estos hechos han sugerido que la fase de preimplantación y de maduración de la línea germinal son periodos críticos en los que los factores exógenos pueden interferir con la maquinaria de demetilación y metilación, introduciendo de esta forma errores que afectan al embrión y potencialmente al adulto, o la progenie [65].

Actualmente, usando microarreglos de la mADN que permiten determinar el estado de la mADN de ~1.5% de las CpGs en el genoma humano distribuidos a lo largo de todos los genes, o la secuenciación completa del metiloma, se sabe que muchas patologías muestran cambios en la mADN. Entre ellas, enfermedades o condiciones relacionadas con el estilo de vida, como obesidad [66], aterosclerosis [67] y diabetes mellitus tipo 2 [68], indicando que la dieta puede tener un papel importante en dichas modificaciones. Respecto a aterosclerosis, sabemos que aproximadamente el 20% de los cambios en la mADN correlacionados con la severidad de aterosclerosis se sobreponen con cambios en la mADN observados en células expuestas al AA [69]. En el ratón, el ejemplo mejor documentado de que los factores nutricionales pueden modificar el metiloma, es el modelo *Agouti viable yellow* ( $A^{vy}$ , por sus siglas en inglés) que regula la producción de pigmento amarillo en el folículo piloso y otros efectos, como obesidad. El alelo  $A^{vy}$  tiene una inserción de un retrotransposón partícula A intracisternal (IAP, por sus siglas en inglés) dentro de un exón no codificante río arriba de los exones codificantes del gen *Agouti*. La región LTR (*long terminal repeat* por sus siglas en inglés) del IAP funciona como promotor alternativo del gen, promoviendo la transcripción ectópica constitutiva de *Agouti*, produciendo pelaje de color amarillo [70]. La actividad del alelo  $A^{vy}$  es variable en un fondo isogénico y correlaciona con el estado de metilación del IAP; al estar híper o hipometilado los ratones muestran el color de pelaje silvestre (denominado pseudoagouti) o color amarillo, respectivamente, mientras que un nivel de mADN intermedio produce un fenotipo moteado. De manera interesante, las hembras  $A^{vy}$  suplementadas con cofactores (folato, vitaminas B) en las reacciones de metilación

durante el embarazo, producen una progenie predominantemente pseudoagouti con hipermetilación del alelo  $A^{vy}$  *in útero*, y sin el fenotipo (no son amarillos). Ese cambio de fenotipo es estable a lo largo de la vida adulta.

Estos resultados muestran que los efectos nutricionales pueden tener una participación preventiva si se aplica en los momentos de la vida donde el metiloma es más vulnerable [11].

En conjunto, estos datos indican que los mecanismos epigenéticos proveen un modelo molecular para explicar los efectos que el ambiente puede tener sobre el fenotipo [71] (**Figura 3**). De interés particular para nosotros es investigar en más detalle cómo los AG de la dieta afectan la mADN a corto y a largo plazo y en relación con la dosis y/o longitud del estímulo.



**Figura 3. mADN estable o transitoria en respuesta a un estímulo.** Las paletas llenas o vacías representan residuos de CpG metiladas o no metiladas [54].

## 2.5 Ácidos grasos y mADN

El contenido de los AG en un organismo refleja tanto la composición de su dieta como su biosíntesis y metabolismo. Los niveles anormales de AG se han asociado con enfermedades metabólicas, las cuales a su vez se asocian frecuentemente con patrones de mADN aberrantes [66–68]. De hecho, existen estudios *in vivo* e *in vitro* que respaldan la idea de que los AG en la dieta son capaces de remodelar el metiloma directamente.

### **2.5.1 Evidencia *in vivo***

Estudios en humanos muestran que los AG están asociados con cambios en mADN tanto a corto como largo plazo. Una dieta alta en SFA o PUFA por siete semanas en humanos se tradujo en cambios en la mADN de varios genes del tejido adiposo, mayormente inducidos por los PUFA [26]. Otro estudio analizó los efectos de una HFD por 5 días en el músculo esquelético de adultos clasificados como normal o bajo peso al nacer [72]. Los dos grupos no mostraron diferencias en la mADN antes de la intervención con HFD. Sin embargo, después de la HFD se observó que solo el grupo de peso normal al nacer presentó cambios en la mADN. El mismo fenómeno se observó sobre cambios en la mADN en los genes de la leptina y la adiponectina en tejido adiposo después de 36 horas en ayuno. Solo los adultos clasificados por un peso normal presentaban cambios en la mADN de estos genes [73]. En conjunto estos dos experimentos muestran que un bajo peso al nacer tiene efectos a largo plazo sobre la mADN en la vida adulta; en este caso la pérdida de la plasticidad en la mADN bajo estímulos metabólicos.

Existe muy poca evidencia respecto a los efectos de AG específicos sobre el metiloma humano o en otros mamíferos. Un ejemplo son ratones hembras suplementadas con ácido eláídico durante el embarazo y la lactancia [13]. Se observó que su progenie tenía niveles más altos de mADN en tejido adiposo a los 3 meses de vida (vida adulta) respecto a los controles, cuyas madres recibieron únicamente el vector aceite de soya.

### **2.5.2 Evidencia *in vitro***

Experimentos *in vitro* han demostrado que AG específicos inducen cambios en la mADN. Por ejemplo, una estimulación con AA o ácido palmítico induce una respuesta de hipermetilación en células de monocitos y de islotes pancreáticos humanos, respectivamente [12,74–76]. Por otro lado, el ácido oleico o eicosano-pentaenoico (EPA) produjo hipometilación global en células de monocitos o gen-específica en células de leucemia, respectivamente [12,77].

Respecto a la hipermetilación inducida por el AA en células monocíticas THP-1 o fibroblastos embrionarios de ratón, se sabe que es completamente dependiente de la actividad del receptor nuclear activada por el proliferador de peroxisoma alfa

(PPAR $\alpha$ ) y la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, y parcialmente dependiente de Sirtuina 1 (Sirt1) [12]. El último es una deacetilasa de histonas que entre sus blancos está un coregulador de PPAR $\alpha$ , *Ppar-gamma, coactivador 1 alfa* [12,78,79].

## **2.6 El AA: un ácido graso poliinsaturado y su metabolismo**

El AA (C20:4n-6) es un PUFA originado a partir de su precursor, el ácido linoleico, o bien, puede provenir directamente de la dieta. Las principales fuentes de AA en la dieta son el pollo y el huevo, en menor medida la carne de res, puerco, pavo y embutidos [80]. Los PUFA, y en particular el AA, representan mucho más que fuentes energéticas y de función estructural. Son moléculas con varias funciones biológicas, incluyendo el mantenimiento de la fluidez de la membrana celular, la agregación plaquetaria, protección contra el estrés oxidativo, e inhibición o promoción de procesos inflamatorios, entre otras [25].

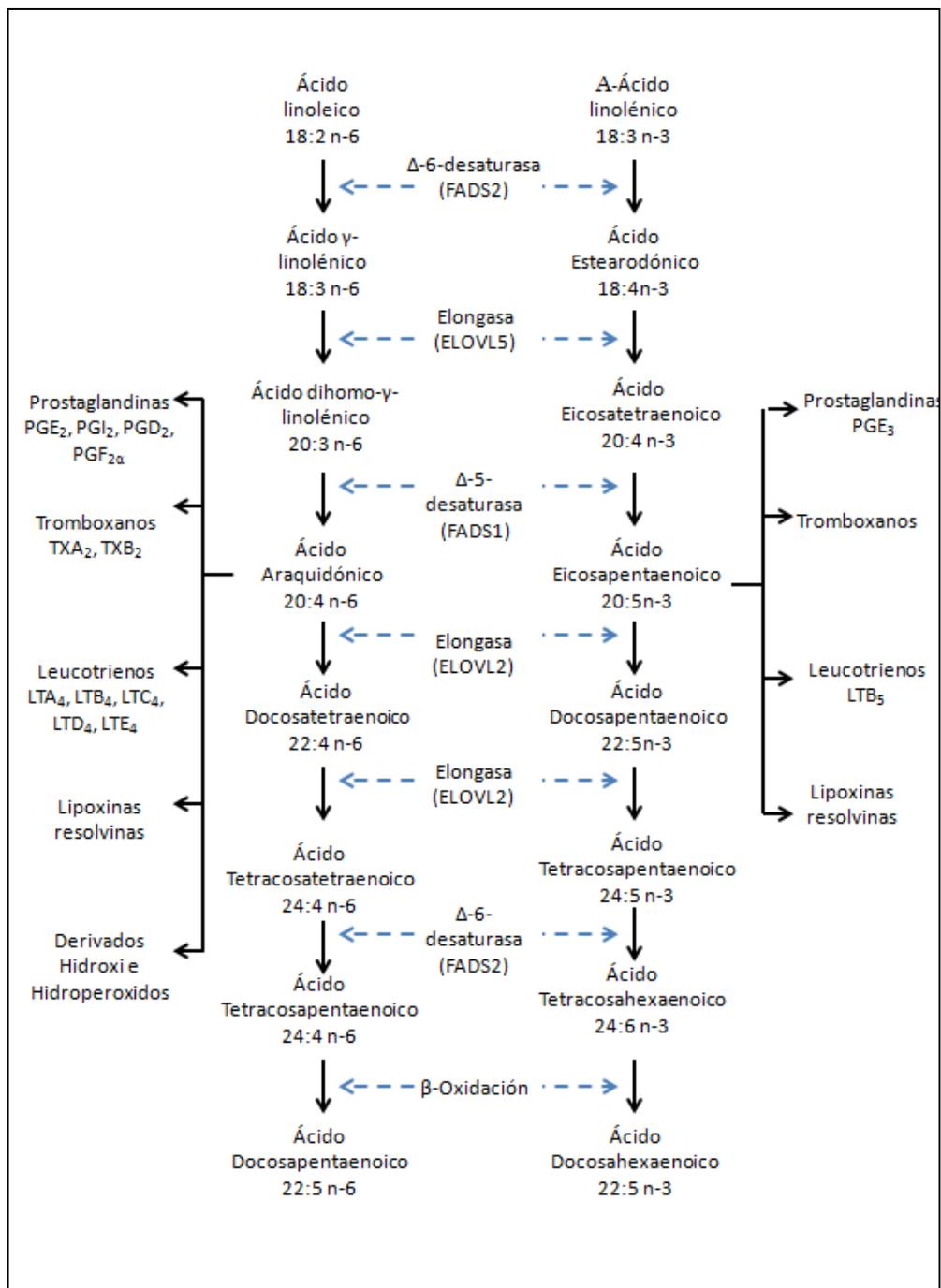
El AA está también asociado con parámetros de desarrollo óptimos en las etapas tempranas de la vida [81]. Por ejemplo, existe una correlación positiva entre el peso al nacer y la circunferencia de cabeza y los niveles de AA en sangre del cordón umbilical de recién nacidos prematuros [82]. También se encontró una correlación entre la densidad ósea y el contenido de AA en la sangre umbilical [83,84]. A su vez, suplementarlo en cerdos en etapas tempranas del desarrollo se traduce en una mayor densidad ósea y peso corporal [85]. La deficiencia de AA en modelos murinos se traduce en un retardo del crecimiento, afecciones en la piel, úlceras en córneas e intolerancia a los alimentos [86]. Por lo anterior, el AA está suplementado casi de manera estándar en todas las fórmulas lácteas con la recomendación nutricional de que su contenido sea de al menos de 0.35% en AG, y considerándose adecuado el 0.5 % [87,88]. Por otro lado, un estudio reciente en población infantil mexicana encontró una correlación positiva entre la relación AA/EPA y el peso en niños obesos [84].

El AA es transportado al plasma en forma esterificada y no esterificada, unido a lipoproteínas y albúmina, respectivamente, y es compartimentalizado en los fosfolípidos de la membrana celular [89]. Diversos estímulos físicos y químicos movilizan el AA para su subsecuente metabolismo, como para la producción de los eicosanoides (prostanoides, leucotrienos, lipoxinas ácidos epoxieicosatrienoicos y

ácidos hidroxieicosatetraenoicos), para ser convertido a AG de cadena larga, o sufrir  $\beta$ -oxidación [90,91].

Tanto los PUFA n-3 como n-6 pueden servir como precursores de prostaglandinas (PG). El AA es el precursor inmediato de las PG de la serie dos, mientras que las PG de la serie tres se derivan del EPA (**Figura 4**). Ya que el metabolismo de los PUFA n-3 y n-6 comparten las mismas enzimas, la proporción y cantidad de las PG producidas estarán alteradas por el contenido en la dieta de los n-3 y n-6 [92]. Los eicosanoides derivados de n-6 son comúnmente considerados proinflamatorios - por ejemplo, las enzimas ciclooxigenasa 1 y 2 (COX1 y COX2) que dan lugar a las PG, son blancos de terapias antiinflamatorias [93]. Por otro lado los eicosanoides derivados de los n-3 son antiinflamatorios [94,95]. Sin embargo, esto es resultado de una simplificación ya que también ciertos eicosanoides derivados de AA como PGE<sub>2</sub> tienen funciones antiinflamatorias [95]. De igual manera, se ha observado que otro AG, el cis-7-hexadecenoico (C16:1 n-9), producto de la  $\beta$ -oxidación del ácido oleico, tiene capacidades antiinflamatorias en ratón [96]. Este dato es de especial interés, ya que la estimulación con AA en monocitos cultivados produce la acumulación de este AG [96].

En la actualidad, existe mucha controversia acerca del papel que tienen los n-6 en la enfermedad, y en especial los productos del metabolismo de AA sobre procesos inflamatorios. Por un lado, varios autores han asociado el consumo elevado de éstos con la producción de marcadores proinflamatorios y un mayor riesgo de padecer enfermedades metabólicas [95,97]; por otro lado, otros estudios no son del todo concluyentes [98,99]. Otro componente que complica entender los efectos de AA sobre procesos inflamatorios es el hecho que también EPA y DHA dan lugar a compuestos que afectan estos procesos [100]. Además, falta todavía mucha información acerca del mecanismo exacto involucrado en la liberación preferencial de AA, EPA o DHA de los lípidos de la membrana celular y su subsecuente conversión a sus productos específicos. Es razonable sugerir que un balance entre estos compuestos mutuamente antagonistas tiene un papel fundamental en la iniciación, progresión y resolución de procesos patológicos [101].



**Figura 4. Metabolismo de los PUFA n-6 y n-3.** El metabolismo de los PUFA es un proceso complejo que involucra muchas enzimas desaturasas y elongasas, así como de β-oxidación. En la figura se muestra la ruta del metabolismo de n-6 y n-3 hacia los AG más insaturados y largos de cada familia, así como los eicosanoides derivados, de arriba para abajo, comenzando con la serie de 18 carbonos provenientes de la dieta (adaptado de [102]).

Dado que el AA puede promover cambios en la mADN *in vitro*, el enfoque principal de esta tesis es explorar los efectos de AA *in vivo* sobre estos parámetros en humanos y un modelo de ratón. Para este fin analizamos: 1) si existe una correlación entre la mADN y AA en una cohorte de humanos en respuesta a una sola dieta por un día, así como el estado metabólico; 2) el efecto de un suplemento de AA en etapas periconceptuales en ratones sobre la mADN total y gen-específica, así como su relación con los AG sistémicos; y 3) los efectos de un suplemento de AA sobre el peso corporal y en tejidos específicos, dado que el AA tiene efecto sobre el peso y desarrollo en la vida temprana.

### 3 Hipótesis

El AA es un modificador importante de la mADN *in vivo* a corto y a largo plazo; a corto plazo durante dos estados fisiológicos diferentes en humanos adultos; el ayuno y el postprandial, y a largo plazo de manera transgeneracional en un modelo murino.

### 4 Objetivos

#### 4.1 Objetivo general

Analizar si existe una correlación entre la exposición a AA, el peso corporal y la mADN en humanos y en un modelo experimental de ratón BALB/C dentro y a través de tres generaciones.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Analizar muestras de sangre, tomadas cada dos horas durante dos días experimentales (uno en ayuno y uno postprandial) en 12 hombres clasificados de acuerdo a su IMC, respecto a:
  - El perfil de AG
  - La mADN global y gen-específica en *histona deacetilasa 4 (HDAC4)* y *piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK4)*
  - Correlaciones entre peso, mADN y AG específicos
- Suplementar ratones machos y hembras de la cepa BALB/C con AA previo al cruce (10 días) o durante el embarazo (20 días), por tres generaciones.
- Analizar muestras de hígado, cerebro y testículos en progenie de ratones de un mes de edad expuestas al AA, respecto a:
  - Los pesos corporales, de hígado y de cerebro
  - El perfil de AG
  - La mADN en hígado, cerebro y testículos
  - La mADN de la región promotora de *estearoil-Coenzima A desaturasa 1 (Scd1)*, *Coactivador 1 alfa de PPARG (Pparpgc1a)* y *desaturasa de ácidos grasos 2 (Fads2)*, en hígados
  - Correlaciones entre peso, mADN y AG específicos

## 5 Estrategia experimental

### 5.1 Análisis en humanos

Participaron en este análisis doce hombres mexicanos distribuidos equitativamente entre las tres clases convencionales de índice de masa corporal (IMC):  $<25 \text{ kg/m}^2$ , eutróficos;  $\geq 25$  y  $<30 \text{ kg/m}^2$ , sobrepeso;  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ , obesos. Los sujetos consumieron un único platillo típico de la dieta "occidental" estándar al inicio del día y produjeron cinco muestras de sangre venosa cada dos horas (**Figura 5**). Los mismos sujetos se sometieron a ayuno total en un día distinto y se obtuvieron también cinco muestras de sangre venosa cada dos horas. Para todas las muestras se analizó la mADN total, así como el perfil de 18 AG.

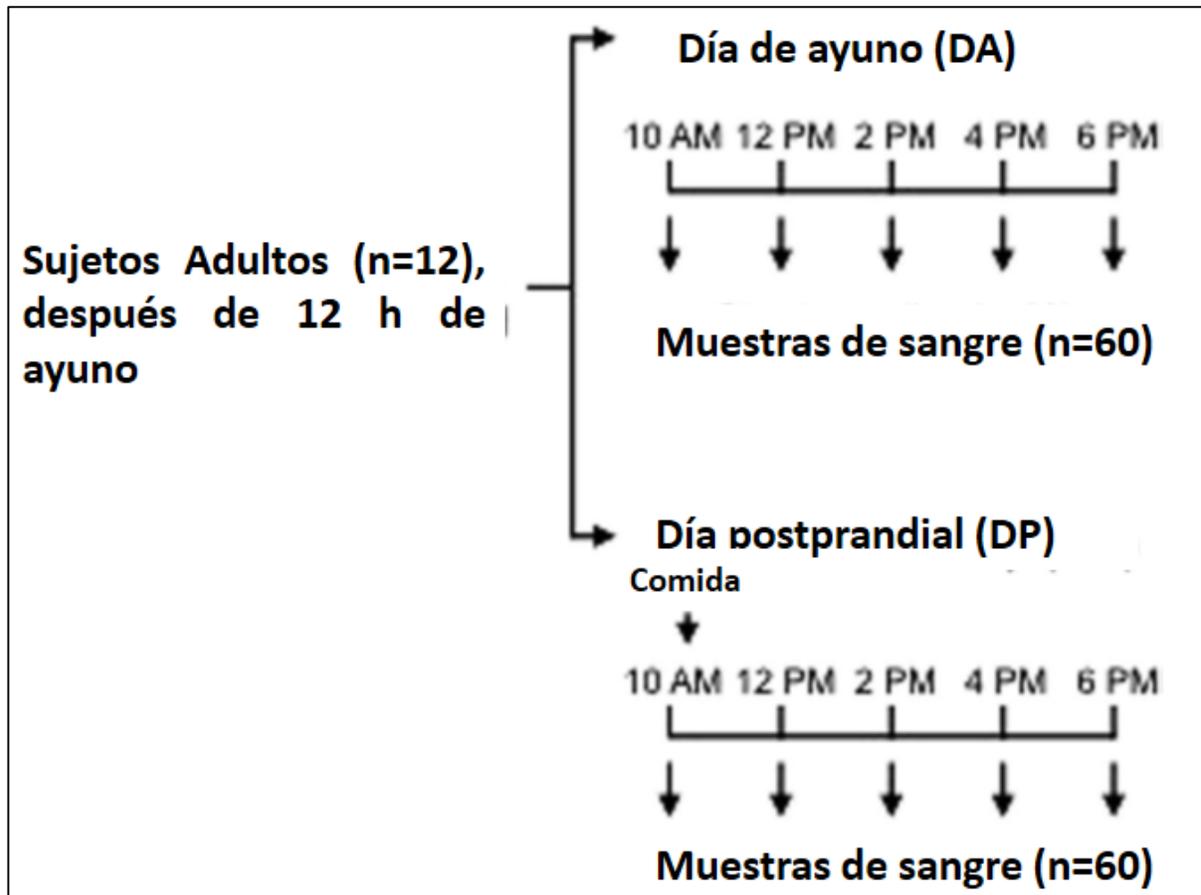


Figura 5. Toma de muestras en cohorte de humanos adultos.

## 5.2 Estudios en ratones

Todos los experimentos con ratones, se llevaron a cabo en el bioterio de la Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, en colaboración con el Dr. Luis Manuel Orozco Castellanos.

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/C, siguiendo la normatividad señalada en la NOM-062-ZOO-1999 de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Se mantuvieron en cama sanitaria y con agua y alimento *ad libitum* (5001 LabDiet de PURINA®).

### *Suplementación con AA:*

Tanto las hembras como los machos recibieron el suplemento de 1.1 y 1.35 mg de AA respectivamente (SIGMA-ALDRICH® Número de catálogo: A9673 de hígado porcino  $\geq 99\%$  puro), disuelto en aceite de soya (SBO, por las siglas en inglés de *soy bean oil*) (Nutrioli®) libre de AA (**Tabla 1**). Cada mañana (entre 8 –10 am), se administró el suplemento en un volumen total de 5  $\mu\text{L}$  por vía oral, con una micropipeta en un solo bolo. Los controles recibieron únicamente el SBO, tanto por vía materna como por vía paterna (5  $\mu\text{L}$ ) y un grupo no suplementado (NS, la suplementación materna y paterna se detalla a continuación).

**Tabla 1.** Perfil de ácidos grasos en el alimento para roedor de laboratorio 5001 y aceite de soya Nutrioli®.

	% del total de ácidos grasos	
	5001	Nutrioli®
C14:0 (Mirístico)	1.15	ND
C16:0 (Palmitico)	19.74	10.85
C18:0 (Esteárico)	10.09	4.76
C20:0 (Araquídico)	0.31	ND
C16:1n-9 (cis-7-hexadecenoico)	0.09	ND
C16:1n-7 (Palmitoleico)	1.80	ND
C18:1c (Oleico)	28.09	20.92
C18:1t (Elaídico)	3.07	2.35
C20:1 (Eicosenoico)	0.77	ND
C18:2n-6 (Linoleico)	29.92	54.31
C20:4n-6 (Araquidónico)	0.18	ND
C:20:3n-6 (DGLA)	0.11	ND
C18:3n-3 (Linolénico)	2.32	5.38
C20:5n-3 (EPA)	1.06	ND
C20:6n-3 (DHA)	0.99	ND

Se determinó el nivel de AG específicos como se describe en el inciso 5.5 ND: no detectado.

### 5.2.1 Suplementación transgeneracional de AA

La **Figura 6** muestra un esquema general de los experimentos con la suplementación de AA.

*Suplementación por vía materna:* Las hembras recibieron una dosis de AA durante el periodo de embarazo (20 días) a partir de la fecundación (día 1) detectada por la aparición de un tapón vaginal [103]. A las 12 semanas de edad, la progenie F1 femenina recibió el mismo tratamiento que sus madres y así sucesivamente hasta la generación F2.

*Suplementación por vía paterna:* En la generación F0 los machos recibieron la dosis de AA diariamente durante 10 días. Después se realizaron las cruza con hembras de la misma cepa pura utilizando el efecto Whitten para sincronizar el periodo estral de las hembras [104]. A las 12 semanas de edad, la progenie F1 masculina recibió el mismo tratamiento que sus padres y así sucesivamente hasta la generación F2.

Con el fin de identificar posibles efectos dosis-dependientes se suplementaron hembras de la generación F0 con el doble de la dosis de AA (2.2 mg/día) durante el embarazo.

### 5.2.2 Análisis de la progenie F1, F2 y F3

Al destete, la descendencia de cada generación fue pesada y sexada. Se sacrificaron por dislocación cervical al menos 5 machos y 5 hembras de cada grupo, elegidos aleatoriamente, tomando una hembra y un macho de cada jaula. Se les extrajeron hígado, cerebro y testículos (en machos), que fueron pesados y almacenados en *RNA later* (AMBION®) a -20 °C hasta su análisis.

La **Tablas 3 y 4** de la sección de resultados muestra el tamaño de muestra de cada grupo suplementado por generación y su progenie. Los AG, la mADN global y gen-específica, se analizaron conjuntamente en material de tres machos o tres hembras utilizando los mismos individuos para cada uno de los experimentos. Es decir, se tomó la misma cantidad de órgano de cada uno de los tres individuos, se mezclaron y los análisis se llevaron a cabo sobre esta mezcla, ya sea de hembras o machos.

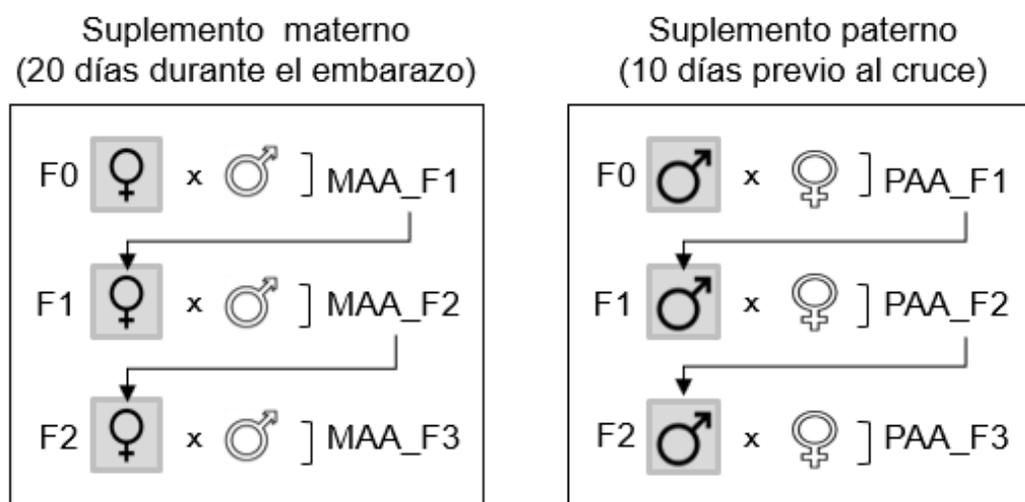
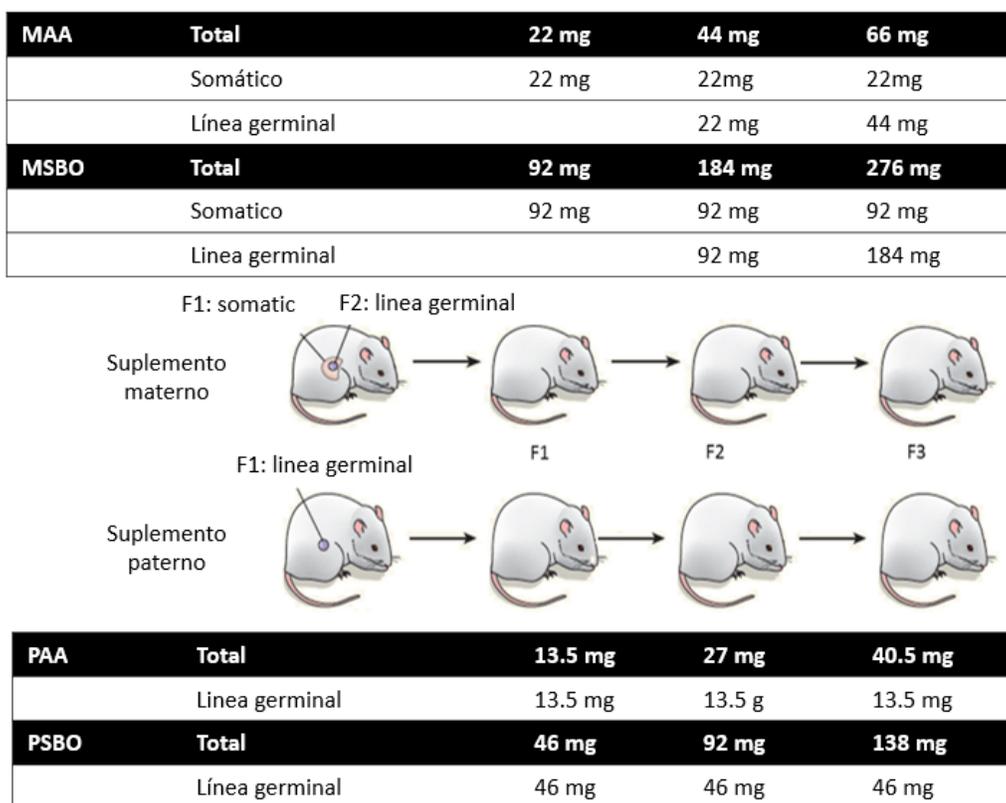


Figura 6. Esquemización del suplemento materno y paterno de AA por tres generaciones (MAA y PAA, respectivamente).

### 5.3 Cálculo de exposición acumulativa

La exposición acumulativa a AA o SBO se cuantificó sumando los mg de exposición de la línea germinal más la exposición somática (**Figura 7**). Por ejemplo, para la suplementación materna el suplemento diario (1.1 mg/día de AA o 4.59 mg/día de SBO) [105] fue multiplicado por el periodo de suplementación (ejemplo: 1.1\*20 días). Considerando que la suplementación materna de F0 afecta la línea germinal que da lugar a la generación F2 (y de la misma manera para la suplementación de F1 que afecta la línea germinal que da lugar a F3), estos mg también se consideran para calcular los mg de exposición a AA por generación. En la suplementación paterna, solo la línea germinal estuvo expuesta; entonces se obtuvieron los mg de exposición de AA multiplicando los días de exposición por el tiempo de suplemento (1.35 mg de AA o 4.59 mg de SBO \*10 días).



**Figura 7. Determinación de los mg suplementados en ratones acumulativamente.** El suplemento materno ocurre tanto en la línea germinal como somático, mientras que el paterno únicamente en la germinal (MAA, suplemento materno con AA; MSBO, suplemento paterno con SBO; PAA, suplemento paterno con AA; PSBO, suplemento paterno con SBO).

#### **5.4 Extracción de lípidos totales en hígado**

Se extrajeron los lípidos totales de ~30 mg de tejido hepático de progenie suplementada al mes de edad mediante inmersión en 10 ml de cloroformo durante 3 semanas a 4°C. El contenido total de grasa hepática se calculó como porcentaje de pérdida de peso; es decir se pesaron los hígados al inicio y después de tres semanas de tratamiento y la pérdida de peso se tradujo en porcentaje de lípidos.

#### **5.5 Medición de ácidos grasos**

Para el análisis del perfil de los AG, éstos se analizaron como metil-ésteres mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, por duplicado. Las mediciones se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. Jorge Molina del Departamento de Bioquímica, CINVESTAV- Irapuato.

Para las muestras en humanos, se analizó 500 µL de sangre total de cada de las tomas a lo largo del día de ayuno y del día postprandial (**Figura 6**). En ratones, para cada grupo experimental se analizó una muestra representativa de los tejidos derivada de tres hembras y tres machos. Los tejidos fueron molidos con nitrógeno líquido y secados con centrifuga de vacío de velocidad (MAXI DRY). Se utilizaron 10, 20 y 60 mg de tejido seco de testículos, hígado y cerebro, respectivamente.

Se incubaron las muestras a 90 °C por 1 hora con 1 mL de NaOH 0.5 M en metanol y 20 uL de ácido metil nonadecanoico (3.3 mg/mL) como estándar interno. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se agregó 1 mL de BF<sub>3</sub> en metanol y se incubaron 30 minutos a 90 °C. Nuevamente se dejaron enfriar a temperatura ambiente y fueron transferidas a un tubo limpio. Se agregaron 2 mL de agua desionizada y 5 mL de hexano, se mezclaron vigorosamente por 10 segundos y se centrifugaron 3 minutos a 13000 rpm. Se colectó la fase orgánica y el solvente fue evaporado con gas nitrógeno. Cada muestra seca fue suspendida en 400 uL de isoctano para ser analizada.

Se analizaron las muestras en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890A) utilizando una columna capilar DB-1MS UI (30 m x 250 µm x 0.25 µm) acoplado a un espectrómetro de masas por impacto de electrones (Agilent Technologies 5975C). El programa y la temperatura fueron los siguientes: temperatura inicial 150 °C por 3 min, después se incrementó a una tasa de 4

°C/minuto hasta 300 °C y se mantuvo por 10 minutos. La temperatura de inyección fue de 250 °C y se mantuvo constante. Se utilizó gas helio (2 ml/min) como acarreador. La muestra se inyectó con un Split 10:1. Para la identificación de los metil ésteres de AG, se utilizó el software MSchem para coleccionar los datos m/z y el software NIST MS Search para comparar el espectro de masas y el tiempo de retención, contra la base de datos NIST 2011 (*National Institute of Standards and Technology Mass Spectra Database U.S. Department of Commerce*). Los isómeros de C18:1 y C16:1 se identificaron utilizando estándares de ácido eláidico (Sigma, E4637) y los C16:1n-9 y C16-1n7 (Cayman Chemical, no. 100009871 y 10007290 respectivamente). Ambos fueron derivatizados y analizados como se describió previamente.

## 5.6 Extracción de ADN

*Sangre periférica de humanos:*

Se extrajo ADN de 200 µL de sangre total con el kit de extracción *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

*Tejidos de ratón:*

Para la extracción de ADN de los tejidos (hígado, cerebro y testículos), se realizó una molienda con mortero y nitrógeno líquido. Posteriormente se dejó una alícuota de tejido en agitación toda la noche a 37 °C (o 3 horas a 55 °C) con 30 µL de proteinasa K (10 mg/µL), 600 µL de TL BRAIN (10 mM Tris-HCl pH 4, 10 mM EDTA, 200 mM NaCl) y 10 % de SDS. Al observar que el tejido estuviese completamente degradado, se inactivó la proteinasa K con una incubación a 75 °C por 15 minutos. Consecutivamente se agregaron 500 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (5:24:1); se agitó 10 minutos y se centrifugó 15 minutos a velocidad máxima. Se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 500 µL de cloroformo. Nuevamente se centrifugó 5 minutos a velocidad máxima. y se separó la fase superior. Subsiguientemente se precipitó el ADN agregando un volumen de etanol absoluto frío (-20 °C) y 20 µL de acetato de sodio 0.5 M. Se agitó y en ese punto se observó a simple vista el agregado de ADN. Se dejó precipitando 60 minutos y se centrifugó 15 minutos a 4 °C a 6000 rpm. Se desechó el sobrenadante teniendo cuidado de no perder el *pellet*. Se agregó etanol al 70 % (enfriado a -20 °C) al *pellet* y nuevamente

se centrifugó 15 minutos a 6000 rpm. Se desechó el sobrenadante, el *pellet* se dejó secar durante 10 minutos. El ADN fue resuspendido en agua inyectable estéril, se añadió 1 µL de RNasa A (10 mg/mL) y se incubó 30 minutos a 37°C. Se verificó la extracción e integridad del ADN por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

## 5.7 Análisis de mADN

El análisis se realizó mediante el *MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit*, el cual cuantifica específicamente los niveles de 5-metilcitosina (5-mC) en una microplaca. En esta técnica se coloca la muestra de ADN en una tira de pozos que son tratados para tener una alta afinidad al ADN. La fracción metilada del ADN es detectada por anticuerpos y después cuantificada por absorbancia. La cantidad de ADN metilado es proporcional a las UFR (Unidades de Fluorescencia Relativa). Se utilizó ADN extraído de cerebro, testículos e hígado. Al igual que para el análisis de los AG, se agrupó por hembra y macho utilizando tres individuos de cada uno. Se cuantificó la concentración de ADN con *SYBR green* (INVITROGEN) y se utilizó un total de 50 ng por ensayo. Cada medida se hizo por duplicado y la cuantificación de la mADN se hizo de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

## 5.8 Análisis de mADN en genes específicos

En ambos estudios se analizó la mADN en genes específicos mediante pirosecuenciación por bisulfito.

En humanos: el ADN extraído fue convertido con bisulfito con el kit *EZ DNA Methylation™*, Zymo Research con el *PyroMark Q96 ID* (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Este ensayo fue realizado por Javier Carmona en el Instituto de Investigación Biomédica Bellvitge (IDIBELL) en Barcelona, España. Se utilizaron los oligonucleótidos diseñados con el software *PyroMark Assay Design* para analizar el estado de la mADN de 5 CpGs *PDK4* y 2 CpGs de *HDAC4*.

Los oligonucleótidos para PCR fueron (5' - 3'):

*PDK4*: GGTGGGAAGATTTGAATTTGAA y

AAACTACTCRAAACAAAACCTAATTCC (R indica A o G);

*HDAC4*: TGGGAGGTTTGTGTTGAGTT y CACCACCAAAAAATAACCACTA

Los oligonucleótidos para secuenciación fueron (5' - 3'):

*PDK4*: GGTATTTTTAAATTTTAGTTTAGG

*HDAC4*: TGGTTGTTAGTAGGTG

En ratones se analizó el estado de la mADN de los promotores de *Pparpgc1a*, *Fads2* y *Scd1* por pirosecuenciación en EpigenDx Inc. (Worcester, MA): *Pparpgc1a*, 4 sitios CpG comprendiendo 154 pb (Chr5:51945395-51945241); *Fads2*, 6 sitios CpG comprendiendo 38 pb (Chr19:10101826-10101788); *Scd1*, 3 sitios CpG comprendiendo 10 pb (Chr19: 44408468-44408458). Los perfiles se determinaron en ADN de ratón agrupado por hembras y machos como se describió previamente.

### 5.9 Análisis de expresión

El ARN total se extrajo utilizando el reactivo Trizol de hígados de hembras y machos de progeñie F2 y las muestras se agruparon como se describe para mADN, pirosecuenciación y determinación de AG. Tras el tratamiento con DNaseI (Thermo Scientific™ DNase I), se sintetizó ADN de cadena complementaria a partir de 1 µg de RNA (SuperScript™ II, Life technologies) y 1/50 del volumen se utilizó para la PCR semicuantitativa utilizando pares de oligonucleótidos específicos de genes para: *Scd1* y *Ppargc1a*. Los productos de RT-PCR se cuantificaron mediante escaneo densitométrico (Quantity one, BioRad) y los datos se normalizaron con el gen que codifica para la proteína ribosomal de ratón *36b4* y para los valores obtenidos en la progeñie NS.

Los oligonucleótidos fueron (5' - 3'):

*36b4*: ATGATTATCCAAAATGCTTCATTG y AACAGCATATCCCGAATCTCA

*Scd1*: CACCTGCCTCTTCGGGATTT y CTTTGACAGCCGGGTGTTTG

*Ppargc1a*: CAGGAACAGCAGCAGAGACA y ATGGTCACCAAACAGCCGAA

### 5.10 Análisis estadístico

Para comparación de grupos se utilizaron ANOVA y prueba Scheffé's *post hoc*, prueba t para muestras pareadas y correlación de Pearson o regresión múltiple para analizar la relación entre variables. Se consideraron significativas con un valor p < 0.05.

El análisis se realizó con el programa estadístico SPSS Versión 15.0.

## 6 Resultados

### 6.1 Estudios en la cohorte humana

#### 6.1.1 Asociaciones entre la mADN y AG a lo largo de un día en ayuno o un día postprandial

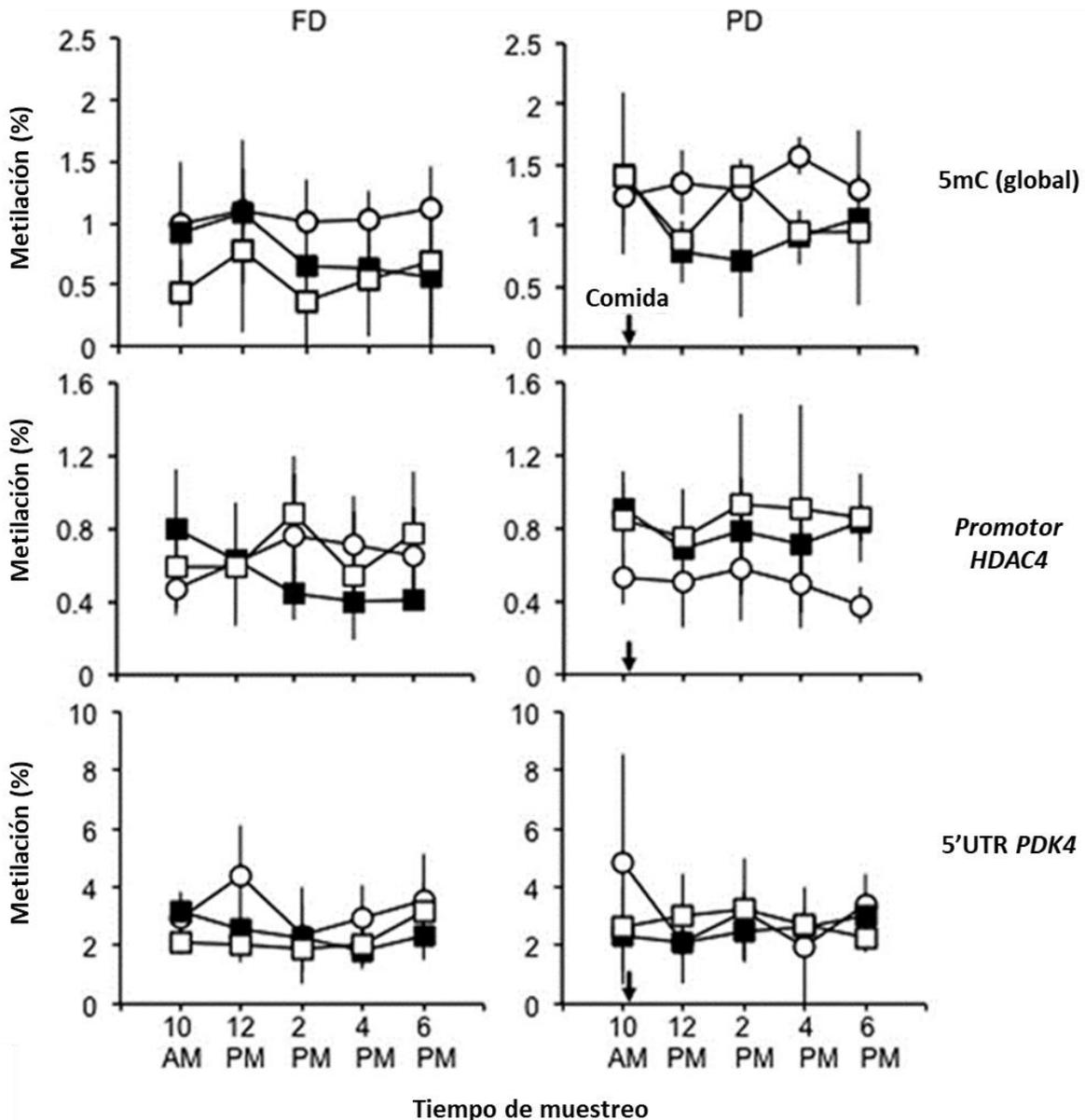
Dado que los AG inducen cambios globales y gen-específicos en la mADN en cultivo celular [12,74,76,77], nos preguntamos si los AG pueden modificar patrones de mADN de manera dinámica *in vivo* en humanos. Para este fin, se analizó una cohorte de 12 hombres metabólicamente sanos distribuidos igualmente entre las tres clases convencionales de IMC durante un día de ayuno y un día postprandial. Para cada sujeto se analizó la mADN global y gen-específico y el perfil de AG en sangre total tomada cada dos horas entre las 10 y las 18 pm. Se eligió analizar el estado de la mADN de la región promotora de los genes *HDAC4* y *PDK4*, ya que evidencia *in vitro* muestra que AG o lipoproteínas específicas pueden modular sus niveles de mADN [12,106].

Para cada día experimental se buscaron asociaciones entre la mADN global y/o gen-específica y AG específicos a lo largo de cada día experimental. Como se puede observar en la **Figura 8**, la mADN global y gen-específica muestra variación a lo largo de los dos días experimentales. Sin embargo, no detectamos correlaciones significativas entre la mADN global o gen-específica y los AG específicos a lo largo de los dos días experimentales.

#### 6.1.2 Diferencias en la mADN y AG específicos durante los días experimentales

Con el objetivo de aumentar la exactitud de medidas, se trataron las 5 muestras de cada día experimental como réplicas de cada sujeto. Usando un modelo de regresión, se mostró una dependencia significativa positiva entre la mADN y los PUFA totales, en específico con el AA y EPA en el día postprandial (**Tabla 2**). Por otro lado para el día de ayuno únicamente los PUFA y EPA mostraron una dependencia positiva. En cuanto a la mADN gen-específica, se encontraron las siguientes asociaciones: 1) en día postprandial el AA correlacionó de manera negativa con *HDAC4* ( $r = 0.5$ ;  $p = 0.046$ ), mientras que EPA correlacionó de manera

positiva con *PDK4* ( $r = 0.56$ ;  $p = 0.0499$ ). En el día de ayuno, no se encontró ninguna asociación entre *HDAC4* y los AG, mientras que *PDK4* mostró asociaciones significativas positivas con el AA ( $r = 0.866$ ,  $p = 0.0291$ ), EPA ( $r = 0.763$ ,  $p = 0.0261$ ) y los PUFA en conjunto ( $r = 0.763$ ;  $p = 0.0155$ ).



**Figura 8. Tendencias de la mADN a lo largo del período de muestreo en humanos.** Promedio y DS para  $n = 4$  sujetos por punto de tiempo. Círculos blancos: peso normal; cuadrados negros: sobrepeso; cuadrados blancos: obesos. Las flechas indican el tiempo aproximado de consumo de comida. FD; día de ayuno PD; día postprandial,

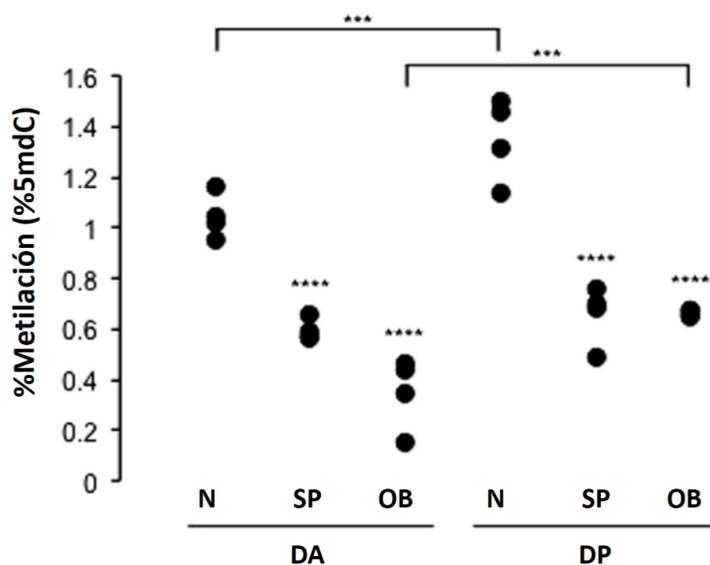
**Tabla 2.** Asociación entre mADN y AG específicos en un modelo de regresión lineal.

	DP			DA		
	$\beta$	T	P	$\beta$	T	P
SFA	-0.0088	-0.2792	0.7864	0.0599	1.6969	0.1239
MUFA	0.0175	0.703	0.4998	-0.0321	-0.7997	0.4445
PUFA	0.0214	3.7356	<b>0.004**</b>	0.0146	2.5549	<b>0.0309*</b>
C18:2(n-6)	0.0136	0.2947	0.796	0.0298	1.6037	0.1599
C18:3 (n-3)	2.0509	1.5249	0.2668	-0.2205	-0.2873	0.7835
C20:3 (n-6)	-0.0205	-0.0386	0.9727	-0.1471	-0.8513	0.4273
C20:4 (n-6)	0.1118	4.2941	<b>0.0013**</b>	-0.0623	-1.7656	0.1079
C20:5 (n-3)	0.7000	6.1371	<b>0.0001***</b>	1.1339	4.2449	<b>0.0017**</b>
C22:6(n-3)	0.4991	2.289	0.0513	0.0857	0.4889	0.6354

DP: día postprandial; DA: día de ayuno; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 6.1.3 La mADN, AG y el IMC

Cuando se analizó la mADN por IMC, se encontró que la mADN fue significativamente más baja en los sujetos obesos y con sobrepeso en comparación con los eutróficos, independientemente del estado de ayuno o postprandial (**Figura 9**).

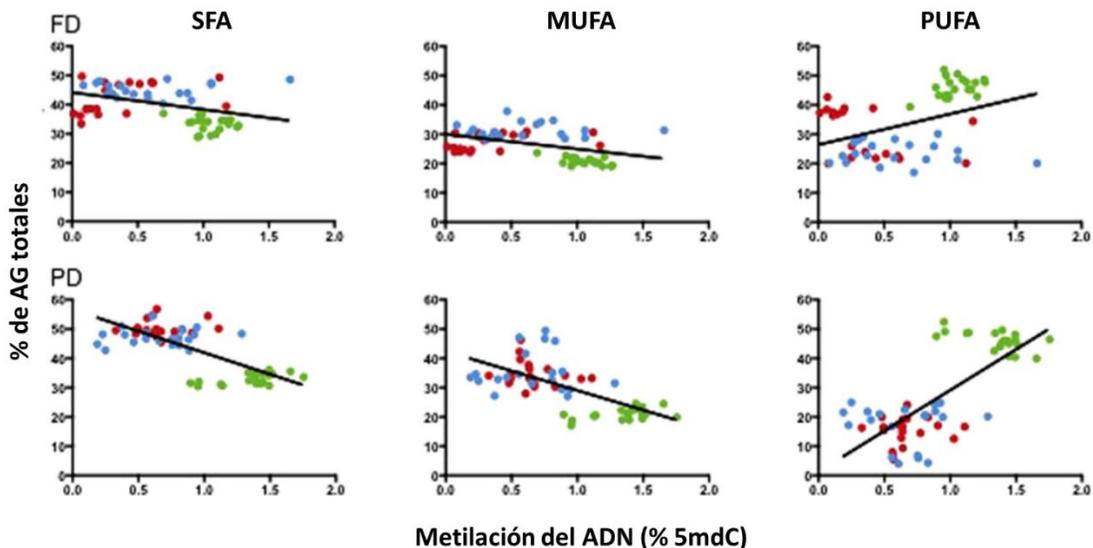


**Figura 9.** mADN en humanos con diferentes IMC. Los puntos de datos son los promedios de los cuatro sujetos de 5 mediciones repetidas en cada condición. N, SP y OB indican sujetos de peso

normal, con sobrepeso y obesos, respectivamente. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 10^{-4}$  ANOVA y prueba de Scheffé.

También se observó una diferencia más débil ( $p = 0.04$ ) entre los sujetos con sobrepeso y obesos, pero únicamente en el día de ayuno. Además, el análisis reveló cambios dinámicos en la mADN entre el día de ayuno y día postprandial. Para los sujetos de peso normal u obesos, la mADN fue significativamente más alta el día postprandial respecto al de ayuno.

Respecto a los AG, observamos que las personas con sobrepeso u obesidad muestran un mayor porcentaje de SFA y MUFA respecto a los eutróficos en ambos días experimentales (**Figura 10**). Sin embargo, se puede observar que dentro de cada grupo de IMC la tendencia fue opuesta, pero aún significativa.



**Figura 10: Distribución de los AG de acuerdo al IMC y mADN en humanos adultos.** Puntos verdes, peso normal; azules, sobre peso; rojos, obesos. Para cada IMC se muestra  $n=20$ , que representa las 5 mediciones de cada uno de los 4 sujetos de cada grupo.

En conjunto, estas observaciones muestran claramente que coexisten dos asociaciones de la mADN con rasgos metabólicos dinámicamente diferentes: 1) una hipermetilación determinada por el estado postprandial (o una hipometilación determinada por el estado de ayuno), que por lo tanto representa una respuesta de

corto plazo. 2) una asociación inversa con el IMC que, por el tiempo de evolución de este último, debe ser considerada una asociación de largo plazo

## **6.2 Estudios en ratones machos y hembras expuestos a AA por tres generaciones**

Para caracterizar los efectos de la exposición acumulada a AA, se expusieron un promedio de 18 ratones hembras o machos BALB/C a un suplemento diario de 1,10 o 1,35 mg de AA disuelto en SBO libre de AA durante tres generaciones consecutivas (F0, F1 y F2). Esta dosis de AA representa un 0.45% del total de AG o un 0.05% del total de la energía diaria, y se encuentra dentro de los valores presentes y recomendados en sucedáneos de leche materna [87,107]. Además, se expusieron 10 ratones F0 a una dosis doble de AA. Como control se utilizaron ratones expuestos solo a SBO y ratones que no recibieron suplementos (NS). Las características de las camadas y grupos se expresan en la **Tabla 3**. Los suplementos se administraron de la siguiente manera: 1) en hembras durante todo el embarazo (AA y SBO materno; MAA y MSBO, respectivamente); 2) en machos 10 días antes de aparearse (paterno AA y SBO; PAA y PSBO, respectivamente). En ambos casos, las hembras o los machos suplementados con AA o SBO se cruzaron con individuos no suplementados (NS) (**Figura 6**).

### **6.2.1 El efecto de la suplementación con AA sobre parámetros reproductivos**

Para cada hembra, se registraron la tasa de embarazo, el aumento de peso durante el embarazo, el tamaño de la camada y la proporción de sexos de la misma (**Tabla 3**). Ninguno de estos parámetros fue diferente significativamente, ni en relación con la progenie NS, ni entre la progenie AA y SBO. Además, la tasa promedio de embarazo de 65.4% y el tamaño de la camada en todos los grupos experimentales fue muy similar a la reportada previamente en ratones BALB/C (tamaño de camada de 5.9 y una tasa de embarazo de 64.9 %) [108]. Esto indica que la intervención no produjo efectos adversos sobre los parámetros reproductivos.

**Tabla 3.** Demografía de la muestra por tratamiento

Hembras o machos expuestos al suplemento de AG y características de las camadas							
Tratamiento	Generación	n	mg de exposición	% embarazo	% aumento de peso en embarazo	ratones/camada	machos:hem
MAA	F0	39	22	46.2	69.09±13.14	5.8±1.5	1.3
	F0 (2x)	10	44	90.0	74.11±13.6	4.6±1.2	1.3
	F1	7	44	100.0	81.26±14.84	5.0±1.6	1.3
	F2	9	66	33.3	58.79±8.48	6.7±1.5	0.3
PAA	F0	40	13.5	72.5	71.53±12.86	5.1±1.5	1.4
	F1	7	27	71.4	61.58±8.05	5.8±1.6	0.9
	F2	7	40.5	42.9	ND	5.3±1.5	0.5
MSBO	F0	38	92	65.0	65.06±12.62	5.2±2.0	1
	F1	8	184	66.7	73.88±12.12	4.5±0.8	1.1
	F2	5	276	44.4	61.22±0.48	6.0±1.0	1.3
PSBO	F0	40	46	57.9	71.4±5.2	4.4±2.0	1.2
	F1	9	92	100.0	85.15±9.77	5.7±0.8	1.1
	F2	9	138	60.0	ND	5.3±2.5	1.1
NS		37	0	65.4	68.59±12.16	5.4±1.4	1.1
Promedio		18.9		65.4	70.14±10.28	5.1±1.6	1.1
Valor p (ANOVA)						0.338	0.51

MAA y MSBO, suplementos materno con AA o aceite de soya respectivamente; PAA y PSBO, suplementos materno con AA o aceite de soya respectivamente, NS, no suplementados; ND, no determinado

### 6.2.2 El AA está asociado con un incremento en el peso corporal a través de las generaciones en ratones de un mes de edad

De la progenie resultante, se registró el peso corporal de F1, F2 y F3 al mes de edad de hembras y machos en todos los grupos suplementados (es decir, MAA, PAA, MSBO y PSBO) (**Tabla 4**). Para la progenie de F1 se registró también el peso a los 5 meses de edad. Los datos para la progenie de 1 mes de edad representaron un promedio de 52 ratones/generación/grupos suplementado, mientras que los datos correspondientes de la progenie F1 a los 5 meses representaron 10 ratones.

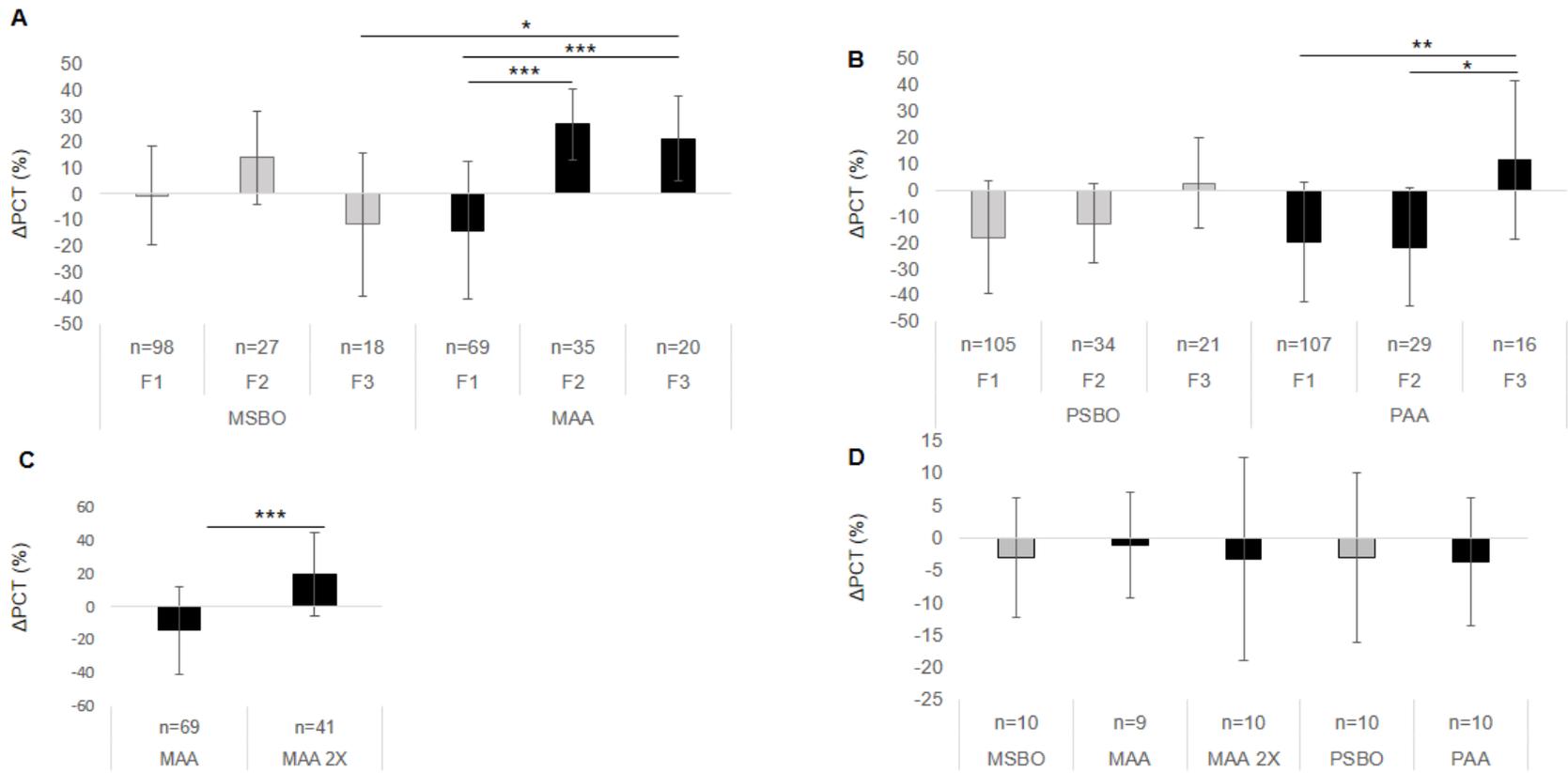
Para cada grupo experimental y generación se calculó el cambio en el peso corporal relativo al progenie NS.

A lo largo de las generaciones MAA, el peso corporal aumentó 47 y 40% en la progenie F2 y F3, respectivamente, con respecto a la progenie F1 ( $p = 9.6 \times 10^{-12}$  y  $p = 6.3 \times 10^{-5}$ , respectivamente) (**Figura 11A**).

**Tabla 4.** Demografía de la progenie por tratamiento

Características de la progenie de padres expuestos																
Tx	Gen.	1 mes									5 meses					
		(mg)			No. ratones			PCT (g)			No. ratones			PCT (g)		
		total	germ.	No. camada	todos	♂	♀	todos	♂	♀	todos	♂	♀	todos	♂	♀
MAA	F1	22	0	12	69	39	30	12.2±3.8	12.3±4.0	12.1±3.5	9	4	5	38.11±3.12	39.10±1.47	37.32±4.01
	F1(2x)	44	0	9	41	23	18	17.0±3.5	17.7±3.7	16.0±3.17	10	5	5	37.28±6.07	40.22±6.28	34.34±4.67
	F2	44	22	7	35	20	15	18.0±2.0	18.3±1.8	17.7±2.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	F3	66	44	3	20	5	15	17.2±2.3	18.7±3.1	16.7±1.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PAA	F1	13.5	13.5	21	107	62	45	11.4±3.2	12.1±3.3	10.4±2.8	10	5	5	37.13±3.79	38.52±4.81	35.74±2.10
	F2	27	27	5	29	14	15	11.1±3.2	11.3±3.6	10.9±2.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	F3	40.5	40.5	3	16	5	11	15.8±4.3	17.0±3.7	15.3±4.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MSBO	F1	92	0	19	98	49	49	14.1±2.7	14.9±2.8	13.3±2.5	9	5	4	37.87±3.4	39.50±3.07	35.26±2.80
	F2	184	92	6	27	14	13	<b>16.2±2.6</b>	17.1±2.7	15.2±2.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	F3	276	184	3	18	10	8	12.5±3.9	12.1±4.0	13.1±4.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PSBO	F1	46	46	24	105	58	47	11.6±3.1	12.4±3.0	10.7±2.8	10	5	5	37.38±5.04	40.60±3.05	34.16±4.69
	F2	92	92	6	34	18	16	12.4±2.2	12.2±2.4	12.6±2.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	F3	138	138	4	21	11	10	14.6±2.4	14.9±2.5	14.3±2.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NS	NS	0	0	11	108	57	51	14.2±4.1	14.5±4.3	13.9±3.8	8	5	3	38.55±3.33	39.54±3.90	36.9±1.30
Promedio				10	52	28	25	13.5±3.8	13.9±3.9	13.1±3.6	56	29	27	37.68±4.16	39.60±3.81	35.62±3.53

MAA y MSBO, suplemento de ácido araquidónico materno y aceite de soya, respectivamente; PAA y PSBO, ácido araquidónico paterno y suplemento de aceite de soya, respectivamente. NS, sin suplemento. Gen, generación; germ, exposición germinal; PCT, peso corporal total; Tx, tratamiento; ND, no determinado.



**Figura 11. Cambios en peso corporal relativo a la progenie no suplementada.** Media del cambio (delta) de peso (media  $\pm$  DS) al destete de la progenie de ratones hembras (A) o machos (B) expuestos a SBO (barras grises) y AA + SBO (barras negras) a través de las generaciones. C) peso corporal de la progenie de hembras expuestas al doble de la dosis de AA. D) cambio de peso corporal en ratones de 5 meses.

Además, el peso corporal aumentó significativamente en MAA en comparación con la progenie F3 de MSBO ( $p = 0.039$ ). Del mismo modo, la descendencia F3 de PAA mostró un aumento de 38 y 42% en peso corporal en relación con las generaciones F1 y F2 de la misma línea, respectivamente ( $p = 0.005$  y  $p = 0.022$ ) (**Figura 11B**). Las asociaciones descritas fueron similares tanto en la progenie femenina como en la masculina. Sin embargo, esta última mostró una tendencia hacia un aumento promedio más alto en el peso corporal a lo largo de generaciones en comparación con la progenie femenina (23 contra 21%, respectivamente;  $p = 0.084$ ) (**ANEXO 1**). Por otro lado, en los ratones de 5 meses (F1) (**Figura 11D**), aunque no significativo, todos los grupos presentaron un decremento de peso respecto al grupo NS.

### **6.2.3 El incremento en el peso corporal a un mes de edad es dependiente de la dosis de AA acumulado a través de generaciones**

Observamos que el aumento en peso corporal fue mayor en MAA en comparación con la progenie de PAA (27 % contra 11 %, respectivamente) (**Figuras 11A y B**). Esto podría sugerir un efecto dependiente de la dosis de AA, ya que el período de suplemento de AA materno y paterno fue de 20 y 10 días, respectivamente. Para abordar este problema directamente, se comparó el peso corporal de la progenie F1 de un mes de edad expuesta a una dosis única o doble de MAA (MAA2x) (**Figura 11C**). De hecho, la progenie F1 mostró un aumento significativo en peso corporal en MAA2x en relación con la progenie MAA pero no en relación con la progenie F2 de MAA ( $p < 3.4 \times 10^{-8}$  y  $p = 0.999$ , respectivamente).

Se cuestionó también si los miligramos (mg) de AA o SBO suplementado en cada generación se correlacionaban con el peso corporal, tomando en cuenta si la exposición fue en la línea germinal o en la línea germinal y somática. Para cada generación de progenie calculamos la cantidad de AA y SBO en mg a los que fueron expuestos, ya sea en la línea germinal (gAA y gSBO) o germinal y somáticamente (tAA y tSBO) como está descrito en los métodos apartado 5.3.

A lo largo de las tres generaciones, se observó que los mg de gAA o gSBO mostraron correlaciones positivas con el peso corporal en los grupos PAA y PSBO, respectivamente (**Tabla 5**). Por otro lado, solo los mg de tAA y- no de tSBO -

presentaron correlaciones positivas con el peso corporal en todos los grupos experimentales (toda la progenie, ambos sexos y MAA).

**Tabla 5.** Correlación entre los mg suplementados de AG y el peso de la progenie

		Peso corporal
GERMINAL	Toda la progenie	0.3350
	Progenie hembra	0.3090
	mg AA Progenie macho	0.3630
	MAA	0.6140
	PAA	<b>0.838*</b>
	Toda la progenie	0.0100
	Progenie hembra	0.2950
	mg SBO Progenie macho	-0.2160
	MSBO	-0.3810
	PSBO	<b>0.918**</b>
GERMINAL + SOMÁTICO	Toda la progenie	<b>0.868***</b>
	mg AA Progenie hembra	<b>0.861*</b>
	Progenie macho	<b>0.883*</b>
	MAA	<b>0.818*</b>
	Toda la progenie	0.2760
	mg SBO Progenie hembra	0.5240
	Progenie macho	0.0830
	MSBO	-0.3810
En negrita, correlaciones significativas con prueba de Pearson; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.		

También se analizó si los mg de tAA o gAA afectaron las tasas de embarazo y el tamaño y la proporción de camadas en todas las generaciones. Solo los mg de gAA afectaron a la relación macho:hembra en la progenie ( $r = -0.885$ ,  $p = 0.008$ ) (**ANEXO 2**) que explica la reducción de machos en la progenie F3 de PAA y MAA (**Tabla 3**). En conjunto, los datos muestran que la exposición de AA tanto por vía materna como por vía paterna está asociada con un aumento del peso corporal dependiente de la dosis. Por vía paterna por la exposición germinal y por vía materna por

exposición germinal y germinal más somática. Además, la exposición acumulativa de la línea germinal a AA afectó la proporción de sexos de la progenie.

#### **6.2.4 Correlaciones entre mg de AA, la mADN y AG en tejidos específicos**

Para analizar el efecto de los suplementos de AA y SBO sobre la mADN y AG específicos, se extirparon el hígado, el cerebro y testículos de ratones de 1 y 5 meses de edad. Para cada órgano, se registró el peso de en promedio 5 machos y hembras/generación (**ANEXO 3**). Después, se analizó la mADN global (**ANEXO 4**) y los niveles de 16 AG individuales (4 SFA, 5 MUFA y 7 PUFA) (**ANEXOS 5 y 6**) en los tres tejidos. Las medidas de la mADN y los AG se realizaron sobre un “pool” de 3 ratones machos o 3 ratones hembras como se describe en el inciso 5.2.2 de los métodos. En el hígado se analizó también el contenido total de grasa en hígados (**ANEXO 7**). Todos los análisis posteriores se realizaron en AG normalizados en porcentaje con respecto a la progenie NS.

#### **6.2.5 Efectos de AA sobre el peso y la mADN de órganos específicos**

Primero, analizamos si los pesos de los tres tejidos correlacionaban con el peso corporal. Para el AA los pesos del hígado, cerebro y testículos correlacionaron positivamente con el peso corporal ( $r = 0.982$ ,  $p = 0.0001$ ;  $r = 0.617$ ,  $p = 0.001$  y  $r = 0.775$ ,  $p = 0.0407$ , respectivamente) en la progenie de AA. Para SBO Se encontró la misma tendencia (hígado,  $r = 0.945$ ,  $p = 0.0001$ ; cerebro,  $r = 0.856$ ,  $p = 0.0004$  y testículos  $r = 0.872$ ,  $p = 0.023$ ). Esto indica que el AA afecta el crecimiento de órganos en general y no se asume obesidad, por ejemplo, por aumento de tejido adiposo.

Igual al análisis de peso corporal, analizamos si los mg de AG correlacionaban con el peso de cada órgano a través de las generaciones (**Tabla 6**). Para el peso del hígado, las correlaciones fueron idénticas que para el peso corporal (es decir la gAA y gSBO correlacionaron solo en línea paterna, y en todos los grupos con tAA). También el peso del cerebro correlacionó con los mg de gAA en la progenie PAA y con los mg de tAA en hembras y el de los testículos solo con tAA.

Respecto a la mADN únicamente se observó correlación entre gAA y mADN en hígado cuando se evaluó toda la progenie.

**Tabla 6.** Correlación entre los mg suplementados de AG y el peso y mADN órgano-específicos.

		Peso			mADN		
		Hígado	Cerebro	Testículos	Hígado	Cerebro	Testículos
GERMINAL	Toda la progenie	0.2930	-0.2314	NA	0.3666	0.2107	NA
	Progenie hembra	0.2130	0.0557	NA	-0.0226	0.3201	NA
	mg AA Progenie macho	0.3690	-0.3605	0.6330	<i>0.8403</i>	0.1501	-0.3166
	MAA	0.5540	0.1604		-0.2448	-0.2884	
	PAA	<b>0.830*</b>	<b>0.8240*</b>		0.6740	0.1422	
	Toda la progenie	-0.0100	-0.0261	NA	0.0404	-0.5519	NA
	Progenie hembra	-0.0360	0.0439	-0.1291	0.3159	-0.6062	NA
	mg SBO Progenie macho	0.0120	-0.0723	NA	-0.0653	-0.6517	-0.3420
	MSBO	-0.4240	-0.5149		-0.1054	-0.5425	
	PSBO	<b>0.854*</b>	0.5926		0.5070	-0.7885	
GERMINAL + SOMATICO	Toda la progenie	<b>0.838***</b>	0.4310	NA	<b>0.5836*</b>	-0.2545	NA
	Progenie hembra	<b>0.7970</b>	<b>0.7961*</b>	NA	0.5012	-0.0371	NA
	mg AA Progenie macho	<b>0.885*</b>	0.3936	<b>0.8302*</b>	0.6827	-0.6132	0.5222
	MAA	<b>0.830*</b>	0.1604		0.4958	-0.2884	
	Toda la progenie	0.2580	0.2276	NA	-0.2460	-0.2049	NA
	Progenie hembra	0.3020	0.2802	NA	0.1047	-0.2546	NA
	mg SBO Progenie macho	0.2230	0.2464	0.1021	-0.4339	-0.2321	-0.2615
	MSBO	-0.4240	-0.5149	NA	-0.6382	-0.5425	

En negrita, correlaciones significativas con prueba de Pearson; \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001; NA; no aplica, |, grupos insuficientes para realizar la prueba.

### 6.2.6 Correlaciones entre AG específicos observados y el peso órgano-especifico, mg de AG suplementados o la mADN

Posteriormente, se buscaron correlaciones con los AG individuales en hígado, cerebro y testículos dependiendo de: 1) mg suplementados de AA o SBO; 2) peso de los órganos; 3) mADN (**Tablas 7-10**, Excel adjunto). Estas correlaciones fueron hechas por los grupos “todos”, “hembras”, “machos”, “MAA o MSBO” y “PAA o PSBO”. En general, tanto en cerebro como en hígado, hubo más correlaciones entre estas variables y los AG observados en los ratones suplementados con AA versus SBO. En el hígado se encontraron el triple de correlaciones respecto a SBO, mientras que, en testículos, aunque hubo muy pocas en general, en particular fueron

más en los suplementados con SBO (**ANEXO 8**). Esto indica un efecto específico del AA en la variabilidad de los AG sobre todo en el hígado y el cerebro.

Solo el tejido hepático de la progenie expuesta a AA mostró correlaciones sólidas con AG específicos en todos los grupos de progenie (**Tabla 7**). Estos incluían EPA que se correlacionaba con mg tAA y cis-7-hexadecenoico que se correlacionó con el peso del hígado (es de destacar que en la progenie masculina la correlación entre tAA y EPA fue marginal:  $r = 0.727$ ,  $p = 0.064$ ). Además, de manera interesante observamos que el cis-7-hexadecenoico se correlacionó positivamente con todas las variables en el grupo “todos” (**Tabla 11**).

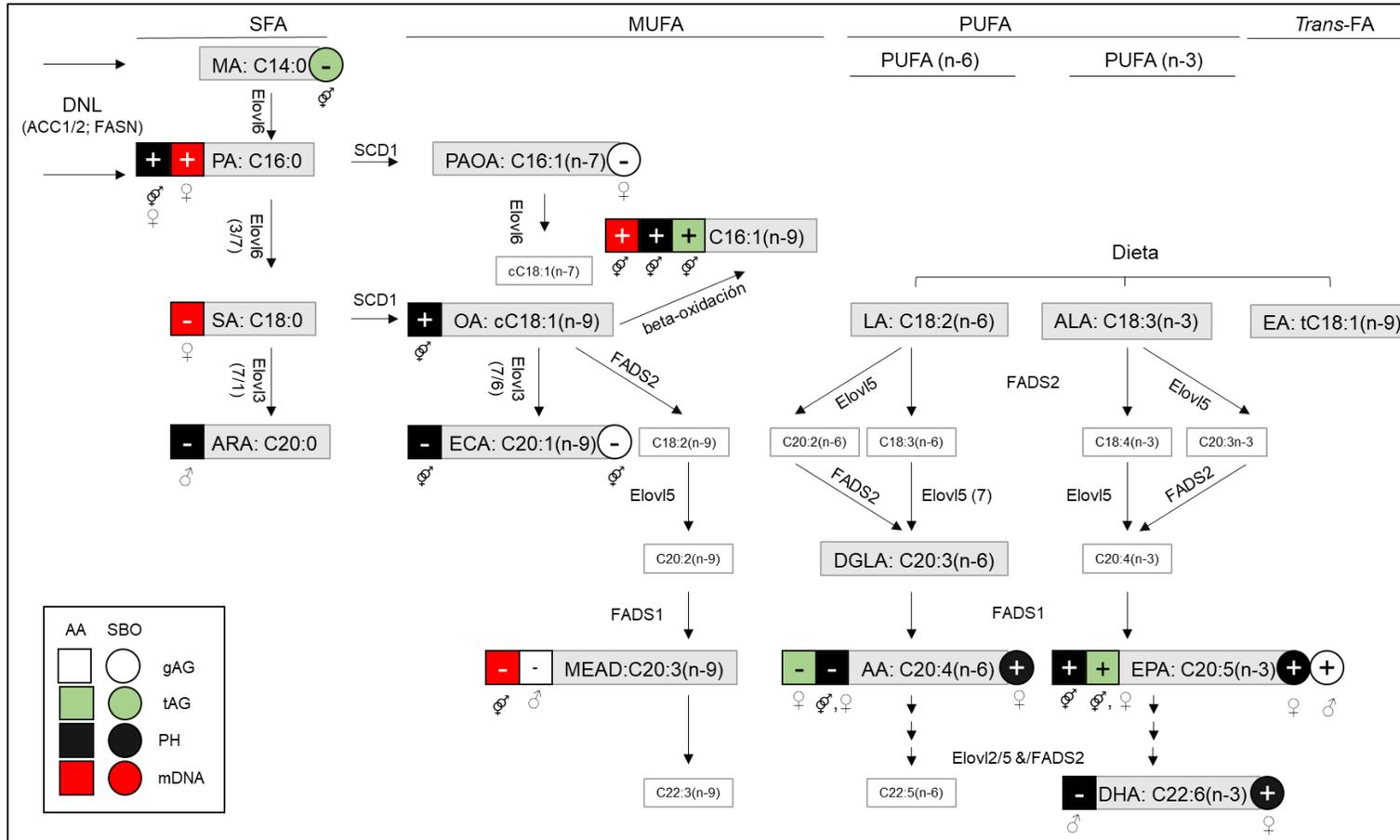
Para proporcionar una visión general de todas las correlaciones significativas independientes y dependientes del sexo entre los AG y cada variable en el hígado, se asignaron los AG a las vías de síntesis generales de los SFA, los PUFA y los MUFA (**Figura 12**). El peso del hígado está correlacionado positivamente con la acumulación de SFA y MUFA (en lo particular con el ácido palmítico, oleico, cis-7-hexadecenoico además de EPA, un PUFA n-3). Sin embargo, los PUFA AA y DHA muestran correlaciones negativas. Respecto a la mADN, ésta está correlacionada de manera positiva con el ácido palmítico y cis-7-hexadecenoico. En cambio, el peso del hígado en la progenie SBO se relacionó con un aumento en AG n-6 y n-3, AA, EPA y DHA.

Por lo general se observó poca superposición entre correlaciones a través de los tejidos. Sin embargo, en el hígado y el cerebro, el ácido palmítico y el ácido eicosatrienoico (también conocido como MEAD) se correlacionaron positiva y negativamente, respectivamente, con mADN en la progenie AA.

**Tabla 11.** Correlación entre mg AA suplementados en hígado, peso del órgano y mADN con AG individuales.

	% SFA				% MUFA					% PUFA					
	C14:0 Mirístico	C16:0 Palmitico	C18:0 Estearico	C20:0 Araquídico	C16:1 n7 Palmitoleico	C16:1n-9 cis-7-hex.	C18:1c n9 Oleico	C18:1t n9 Elaidico	C20:1 n9 Eicosenoico	C20:3 n9 MEAD	C18:2 n6 Linoleico	C20:4 n6 AA	C20:3 n6 DHGL	C20:5 n3 EPA	C22:6 n3 DHA
mg gAA	-0.0574	-0.0148	0.048	-0.1304	-0.2744	0.2889	0.2698	0.0234	-0.1172	-0.4777	-0.1388	-0.0268	0.2704	0.4702	0.0804
mg tAA	0.0203	0.4722	-0.1203	-0.4903	0.1328	<b>0.5790*</b>	0.2842	0.0055	<b>-0.6237</b>	-0.4316	-0.291	-0.4841	-0.331	<b>0.7571**</b>	-0.2232
PH	0.1824	<b>0.6545*</b>	-0.4985	-0.407	0.0231	<b>0.8023***</b>	<b>0.5525*</b>	-0.1213	<b>-0.6383*</b>	-0.3709	-0.3786	<b>-0.5535*</b>	-0.4229	<b>0.5357*</b>	-0.2834
mADN	-0.059	0.3107	-0.4477	-0.0465	-0.3192	<b>0.5575*</b>	0.4158	-0.2018	-0.3298	<b>-0.6406*</b>	-0.0547	-0.2767	-0.1977	0.3741	-0.117
mg gSBO	-0.4042	-0.0497	0.0386	-0.2404	-0.4805	-0.1463	-0.3141	<b>-0.6402*</b>	-0.4326	-0.5068	0.0829	0.2959	0.1054	0.3831	0.357
mg tSBO	<b>-0.5365*</b>	-0.2161	-0.101	-0.2346	-0.2789	0.2111	0.0525	-0.4397	-0.3118	-0.1471	0.0551	0.2487	0.1706	0.5118	0.4682
PH	-0.0011	-0.0969	-0.4946	-0.1977	0.0949	0.4626	0.4014	-0.3637	-0.2563	0.1097	0.1386	0.0654	0.1375	0.4012	0.3948
mADN	-0.1805	0.4358	0.2553	-0.3235	-0.3304	-0.1512	-0.2603	-0.2073	-0.2958	-0.0476	-0.1979	-0.151	-0.3962	-0.0972	-0.0674

En negrillas, correlaciones significativas determinadas por prueba de Pearson: las pruebas se realizaron usando el cambio relativo a la progenie NS: \*. P<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*p<0.001; en cursiva, p <1; ND=no detectable. PH: peso del hígado.



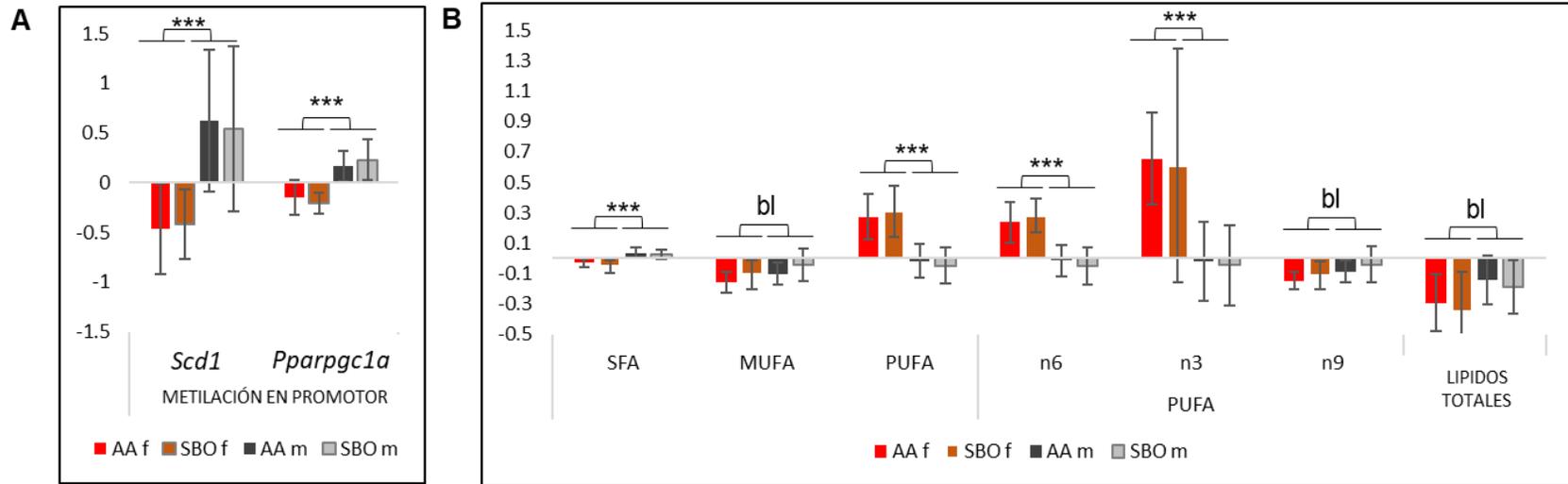
**Figura 12.** Diagramas esquemáticos de las vías de síntesis de los AG. Aquí se indican correlaciones observadas en hígado. Las casillas grises indican los AG analizados. Los símbolos de más y menos dentro de cuadrados y círculos indican correlaciones positivas y negativas, respectivamente con cada una de las variables analizadas; LDN, lipogénesis *de novo*.

### 6.2.7 El peso del hígado y la mADN en la progenie masculina se asocia negativamente con la mADN en el promotor de *Scd1*

Como se puede observar en la Figura 11, el peso del hígado correlacionó positivamente con AG que son precursores o productos de *Scd1* (el ácido palmítico y ácido oleico) y *Fads2* (EPA) o de  $\beta$ -oxidación (cis-7-hexadecenoico). Por eso decidimos analizar el estado de la mADN de las regiones promotores de *Scd1*, *Ppargc1a* y *Fads2*. Solo *Scd1* y *Ppargc1a* mostraron mADN detectable (**ANEXO 9**). El nivel de la mADN de ambas regiones fue significativamente menor en ratones hembras respecto a ratones machos expuestos a AA y SBO ( $p = 0.001$  en cualquier caso), pero no entre la progenie AA y SBO (**Figura 13A**). Además, observamos que la mADN de los promotores de *Scd1* y *Ppargc1a* correlacionaron positivamente en la progenie femenina de AA y SBO ( $r = 0.742$ ,  $p = 0.056$  y  $r = 0.816$ ,  $p = 0.048$ , respectivamente), pero no en la progenie masculina correspondiente ( $r = -0.045$ ,  $p = 0.924$  y  $r = 0.492$ ,  $p = 0.321$ , respectivamente). Eso sugirió que la mADN del promotor *Scd1* y *Ppargc1a* están corregulados en la progenie femenina. Cabe resaltar que en estos genes ya se ha descrito que la mADN del promotor correlaciona negativamente con la expresión [109–111], y si bien en nuestro análisis no resultó significativo, se observó una asociación negativa entre la mADN y la expresión (**ANEXO 11**).

Posteriormente, nos preguntamos si la mADN del promotor *Scd1* o *Ppargc1a* correlacionaba con los mg de AA (gAA o tAA), el peso del hígado, la mADN o AG específicos a través de las generaciones. Solo la progenie AA masculina y la progenie SBO femenina mostraron correlaciones significativas: la primera mostró correlaciones negativas con las tres variables y el ácido cis-7-hexadecenoico; este último mostró correlaciones positivas con peso del hígado, AA y DHA (**ANEXO 10**). Para entender si las diferencias específicas del sexo en la mADN de la región promotora de los genes *Scd1* y *Ppargc1a* estuvieron relacionadas con diferencias en la acumulación de SFA y MUFAs, se compararon los perfiles de AG promedio a través de generaciones y tratamientos de F1-F3. Observamos que los PUFA n-3 y n-6 aumentaron significativamente en la progenie femenina y disminuyeron en la progenie masculina, mientras que los SFA tuvieron un comportamiento opuesto a

los anteriores, por otro lado MUFA y PUFA n-9 y el contenido total de lípidos no difirieron, estadísticamente hablando (**Figura 13B**).



**Figura 13. Diferencias específicas por sexo en el metabolismo de AG de la progeñe expuesta a AA y SBO.** A) mADN del promotor de *Scd1* y *Pparg1α*. B) Promedio de perfiles de AG y lípidos totales de generaciones de progeñe F1-F3. Tanto en A como en B, los valores están normalizados a NS. Prueba t para muestras pareadas; \*\*\*,  $p < 0.0001$ . AAf, ; SBOf, progeñe femenina expuesta AA o SBO respectivamente; AAm, ; SBOm, progeñe masculina expuesta AA o SBO respectivamente.

## 7 Discusión

### 7.1 La mADN está relacionada con el IMC en humanos y el contenido de los PUFA en sangre

Nuestros datos muestran que la variación en la mADN global entre dos estados metabólicos diferentes, postprandial y ayuno, ocurre tanto en individuos eutróficos, como con sobrepeso y obesos. En cuanto a la mADN dependiente del tiempo durante el día, nuestros resultados no muestran un perfil claramente identificable de manera consistente. Por lo tanto, los datos obtenidos no soportan la ocurrencia de oscilaciones de mADN intraindividual a corto plazo impulsados por la dieta en un tiempo de 8 horas. Más bien, el aumento significativo en la mADN en estado postprandial se establece al menos en los dos IMC altos (sobrepeso y obesidad). La cohorte humana incluyó el análisis de dos genes, *HDAC4* y *PDK4*, ambos importantes reguladores del metabolismo de la glucosa y los AG [112–114]. Se encontró que las asociaciones opuestas de la mADN de *HDAC4* y de *PDK4* con los PUFA son consistentes con datos previamente publicados sobre las tendencias de correlación en estos dos genes entre la mADN y expresión génica con el IMC [115,116]. Aunque es un campo poco estudiado, ya se ha asociado el IMC con la mADN de genes específicos; en una cohorte humana se encontró una correlación positiva entre el IMC y la mADN del gen *HIF3A* que participa en hipoxia [117]. En cuanto a los AG, se encontró que EPA y AA están significativamente asociados con la mADN, independiente del IMC, lo cual respalda lo observado previamente en modelos *in vitro* [12,77].

### 7.2 El suplemento de AA en ratones

Este trabajo nos da una perspectiva de los efectos que tiene el suplemento en diferentes etapas de la vida del ratón, así como las implicaciones que tiene en siguientes generaciones, así como posibles mecanismos moleculares por lo que ello ocurre.

En el presente estudio, ratones de la cepa BALB/C fueron suplementados por tres generaciones durante el embarazo o antes a éste, con una discreta dosis diaria de AA (0,45 % del total de AG o 0,05 % de la energía total). Esa dosis corresponde

aproximadamente al contenido de AA en la leche materna humana [87,107] y al consumo promedio de AA en los países desarrollados [118]. Los suplementos que se administraron antes del coito en ratones machos, o durante el embarazo en hembras, conducen a un aumento de 38-47 % en el peso corporal entre la progenie F1 y F3 de ratones de 1 mes en relación con la progenie NS. Esto, a pesar de que los ratones BALB/c son relativamente resistentes a la obesidad inducida por la dieta [119,120] y el hecho de que el suplemento de AA solo aumenta ligeramente las calorías totales, el grado de aumento de peso en la progenie AA fue similar al reportado en varios estudios murinos de obesidad inducida por HFD [121]. De hecho, una revisión exhaustiva de los estudios con HFD en murinos reveló una amplia variabilidad en el fenotipo de aumento de peso y concluyó que las causas subyacentes pueden estar relacionadas con las diferencias en el contenido de grasa entre las dietas con HFD y las dietas de control [122]. Aunque en este caso, no se puede decir si dicho aumento de peso está acompañado de un mayor porcentaje de grasa corporal, o bien es un indicador de mejor desarrollo, como ya lo han reportado otros [123–126].

También demostramos que la ganancia de peso corporal depende de la dosis de AA, tanto dentro como a través de generaciones. En consecuencia, la exposición a AA durante la lactancia y el crecimiento postnatal temprano en ratas o en ratones *knockout* para *Fads2* (que carecen de la capacidad de sintetizar AA de forma endógena) se asocia con un aumento en el aumento de peso [127–129]. Además, en humanos, se ha demostrado que el estado de AA en plasma infantil se correlaciona positivamente con el peso corporal y el crecimiento [81,126], mientras que la ingesta de AA está inversamente relacionada con el retraso del crecimiento en los países en desarrollo [118]. Además, los efectos dependientes de la dosis de AA en el crecimiento también se informaron en cerdos, peces y reptiles [85,123–125,130].

### **7.2.1 El aumento transgeneracional en peso del hígado y mADN es lábil dentro de las generaciones**

Nuestro estudio muestra que un suplemento oral de AA dio lugar a un aumento de peso en la progenie de 1 mes, pero no de 5 meses, al igual que en los ratones de

un mes en F1 se observa una discreta disminución de peso en comparación a los NS que no es estadísticamente significativa. Dado que los ratones expuestos a AA se aparearon a los 3 meses de edad en cada generación, esto implica que la memoria celular de la exposición a AA en cada generación debe haberse mantenido al menos hasta esta edad. Específicamente, la progenie MAA y PAA retuvieron un recuerdo de la exposición a AA durante al menos 31 y 34 semanas después de una exposición de 20 o 10 días en el útero o antes del apareamiento, respectivamente. Considerando que 1 día en la vida de un ratón es equivalente a 1 mes de vida humana [131], esto se traduciría en un período de intervención dietética de 10 o 20 meses en hombres o mujeres, respectivamente, que continúan impactando en el metabolismo celular durante al menos 7 años. Este período de tiempo es relevante con respecto a la fórmula postnatal o lactantes amamantados y subraya la importancia de comprender el papel de la dosis de AA con respecto al aumento de peso en los lactantes.

Por otro lado, en los ratones de cinco meses expuestos a suplementación con AA, se observó una correlación positiva entre el contenido de AG n-6 y la mADN, que no se observó a temprana edad ni de manera transgeneracional, esta observación resulta muy interesante ya que en humanos con depresión se observaron cambios en la mADN del gen *Elovl5*, lo que indica una relación directa entre marcas epigenéticas en los genes que regulan el metabolismo de los PUFA y trastornos neurológicos [132].

Del mismo modo, en humanos, un estudio de intervención en la dieta mostró que la sobrealimentación con alto contenido de grasa a corto plazo indujo cambios sutiles de la mADN en todo el genoma, que solo se revirtieron parcialmente después de 6-8 semanas [133]. Además, dos estudios recientes en modelos murinos analizaron si el tejido hepático retenía memoria epigenética, transcripcional y estructural de la cromatina de obesidad inducida por HFD después de la pérdida de peso. Esos estudios llevaron a conclusiones opuestas y se ha argumentado que tales diferencias podrían reflejar en parte las diferencias en el contenido de AG de la HFD empleada [134,135]. De hecho, este estudio y otros muestran que los AG

individuales difieren en su capacidad para inducir efectos tanto a corto como a largo plazo en el metiloma humano [12–14].

### **7.2.2 Diferencias específicas del tejido en el contenido de AG y mADN después de la suplementación de AA y SBO**

Para analizar los efectos de la suplementación con AA y SBO durante el embarazo en hembras, o antes del coito en los machos, nos interesó particularmente identificar asociaciones entre los AG individuales y la mADN que dependían de la exposición previa al AA en tres generaciones. Con este fin, analizamos los tejidos del hígado y el cerebro que se derivan de las capas germinales de endodermo y ectodermo, respectivamente, de la progenie de 1 mes de edad. Sin embargo, con la excepción de una asociación positiva y negativa entre mADN y palmítico y MEAD, respectivamente, todas las correlaciones fueron específicas del tejido. Por lo tanto, las alteraciones tanto en el contenido de AG como en el mADN se establecieron después de la diferenciación de las capas de endospermo y ectodermo. De manera similar, las crías de ratas hembras expuestas a dietas que difieren en el contenido de grasa mostraron diferencias específicas de tejido en la composición de AG entre el hígado y el plasma, que se asociaron con diferencias en la mADN y expresión de *Fads2* [136,137].

En los hígados de 1 mes de la progenie AA, tanto el ácido cis-7-hexadecenoico como el EPA se correlacionaron positivamente con los mg de tAA y el peso del hígado, mientras que el AA mostró una correlación negativa con cualquiera de los dos. En concordancia, los aumentos o la disminución específicos del tejido en el contenido de EPA luego de las dietas suplementadas con AA (0.22-0.56 % del total de los AG) ya se han observado previamente en lubina y rodaballo [123,138]. Del mismo modo, la estimulación por AA de las células THP-1 conduce a la síntesis del ácido cis-7-hexadecenoico. Curiosamente, tanto el EPA como el cis-7-hexadecenoico tienen propiedades antiinflamatorias significativas *in vitro* e *in vivo* [139–143].

### **7.2.3 Diferencias sexo-especificas en el contenido de los AG y en los perfiles de mADN en el hígado**

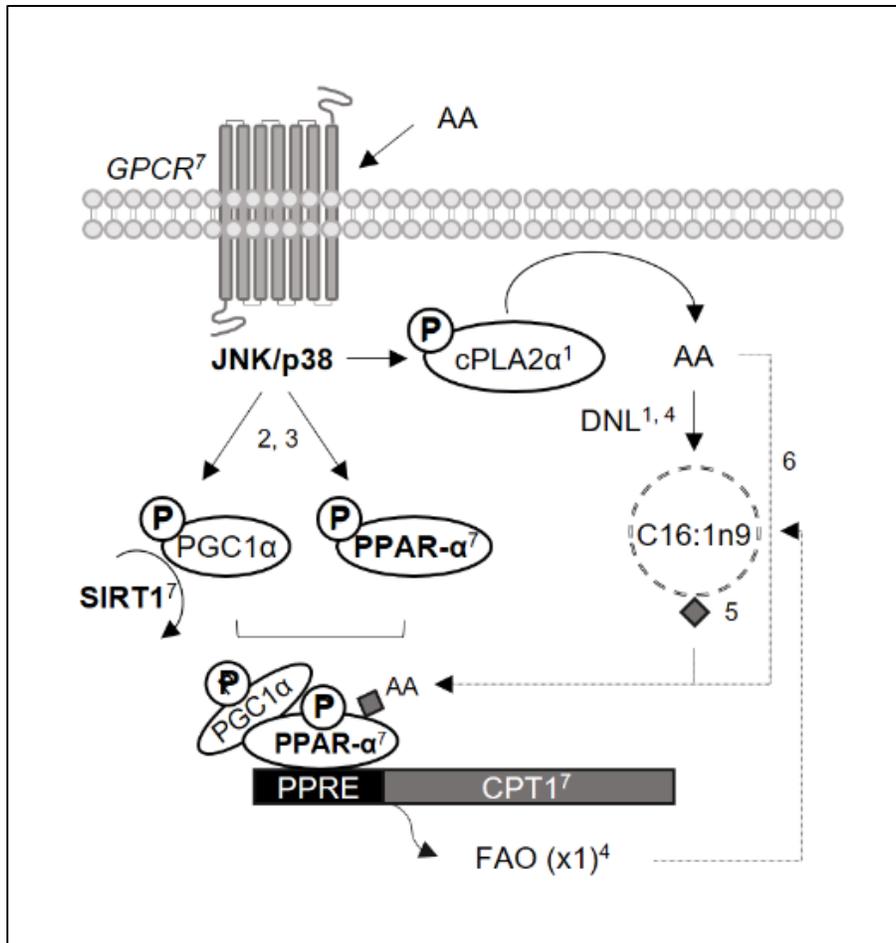
En el hígado, el aumento de peso en los machos se asoció con un aumento en el porcentaje de SFA y MUFA y una disminución de los niveles de PUFA n-3 y n-6 en relación con la progenie femenina. Del mismo modo, la progenie de los suplementados con AA mostró una tendencia hacia mayores diferencias específicas por sexo en la expresión de genes asociados con la lipogénesis *de novo*, y también los relacionados al metabolismo oxidativo. En particular, en relación con la progenie NS, estos genes estaban sobreexpresados en las hembras AA y SBO. Aunque la suplementación con SBO condujo a diferencias similares específicas por sexo en el contenido de AG, estas fueron menos pronunciadas en comparación con la progenie expuesta a AA, lo que en parte podría explicar la falta de diferencias entre la progenie SBO masculina y femenina. Se han reportado diferencias específicas de sexo similares con respecto a la composición de AG y el metabolismo oxidativo en humanos [144–146] que pueden explicar la mayor incidencia de esteatosis hepática en los machos.

#### **7.2.4 La mADN y el aumento intergeneracional inducido por AA en el peso corporal y del hígado**

La exposición a AA durante tres generaciones consecutivas resultó en efectos acumulativos en peso corporal y del hígado en todos los grupos de progenie que se correlacionaron positivamente con mADN y cis-7-hexadecenoico. Además, en la progenie masculina esos fenotipos se asociaron directamente con la pérdida de metilación del promotor de *Scd1*. Sin embargo, el hecho de que la mADN total y del promotor *Scd1* dependieran tanto de la línea germinal como de la exposición somática a AA, excluye una transmisión estricta de la línea germinal de estos perfiles de mADN. Más bien, los lípidos u otras moléculas en los tejidos que rodean las células de la línea germinal pueden mediar en la memoria intergeneracional informada aquí, de acuerdo con la siguiente justificación. *In vitro*, se mostró que la respuesta de mADN inducida por AA depende de la actividad de p38 MAPK o JNK (datos no publicados), pero no del ácido cis-7-hexadecenoico que se acumula preferentemente en las gotas de lípidos. Esta última observación sugiere que es poco probable que los componentes de AG en gotas de lípidos medien la respuesta a AA. Además, las actividades de SIRT1, PPAR $\alpha$  y CPT1 también son

indispensables [12]. Más aún, los objetivos conocidos de la mADN inducida por AA incluyen genes relacionados con las vías de señalización de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés). Cuando se extrapola al modelo *in vivo* presentado aquí, los datos *in vitro* sugieren que la exposición inicial (es decir, durante el embarazo o antes del coito en hembras y machos, respectivamente) a AA induce cambios en las vías relacionadas con el GPCR que dan como resultado la señalización y captación de AA, la activación de p38 MAPK y JNK, que conducen a la lipogénesis *de novo* y metabolitos de AG originados por la oxidación de AG que pueden actuar como ligandos de PPAR. Las últimas moléculas, ya sea en la superficie de las gotas de lípidos [147,148] o en otros compartimentos celulares, podrían activar la oxidación de AG en ausencia de AA exógeno, representando así una memoria de exposición pasada que imita los efectos de AA (**Figura 14**). La memoria molecular propuesta no se vería afectada por la extensa reprogramación del epigenoma de la línea germinal. Este sería un mecanismo general comprobable de preservación de la memoria metabólica entre generaciones. Los estudios *in vitro* que utilizan la línea celular monocítica, THP-1 muestran que el AA se asocia con un aumento agudo en la lipogénesis *de novo* y la mADN [12,96]. En particular, una estimulación de AA por dos horas conduce a una síntesis *de novo* de ácido mirístico, palmítico, palmitoleico y cis-7-hexadecenoico, un isómero del palmitoleico [96,149]. Igualmente, se puede detectar un incremento en la mADN a las tres horas después de la estimulación de AA (datos no publicados). Sin embargo, se desconoce hasta qué punto se mantienen estos cambios agudos en el contenido de mADN y AG, y/o cómo afectan el contenido de AG posterior a la exposición a AA.

Dado que varios estudios no encontraron ninguna asociación entre la exposición a AA y la ingesta de alimentos [127,129,150], es improbable que el aumento de peso corporal inducido por AA sea el resultado de un aumento de las calorías ingeridas, y sea más bien atribuible a un mejor desarrollo como se abordó en la introducción de esta tesis.



**Figura 14. Vías de señalización propuestas que explican la correlación entre el tADNm inducido por AA y la acumulación de C16: 1n9.** Los números del 1 al 7 indican la fuente bibliográfica de la siguiente manera. La exposición a AA conduce a la activación de la cinasa JNK y p38 que fosforila cPLA2α, PGC1α y PPARα (1, [149]; 2, [151]; 3, [152]); la activación de la primera conduce a la formación de gotas de lípidos enriquecida en C16: 1n9 (4, [96]), mientras que la última activa una ronda de FAO (oxidación de ácidos grasos, por siglas en inglés) en presencia de ligandos de PPARα generados en la superficie de la gota de lípidos (5,[148]) u otros metabolitos derivados de AA independientes de LD (6, [153]). En **negrita**, la actividad de la proteína que es necesaria para la mADN inducida por AA en células THP-1; en *cursiva*, la vía de señalización que se asocia con alteraciones en la mADN y expresión del ADN (7, [12]).

## 8 Conclusiones y perspectivas

El trabajo llevado a cabo en la presente tesis, condujo a las siguientes conclusiones principales:

- 1) En una cohorte de humanos adultos mexicanos con diferentes estados nutricionales (eutróficos, sobrepeso y obesidad), los niveles de AA en sangre periférica están asociados con un incremento en la mADN independientemente de su IMC en el día postprandial. De igual manera, los mg de suplemento proporcionados a los ratones correlacionaron positivamente con la mADN en el hígado de la progenie.
- 2) Los sujetos eutróficos presentan una mayor mADN en comparación con los individuos con sobrepeso y obesidad, independiente del estado fisiológico.
- 3) El estudio transgeneracional de ratones reveló que el AA es un importante modificador del peso corporal, así como de los pesos de hígado y de cerebro, de manera acumulativa, pero transitoria, ya que en ratones adultos desaparece el efecto.
- 4) El peso del hígado de ratones correlaciona con la mADN y el ácido cis-7-hexadecenoico presente en las gotas de lípidos, y que es un AG antiinflamatorio, y en los machos esta observación depende de la mADN de la región promotora del gen *Scd1*, que codifica para una enzima desaturasa de SFA a MUFA.

Perspectivas:

Para responder muchas de las preguntas que surgieron de este trabajo, podrían realizarse otros estudios en ratones de manera transgeneracional a diferentes dosis de AA, para entender la relación entre dosis y respuestas.

También, ayudaría a entender mejor los efectos de los AG en la dieta, utilizar un grupo de ratones con HFD en conjunto con AA, para evaluar si un estado metabólicamente patológico tiene la capacidad de conservar el fenotipo de aumento de peso transitorio, exclusivo de ratones jóvenes.

De igual manera, es importante elucidar la edad del ratón para producir progenie en que ya no tendrá el efecto observado en este estudio, ya que nuestros datos

muestran que a los 5 meses el fenotipo se diluye, sin embargo las cruizas se llevaron a cabo a los 3 meses.

A su vez, un estudio transgeneracional pero utilizando como suplemento el ácido cis-7-hexadecenoico, ayudará a entender la interrelación de AA con este AG a largo plazo.

## 9 Referencias

- [1] Godfrey KM, Barker DJ. 2001; Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr.* 4(2B):611–24.
- [2] Dimasuay KG, Boeuf P, Powell TL, Jansson T. 2016; Placental responses to changes in the maternal environment determine fetal growth. *Front Physiol.* 7(12.);doi: 10.3389/fphys.2016.00012.
- [3] Waterland RA, Jirtle RL. 2003; Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 23(15):5293–300.
- [4] Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. 2008; Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci.* 105(44):17046–9.
- [5] Fleming TP, Eckert JJ, Denisenko O. 2017; The role of maternal nutrition during the periconceptional period and its effect on offspring phenotype. 1014:87–105.
- [6] Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, et al. 2010; Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell.* 143(7):1084–96.
- [7] Rando OJ. 2016; Intergenerational transfer of epigenetic information in sperm. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 6(5):pii:a022988.
- [8] de la Rocha C, Zaina S, Lund G. 2015; Reprogramming transgenerational programming. *Curr Opin Lipidol.* 26(6):603–4.
- [9] Burdge G, Lillycrop K. 2016. *Nutrition, epigenetics and health.* Singapore: World Scientific Publishing; 225 p.
- [10] Dunn GA, Bale TL. 2011; Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. *Endocrinology.* 152(6):2228–36.
- [11] Waterland RA, Travisano M. 2008; NIH public access. *Int J Obes.* 32(9):1373–9.
- [12] Silva-Martínez GA, Rodríguez-Ríos D, Alvarado-Caudillo Y, Vaquero A, Esteller M, Carmona FJ, et al. 2016; Arachidonic and oleic acid exert distinct effects on the DNA methylome. *Epigenetics.* 11(5):321–34.
- [13] Flores-Sierra J, Arredondo-Guerrero M, Cervantes-Paz B, Rodríguez-Ríos D, Alvarado-Caudillo Y, Nielsen FC, et al. 2016; The trans fatty acid elaidate affects the global DNA methylation profile of cultured cells and in vivo. *Lipids Health Dis.* 15(1):75.
- [14] de la Rocha C, Pérez-Mojica JE, León SZ-D, Cervantes-Paz B, Tristán-Flores FE, Rodríguez-Ríos D, et al. 2016; Associations between whole peripheral blood fatty acids and DNA methylation in humans. *Sci Rep.* 6(1):25867.
- [15] De La Rocha C, Rodríguez-Ríos D, Molina-Torres J, Ramírez-Chávez E, Alvarado-Caudillo Y, Orozco-Castellanos LM, et al. 2019; A modest supplement of arachidonic acid induces cumulative metabolic and epigenetic changes across three generations in mice. :not published.
- [16] Wallace DC. 2010; Bioenergetics and the epigenome: Interface between the environment and genes in common diseases. *Dev Disabil Res Rev.* 16(2):114–9.

- [17] Poulsen P, Esteller M, Vaag A, Fraga MF. 2007; The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases. *Pediatr Res.* 61(5):32–41R.
- [18] Stevens G, Dias RH, Thomas KJA, Rivera JA, Carvalho N, Barquera S, et al. 2008; Characterizing the epidemiological transition in Mexico: National and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. *PLoS Med.* 5(6):e125.
- [19] WHO. 2018. Noncommunicable diseases [Internet]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- [20] Sacks FM, Lichtenstein AH, Wu JHY, Appel LJ, Creager MA, Kris-Etherton PM, et al. 2017; Dietary fats and cardiovascular disease: A presidential advisory from the American Heart Association. *Circulation.* 136:e1–e23.
- [21] Keys A. 1980. Seven countries: A multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge: Harvard University Press.; [https://Available from: www.degruyter.com/view/pro](https://www.degruyter.com/view/pro).
- [22] Rosato V, Temple NJ, la Vecchia C, Castellan G, Tavani A, Guercio V. 2017; Mediterranean diet and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Eur J Nutr.* :doi.org/10.1007/s00394-017-1582-0 [Epub ahead of p.
- [23] Innis SM. 2011; Metabolic programming of long-term outcomes due to fatty acid nutrition in early life. *Matern Child Nutr.* 7(SUPPL. 2):112–23.
- [24] Simopoulos A, P. A. 2016; An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients.* 8(3):128.
- [25] Nantapo C, Voster M, Nkukwana TT, Hugo A, Descalzo A, Grigioni G, et al. 2015; Socio-economic dynamics and innovative technologies affecting health-related lipid content in diets: Implications on global food and nutrition security. *Food Res Int.* 76:896–905.
- [26] Perfilyev A, Dahlman I, Gillberg L, Rosqvist F, Iggman D, Volkov P, et al. 2017; Impact of polyunsaturated and saturated fat overfeeding on the DNA-methylation pattern in human adipose tissue: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 105(4):991–1000.
- [27] Langley-Evans SC. 2015; Nutrition in early life and the programming of adult disease: A review. *J Hum Nutr Diet.* (Suppl 1):1–14. doi:10.1111/jhn.12212.
- [28] Forsdahl A. 1977; Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *J Epidemiol Community Heal.* 31(2):91–5.
- [29] Barker, Osmond C., Al. E. 1989; Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 334(8663):577–80.
- [30] Barker DJP, Hales CN, Fall CHD, Osmond C, Phipps K, Clark PMS. 1993; Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia.* 36(1):62–7.
- [31] Mcmillen IC. 2005; Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev.* 85(2):571–633.
- [32] Vaag AA, Grunnet LG, Arora GP, Brøns C. 2012; The thrifty phenotype hypothesis revisited. *Diabetologia.* 55(8):2085–8.
- [33] Brenseke B, Prater MR, Bahamonde J, Gutierrez JC. 2013; Current thoughts

- on maternal nutrition and fetal programming of the metabolic syndrome. *J Pregnancy*. 2013:1–13.
- [34] Van Abeelen AFM, De Rooij SR, Osmond C, Painter RC, Veenendaal MVE, Bossuyt PMM, et al. 2011; The sex-specific effects of famine on the association between placental size and later hypertension. *Placenta*. 32(9):694–8.
- [35] Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. 2005; Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: An overview. *Reprod Toxicol*. 20(3):345–52.
- [36] Roseboom TJ, Painter RC, Van Abeelen AFM, Veenendaal MVE, De Rooij SR. 2011; Hungry in the womb: What are the consequences? Lessons from the Dutch famine. *Maturitas*. 70(2):141–5.
- [37] Veenendaal MVE, Painter RC, De Rooij SR, Bossuyt PMM, Van Der Post JAM, Gluckman PD, et al. 2013; Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 120(5):548–53.
- [38] Bossuyt PM, Elias SG, Roseboom TJ, Uiterwaal CS, Veenendaal M V., Dijkgraaf MG, et al. 2012; Survival effects of prenatal famine exposure. *Am J Clin Nutr*. 95(1):179–83.
- [39] Briño-Enríquez MA, Larriba E, del Mazo J. 2016; Endocrine disruptors, microRNAs, and primordial germ cells: a dangerous cocktail. *Fertil Steril*. 106(4):871–9.
- [40] Walker VR, Boyles AL, Pelch KE, Holmgren SD, Shapiro AJ, Blystone CR, et al. 2018; Human and animal evidence of potential transgenerational inheritance of health effects: An evidence map and state-of-the-science evaluation. *Environ Int*. 115:48–69.
- [41] Lane M, Zander-Fox DL, Robker RL, McPherson NO. 2015; Peri-conception parental obesity, reproductive health, and transgenerational impacts. *Trends Endocrinol Metab*. 26(2):84–90.
- [42] Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S. 2001; Longevity determined by paternal ancestors' nutrition during their slow growth period. *Acta Biotheor*. 49(1):53–9.
- [43] Vågerö D, Pinger PR, Aronsson V, van den Berg GJ. 2018; Paternal grandfather's access to food predicts all-cause and cancer mortality in grandsons. *Nat Commun*. 9(1):1–7.
- [44] Zhang J, Zhou X, Yuan H, Niu Y, Di F, Fu L. 2017; Paternal lifestyle influence susceptibility to high-fat diet-induced metabolic disorders among male offspring of C57BL/6 mice. *Int J Clin Exp Med*. 10(1):1715–24.
- [45] de Castro Barbosa T, Ingerslev LR, Alm PS, Versteyhe S, Massart J, Rasmussen M, et al. 2016; High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Mol Metab*. 5:184–97.
- [46] Li J, Huang J, Li J-S, Chen H, Huang K, Zheng L. 2012; Accumulation of endoplasmic reticulum stress and lipogenesis in the liver through generational effects of high fat diets. *J Hepatol*. 56(4):900–7.
- [47] Broughton K, Wade J. 2002; Total fat and (n-3):(n-6) fat ratios influence eicosanoid production in mice. *J Nutr*. 132(1):88–94.
- [48] Saini RK, Keum YS. 2018; Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids:

- Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sci.* 203:255–67.
- [49] Massiera F, Barbry P, Guesnet P, Joly A, Luquet S, Moreilhon-Brest C, et al. 2010; A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. *J Lipid Res.* 51(8):2352–61.
- [50] Masuyama H, Mitsui T, Nobumoto E, Hiramatsu Y. 2015; The effects of high-fat diet exposure in utero on the obesogenic and diabetogenic traits through epigenetic changes in adiponectin and leptin gene expression for multiple generations in female mice. *Endocrinology.* 156(7):2482–91.
- [51] Yi D, Zeng S, Guo Y. 2012; A diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids reduced prostaglandin biosynthesis, ovulation rate, and litter size in mice. *Theriogenology.* 78(1):28–38.
- [52] Heerwagen MJR, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE. 2010; Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 299(3):R711–22.
- [53] Kulis M, Queirós AC, Beekman R, Martín-Subero JI. 2013; Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 1829(11):1161–74.
- [54] Lund G, Zaina S. 2019. Epigenetics, the vascular wall, and atherosclerosis. In: *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. Second Edi. Elsevier; p. 302–13.
- [55] Cedar H, Bergman Y. 2009; Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet.* 10(5):295–304.
- [56] Jjingo D, Conley AB, Yi S V., Lunyak V V., Jordan IK. 2012; On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget.* 3(4):462–74.
- [57] Yin Y, Morgunova E, Jolma A, Kaasinen E, Sahu B, Khund-Sayeed S, et al. 2017; Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science (80- ).* 356(6337):eaaj2239.
- [58] Jones PA. 2012; Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 13(7):484–92.
- [59] Gruenbaum Y, Cedar H, Razin A. 1982; Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature.* 295(5850):620–2.
- [60] Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. 1999; DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99(3):247–57.
- [61] Lyko F. 2018; The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet.* 19(2):81–92.
- [62] Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. 2014; DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev.* 28(8):812–28.
- [63] Xu Q, Xie W. 2018; Epigenome in early mammalian development: Inheritance, reprogramming and establishment. *Trends Cell Biol.* 28(3):237–53.
- [64] Hill PWS, Leitch HG, Requena CE, Sun Z, Amouroux R, Roman-Trufero M, et al. 2018; Epigenetic reprogramming enables the transition from primordial germ cell to gonocyte. *Nature.* 555(7696):392–6.
- [65] Dupont C, Cordier AG, Junien C, Mandon-Pépin B, Levy R, Chavatte-Palmer P. 2012; Maternal environment and the reproductive function of the offspring. *Theriogenology.* 78(7):1405–14.

- [66] Benton MC, Johnstone A, Eccles D, Harmon B, Hayes MT, Lea RA, et al. 2015; An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome Biol.* 16(8):doi: 10.1186/s13059-014-0569-x.
- [67] Zaina S, Heyn H, Carmona FJ, Varol N, Sayols S, Condom E, et al. 2014; DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet.* 8(1):1–9.
- [68] Dayeh T, Volkov P, Salö S, Hall E, Nilsson E, Olsson AH, et al. 2014; Genome-wide DNA methylation analysis of human pancreatic islets from type 2 diabetic and non-diabetic donors identifies candidate genes that influence insulin secretion. *PLoS Genet.* 10(3):e1004160.
- [69] Valencia-Morales MDP, Zaina S, Heyn H, Carmona FJ, Varol N, Sayols S, et al. 2015; The DNA methylation drift of the atherosclerotic aorta increases with lesion progression. *BMC Med Genomics.* 8(1):1–9.
- [70] Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG. 2007; Diet-induced hypermethylation at agouti viable yellow is not inherited transgenerationally through the female. *FASEB J.* 21(12):3380–5.
- [71] Guerrero-Bosagna C, Settles M, Lucker B, Skinner MK. 2010; Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on promoter regions of the sperm epigenome. *PLoS One.* 5(9):1–17.
- [72] Jacobsen SC, Gillberg L, Bork-Jensen J, Ribel-Madsen R, Lara E, Calvanese V, et al. 2014; Young men with low birthweight exhibit decreased plasticity of genome-wide muscle DNA methylation by high-fat overfeeding. *Diabetologia.* 57(6):1154–8.
- [73] Hjort L, Jørgensen SW, Gillberg L, Hall E, Brøns C, Frystyk J, et al. 2017; 36 h fasting of young men influences adipose tissue DNA methylation of LEP and ADIPOQ in a birth weight-dependent manner. *Clin Epigenetics.* 9:40. doi: 10.1186/s13148-017-0340-8.
- [74] Hall E, Volkov P, Dayeh T, Bacos K, Rönn T, Nitert MD, et al. 2014; Effects of palmitate on genome-wide mRNA expression and DNA methylation patterns in human pancreatic islets. *BMC Med.* 12(1):103.
- [75] Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. 2015; Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *PLoS One.* 6(1):1–10.
- [76] Barrès R, Osler ME, Yan J, Rune A, Fritz T, Caidahl K, et al. 2009; Non-CpG methylation of the PGC-1 $\alpha$  promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab.* 10(3):189–98.
- [77] Ceccarelli V, Racanicchi S, Martelli MP, Nocentini G, Fettucciari K, Riccardi C, et al. 2011; Eicosapentaenoic acid demethylates a single cpg that mediates expression of tumor suppressor CCAAT/enhancer-binding protein  $\delta$  in U937 leukemia cells. *J Biol Chem.* 286(31):27092–102.
- [78] Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L. 2000; Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature.* 403(6771):795–800.
- [79] Amat R, Planavila A, Chen SL, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. 2009; SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  co-activator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) gene in skeletal muscle through the PGC-1 $\alpha$  autoregulatory loop and interaction with MyoD. *J Biol Chem.* 284(33):21872–

- 21880.
- [80] Epidemiology and Genomics Research Program website. National Cancer Institute. 2018. Sources of selected fatty acids among the U.S. Population, 2005-06. p. Available form: <http://epi.grants.cancer.gov/diet/>.
  - [81] Carlson SE, Werkman SH, Peeples JM, Cooke RJ, Tolley EA. 1993; Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. *Appl Biol Sci.* 90:1073–7.
  - [82] Crawford MA, Golfetto I, Ghebremeskel K, Min Y, Moodley T, Poston L, et al. 2003; The potential role for arachidonic and docosahexaenoic acids in protection against some central nervous system injuries in preterm infants. *Lipids.* 38(4):303–15.
  - [83] Weiler H, Fitzpatrick-Wong S, Schellenberg J, McCloy U, Veitch R, Kovacs H, et al. 2005; Maternal and cord blood long-chain polyunsaturated fatty acids are predictive of bone mass at birth in healthy term-born infants. *Pediatr Res.* 58(6):1254–1258.
  - [84] Sanchez Meza K, Tene Pérez CE, Sanchez Ramirez CA, Muñiz Valencia R. 2018; The serum arachidonic acid/eicosapentaenoic acid ratio in children with healthy weight and obesity. *Arch Latinoam Nutr.* 68(1).
  - [85] Weiler HA. 2000; Dietary supplementation of arachidonic acid is associated with higher whole body weight and bone mineral density in growing pigs. *Pediatr Res.* 47(5):692–7.
  - [86] Hadley KB, Ryan AS, Forsyth S, Gautier S, Salem N. 2016; The essentiality of arachidonic acid in infant development. *Nutrients.* 8(4):216.
  - [87] Simopoulos AP, Leaf A, Salem Jr. N. 1999; Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann Nutr Metab.* 43(2):127–30.
  - [88] Campoy C, Cabero L, Sanjurjo P, Serra-Majem L, Anadón A, Morán J, et al. 2010; Actualización, recomendaciones y consenso sobre el papel de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la gestación, lactancia y primer año de vida. *Med Clin (Barc).* 135(2):47–96.
  - [89] Brash AR. 2001; Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest.* 107(11):1339–45.
  - [90] Meagher EA, FitzGerald GA. 1993; Disordered eicosanoid formation in pregnancy-induced hypertension. *Circulation.* 88(3):1324–33.
  - [91] Abayasekara DRE, Wathes DC. 1999; Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 61(5):275–87.
  - [92] Cheng Z, Elmes M, Kirkup SE, Chin EC, Abayasekara DRE, Wathes DC. 2005; The effect of a diet supplemented with the n-6 polyunsaturated fatty acid linoleic acid on prostaglandin production in early- and late-pregnant ewes. *J Endocrinol.* 184(1):165–78.
  - [93] Cryer B, Feldman M. 1998; Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med.* 104(5):413–21.
  - [94] Calder PC. 2001; Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids.* 36(9):1007–24.
  - [95] Calder PC. 2009; Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes:

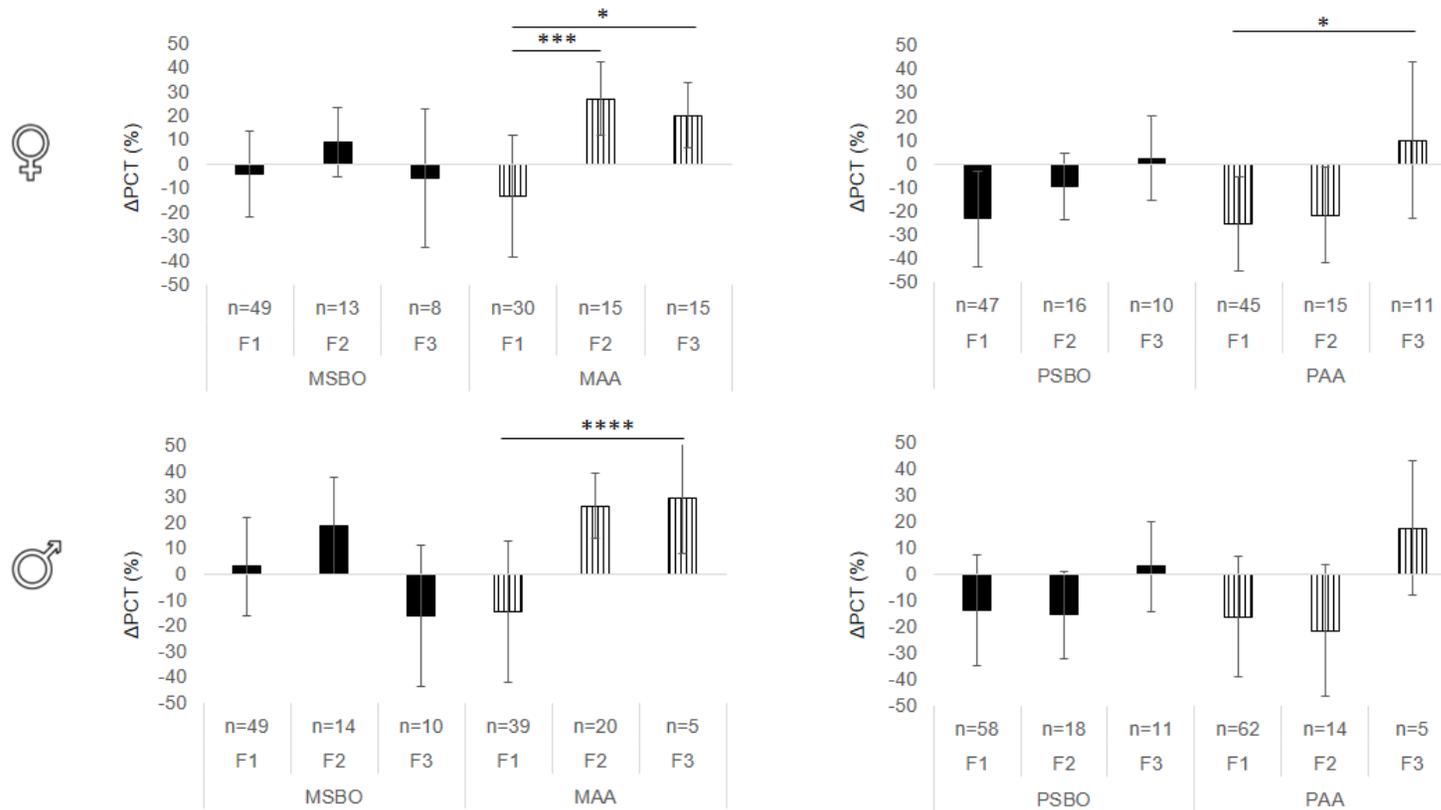
- New twists in an old tale. *Biochimie*. 91(6):791–5.
- [96] Guijas C, Meana C, Astudillo AM, Balboa MA, Balsinde J. 2016; Foamy monocytes are enriched in cis-7-hexadecenoic fatty acid (16:1n-9), a possible biomarker for early detection of cardiovascular disease. *Cell Chem Biol*. 23(6):689–99.
- [97] Simopoulos AP. 2008; The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med*. 233(6):674–88.
- [98] Johnson GH, Fritsche K. 2012; Effect of dietary linoleic acid on markers of inflammation in healthy persons: A systematic review of randomized controlled trials. *J Acad Nutr Diet*. 112(7):1029–41.
- [99] Fritsche KL. 2008; Too much linoleic acid promotes inflammation-doesn't it? Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids. 79(3–5):173–5.
- [100] Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2010; Fatty acids from fish: The anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev*. 68(5):280–289.
- [101] Layé S, Nadjar A, Joffre C, Bazinet RP. 2018; Anti-inflammatory effects of omega-3 fatty acids in the brain: Physiological mechanisms and relevance to pharmacology. *Pharmacol Rev*. 70(1):12–38.
- [102] Patterson E, Wall R, FitzGerald GA, Ross R, Stanton C. 2012; Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acid. *J Nutr Metab*. 2012:539426.
- [103] Mader SL, Libal NL, Pritchett-Corning K, Yang R, Murphy SJ. 2009; Refining timed pregnancies in two strains of genetically engineered mice. *Lab Anim (NY)*. 38(9):305–10.
- [104] Jemiolo B, Harvey S, Novotny M. 1986; Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc Natl Acad Sci*. 83(12):4576–9.
- [105] Nouredini H, Teoh BC, Clements LD. 1992; Densities of vegetable oils and fatty acids. *Chem Biomol Eng Res Publ*. 69(12):1184–8.
- [106] Rangel-Salazar R, Wickström-Lindholm M, Aguilar-Salinas CA, Alvarado-Caudillo Y, Døssing KBV, Esteller M, et al. 2011; Human native lipoprotein-induced de novo DNA methylation is associated with repression of inflammatory genes in THP-1 macrophages. *BMC Genomics*. 12:582.
- [107] Koletzko B, Lien E, Agostoni C, Böhles H, Campoy C, Cetin I, et al. 2008; The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: Review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med*. 36(1):5–14.
- [108] Finlay JB, Liu X, Ermel RW, Adamson TW. 2015; Maternal weight gain as a predictor of litter size in swiss webster, C57BL/6J, and BALB/cJ mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 54(6):694–9.
- [109] Lochmann TL, Thomas RR, Bennett JP, Taylor SM. 2015; Epigenetic modifications of the PGC-1 $\alpha$  promoter during exercise induced expression in mice. *PLoS One*. 10(6):1–16.
- [110] Niculescu MD, Lupu DS, Craciunescu CN. 2013; Perinatal manipulation of  $\alpha$ -linolenic acid intake induces epigenetic changes in maternal and offspring livers. *FASEB J*. 27(1):350–8.

- [111] Schwenk RW, Jonas W, Ernst SB, Kammel A, Jähnert M, Schürmann A. 2013; Diet-dependent alterations of hepatic *scd1* expression are accompanied by differences in promoter methylation. *Horm Metab Res.* 45(11):786–94.
- [112] Mihaylova MM, Vasquez DS, Ravnskjaer K, Denechaud PD, Yu RT, Alvarez JG, et al. 2011; Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell.* 145(4):607–21.
- [113] Barrès R, Yan J, Egan B, Treebak JT, Rasmussen M, Fritz T, et al. 2012; Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab.* 15(3):405–11.
- [114] Barres R, Kirchner H, Rasmussen M, Yan J, Kantor FR, Krook A, et al. 2013; Weight loss after gastric bypass surgery in human obesity remodels promoter methylation. *Cell Rep.* 3(4):1020–7.
- [115] Abu-Farha M, Tiss A, Abubaker J, Khadir A, Al-Ghimlas F, Al-Khairi I, et al. 2013; Proteomics analysis of human obesity reveals the epigenetic factor HDAC4 as a potential target for obesity. *PLoS One.* 8(9):e75342.
- [116] Kirchner H, Nylen C, Laber S, Barrès R, Yan J, Krook A, et al. 2014; Altered promoter methylation of PDK4, IL1 B, IL6, and TNF after Roux-en y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis.* 10(4):671–8.
- [117] Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, et al. 2014; DNA methylation and body-mass index: A genome-wide analysis. *Lancet.* 383(9933):1990–8.
- [118] Forsyth S, Gautier S, Salem Jr. N. 2017; Dietary intakes of arachidonic acid and docosahexaenoic acid in early life - With a special focus on complementary feeding in developing countries. *Ann Nutr Metab.* 70(3):217–27.
- [119] Dumas M-E, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, et al. 2006; Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci.* 103(33):12511–6.
- [120] Fearnside JF, Dumas M-E, Rothwell AR, Wilder SP, Cloarec O, Toye A, et al. 2008; Phylometabonomic patterns of adaptation to high fat diet feeding in inbred mice. *PLoS One.* 3(2):e1668.
- [121] Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Król E. 2007; Animal models of obesity. *Obes Rev.* 8(1):55–61.
- [122] Kakimoto PA, Kowaltowski AJ. 2016; Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Redox Biol.* 8:216–25.
- [123] Xu H, Ai Q, Mai K, Xu W, Wang J, Ma H, et al. 2010; Effects of dietary arachidonic acid on growth performance, survival, immune response and tissue fatty acid composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture.* 307(1–2):75–82.
- [124] Tian J, Lei C, Ji H, Kaneko G, Zhou J, Yu H, et al. 2017; Comparative analysis of effects of dietary arachidonic acid and EPA on growth, tissue fatty acid composition, antioxidant response and lipid metabolism in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Br J Nutr.* 118(06):411–22.
- [125] Staton MA, Edwards HMJ, Brisbin ILJ, Joanen T, McNease L. 1990; Essential fatty acid nutrition of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J Nutr.* 120(7):674–85.

- [126] Koletzko B, Braun M. 1991; Arachidonic acid and early human growth: Is there a relation? *Ann Nutr Metab.* 35(3):128–31.
- [127] Hadley KB, Guimont-Desrochers F, Bailey-Hall E, Salem N, Yurko-Mauro K, Field CJ. 2017; Supplementing dams with both arachidonic and docosahexaenoic acid has beneficial effects on growth and immune development. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 126:55–63.
- [128] Hatanaka E, Harauma A, Yasuda H, Watanabe J, Nakamura MT, Salem N, et al. 2016; Essentiality of arachidonic acid intake in murine early development. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 108:51–7.
- [129] Stoffel W, Hammels I, Jenke B, Binczek E, Schmidt-soltau I, Odenthal M, et al. 2014; Obesity resistance and deregulation of lipogenesis in D 6 -fatty acid desaturase ( FADS 2 ) deficiency. *EMBO Rep.* 15(1):110–20.
- [130] Shahkar E, Yun H, Lee S, Kim D-J, Kim S-K, Lee BI, et al. 2016; Evaluation of the optimum dietary arachidonic acid level and its essentiality based on growth and non-specific immune responses in japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture.* 452:209–16.
- [131] Dutta S, Sengupta P. 2016; Men and mice: Relating their ages. *Life Sci.* 152:244–8.
- [132] Haghighi F, Galfalvy H, Chen S, Huang Y yu, Cooper TB, Burke AK, et al. 2015; DNA methylation perturbations in genes involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis associated with depression and suicide risk. *Front Neurol.* 6:92.
- [133] Jacobsen SC, Brøns C, Bork-Jensen J, Ribel-Madsen R, Yang B, Lara E, et al. 2012; Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men. *Diabetologia.* 55(12):3341–9.
- [134] Leung A, Trac C, Du J, Natarajan R, Schones DE. 2016; Persistent chromatin modifications induced by high fat diet. *J Biol Chem.* 291(20):10446–55.
- [135] Siersbaek M, Varticovski L, Yang S, Baek S, Nielsen R, Mandrup S, et al. 2017; High fat diet-induced changes of mouse hepatic transcription and enhancer activity can be reversed by subsequent weight loss. *Sci Rep.* 7:1–13.
- [136] Hoile SP, Lillycrop KA, Thomas NA, Hanson MA, Burdge GC. 2011; Dietary protein restriction during F0 pregnancy in rats induces transgenerational changes in the hepatic transcriptome in female offspring. *PLoS One.* 6(7):e21668.
- [137] Kelsall CJ, Hoile SP, Irvine NA, Masoodi M, Torrens C, Lillycrop KA, et al. 2012; Vascular dysfunction induced in offspring by maternal dietary fat involves altered arterial polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *PLoS One.* 7(4):e34492.
- [138] Castell JD, Bell JG, Tocher DR, Sargent JR. 1994; Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture.* 128(3–4):315–33.
- [139] Bordet JC, Guichardant M, Lagarde M. 1986; Arachidonic acid strongly stimulates prostaglandin I3 (PGI3) production from eicosapentaenoic acid in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 135(2):403–10.

- [140] Du ZY, Ma T, Winterthun S, Kristiansen K, Frøyland L, Madsen L. 2010;  $\beta$ -oxidation modulates metabolic competition between eicosapentaenoic acid and arachidonic acid regulating prostaglandin E2 synthesis in rat hepatocytes-Kupffer cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 1801(4):526–36.
- [141] Miles EA, Calder PC. 2015; Maternal diet and its influence on the development of allergic disease. *Clin Exp Allergy*. 45(1):63–74.
- [142] Serhan CN, Savill J. 2005; Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *6(12):1191–7*.
- [143] Wada M, DeLong CJ, Hong YH, Rieke CJ, Song I, Sidhu RS, et al. 2007; Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem*. 282(31):22254–66.
- [144] Holman RT, Smythe L, Johnson S. 1979; Effect of sex and age on fatty acid composition of human serum lipids. *Am J Clin Nutr*. 32(12):2390–9.
- [145] Nikkari T, Luukkainenor, Pietinen P, Puska P. 1995; Fatty acid composition of serum lipid fractions in relation to gender and quality of dietary fat. *Ann Med*. 27(4):491–8.
- [146] Pramfalk C, Pavlides M, Banerjee R, McNeil CA, Neubauer S, Karpe F, et al. 2015; Sex-specific differences in hepatic fat oxidation and synthesis may explain the higher propensity for NAFLD in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 100(12):4425–4433.
- [147] Guerre-Millo M. 2013. Animal models of obesity. In: *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue*. Springer, Paris; p. 255–66.
- [148] Mottillo EP, Bloch AE, Leffs T, Granneman JG. 2012; Lipolytic products activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  and  $\delta$  in brown adipocytes to match fatty acid oxidation with supply. *J Biol Chem*. 287(30):25038–25048.
- [149] Guijas C, Pérez-Chacón G, Astudillo AM, Rubio JM, Gil-de-Gómez L, Balboa MA, et al. 2012; Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A2 -dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. *J Lipid Res*. 53(11):2343–54.
- [150] Goheen SC, Larkin EC, Manix M, Rao GA. 1980; Dietary arachidonic acid reduces fatty liver, increases diet consumption and weight gain in ethanol-fed rats. *Lipids*. 15(5):328–36.
- [151] Wang S, Awad KS, Elinoff JM, Dougherty EJ, Ferreyra GA, Wang JY, et al. 2015; G protein-coupled receptor 40 (GPR40) and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ): An integrated two-receptor signaling pathway. *J Biol Chem*. 290(32):19544–19557.
- [152] Barger PM, Browning AC, Garner AN, Kelly DP. 2001; p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ : A potential role in the cardiac metabolic stress response. *J Biol Chem*. 276(48):44495–44501.
- [153] Schupp M, Lazar MA. 2010; Endogenous ligands for nuclear receptors: Digging deeper. *J Biol Chem*. 285(52):40409–40415.

## 10 ANEXOS



**ANEXO 1. Cambio de peso corporal en progenie suplementada con AG relativo al de la progenie no suplementada en hembras y machos a través de las generaciones.** ΔPCT: promedio del cambio relativo de peso corporal entre la progenie de ratones suplementados en relación con la progenie de los no suplementados.; MAA and MSBO: suplemento materno; PSBO and PAA: suplemento paterno; panel superior progenie hembra, inferior, progenie macho: las diferencias estadísticas se determinaron con ANOVA y prueba de Scheffé; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

**ANEXO 2.** Correlación entre los mg suplementados de AG e indicadores de fertilidad

	Tamaño de la camada	Relación machos:hembras	% embarazo
tAA	0.3607	-0.6621	-0.2030
tSBO	0.4915	0.5413	-0.4870
gAA	0.5516	<b>-0.8854**</b>	-0.4761
gSBO	0.5551	0.6847	-0.2977

Correlación de Pearson entre los mg suplementados del AG y las variables asociadas a fertilidad. \*\*,  $p < 0.01$ .

### ANEXO 3

Peso de los órganos de la progenie de ratones suplementados con AG a 1 y 5 meses de vida.

Ratones de 1 mes cuyos padres fueron suplementados con AG											
Progenie		Hígado				Cerebro				Testículos	
		#		peso (g)		#		peso (g)		#	peso (g)
		machos	hembras	machos	hembras	machos	hembras	machos	hembras		
MAA	F1	10	10	0.68±0.19	0.68±0.17	10	10	0.39±0.03	0.40±0.03	10	0.08±0.02
	F1 (2x)	5	5	0.99±0.13	0.90±0.20	5	5	0.56±0.30	0.42±0.04	5	0.10±0.02
	F2	5	4	1.04±0.12	1.00±0.15	5	5	0.42±0.01	0.42±0.02	5	0.11±0.02
	F3	5	6	1.02±0.17	0.92±0.1	5	6	0.41±0.02	0.42±0.03	5	0.11±0.01
PAA	F1	10	10	0.59±0.17	0.62±0.16	10	10	0.37±0.03	0.37±0.03	10	0.07±0.03
	F2	5	5	0.66±0.22	0.55±0.13	5	5	0.40±0.02	0.40±0.02	5	0.10±0.03
	F3	4	6	0.96±0.28	0.83±0.19	4	6	0.42±0.04	0.39±0.02	4	0.11±0.02
MSBO	F1	10	10	0.82±0.22	0.80±0.18	10	10	0.41±0.03	0.40±0.03	10	0.09±0.03
	F2	5	5	0.98±0.11	0.93±0.05	5	5	0.42±0.01	0.41±0.01	5	0.11±0.02
	F3	5	5	0.70±0.30	0.69±0.24	5	5	0.39±0.03	0.39±0.04	5	0.08±0.04
PSBO	F1	10	10	0.68±0.16	0.61±0.15	10	10	0.38±0.04	0.38±0.03	9	0.08±0.02
	F2	5	5	0.65±0.10	0.68±0.11	5	5	0.36±0.05	0.39±0.02	4	0.09±0.05
	F3	6	7	0.92±0.15	0.79±0.16	6	7	0.41±0.04	0.40±0.03	6	0.09±0.02
NS		10	10	0.74±0.29	0.71±0.26	10	10	0.39±0.04	0.38±0.05	10	0.08±0.02
PROMEDIO		7	7	0.68±0.19	0.68±0.17	7	7	0.41±0.05	0.40±0.03	7	0.09±0.02
Ratones de 5 meses cuyos padres fueron suplementados con AG											
MAA	F1	4	5	1.97±0.18	1.51±0.11	4	5	0.46±0.03	0.48±0.01	4	0.26±0.04
	F1 (2x)	5	5	2.15±0.51	1.41±0.59	5	5	0.44±0.06	0.47±0.05	5	0.27±0.03
PAA	F1	5	4	1.87±0.2	1.61±0.18	5	4	0.46±0.03	0.47±0.02	5	0.24±0.01
MSBO	F1	5	5	2.09±0.19	1.69±0.22	5	5	0.45±0.05	0.74±0.51	5	0.25±0.01
PSBO	F1	5	5	1.84±0.21	1.67±0.27	5	5	0.45±0.06	0.46±0.02	5	0.26±0.04
NS		5	3	1.99±0.37	1.64±0.02	5	3	0.46±0.02	0.48±0	5	0.28±0.02
PROMEDIO		5	5	1.98±0.3	1.58±0.29	5	5	0.45±0.04	0.51±0.2	5	0.26±0.03

## ANEXO 4

### mADN en progenie de 1 mes

Progenie		Hígado		Cerebro		Testículos
		machos	hembras	machos	hembras	
MAA	F1	0.90±0.12	1.11±0.36	1.96±0.18	2.33±1.17	0.42±0.14
	F1 (2x)	1.17±0.08	1.60±0.16	1.54±0.67	0.93±0.16	1.97±0.14
	F2	1.33±0.23	2.42±0.08	2.21±0.48	1.72±0.28	0.70±0.10
	F3	1.96±0.13	1.39±0.07	1.56±0.14	2.03±1.13	0.98±0.04
PAA	F1	1.12±0.08	0.8±0.04	2.45±1.70	1.83±0.20	0.25±0.14
	F2	0.97±0.20	1.25±0.07	2.10±1.18	1.28±0.54	0.43±0.07
	F3	2.22±0.07	1.14±0.1	2.41±0.32	2.21±0.54	0.30±0.03
MSBO	F1	1.81±0.21	1.73±0.04	3.33±0.30	2.33±0.94	0.41±0.09
	F2	1.22±0.03	1.2±0.29	1.63±0.48	1.82±0.48	0.33±0.17
	F3	0.65±0.02	1.58±0.55	2.09±0.50	2.00±0.68	0.37±0.03
PSBO	F1	1.13±0.11	0.98±0.15	2.00±0.23	2.01±0.29	1.30±0.19
	F2	2.63±0.71	1.89±0.39	2.06±0.29	2.07±0.17	0.25±0.00
	F3	2.96±0.43	1.05±0.06	1.16±0.49	1.53±0.42	0.43±0.17
NS		1.18±0.52	1.10±0.00	1.98±0.51	2.19±0.00	2.65±0.17
PROMEDIO		1.52±0.21	1.37±0.17	2.03±0.53	1.88±0.5	0.77±0.11

### mADN en progenie de 5 meses

Progenie		Hígado		Cerebro		Testículos
		machos	hembras	machos	hembras	
MAA	F1	2.43±0.78	1.17±0.11	0.67±0.22	0.85±0.06	1.27±0.45
	F1 (2x)	1.75±0.46	2.96±0.98	0.62±0.18	1.34±0.33	1±1.06
PAA	F1	2.33±0.79	3.49±0.51	2.08±0.47	2.21±0.39	2.3±0.68
MSBO	F1	0.78±0.23	0.75±0.03	1.88±0.3	0.47±0.05	1.15±0.36
PSBO	F1	3.16±0.36	2.45±0.3	2.27±0.42	1.7±0.03	2.7±0.67
NS		1.19±0.21	1.13±0.29	0.13±0.04	0.89±0.24	0.69±0.37
PROMEDIO		1.94±0.47	1.99±0.37	1.28±0.27	1.24±0.19	1.52±0.6

*Todos los valores de mADN representan los promedios de dos réplicas técnicas de tejido hepático, cerebral o testicular agrupados de 3 individuos de 1 mes de edad.*

**ANEXO 5.** Ácidos grasos en ratones de 1 mes, en hígado, cerebro y testículos (en archivo Excel anexo).

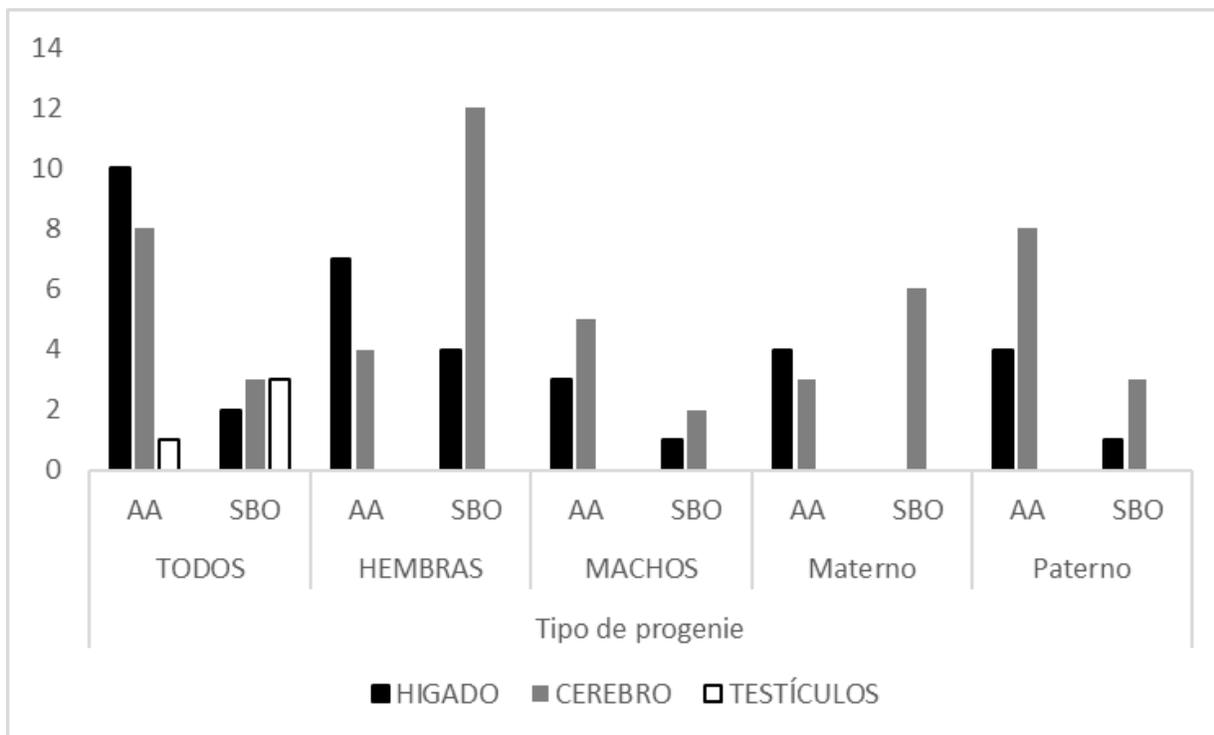
**ANEXO 6.** Ácidos grasos ratones de 5 meses en hígado, cerebro y testículos (en archivo Excel anexo).

## ANEXO 7

Progenie		% de peso	
		machos	hembras
MAA	F1	41.08±12.13	45.84±0.87
	F1 (2x)	53.02±2.37	18.9±8.62
	F2	34.11±0.03	30.19±1.82
PAA	F3	31.53±7.79	40.26±8.58
	F1	35.82±5.15	32.2±11.91
	F2	34.8±2.56	44.42±0.13
MSBO	F3	40.79±6.31	39.19±4.08
	F1	38.53±2.75	41.57±1.75
	F2	47.08±3.42	13.33±2.98
PSBO	F3	31.22±4.08	43.85±8.93
	F1	36.15±4.62	23.93±1.75
	F2	42.45±4.4	46.37±10.78
NS	F3	25.23±4.25	29.83±1.37
		45.21±3.03	50.58±2.85

*Cada valor representa los promedios de dos réplicas técnicas de tejido hepático agrupados de 3 ratones machos o 3 hembras de 1 mes de edad.*

## ANEXO 8



**ANEXO 8.** Frecuencia de correlaciones por grupo de estudio/órgano/suplemento. La gráfica muestra la frecuencia de observaciones de correlaciones de Pearson con una  $p < 0.05$  entre las variables gAG o tAG, peso del órgano y mADN, considerando el tipo de progenie la progenie y de suplemento.

## ANEXO 9

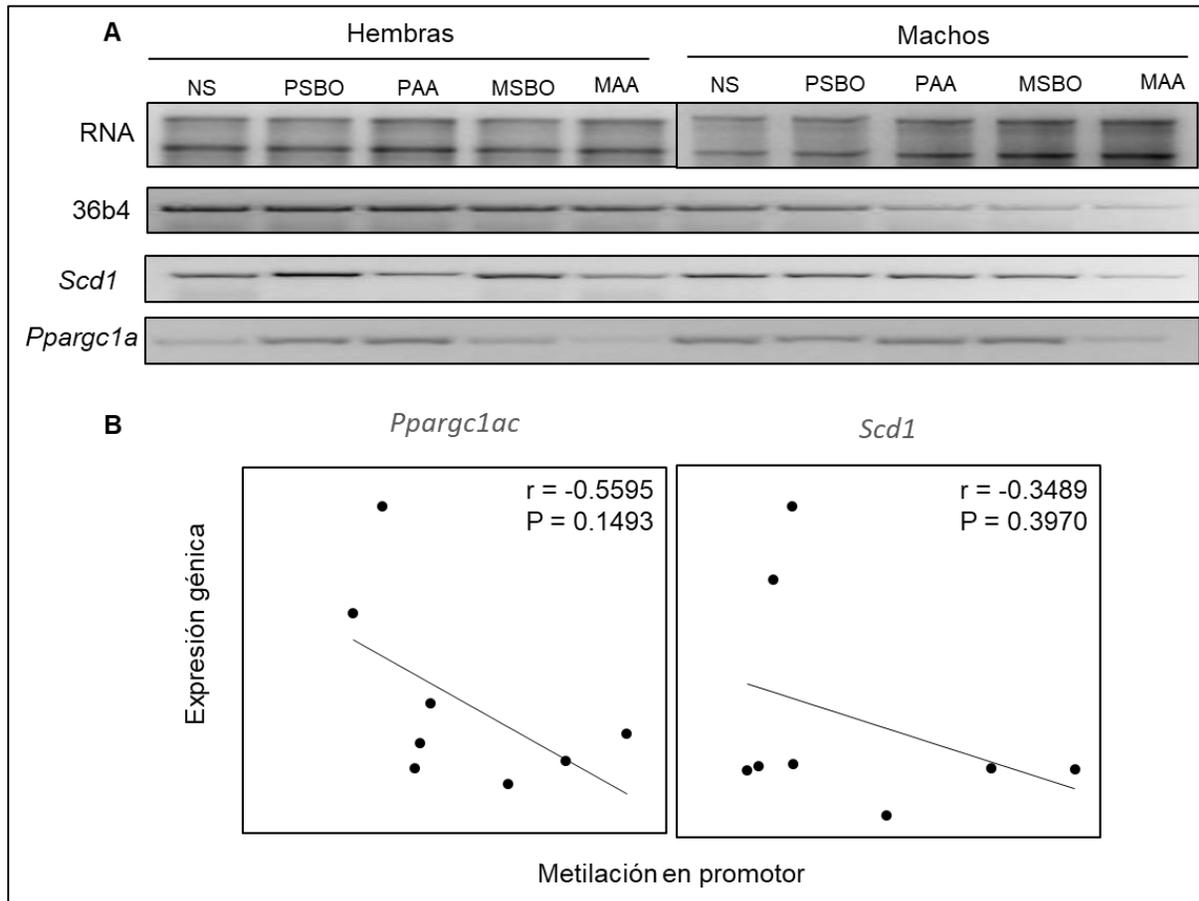
### Metilación gen-específica en promotores en hígado de ratones de 1 mes de edad.

	<i>Ppargc1a</i>		<i>Scd1</i>		<i>Fads2</i>	
	machos	hembras	machos	hembras	machos	hembras
MAA F1	16.91±0.86	22.65±1.19	5.44±0.28	16.32±1.73	0.00±0.00	0.00±0.00
MAA F1 2X	15.46±1.03	14.14±1.4	2.95±0.94	3.53±0.88	0.0±0.00	0.0±0.00
MAA F2	14.44±1.77	18.46±0.93	2.52±0.27	5.82±0.14	0.00±0.00	0.00±0.00
MAA F3	13.54±1.15	19.08±1.09	2.18±1.73	2.89±0.87	0.00±0.00	0.00±0.00
PAA F1	16.83±1.22	12.35±1.21	5.16±0.26	3.34±1.73	0.00±0.00	0.00±0.00
PAA F2	12.25±1.51	17.22±1.17	5.54±0.67	3.48±1.73	0.00±0.00	0.00±0.00
PAA F3	17.63±1.28	14.66±1.41	2.04±1.00	4.02±0.41	0.00±0.00	0.00±0.00
MSBO F1	13.87±1.17	16.46±1.09	1.99±1.73	3.72±1.22	0.00±0.00	0.00±0.00
MSBO F2	17.38±1.41	19.06±1.15	1.01±1.73	12.31±0.66	0.00±0.00	0.00±0.00
MSBO F3	16.57±1.27	16.23±1.21	3.89±0.54	5.26±0.40	0.00±0.00	0.00±0.00
PSBO F1	20.24±1.27	12.33±1.40	6.42±0.35	2.64±0.43	0.00±0.00	0.00±0.00
PSBO F2	15.86±1.39	16.13±1.27	4.2±0.37	8.66±0.33	0.40±0.90	0.00±0.00
PSBO F3	12.75±1.53	14.92±1.15	3.5±0.06	4.18±0.37	0.00±0.00	0.00±0.00
NS	13.11±1.27	19.96±1.33	0.85±1.73	10.54±0.38	0.00±0.00	0.00±0.00

Cada dato representa el promedio ( $\pm$  DS) de la metilación de las citosinas evaluadas en cada región en muestras de hígados agrupadas de tres individuos cada uno.

**ANEXO 10.** Correlaciones entre metilación del promotor (mp) de *Scd1*, mp de *Ppargc1a*, mg de AG suplementado, peso del hígado y AG específicos (archivo Excel anexo).

## ANEXO 11.



**ANEXO 11. Análisis de expresión génica. A) Análisis de RT-PCR de genes en progenie de F2. B) Correlación de Pearson entre la expresión y la metilación del promotor en progenie F2. Los datos de expresión fueron normalizados con el gen 36b4 y con los valores de NS, los de metilación con NS. Cada punto representa el promedio de dos replicas por sexo, de un pool de 3 hembras o 2 machos.**

## 11 Publicaciones durante el programa

- de la Rocha, C., Pérez-Mojica, J. E., León, S. Z., Cervantes-Paz, B., Tristán-Flores, F. E., Rodríguez-Ríos, D., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E., Alvarado-Caudillo, Y., Carmona, F. J., Esteller, M., Hernández-Rivas, R., Wrobel, K., Wrobel, K., Zaina, S., ... Lund, G. (2016). Associations between whole peripheral blood fatty acids and DNA methylation in humans. *Scientific reports*, 6, 25867. doi:10.1038/srep25867

Participación en la cohorte humana en el procesamiento de las muestras y análisis de datos (enero 2012-mayo 2013)

- Valencia-Morales, M., Zaina, S., Heyn, H., Carmona, F. J., Varol, N., Sayols, S., Condom, E., Ramírez-Ruz, J., Gomez, A., Moran, S., Lund, G., Rodríguez-Ríos, D., López-González, G., Ramírez-Nava, M., de la Rocha, C., Sanchez-Flores, A., ... Esteller, M. (2015). The DNA methylation drift of the atherosclerotic aorta increases with lesion progression. *BMC medical genomics*, 8, 7. doi:10.1186/s12920-015-0085-1

Participación en la crianza y cuidado de los ratones (abril-diciembre 2013).

- Tristán-Flores, F. E., Guzmán, P., Ortega-Kermedy, M. S., Cruz-Torres, G., de la Rocha, C., Silva-Martínez, G. A., Rodríguez-Ríos, D., Alvarado-Caudillo, Y., Barbosa-Sabanero, G., Sayols, S., Lund, G., ... Zaina, S. (2018). Liver X Receptor-Binding DNA Motif Associated With Atherosclerosis-Specific DNA Methylation Profiles of Alu Elements and Neighboring CpG Islands. *Journal of the American Heart Association*, 7(3), e007686. doi:10.1161/JAHA.117.007686

Participación en trabajo del laboratorio (marzo 2012-abril 2013).

- de la Rocha C, Zaina S, Lund G (2015). Reprogramming transgenerational programming. *Current Opinion of Lipidology*. ;26(6):603-4. doi: 10.1097/MOL.0000000000000245.

Participación en la escritura del comentario (diciembre 2015).

- De La Rocha C, Rodríguez-Ríos D, Molina-Torres J, Ramírez-Chávez E, Alvarado-Caudillo Y, Orozco-Castellanos LM, et al. 2019; A modest supplement of arachidonic acid induces cumulative metabolic and epigenetic changes across three generations in mice.: not published.

Artículo que aún no ha sido publicado, participación en la mayoría del trabajo experimental y escritura del manuscrito.