



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**ESTUDIO BIOQUÍMICO,
NEUROQUÍMICO, MORFOLÓGICO
Y PROTEÓMICO DE DISTINTAS
CONDICIONES NUTRICIONALES
EN TERNEROS Y CERDOS**

**Tesis Doctoral
Natalia Yeste Vizcaino
Febrero de 2022**

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona



Universitat Autònoma de Barcelona

**ESTUDIO BIOQUÍMICO, NEUROQUÍMICO,
MORFOLÓGICO Y PROTEÓMICO DE
DISTINTAS CONDICIONES NUTRICIONALES
EN TERNEROS Y CERDOS**

Tesis Doctoral

Natalia Yeste Vizcaino

Directora

Anna Bassols i Teixidó

Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Veterinaria

Universitat Autònoma de Barcelona

2022



Universitat Autònoma de Barcelona

ESTUDIO BIOQUÍMICO, NEUROQUÍMICO, MORFOLÓGICO Y PROTEÓMICO DE DISTINTAS CONDICIONES NUTRICIONALES EN TERNEROS Y CERDOS

Memoria realizada por

Natalia Yeste Vizcaino

para optar al título de Doctora

Tesis realizada bajo la dirección de la catedrática Anna Bassols i Teixidó en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona, dentro del Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina.

Natalia Yeste Vizcaino

Anna Bassols i Teixidó

Bellaterra, febrero de 2022

*If you can dream it,
you can do it*

- Walt Disney -



Quien me lo iba a decir a mi hace seis años cuando llegué a Barcelona que ahora estaría escribiendo esta tesis doctoral interminable, parecía que nunca iba a llegar este momento. Cuando llegué a la UAB la única cosa que tenía claro es que no quería hacer el doctorado, que lo de hacer ciencia no estaba hecho para mí. Pero la vida da muchas vueltas, para bien o para mal, y está claro que este cambio de rumbo no se hubiera producido si no fuera por todas las personas que de una manera u otra habéis formado parte de esta etapa. Desde el primer momento me aceptasteis como una más de esta familia de la que ahora formo parte, y sé que, aunque ahora nos separemos me llevo una parte de cada uno de vosotros para siempre, y que en algún momento nos volveremos a juntar, y seguro que será para comer y beber, algo que no nos ha faltado nunca.

Por si fuera poco, no podía ser una etapa más y un poco normal como la de todo el mundo, más complicado no podía haberlo tenido. Al parecer los astros divinos se alinearon para no dejarme terminar ni entregarla nunca. Ha tenido que haber una pandemia mundial por el medio, así que, gracias SARS-CoV-2 por aparecer en nuestras vidas y complicarlo todo un poco más. Y cuando todo se estaba normalizado, se produce un ciberataque que parecía que no me dejaría depositar nunca.

Hecha esta pequeña reflexión, toca empezar todo esto por el principio, por la persona que me abrió las puertas a esta odisea, **Anna Bassols**. Tengo mucho que agradecerte, desde el primer minuto que puse un pie en este departamento depositaste una confianza enorme en mí, me has ido guiando por este largo camino, a la vez que me he sentido respaldada en todo momento.

A la gente del INIA, pero principalmente a **Antonio González-Bulnes**, primero por cuidar los gorrinos que forman parte de esta tesis, y segundo por estar siempre disponible a distancia. Siempre que he necesitado alguna cosa has estado allí detrás de la pantalla. Te estaré eternamente agradecida por el trato y cariño con el que siempre me has tratado, y porqué sin conocerme

Agradecimientos

prácticamente has tenido una confianza ciega conmigo. Espero que el tiempo nos vuelva a juntar porque es un gustazo trabajar contigo.

A **Susana Benítez** mi salvavidas en el HPLC. Has sido mi mayor ayuda y apoyo siempre que me tocaba hacer viajes a medicina, echando un mano siempre que lo he necesitado, incluso los fines de semana. Al final no solo has sido el soporte técnico a la hora de trabajar con esta máquina infernal, que raro era la semana que nos daba un respiro, sino que también me has dado un soporte personal enorme sabiendo que podía contar contigo para cualquier motivo.

Aunque cada vez somos menos, hay mucha gente que forma y ha formado parte de este departamento de bioquímica. **Antonio** tu desde el primer momento confiaste en mi para llevar las prácticas de *Laboratori Integrat*, y esto te lo agradeceré toda la vida, ya que el haber podido impartir estas clases a los futuros veterinarios para mi es de las mayores experiencias que me llevo, nunca me hubiera podido imaginar que me llenaría tanto. Pero ahora nos queda disfrutar de lo mejor, ya que cervezas y excursiones seguro que no nos faltarán. A **Rosa**, quien nos lo iba a decir que al final te irías tú antes que yo, entrar a la secretaría y verte, recibir tus “buenos días”, hacía que las mañanas empezaran mucho mejor. A las chicas del Servei, **Raqueles** y **Yolanda**, gracias por dejarme ser una más de vosotras, y ayudarme en cualquier cosa que he necesitado. A **Anna Vilalta**, coincidimos muy pocos meses juntas, pero me acuerdo de que durante mi primer año era toda una odisea para mi hacer cualquier experimento o encontrar cualquier cosa, me enseñaste muchísimo. Realmente, nos hemos conocido y hemos hecho vida juntas fuera de los laboratorios, donde hubiera comida y bebida, y esto es lo más bonito que nos llevamos, porque hay más vida fuera del trabajo.

A mis mentores, los que me acogieron como una más del grupo cuando llegué. **Laura y Dani**, gracias a vosotros decidí tirarme a la piscina de la ciencia, y

hoy estoy aquí. Todo lo que os pueda decir se queda corto. De vosotros aprendí todo lo que se ahora, tanto lo bueno como lo malo, y aunque ya no estáis aquí de cuerpo presente lo habéis estado en todo momento a distancia. Pero, sobre todo, he aprendido lo que es la buena vida y me quedo con todos los momentos compartidos, principalmente los cierres en la Vila.

A **Néstor**, la única persona que aún aguanta aquí desde que llegué. Quien te lo iba a decir que llegaría yo y pasarías de ser “El Capo”, una persona respetada por todas las personas de la Unidad, al “Yayo”. Han sido muchas horas las que hemos pasado en la Vila, así que las cosas no podían ir a mejor. Me voy con el honor de ser la única persona que te ha penetrado y que te ha acompañado hacerte un tatuaje. Ara en serio, moltes gràcies per tot, et tinc una admiració i un carinyo que no t’ho creus ni tu. Sigui on sigui faré el possible per seguir venint a veure’t, no et lliuraràs de mi tan fàcilment.

Jorge, fuiste el último en llegar, pero estos últimos meses has sido un gran apoyo, no has dejado que me volviera loca en ese despacho solitario y vacío de calor humano. Quien nos lo iba a decir, incluso vamos a tener un artículo y un capítulo de libro juntos, si esto no nos une, no sé qué lo hará. Ha sido muy guay trabajar contigo mano a mano en el laboratorio, pero mejor han estado las horas Vileras junto al Yayo y la Elena, sobre todo los días que tenías que dar prácticas por la tarde. Esos días se quedan conmigo para siempre, y sé que te llevo para toda la vida, a partir de ahora tocará hacer las cervezas en la playa de Cambrils.

No podía escribir unos agradecimientos sin poner a la persona que se ha llevado una parte de mi corazón con ella, y en la otra parte ha dejado una huella enorme. **Elena**, debería darte las gracias por tu apoyo técnico ya que sin tu ayuda muchas cosas no hubieran salido para delante... pero es que todo esto para mí se quedó en un segundo plano hace mucho tiempo, no has sido una compañera más. Te convertiste en mi mayor apoyo dentro y fuera. Eres la que ha vivido todos mis altibajos, contigo he reído, he llorado... he vivido mis mejores

Agradecimientos

momentos, si pienso en alguno tú estás en él. Solo puedo dar las gracias por haberte cruzado en mi vida, y ya sea estando en la misma ciudad o a 1000km siempre te llevo conmigo.

Romi, mi amiga, confidente y amante. Se que todo lo que te pueda decir ahora se queda corto, ya que nunca podré agradecerte suficiente lo que haces por mí día a día, siempre has sido y serás mi mayor apoyo. Solo puedo darte las gracias, por estar, por quererme. Se que este último año no ha sido fácil para ninguna de las dos, y a pesar de todo aquí seguimos la una para la otra, no me imagino un futuro sin ti a mi lado, acompañándome en cualquier locura que se presente. Ya lo sabes: yo contigo, tú conmigo.

Por último, no puedo terminar los agradecimientos sin una mención especial a las personas más importantes, las que llevan conmigo toda la vida apoyándome en cada decisión que he tomado, mi familia. **Mamá, David** solo os puedo dar las GRACIAS. Gracias por estar ahí a mi lado, en cada momento de esta larga etapa, y ayudándome a levantarme cada vez que me caído. Soy lo que soy gracias a vosotros.

GRACIAS POR TANTO
GRACIAS POR SER PARTE DE MÍ

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	VII
LISTADO DE ABREVIATURAS	XVII
RESÚMENES.....	1
INTRODUCCIÓN	9
1. Bienestar y nutrición animal	11
2. Sistema Nervioso Central	13
2.1. Monoaminas transmisoras.....	14
2.1.1. Catecolaminas.....	14
2.1.1.1. Metabolismo de las catecolaminas	14
2.1.1.2. Receptores dopaminérgicos.....	16
2.1.1.3. Sistema dopaminérgico	17
2.1.1.4. Receptores adrenérgicos.....	18
2.1.1.5. Sistema noradrenérgico	19
2.1.2. Indolaminas	20
2.1.2.1. Metabolismo de las indolaminas.....	20
2.1.2.2. Receptores serotoninérgicos.....	21
2.1.2.3. Sistema serotoninérgico.....	22
2.2. Acetilcolina	23
2.2.1. Receptores colinérgicos.....	24
2.2.2. Sistema colinérgico.....	24
2.3. Aminoácidos transmisores	26
2.3.1. Glutamato.....	26
2.3.1.1. Receptores glutamatérgicos.....	26
2.3.1.2. Sistema glutamatérgico.....	27
2.3.2. GABA.....	27
2.3.2.1. Receptores GABAérgicos.....	28
2.3.2.2. Sistema GABAérgico	28
3. Respuestas endocrinas	30
3.1. Eje SAM.....	30
3.2. Eje HPA	30
4. Marcadores neuronales	33
4.1. Núcleos Neuronales	35
4.2. Doblecortina.....	36
4.3. Proteína de los neurofilamentos.....	36

5.	Restricción del crecimiento intrauterino	37
5.1.	Clasificación	37
5.2.	Enfermedades en adultos de origen fetal (FOAD).....	39
5.2.1.	Hipótesis de la insulina fetal y genes MODY.....	40
5.2.2.	“Thrifty genotype” (genotipo “ahorrativo”)	40
5.2.3.	“Thrifty phenotype” (hipótesis de Barker).....	41
5.3.	Alteraciones neurológicas asociadas a la IUGR	42
5.3.1.	Déficits estructurales	42
5.3.2.	Déficits funcionales.....	43
5.4.	Alteraciones metabólicas asociadas a la IUGR	44
5.5.	Modelos animales de IUGR	50
6.	El hipocampo y la IUGR	53
7.	Los aminoácidos en la nutrición de terneros.....	55
8.	Estudios proteómicos.....	58
	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	63
	Antecedentes	65
	Objetivos	67
	MATERIAL Y MÉTODOS	69
	Material.....	71
1.	ELISAs comerciales	71
2.	Determinación de parámetros bioquímicos.....	72
3.	Anticuerpos	73
	Métodos	74
4.	Obtención y procesamiento de las muestras	74
4.1.	Sangre, suero y plasma.....	74
4.2.	Áreas cerebrales.....	74
5.	Preparación de homogenados de tejido cerebral	76
6.	Determinaciones por HPLC.....	77
6.1.	Sistema HPLC.....	77
6.2.	Determinación de neurotransmisores en extractos cerebrales.....	78
6.2.1.	Procesado de los homogenados cerebrales para HPLC.....	78
6.2.2.	Separación y cuantificación de neurotransmisores	78

6.3.	Determinación de aminoácidos libres en plasma	80
6.3.1.	Preparación de las muestras.....	80
6.3.2.	Reacción de derivatización de los aminoácidos.....	80
6.3.3.	Separación y cuantificación de aminoácidos	82
7.	Ensayo de peroxidación lipídica	84
8.	Análisis inmunohistoquímico del hipocampo.....	86
8.1.	Congelación y corte de las muestras.....	86
8.2.	Inmunohistoquímica.....	86
8.3.	Procesamiento y análisis de imagen	88
9.	Proteómica del hipocampo mediante TMT10-plex	89
9.1.	Análisis del proteoma de hipocampo mediante TMT10-plex, RP-HPLC y LC-MS/MS.....	89
9.1.1.	Cuantificación de proteína por el método BCA	89
9.1.2.	Reducción, alquilación y tripsinización	90
9.1.3.	Marcaje con TMT10-plex de los péptidos.....	91
9.1.4.	Cromatografía líquida de pH alto - fase reversa	92
9.1.5.	Análisis LC-MS / MS	94
9.1.6.	Análisis de datos	94
9.1.7.	Análisis estadístico.....	95
9.2.	Análisis del proteoma de hipocampo mediante TMT10-plex y nano-LC-ESI-MS/MS.....	96
9.2.1.	Cuantificación de proteína por el método BCA	96
9.2.2.	Reducción, alquilación y tripsinización	96
9.2.3.	Marcaje con TMT10-plex de los péptidos.....	97
9.2.4.	Espectrometría de masas en tándem de ionización por electropulverización de cromatografía nanolíquida (nano LC-ESI-MS/MS).....	97
9.2.5.	Búsqueda de base de datos	99
9.2.6.	Análisis estadístico.....	99
9.3.	Análisis bioinformático.....	101
	RESULTADOS.....	103
	Capítulo 1. Efecto de la suplementación de la dieta materna con el antioxidante hidroxitirosol en el desarrollo cerebral de un modelo porcino de restricción del crecimiento intrauterino	105
	Estudio 1. Efecto de la suplementación materna de la dieta con el antioxidante hidroxitirosol en el cerebro de fetos de 100 días de gestación, de cerdos de 1 mes y de 6 meses de edad	107
1.	Declaración de ética	107
2.	Animales y procedimiento experimental	107

3.	Análisis estadístico	109
4.	Perfil de neurotransmisores	110
4.1.	Amígdala	111
4.2.	Corteza prefrontal	113
4.3.	Hipocampo	114
4.4.	Efecto del sexo y su interacción con el tratamiento con HTX sobre los neurotransmisores	116
5.	Parámetros de estrés oxidativo en los fetos	119
6.	Análisis inmunohistoquímico del hipocampo	120
7.	Efecto de la suplementación materna con HTX en el proteoma del hipocampo de los fetos mediante TMT10-plex.....	127
Estudio 2. Efecto de la suplementación materna con el antioxidante hidroxitirosol en el cerebro de fetos de 100 días de gestación afectados por la IUGR		133
1.	Declaración de ética	133
2.	Animales y procedimiento experimental	133
3.	Clasificación de los animales	135
4.	Análisis estadístico	137
5.	Perfil de neurotransmisores	137
6.	Parámetros de estrés oxidativo.....	142
7.	Análisis inmunohistoquímico del hipocampo	143
Capítulo 2. Efectos de una dieta alta en grasas en el metabolismo y en el sistema nervioso central de animales de 1 año en un modelo porcino de IUGR		155
1.	Declaración de ética	157
2.	Animales y procedimiento experimental	157
3.	Análisis estadístico	160
4.	Perfil bioquímico del plasma	160
5.	Perfil de aminoácidos libres en el plasma	165
5.1.	Efecto de la dieta y de la IUGR sobre los aminoácidos libres.....	167
6.	Perfil de neurotransmisores	169
6.1.	Efecto de la dieta y de la IUGR sobre los neurotransmisores	174
6.2.	Efecto de la dieta y del sexo sobre los neurotransmisores	180
7.	Perfil de neuropéptidos en el hipotálamo	186
8.	Grado de peroxidación lipídica.....	189

9.	Análisis inmunohistoquímico del hipocampo	191
10.	Análisis del proteoma del hipocampo mediante TMT10-plex	198
10.1.	Efecto de la interacción dieta*peso sobre la abundancia diferencial de proteínas	202
10.2.	Efecto de la interacción peso*dieta sobre la abundancia diferencial de proteínas	210
Capítulo 3. Evaluación de la suplementación de triptófano en dietas con lacto reemplazantes en terneros lactantes		227
1.	Animales	229
2.	Condiciones ambientales	229
3.	Programa de alimentación	230
4.	Lacto reemplazantes y tratamientos.....	231
5.	Obtención de las muestras.....	232
6.	Análisis estadístico	233
7.	Perfil de aminoácidos libres en plasma	234
8.	Perfil bioquímico	239
DISCUSIÓN.....		245
Capítulo 1. Efecto de la suplementación de la dieta materna con el antioxidante hidroxitirosol en el desarrollo cerebral de un modelo porcino de restricción del crecimiento intrauterino		247
Estudio 1. Efecto de la suplementación materna de la dieta con el antioxidante hidroxitirosol en el cerebro de fetos de 100 días de gestación, de cerdos de 1 mes y de 6 meses de edad.....		249
1.	Efectos del HTX sobre el perfil de neurotransmisores en distintas áreas cerebrales.	251
2.	Efectos del HTX en el desarrollo del hipocampo.....	255
3.	Efectos del HTX sobre el proteoma del hipocampo.....	257
Estudio 2. Efecto de la suplementación materna con el antioxidante hidroxitirosol en el cerebro de fetos de 100 días de gestación afectados por la IUGR.....		261
1.	Efectos de la IUGR sobre el perfil de neurotransmisores en varias áreas del cerebro.....	261
2.	Efectos de la IUGR en el desarrollo del hipocampo.....	263
Capítulo 2. Efectos de una dieta alta en grasas en el metabolismo y en el sistema nervioso central de animales de 1 año en un modelo porcino de IUGR		267
1.	Efectos de la dieta HFD sobre la IUGR en el perfil bioquímico.....	269
2.	Efectos de la dieta HFD sobre la IUGR en el perfil de aminoácidos libres del plasma.....	272
3.	Efectos de la dieta HFD sobre la IUGR en el perfil de neurotransmisores de varias áreas del cerebro, y en los neuropéptidos del hipotálamo.....	274

Índice

4. Efectos del sexo sobre la dieta HFD en el perfil de neurotransmisores de varias áreas del cerebro.....	278
5. Efectos de la dieta HFD sobre la IUGR en la morfología del hipocampo.	280
6. Efectos de la dieta HFD sobre la IUGR en el proteoma del hipocampo. .	282
Capítulo 3. Evaluación de la suplementación de triptófano en dietas con lacto reemplazantes en terneros lactantes.....	289
CONCLUSIONES.....	295
REFERENCIAS	301
APÉNDICES.....	333
ARTÍCULOS.....	347

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Esquema de la ruta de síntesis de catecolaminas.....	15
Figura 2. Distribución en el encéfalo de las proyecciones del sistema dopaminérgico en el SNC.	18
Figura 3. Distribución en el encéfalo de las proyecciones del sistema noradrenérgico en el SNC.	19
Figura 4. Esquema de la ruta de síntesis y degradación de la serotonina.	21
Figura 5. Distribución en el encéfalo de las proyecciones del sistema serotoninérgico en el SNC.	23
Figura 6. Distribución en el encéfalo de las proyecciones del sistema colinérgico en el SNC.	25
Figura 7. Metabolismo de los aminoácidos transmisores en el encéfalo.	29
Figura 8. Representación gráfica de funcionamiento de los ejes SAM y HPA..	32
Figura 9. Representación esquemática de una neurona motora de la médula espinal con sus regiones representativas.	34
Figura 10. Etapas de desarrollo en la neurogénesis y marcadores neurales.	35
Figura 11. Hipótesis de Barker que explica el FOAD en lactantes con IUGR.....	41
Figura 12. Hipótesis de Barker.	47
Figura 13. Papel del entorno nutricional materno-fetal en los cambios de tejidos y órganos relacionados con el metabolismo energético de la descendencia con IUGR.	48
Figura 14. Secciones teñidas con Nissl y dibujos lineales que ilustran la organización general de la formación del hipocampo en humanos.....	53
Figura 15. Estómago de los rumiantes.....	55
Figura 16. Estructura química genérica del reactivo TMT.	61
Figura 17. Esquema de la cuantificación relativa por TMT10-plex.	62

Material y métodos

Figura 18. Partes básicas del sistema HPLC utilizado.....	77
Figura 19. Cromatograma de la separación de neurotransmisores en una muestra de amígdala de un feto porcino.	79
Figura 20. Esquema de la reacción de derivatización de los aminoácidos.	81
Figura 21. Cromatograma de la separación de aminoácidos en una muestra de plasma bovino.	83
Figura 22. Esquema de la reacción para evaluar la peroxidación lipídica.....	84
Figura 23. Esquema general del protocolo de proteómica.....	89
Figura 24. Perfil cromatográfico de los péptidos en el RP-HPLC del experimento 1 (azul) y el experimento 2 (rojo).	93
Figura 25. Procedimiento de marcaje, randomización e identificación de las muestras.	93

Resultados. Capítulo 1. Estudio 1

Figura 26. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la concentración de neurotransmisores y metabolitos en la amígdala de fetos de 100 días, lechones de 1 mes, y cerdos de 6 meses de edad.	112
Figura 27. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la concentración de neurotransmisores y metabolitos en la corteza prefrontal de fetos de 100 días, lechones de 1 mes, y cerdos de 6 meses de edad.....	114
Figura 28. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la concentración de neurotransmisores y metabolitos en el hipocampo de fetos de 100 días, lechones de 1 mes, y cerdos de 6 meses de edad.	115
Figura 29. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la inmunotinción con NeuN en el hipocampo de fetos de 100 días (A-B), lechones de 1 mes (C-D) y cerdos de 6 meses (E-F).	122
Figura 30. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la inmunotinción con NeuN en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días (A1-A2, B1-B2), lechones de 1 mes (C1-C2, D1-D2) y cerdos de 6 meses (E1-E2, F1-F2).	123
Figura 31. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la inmunotinción con DCX en el hipocampo de fetos de 100 días (A-B), lechones de 1 mes (C-D) y cerdos de 6 meses (E-F).	124

Figura 32. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la inmunotinción con DCX en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días (A1-A2, B1-B2), lechones de 1 mes (C1-C2, D1-D2) y cerdos de 6 meses (E1-E2, F1-F2).	125
Figura 33. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la inmunotinción de NFT en el hipocampo de fetos de 100 días (A-B), lechones de 1 mes (C-D) y cerdos de 6 meses (E-F).	126
Figura 34. Representación gráfica mediante Panther del análisis de términos GO-Slim según la función molecular de las DAP identificadas.....	129
Figura 35. Representación gráfica mediante Panther del análisis de términos GO-Slim según los procesos biológicos de las DAP identificadas.....	130
Figura 36. Representación gráfica mediante STRING de las interacciones de las DAP identificadas.....	132

Resultados. Capítulo 1. Estudio 2

Figura 37. Esquema del diseño experimental de este estudio.	135
Figura 38. Representación gráfica de la interacción del tratamiento con HTX y del peso sobre la concentración de 5-HT (A) e indolaminas totales (B) en el hipocampo.	138
Figura 39. Representación gráfica del efecto del sexo (A), y de la interacción del sexo con el peso (B) sobre la concentración de NA en la amígdala.	139
Figura 40. Efecto de la suplementación materna con HTX y de la IUGR sobre la inmunotinción con NeuN en el hipocampo de fetos de 100 días.	144
Figura 41. Efecto de la suplementación materna con HTX y de la IUGR sobre la inmunotinción con NeuN en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días.	145
Figura 42. Efecto de la suplementación materna con HTX y de la IUGR sobre la inmunotinción con DCX en el hipocampo de fetos de 100 días.....	149
Figura 43. Efecto de la suplementación materna con HTX y de la IUGR sobre la inmunotinción con DCX en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días... ..	150
Figura 44. Efecto de la suplementación materna con HTX y de la IUGR sobre la inmunotinción con NFT en el hipocampo de fetos de 100 días.....	152
Figura 45. Efecto de la suplementación materna con HTX y de la IUGR sobre la inmunotinción con NFT en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días. ..	153

Resultados. Capítulo 2

Figura 46. Esquema del diseño experimental de este estudio..	159
Figura 47. Representación gráfica del efecto de la dieta (A), y de la interacción de la dieta con el peso al nacer (B) sobre la concentración de triglicéridos en el plasma.	161
Figura 48. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el peso al nacer sobre la concentración de colesterol total (A), LDL-C (B) y HDL-C (C) en el plasma.	162
Figura 49. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el peso al nacer sobre la concentración de cortisol (A) y haptoglobina (B) en el plasma.	163
Figura 50. Representación gráfica del efecto de la dieta sobre la concentración de los aminoácidos libres en el plasma.	166
Figura 51. Representación gráfica del efecto de la interacción de la dieta con el peso al nacer sobre la concentración de los aminoácidos libres en el plasma.	167
Figura 52. Representación gráfica del efecto de la dieta sobre la concentración de 5-HT en la amígdala (A), el hipotálamo (B), el cuerpo estriado (C), la corteza prefrontal (D) y el hipocampo (E).	170
Figura 53. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el peso al nacer sobre la concentración de GABA en el hipotálamo.	174
Figura 54. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el peso al nacer sobre la concentración de 5-HT en la amígdala (A), el hipotálamo (B), el cuerpo estriado (C), la corteza prefrontal (D) y el hipocampo (E).	175
Figura 55. Representación gráfica del efecto del peso al nacer (A), y de la interacción de la dieta con el peso al nacer (B) sobre la concentración de DA en el cuerpo estriado.	176
Figura 56. Representación gráfica de la interacción de la dieta con sexo sobre la concentración de DOPAC (A) y de 5-HT (B) en la amígdala.	180
Figura 57. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el sexo sobre la concentración de DOPAC (A), de HVA (B), de 3-MT (C) y de Glutamato (D) en el cuerpo estriado.	181
Figura 58. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el sexo sobre la concentración de HVA (A) y de Glutamato (B) en el hipotálamo.	182
Figura 59. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el peso al nacer sobre la concentración de NPY en el hipotálamo.	187
Figura 60. Representación gráfica del efecto del peso al nacer (A), y de la interacción de la dieta con el peso al nacer (B) sobre la concentración de POMC en el hipotálamo.	187

Figura 61. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el sexo sobre la concentración de NPY (A) y de POMC (B) en el hipotálamo.	188
Figura 62. Representación gráfica del efecto de la dieta (A), y de la interacción de la dieta con el peso al nacer (B) sobre la concentración de MDA en el hipocampo.	190
Figura 63. Esquema del diseño experimental para el análisis inmunohistoquímico y proteómico del hipocampo.	191
Figura 64. Efecto de la dieta HFD y de la IUGR sobre la inmunotinción con NeuN en el hipocampo.	193
Figura 65. Efecto de la dieta HFD y de la IUGR sobre la inmunotinción con NeuN en las áreas CA1 y GD del hipocampo.	194
Figura 66. Efecto de la dieta HFD y de la IUGR sobre la inmunotinción con DCX en las áreas CA1 y GD del hipocampo.	196
Figura 67. Efecto de la dieta HFD y de la IUGR sobre la inmunotinción con NFT en las áreas CA1 y GD del hipocampo.	197
Figura 68. Diagrama de Venn con el número de DAP identificadas en las comparaciones por sexo, peso al nacer y dieta.	200
Figura 69. Diagrama de Venn con el número de DAP identificadas en las comparaciones por peso al nacer, dieta y la interacción dieta*peso.	202
Figura 70. Diagrama de Venn con el número de DAP identificadas en las comparaciones entre CTRL-LBW/NBW y HFD-LBW/NBW.	205
Figura 71. Representación gráfica mediante Panther del análisis de términos GO-Slim según la función molecular de las DAP identificadas en la comparación Dieta*Peso. .	205
Figura 72. Representación gráfica mediante Panther del análisis de términos GO-Slim según los procesos biológicos de las DAP identificadas en la comparación Dieta*Peso.	207
Figura 73. Representación gráfica mediante STRING de las interacciones de las DAP identificadas en la comparación de los animales con distinto peso alimentados con la dieta CTRL (A), y con la dieta HFD (B).	209
Figura 74. Diagrama de Venn con el número de DAP identificadas en las comparaciones por peso al nacer, dieta y la interacción peso*dieta.	210
Figura 75. Diagrama de Venn con el número de DAP identificadas en las comparaciones entre NBW-CTRL/HFD y LBW-CTRL/HFD.	211
Figura 76. Representación gráfica mediante Panther del análisis de términos GO-Slim según la función molecular de las DAP identificadas en la comparación Peso*Dieta. .	211

Índice

Figura 77. Representación gráfica mediante Panther del análisis de términos GO-Slim según los procesos biológicos de las DAP identificadas en la comparación Peso*Dieta.	214
Figura 78. Diagrama del Reactome de los principales procesos identificados en la comparativa de dietas en los animales NBW: metabolismo de RNA, metabolismo, metabolismo de proteínas y vías de transporte mediadas por vesículas.	218
Figura 79. Diagrama del Reactome de los principales procesos identificados en la comparativa de dietas en los animales LBW: metabolismo de RNA, metabolismo de proteínas y vías de transporte mediadas por vesículas.	220
Figura 80. Representación gráfica mediante STRING de las interacciones de las DAP identificadas en la comparación entre dietas de los animales NBW.	221
Figura 81. Representación gráfica mediante STRING de las interacciones de las DAP identificadas en la comparación entre dietas de los animales LBW.	223

Resultados. Capítulo 3

Figura 82. Representación gráfica de la concentración de Trp en plasma.	234
Figura 83. Representación gráfica de la concentración de Kyn en plasma.....	235
Figura 84. Representación gráfica de la concentración de NEFAs en suero.	239
Figura 85. Representación gráfica de la concentración de glucosa en suero.	240
Figura 86. Evolución de la concentración de cortisol sérico a lo largo de las distintas semanas del proceso de destete.	241

Discusión

Figura 87. Estructura química del hidroxitirosol.....	248
Figura 88. Vía metabólica común entre la DA y el HTX.....	252
Figura 89. Ruta de migración de las células piramidales hacia CA (A) y de las células granulares hacia GD (B) desde la capa germinativa ventricular.	256
Figura 90. Anaplerosis y cataplerosis en el ciclo de Krebs.....	273
Figura 91. Heatmap del patrón de las DAP en las comparaciones CTRL-LBW versus HFD-LBW y CTRL-NBW versus HFD-NBW.	283
Figura 92. Vía metabólica de la quinurenina de la degradación del triptófano.....	290

LISTADO DE TABLAS

Tabla A. Listado de abreviaturas.....	XVII
--	------

Material y métodos

Tabla 1. Parámetros determinados mediante ELISAs, y los kits comerciales utilizados para su cuantificación.	71
Tabla 2. Parámetros bioquímicos determinados, y los kits comerciales usados para su cuantificación mediante el analizador automático AU400.	72
Tabla 3. Listado de anticuerpos primarios y sus respectivas diluciones.	73
Tabla 4. Listado de anticuerpos secundarios.	73
Tabla 5. Gradiente entre las dos fases móviles para la separación cromatográfica de los aminoácidos.	82
Tabla 6. Serie de soluciones de alcohol y de xileno, con los respectivos tiempos y repeticiones.	88
Tabla 7. Gradiente cromatográfico entre los dos solventes para la separación de los péptidos en el RP-HPLC.	92

Resultados. Capítulo 1. Estudio 1

Tabla 8. Peso corporal medio inicial, y número de individuos del estudio.....	109
Tabla 9. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en las distintas áreas cerebrales en función de la suplementación de la dieta materna sin o con HTX en los fetos de 100 días y cerdos de 1 y 6 meses.	117
Tabla 10. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre los marcadores de estrés oxidativo y las enzimas antioxidantes en la corteza prefrontal y el hipocampo de fetos de 100 días.	119
Tabla 11. Peso corporal medio inicial, y número de individuos incluidos en el análisis inmunohistoquímico.	120
Tabla 12. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la inmunotinción de NeuN en el hipocampo de los animales cuyas madres fueron CTRL o suplementadas con HTX.	121
Tabla 13. Diseño experimental del TMT10-plex.	127
Tabla 14. Listado de proteínas diferenciales identificadas por TMT10-plex.	129

Resultados. Capítulo 1. Estudio 2

Tabla 15. Información de los fetos utilizados para cada tratamiento. 136

Tabla 16. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en las distintas áreas cerebrales en función de la suplementación de la dieta materna con o sin HTX en los fetos de 100 días según su peso. 140

Tabla 17. Efecto de la IUGR sobre los marcadores de estrés oxidativo y las enzimas antioxidantes en la corteza prefrontal y el hipocampo. 142

Tabla 18. Peso corporal medio y número de individuos incluidos en el análisis inmunohistoquímico. 143

Tabla 19. Efecto de la dieta y del peso al nacer de los fetos sobre la inmunotinción de NeuN en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días. 146

Tabla 20. Efecto del sexo de los fetos sobre la inmunotinción de NeuN en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días. 148

Resultados. Capítulo 2

Tabla 21. Peso corporal medio al nacer y al sacrificio según las variables de estudio. 158

Tabla 22. Peso corporal medio al nacer y al sacrificio según la dieta recibida y el efecto de la IUGR. 158

Tabla 23. Concentración de diferentes parámetros bioquímicos plasmáticos en función de la dieta y del peso al nacer. 164

Tabla 24. Concentración de los aminoácidos libres plasmáticos en función de la dieta, del peso al nacer o sexo del animal. 165

Tabla 25. Concentración de los aminoácidos libres en el plasma en función de la dieta y del peso al nacer. 168

Tabla 26. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en distintas áreas cerebrales en función de la dieta, del peso al nacer o del sexo del animal. 172

Tabla 27. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en distintas áreas cerebrales en función de la dieta recibida y del peso al nacer. 177

Tabla 28. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en distintas áreas cerebrales en función de la dieta recibida y del sexo. 183

Tabla 29. Concentración de los neuropéptidos NPY y POMC en el hipotálamo en función de la dieta y el peso al nacer. 186

Tabla 30. Concentración de los neuropéptidos NPY y POMC en el hipotálamo en función del sexo y de la dieta.....	188
Tabla 31. Concentración de MDA en función de la dieta y el peso al nacer en distintas áreas cerebrales.....	189
Tabla 32. Efecto de la dieta HFD y de la IUGR sobre la inmunotinción de NeuN en las áreas CA1 y GD del hipocampo.....	192
Tabla 33. Diseño experimental del marcaje con TMT10-plex.....	198
Tabla 34. Listado de proteínas diferencialmente abundantes en función del sexo, del peso al nacer o de la dieta.....	201
Tabla 35. Listado de proteínas diferencialmente abundantes identificadas entre CTRL-LBW/NBW y HFD-LBW/NBW.....	203
Tabla 36. Agrupación de las DAP identificadas mediante KEGG en los animales NBW según las vías más representativas de las que forman parte.....	217
Tabla 37. Agrupación de las DAP identificadas mediante KEGG en los animales LBW según las vías más representativas de las que forman parte.....	219
Tabla 38. Identificación y agrupación de las DAP identificadas en los nodos STRING de los animales NBW sujetos a dieta CTRL y dieta HFD.....	222
Tabla 39. Identificación y agrupación de las DAP identificadas en los nodos STRING de los animales LBW sujetos a dieta CTRL y dieta HFD.....	224
 Resultados. Capítulo 3	
Tabla 40. Ingredientes y composición química de los lacto reemplazantes.....	231
Tabla 41. Composición de aminoácidos de los lacto reemplazantes y de los piensos concentrados de iniciación.....	232
Tabla 42. Perfil de aminoácidos libres en el plasma en los terneros según el tiempo de la toma de muestra y la suplementación del MR sin o con Trp.....	236
Tabla 43. Valoración de la absorción de aminoácidos tras la toma del lacto reemplazante.....	238
Tabla 44. Concentraciones séricas de los parámetros bioquímicos según el tiempo de la toma de muestra y la suplementación del MR sin o con Trp.....	242
Tabla 45. Valoración de las consecuencias en los parámetros bioquímicos séricos tras la toma del lacto reemplazante.....	244

Apéndices

Tabla Suplementaria 1. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en distintas áreas del cerebro en función de la suplementación materna con el HTX y del sexo a las distintas edades 335

Tabla Suplementaria 2. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en distintas áreas del cerebro en función del peso corporal al nacer y del sexo en los fetos de 100 días de gestación 337

Tabla Suplementaria 3. Listado de proteínas diferencialmente abundantes identificadas al comparar los animales NBW-CTRL con los NBW-HFD 339

Tabla Suplementaria 4. Listado de proteínas diferencialmente abundantes identificadas al comparar los animales LBW-CTRL con los LBW-HFD 343

LISTADO DE ABREVIATURAS

Tabla A. Listado de abreviaturas.

Abreviaturas	Significado
3-MT	3-Metoxitiramina
5-HIAA	Ácido 5-Hidroxindolacético
5-HT	Serotonina, 5-Hidroxitriptamina
5-HTP	5-Hidroxitriptófano
5-HTR	Receptor de serotonina
AADC	L-Aminoácido Aromático Descarboxilasa
AC	Adenilato Ciclasa
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ACN	Acetonitrilo
ACT	O-Acetiltransferasa
ACTH	Corticotropina
ADH	Alcohol Deshidrogenasa
AGC	del inglés <i>Automatic Gain Control</i>
Ala	Alanina
ALDH	Aldehído Deshidrogenasa
ALR	Aldehído Reductasa
ALT	Alanina Aminotransferasa
AMQ	6-Aminoquinolina
AMY	Amígdala
AQC	6-Aminoquinolil-N-Hidroxisuccinimidil Carbamato
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
AST	Aspartato Aminotransferasa
ATV	Área Tegmental Ventral
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CA	Cuerno de Ammón, del latín <i>Cornu Ammonis</i>
CAT	Colina Acetiltransferasa
CATtotal	Suma de todas las catecolaminas
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico
CID	del inglés <i>Collision-Induced Dissociation</i>
Cit	Citrulina
CK	Creatina Quinasa
COMT	Catecol-O-Metiltransferasa
CRH	Factor liberador de corticotropina
CRP	Proteína C-Reactiva
CTRL	Grupo Control
CV	Coefficiente de Variación
Cys	Cisteína
DA	Dopamina
DAP	del inglés <i>Differentially Abundant Proteins</i>

Abreviaturas

Abreviaturas	Significado
DBH	Dopamina β -Hidroxilasa
DCX	Doblecortina
DDA	del inglés <i>Data Dependent Acquisition</i>
DHBA	3,4-Dihidrobencilamina Bromohidrato
DOPAC	Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético
DOPAL	3,4-Dihidroxifenilacetaldehído
DOPtotal	Suma de metabolitos de la vía dopaminérgica
DOR	DOPAC Reductasa
DR	Receptor de dopamina
DTT	1,4-Ditiotreitól
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ELISA	del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EQ	Electroquímico
ESI	del inglés <i>Electrospray Ionization</i>
EST	Cuerpo Estriado
FASP	del inglés <i>Filter Aided Sample Preparation</i>
FC	del inglés <i>Fold-Change</i>
FDR	del inglés <i>False Discovery Rate</i>
FOAD	del inglés <i>Fetal Origins of Adult Disease</i>
GABA	Ácido γ -Aminobutírico
GABA-A/B	Receptor de GABA
GABA-T	GABA Transaminasa
GAD	Glutamato Descarboxilasa
GC	Glucocorticoide
GD	Giro Dentado, del latín <i>Gyrus Dentatus</i>
GGT	Gamma Glutamilttransferasa
GLM	Modelo Lineal General
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
GO	del inglés <i>Gene Ontology</i>
GPx	Glutación Peroxidasa
H	Hembras
HDL-C	del inglés <i>High-Density Lipoprotein with Cholesterol</i>
HFD	del inglés <i>High Fat Diet</i>
His	Histidina
HPA	Eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenocortical
HPC	Hipocampo
HPLC	del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPT	Hipotálamo
HTX	Hidroxitirosol
HVA	Ácido Homovanílico
HVAIc	Alcohol Homovanilílico, 3-O-Metil-Hidroxitirosol
IDO	Indolamina-2,3-Dioxigenasa
IFN γ	Interferón γ

Abreviaturas	Significado
IHQ	Inmunohistoquímica
Ile	Isoleucina
INDtotal	Suma de todas las indolaminas
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
IRB	Instituto de Investigación en Biomedicina
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaria
iTRAQ	del inglés <i>isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification</i>
IUGR	del inglés <i>Intrauterine Growth Restriction</i>
Kyn	Quinurenina
LBW	del inglés <i>Low Body Weight</i>
LDL-C	del inglés <i>Low-Density Lipoprotein with Cholesterol</i>
L-DOPA	L-Dihidroxifenilalanina
Leu	Leucina
LNAAs	del inglés <i>Large Neutral Amino Acids</i>
Lys	Lisina
M	Machos
mAChR	Receptor muscarínico de ACh
MALDI	del inglés <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MAO	Monoamina Oxidasa
MDA	Malondialdehído
Met	Metionina
mGluR	Receptor muscarínico de glutamato
MHPG	3-Metoxi-4-Hidroxifenilglicol
MODY	del inglés <i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
MR	del inglés <i>Milk Replacer</i>
MS	del inglés <i>Mass Spectrometry</i>
NA	Noradrenalina
nAChR	Receptor nicotínico de ACh
NBW	del inglés <i>Normal Body Weight</i>
NEFAs	del inglés <i>Non-Esterified Fatty Acids</i>
NeuN	Núcleos Neuronales
NFT	Neurofilamentos
NGS	del inglés <i>Normal Goat Serum</i>
NHS	N-Hidroxisuccinimida
NPY	Neuropéptido Y
NT	Neurotransmisores
Orn	Ornitina
OSR	del inglés <i>Olympus System Reagent</i>
PB	Tampón Fosfato
PBS	del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PB-Tritón	Tampón Fosfato con Tritón X-100
PFC	Corteza Prefrontal
Phe	Fenilalanina
Pig-MAP	del inglés <i>Pig-Major Acute Phase Protein</i>
PKA	Proteína Quinasa A

Abreviaturas

Abreviaturas	Significado
PMF	del inglés <i>Peptide Mass Fingerprinting</i>
PNMT	Feniletanolamina-N-Metiltransferasa
POMC	Proopiomelanocortina
Pro	Prolina
PVN	Núcleo Paraventricular
ROS	del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>
RP	del inglés <i>Reverse Phase</i>
RT	del inglés <i>Room Temperature</i>
SAM	Eje Simpático-Adrenal-Medular
SD	del inglés <i>Standard Deviation</i>
SE	del inglés <i>Standard Error of the Mean</i>
Ser	Serina
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SOD	Superóxido Dismutasa
SOS	Octilsulfato Sódico
SPE	del inglés <i>Solid Phase Extraction</i>
SPS	del inglés <i>Synchronous Precursor Selection</i>
SULT	Sulfotransferasa
T0	Efecto de la suplementación con Trp antes de tomar el MR
T3	Efecto de la suplementación con Trp 3 horas después de tomar el MR
TAS	del inglés <i>Total Antioxidant Status</i>
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TDO	Triptófano 2,3-Dioxigenasa
TEA	Trietilamina
TH	Tirosina Hidroxilasa
Thr	Treonina
TMT	del inglés <i>Tandem Mass Tags</i>
TOF	del inglés <i>Time-Of-Flight</i>
Trp	Triptófano
TrpH	Triptófano Hidroxilasa
Tyr	Tirosina
UGT	Uridina 5'-Difosoglucuronosil Transferasa
UV	Ultravioleta
Val	Valina
VMA	Ácido 3-Metoxi-4-Hidroximandélico



RESÚMENES

RESUMEN

Una cuestión fundamental para el bienestar es mantener a los animales clínicamente sanos, sin estrés, y correctamente alimentados, sobre todo durante la cría, para mejorar la producción y la calidad de los productos derivados. Hay que tener en cuenta que el estado nutricional y metabólico de la madre es determinante para el crecimiento fetal, y que alteraciones en la dieta cambian la homeostasis metabólica del organismo.

La restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) se caracteriza por un déficit en el crecimiento y en el peso debido a la falta de nutrientes, oxígeno o alteraciones en la placenta que provocan carencia de componentes esenciales para el desarrollo. Debido a la IUGR, el feto adapta su metabolismo y fisiología para sobrevivir. La principal adaptación es el "*brain-sparing*", que prioriza el desarrollo cerebral, sin embargo, no garantiza su desarrollo normal ni su función. A su vez, hay otras alteraciones sistémicas que afectan el metabolismo energético, induciendo así la aparición del "*thrifty phenotype*", responsable de alteraciones metabólicas que se prolongan hasta la edad adulta, aumentando la incidencia de enfermedades metabólicas.

Este trabajo consta de 4 estudios donde se analizaron las consecuencias de distintos cambios nutricionales aplicados a las madres gestantes o directamente sobre las crías. En tres de ellos se utilizó un modelo porcino de IUGR prestando especial atención al sistema nervioso, donde se evaluaron: el efecto de la suplementación de la dieta materna con el antioxidante hidroxitirosol (HTX) a diferentes edades prenatal y postnatal; el efecto producido por la IUGR en el cerebro de fetos de 100 días de gestación cuyas madres habían sido tratadas con HTX; y el efecto a largo plazo de la IUGR cuando se administra una dieta alta en grasas (HFD) a individuos ya adultos.

En el primer estudio, se analizó el perfil de neurotransmisores en diversas áreas cerebrales, así como la morfología del hipocampo mediante

Resumen

marcadores moleculares de neuronas inmaduras y maduras. Los resultados mostraron que los efectos de la suplementación materna con HTX están restringidos al período prenatal, ya que solo se observaron cambios en fetos de 100 días, y no se observaron efectos del HTX en cerdos de 1 mes y 6 meses de edad, indicando que se necesita la presencia continua del HTX para mantener sus efectos en el cerebro.

La restricción calórica a partir del segundo trimestre de gestación afecta al desarrollo fetal e induce menor peso al nacer, siendo un buen modelo animal de IUGR. Los resultados del segundo estudio indicaron que la IUGR modificó el perfil de neurotransmisores en los fetos, así como el desarrollo del hipocampo. La suplementación materna con HTX revertió estos cambios, haciendo ambas características más similares a los fetos no afectados por la IUGR.

En tercer lugar, los animales afectados por la IUGR durante la gestación, cuando tenían un año respondieron diferente a una HFD en comparación a los animales control debido al “*thrifty phenotype*”: aumentó la concentración de aminoácidos libres en plasma, pero no la de los lípidos. En la mayoría de las áreas cerebrales aumentó la concentración de serotonina, a diferencia de los animales no afectados por la IUGR. En cuanto al proteoma del hipocampo, aunque la HFD modificó varios *pathways* de manera similar, en el grupo IUGR también afectó al *splicing* del mRNA, al transporte vesicular y a la vía mTOR.

Finalmente, se evaluó el efecto de la suplementación con triptófano en la dieta de terneros lactantes, así como su funcionalidad para mejorar su crecimiento y desarrollo. Los resultados mostraron que la suplementación con triptófano no afectaba al rendimiento ni al comportamiento de los terneros durante el proceso de destete, y tampoco provocó cambios metabólicos.

RESUM

Una qüestió fonamental per al benestar és mantenir els animals clínicament sans, sense estrès, i correctament alimentats, sobretot durant la cria, per a millorar la producció i la qualitat dels productes derivats. Cal tenir en compte que l'estat nutricional i metabòlic de la mare és determinant per al creixement fetal, i que alteracions de la dieta canvien l'homeòstasi metabòlica de l'organisme.

La restricció del creixement intrauterí (IUGR) es caracteritza per un dèficit en el creixement i en el pes a causa de la manca de nutrients, oxigen o alteracions a la placenta que provoquen manca de components essencials per al desenvolupament. A causa de la IUGR, el fetus adapta el seu metabolisme i fisiologia per sobreviure. La principal adaptació és el "*brain-sparing*", que prioritza el desenvolupament cerebral, però no en garanteix el desenvolupament normal ni la funció. Alhora, hi ha altres alteracions sistèmiques que afecten el metabolisme energètic, induint així l'aparició del "*thrifty phenotype*", responsable d'alteracions metabòliques que es prolonguen fins a l'edat adulta, augmentant la incidència de malalties metabòliques.

Aquest treball consta de 4 estudis on es van analitzar les conseqüències de diferents canvis nutricionals aplicats a la mare gestant o directament sobre les cries. En tres es va utilitzar un model porcí de IUGR prestant especial atenció al sistema nerviós, on es va avaluar: l'efecte de la suplementació de la dieta materna amb l'antioxidant hidroxitirosol (HTX) a diferents edats prenatal i postnatal; l'efecte produït per la IUGR al cervell de fetus de 100 dies de gestació dels quals les seves mares havien estat tractades amb HTX; i l'efecte a llarg termini de la IUGR quan s'administra una dieta alta en greixos (HFD) als individus ja adults.

Al primer estudi, es va analitzar el perfil de neurotransmissors en diverses àrees cerebrals, així com la morfologia de l'hipocamp mitjançant

Resum

marcadors moleculars de neurones immadures i madures. Els resultats van mostrar que els efectes de la suplementació materna amb HTX estan restringits al període prenatal, ja que només es van observar canvis en fetus de 100 dies, i no es van observar efectes del HTX en porcs d'un mes i sis mesos, indicant que es necessita la presència contínua del HTX per a mantenir els seus efectes al cervell.

La restricció calòrica a partir del segon trimestre de gestació afecta el desenvolupament fetal i indueix un menor pes en néixer, sent un bon model animal de IUGR. Els resultats del segon estudi van indicar que la IUGR modificava el perfil de neurotransmissors als fetus, així com el desenvolupament de l'hipocamp. La suplementació materna amb HTX va revertir aquests canvis, fent ambdues característiques més semblants als fetus no afectats per la IUGR.

En tercer lloc, els animals afectats per la IUGR durant la gestació, quan tenien un any van respondre diferent a una HFD en comparació als animals control a causa del "*thrifty phenotype*": va augmentar la concentració d'aminoàcids lliures en plasma, però no la dels lípids. A la majoria d'àrees cerebrals va augmentar la concentració de serotonina, a diferència dels animals no afectats per la IUGR. En quant al proteoma de l'hipocamp, encara que la HFD va modificar diverses *pathways* de manera similar, en el grup IUGR també va afectar al *splicing* del mRNA, al transport vesicular i a la via mTOR.

Finalment, es va avaluar l'efecte de la suplementació amb triptòfan a la dieta de vedells lactants, així com la seva funcionalitat per a millorar-ne el creixement i el desenvolupament. Els resultats van mostrar que la suplementació amb triptòfan no afectava al rendiment ni al comportament dels vedells durant el procés de deslletament, i tampoc va provocar canvis metabòlics.

SUMMARY

A fundamental issue for animal welfare is to keep them clinically healthy, stress-free, and properly fed, especially during rearing, to improve production and quality of derived products. It must be considered that the nutritional and metabolic state of the mother is decisive for foetal growth, and that alterations in the diet change the metabolic homeostasis of the organism.

Intrauterine growth restriction (IUGR) is characterized by a deficit in growth and weight due to a lack of nutrients, oxygen or an alteration in the placenta that causes a lack of essential components for development. Due to IUGR the foetus adapts its metabolism and physiology to survive. The main adaptation is "brain-sparing", which prioritizes brain development, however, it does not guarantee its normal development or function. In turn, there are other systemic alterations that affect energy metabolism, thus inducing the appearance of the "thrifty phenotype", responsible for metabolic alterations that last into adulthood, increasing the incidence of metabolic diseases.

This work consists of 4 studies in which the consequences of different nutritional changes are analysed, whether applied to the pregnant mother or directly to the offspring. In three of them, a porcine IUGR model was used, paying special attention to the nervous system, where the following were evaluated: the effect of supplementing the maternal diet with the antioxidant hydroxytyrosol (HTX) at different prenatal and postnatal ages; the effect produced by IUGR in the brain of foetuses of 100 days of gestation whose mothers had been treated with HTX; and the long-term effect of IUGR when a high-fat diet (HFD) is administered to adult individuals.

In the first study, the neurotransmitter profile in various brain areas was analysed, as well as the morphology of the hippocampus using molecular markers of immature and mature neurons. The results showed that the effects of maternal supplementation with HTX are restricted to the prenatal period,

Summary

since changes were only observed in foetuses of 100 days, and no effects of HTX were observed in pigs of 1 month and 6 months of age, indicating that the continued presence of HTX is needed to maintain its effects in the brain.

Caloric restriction from the second trimester of gestation affects foetal development and induces lower birth weight in new-borns, being a good animal model of IUGR. The results of the second study indicated that IUGR modified the neurotransmitter profile in foetuses, as well as the development of the hippocampus. Maternal HTX supplementation reversed these changes, making both characteristics more like foetuses unaffected by IUGR.

Third, animals affected by IUGR during gestation, when they were one year old, responded differently to an HFD compared to the control animals due to the “thrifty phenotype”: the concentration of free amino acids in plasma increased, but not that of the lipids. In most areas of the brain, the concentration of serotonin increased, unlike in animals not affected by IUGR. Regarding the hippocampal proteome, although HFD modified several pathways in a similar way, in the IUGR group it also affected mRNA splicing, vesicular transport and mTOR pathway.

Finally, the effect of tryptophan supplementation in the diet of suckling calves, as well as its functionality to improve their growth and development, was evaluated. The results showed that tryptophan supplementation did not affect the performance or behaviour of the calves during the weaning process, nor did it cause metabolic changes.



INTRODUCCIÓN

1. Bienestar y nutrición animal

No hay absolutamente ninguna duda de que los animales son vitales para el bienestar humano, porque comparten nuestros hogares brindándonos compañía, nos permiten alimentarnos al poder consumir productos animales, y gracias a su uso en la investigación permiten que haya avances científicos, sobre todo en el ámbito médico.

Debido a la importancia de las cuestiones éticas relacionadas con la producción y el uso de modelos animales en la ciencia se hizo necesaria la investigación sobre su bienestar. Las primeras investigaciones se basaron en el comportamiento animal y la fisiología del estrés, pero rápidamente se reconoció su relevancia en otros campos, como la epidemiología, la nutrición o la neurología [1], [2].

Una cuestión fundamental para el bienestar de los animales de granja es mantenerlos clínicamente sanos, sin estrés, y correctamente alimentados. Un buen bienestar es especialmente importante en la cría, también para mejorar la eficiencia de la producción y la calidad de los productos alimenticios.

La presencia de factores de estrés y la falta de condiciones saludables para el bienestar animal pueden hacer que los animales aumenten su susceptibilidad a las enfermedades.

Debido a la dificultad de estudiar directamente las emociones de los animales, se infiere su estado de bienestar y estrés mediante mediciones relacionadas con ello. Estas mediciones incluyen variables fisiológicas, de comportamiento, de producción y de patología con la finalidad de estudiar las emociones, el estrés y la adaptación psico y fisiopatológica [3].

Una de las condiciones básicas a tener en cuenta es el estado nutricional de los individuos, que condicionarán tanto su bienestar como los resultados

Introducción

productivos, ya que alteraciones nutricionales en la dieta de los animales provocan cambios en la homeostasis cardiovascular y metabólica del organismo.

Hay que destacar que los cambios nutricionales, ya sean debidos a una dieta restringida o excesiva, se pueden aplicar directamente al individuo o a las madres gestantes. La duración e intensidad de estos cambios influirán en la severidad de los cambios metabólicos que se presentarán en el organismo y en su adaptación al entorno. El proceso para generar esta respuesta se inicia mediante la percepción del estímulo que está provocando estos cambios. En la percepción siempre está implicado el sistema nervioso central (SNC) que recibe las señales procedentes del entorno o del propio sistema y será el primer responsable de generar una posterior respuesta [4], [5].

Así, cuando se produce un cambio metabólico, ciertos tejidos tienden a reducir su consumo de energía mientras que otros, especialmente los que son importantes para la actividad locomotora, reciben suficientes nutrientes para funcionar correctamente. El SNC también tiene prioridad y recibe preferentemente una cantidad suficiente de nutrientes de la circulación. Por lo menos en individuos adultos, el aumento del suministro de energía a los órganos "cruciales" se logra principalmente mediante la liberación de catecolaminas y glucocorticoides que, en general, aumentan la gluconeogénesis y la glucogenólisis, inhiben la captación de glucosa y activan la proteólisis y la lipólisis.

2. Sistema Nervioso Central

El SNC es el encargado de percibir y procesar los estímulos para, posteriormente, producir una respuesta en todo el sistema del organismo mediante la liberación y secreción de distintas hormonas o metabolitos señalizadores. Las principales áreas cerebrales involucradas en el procesamiento son la amígdala, el hipocampo, la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipotálamo [6], [7].

La amígdala es la principal área que se encarga de la recepción de los estímulos, y la posterior comunicación entre las distintas áreas cerebrales. Ésta recibe información auditiva, visual y sensorial por parte del tálamo y la corteza cerebral, e información contextual a través del hipocampo. En el caso de estímulos negativos, una vez recibida la información, la amígdala devuelve la señal al hipocampo, la corteza prefrontal y el cuerpo estriado para integrar las emociones, aprender a evitar el estímulo, memorizarlo y atenuar su efecto. Destaca la función de la corteza prefrontal en la expresión y extinción del miedo; el hipocampo en la regulación de la memoria contextual de la asociación de un estímulo a una situación amenazante y la extinción de la respuesta; y el cuerpo estriado en el aprendizaje para evitar dichas situaciones [7], [8].

Por otro lado, la amígdala también recibe señales procedentes del tronco encefálico. Al llegar esta señal a la amígdala, ésta envía señales a otras áreas cerebrales, pero principalmente al hipotálamo. El hipotálamo activa los ejes simpático-adrenal-medular (SAM) e hipotalámico-pituitario-adrenocortical (HPA) para la liberación de hormonas al resto del sistema y así producir una respuesta al estímulo [9].

Las distintas áreas cerebrales están conectadas entre ellas con proyecciones neuronales que se inervan sinápticamente. La transmisión de la señal se produce mediante la secreción presináptica de neurotransmisores en

los espacios sinápticos que activa la neurona postsináptica mediante receptores específicos para cada neurotransmisor [10], [11].

2.1. Monoaminas transmisoras

Los encargados de regular las funciones cerebrales son los neurotransmisores, que pueden actuar localmente o como intermediarios entre regiones, siendo sintetizados por neuronas en localizaciones específicas y proyectando alrededor del encéfalo. De esta manera se organiza la respuesta a diferentes tipos de estímulos.

Las aminas biógenas están incluidas dentro de los neurotransmisores con amplia proyección en el SNC. Están implicadas en muchos tipos de comportamientos, que varían desde funciones homeostáticas centrales hasta fenómenos cognitivos. Por este motivo, si se producen anomalías en la síntesis, el transporte o la degradación de estos neurotransmisores pueden provocar diferentes síndromes, incluyendo trastornos psiquiátricos [12], [13].

2.1.1. Catecolaminas

Las catecolaminas son monoaminas que se caracterizan por poseer un anillo bencénico 3,4-dihidroxiado (catecol), son naturalmente fluorescentes, sensibles a la luz y fácilmente oxidables. Las tres catecolaminas funcionales que existen *in vivo* son la dopamina (DA), la noradrenalina (NA) y la adrenalina.

2.1.1.1. *Metabolismo de las catecolaminas*

Las tres tienen el mismo precursor, y se sintetizan por la misma vía metabólica (**Figura 1**). La ruta se inicia con el aminoácido L-tirosina, que se convierte en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) gracias a la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Esta enzima es la limitante para la síntesis de la DA y la NA [12], [13].

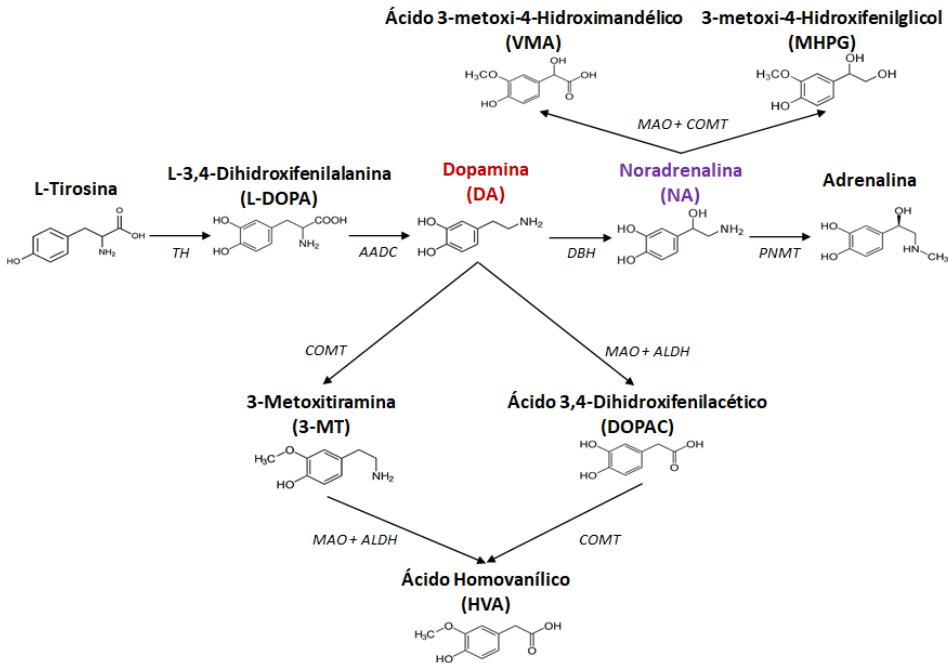


Figura 1. Esquema de la ruta de síntesis de catecolaminas. TH, tirosina hidroxilasa; AADC, L-aminoácido aromático descarboxilasa; DBH, dopamina β-hidroxilasa; PNMT, feniletanolamina-N-metiltransferasa; MAO, monoamina oxidasa; ALDH, aldehído deshidrogenasa; COMT, catecol-O-metiltransferasa.

La ruta continúa con la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) que descarboxila la L-DOPA y produce DA. A medida que se va sintetizando DA se va almacenando en vesículas sinápticas hasta su liberación al espacio sináptico [12], [13].

En las neuronas noradrenérgicas la DA es metabolizada NA por la enzima dopamina β-hidroxilasa (DBH) en el interior de las vesículas sinápticas. En las glándulas suprarrenales se expresa la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) que metila la NA para formar adrenalina [12], [13].

Para finalizar la acción sináptica de las catecolaminas el mecanismo más frecuente es su recaptación mediante transportadores específicos de las neuronas presinápticas y/o mediante su degradación enzimática [12], [13].

La DA puede ser procesada por las enzimas monoamina oxidasa (MAO) y aldehído deshidrogenasa (ALDH) dando lugar al ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético (DOPAC). Posteriormente, la catecol-O-metiltransferasa (COMT) lo metila y produce el ácido homovanílico (HVA). Alternativamente, la DA puede ser primero metilada por la COMT dando lugar a 3-metoxitiramina (3-MT) seguido de la acción de las enzimas MAO y ALDH formando de nuevo HVA [12], [13].

Las enzimas que metabolizan la NA son las mismas que las que metabolizan la DA, la MAO y la COMT, sólo que al catalizar sus reacciones generan ácido 3-metoxi-4-hidroxi-mandélico (VMA) y 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol (MHPG) [12], [13].

2.1.1.2. Receptores dopaminérgicos

Existen 5 tipos de receptores de DA, que se agrupan en dos familias: DR1 y DR2, según sus características farmacológicas y bioquímicas. Todos pertenecen a la familia de receptores de membrana acoplados a proteínas G [14].

La familia DR1 comprende DR1 y DR5. Estos receptores se acoplan a través de la proteína Gs para estimular la enzima adenilato ciclasa (AC) y activar la proteína quinasa A (PKA) que fosforilará múltiples proteínas, como canales de sodio, potasio y calcio activados por voltaje, además de receptores de glutamato y de GABA [14]–[16]. Los receptores DR1 se localizan en el cuerpo estriado, el sistema límbico, el tálamo y el hipotálamo. Los receptores DR5 se expresan a niveles más bajos que los DR1, principalmente en el hipocampo y en núcleos del tálamo [14], [16], [17].

La familia DR2 está formada por DR2, DR3 y DR4. Estos receptores se acoplan a través de Gi/GO y activan canales de potasio, inhibiendo canales de calcio y la AC. Los receptores DR2 se localizan en las mismas áreas que los DR1, además de la hipófisis. Los receptores DR3 se expresan en el hipotálamo, la sustancia negra y en el cerebelo. La expresión del receptor DR4 es mucho más débil, principalmente en la corteza y el sistema límbico [14]–[17].

2.1.1.3. *Sistema dopaminérgico*

La distribución de la DA es limitada, la principal área del encéfalo que la contiene es el cuerpo estriado, que recibe las principales aferencias de la sustancia negra y desempeña un papel esencial en la función motora. También se cree que la DA está involucrada en emoción, motivación, almacenamiento de la memoria, atención y conductas de recompensa. Hay cuatro vías dopaminérgicas principales en el encéfalo [12], [18] (**Figura 2**):

1. La **vía nigroestriada**, consta de neuronas que se encuentran en la sustancia negra y cuyos axones se proyectan hacia el núcleo estriado. Contienen alrededor del 75% de toda la DA del encéfalo. El cuerpo estriado está involucrado en reacciones a estímulos y aprendizaje.

2. La **vía mesolímbica**, cuyos cuerpos celulares se localizan en el área tegmental ventral (ATV) del mesencéfalo, adyacente a la sustancia negra, y cuyas fibras se proyectan hacia distintas zonas del sistema límbico, especialmente al núcleo accumbens, la amígdala y el hipocampo. Las áreas límbicas están implicadas en emociones, atención, mecanismos de recompensa, memoria y aprendizaje.

3. La **vía tuberoinfundibular** es un grupo de neuronas cortas, que se dirige desde el hipotálamo ventral hacia la medula espinal y la hipófisis, regulando sus secreciones hormonales para mantener la homeóstasis energética del organismo.

4. La **vía mesocortical** los cuerpos celulares están situados en el ATV y proyectan hacia la corteza frontal y temporal, implicadas en la motivación y las adicciones.

Introducción

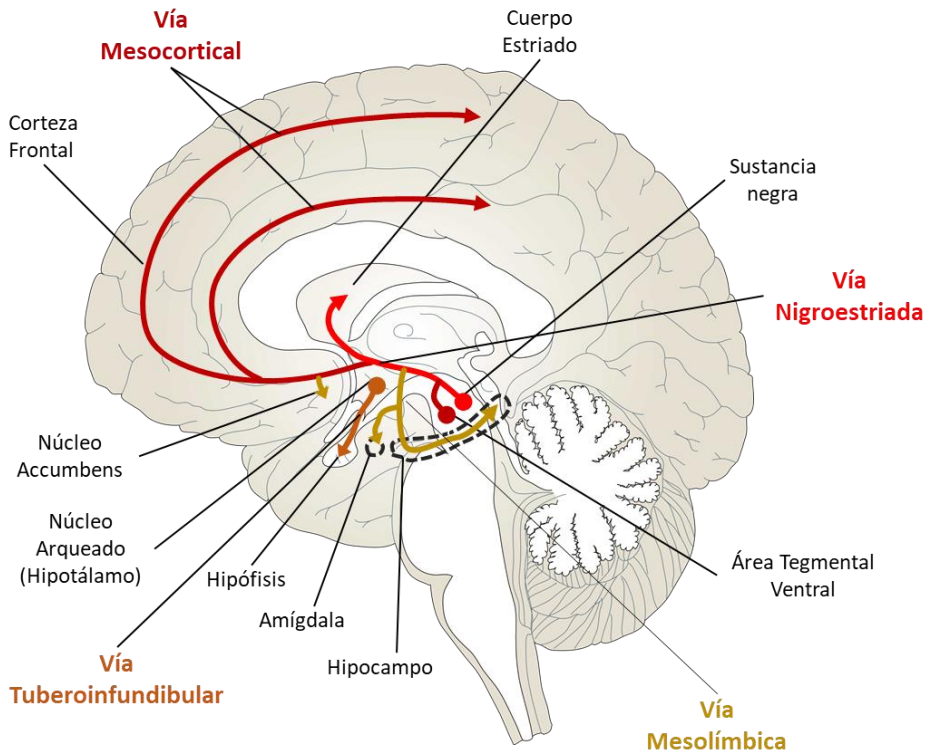


Figura 2. Distribución en el encéfalo de las proyecciones del sistema dopaminérgico en el SNC. Adaptada del libro Rang and Dale's Pharmacology [18].

2.1.1.4. *Receptores adrenérgicos*

Los receptores de la noradrenalina son receptores acoplados a proteínas G. En total hay 9 receptores distintos que se agrupan en 3 familias: $\alpha 1$ ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1C$), $\alpha 2$ ($\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$) y β ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$) [14].

Los receptores $\alpha 1$ están acoplados a proteínas Gq por lo que activan la fosfolipasa C responsable del aumento de calcio citosólico. Se encuentran principalmente en la corteza cerebral, el núcleo estriado y el hipocampo [14], [19].

Los receptores $\alpha 2$ están acoplados a proteínas Gi por lo que inhiben la AC. Se encuentran en gran número de regiones entre las que destacan la corteza cerebral, el hipocampo, los ganglios basales, la amígdala, el locus cerúleo y la medula espinal [14], [19].

Por último, los receptores β están acoplados a proteínas Gs que activan la AC, y se encuentran en la corteza, el cuerpo estriado, el hipocampo, y el cerebelo [14], [19].

2.1.1.5. Sistema noradrenérgico

Las neuronas noradrenérgicas se encuentran en el tronco encefálico, en dos áreas diferenciadas, el locus cerúleo y el área tegmental lateral (**Figura 3**). El 50% de las neuronas noradrenérgicas del encéfalo se localizan en el locus cerúleo cuyos axones se proyectan hacia la corteza cerebral, el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo y el cerebelo. Además, un pequeño grupo de neuronas también se proyecta hacia la amígdala y la médula espinal [13], [18].

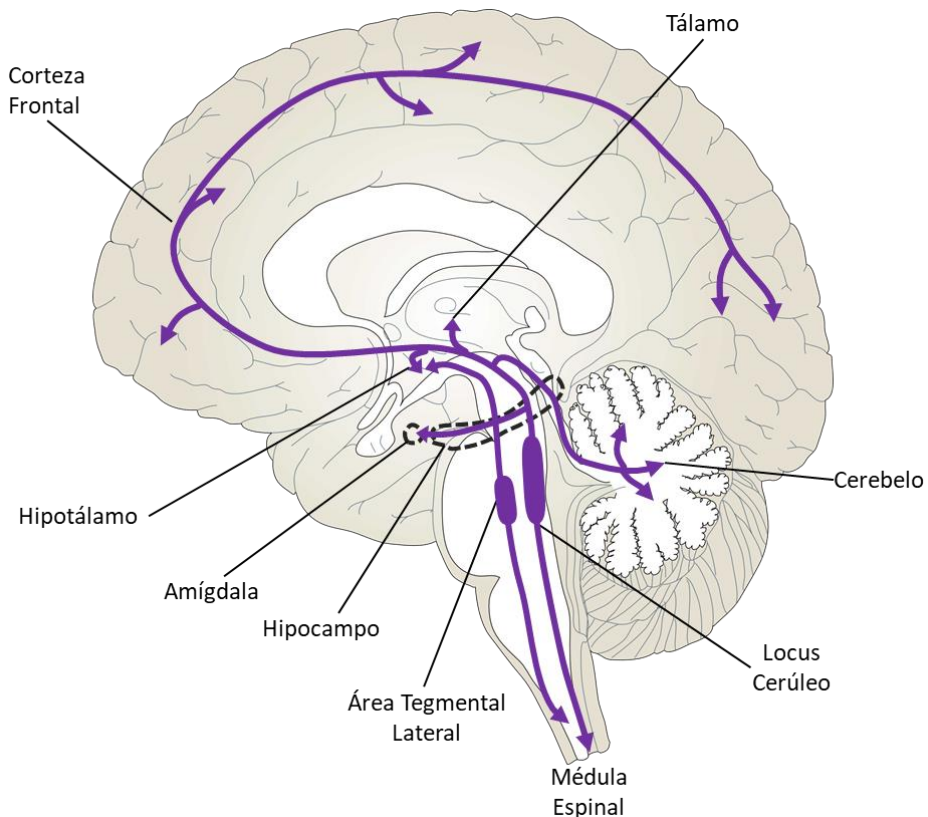


Figura 3. Distribución en el encéfalo de las proyecciones del sistema noradrenérgico en el SNC. Adaptada del libro Rang and Dale's Pharmacology [18].

Hay otro grupo más pequeño de neuronas adrenérgicas cuyos cuerpos celulares se encuentran en una situación más ventral del tronco encefálico, en el área tegmental lateral. Estas células contienen la enzima PNMT, que convierte la noradrenalina en adrenalina, y se proyectan principalmente al hipotálamo. Los conocimientos sobre estas neuronas son muy escasos, pero se cree que son importantes para el control cardiovascular mediante secreciones endocrinas. Por último, hay otro subgrupo de neuronas noradrenérgicas que proyectan a la médula espinal [13], [18].

La función principal del sistema noradrenérgico es la regulación de la excitación y el estado de ánimo. Es muy relevante para mantener el estado de vigilia y la capacidad de respuesta a estímulos ambientales inesperados [12].

2.1.2. Indolaminas

Este grupo de neurotransmisores monoaminérgicos se caracterizan por tener un anillo de indol e incluye principalmente la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT).

2.1.2.1. *Metabolismo de las indolaminas*

Su biosíntesis (**Figura 4**) se da a partir del aminoácido L-triptófano. Mediante la enzima triptófano hidroxilasa (TrpH) el triptófano se convierte en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica. Esta reacción es la limitante de toda la ruta. A continuación, la AADC convierte el metabolito anterior en 5-HT, que debido a sus características químicas no puede cruzar la barrera hematoencefálica y se almacena en las vesículas presinápticas [12], [13].

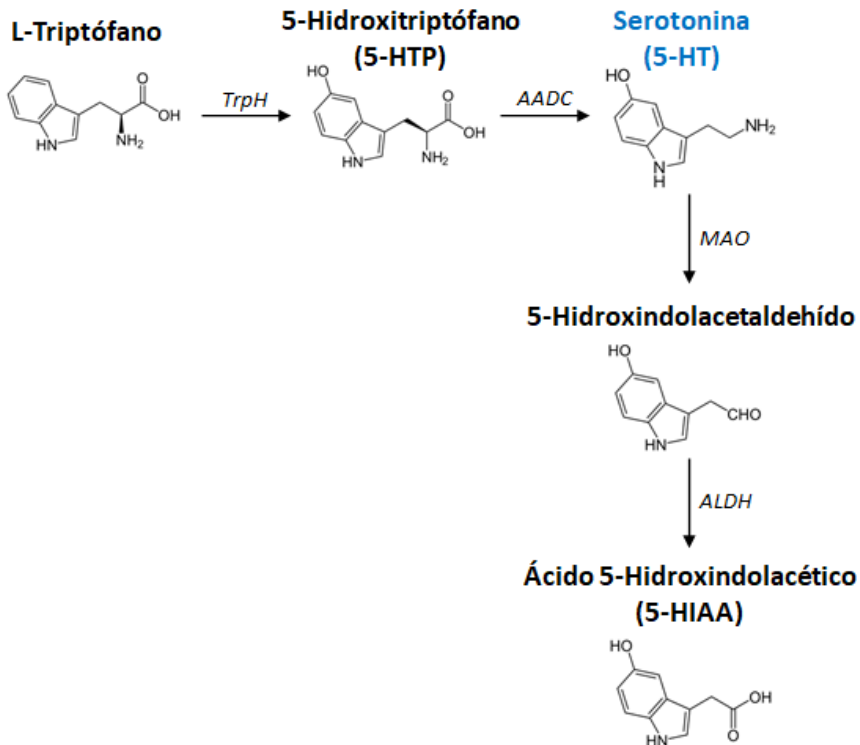


Figura 4. Esquema de la ruta de síntesis y degradación de la serotonina. TrpH, triptófano hidroxilasa; AADC, L-aminoácido aromático descarboxilasa; MAO, monoamina oxidasa; ALDH, aldehído deshidrogenasa.

El mecanismo para finalizar la acción sináptica de la 5-HT es por recaptación mediante transportadores específicos en las neuronas presinápticas y/o degradación enzimática, concretamente por la MAO formando 5-hidroxiacetaldehído. Rápidamente, este metabolito es oxidado de nuevo por la enzima ALDH dando lugar al ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) [12], [13].

2.1.2.2. Receptores serotoninérgicos

Los receptores de la serotonina se clasifican en 7 familias (5-HTR1-7). Todos están acoplados a proteínas G, a excepción de los receptores de la familia 5-HTR3 que son receptores ionotrópicos, es decir ligados a canal iónico [14].

Los receptores de la familia 5-HTR1 y de la familia 5-HTR5 son acoplados a proteínas Gi, por lo tanto, actúan inhibiendo la AC. Se encuentran ampliamente

distribuidos por el SNC, principalmente en el hipocampo, los núcleos del rafe, la corteza cerebral, la amígdala, el hipotálamo y el núcleo estriado [14], [20].

Los de la familia 5-HTR2 están acoplados a proteínas Gq y estimulan la fosfolipasa C. Estos se encuentran principalmente en los ganglios basales. La familia de receptores 5-HTR3 se encuentran principalmente en la corteza cerebral, el hipocampo y la medula espinal. El resto de los receptores (5-HTR4, 5-HTR6, 5-HTR7) están acoplados a proteína Gs que activarán la AC. La distribución de estos receptores es difusa concentrándose en el núcleo accumbens, el hipocampo, el hipotálamo y la corteza cerebral [14], [20].

2.1.2.3. *Sistema serotoninérgico*

Las neuronas serotoninérgicas se localizan en los núcleos del rafe del tronco encefálico (**Figura 5**). Los núcleos del rafe situados dorsalmente proyectan a múltiples regiones del SNC: la corteza, el hipocampo, los núcleos de la base, el sistema límbico y el hipotálamo y el cerebelo. Las neuronas del núcleo del rafe caudal proyectan al cerebelo, el bulbo raquídeo y la médula espinal [13], [18].

La función de la 5-HT, mediante proyecciones al prosencéfalo, incluye regular el estado de ánimo, el apetito, los ciclos de sueño y vigilia, la termorregulación y la conducta sexual. Mientras que, mediante proyecciones al tronco encefálico y a la medula espinal, regula el tono de los sistemas motores y la percepción del dolor [13], [18].

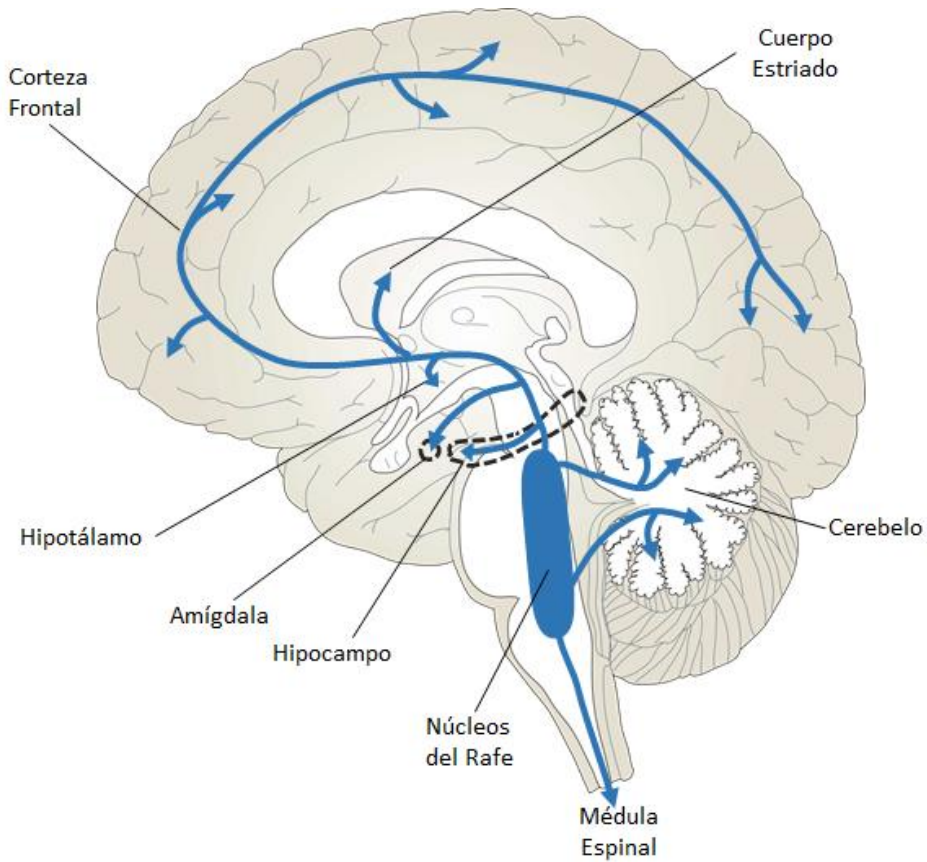


Figura 5. Distribución en el encéfalo de las proyecciones del sistema serotoninérgico en el SNC. Adaptada del libro Rang and Dale's Pharmacology [18].

2.2. Acetilcolina

La acetilcolina (ACh) se sintetiza en las terminaciones nerviosas de las neuronas colinérgicas a partir de colina. La colina es introducida en la terminación nerviosa por un transportador específico, y en el interior es acetilada por una enzima citosólica, la colina acetiltransferasa (CAT), que le transfiere el grupo acetilo del acetyl-CoA [12], [13].

La ACh recién sintetizada se transporta y almacena en vesículas sinápticas. Una vez que la ACh se libera en la sinapsis, es rápidamente hidrolizada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que se encuentra principalmente en la

sinapsis, entre las membranas presináptica y postsináptica, de modo que la ACh se hidroliza y resintetiza continuamente [12], [13].

2.2.1. Receptores colinérgicos

La acetilcolina actúa en el SNC tanto sobre receptores muscarínicos (acoplados a proteínas G) como sobre receptores nicotínicos (ionotrópicos).

Se conocen 5 familias de receptores muscarínicos de ACh (mAChR). Los receptores M1, M3, M5 están acoplados a proteínas Gq, en el encéfalo encontramos principalmente los receptores M1. Por otra parte, los receptores M2 y M4 están acoplados a proteínas Gi/Go. Estos receptores tienen una expresión importante en el cuerpo estriado y en los ganglios del sistema nervioso periférico (SNP) [21].

Los receptores nicotínicos de ACh (nAChR) son canales catiónicos y forman una familia heterogénea de subtipos. Están formados por cinco subunidades. Estas subunidades están codificadas por nueve genes de subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y tres β ($\beta 2$ - $\beta 4$). Debido a la gran variedad de receptores que se pueden formar, estos se encuentran repartidos ampliamente por el encéfalo: en la corteza, el cerebelo, el hipocampo, la amígdala, el hipotálamo, el locus cerúleo, el bulbo olfatorio, los núcleos del rafe, la médula espinal, la sustancia negra, el área tegmental ventral y el tálamo [22].

2.2.2. Sistema colinérgico

Las neuronas colinérgicas están ampliamente distribuidas en el cerebro y se encuentran en todas las partes del prosencéfalo, el mesencéfalo y el tronco encefálico (**Figura 6**).

Las neuronas colinérgicas del prosencéfalo y el tronco del encéfalo forman los núcleos basales y envían proyecciones difusas a muchas partes del encéfalo. Otro grupo de neuronas, el núcleo septohipocámpico (del septum), es

la principal fuente colinérgica del hipocampo. Además, hay muchas interneuronas colinérgicas locales en el cuerpo estriado [13], [18].

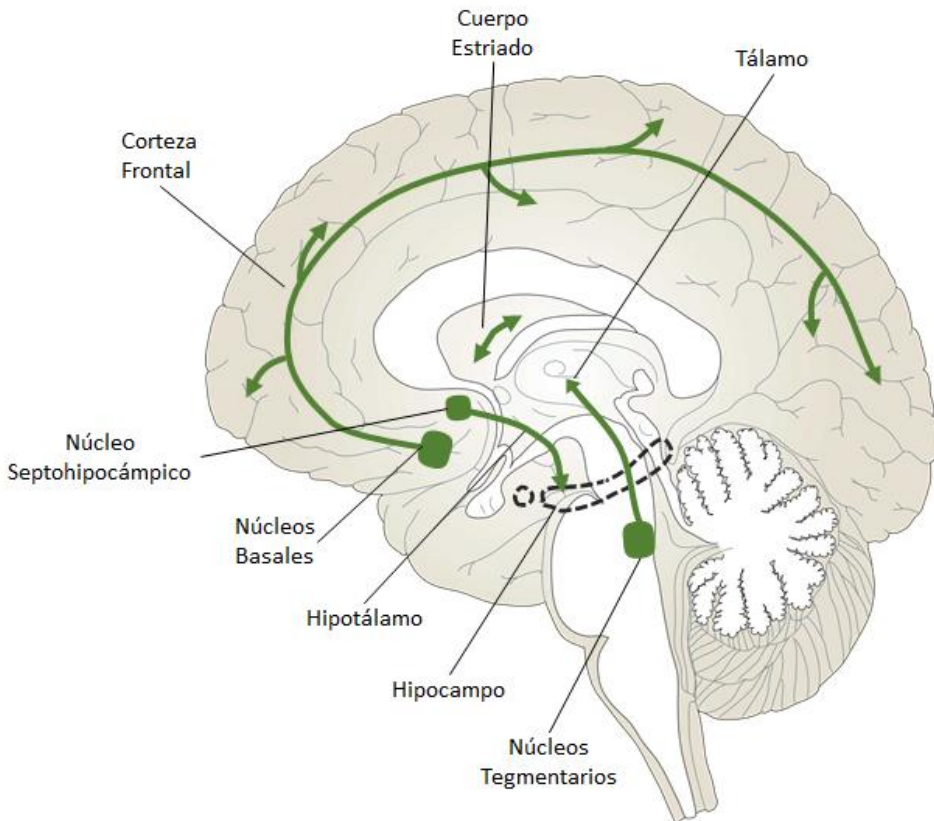


Figura 6. Distribución en el encéfalo de las proyecciones del sistema colinérgico en el SNC. Adaptada del libro Rang and Dale's Pharmacology [18].

Las principales funciones descritas para las vías colinérgicas están relacionadas con la excitación, el control motor, el aprendizaje y la memoria. De hecho, la degeneración de algunos de los núcleos del prosencéfalo se ha asociado con la enfermedad de Alzheimer, mientras que se ha descrito que la degeneración de las interneuronas colinérgicas del cuerpo estriado está relacionada con la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington [13], [18].

2.3. Aminoácidos transmisores

2.3.1. Glutamato

El L-glutamato es el principal neurotransmisor excitador y se distribuye amplia y uniformemente en el SNC. Se sintetiza sobre todo a partir de la glucosa, a través del ciclo de Krebs, a partir de α -oxoglutarato. También se puede producir a partir de la glutamina sintetizada en las células gliales a través de la enzima glutaminasa (**Figura 7**) [12], [18].

2.3.1.1. *Receptores glutamatérgicos*

El glutamato activa tanto los receptores ionotrópicos (canales de cationes controlados por ligandos) como los metabotrópicos (acoplados a proteínas G).

Los receptores ionotrópicos de glutamato están compuestos por cuatro subunidades. Se han diferenciado tres tipos principales de receptores: receptores de NMDA, AMPA y kainato. Se localizan principalmente en la corteza, los ganglios basales y las vías sensitivas.

Para formar los receptores de NMDA hay siete tipos de subunidades: GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A y GluN3B. Hay cuatro subunidades distintas para constituir los receptores de AMPA, GluA1-4, y cinco subunidades para formar los receptores de kainato, GluK1-5 [23].

Existen ocho receptores de glutamato metabotrópicos diferentes (mGluR1-8), que se agrupan en 3 grupos. Son receptores acoplados a proteínas G, y funcionan como homo- y heterodímeros. El grupo 1 incluye los receptores mGluR1 y mGluR5, y están acoplados a proteínas Gq, por lo que estimulan la fosfolipasa C, que conduce a una elevación del calcio intracelular y la activación de la proteína quinasa C. Los receptores del grupo 2 (mGluR2 y mGluR3) y del grupo 3 (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) están acoplados a proteínas Gi/Go, e inhiben la AC, lo que conduce a una reducción del cAMP y la inactivación

de la PKA. Los receptores de glutamato metabotrópicos se encuentran repartidos por todo el encéfalo [24], [25].

2.3.1.2. *Sistema glutamatérgico*

Las principales neuronas glutamatérgicas se localizan en la corteza cerebral, y se proyectan a varias estructuras subcorticales, como el hipocampo, la amígdala basolateral, el núcleo accumbens, la sustancia negra, el núcleo caudado y el núcleo rojo. En cuanto a las funciones biológicas de este aminoácido excitador, son múltiples. Sin embargo, la más relevante es su importancia para la plasticidad sináptica y las adaptaciones a largo plazo [18].

Las sinapsis glutamatérgicas pueden sufrir excitotoxicidad, que consiste en una liberación excesiva de glutamato en la sinapsis en respuesta a una entrada de potencial de acción repetida. Este fenómeno, si se repite constantemente, puede provocar estrés oxidativo y muerte neuronal, de hecho, se ha descrito que está muy presente en algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson [26], [27].

2.3.2. GABA

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del encéfalo. Se produce en las neuronas GABAérgicas a partir del glutamato por acción de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), una enzima que solo existe en las neuronas que sintetizan GABA en el encéfalo (**Figura 7**). Una vez que se ha sintetizado se almacena en vesículas en las terminales nerviosas.

Después de su liberación, el GABA es captado por transportadores específicos de astrocitos y neuronas GABAérgicas. Luego, la enzima GABA transaminasa (GABA-T) puede degradarlo a semialdehído succínico y volver a entrar en el ciclo de Krebs [18], [28].

2.3.2.1. *Receptores GABAérgicos*

El GABA actúa sobre dos tipos diferentes de receptores: GABA-A y GABA-B. Al igual que los receptores de glutamato, los receptores de GABA se encuentran ampliamente repartidos por todo el encéfalo.

Los receptores GABA-A son de tipo ionotrópico (canales iónicos de cloruro), compuestos por subunidades α , β , γ y δ en una estructura heteropentamérica. Dentro de las subunidades existe una diversidad adicional lo que hace que haya una mayor heterogeneidad de estos receptores.

Los receptores GABA-B están acoplados a proteínas G, concretamente a proteínas Gi/GO para inhibir los canales de calcio (reduciendo así la liberación de transmisores), para abrir los canales de potasio (reduciendo la excitabilidad postsináptica) y para inhibir la AC [29].

2.3.2.2. *Sistema GABAérgico*

GABA actúa como un neurotransmisor inhibitor en muchas vías diferentes dentro del SNC; de hecho, alrededor del 20% de las neuronas totales son neuronas GABAérgicas. La mayor parte de ellas son interneuronas cortas, si bien existen vías largas, como la del cuerpo estriado a la sustancia negra y el globo pálido [18].

Existen algunas patologías neurológicas que clásicamente se han relacionado con la disfunción del sistema GABAérgico, principalmente por una respuesta incorrecta a la inhibición provocada por GABA, como la epilepsia. De hecho, hay estudios que relacionan los déficits de la función GABA con alteraciones psiquiátricas como depresión, ansiedad y trastorno por déficit de atención con hiperactividad [30].

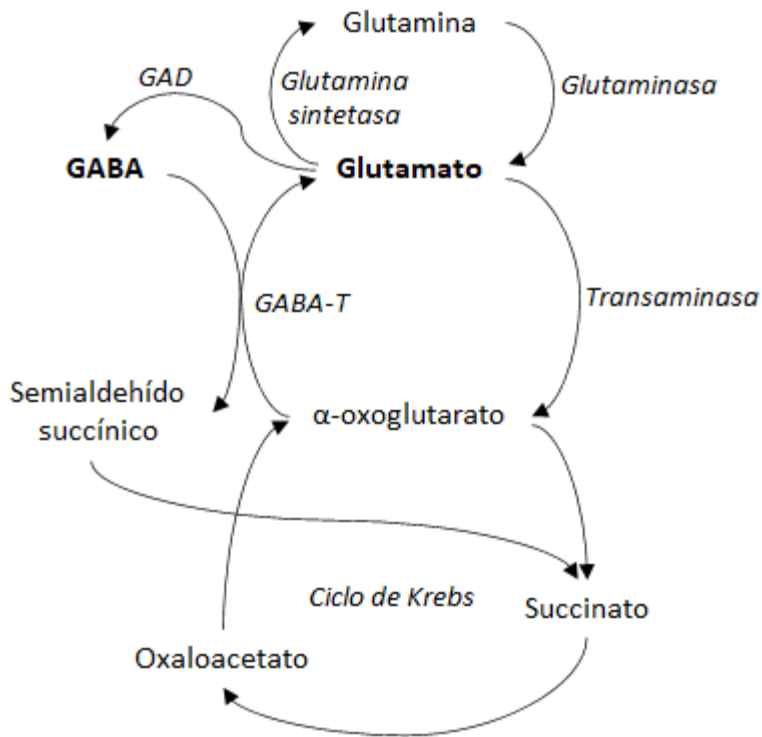


Figura 7. Metabolismo de los aminoácidos transmisores en el encéfalo. GABA, ácido g-aminobutírico; GABA-T, GABA transaminasa; GAD, descarboxilasa del ácido glutámico. Adaptada del libro Rang and Dale's Pharmacology [18].

3. Respuestas endocrinas

La integración de la respuesta al estrés y procesamiento en el SNC se da en el hipotálamo, específicamente en el núcleo paraventricular (PVN). Este núcleo secreta hormonas y neurotransmisores que transmitirán la señal del estímulo estresor por todo el sistema incluyendo otras áreas cerebrales [31].

Existen dos rutas por las cuales se consiguen respuestas sistémicas a los factores estresantes, estando el hipotálamo involucrado en ambas.

3.1. Eje SAM

La recepción de un estímulo estresante por parte del hipotálamo provoca la activación del **eje simpático-adrenal-medular (SAM)**. La activación de este eje produce la liberación al torrente sanguíneo de catecolaminas (adrenalina y NA). La NA es sintetizada principalmente en las neuronas noradrenérgicas del locus cerúleo y de los nervios postganglionares del sistema nervioso simpático. La adrenalina, y parte de la NA, se producen en la médula de la glándula suprarrenal (**Figura 8**).

Cuando las catecolaminas se liberan al torrente sanguíneo interactúan con los receptores adrenérgicos de los tejidos diana y producen efectos para una respuesta de “lucha-huida” a nivel sistémico, produciendo un aumento de la frecuencia cardíaca, vasoconstricción y movilización de las reservas energéticas [32].

3.2. Eje HPA

El PVN del hipotálamo también activa al **eje hipotalámico-pituitario-adrenocortical (HPA)**. Las neuronas sintetizan y secretan el factor liberador de corticotropina (CRH). Este factor transmitirá una señal a la hipófisis anterior, también conocida como glándula pituitaria, donde se secretará al torrente sanguíneo corticotropina (ACTH). La ACTH tiene como diana la glándula adrenal

donde su corteza promueve la síntesis y la liberación de glucocorticoides (GC) al torrente sanguíneo (**Figura 8**) [31].

Los GC se sintetizan a partir del colesterol y promueven cambios fisiológicos en el organismo para adaptarse al estímulo estresor. Entre estos cambios se encuentran la inhibición del crecimiento óseo y muscular, movilización energética, degradación de lípidos y proteínas, y vasoconstricción [9].

El eje HPA se encuentra regulado mediante una retroinhibición negativa por parte de los GC, lo que conlleva una disminución de la secreción de CRH y de ACTH por parte del PVN y la hipófisis. Además, existe un complejo sistema de modulación del eje HPA por parte de distintas áreas cerebrales y sistemas de neurotransmisores que proyectan al hipotálamo. Los núcleos del rafe y la amígdala activan el eje HPA estimulando la secreción de CRH y, por lo tanto, de ACTH y GC, mediante proyecciones serotoninérgicas al PVN [9], [31].

El hipocampo tiene un importante papel en la finalización de la respuesta al estrés por parte del eje HPA. El hipocampo tiene receptores de GC que promueven su activación. Al estimularse reduce la actividad del PVN inhibiendo así la liberación de GC. Se sugiere que la disminución de la actividad del PVN se produce mediante proyecciones GABAérgicas [33].

La corteza prefrontal presenta gran número de receptores de GC indicando así su importancia en la modulación del eje HPA. La activación de la corteza prefrontal se puede dar mediante los receptores de GC, por el sistema noradrenérgico o el dopaminérgico. Al igual que en el hipocampo, la activación de la corteza prefrontal produciría una inhibición del eje HPA mediante proyecciones GABAérgicas de la corteza prefrontal al PVN [33].

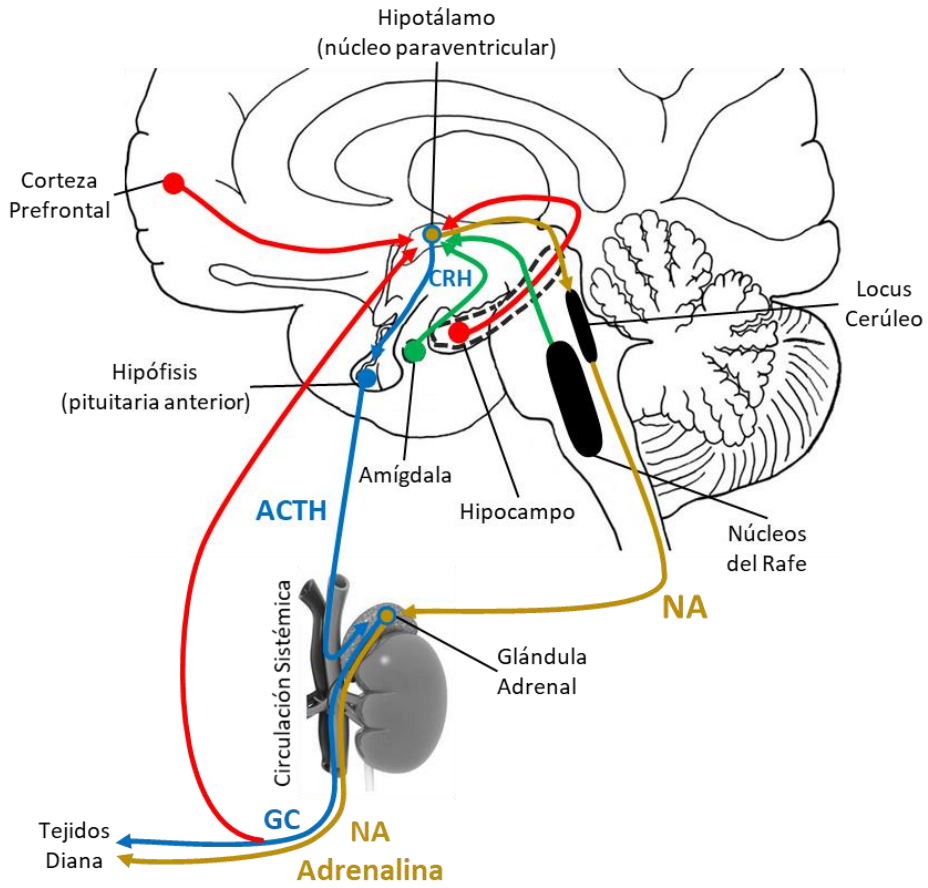


Figura 8. Representación gráfica de funcionamiento de los ejes SAM y HPA. En amarillo el eje SAM; en azul el eje HPA; en verde las acciones activadoras; en rojo las acciones inhibitorias. Adaptada de Herman et al. (2003) [9].

4. Marcadores neuronales

Las neuronas son los componentes básicos de señalización en el encéfalo. Tienen una estructura especializada que les permite propagar las señales eléctricas y así comunicarse entre ellas. En su estructura se pueden diferenciar morfológicamente cuatro regiones (**Figura 9**) [34]:

- El **cuerpo celular** (soma). Es el centro funcional y metabólico de la célula. Alberga el núcleo con el DNA celular y otros orgánulos. De él emergen dos tipos de estructuras:
 - El **axón**, lleva información que sale de la neurona. Emerge desde una región especializada del soma celular, llamada cono axonal, y es responsable de la propagación del potencial de acción.
 - Las **dendritas**, reciben información que entra a la neurona. Una neurona normalmente tiene muchas dendritas. Cada una de estas dendritas a su vez contiene de cientos a miles de espinas, las cuales conectan con los axones de otras neuronas.
- Las **terminales sinápticas**. El punto de contacto entre dos neuronas es la sinapsis, pero no hay contacto físico, sino que se encuentran separadas por el espacio sináptico. Al final de cada axón está la terminal sináptica que contiene vesículas llenas de neurotransmisores. Cuando un potencial sináptico alcanza la terminal, el contenido vesicular es liberado dentro del espacio sináptico permitiendo la comunicación química con la neurona postsináptica.

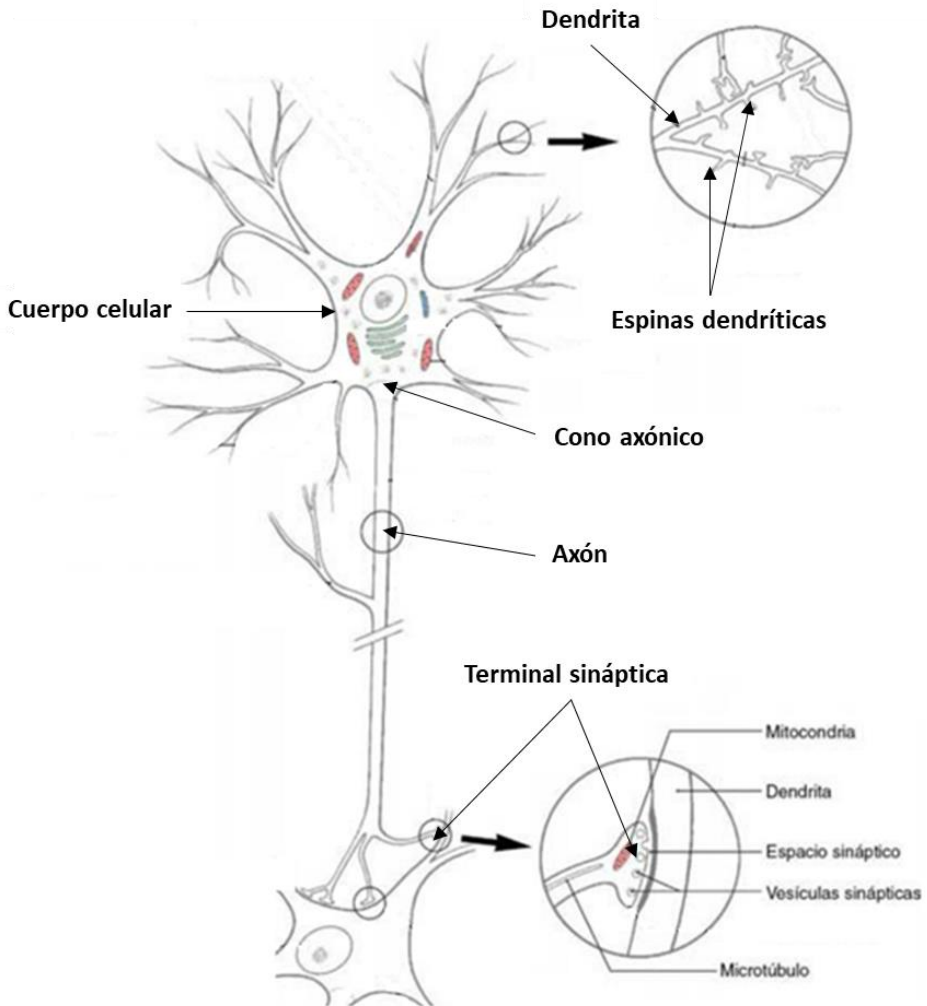


Figura 9. Representación esquemática de una neurona motora de la médula espinal con sus regiones representativas. Adaptada del libro Principios de Neurociencia [34].

Para entender cómo funciona el encéfalo es fundamental estudiar los diferentes tipos celulares cerebrales (neuronas, glía, oligodendrocitos...). Con este propósito, mediante tinciones o marcadores inmunohistoquímicos se pueden identificar células que expresan un fenotipo neuronal, recolectar información de sus características morfológicas y analizar la expresión de proteínas específicas. Sin embargo, el marcaje estará determinada por la distribución de la proteína diana dentro de la célula, la cual variará entre el núcleo, el soma, la dendrita y el axón [35].

Hay un gran número de marcadores inmunohistoquímicos disponibles para facilitar la distinción del fenotipo de las células neuronales en el encéfalo (Figura 10).

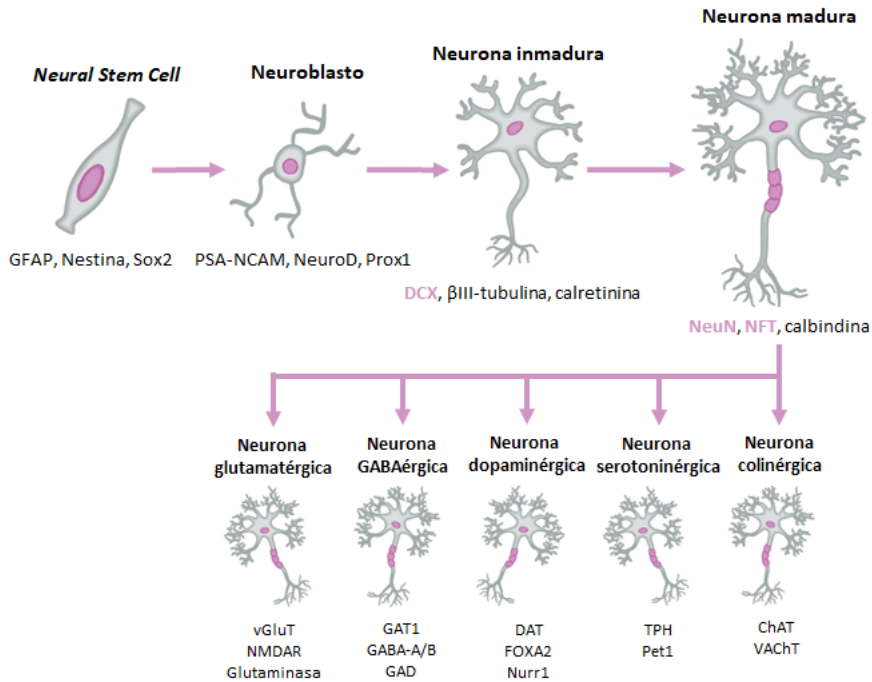


Figura 10. Etapas de desarrollo en la neurogénesis y marcadores neurales. Adaptada de Kempermann et al. (2015) [35].

4.1. Núcleos Neuronales

En 1992, Mullen et al. generaron un anticuerpo monoclonal que reconocía una proteína nuclear específica de neuronas de vertebrados. La llamaron Núcleos Neuronales (NeuN), y fue detectada en la mayoría de las neuronas del SNC y del SNP, tanto en el embrión como en el adulto, con excepción de las células de Purkinje, células del bulbo olfativo y células fotorreceptoras de la retina [36]. Aun así, no se conocía el antígeno diana del anticuerpo, hasta que, en 2009, Kim et al. identificaron a NeuN como Fox-3, una proteína involucrada en la regulación del *splicing* del mRNA. Dado que Fox-3 se

expresa exclusivamente en neuronas, se ha sugerido que juega un rol en la regulación de la diferenciación celular y el desarrollo del sistema nervioso [37].

Actualmente, NeuN se usa como marcador de los cuerpos y núcleos de células neuronales, y su expresión aparece cuando finaliza la proliferación celular y las neuronas postmitóticas migran, por lo que es un excelente marcador de neuronas maduras [38].

4.2. Doblecortina

La doblecortina (DCX) es una fosfoproteína asociada a microtúbulos que se expresa ampliamente durante la migración y la diferenciación de las neuronas inmaduras, mientras que no se expresa en las células madre neurales ni en las células progenitoras (neuroblastos) durante la neurogénesis, ni cuando las nuevas neuronas ya son maduras. Se localiza en el soma de las neuronas que migran, y en los axones de las neuronas que se están diferenciando. Es un buen marcador de neurogénesis, de neuronas en desarrollo y en migración [39].

4.3. Proteína de los neurofilamentos

La proteína de los neurofilamentos (NFT) es una de las proteínas citoesqueléticas más importantes, formando parte de los filamentos intermedios propios de las neuronas. Los neurofilamentos son específicos de las neuronas y se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes poblaciones neuronales, excepto en células de Purkinje y algunas ganglionares. Su función principal es proveer soporte estructural a los axones y regular el diámetro axonal. La inmunotinción con anticuerpos contra esta proteína se usa para distinguir neuronas maduras de otros tipos de células, marcando ampliamente el neuropilo, donde se encuentran las conexiones sinápticas de las ramificaciones axónicas y las dendritas [40].

5. Restricción del crecimiento intrauterino

La restricción del crecimiento intrauterino (IUGR, del inglés “*Intrauterine growth restriction*”) se define como una tasa de crecimiento fetal menor de lo normal según la raza y el sexo del feto. Durante la gestación, aquellas condiciones que limitan el espacio disponible en el útero, como es un elevado número de embriones, causan disminución del suministro de nutrientes y/u oxígeno. Estas condiciones conllevan a pérdidas fetales y comprometen los fetos supervivientes conduciendo al nacimiento de descendencia con peso inferior al normal (LBW, “*low body weight*”) [41].

Tradicionalmente, la IUGR en humanos se ha relacionado con malnutrición materna (induce escasez de nutrientes en el feto) y/o con la hipoxia hipobárica materna, que afecta a mujeres embarazadas que viven o visitan zonas geográficas a gran altitud (induciendo escasez de oxígeno al feto). Actualmente, también existe un aumento relativo en la incidencia de IUGR en condiciones económicas, geográficas y sociales adecuadas, debido al desarrollo anormal de la placenta (insuficiencia placentaria). Se calcula que más del 60% de casos de IUGR en países desarrollados se deben a insuficiencia placentaria, que impide la correcta transferencia de nutrientes y oxígeno al feto y, por lo tanto, limita su crecimiento. Las principales causas de IUGR por insuficiencia placentaria son un estilo de vida inadecuado (estrés, hábitos sedentarios, contaminación, consumo de alcohol y tabaco) y factores maternos y gestacionales (enfermedad materna, diabetes, compresión del cordón umbilical, hemoglobinopatía, desarrollo aberrante de la placenta...) [41], [42].

5.1. Clasificación

Según sus características se conocen 3 tipos de IUGR:

La **IUGR asimétrica** es la que tiene una mayor incidencia, entre el 70 y 80% de los casos. El feto suele tener un crecimiento normal hasta el tercer trimestre, seguido de un escaso aumento de peso a partir de entonces. Se debe

a reducciones en los nutrientes fetales que limitan el almacenamiento de glucógeno y grasa, causadas generalmente por trastornos de la placenta. Como resultado, hay una reducción del tamaño de las células a pesar de que se mantiene la cantidad de células totales que forman el feto. Esos recién nacidos presentan un peso significativamente reducido y disminución de la circunferencia abdominal, pero diámetro biparietal, circunferencia de la cabeza y longitud del fémur normales [41], [42].

En este tipo de IUGR el desarrollo fetal es asimétrico ya que el feto adapta su fisiología para preservar u optimizar el crecimiento de órganos vitales a expensas de otros. El encéfalo es el órgano más importante para la supervivencia del neonato, ya que se encarga de funciones esenciales como la respiración, la respuesta al entorno y el reflejo de amamantamiento, por lo tanto, su adecuado desarrollo prenatal necesita ser asegurado. Este efecto se conoce como "*brain-sparing*", y tiene como objetivo proteger el desarrollo del encéfalo. Sin embargo, esto no garantiza su desarrollo normal, ya que existe el riesgo de que ocurran deficiencias neurológicas a corto o largo plazo, específicamente en el sistema límbico, que puedan causar déficits cognitivos, emocionales o interactivos [43], [44].

La **IUGR simétrica** tiene una incidencia de aproximadamente el 20-30% de los casos de IUGR. El retraso del crecimiento en el útero es más temprano que el tipo 1, por lo general en las primeras etapas del embarazo. La principal causa son factores intrínsecos como infecciones congénitas o anomalías cromosómicas. La mayor afectación que se observa es la disminución de la cantidad total de células que forman el feto y no el tamaño de estas. Los recién nacidos presentan parámetros alterados como una disminución proporcional del diámetro biparietal, la circunferencia de la cabeza, la circunferencia abdominal y la longitud femoral. Esto hace que este tipo de IUGR tenga una alta tasa de mortalidad y morbilidad [41], [42].

Por lo tanto, si se produce IUGR simétrica es posible que el encéfalo de estos bebés no se desarrolle correctamente. Concretamente, se ha visto en fetos que tanto el volumen como el diámetro del encéfalo se reducen, persistiendo en la infancia con alteraciones de la organización estructural, la conectividad y su función [45]. La caracterización de los cambios cerebrales producidos por la IUGR es uno de los principales retos de la medicina fetal y pediátrica. Por eso, se necesita investigar el desarrollo de estrategias diagnósticas, preventivas y terapéuticas, para así disminuir su incidencia y repercusiones. En consecuencia, es interesante examinar los posibles cambios que se puedan dar en regiones cerebrales concretas.

El último tipo es la **IUGR mixta**. Los recién nacidos que la padecen tienen una disminución en la cantidad de células y su tamaño, por lo que las características de estos bebés son una mezcla de la IUGR simétrica y asimétrica. Por lo general, ocurre cuando la IUGR es producida por causas placentarias al final del embarazo [42], [46].

5.2. Enfermedades en adultos de origen fetal (FOAD)

Se sugiere que muchas enfermedades que surgen en edad adulta tienen su origen durante la formación del feto, ya que la exposición ambiental intrauterina a factores de riesgo afecta el desarrollo del feto durante los períodos sensibles y aumentan el riesgo de enfermedades específicas en la vida adulta.

Los neonatos con IUGR tienen un mayor riesgo de desarrollar algunos trastornos durante la edad adulta. Barker observó que los bebés que nacieron entre las décadas de 1920 y 1930, y tenían bajo peso al nacer, cuando llegaron a la edad de 50-70 años tenían una alta incidencia de enfermedad coronaria, diabetes mellitus, hiperinsulinemia e hipercolesterolemia [47]–[49]. Otros investigadores observaron hallazgos similares y propusieron que estos lactantes con IUGR eran susceptibles a varias enfermedades durante la edad adulta [50]–[52].

Se han propuesto tres hipótesis diferentes para esta asociación.

5.2.1. Hipótesis de la insulina fetal y genes MODY

En 1999 Hattersley y Tooke propusieron que hay un factor genético causante tanto del bajo peso al nacer como de un mayor riesgo de diabetes tipo 2. Afirmaron que la resistencia a la insulina determinada genéticamente da como resultado un crecimiento deficiente en el feto mediado por la insulina y también es responsable de la resistencia a la insulina en la vida adulta que conduce a la susceptibilidad a la diabetes tipo 2. Debido al resultado de esta resistencia a la insulina, hay un desarrollo vascular anormal durante la vida fetal y la primera infancia, lo que aumenta el riesgo de hipertensión y enfermedad vascular. Esta hipótesis de la insulina fetal está respaldada por individuos que padecen diabetes MODY de tipo 2 (*“Maturity Onset Diabetes of the Young”*), un tipo de diabetes causada por mutaciones en el gen de la glucoquinasa que dan como resultado una disminución de la secreción de insulina, y un crecimiento fetal reducido [53].

5.2.2. *“Thrifty genotype”* (genotipo *“ahorrativo”*)

Esta teoría fue propuesta por Neel en 1962. El investigador afirmó que los genes responsables de causar diabetes se habían retenido en el genoma de todos los individuos como resultado de la selección natural, ya que son beneficiosos para el bebé. Estos genes dan como resultado una mayor capacidad para almacenar grasa durante épocas de inanición y desnutrición, y recientemente estos genes se han vuelto perjudiciales debido a la sobrealimentación y la falta de ejercicio, lo que en adelante conduce a la aparición precoz de la obesidad [54].

5.2.3. “Thrifty phenotype” (hipótesis de Barker)

Ésta es la hipótesis más aceptada para explicar el FOAD. Sugirió que cuando el ambiente intrauterino era deficiente debido a cualquier motivo materno, placentario o fetal, el feto se adapta a este ambiente hostil para asegurar su supervivencia en el útero (**Figura 11**).

La hipótesis propone que, aunque estas adaptaciones ocurren durante un fenómeno transitorio (desnutrición fetal), se vuelven permanentes o "programadas" porque ocurren en un momento crucial del desarrollo fetal. Los mecanismos implicados serían epigenéticos. Estos cambios hacen que el feto se adapte a una mala nutrición prenatal, pero cuando la nutrición posnatal es normal o excesiva, que es opuesta a la programación fetal, conduce a un crecimiento anormal y lo hace susceptible a FOAD [55].

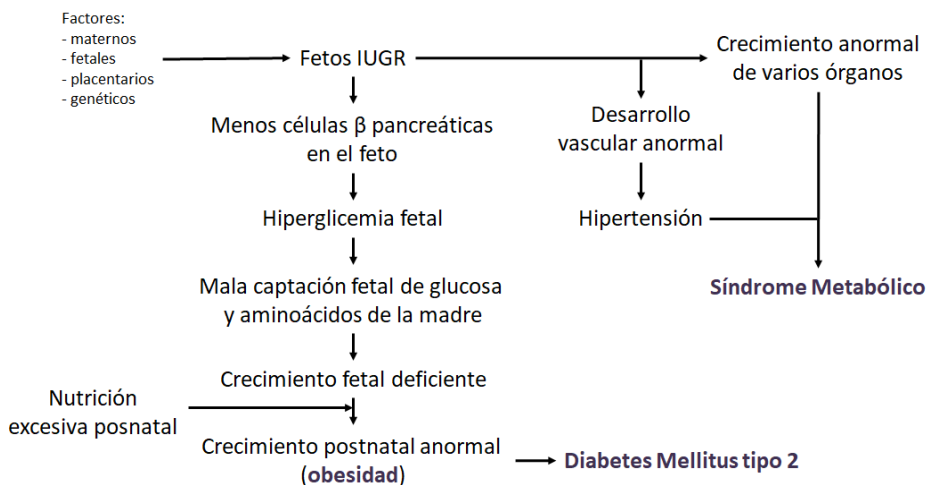


Figura 11. Hipótesis de Barker que explica el FOAD en lactantes con IUGR. Adaptada de Cianfaran et al. (2012) [56] y Fowden et al. (2006) [57].

Esos cambios de adaptación fetal se deben principalmente a la falta de nutrientes y oxígeno, pero también a la desregulación endocrina. Este cambio en la programación intrauterina se basa en la reestructuración del desarrollo fetal, desviando los pocos nutrientes y suministros de oxígeno disponibles a los órganos más vitales, como el cerebro, a expensas de otros tejidos como el

músculo, el hígado y el páncreas. Además, hay una reducción de la producción y de la sensibilidad a la insulina fetal y al IGF-1 [56]–[58].

5.3. Alteraciones neurológicas asociadas a la IUGR

Como se ha comentado anteriormente, los recién nacidos que sufren IUGR tienen una falta de suministro de oxígeno y nutrientes. En esta situación se produce el fenómeno denominado “*brain-sparing*”. Se consigue con una alteración de la circulación del feto, para dar preferencia del flujo sanguíneo hacia el cerebro y así preservar el oxígeno y los nutrientes en él. Sin embargo, no asegura que se produzca un correcto desarrollo cerebral [43], [59], [60].

Se ha visto que, al reducirse el oxígeno cerebral por privación en la placenta, se produce una cascada bioquímica que causa lesiones que pueden conducir a disfunción mitocondrial e incluso muerte celular. Estas alteraciones se producen principalmente por mecanismos de estrés oxidativo, excitotoxicidad, apoptosis y neuroinflamación [43].

Una de las alteraciones más estudiada es la neuroinflamación. En varios estudios se ha observado un aumento de la microglía activada y astrogliosis en IUGR. La microglía se activa como defensa contra infecciones o sustancias tóxicas liberadas por células apoptóticas. Al activarse cambia de morfología y regula la liberación de óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8...), que inducen la infiltración de leucocitos y la expresión de moléculas de adhesión provocando una alteración de la barrera hematoencefálica. Por otra parte, los astrocitos liberan factores de crecimiento y citoquinas que aumentan la lesión cerebral e inhiben la regeneración neuronal [61].

5.3.1. Déficit estructurales

Se ha detectado que los neonatos que han padecido IUGR suelen tener una circunferencia de la cabeza más pequeña que los bebés con una tasa de crecimiento normal, contribuyendo a futuros problemas neurológicos [62].

También presentan pérdida de la sustancia blanca y gris. Algunos estudios *post-mortem* de recién nacidos con IUGR demuestran que la sustancia blanca es inmadura y presenta una reducción de la mielinización [63], mientras que la materia gris muestra un menor volumen y número de células asociándose a discapacidades cognitivas y físicas [64], [65].

Otra característica importante, observada en fetos y recién nacidos, es la disminución tanto de las células como del contenido de mielina, produciendo un retraso de la mielinización de las neuronas. Además, se ha observado que existe una pérdida de conectividad de algunas redes neuronales, principalmente en las redes prefrontal y límbica. Esta pérdida de conectividad puede dar lugar a la aparición de problemas de comportamiento futuros como hiperactividad y problemas cognitivos [60].

Después del nacimiento, los bebés que han sufrido IUGR presentan áreas cerebrales con su estructura morfológica alterada. Mediante análisis histológicos en modelos animales se ha podido observar diferencias en poblaciones de células específicas y en el tamaño de algunas regiones del cerebro, evidenciando así cuáles eran las estructuras neurológicas más dañadas por el IUGR. Principalmente, se observaron alteraciones neurológicas provocadas por el IUGR en el hipocampo y la corteza cerebral, ya que son estructuras altamente vulnerables a esta patología [66], [67].

Además, en la corteza cerebral de recién nacidos se observó una alteración de la girificación cortical, probablemente debida a un grosor cortical más delgado [68].

5.3.2. Déficit funcionales

Como resultado de todas estas alteraciones de la estructura cerebral, aparecen muchos déficit funcionales en los niños que han padecido IUGR. Las principales funciones que se alteran con esta afección son básicamente las relacionadas con las funciones motoras, cognitivas, conductuales y académicas.

Se ha descrito una relación en los neonatos que han padecido IUGR y la pérdida de algunas discapacidades neuromotoras como en la motricidad fina, las habilidades visomotoras (reconocimiento visual), la torpeza y la parálisis cerebral. La parálisis cerebral es un trastorno que afecta el tono y el movimiento muscular, perdiendo la capacidad de moverse de forma intencionada y coordinada. A la larga se ha relacionado también con otros problemas como la pérdida de audición, problemas de visión y del habla [69].

Otra función alterada es la función cognitiva. Algunos de los resultados que se ven alterados son el cociente de inteligencia y el cociente de desarrollo. Algunos estudios concluyeron que tener la circunferencia de la cabeza pequeña estaba relacionada con una mala memoria, por lo que suelen ser más vulnerables a tener un coeficiente intelectual más bajo [69].

Otra función alterada es el comportamiento de estos niños. Algunos estudios observaron que los niños con IUGR eran más susceptibles a sufrir alteraciones del estado de ánimo y del comportamiento (siendo más propensos a la irritabilidad), déficits de atención y de interacción, hiperactividad, ansiedad y depresión [69].

Por último, donde la alteración de todas estas funciones ha tenido un mayor impacto y preocupación es en el área del rendimiento escolar. En la mayoría de los estudios, se ha concluido que estos niños tienen un alto riesgo de experimentar déficits de memoria verbal a corto plazo que pueden obstaculizar su capacidad de aprendizaje, por lo que a la larga presentan una mayor incidencia de problemas escolares, reduciendo su rendimiento escolar o llegando incluso al fracaso escolar [69], [70].

5.4. Alteraciones metabólicas asociadas a la IUGR

La IUGR puede ocurrir en cualquier trimestre, lo que provocaría una IUGR simétrica o asimétrica. El crecimiento se produce principalmente por el aumento del número de células durante el primer trimestre, mientras que el tamaño de

las células aumenta con el número en el segundo trimestre. Al final de la gestación la tasa de división celular disminuye, pero el tamaño de la célula continúa aumentando. El crecimiento de tejidos, como el tejido adiposo y el músculo esquelético, se produce durante el último período de gestación y se evitan otros órganos y tejidos, como el cerebro y el corazón, cuyo desarrollo ya ha tenido lugar [42].

El contenido de distintas moléculas y compuestos se ven alterados debido al proceso de IUGR.

- El contenido de **agua** corporal total en el feto normal aumenta con la gestación, pero el porcentaje de agua por peso corporal disminuye a medida que aumenta el contenido de proteínas, tejido adiposo y minerales con la gestación. Cuando se produce una IUGR grave, hay una marcada disminución del contenido de grasa y se caracteriza por un mayor contenido de agua corporal [71].

- El contenido de **nitrógeno** aumenta con la edad gestacional. El aumento tiene una relación lineal con el peso fetal y una relación exponencial con la edad gestacional. La mayor parte del contenido de nitrógeno fetal se encuentra en las proteínas y ácidos nucleicos, el resto está compuesto por urea, amoníaco y aminoácidos libres. En los lactantes que han padecido IUGR se ve reducido ya que estos recién nacidos tienen un crecimiento muscular deficiente [71].

- La **insulina** tiene efectos mitogénicos directos sobre el desarrollo celular y, por lo tanto, controla el número de células. La insulina fetal actúa como señal de disponibilidad de nutrientes y promueve la captación y el consumo de glucosa por muchos tejidos del cuerpo, principalmente de los músculos, y limita la degradación de proteínas. En fetos que padecen IUGR hay una deficiencia de insulina dando como resultado una reducción del crecimiento fetal, porque los tejidos fetales disminuyen la absorción y la utilización de nutrientes [72].

- El factor de crecimiento **IGF-1** está regulado positivamente por el suministro de glucosa en el feto. El IGF-1 tiene propiedades mitogénicas, induce el crecimiento y la proliferación de células somáticas e influye en el transporte de glucosa y aminoácidos a través de la placenta y, por lo tanto, afecta el crecimiento fetal. Además, a nivel neuronal el IGF-I estimula un aumento de los oligodendrocitos y el número de neuronas, y el crecimiento neuronal con un aumento de la arborización dendrítica y los campos terminales de los axones [73]. Ensayos preclínicos han demostrado que la disminución de la expresión de IGF-I da como resultado una notable reducción de las tasas de crecimiento fetal, cosa que ocurre en los fetos que han padecido IUGR [74].

- La insulina actúa sobre el metabolismo de la glucosa para aumentar las reservas de **glucógeno** hepático del feto y, cuando nace el bebé, el cortisol, la epinefrina y el glucagón inducen la glucogenólisis y aumentan los niveles de glucosa. La mayoría de los tejidos del feto, incluidos el cerebro, el hígado, los pulmones, el corazón y el músculo esquelético, sintetizan glucógeno durante la segunda mitad de la gestación, lo que conduce a una acumulación progresiva de glucógeno en los órganos. Los fetos con IUGR tienen un almacenamiento reducido de glucógeno tanto en el hígado como en el músculo esquelético debido a las concentraciones plasmáticas más bajas de glucosa e insulina en el feto. Además, estos fetos cuando tienen episodios intrauterinos de hipoxia estimulan la secreción de epinefrina y reducen aún más el glucógeno activando la glucógeno fosforilasa y aumentando la glucogenólisis [71].

- La acumulación de **tejido adiposo** comienza a finales del segundo y principios del tercer trimestre de gestación. En la primera mitad de la gestación, los componentes grasos y no grasos son casi iguales en contenido y contribuyen de igual forma al contenido de carbono del cuerpo fetal. En la última parte del embarazo hay una rápida acumulación de grasa y al nacer constituye el contenido principal de carbono del cuerpo. Los fetos con IUGR tienen deficiencia en el contenido de grasa debido a la disminución de los niveles de ácidos grasos,

triglicéridos y glucosa. La hormona insulina también está disminuida, lo que limita la síntesis de grasas debido a la disminución de la estimulación de la sintasa de ácidos grasos en los adipocitos [71], [75]. Por tanto, nacen con menos reservas energéticas, tanto de lípidos como de carbohidratos.

Como se ha descrito en las hipótesis de Barker, la plasticidad del epigenoma durante el desarrollo permite que el organismo en desarrollo se "pre-adapte" al futuro entorno cuando sea adulto, lo que le proporciona una ventaja de supervivencia (**Figura 11**). Sin embargo, en entornos en los que el entorno fetal no coincide con el entorno adulto, por ejemplo, el desarrollo fetal en un entorno pobre en nutrientes (hipoglucemia intrauterina) junto con un entorno rico en nutrientes cuando es adulto, puede acabar provocando obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 en la edad adulta (**Figura 12**).

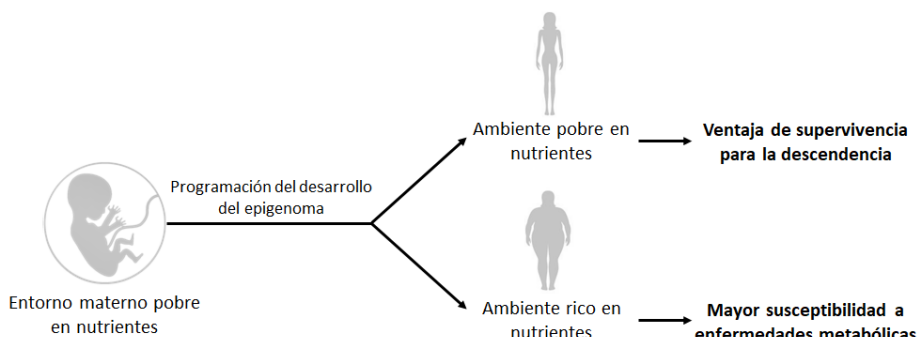


Figura 12. Hipótesis de Barker. Adaptada de Vaiserman et al. (2019) [76].

Muchos estudios demuestran que la IUGR puede inducir cambios estructurales o funcionales a largo plazo en diferentes órganos de los lactantes que afectarían de manera permanente a sus funciones corporales [58], [72].

En la **Figura 13** se presentan los principales cambios en tejidos y órganos involucrados en la programación del metabolismo energético celular en la descendencia que padece IUGR. Estos cambios van a favor del almacenamiento de lípidos, por lo que predispone a los individuos al síndrome metabólico [76].

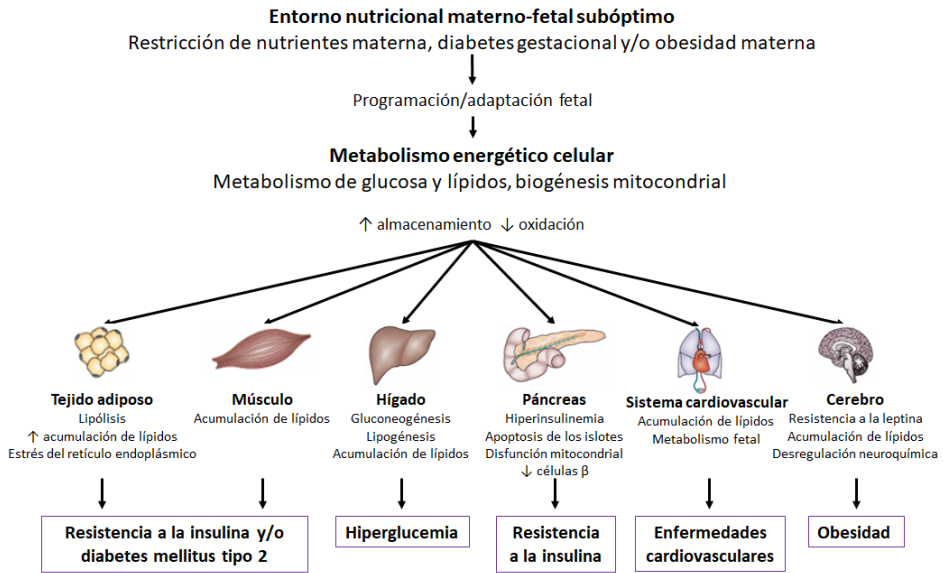


Figura 13. Papel del entorno nutricional materno-fetal en los cambios de tejidos y órganos relacionados con el metabolismo energético de la descendencia con IUGR. Adaptada de Vaiserman et al. (2019) [76].

Un buen ejemplo de tales cambios es el desarrollo del páncreas. El páncreas es un órgano particularmente sensible al desequilibrio nutricional durante la organogénesis intrauterina. La ingesta inadecuada de nutrientes a lo largo de esta etapa puede resultar en alteraciones del tejido pancreático estructural y funcional de por vida. En estudios sobre la IUGR en ratas se ha observado una reducción en las células de los islotes y en la proporción relativa de células β-pancreáticas, así como en el peso pancreático total [77]. Tales alteraciones persistentes pueden causar modificaciones a largo plazo en diversas vías bioquímicas y/u hormonales, aumentando así la susceptibilidad al desarrollo de patologías de adulto [78].

En la sangre del cordón umbilical de los fetos con restricción del crecimiento, se han encontrado disminuidos los niveles de IGF-1, de glucosa y de insulina [59].

Los recién nacidos que han sufrido IUGR son más sensibles a la insulina de lo habitual y experimentan un crecimiento posnatal acelerado (crecimiento

de recuperación) que promueve la adiposidad, pero posteriormente da lugar a la aparición de resistencia a la insulina [79]. Todo esto, hace que aumente el riesgo de padecer enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes tipo 2. Además, la resistencia a la insulina también está relacionada con el aumento de la grasa abdominal y hepática y con un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares [80].

Se han observado cambios en la función y la morfología del tejido adiposo ya que, si el suministro posnatal de nutrientes es mayor al intrauterino, se produce un mayor crecimiento y acumulación de grasa. De manera normal, los triglicéridos se almacenan en el tejido adiposo subcutáneo, pero cuando la ingesta excede su capacidad de almacenamiento, los triglicéridos se almacenan en el tejido adiposo visceral, cuya relación al tejido adiposo subcutáneo aumenta. El principal problema de un exceso de tejido adiposo visceral es que los lípidos se depositan ectópicamente en el músculo esquelético, el hígado y el cerebro produciendo TNF α y otros mediadores inflamatorios que contribuyen en la resistencia a la insulina. Esto es lo que sucede en individuos nacidos IUGR cuando se encuentran con un suministro alto de nutrientes posnatalmente [81], [82].

Además, se ha visto que también tienen un mayor riesgo de alteraciones termorreguladoras. Se postula que la hipoxia y la hipoglucemia pueden interferir con la producción de calor y pueden desempeñar un papel importante en la respuesta termorreguladora interrumpida [79]. Esto provoca que se redirija la glucosa al restablecimiento rápido de reservas de grasa provocando hiperinsulinemia y resistencia a la insulina que predisponen a obesidad abdominal, disfunción de células β -pancreáticas, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares [76].

5.5. Modelos animales de IUGR

Los modelos animales de IUGR se utilizan para estudiar sus consecuencias celulares y moleculares, la eficacia de nuevos fármacos, técnicas de diagnóstico o para evaluar el impacto de algunos factores de riesgo.

Muchas características de la biología humana a nivel celular y molecular se comparten con una amplia variedad de organismos, como roedores y otros mamíferos, que tienen una alta relación en cuanto a genes, vías bioquímicas, órganos y fisiología. Se han utilizado muchas especies animales como modelos animales de IUGR, tales como: ratas (60%), ratones (10%), ovejas (12%), cerdos (8%), cobayas (4%), monos (2%), embriones de pollo (2%) y corderos (2%) [83].

Al elegir un modelo animal para realizar un estudio, hay algunos factores específicos de la especie que hay que tener en cuenta: el número de crías por embarazo, la placentación, la duración de la gestación, el parto y el desarrollo del feto frente al neonato [84].

Referido a la IUGR, la mayoría de los estudios usan como modelo a los roedores debido a su fácil estabulado y cría, pero tienen algunas limitaciones, como nacer con un cerebro poco desarrollado en comparación a los humanos, de modo que es difícil hacer una extrapolación de resultados al ser humano. En cambio, en el modelo porcino el cerebro es más parecido al humano en peso, volumen, área cortical, mielinización, composición y actividad eléctrica. También es similar el desarrollo del cerebro, puesto que la neurogénesis en el cerdo, al igual que en humanos, se prolonga desde la fase prenatal tardía hasta la fase postnatal temprana. Además, la superficie cortical es girencefálica, es decir, presenta circunvoluciones. Por tanto, el cerdo presenta ventajas para el conocimiento de los procesos neurológicos y comportamentales que ocurren en humanos respecto a otros animales de laboratorio [85].

En particular, la cerda gestante es un modelo muy bueno porque la IUGR puede inducirse mediante la restricción de nutrientes maternos. Además, el cerdo es un modelo reconocido de IUGR causada por insuficiencia placentaria. Su alta prolificidad limita el espacio uterino disponible para el desarrollo de la placenta y hace que el suministro de nutrientes sea variable entre los fetos de la misma camada, por lo tanto, compromete la función placentaria provocando IUGR en un alto porcentaje (15-20%) de cada camada. La ventaja experimental es por tanto la coexistencia de fetos con un desarrollo normal y fetos con IUGR en una misma camada, lo que permite estudios comparativos entre ellos [83], [84], [86].

Al crear un modelo animal de IUGR las intervenciones que se pueden ejecutar son: intervención fetal, intervención materna o modificación genética.

La principal intervención fetal es la exposición del animal a condiciones hipóxicas, generando un modelo hipóxico de modo que no se interfiere en la salud de la madre [84].

El modelo de intervención materna más antiguo es quirúrgico y se basa en alterar la circulación uterina mediante la realización de una ligadura de la arteria umbilical. Esta técnica permite reducir los nutrientes y el oxígeno que llega a la placenta. Sin embargo, actualmente uno de los modelos más utilizados es la restricción de nutrientes materna. A las madres se les han impuesto muchos tipos diferentes de restricciones, como restricción de la ingesta de calorías, o restricción de la ingesta de nutrientes específicos.

Por último, también existen modelos modificados genéticamente. No son tan habituales como los demás y suelen realizarse en ratones. La mayoría de los modelos creados son *knock-out*, pero tiene un impacto tan severo que la mayoría de las veces conduce a una muerte prematura. Hoy en día, los modelos KO creados son condicionales o específicos de tejido [84].

Introducción

Los modelos animales de IUGR se han utilizado, entre otras cosas, para investigar posibles tratamientos preventivos y evitar los numerosos efectos perjudiciales del IUGR, incluyendo las posibles deficiencias a nivel del SNC. Estudios previos en modelos ovinos han demostrado que mediante la administración de agentes antioxidantes (vitaminas y melatonina) se pueden prevenir los efectos nocivos que derivan del estrés oxidativo [87]. Este fenómeno de estrés oxidativo es la consecuencia de la hipoxia que sufren los fetos debido a la IUGR. Por lo tanto, una mejora en el equilibrio de antioxidante respecto a las especies reactivas de oxígeno se encuentra directamente relacionada con un aumento en el peso y la viabilidad de la descendencia.

6. El hipocampo y la IUGR

El hipocampo es una de las regiones más importantes del encéfalo. Es una estructura de la materia gris que se encuentra en la región medial del lóbulo temporal, formando parte del sistema límbico. Tiene un papel relevante en el procesamiento e integración de diferentes tipos de memoria, como la memoria a corto y largo plazo o la memoria espacial [88].

Está conformada por dos estructuras principales, el hipocampo propiamente dicho o cuerno de Ammón (*cornu ammonis*, CA), y la circunvolución dentada (o giro dentado, GD) (**Figura 14**).

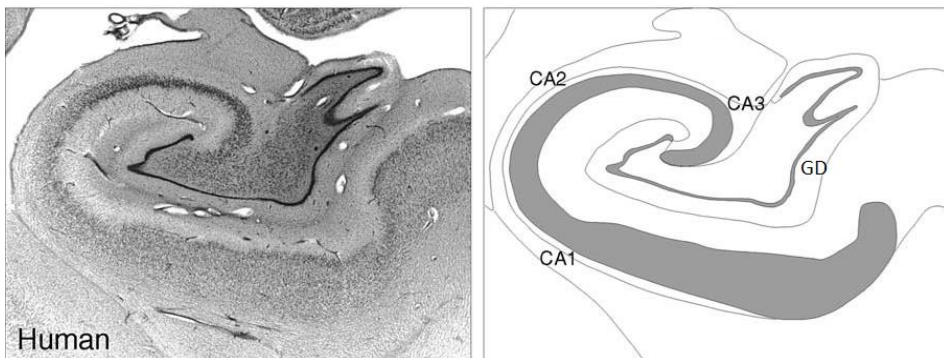


Figura 14. Secciones teñidas con Nissl y dibujos lineales que ilustran la organización general de la formación del hipocampo en humanos. Imagen extraída del libro Hippocampus Book [88].

El cuerno de Ammón tiene tres subdivisiones: CA3, CA2 y CA1. El principal tipo de célula neuronal que lo forma es la neurona piramidal. La mayoría de las neuronas se encuentran formando la capa de células piramidales, que está fuertemente empaquetada en CA3 y menos en CA2 y CA1.

El giro dentado es una región cortical trilaminada con forma de V o U. Tiene una estructura relativamente similar en todos los niveles de la formación del hipocampo y no suele dividirse en subregiones. Está formada principalmente por neuronas granulares y es el lugar principal de aferencias del hipocampo.

Introducción

Tiene un papel importante en la neurogénesis adulta de muchas especies de mamíferos, como roedores y primates, así como otras funciones relevantes.

El hipocampo es muy vulnerable a la hipoxia, la desnutrición y la alteración del suministro de micronutrientes, condiciones presentes en la IUGR. Es por ello por lo que el estudio histológico de esta área cerebral es un buen marcador para conocer los efectos de la IUGR a nivel de la formación del SNC y, a la vez, también es un buen marcador para el estudio de los efectos que pueden producir posibles tratamientos o dietas para revertir las consecuencias de la IUGR.

Estudios con modelos animales han mostrado que los individuos afectados por la IUGR presentaron alteraciones en el hipocampo con consecuencias en el desarrollo neurológico normal [89]. Así pues, la IUGR daña esta estructura provocando déficits cognitivos y de aprendizaje antes mencionados. Estudios específicos realizados con bebés prematuros nacidos con IUGR [65] y con fetos de monos rhesus (*Macaca mulatta*) [90] han mostrado una mayor degeneración de las neuronas piramidales del hipocampo, así como una menor densidad de neuronas granulares y una pérdida de ramas dendríticas en la circunvolución dentada. Con referencia a algunos estudios en roedores, se detectó una disminución significativa en el grosor y el número de células neuronales en la región CA2 de animales con IUGR leve y moderada. Sin embargo, solo los animales que padecieron una IUGR moderada mostraron una disminución del grosor de la región CA3 y de la circunvolución dentada, así como una reducción general del área del hipocampo [91], que también se observa en humanos y se correlaciona con el grado de restricción del crecimiento y el peso al nacer [66], [92].

7. Los aminoácidos en la nutrición de terneros

Uno de los principales retos en la nutrición de animales monogástricos es la reducción de proteína de las raciones, con el objetivo de disminuir la excreción de nitrógeno al medio ambiente sin perjudicar su crecimiento. La suplementación de las dietas con aminoácidos ha sido una de las estrategias más estudiadas y ha dado pie a un uso más razonable de la proteína [93], [94].

En rumiantes, la complejidad del metabolismo del nitrógeno en el rumen y de la fermentación microbiana hacen más compleja la formulación de los aminoácidos que se suplementan en la dieta, puesto que se requiere protegerlos del ataque microbiano en el rumen (**Figura 15**). Sin embargo, los terneros lactantes son una excepción: el reflejo de la gotera esofágica hace que la leche vaya directamente al abomaso y no fermenta a nivel del rumen, con lo que en los terneros lactantes no es necesaria la protección de los aminoácidos suplementados [95].

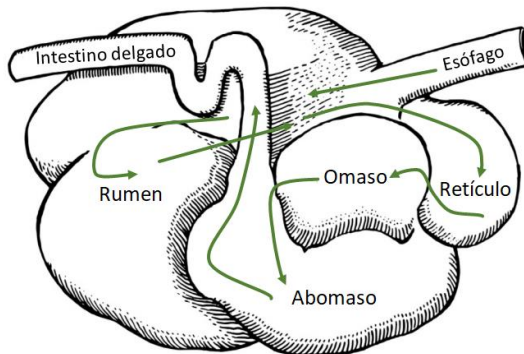


Figura 15. Estómago de los rumiantes. Adaptada de DePeters et al. (2014) [95].

Los aminoácidos que pueden ser sintetizados *de novo* por las células de los animales son considerados como dispensables de la dieta, pero quizás aquellos aminoácidos que el organismo es capaz de sintetizar por sí mismo son más importantes para él que aquellos que no es capaz y siempre se han considerado esenciales. En todo caso, podrían darse situaciones en que el uso de

Introducción

un aminoácido no esencial por el organismo fuera más rápido que su síntesis, de manera que estuviera limitando el crecimiento del animal. Por ejemplo, en situaciones de daño tisular o infección podría incrementar la demanda de Glicina puesto que es necesaria para la síntesis de glutatión y de algunas proteínas de fase aguda, entre muchas otras proteínas como la hemoglobina, creatinina, porfirinas, sales biliares y nucleótidos [96].

Hay diversos estudios que plantean estimar las necesidades de aminoácidos concretos (principalmente los esenciales) pero muchos son antiguos, y se realizaron con un número muy reducido de animales en un corto periodo de tiempo a partir de las 5 semanas de vida [97]–[99]. Más recientemente, Hill et al. en 2008 optimizaron las cantidades de Lisina (2.34%), Metionina (0.72%) y Treonina (1.8%) en lacto reemplazantes para maximizar la eficiencia y crecimiento de animales de menos de 5 semanas de edad [100]. Pero los aminoácidos no esenciales y su posible efecto como limitantes del crecimiento en terneros lactantes no se han estudiado en ningún caso.

A lo largo de las primeras semanas de vida el ternero lactante sufre una serie de cambios que indican que las necesidades de ciertos AA aumentan. Por eso el estudio de la funcionalidad de los AA y el conocimiento de las bases moleculares de sus efectos fisiológicos puede abrir nuevas puertas al uso racional de estos compuestos.

Terré et al. en 2006 concluyeron que la fenilalanina y el triptófano podrían estar limitando el crecimiento de los terneros amamantados siguiendo un programa de alimentación convencional [101]. Estos aminoácidos junto con la tirosina son precursores de la síntesis de neurotransmisores y hormonas que pueden jugar un papel muy importante en el desarrollo del ternero durante las primeras semanas de vida. La fenilalanina es precursora de la tirosina y, como se ha comentado anteriormente, tirosina y triptófano son precursores respectivamente de catecolaminas y indolaminas. Concretamente, el **triptófano**

(Trp) es un aminoácido aromático esencial para rumiantes lactantes que tiene un papel crítico en el funcionamiento del sistema nervioso debido a su papel en la síntesis de indolaminas, en el sistema inmunitario y en la regulación del apetito y la respuesta al estrés [102].

El proceso de destete en la mayoría de las especies de mamíferos (porcinos, rumiantes) criados en condiciones intensivas es un evento estresante, que puede implicar una disminución en el rendimiento del crecimiento [103], un aumento de los estereotipos orales debido a la falta de succión del pezón [104], y puede suprimir las respuestas inmunes innatas [105]. Ofrecer altos niveles de nutrición a los terneros en una etapa temprana de la vida puede agravar esta situación si el destete no se realiza correctamente [106] o si se realiza demasiado temprano [107]. Se ha propuesto que la suplementación con Trp puede ayudar a los lechones a sobrellevar el estrés del destete y, por lo tanto, mejorar el rendimiento, reducir las concentraciones séricas de hormonas relacionadas con el estrés y modular su comportamiento [108].

El triptófano es el precursor de la 5-HT y de la melatonina. Como se ha comentado anteriormente, la 5-HT es un neurotransmisor que se ha relacionado fuertemente con los estados de ánimo y su déficit está asociado a ansiedad y depresión [109]. Se ha descrito que los niveles de 5-HT en el cerebro incrementan con la administración de Trp [110]. Una implicación biológica adicional de la 5-HT es la regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos en el sistema periférico que induce la liberación de insulina en respuesta a la glucosa y la adipogénesis en condiciones de alimentación [111]. Además, la 5-HT regula a su vez la secreción de IGF-I en el hígado, y se conoce que la señalización por IGF-I en el músculo tiene un papel esencial en la regulación de la masa muscular. El Trp suplementado en la dieta estimula la síntesis de proteína muscular e induce la expresión de genes de miogénesis [112], y aumenta la proliferación de células musculares lisas [113].

8. Estudios proteómicos

El proteoma se define como el conjunto de proteínas expresadas en un organismo, tejido, célula o fluido en un momento determinado y bajo unas condiciones específicas. Al contrario del genoma, que es común para todas las células de un organismo, el proteoma cambia según el momento o situación fisiológica o patológica del individuo. Debido a que las proteínas son las verdaderas protagonistas de la vida de la célula, el análisis del proteoma aporta una información funcional de gran relevancia imposible de obtener a través de otras técnicas *ómicas*.

Las técnicas proteómicas permiten una aproximación objetiva e independiente para confirmar o descartar hipótesis sobre el análisis de los cambios provocados por una determinada situación. Permiten la caracterización, la identificación y la cuantificación de proteínas, la caracterización de interacciones entre proteínas y la caracterización de las modificaciones postraduccionales.

En la última década ha tomado gran importancia la investigación de la expresión diferencial de proteínas en tejidos del SNC para el estudio de enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas [114], [115].

También se han podido determinar cambios de abundancia e identificar qué proteínas responden ante diversos tipos de estrés y así entender la respuesta celular frente a estas situaciones. Además, en el caso de animales de granja, donde el estrés que pueden sufrir durante la estabulación afecta directamente a la productividad y la calidad de la carne, la proteómica resulta de gran utilidad ya que puede dar información sobre los procesos biológicos involucrados en la respuesta frente estresores típicos en el sector ganadero como son la nutrición, el manejo, el transporte, estabulaciones de alta densidad o el sacrificio [5], [116]–[118].

Las técnicas utilizadas en proteómica se clasifican en dos grandes grupos:

- las **técnicas “gel-based”**, utilizan electroforesis bidimensional, selección de spots de proteínas expresadas de manera diferencial, digestión con tripsina e identificación de las proteínas presentes en los spots mediante *peptide mass fingerprinting* (PMF) y/o MS/MS. Tienen la gran ventaja de visualizar las proteínas enteras y son las más adecuadas cuando se persigue analizar patrones de isoformas, ya que permiten identificar modificaciones postraduccionales que hacen variar el pI o la masa molecular de las proteínas. Por otro lado, tienen la desventaja de tener escasa capacidad de análisis de las proteínas básicas o con masas moleculares muy altas. Además, las técnicas son laboriosas.
- las **técnicas “gel-free”**, se basan en la digestión directa de las proteínas de la muestra a péptidos, y la separación de estos péptidos mediante cromatografía líquida previa a su identificación mediante MS. Son muy utilizadas actualmente debido a los grandes avances en MS y al hecho de que las bases de datos son cada vez más completas. Permiten el análisis de todas las proteínas independientemente de sus características fisicoquímicas, son más sensibles, permiten detectar proteínas minoritarias y son más fácilmente automatizables. Sin embargo, al digerir las proteínas a péptidos se pierde información sobre modificaciones postraduccionales y la existencia de isoformas.

La espectrometría de masas (MS) es una herramienta imprescindible en el campo de la proteómica. Es una técnica analítica cualitativa y cuantitativa, por lo que permite identificar y cuantificar proteínas a partir de la relación masa-carga (m/z) y la abundancia de iones en una muestra con gran precisión.

Los tres componentes fundamentales de un espectrómetro de masas son la fuente de iones, el analizador y el detector [119], [120].

En primer lugar, las muestras de proteínas o péptidos introducidas son convertidas a iones en fase gaseosa por la fuente de ionización. Existen dos tipos

Introducción

de técnicas para volatilizar e ionizar las proteínas, que son la ionización por pulverización eléctrica (*electrospray ionization*, ESI) y la ionización por láser con ayuda de una matriz (*matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI).

En el analizador de masas los iones se separan de acuerdo con su relación m/z , ya que se manipulan mediante campos eléctricos o magnéticos para dirigirlos hacia el detector donde serán medidos y digitalizados en forma de espectro de masas. En proteómica se emplean tres tipos de analizadores de masa: de trampa iónica, de tiempo de vuelo (TOF) y de cuadrupolo. Se diferencian por su sensibilidad, resolución, exactitud de masa y posibilidad de fragmentar los iones peptídicos.

Uno de los objetivos más importantes de la proteómica es la cuantificación de la expresión diferencial de las proteínas entre condiciones experimentales, ya sea de manera relativa midiendo el cambio o *fold-change* (FC) entre condiciones, o de manera absoluta.

Entre las técnicas *gel-free* cuantitativas se encuentra el marcaje isobárico con isótopos estables, que permite la comparación de múltiples muestras en el mismo ensayo. Hay dos familias de marcadores isobáricos disponibles comercialmente: *Tandem Mass Tags* (TMT) e *Isobaric tag for relative and absolute quantitation* (iTRAQ) [121], [122].

El marcaje isobárico se logra mediante el uso de etiquetas que son idénticas en masa, de modo que todos los péptidos son isobáricos, cromatográficamente indistinguibles y producen un solo pico en el espectro de masas. Sin embargo, las abundancias relativas de los péptidos marcados isobáricamente se revelan cuando se fragmentan durante los experimentos de MS/MS para liberar iones informadores con diferentes masas [123].

Las etiquetas para el marcaje tienen tres partes (**Figura 16**): un grupo reactivo a los grupos amino de la proteína, una región informadora o etiqueta

(grupo *reporter*) que posee diferentes masas isotópicas, y una región normalizadora (grupo balanceador) que compensa la masa del grupo *reporter*. La región informadora de masas se separa de la región normalizadora de masas mediante un enlazador vulnerable a la fragmentación [122].

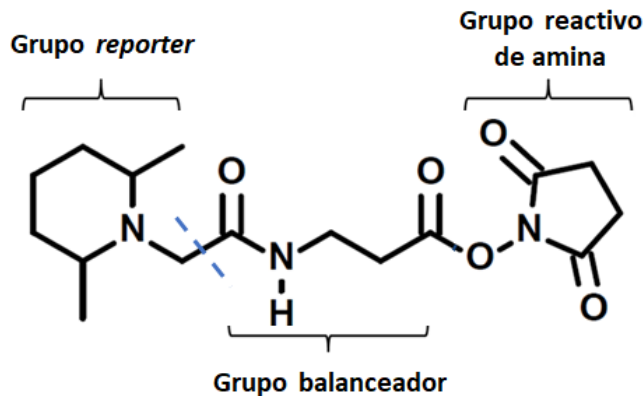


Figura 16. Estructura química genérica del reactivo TMT. Muestra los tres grupos funcionales: el grupo reactivo de amina que marca el extremo N-terminal y el grupo ϵ -amina de la lisina en los péptidos, el grupo balanceador de masas y el grupo *reporter* que proporciona la abundancia de un péptido en el MS/MS de muestras individuales que se mezclan. La línea azul indica un enlazador que permite la liberación del *reporter* del marcador en el MS / MS.

En consecuencia, la masa total de la etiqueta y del balanceador es la misma en todos los marcajes, pero los pesos individuales cambian cuando el grupo *reporter* se libera en el MS/MS, y puede correlacionarse con una muestra particular.

Distintas muestras se marcan con distintas etiquetas, se combinan y se analizan. El mismo péptido de diferentes muestras tendrá la misma masa, pero cuando se fragmenta por MS/MS, además de generarse los iones específicos que permiten la identificación del péptido, se liberan los iones *reporters*, de bajo peso molecular, que difieren uno o unos pocos Da entre ellos y permite identificar la procedencia de las muestras (el marcaje).

Introducción

Las intensidades de estos iones *reporters* reflejan las abundancias relativas del péptido en cada una de las muestras a comparar, por lo que la cuantificación relativa de una proteína es el resultado de combinar las abundancias relativas de los diferentes péptidos que la identifican.

Todos los reactivos TMT10-plex tienen la misma estructura química, pero presentan diferentes números y combinaciones de isótopos ^{13}C y ^{15}N en la región *reporter*, lo que hace que difieran entre ellos aproximadamente 6 mDa [122]. El esquema de la técnica del marcaje mediante TMT10-plex se representa en la **Figura 17**.

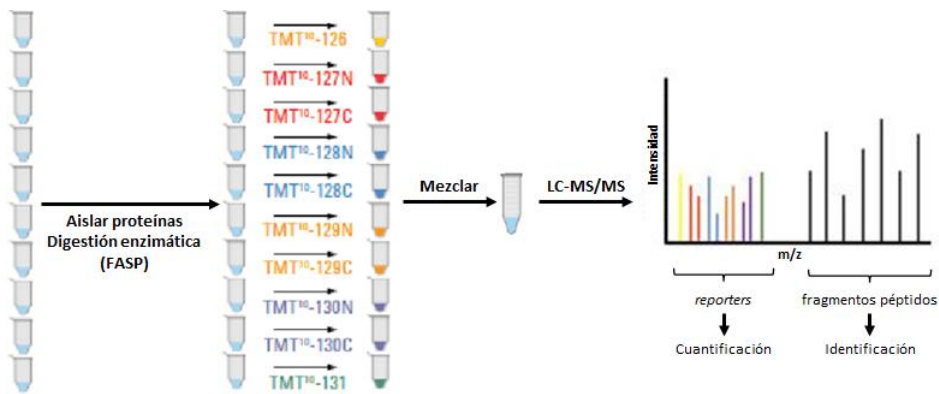


Figura 17. Esquema de la cuantificación relativa por TMT10-plex.



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Antecedentes

Desde hace unos años nuestro grupo se centró en la investigación del estrés y del bienestar en animales de granja, concretamente en bovino y porcino. Estudios previos del grupo se iniciaron con la determinación de marcadores de estrés como cortisol y proteínas de fase aguda (haptoglobina, Pig-MAP o proteína C-reactiva) en plasma. Seguidamente, se procedió a la búsqueda de nuevos marcadores plasmáticos de bienestar y estrés mediante técnicas proteómicas [5], [116]–[118], [124]–[126]. Más adelante, al tener el estrés un gran componente neurológico, se incorporó el estudio de los neurotransmisores del sistema nervioso central frente estas situaciones de estrés [127]–[129].

Al incorporarme al grupo se siguió con el estudio de las vías catecolaminérgicas y serotoninérgicas en otras situaciones, concretamente el efecto que pueden producir modificaciones en la dieta de una madre gestante a su descendencia. Para ello, se realizaron tres estudios en ganado porcino en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Antonio González-Bulnes del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), con quien ya se ha establecido una colaboración estable [5], [44], [129], [130].

En el primero se quería evaluar el efecto de la suplementación materna de la dieta con el antioxidante hidroxitirosol; el segundo pretendía ver el efecto producido por la restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) en el cerebro de fetos de 100 días de gestación; y por último analizar las modificaciones producidas por una dieta alta en grasas. Para la realización de estos estudios se combinaron la determinación de neurotransmisores con técnicas inmunohistoquímicas y proteómicas. El objetivo central era el estudio sobre el sistema nervioso central, aunque se incluyeron también en algunos casos determinaciones en plasma.

Antecedentes

Además, mi incorporación al grupo coincidió con un nuevo proyecto coordinado cuyo objetivo era identificar aminoácidos que pudieran ser limitantes para el crecimiento de los terneros, así como evaluar su funcionalidad para mejorar la eficiencia del crecimiento y el desarrollo de la masa muscular en el tiempo previo al destete. Este proyecto denominado AMINOCRET (AGL2015-68463-C2-2-P), tenía como título general “Estudio molecular de los efectos de la suplementación de aminoácidos en terneros amamantados mediante una aproximación bioquímica y proteómica”. Fue financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, y se trabajó de forma coordinada con la Dra. Marta Terré del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaria (IRTA).

Objetivos

El objetivo general ha sido estudiar los mecanismos bioquímicos y moleculares que subyacen determinados aspectos nutricionales, y analizar sus efectos fisiológicos y neuroquímicos en bovino y porcino. Para ello, se llevó a cabo la determinación de parámetros bioquímicos en suero y de aminoácidos plasmáticos, el análisis morfológico del hipocampo, el análisis del perfil de neurotransmisores cerebrales, y el uso de técnicas proteómicas.

Los objetivos específicos se dividieron por capítulos:

1. Estudio de los efectos de la suplementación materna de la dieta con el antioxidante hidroxitirosol durante la gestación en el cerebro de fetos de 100 días de gestación, y de cerdos de 1 mes y 6 meses de edad. En concreto:
 - Determinar cambios en el perfil de neurotransmisores en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala.
 - Determinar distintos marcadores de estrés oxidativo en la corteza prefrontal y el hipocampo.
 - Determinar la morfología del hipocampo mediante inmunohistoquímica con varios marcadores neuronales.
 - Determinar cambios en el proteoma del hipocampo.
 - Evaluar los cambios provocados por la suplementación materna con el antioxidante hidroxitirosol a las distintas edades y/o según el sexo de los animales.

2. Estudio de los efectos de la restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) en el cerebro de fetos de 100 días de gestación. En concreto:
 - Determinar cambios en el perfil de neurotransmisores en la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala.
 - Determinar distintos marcadores de estrés oxidativo en la corteza prefrontal y el hipocampo.
 - Determinar la morfología del hipocampo mediante inmunohistoquímica con varios marcadores neuronales.

Objetivos

- Evaluar si los cambios provocados por la restricción del crecimiento intrauterino se pueden ver influenciados por la suplementación materna de la dieta con el antioxidante hidroxitirosol.
 - Evaluar si los cambios provocados por la restricción del crecimiento intrauterino se pueden ver influenciados por el sexo de los animales.
3. Estudio de los efectos provocados por la restricción calórica materna y el tratamiento de los individuos con una dieta alta en grasas (HFD) sobre el metabolismo y el sistema nervioso central. En concreto:
- Determinación del perfil bioquímico, incluido marcadores de estrés oxidativo y el perfil de aminoácidos libres en plasma.
 - Determinar el perfil de neurotransmisores en el cuerpo estriado, el hipotálamo, la amígdala, la corteza prefrontal y el hipocampo.
 - Determinar la concentración de los neuropéptidos POMC y neuropéptido Y en el hipotálamo.
 - Determinar la morfología del hipocampo mediante inmunohistoquímica con varios marcadores neuronales.
 - Determinar cambios en el proteoma del hipocampo.
 - Evaluar los cambios provocados por la dieta HFD.
 - Evaluar si la respuesta frente una dieta HFD se puede ver alterada por el peso corporal al nacer, es decir, si se ve afectada por la IUGR.
 - Evaluar si la respuesta frente una dieta HFD se puede ver alterada por el sexo de los animales.
4. Estudio de los efectos de la suplementación de lacto reemplazantes con triptófano en terneros lactantes. En concreto:
- Determinación del perfil bioquímico, incluyendo marcadores de inflamación, marcadores de estrés oxidativo y el perfil de aminoácidos libres en plasma.
 - Evaluar si los cambios provocados por la suplementación con triptófano tienen alguna relación con los resultados de crecimiento y comportamiento de los terneros (peso y consumo de alimento).



MATERIAL Y MÉTODOS

Material

1. ELISAs comerciales

Se utilizaron ELISAs comerciales específicos para porcino o bovino para la determinación y cuantificación de: las hormonas insulina y cortisol en suero; los neuropéptidos NPY y POMC en homogenado de hipotálamo; los neurotransmisores acetilcolina, GABA y glutamato en homogenados de distintas áreas cerebrales; el metabolito quinurenina y la citoquina IFN- γ en plasma (**Tabla 1**), siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes. Las lecturas de las absorbancias se realizaron con el lector iEMS Reader MF (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), y el software Ascent versión 2.6 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Tabla 1. Parámetros determinados mediante ELISAs, y los kits comerciales utilizados para su cuantificación.

Antígeno	Kit Comercial
Acetilcolina	<i>Acetylcholine ELISA</i> (Elabscience, TX, USA) Ref. E-EL-0081
Cortisol Suero Bovino	<i>Salivary Cortisol ELISA</i> (DRG Diagnostics, Marburg, Germany) Ref. SLV-2930
Cortisol Suero Porcino	<i>Cortisol ELISA</i> (DRG Diagnostics, Marburg, Germany) Ref. EIA-1887
GABA	<i>GABA ELISA</i> (Immumol, Bordeaux, France) Ref. BA E-2500
Glutamato	<i>Glutamate ELISA</i> (Immumol, Bordeaux, France) Ref. BA E-2400
INF-γ	<i>Bovine Interferon-γ Specific ELISA</i> (Bio-Rad, Sweden) Ref. MCA5638KZZ
Insulina	<i>Insulin ELISA</i> (DRG Diagnostics, Marburg, Germany) Ref. 10-1200-01
Neuropéptido Y (NPY)	<i>EIA porcine Anti-NPY</i> (Phoenix Pharmaceuticals, CA, USA) Ref. EK-049-07
Proopiomelanocortina (POMC)	<i>ELISA porcine Anti-POMC</i> (Neobiolab, MA, USA) Ref. PP0140
Quinurenina	<i>L-kynurenine ELISA</i> (Immumol, Bordeaux, France) Ref. BA E-2200

2. Determinación de parámetros bioquímicos

Para el análisis de los distintos parámetros bioquímicos se usó el analizador automático AU400 (Beckman Coulter, Hamburg, Alemania), siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante de los kits comerciales (**Tabla 2**).

Tabla 2. Parámetros bioquímicos determinados, y los kits comerciales usados para su cuantificación mediante el analizador automático AU400.

Parámetro	Nombre Comercial
Ácidos Grasos Libres (NEFA)	NEFA HR (FUJIFILM Wako Chemicals, Germany)
Alanina Aminotransferasa (ALT)	ALT (OSR, Beckman Coulter, Germany)
Aspartato Aminotransferasa (AST)	AST (OSR, Beckman Coulter, Germany)
Colesterol total	Cholesterol (OSR, Beckman Coulter, Germany)
Creatinina	Creatinine (OSR, Beckman Coulter, Germany)
Creatina Quinasa (CK)	Creatine kinase (OSR, Beckman Coulter, Germany)
Fructosamina	Fructosamine COBAS (ROCHE Diagnostics, Germany)
Gamma Glutamyltransferasa (GGT)	GGT (OSR, Beckman Coulter, Germany)
Glutación peroxidasa (GPx)	GPx Ransel (Randox, Crumlin, UK)
Glucosa	Glucose (OSR, Beckman Coulter, Germany)
Haptoglobina	Haptoglobin Colorimetric Assay PHASE RANGE (Tridelta Development Limited, Maynooth, Ireland)
HDL-C	HDL-cholesterol (OSR, Beckman Coulter, Germany)
D-3-hidroxi butirato	RANBUT D-3-Hydroxybutyrate (Randox, Crumlin, UK)
LDL-C	LDL-cholesterol (OSR, Beckman Coulter, Germany)
Pig-MAP	TURBOVET pig-MAP (Acuvet biotech, Zaragoza, Spain)
Proteína C-reactiva	C-reactive protein (OSR, Beckman Coulter, Germany)
Proteínas totales	Total protein (OSR, Beckman Coulter, Germany)
Superóxido dismutasa (SOD)	RanSOD (Randox, Crumlin, UK)
Total Antioxidant Status (TAS)	TAS (Randox, Crumlin, UK)
Triglicéridos	Triglycerides (OSR, Beckman Coulter, Germany)
Urea	Urea (OSR, Beckman Coulter, Germany)

OSR, Olympus System Reagent

3. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios (**Tabla 3**) y secundarios (**Tabla 4**) usados para los ensayos de inmunohistoquímica se diluyeron en suero normal de cabra (*normal goat serum* (NGS); Sigma, St. Louis, MO, USA) al 2 % (v/v) en una solución de Tritón X-100 al 0,25% en tampón fosfato (PB-Tritón), a sus diluciones correspondientes, y se enumeran a continuación.

Tabla 3. Listado de anticuerpos primarios y sus respectivas diluciones.

Marcador	Anticuerpo	Dilución	Fuente
Doblecortina (DCX)	<i>Rabbit anti-doblecortin, polyclonal</i>	1:750	Abcam (Cambridge, Massachusetts, USA) Ref. ab18723
Neurofilamentos (NFT)	<i>Mouse anti-neurofilament 200, monoclonal. Clone N52</i>	1:10000	Sigma (St. Louis, MO, USA) Ref. N0142
Núcleos Neuronales (NeuN)	<i>Mouse anti-neuronal nuclei, monoclonal. Clone A60</i>	1:1000	Merck Millipore (Chemicon, Billerica, Massachusetts, USA) Ref. MAB377

Tabla 4. Listado de anticuerpos secundarios.

Anticuerpo	Fuente
<i>Polyclonal Goat anti-mouse immunoglobulins/biotinylated</i>	Agilent Technologies (Dako, Glostrup, Denmark) Ref. E 0433
<i>Polyclonal Goat anti-rabbit immunoglobulins/biotinylated</i>	Agilent Technologies (Dako, Glostrup, Denmark) Ref. E 0432

Métodos

En este apartado se detallan las metodologías comunes empleadas en los distintos estudios realizados. Las características únicas de cada estudio como el diseño experimental o el análisis estadístico se explican en el apartado de resultados correspondiente.

4. Obtención y procesamiento de las muestras

4.1. Sangre, suero y plasma

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena cava anterior, con cuidado para evitar la hemólisis, o aprovechando la incisión del desangrado en el caso del sacrificio, usando tubos Vacutainer de 10 mL sin anticoagulante (Eurotubo™, Deltalab, Rubí, Spain). En ambos casos, la sangre se dejó coagular 30 min a temperatura ambiente (RT) y luego se centrifugó a 2000 x g durante 10 min para obtener el suero.

Para la obtención de muestras de plasma se aplicó el mismo procedimiento sólo que usando tubos Vacutainer con anticoagulante EDTA o Heparina, y agitando suavemente el tubo, una vez obtenida la sangre, antes de centrifugar.

El sobrenadante, tanto de suero como de plasma, se alicuotó para ser congelado y almacenado a -80°C hasta su análisis.

4.2. Áreas cerebrales

Inmediatamente después del sacrificio, transcurrido un tiempo máximo de 5 min, se abrió el cráneo y se extrajo el cerebro entero de su interior. Dependiendo del estudio se diseccionaron distintas áreas cerebrales, pero el orden de las disecciones siempre era el mismo. Primero se diseccionaron el hipotálamo y la corteza prefrontal; a continuación, el hipocampo y la amígdala

de un hemisferio, seguido del hipocampo y de la amígdala del otro hemisferio; y por último los cuerpos estriados.

Las áreas de interés se diseccionaron tan rápido como era posible, se congelaron inmediatamente, excepto un hipocampo, en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Todo este proceso duró como máximo entre 2 y 3 minutos.

El hipocampo restante se fijó en formol al 4 % en tampón fosfato salino (PBS, Amresco, Solon, Ohio, USA) durante 24 horas a 4°C . A continuación, se puso en sacarosa al 30 % en PBS a 4°C para conservarlo. Se dejó en esta solución hasta que descendió hasta el fondo del tubo, indicando así que su densidad era igual a la sacarosa, y por lo tanto el tejido estaba impregnado de sacarosa y crioprotegido.

5. Preparación de homogenados de tejido cerebral

Los homogenados fueron preparados de tal forma que no hubiera ninguna incompatibilidad entre los diferentes ensayos realizados. Para ello, las muestras de áreas cerebrales congeladas se pesaron individualmente antes de que se descongelaran y se homogeneizaron mediante sonicación (*Branson Digital Sonifier 250*; Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA) en un **Tampón de Lisis** (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% NP-40 (v/v) pH 7,5) en una relación de 0,3 mg de tejido/1 μ L Tampón de Lisis (esta relación se modificó en función de la cantidad de tejido disponible, ya sea aumentándola o disminuyéndola, y se tuvo en cuenta en la correspondiente cuantificación final). Además, al tampón de lisis se añadieron inhibidores de proteasas (*proteases inhibitor cocktail*; Sigma, St. Louis, MO, USA), y para la determinación de neurotransmisores, se añadió 3,4-dihidrobencilamina bromohidrato (DHBA) a una concentración de 100 μ g/ μ L a modo de estándar interno para permitir la comparación entre muestras y poder determinar el factor de degradación producido por la sonicación del tejido.

Las muestras se sonicaron al 30% de amplitud durante 10 s, en intervalos de 1 s, manteniéndolas en todo momento en hielo. Finalmente, los homogenados de los tejidos cerebrales se alicuotaron y se congelaron a -80°C hasta su análisis.

6. Determinaciones por HPLC

6.1. Sistema HPLC

Se usó para dos tipos de compuestos distintos, la determinación de neurotransmisores por un lado y la de aminoácidos por el otro. El sistema de HPLC era el mismo en ambas técnicas *Elite LaChrom* (Merck-Hitachi; Prague, The Czech Republic), con una bomba *Hitachi L-2130* (Hitachi, Japan) y un inyector automático *Autosampler Hitachi L-2200* (Hitachi, Japan) con refrigeración a 10°C. Para la detección de neurotransmisores se acopló al HPLC un detector electroquímico (*ESA Coulochem II 5200*; Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) y un horno para la columna *Column Oven Hitachi L-2300* (Hitachi, Japan), mientras que para detectar aminoácidos se acopló un detector de espectroscopia Ultravioleta-Visible *Hitachi L-2420* (Hitachi, Japan) y un horno para la columna *Column thermostat Jetstream II Plus* (Konik Group, Barcelona, Spain) (Figura 18).

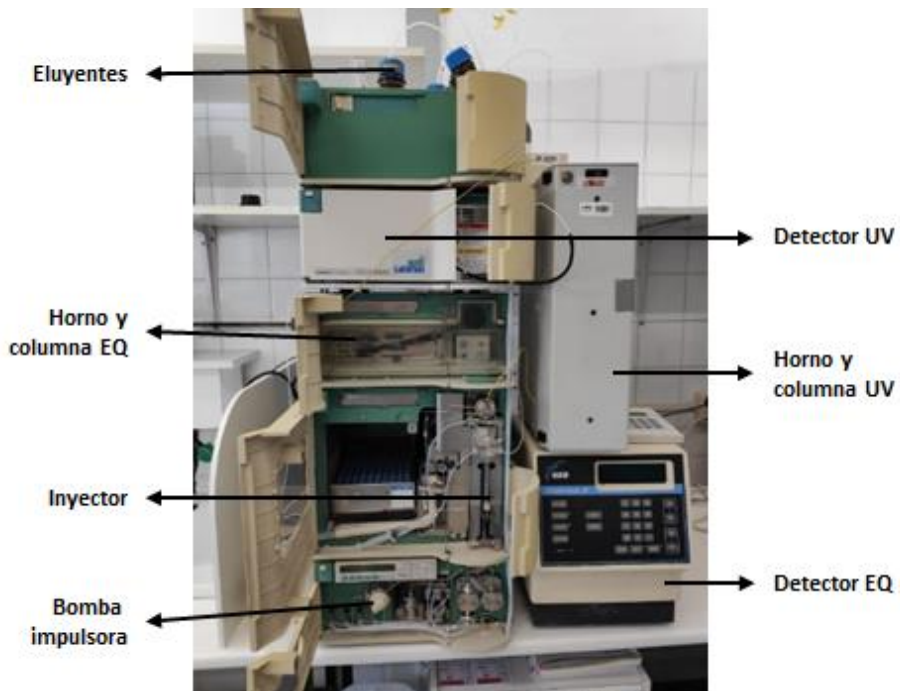


Figura 18. Partes básicas del sistema HPLC utilizado. EQ, electroquímico; UV, ultravioleta.

6.2. Determinación de neurotransmisores en extractos cerebrales

6.2.1. Procesado de los homogenados cerebrales para HPLC

Una de las alícuotas de homogenado cerebral se reservó para la determinación de neurotransmisores. Antes de inyectar las muestras al HPLC los lisados de los tejidos cerebrales fueron desproteinizados con **Solución de HPLC** (0,25 M HClO₄, 0,1 mM Na₂S₂O₅, 0,3 mM EDTA) en una relación 2:1 (v:v) respectivamente. Justo después se mezclaron intensamente usando un vórtex y se mantuvieron en hielo.

Previo a la inyección, las muestras desproteinizadas se centrifugaron a 16000 x g durante 10 min a 4°C. Finalmente, se inyectaron 20 µL de los sobrenadantes al HPLC para la determinación de catecolaminas (NA y DA) e indolaminas (5-HT) y sus metabolitos (DOPAC, HVA y 3-MT; y 5-HIAA, respectivamente).

6.2.2. Separación y cuantificación de neurotransmisores

Se siguió el método de Sabriá et al. (2003) [131] con modificaciones descritas por Arroyo et al. (2016) [128].

Para separar las distintas catecolaminas (NA y DA) e indolaminas (5-HT) y sus metabolitos (L-DOPA, HVA, DOPAC y 5-HIAA) (**Figura 19**) se utilizó el sistema de HPLC equipado con una columna *Cromolith Rp-18e* 100 x 4,6 mm (Merck-KgaA, Darmstadt, Germany) y un sistema de detección electroquímica. La **Fase Móvil** utilizada (0,5 M ácido cítrico, 0,05 mM EDTA, 1,2 mM SOS, 1% Acetonitrilo) se ajustó con trietilamina (TEA) a pH 2,8. El método usado consistió en aplicar la Fase Móvil isocráticamente, a un flujo del equipo en 1,2 mL/min, y con un voltaje de la celda de detección electroquímica a 400 mV.

Finalmente, para determinar las concentraciones de las monoaminas y sus metabolitos se inyectaron estándares de cada neurotransmisor a concentraciones que iban desde 9,375 a 600 pg/µL. De ese modo se pudo

representar una recta patrón donde los ejes eran el área del pico en el cromatograma y la concentración de cada neurotransmisor. Usando las ecuaciones de las rectas, asegurándose de que los coeficientes de regresión lineal (R^2) fueran $\geq 0,990$, se obtuvo la concentración de los neurotransmisores en función del área del pico presentes en las muestras.

La validación del método mostró una precisión inter-intradía $\leq 4\%$ y un límite de detección entre 2,14 y 4,97 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para los distintos neurotransmisores [128].

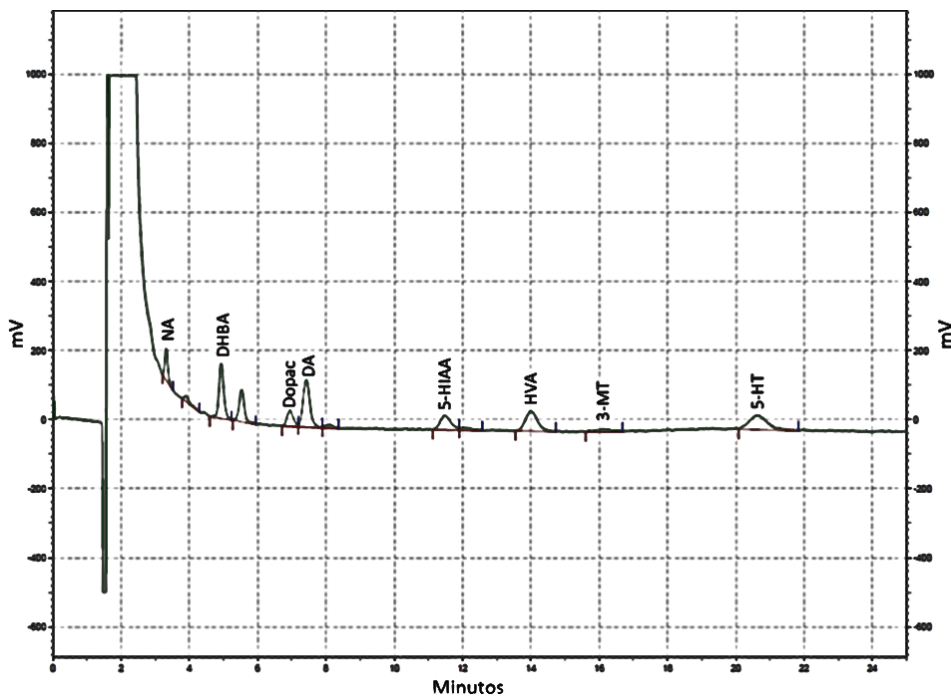


Figura 19. Cromatograma de la separación de neurotransmisores en una muestra de amígdala de un feto porcino. En el eje horizontal hay representado el tiempo de retención (en minutos), y en el eje vertical la señal obtenida de cada neurotransmisor en la muestra por el detector electroquímico (en mV).

6.3. Determinación de aminoácidos libres en plasma

6.3.1. Preparación de las muestras

Las muestras de plasma necesitan una preparación previa para poder ser analizadas mediante HPLC. En primer lugar, tal y como sucede con el homogenado de tejido cerebral, es necesario realizar una desproteización de la muestra. Para ello se partieron de 100 μ L de plasma a los que se añadieron 10 μ L de 100 mM DTT (concentración final 9 mM) para reducir los posibles enlaces disulfuro, y 5,79 μ L de 2,5 mM GABA (concentración final 125 μ M) a modo de estándar interno. Se vortearon y se les añadió un volumen de ácido sulfosalicílico al 10 % (p/v) para precipitar las proteínas plasmáticas. Rápidamente se volvió a vortear y se centrifugaron a 14000 x g durante 10 min a 4°C. Para terminar, se preservó el sobrenadante para la posterior derivatización de los aminoácidos libres.

6.3.2. Reacción de derivatización de los aminoácidos

En segundo lugar, para poder detectar los distintos aminoácidos libres mediante espectroscopia ultravioleta es necesaria una reacción previa de derivatización en la que al aminoácido se le une covalentemente una molécula que presenta absorbancia a longitudes de onda ultravioleta (UV).

La reacción de derivatización (**Figura 20**) se realizó a una temperatura de 55°C y en un medio básico (pH 8-9). El agente AQC (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato) reacciona de 2 formas. La primera consiste en la reacción del agente derivatizante con una amina primaria o secundaria, mediante un ataque nucleofílico por parte del grupo α -amino del aminoácido con el grupo carbonilo del AQC. Esta reacción rápida produce aminoácidos derivatizados (unidos a AMQ (6-aminoquinolina)) de gran estabilidad que emiten fluorescencia y absorben a longitudes de onda del UV (254 nm). De esta reacción también se forma N-hidroxisuccinimida (NHS) que no interfiere en el análisis.

La segunda reacción consiste en la hidrólisis lenta del agente derivatizante, AQC, que se encuentra en exceso, y se forman 3 productos: AMQ, NHS y CO₂.

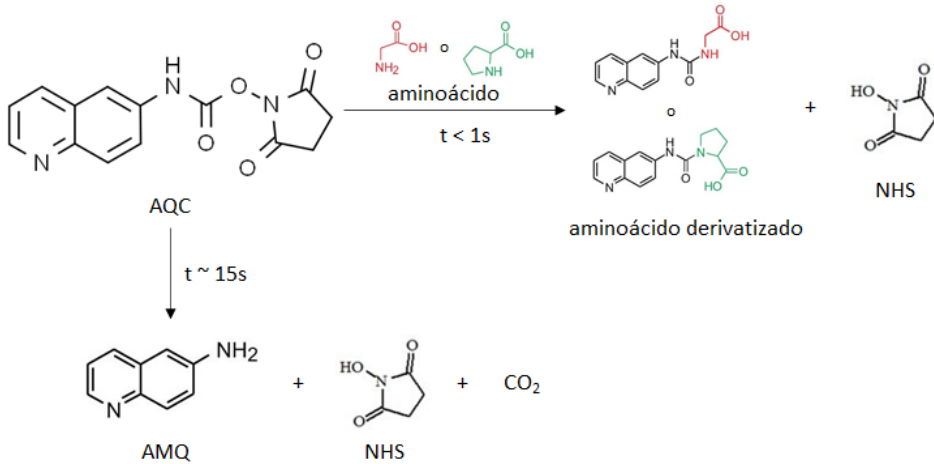


Figura 20. Esquema de la reacción de derivatización de los aminoácidos. AQC, 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato; NHS, N-hidroxisuccinimida; AMQ, 6-aminoquinolona.

Para realizar la reacción de derivatización se utilizó el *kit AccQ-Fluor Reagent* (Waters, MA, USA) siguiendo sus instrucciones. Primero, se resuspendió el reactivo de derivatización liofilizado con 1 mL de acetonitrilo (ACN) a 55°C durante 10 min. Seguidamente, en un tubo de 1,5 mL se mezclaron 70 µL del tampón borato suministrado en el kit con 10 µL de muestra o estándar para así tamponar a pH 8,8. Finalmente, se añadieron 20 µL del reactivo AccQ-Fluor resuspendido para producir la derivatización de los aminoácidos. Se vortexó el conjunto y se incubó a 55°C durante 10 min. Pasado ese tiempo, se mantuvieron las muestras o estándares a 4°C (no más de dos semanas) hasta su análisis en el HPLC.

6.3.3. Separación y cuantificación de aminoácidos

Se puso a punto la técnica de separación y cuantificación de aminoácidos partiendo del protocolo descrito en Castellanos et al. [132] con modificaciones posteriores.

Para separar los distintos aminoácidos Asp, Asn/Ser, Glu, Gly, Gln, His, Arg, Cit, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Orn, Lys, Cys, Ile, Leu, Phe y Trp, además del GABA como estándar interno, se utilizó el sistema de HPLC equipado con una columna de fase reversa (*Pico-Tag* 300 x 3,9 mm; Waters, MA, USA) y un sistema de UV-Visible a una longitud de onda de 254 nm (**Figura 21**). El flujo del equipo fue 1 mL/min, y a una temperatura para la columna de 37°C.

A diferencia de la separación de neurotransmisores, para la separación de los aminoácidos fueron necesarias dos fases móviles: una fase polar para la retención de los aminoácidos en la columna y otra fase apolar para poder eluirlos, además de crear un gradiente (**Tabla 5**) entre ambas fases para una elución óptima. La primera fase móvil consistió en una fase móvil no comercial de 140 mM de acetato de sodio trihidratado, 12 mM TEA, 1 mg/L EDTA, y corrigiendo el pH con ácido ortofosfórico (85 %) hasta 5,03. La otra fase móvil (el eluyente) consistió en una solución de 60 % de ACN en H₂OMQ (v/v).

Tabla 5. Gradiente entre las dos fases móviles para la separación cromatográfica de los aminoácidos.

Tiempo Inicial (min)	Tiempo Final (min)	Fase Móvil (%)	ACN 60 % (%)
0	0,5	100	0
0,5	16	98	2
16	30	94	6
30	40	92	8
40	48	68	32
48	50	30	70
50	66	0	100
66	81	100	0

Finalmente, para determinar las concentraciones de los aminoácidos se inyectaron estándares de cada uno de ellos a concentraciones que iban desde 7,8125 a 500 μM . De ese modo se representó una recta patrón donde los ejes eran el área del pico en el cromatograma y la concentración de cada neurotransmisor. Usando las ecuaciones de las rectas, asegurándose de que los coeficientes de regresión lineal (R^2) fueran $\geq 0,990$, se obtuvo la concentración de los aminoácidos en función del área del pico presentes en las muestras.

La validación del método mostró una precisión inter-intradía menor del 5 %. Los límites de detección estaban en un rango entre 0,091 y 7,076 μM para los distintos aminoácidos [133].

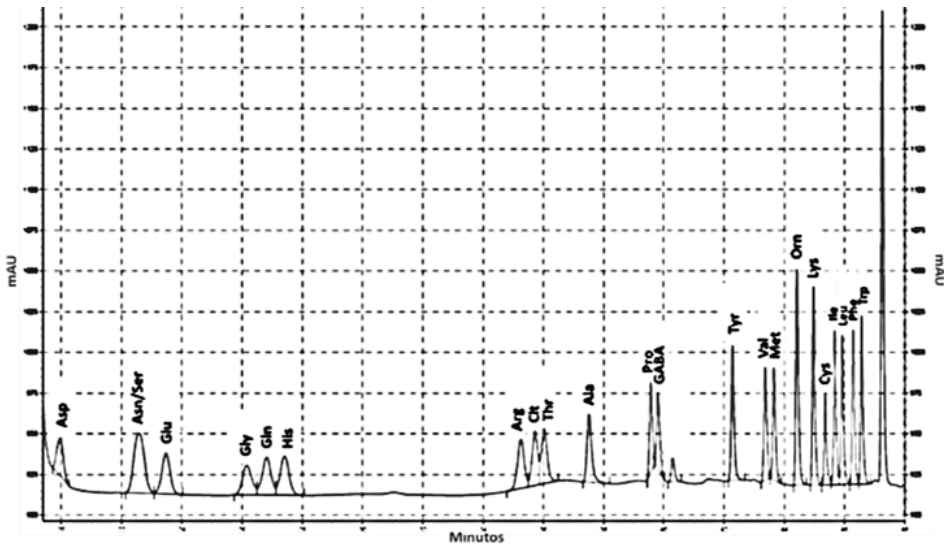


Figura 21. Cromatograma de la separación de aminoácidos en una muestra de plasma bovino. En el eje horizontal hay representado el tiempo de retención (en minutos), y en el eje vertical la señal obtenida de cada aminoácido en la muestra por el detector ultravioleta (en mAU).

7. Ensayo de peroxidación lipídica

El malondialdehído (MDA) es un producto natural procedente de la peroxidación lipídica, mecanismo de daño celular tanto en plantas como en animales, y se utiliza como indicador de estrés oxidativo en células y tejidos [134], [135].

Para medir los niveles de MDA se siguió el método descrito por Yagi (1966) con algunas modificaciones [134], [136], que se basa en la reactividad que tiene con el ácido tiobarbitúrico (TBA). Las muestras procedentes del **apartado 4.1 y 5** fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 5 % en la muestra, así las fracciones de lipoproteínas se precipitaron de la muestra y se eliminaron sustancias solubles que podían interferir, haciendo el ensayo específico para la peroxidación de lípidos.

A continuación, las muestras se centrifugaron a 1600 x g durante 10 min a RT, y el sobrenadante se añadió a un volumen igual de una solución del 0,9 % de TBA en 5 % de TCA. Se mantuvieron durante 1 hora a 100°C, se dejaron enfriar 10 min en hielo, y se centrifugaron a 1600 x g durante 10 min a 4°C.

Finalmente, la reacción de MDA y TBA a una temperatura alta y en condiciones ácidas forma un aducto MDA-TBA (**Figura 22**), que permite determinar la presencia de MDA en el sobrenadante leyendo su absorbancia a 530 nm, mediante el lector iEMS Reader MF (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), y el software Ascent versión 2.6 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

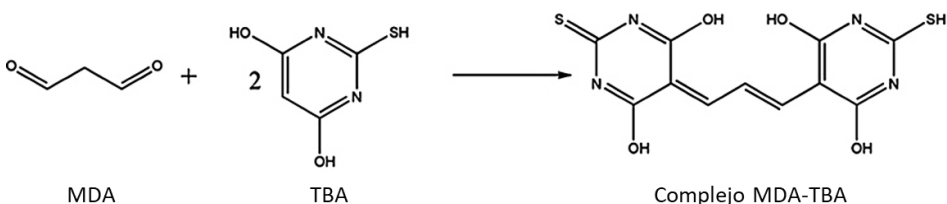


Figura 22. Esquema de la reacción para evaluar la peroxidación lipídica. MDA, malondialdehído; TBA, ácido tiobarbitúrico.

Para determinar la concentración de MDA se usaron estándares a concentraciones que iban desde 0,0625 a 50 μM . De ese modo se pudo representar una recta patrón donde los ejes eran la absorbancia obtenida y la concentración. Usando la ecuación de la recta patrón, asegurándose de que el coeficiente de regresión lineal (R^2) fuera $\geq 0,990$, se obtuvo la concentración de MDA, y en el caso de los homogenados cerebrales los resultados se expresaron en pmoles de MDA por cada g de tejido.

8. Análisis inmunohistoquímico del hipocampo

8.1. Congelación y corte de las muestras

Las muestras de hipocampo de los animales seleccionados se congelaron en un medio de O.C.T (Aname, Madrid, Spain) usando moldes, un baño de isopentano (Sigma, St. Louis, MO, USA) y hielo seco, controlando la temperatura de congelación entre -40°C y -60°C durante 2 min.

Los bloques de O.C.T. se cortaron en secciones seriadas de $40\ \mu\text{m}$ de grosor con criostato (*SME Cryotome Thermo Electron Corporation*; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) en el Servicio de Histología del Instituto de Neurociencias (INc; UAB, Spain). Los cortes se hicieron con una orientación longitudinal, recogiénolos en flotación en placas de 12 pocillos con una **solución antifreeze pH 7,4** (40% etilenglicol, 30% glicerol, 30% tampón fosfato 0,1 M pH 7,4).

8.2. Inmunohistoquímica

Para realizar las tinciones de inmunohistoquímica (IHQ) se seleccionaron un mínimo de 6 secciones de cada individuo. Todo el procedimiento se realizó a RT, a excepción de la incubación con el anticuerpo primario. Primero de todo se lavaron los cortes 3 veces, durante 5 min y en agitación suave, usando una solución de tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 (PB). A continuación, se realizó una post-fijación de las secciones con formaldehído al 2% en PB.

Seguidamente, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena del tejido con H_2O_2 al 1% en PB, en agitación suave durante 15 minutos y a oscuras. A continuación, se volvieron a lavar los cortes con una solución de Tritón X-100 al 0,25% en tampón fosfato (PB-Tritón), y se bloquearon los posibles antígenos inespecíficos presentes en el tejido mediante la incubación con suero normal de cabra al 2% en solución de PB-Tritón (NGS) durante 90 min a RT y en agitación suave.

Los cortes de las muestras se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios en su dilución óptima con NGS, como se muestra en la **Tabla 3 del apartado 3**, durante toda la noche a 4°C. A modo de controles negativos se incubaron secciones con NGS únicamente, sin el anticuerpo primario.

Después de la incubación con el anticuerpo primario, los cortes se lavaron 3 veces con PB-Tritón durante 5 minutos, y se incubaron con el anticuerpo secundario biotilado correspondiente a una dilución 1:500 durante 90 min a RT y en agitación suave. Los anticuerpos secundarios usados en este estudio se resumen en la **Tabla 4 del apartado 3**.

Seguidamente, las secciones se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (*Standard ABC Peroxidase Staining Kit*; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) en agitación suave durante 1 hora a RT, se lavaron tres veces con PB durante 5 min, y se reveló la actividad enzimática de la peroxidasa presente en los cortes mediante el sistema DAB (*DAB Liquid Substrate System*; Sigma, St. Louis, MO, USA) con 3,3'-diaminobencidina como sustrato.

Una vez reveladas las secciones fueron trasladadas a los portaobjetos adherentes SuperFrost® Plus (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), se hidrataron durante 10 minutos y se aplicó un contraste con tinción de Hematoxilina Mayer (Merck, Darmstadt, Germany) durante 40 segundos.

Para terminar, las secciones se deshidrataron a través de una batería de concentraciones crecientes de alcoholes y xileno (**Tabla 6**), y se montaron con el medio de montaje DPX (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Tabla 6. Serie de soluciones de alcohol y de xileno, con los respectivos tiempos y repeticiones.

Compuesto	Concentración	Tiempo (min)	Repeticiones
Etanol	50 %	3	2
	70 %	3	2
	96 %	3	3
	100 %	5	2
Xileno		10	3

8.3. Procesamiento y análisis de imagen

Los portaobjetos se escanearon digitalmente con el Nanozómero 2.0HT (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) en el Servicio de Histopatología del Instituto de Investigación en Biomedicina (IRB, Barcelona, Spain). Las imágenes escaneadas se visualizaron y analizaron mediante el *software* NDP.view 2 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). De cada individuo se obtuvieron mínimo 6 imágenes para el posterior análisis estadístico.

La inmunotinción de NeuN se analizó utilizando el software gratuito ImageJ 1.52p del sitio web del National Institute of Health (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>). El procedimiento realizado para analizar las imágenes fue: convertir la imagen escaneada a escala de grises (8 bits); establecer la escala de medición; umbral de la imagen usando "*Make binary*"; y finalmente analizar partículas. Se calculó el área de tejido total, el área de neuronas y el porcentaje de área ocupado por las neuronas. Para obtener el nivel de la señal DAB específica en todo el tejido de la fotografía, se calculó el área real de las neuronas restando las áreas en blanco que no contienen tejido (por ejemplo, luz de vasos, artefactos). Además, se excluyó el área positiva para DAB fuera del área de la neurona. Los grupos de neuronas individuales se numeraron para obtener información con respecto a una neurona en particular (tamaño, circularidad, área, etc.) a partir de los resultados tabulados.

9. Proteómica del hipocampo mediante TMT10-plex

Se realizaron dos experimentos proteómicos en dos centros de investigación distintos, por lo que, aunque el fundamento de la técnica es el mismo (**Figura 23**), el procedimiento específico realizado difiere entre ambos.

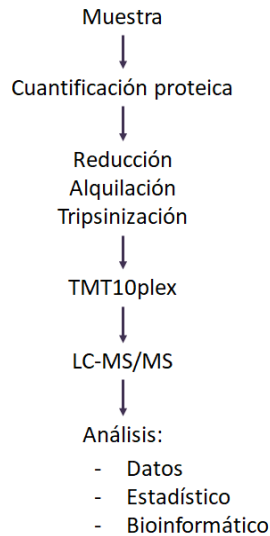


Figura 23. Esquema general del protocolo de proteómica.

9.1. Análisis del proteoma de hipocampo mediante TMT10-plex, RP-HPLC y LC-MS/MS

Este procedimiento es el que se usó para obtener los **resultados proteómicos del Estudio 1 del Capítulo 1**. Se realizó en el Laboratorio de Proteómica del CSIC/UAB, ubicado en la Facultad de Medicina de la UAB.

9.1.1. Cuantificación de proteína por el método BCA

Este método combina la reacción de reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} que se produce en un medio alcalino en presencia de proteínas con un método colorimétrico de detección del Cu^{+1} por ácido bicinónico.

Las muestras del homogenado de hipocampo se descongelaron previamente en hielo y se centrifugaron durante 30 min a 12000 g a 4°C. Los

sobrenadantes se transfirieron a tubos *Protein LoBind* (Eppendorf, Hamburg, Germany, ref. 022431081), donde se centrifugaron durante 1 min a 14100 g. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos *Protein LoBind*.

Para determinar la concentración de proteína se usó el *kit Micro BCA™ Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Los sobrenadantes de homogeneizado se diluyeron a 1/2000, y la concentración de proteína de las muestras se determinó por interpolación de los valores de absorbancia de las muestras a 562 nm mediante una recta patrón de BSA de rango 0-20 µg/mL. Para la lectura de los resultados se utilizó el lector de microplacas iEMS Reader MF (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) con *software Ascent* (versión 2.6, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Se obtuvo un rango de concentración de proteína de 17 a 27 µg/µL, con un coeficiente de variación (CV) entre las réplicas de la muestra inferior al 5%.

9.1.2. Reducción, alquilación y tripsinización

A las muestras se les añadió 1 M DTT, de manera que la concentración final de DTT en la muestra fuera 0,1 M. Las muestras se calentaron en el *Thermomixer* a 95°C durante 5 min con 600 rpm de agitación. Se centrifugaron durante 15 s y se dejaron atemperar mínimo 15 min.

Las muestras se diluyeron con **Tampón UA** (8 M Urea, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5), de manera que la concentración final de SDS en muestra fuera $\leq 0,1 \%$ para que fuera compatible con el proceso.

Se digirieron 60 µg de proteína de cada muestra con tripsina siguiendo el protocolo FASP [137]. Para ello, las muestras se cargaron en filtros Amicon Ultra-0.5 mL 1kDa previamente acondicionados. Se les añadió tampón UA y 0,05 M IAA, y se incubaron durante 20 min a RT en un agitador orbital en la oscuridad. El exceso de IAA fue contrarrestado incubando con tampón UA durante 15 min.

A continuación, se hicieron lavados con 20 mM TEAB para reducir la concentración de urea y permitir finalmente la tripsinización.

Para la digestión se tuvo en cuenta una relación 3:100 de tripsina respecto la cantidad de proteína a digerir, y se incubó durante 18 horas a 37°C.

El control del rendimiento de la digestión se llevó a cabo colocando 0,5 µL de los péptidos eluidos de cada muestra con matrices Thermo Scientific CHCA MALDI (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) mediante el método de gotas secas y se analizaron en un rango de 800 a 4000 m/z en un espectrómetro de masas 4800 AB-Sciex MALDI-TOF/TOF.

Los péptidos se evaporaron en *speed-vac* antes de ser marcados para el análisis cuantitativo de espectrometría de masas.

9.1.3. Marcaje con TMT10-plex de los péptidos

Las muestras de péptidos trípticos evaporados se reconstituyeron con 100 µL de 20 mM TEAB durante 10 min a 700 rpm a 20°C.

Los reactivos de marcaje isobáricos TMT10-plex (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, ref. 15285743) se reconstituyeron con 41 µL de ACN siguiendo las instrucciones del fabricante, y el marcaje de las muestras se realizó durante 1 hora a RT en dos experimentos aleatorios (Experimento 1 y 2; la distribución de las muestras elegidas se especifica en la **Figura 25** y en la **Tabla 13**).

Cada reacción de marcaje individual se inactivó con hidroxilamina al 5% durante 15 minutos antes de que se mezclaran en un solo tubo TMT10-plex. Las dos mezclas de péptidos marcados se limpiaron mediante extracción en fase sólida (SPE) con *Bond Elut SPEC C18 cartridge* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, ref. A5320320) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las 2 mezclas de péptidos marcados y limpios se evaporaron en el sistema *speed-vac* y se congelaron.

9.1.4. Cromatografía líquida de pH alto - fase reversa

Cada mix de 10-plex (correspondiente a ~600 µg de proteína inicial) se reconstituyó con 300 µL de 5 mM formiato de amonio, pH 10, 2% ACN, para crear una solución de 2 µg/µL.

Se fraccionaron 200 µL de cada mix (~400 µg) en un HPLC 1100 UV-Visible (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), con una columna *XBridge Peptide BEH C18*, 130Å, 5 µm, 2,1 mm x 100 mm (Waters, MA, USA, ref. 186003575).

Para separar los péptidos marcados se utilizó un flujo de 200 µL/min durante un tiempo de ejecución total de 76 min, y se realizó el gradiente cromatográfico indicado en la **Tabla 7**, utilizando el solvente A (5 mM formiato de amonio, pH 10, 2% ACN) y el solvente B (5 mM formiato de amonio, pH 10, 90% ACN).

Tabla 7. Gradiente cromatográfico entre los dos solventes para la separación de los péptidos en el RP-HPLC.

Tiempo Inicial (min)	Tiempo Final (min)	% A	% B
0	5	97	3
5	7	94	6
7	45	92	8
45	49	73	27
49	53	69	31
53	60	61	39
60	66	40	60
66	76	97	3

Las fracciones se recolectaron cada 2 min (400 µL) y se mantuvieron a -40°C. De acuerdo con los perfiles cromatográficos obtenidos (**Figura 24**), se consideraron las fracciones de 26 a 60 min para su posterior análisis. Se realizaron seis mezclas de 40 µL de 3 fracciones diferentes para cada mezcla etiquetada como se describe en la **Figura 25**. Se congelaron alícuotas de 40 µL de estas mezclas de fracciones y se evaporaron en el *speed-vac* antes del análisis LC-MS/MS.

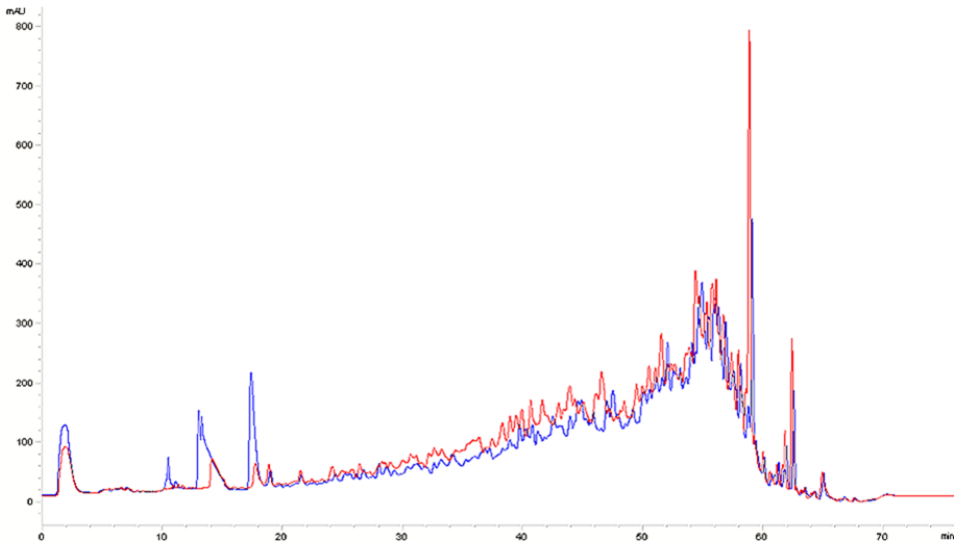


Figura 24. Perfil cromatográfico de los péptidos en el RP-HPLC del experimento 1 (azul) y el experimento 2 (rojo). En el eje horizontal hay representado el tiempo de retención (en min), y en el eje vertical la señal obtenida de cada péptido (en mAU).

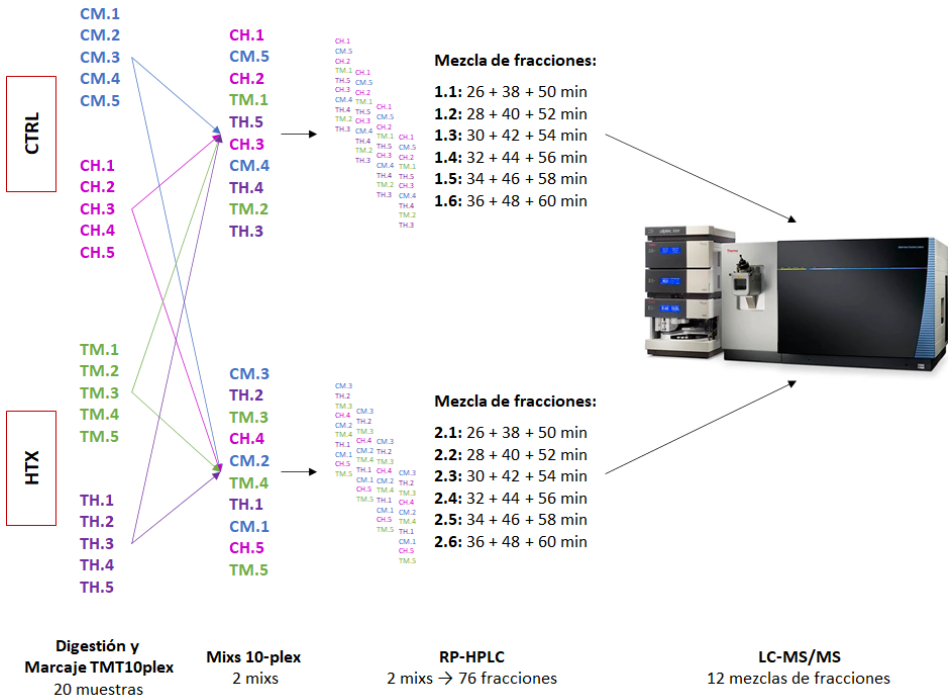


Figura 25. Procedimiento de marcaje, randomización e identificación de las muestras. Muestras C (CTRL) y T (suplementación con HTX), en las H (hembras) y en los M (machos).

9.1.5. Análisis LC-MS / MS

Se realizó LC-MS/MS de alta resolución para las 12 mezclas de fracciones.

El sistema utilizado fue un espectrómetro de masas *Fusion Lumos™ Tribrid* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) acoplado a un sistema cromatográfico *Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). El equivalente a 500 ng de cada mezcla de fracciones se cargó en una columna *Acclaim PepMap100 C18 Trap* (100 μm \times 2 cm, 5 μm , 100 Å; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a un flujo de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$, conectada a una columna *NanoEase MZ HSS T3 column* (75 μm \times 250 cm, 1.8 μm , 100 Å; Waters, MA, USA) para la separación.

La separación se realizó a un flujo de 250 nL/min, con un gradiente 3-35% ACN (0,1% ácido fórmico) en 60 min. El extremo de la columna cromatográfica se conectó directamente al sistema *Advion TriVersa NanoMate* acoplado al espectrómetro y trabajando a 1,7 kV.

El análisis espectrométrico se realizó en un modo dependiente de datos, con un rango m/z de 375-1500, fragmentación SPS3, método de velocidad máxima con una energía de colisión del 35% para MS2 CID y del 65% para MS3 HCD. La detección se realizó en Orbitrap (MS1 120k), trampa iónica (MS2) y Orbitrap (MS3 60 kDa). El software para la adquisición de instrumentos fue Xcalibur versión 4.2.28.14 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

9.1.6. Análisis de datos

La búsqueda en la base de datos y la identificación de los péptidos se realizó con el software *Proteome Discoverer v2.5* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) con una tasa de descubrimiento falso (FDR) al 1%, y la base de datos Uniprot restringida a la taxonomía (publicado el 02/2021) y contaminantes (publicado el 2017) de *Sus scrofa*.

Los parámetros de búsqueda establecidos fueron permitir 2 escisiones omitidas para la enzima tripsina; las modificaciones dinámicas: oxidación y acetilación de la metionina, y la acetilación del extremo N-terminal de la proteína; y las modificaciones estáticas: carbamidometilación de las cisteínas, y el TMT en el extremo N-terminal del péptido y en K. La tolerancia de la masa del precursor y del fragmento se estableció en 100 ppm y 0,6 Da respectivamente.

9.1.7. Análisis estadístico

La cuantificación de las proteínas se realizó en base a la intensidad de los *reporter ions* derivados del marcaje TMT. Dentro de cada experimento (mix de muestras) de TMT se realizó la normalización de la cuantificación peptídica.

Solo se utilizaron para la cuantificación los péptidos únicos y con coincidencias de masa de la selección de precursores sincrónicos (SPS) superiores al 55%. La normalización se realizó para cada canal de TMT frente a la intensidad total. Para ello, se sumaron todas las intensidades de cada uno de los *reporter ion*, y con ese valor se normalizaron las intensidades individuales para minimizar el error debido a la carga de proteína diferente de cada *reporter ion*.

El análisis estadístico para determinar proteínas y péptidos diferenciales se realizó utilizando el software DanteR (<http://omics.pnl.gov/software/danter>). La información detallada sobre cómo funciona este software se encuentra en el enlace: http://omics.pnl.gov/sites/default/files/DanteR_Overview.pdf.

Se realizó un análisis ANOVA de las muestras CTRL frente a las tratadas con el HTX utilizando los datos normalizados. La variabilidad debida al marcaje y también por el sexo de los animales también se incluyó en el modelo lineal. Además, los *p*-valores se ajustaron usando la corrección de FDR Benjamini & Hochberg.

Las proteínas diferenciales se determinaron usando un *p*-valor ajustado de 0,05 y un *fold-change* (FC) inferior a 0,67 (*down*) o superior a 1,5 (*up*).

9.2. Análisis del proteoma de hipocampo mediante TMT10-plex y nano-LC-ESI-MS/MS

Este procedimiento es el que se usó para obtener los **resultados proteómicos del Capítulo 2**. Se realizó en el Centro de Espectrometría de Masas y Proteómica del IRB, ubicado en el Parc Científic de Barcelona.

9.2.1. Cuantificación de proteína por el método BCA

Para cuantificar las proteínas se utilizó el mismo método descrito en el anterior experimento, pero se usó el reactivo *Pierce™ 660nm Protein Assay* y el *Ionic Detergent Compatibility Reagent* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de proteína de las muestras se determinó por interpolación de los valores de absorbancia a 630 nm mediante una recta patrón de BSA de rango 0-2000 µg/mL.

Para la lectura de los resultados se utilizó el lector de microplacas iEMS Reader MF (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) con *software Ascent* (versión 2.6, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

9.2.2. Reducción, alquilación y tripsinización

Se digirieron 200 µg de proteína de cada muestra con tripsina siguiendo el protocolo FASP [137].

Se llevaron 200 µg de proteína total al volumen final de 20 µL. Esta cantidad de proteína fue reducida con 5 mM TCEP durante 1 hora a 35°C en un agitador orbital y alquilada con 50 mM IAA durante 30 min a RT en un agitador orbital en la oscuridad. El exceso de IAA fue contrarrestado incubando con 8 M de urea durante 15 min. A continuación, se hicieron lavados con tampón 100 mM TEAB para reducir la concentración de urea a niveles por debajo de 1,5 M y permitir así la tripsinización con 4 µg de tripsina (2 % (p/p) tripsina en proteína a digerir) incubando 20 horas a 37°C.

9.2.3. Marcaje con TMT10-plex de los péptidos

Una vez bloqueada la digestión de proteínas mediante la inhibición de la tripsina por tratamiento con ácido (1 % ácido trifluoroacético), se guardó una alícuota de los péptidos trípticos (3 µg) para comprobar que la digestión se había realizado correctamente.

Con el resto de la muestra se procedió a la desalinización y limpieza de las muestras con *PolyLC tips C18* (PolyLC INC, Columbia, MD, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Finalmente, la muestra fue evaporada con un sistema *SpeedVac*. También se guardó una alícuota (19,7 µg) para la cuantificación de péptidos mediante el método *Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Teniendo en cuenta la cuantificación de proteínas, 70 µg de cada muestra que se había secado, se reconstituyeron en 100 µL de TEAB 100 mM y se marcaron con TMT10-plex (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Una vez finalizado el marcaje, las muestras fueron combinadas aleatoriamente (la distribución de las muestras se especifica en el **apartado 10 de los Resultados**, en la **Tabla 33**), y evaporadas en el *SpeedVac*, para finalmente ser desaladas y limpiadas primero con *PolyLC tips C18* y segundo con *PolyLC tips SCX* (PolyLC INC, Columbia, MD, USA). Por último, las muestras fueron evaporadas y resuspendidas con 200 µl en 3 % (v/v) ACN y 1 % (v/v) ácido fórmico.

9.2.4. Espectrometría de masas en tándem de ionización por electropulverización de cromatografía nanolíquida (nano LC-ESI-MS/MS)

Los péptidos se analizaron utilizando un espectrómetro de masas *Orbitrap Fusion Lumos™ Tribrid* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) acoplado

al sistema cromatográfico *Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 ultrahigh pressure* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y al *Advion TriVersa NanoMate* (Advion Inc. Biosciences, Ithaca, NY, USA) como interfaz de nanopulverización.

Las mezclas de péptidos se cargaron en una μ -Precolumna (300 μ m i.d x 5 mm, C₁₈ PepMap100, 5 μ m, 100 Å, C₁₈ Trap column; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a un flujo de 15 μ L/min. Se separaron mediante una columna analítica C₁₈ (*NanoEase MZ HSS T3 column*; 75 μ m x 250 mm, 1.8 μ m, 100Å; Waters, MA, USA), a un flujo de 250 nL/min y cromatogramas de 3000 min. La separación comprende tres pasos consecutivos con gradientes lineales, utilizando solvente A (0,1 % (v/v) de ácido fórmico en agua) y solvente B (0,1 % (v/v) ácido fórmico en ACN). Se empezó con el 100 % de solvente A durante 3 min. A continuación, se realizó un gradiente creciente del solvente B al 1 % durante 3 min, del 1 % al 35 % en 270 min, del 35 % al 50 % en 5 min, y del 50 % al 85 % en 2 min. Seguido de una elución isocrática al 85% del solvente B en 5 min, y una estabilización a las condiciones iniciales.

El espectrómetro de masas se hizo funcionar en un modo de adquisición dependiente de datos (DDA). En cada ciclo de recopilación de datos, se adquirió en el Orbitrap (configuración de resolución de $1,2 \times 10^5$ y control automático de ganancia (AGC) de 2×10^5) un escaneo MS completo (400-1600 m/z).

El siguiente análisis de MS²-MS³ se realizó con un enfoque de máxima velocidad. Los iones más abundantes se seleccionaron para la fragmentación mediante disociación inducida por colisión (CID). La CID se realizó con una energía de colisión del 35%, Q de activación de 0,25, un objetivo de AGC de 1×10^4 , una ventana de aislamiento de 0,7 Da, un tiempo máximo de acumulación de iones de 50 ms y una tasa de barrido de iones turbo. Los iones precursores previamente analizados se excluyeron dinámicamente durante 30 s.

Para los análisis de MS³ para la cuantificación de TMT, se co-seleccionaron y fragmentaron múltiples iones de fragmentos de la exploración

MS2 anterior (iones SPS) mediante HCD utilizando una energía de colisión del 65% y una ventana de aislamiento de precursores de 2 Da. Los iones reporteros se detectaron utilizando el Orbitrap con una resolución de 60.000, un AGC de 1×10^5 y un tiempo máximo de acumulación de iones de 120 ms.

El voltaje de pulverización en la fuente NanoMate se fijó en 1,70 kV. Las lentes de RF se sintonizaron al 30%. La señal mínima requerida para activar el interruptor de MS a MS/MS se estableció en 5,000. El espectrómetro de masas funcionaba en modo de polaridad positiva y los precursores del estado de carga individual fueron rechazados por fragmentación.

9.2.5. Búsqueda de base de datos

Las búsquedas en la base de datos se realizaron con el software *Proteome Discoverer v2.5.0.400* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) utilizando el motor de búsqueda Sequest HT y UniProt_PIG_2021_02 y contaminantes. La búsqueda se realizó en una base de datos de señuelos y objetivos para determinar el FDR.

Los parámetros de búsqueda incluyeron tripsina, lo que permitió dos sitios de escisión perdidos, carbamidometilo en cisteína y el TMT en el extremo N-terminal del péptido y en K como modificaciones estáticas. La oxidación y la acetilación de la metionina en el extremo N-terminal de la proteína como modificaciones dinámicas. La tolerancia de la masa de péptidos fue de 10 ppm para MS1, 0,6 ppm para MS2, y 20 ppm para MS3. Los péptidos con un *q-value* inferior a 0,1 se consideraron identificaciones positivas con un alto nivel de confianza.

9.2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado siguiendo la metodología propuesta por Chick et al. [138]. Las intensidades de los *reporter ions* fueron utilizados para la cuantificación de proteínas. Los péptidos únicos (aquellos que no son

Material y Métodos

compartidos entre diferentes grupos de proteínas), fueron considerados para el análisis cuantitativo y estadístico adicional.

Dentro de cada experimento de TMT se realizó la normalización de la cuantificación peptídica. Para ello, se sumaron los valores de abundancia de todos los péptidos identificados dentro de ese experimento para cada canal (*reporter ion*). Se tomó como referencia el canal con mayor abundancia total y se corrigieron todos los valores de abundancia en todos los demás canales mediante un factor constante por canal, de modo que al final la abundancia total fuera la misma para todos los canales.

Para la normalización entre los experimentos de TMT, se realizó normalización por cuantiles.

Los datos se transformaron primero a escala logarítmica para aplicar un modelo lineal. Los datos se filtraron para retener solo proteínas con valores de cuantificación válidos en al menos 3 valores válidos en al menos un grupo (el grupo aquí se refiere a dieta + peso + sexo). Los valores faltantes se imputaron con números aleatorios distribuidos normalmente (centrados en -1,8 unidades de desviación estándar y una dispersión de 0,3 unidades de desviación estándar con respecto a los valores no perdidos). Para ajustar el efecto por lotes se utilizó un modelo lineal con el lote TMT como efecto fijo. Se aplicaron dos modelos diferentes, uno que consideró dieta y otro que tuvo en cuenta dieta + peso. Se realizó una comparación entre grupos para averiguar qué especies cambiaron significativamente.

Los p -valores fueron ajustados mediante la corrección de Benjamini & Hochberg. Se consideraron estadísticamente significativas entre los grupos aquellas proteínas con un p -valor ajustado inferior a 0,05 y un FC de 1,5.

9.3. Análisis bioinformático

Es necesario interpretar los resultados de las proteínas identificadas para poder analizar el sentido biológico y discutir qué repercusión tienen los cambios en la abundancia de las proteínas identificadas.

Para analizar las proteínas obtenidas en los estudios proteómicos se usaron programas informáticos con bases de datos de libre acceso en internet que cataloguen y caractericen las distintas proteínas identificadas.

Las identificaciones se realizaron usando bases de datos de proteínas de UniProt (www.uniprot.org) restringida a la taxonomía y contaminantes de *Sus scrofa*. Las caracterizaciones de las proteínas en *Gene Ontology* (GO) por su función, proceso biológico en el que participan o su distribución celular se hicieron mediante el software PANTHER versión 16.0 (<http://pantherdb.org>; University of Southern California) [139]. Se analizaron los GO completos y los GO *slims*. Los GO *slims* son versiones reducidas que contienen un subconjunto de los términos de todo el GO, ofrecen una visión general del contenido de la ontología, excluyendo los detalles específicos.

Para el análisis de las vías se utilizó la plataforma Reactome versión 77 (<https://reactome.org/>) [140], así como la herramienta Kegg Mapper versión 5.0 (<https://www.genome.jp/kegg/mapper.html>) [141].

Se analizaron las interacciones entre las proteínas identificadas mediante la herramienta STRING versión 11.5 (<http://string-db.org>).

Se realizaron los diagramas de Venn con el programa informático gratuito FunRich (www.funrich.org) usando las bases de datos de proteomas de UniProt como referencia para catalogar las proteínas.



RESULTADOS

Capítulo 1. Efecto de la suplementación de la dieta materna con el antioxidante hidroxitirosol en el desarrollo cerebral de un modelo porcino de restricción del crecimiento intrauterino.

Estudio 1. Efecto de la suplementación materna de la dieta con el antioxidante hidroxitiroso en el cerebro de fetos de 100 días de gestación, de cerdos de 1 mes y de 6 meses de edad.

Este estudio se llevó a cabo con la colaboración del grupo del Dr. González-Bulnes en el INIA, quienes se encargaron de la cría, mantenimiento y sacrificio de los animales. A continuación, todas las muestras obtenidas fueron enviadas al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de la UAB donde se procedió a su análisis.

Este trabajo fue publicado en: N. Yeste et al., "Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of the Antioxidant Hydroxytyrosol on Brain Neurochemistry and Development in a Porcine Model," *Antioxidants*, vol. 10, no. 6, p. 884, 2021, doi: 10.3390/antiox10060884 [142].

1. Declaración de ética

El estudio fue realizado según la normativa española para la protección de animales RD53/2013, que se encuentra en la Directiva 2010/63/UE de la Unión Europea sobre la protección de animales usados en la investigación. El experimento fue evaluado específicamente y aprobado (Informe CEEA 2013/036) por el Comité de Ética del INIA en investigación animal. Los animales se alojaron en las instalaciones del INIA, que cumple con los requisitos locales, nacionales y europeos de procedimientos científicos.

2. Animales y procedimiento experimental

Para realizar este estudio se usaron 100 fetos y 102 lechones obtenidos de 51 cerdas ibéricas de pura raza que quedaron gestantes tras la sincronización del ciclo con Altrenogest (Regumate, MSD, Boxmeer, Netherlands) y la inseminación con semen congelado de un verraco ibérico de pura raza.

Desde el inicio del experimento hasta el día 35 de gestación, las cerdas fueron alimentadas con una dieta estándar a base de cereales con valores promedio de 15,1 % de proteína cruda, 2,8 % de grasa y 3,0 Mcal/kg de energía, ajustada para cumplir con los requisitos de mantenimiento diario individuales, según los datos de la Sociedad Británica de Ciencia Animal [143].

En el día 35 de gestación, se pesaron todas las cerdas, y fueron alimentadas con la misma dieta estándar pero la cantidad de alimento desde ese día se ajustó a cada una para satisfacer el 50% de sus necesidades diarias de mantenimiento para la gestación (50% de restricción) hasta el día del parto. Este procedimiento de restricción alimentaria ha sido validado previamente, demostrando que afecta al desarrollo fetal causando retraso en su crecimiento y resultando en una incidencia alrededor del 20% de la descendencia con bajo peso al nacer [144], [145].

Para aplicar la restricción, cada ración de alimento se pesaba y se ajustaba a cada cerda de forma individual, por lo tanto, durante el período experimental cada hembra tenía una cantidad de alimento asignada en función de su peso.

También, en el día 35 de gestación, las cerdas se emparejaron según su peso corporal. Desde ese día hasta el día del parto, las cerdas se dividieron en dos grupos: 26 hembras permanecieron como grupo control sin tratar (CTRL) mientras que las 25 hembras restantes actuaron como el grupo tratado al recibir 1,5 mg del antioxidante hidroxitirosol por kg de alimento cada día (HTX).

Los fetos se obtuvieron el día 100 de la gestación, se sexaron y se pesaron inmediatamente después de la extracción (55 CTRL y 45 HTX). Los lechones al nacer fueron sexados, pesados e identificados con una etiqueta auricular y se sometieron a crianza dentro del grupo para igualar el número de lechones entre las cerdas y evitar los efectos de la nutrición postnatal. Posteriormente, todos los lechones permanecieron con las cerdas en corrales individuales (una cerda

por corral) hasta su destete al mes de edad, cuando se muestrearon 52 lechones (18 CTRL y 34 HTX). Los lechones muestreados a los 6 meses de edad (31 CTRL y 19 HTX) se mantuvieron en corrales colectivos separados por sexo y peso, pero mezclando tratamientos, y alimentados con dietas comerciales de mantenimiento [146]. El tamaño de la muestra para cada grupo de animales se resume en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Peso corporal medio inicial, y número de individuos del estudio.

		Peso inicial	N total	Hembras	Machos
Fetos	CTRL	729,7 ± 18,4	55	31	24
	HTX	660,9 ± 17,4	45	26	19
Lechones	CTRL	1235,8 ± 41,8	18	6	12
	HTX	1260,3 ± 33,3	34	10	24
Cerdos	CTRL	1138,4 ± 32,8	31	14	17
	HTX	1282,1 ± 25,8	19	9	10

El peso inicial en el caso de los fetos corresponde al momento de su obtención, y en el caso de los lechones y de los cerdos corresponde al peso de su nacimiento. Unidades del peso en gramos.

El muestreo de cada animal se realizó después del aturdimiento y exanguinación de acuerdo con los procedimientos estándar RD53/2013. Posteriormente, se separó la cabeza del tronco en la unión atlanto-occipital, se extrajo el cerebro del cráneo, se pesó y se diseccionaron ambos hipocampos, la amígdala y la corteza prefrontal, de la forma descrita en el **apartado 4.2 de Material y Métodos**.

3. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo con el software SPSS 24.0 (IBM, Chicago, IL, USA). El nivel de significancia fue establecido en $p < 0,05$, y la tendencia fue considerada en $0,05 \leq p \leq 0,1$. Los datos descriptivos se presentan con la media y el error estándar de la media (media ± SE).

Antes de hacer el análisis estadístico se realizó el test de normalidad Kolmogórov-Smirnov, y en los casos necesarios, los datos fueron transformados

a valores logarítmicos para corregir la distribución y permitir el uso de estadística paramétrica.

Las medidas normalmente distribuidas se analizaron mediante el procedimiento UNIANOVA de SPSS con ajuste de Tukey. En todos los modelos, se introdujo cada cerdo como unidad experimental, los efectos fijos incluidos fueron tratamiento (CTRL y HTX), edad (fetos, 1 mes y 6 meses), sexo (macho y hembra) y sus interacciones. Además, también se realizaron comparaciones por pares con el ajuste de Bonferroni para las interacciones significativas.

4. Perfil de neurotransmisores

Se cuantificaron las concentraciones de los neurotransmisores y sus metabolitos en tres áreas cerebrales: amígdala, corteza prefrontal e hipocampo. Aparte de la concentración de los neurotransmisores individuales, se calculó también la concentración total de la vía dopaminérgica (DOPtotal, la suma de las concentraciones de DA, DOPAC, HVA), la concentración total de catecolaminas (CATtotal, la suma de las concentraciones de NA, DA, DOPAC, HVA), y la concentración total de indolaminas (INDtotal, la suma de las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA).

Además, se calcularon las relaciones de los metabolitos con los neurotransmisores principales: DOPAC/DA, HVA/DA, (DOPAC+HVA)/DA, 5-HIAA/5-HT, como indicadores del metabolismo de la DA y la 5-HT, respectivamente.

Los resultados completos se muestran en la **Tabla 9**, mientras que las diferencias significativas entre las concentraciones de neurotransmisores se representan en las **Figuras 25, 26 y 27**.

4.1. Amígdala.

En los fetos, la evaluación de los neurotransmisores en la amígdala mostró un efecto significativo de HTX tanto en las catecolaminas como en las indolaminas. Los cambios fueron significativos para todos los neurotransmisores, viéndose un aumento de los dopaminérgicos y de los serotoninérgicos en los animales tratados con HTX.

La suplementación con HTX aumentó DA y DOPAC en los fetos ($p = 0,004$ y $p < 0,001$, respectivamente), mientras que el efecto no fue significativo a 1 mes ($p = 0,298$ y $p = 0,070$) o a los 6 meses ($p = 0,046$ y $p = 0,117$). La suplementación materna con HTX aumentó en gran medida el HVA en los fetos ($p < 0,001$), mientras que no hubo diferencias en los animales de 1 mes ($p = 0,383$) o 6 meses ($p = 0,056$) de edad. Al analizar los compuestos dopaminérgicos totales, así como las catecolaminas totales, se observó un efecto importante del tratamiento en los fetos ($p < 0,001$).

La suplementación materna con HTX provocó una disminución de la concentración de NA en los fetos ($p < 0,001$) mientras que no hubo diferencias al mes de edad ($p = 0,096$), pero si a los 6 meses aumentando la NA ($p = 0,002$).

Con respecto a los neurotransmisores serotoninérgicos, se observó un aumento de 5-HT y 5-HIAA en los fetos del grupo HTX ($p < 0,001$), mientras que las diferencias no fueron significativas ni a 1 mes ($p = 0,051$ y $p = 0,279$), ni a los 6 meses de edad ($p = 0,423$ y $p = 0,375$).

No se observó un efecto del tratamiento con HTX a ninguna edad en las relaciones entre los metabolitos dopaminérgicos y la DA (DOPAC/DA, HVA/DA y (DOPAC + HVA)/DA), ni en la relación del metabolito serotoninérgico con la 5-HT (5-HIAA/5-HT).

Se puede concluir que los efectos del HTX fueron claros en los fetos, mientras que en las edades posnatales fueron leves o inexistentes (**Figura 26**).

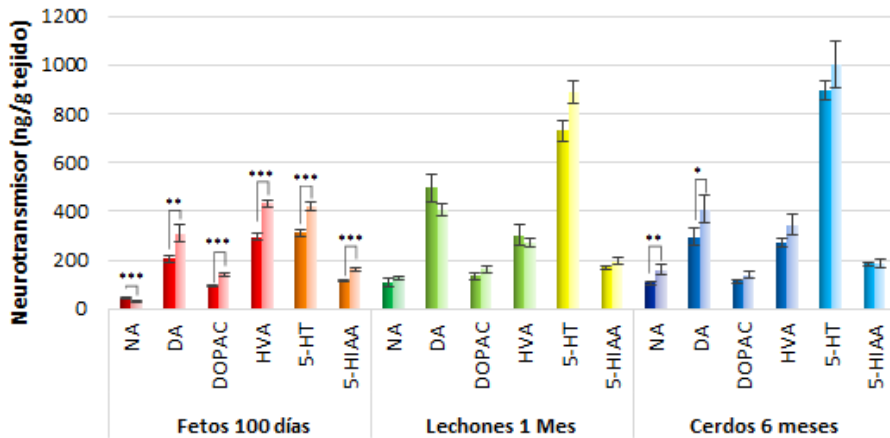


Figura 26. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la concentración de neurotransmisores y metabolitos en la amígdala de fetos de 100 días, lechones de 1 mes, y cerdos de 6 meses de edad. El eje horizontal muestra el neurotransmisor o metabolito y la edad al que pertenece. Las barras representan la media \pm SE, unidades ng/g de tejido. Las barras oscuras representan los resultados de los animales CTRL, y las barras claras representan los resultados de los animales cuyas madres fueron suplementadas con HTX. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el grupo CTRL y el grupo HTX en las respectivas edades (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Con respecto a la edad, la NA, la DA y su metabolito DOPAC aumentaron en gran medida después del nacimiento en los animales CTRL, así como en los animales tratados con HTX. El metabolito HVA no se alteró con la edad en los animales CTRL, mientras que hubo una disminución en los animales tratados con HTX. En consecuencia, al analizar los compuestos dopaminérgicos totales, así como las catecolaminas totales, se observó un efecto importante de la edad. Finalmente, se observó un gran aumento de 5-HT y su metabolito 5-HIAA con la edad tanto en los animales CTRL como en los animales tratados con HTX.

4.2. Corteza prefrontal.

La evaluación de los neurotransmisores en la corteza prefrontal mostró en los fetos un efecto significativo de HTX sobre la mayoría de las catecolaminas e indolaminas.

La suplementación materna con HTX provocó una disminución de NA en los fetos ($p < 0,001$) mientras que no hubo diferencias al mes y a los 6 meses de edad ($p = 0,883$ y $p = 0,834$, respectivamente).

Al analizar las vías dopaminérgicas, la suplementación con HTX disminuyó la DA ($p < 0,001$) y aumentó sus metabolitos DOPAC y HVA ($p < 0,001$) en los fetos, mientras que no hubo un efecto significativo al mes y a los 6 meses de edad. Las proporciones entre metabolitos siguieron la misma tendencia, ya que todos ellos se alteraron en los fetos ($p < 0,001$) indicando una metabolización más rápida de DA, pero no se observaron cambios en las edades más avanzadas.

Al analizar los efectos del tratamiento con HTX sobre los compuestos serotoninérgicos, se observó un aumento de 5-HT y 5-HIAA en los fetos ($p < 0,001$), mientras que las diferencias no fueron significativas a 1 mes ($p = 0,703$ y $p = 0,182$) ni a los 6 meses ($p = 0,555$ y $p = 0,791$). El tratamiento con HTX aumentó la relación 5-HIAA / 5-HT solo en fetos ($p = 0,001$), pero no se observó ningún efecto del tratamiento con HTX en edades más avanzadas.

Nuevamente, al igual que en la amígdala, los efectos del HTX fueron claros en los fetos, mientras que fueron inexistentes en las etapas posnatales (**Figura 27**).

En cuanto a la edad, la NA aumentó a los 1 y 6 meses en comparación con los fetos CTRL, así como en los animales tratados con HTX. Entre los neurotransmisores dopaminérgicos, la DA disminuyó notablemente al mes y a los 6 meses de edad en el grupo CTRL. Su metabolito HVA siguió un patrón similar, mientras que DOPAC permaneció constante durante todo el desarrollo.

La 5-HT aumentó con la edad siendo mucho mayor en la etapa posnatal que en los fetos. La relación 5-HIAA / 5-HT disminuyó a los 1 y 6 meses de edad en comparación con los fetos.

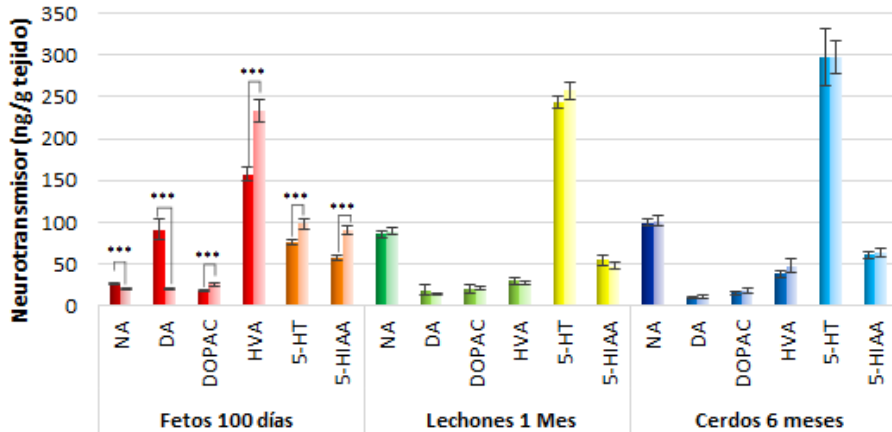


Figura 27. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la concentración de neurotransmisores y metabolitos en la corteza prefrontal de fetos de 100 días, lechones de 1 mes, y cerdos de 6 meses de edad. El eje horizontal muestra el neurotransmisor o metabolito y la edad al que pertenece. Las barras representan la media \pm SE, unidades ng/g de tejido. Las barras oscuras representan los resultados de los animales CTRL, y las barras claras representan los resultados de los animales cuyas madres fueron suplementadas con HTX. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el grupo CTRL y el grupo HTX en las respectivas edades (***) $p < 0,001$.

4.3. Hipocampo.

La evaluación de los neurotransmisores en el hipocampo mostró en los fetos un efecto significativo de HTX sobre la mayoría de las catecolaminas e indolaminas.

En cuanto al tratamiento, HTX aumentó la concentración de NA en los fetos ($p < 0,001$), mientras que no hubo diferencias a los 1 y 6 meses de edad ($p = 0,972$ y $p = 0,436$, respectivamente).

Con respecto a los neurotransmisores dopaminérgicos, la suplementación materna con HTX aumentó la DOPAC y la HVA en los fetos ($p < 0,001$), mientras que no hubo un efecto significativo al mes ($p = 0,333$ y $p = 0,696$,

respectivamente) ni a los 6 meses de edad ($p = 0,600$ y $p = 0,338$, respectivamente). Las proporciones entre metabolitos indicaron la misma tendencia, ya que todos se alteraron en los fetos ($p < 0,001$), pero no se observaron cambios en edades más avanzadas.

Al analizar los efectos del tratamiento con HTX sobre los compuestos serotoninérgicos, se observó un aumento de 5-HT en fetos ($p = 0,009$), mientras que las diferencias no fueron significativas al mes de vida ($p = 0,804$) y a los 6 meses ($p = 0,954$). No se observó ningún efecto del tratamiento con HTX sobre la relación 5-HIAA / 5-HT.

Nuevamente, como se observó en las dos áreas anteriores, los efectos de HTX fueron claros en los fetos, mientras que fueron inexistentes en la etapa posnatal (**Figura 28**).

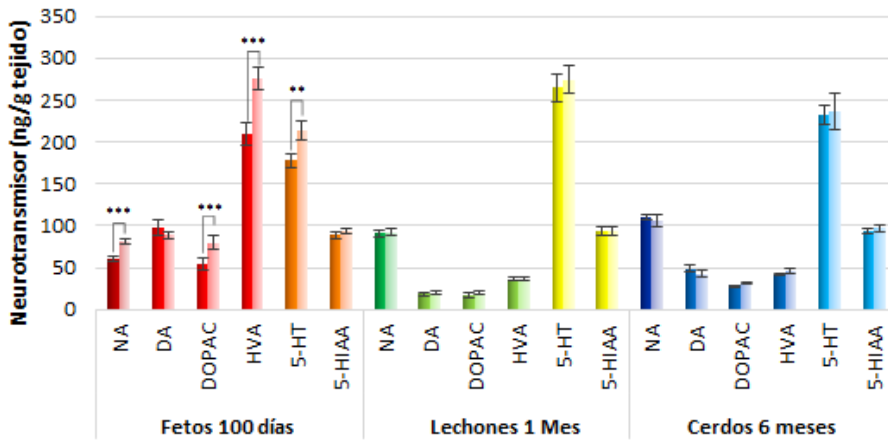


Figura 28. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la concentración de neurotransmisores y metabolitos en el hipocampo de fetos de 100 días, lechones de 1 mes, y cerdos de 6 meses de edad. El eje horizontal muestra el neurotransmisor o metabolito y la edad al que pertenece. Las barras representan la media \pm SE, unidades ng/g de tejido. Las barras oscuras representan los resultados de los animales CTRL, y las barras claras representan los resultados de los animales cuyas madres fueron suplementadas con HTX. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el grupo CTRL y el grupo HTX en las respectivas edades (*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$).

Con respecto a la edad, la NA aumentó a los 1 y 6 meses en comparación con los fetos CTRL, así como en los animales tratados con HTX. La DA y sus metabolitos DOPAC y HVA disminuyeron al mes de edad y luego aumentaron nuevamente a los 6 meses, siguiendo patrones similares tanto en el grupo CTRL como en los grupos tratados con HTX. Se observó un gran aumento de 5-HT a 1 mes de edad frente a los fetos en CTRL, así como en animales tratados con HTX, y luego se estabilizó a los 6 meses de edad. La relación 5-HIAA / 5-HT disminuyó a los 1 y 6 meses de edad en comparación con los fetos.

4.4. Efecto del sexo y su interacción con el tratamiento con HTX sobre los neurotransmisores.

Finalmente, también se analizó el efecto del sexo según el tratamiento, al igual que las posibles interacciones entre el tratamiento con HTX y el sexo en las tres áreas (**Tabla Suplementaria 1**). No se encontraron efectos significativos del sexo, excepto en la amígdala de los fetos, donde se vio un efecto en los niveles de NA. Concretamente se observó que los machos del grupo CTRL tenían niveles más elevados que las hembras del mismo grupo.

No se encontraron interacciones significativas entre el sexo y el tratamiento con HTX para ninguna variable, en ninguna área cerebral y a ninguna edad. En los animales de 1 mes y de 6 meses, al no haber diferencias por el tratamiento con HTX ni del sexo, era de esperar que no hubiera una interacción de ambos. En los fetos, el hecho de que no haya interacción nos indicó que el tratamiento con HTX afectó por igual a ambos sexos, tanto machos como hembras.

Tabla 9. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en las distintas áreas cerebrales en función de la suplementación de la dieta materna sin o con HTX en los fetos de 100 días y cerdos de 1 y 6 meses.

		Fetos		Lechones 1 mes		Cerdos 6 meses	
Amígdala	NA	CTRL	44,00 ± 2,42 ^{Aa}	107,93 ± 15,13 ^{Ab}	106,33 ± 5,65 ^{Ab}		
		HTX	31,46 ± 1,84 ^{Ba}	126,21 ± 9,21 ^{Ab}	160,86 ± 18,45 ^{Bb}		
	DA	CTRL	204,36 ± 12,56 ^{Aa}	496,22 ± 56,40 ^{Ab}	294,06 ± 36,78 ^{Ac}		
		HTX	309,88 ± 32,97 ^{Ba}	404,25 ± 26,16 ^{Ab}	406,63 ± 56,90 ^{Bab}		
	DOPAC	CTRL	94,84 ± 4,28 ^{Aa}	133,03 ± 15,14 ^{Ab}	114,31 ± 6,48 ^{Aab}		
		HTX	143,09 ± 7,00 ^{Ba}	162,14 ± 13,17 ^{Aa}	139,50 ± 15,03 ^{Aa}		
	HVA	CTRL	294,93 ± 13,26 ^{Aa}	301,14 ± 43,09 ^{Aa}	270,65 ± 18,18 ^{Aa}		
		HTX	432,63 ± 14,85 ^{Ba}	270,08 ± 19,39 ^{Ab}	345,39 ± 40,52 ^{Ab}		
	DOPAC/DA	CTRL	0,51 ± 0,02 ^{Aa}	0,28 ± 0,02 ^{Ab}	0,46 ± 0,03 ^{Aa}		
		HTX	0,70 ± 0,17 ^{Aa}	0,41 ± 0,02 ^{Bb}	0,39 ± 0,03 ^{Ab}		
	HVA/DA	CTRL	1,62 ± 0,09 ^{Aa}	0,63 ± 0,04 ^{Ab}	1,08 ± 0,07 ^{Ac}		
		HTX	2,23 ± 0,43 ^{Aa}	0,70 ± 0,04 ^{Ab}	0,98 ± 0,08 ^{Ac}		
	(DOPAC+HVA)/DA	CTRL	2,14 ± 0,11 ^{Aa}	0,91 ± 0,06 ^{Ab}	1,54 ± 0,09 ^{Ac}		
		HTX	2,93 ± 0,59 ^{Aa}	1,11 ± 0,06 ^{Ab}	1,37 ± 0,11 ^{Ab}		
	DOPtotal	CTRL	594,13 ± 26,24 ^{Aa}	930,39 ± 106,55 ^{Ab}	679,01 ± 59,47 ^{Aa}		
		HTX	885,61 ± 46,65 ^{Ba}	836,47 ± 50,81 ^{Aa}	891,51 ± 103,69 ^{Ba}		
	CATtotal	CTRL	638,13 ± 25,89 ^{Aa}	1038,31 ± 116,92 ^{Ab}	785,34 ± 62,73 ^{Aa}		
		HTX	917,06 ± 46,36 ^{Ba}	962,68 ± 56,71 ^{Aa}	1052,37 ± 118,86 ^{Ba}		
	5-HT	CTRL	312,30 ± 14,32 ^{Aa}	731,64 ± 43,08 ^{Ab}	894,76 ± 41,52 ^{Ab}		
		HTX	417,39 ± 17,59 ^{Ba}	886,94 ± 46,18 ^{Ab}	998,98 ± 95,43 ^{Ab}		
5-HIAA	CTRL	113,45 ± 5,28 ^{Aa}	169,36 ± 8,33 ^{Ab}	184,00 ± 7,19 ^{Ab}			
	HTX	163,29 ± 5,73 ^{Ba}	196,31 ± 12,09 ^{Aa}	183,75 ± 18,56 ^{Aa}			
5-HIAA/5-HT	CTRL	0,39 ± 0,02 ^{Aa}	0,24 ± 0,01 ^{Ab}	0,21 ± 0,01 ^{Ab}			
	HTX	0,41 ± 0,02 ^{Aa}	0,23 ± 0,02 ^{Ab}	0,18 ± 0,01 ^{Ab}			
INDtotal	CTRL	425,75 ± 17,86 ^{Aa}	901,00 ± 48,81 ^{Ab}	1078,76 ± 45,48 ^{Ab}			
	HTX	580,68 ± 21,36 ^{Ba}	1083,25 ± 51,18 ^{Bb}	1182,73 ± 111,92 ^{Ab}			
Corteza Prefrontal	NA	CTRL	26,97 ± 1,19 ^{Aa}	85,57 ± 4,40 ^{Ab}	99,41 ± 4,68 ^{Ab}		
		HTX	19,92 ± 0,98 ^{Ba}	88,78 ± 4,49 ^{Ab}	101,17 ± 6,01 ^{Ac}		
	DA	CTRL	91,35 ± 11,56 ^{Aa}	18,55 ± 5,72 ^{Ab}	9,22 ± 1,26 ^{Ab}		
		HTX	19,93 ± 0,56 ^{Ba}	14,08 ± 1,53 ^{Aab}	10,33 ± 1,63 ^{Ab}		
	DOPAC	CTRL	17,20 ± 1,01 ^{Aa}	20,70 ± 5,03 ^{Aa}	15,23 ± 1,43 ^{Aa}		
		HTX	25,49 ± 1,47 ^{Ba}	20,77 ± 1,79 ^{Aab}	18,39 ± 3,59 ^{Ab}		
	HVA	CTRL	157,29 ± 8,31 ^{Aa}	29,60 ± 4,92 ^{Ab}	37,93 ± 3,41 ^{Ab}		
		HTX	233,09 ± 13,50 ^{Ba}	27,00 ± 2,64 ^{Ab}	47,79 ± 8,27 ^{Ac}		
	DOPAC/DA	CTRL	0,54 ± 0,08 ^{Aa}	1,46 ± 0,28 ^{Ab}	2,19 ± 0,30 ^{Ab}		
		HTX	1,27 ± 0,05 ^{Ba}	1,72 ± 0,26 ^{Aa}	2,80 ± 0,74 ^{Aa}		
	HVA/DA	CTRL	5,24 ± 0,80 ^{Aa}	3,14 ± 1,16 ^{Aa}	5,30 ± 0,70 ^{Aa}		
		HTX	11,60 ± 0,45 ^{Ba}	1,67 ± 0,28 ^{Ab}	6,42 ± 1,39 ^{Ac}		
	(DOPAC+HVA)/DA	CTRL	5,78 ± 0,88 ^{Aa}	4,59 ± 0,87 ^{Aab}	7,48 ± 0,98 ^{Ab}		
		HTX	12,87 ± 0,48 ^{Ba}	3,39 ± 0,41 ^{Ab}	9,22 ± 2,08 ^{Ac}		

		Fetos	Lechones 1 mes	Cerdos 6 meses		
Corteza Prefrontal	DOPtotal	CTRL	265,84 ± 15,60 ^{Aa}	108,75 ± 48,17 ^{Ab}	62,38 ± 4,78 ^{Ab}	
		HTX	278,51 ± 15,05 ^{Aa}	58,30 ± 7,94 ^{Ab}	76,52 ± 11,38 ^{Ab}	
	CATtotal	CTRL	292,81 ± 15,92 ^{Aa}	198,46 ± 83,16 ^{Aab}	161,80 ± 7,00 ^{Ab}	
		HTX	298,43 ± 15,30 ^{Aa}	127,98 ± 14,45 ^{Ab}	177,68 ± 14,52 ^{Ac}	
	5-HT	CTRL	76,34 ± 3,15 ^{Aa}	243,39 ± 7,37 ^{Ab}	298,03 ± 34,34 ^{Ab}	
		HTX	98,14 ± 6,22 ^{Ba}	257,78 ± 10,50 ^{Ab}	297,83 ± 19,26 ^{Ab}	
	5-HIAA	CTRL	57,49 ± 3,00 ^{Aa}	54,33 ± 5,72 ^{Aa}	60,44 ± 3,41 ^{Aa}	
		HTX	91,03 ± 4,83 ^{Ba}	47,61 ± 3,60 ^{Ab}	64,19 ± 5,15 ^{Ac}	
	5-HIAA/5-HT	CTRL	0,81 ± 0,06 ^{Aa}	0,22 ± 0,02 ^{Ab}	0,23 ± 0,02 ^{Ab}	
		HTX	1,05 ± 0,06 ^{Ba}	0,19 ± 0,01 ^{Ab}	0,22 ± 0,02 ^{Ab}	
	INDtotal	CTRL	133,83 ± 4,85 ^{Aa}	281,18 ± 18,96 ^{Ab}	358,46 ± 34,67 ^{Ab}	
		HTX	189,17 ± 8,47 ^{Ba}	305,40 ± 12,30 ^{Ab}	362,02 ± 23,13 ^{Ab}	
	Hipocampo	NA	CTRL	60,71 ± 3,28 ^{Aa}	91,21 ± 3,88 ^{Ab}	110,24 ± 3,98 ^{Ab}
			HTX	81,25 ± 3,89 ^{Ba}	92,42 ± 4,64 ^{Aab}	106,90 ± 7,34 ^{Ab}
DA		CTRL	97,87 ± 9,25 ^{Aa}	18,55 ± 2,31 ^{Ab}	48,99 ± 3,78 ^{Ac}	
		HTX	88,40 ± 4,64 ^{Aa}	19,56 ± 1,88 ^{Ab}	42,76 ± 3,96 ^{Ac}	
DOPAC		CTRL	54,37 ± 6,60 ^{Aa}	16,51 ± 2,66 ^{Ab}	28,57 ± 0,67 ^{Aa}	
		HTX	79,54 ± 8,64 ^{Ba}	19,95 ± 2,32 ^{Ab}	31,61 ± 1,60 ^{Ac}	
HVA		CTRL	209,07 ± 13,43 ^{Aa}	35,91 ± 1,97 ^{Ab}	40,94 ± 1,11 ^{Ab}	
		HTX	275,01 ± 13,60 ^{Ba}	36,12 ± 2,33 ^{Ab}	46,74 ± 3,01 ^{Ac}	
DOPAC/DA		CTRL	0,79 ± 0,10 ^{Aa}	2,04 ± 0,91 ^{Ab}	0,66 ± 0,04 ^{Aa}	
		HTX	1,04 ± 0,15 ^{Ba}	1,10 ± 0,10 ^{Aa}	0,80 ± 0,06 ^{Aa}	
HVA/DA		CTRL	2,60 ± 0,18 ^{Aa}	4,50 ± 1,77 ^{Aa}	0,95 ± 0,06 ^{Ab}	
		HTX	3,22 ± 0,13 ^{Ba}	2,08 ± 0,13 ^{Ab}	1,20 ± 0,10 ^{Ac}	
(DOPAC+HVA)/DA		CTRL	3,40 ± 0,26 ^{Aa}	6,54 ± 2,68 ^{Aa}	1,61 ± 0,10 ^{Ab}	
		HTX	4,26 ± 0,22 ^{Ba}	3,18 ± 0,18 ^{Ab}	2,00 ± 0,15 ^{Ac}	
DOPtotal		CTRL	361,31 ± 22,42 ^{Aa}	70,97 ± 4,77 ^{Ab}	118,50 ± 4,00 ^{Ac}	
		HTX	442,95 ± 20,04 ^{Ba}	75,64 ± 5,34 ^{Ab}	121,11 ± 6,22 ^{Ac}	
CATtotal		CTRL	422,03 ± 24,81 ^{Aa}	162,17 ± 7,72 ^{Ab}	228,74 ± 6,53 ^{Ac}	
		HTX	524,19 ± 22,24 ^{Ba}	168,06 ± 8,49 ^{Ab}	228,02 ± 10,05 ^{Ac}	
5-HT		CTRL	177,71 ± 7,96 ^{Aa}	264,34 ± 16,57 ^{Ab}	231,35 ± 11,55 ^{Ab}	
		HTX	213,97 ± 10,95 ^{Ba}	274,56 ± 16,94 ^{Ab}	235,98 ± 21,42 ^{Aab}	
5-HIAA		CTRL	88,67 ± 4,15 ^{Aa}	94,39 ± 5,23 ^{Aa}	93,66 ± 3,61 ^{Aa}	
		HTX	94,24 ± 3,06 ^{Aa}	94,21 ± 5,11 ^{Aa}	96,70 ± 4,84 ^{Aa}	
5-HIAA/5-HT		CTRL	0,52 ± 0,02 ^{Aa}	0,37 ± 0,02 ^{Ab}	0,42 ± 0,02 ^{Ab}	
		HTX	0,47 ± 0,02 ^{Aa}	0,36 ± 0,02 ^{Ab}	0,45 ± 0,03 ^{Aa}	
INDtotal		CTRL	266,38 ± 11,14 ^{Aa}	358,73 ± 20,38 ^{Ab}	325,01 ± 13,17 ^{Ab}	
		HTX	308,21 ± 13,05 ^{Ba}	368,77 ± 19,72 ^{Ab}	332,68 ± 23,46 ^{Aa}	

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Unidades ng/g de tejido. Las filas muestran los neurotransmisores y los metabolitos de cada área cerebral en función del tratamiento (CTRL o HTX). Las columnas dividen los animales según la edad. Los superíndices muestran las diferencias significativas. Diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas entre los tratamientos en cada edad ($p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas entre las edades en cada tratamiento ($p < 0,05$).

5. Parámetros de estrés oxidativo en los fetos

Dado que los efectos del tratamiento con HTX a nivel neuroquímico se observaron solo en los fetos de 100 días, para determinar si realmente la suplementación materna con HTX podría afectar el estado redox del cerebro, se determinaron varios marcadores de estrés oxidativo y enzimas antioxidantes en la corteza prefrontal y en el hipocampo de los animales de esta edad.

Los resultados (**Tabla 10**) muestran que el efecto antioxidante del HTX es evidente en la corteza prefrontal, ya que hubo una clara disminución en el estado de oxidación de los lípidos (ensayo de MDA) y cambios en las actividades enzimáticas de SOD y GPx. El cambio de SOD, aunque es significativo, no es cuantitativamente importante, mientras que la actividad de GPx aumenta en un 20%, aunque estadísticamente solo es tendencia. Los resultados de los mismos ensayos en el hipocampo no arrojaron diferencias significativas entre el grupo CTRL y el grupo HTX.

También se analizó el efecto del sexo y no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los parámetros.

Tabla 10. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre los marcadores de estrés oxidativo y las enzimas antioxidantes en la corteza prefrontal y el hipocampo de fetos de 100 días.

		MDA ($\mu\text{mol/g tejido}$)	TAS ($\mu\text{mol/g tejido}$)	GPX (U/g tejido)	SOD (U/g tejido)
PFC	CTRL	1,49 \pm 0,09	7,97 \pm 0,06	1,58 \pm 0,10	11,09 \pm 0,06
	HTX	1,19 \pm 0,05	7,83 \pm 0,07	1,89 \pm 0,14	10,30 \pm 0,07
	p-valor	0,003	0,134	0,090	< 0,001
HPC	CTRL	43,96 \pm 2,58	7,43 \pm 0,09	1,80 \pm 0,16	9,95 \pm 0,15
	HTX	46,20 \pm 0,99	7,54 \pm 0,08	1,85 \pm 0,16	10,00 \pm 0,09
	p-valor	0,424	0,383	0,838	0,771

Los resultados se presentan como la media \pm SE. Los *p*-valores en negrita indican las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

6. Análisis inmunohistoquímico del hipocampo

Para analizar los efectos de la suplementación materna con HTX sobre la morfología del hipocampo se utilizaron varios marcadores inmunohistoquímicos. Los marcadores se evaluaron en distintas áreas del hipocampo, en el *Cornu Ammonis* (CA1, CA2 y CA3) y en el *Gyrus Dentatus* (interno y externo). Las diferencias principales se encontraron en CA1 y en la parte interna del GD, mientras que no se observó ningún efecto de la suplementación con HTX en CA2 y CA3. Por consiguiente, CA1 y GD son las áreas que se explican a continuación.

Se utilizaron muestras de ambos grupos, CTRL (n = 10) y HTX (n = 10), para cada edad (fetos de 100 días, cerdos de 1 mes y de 6 meses de edad). Se incluyó un número igual de machos y hembras (**Tabla 11**).

Tabla 11. Peso corporal medio inicial, y número de individuos incluidos en el análisis inmunohistoquímico.

		Peso inicial	N total	Hembras	Machos
Fetos 100 días	CTRL	822,1 ± 29,3	10	5	5
	HTX	817,0 ± 24,8	10	5	5
Lechones 1 mes	CTRL	1328,9 ± 57,0	10	5	5
	HTX	1403,7 ± 41,2	10	5	5
Cerdos 6 meses	CTRL	1302,0 ± 18,1	10	5	5
	HTX	1359,0 ± 29,5	10	5	5

El peso inicial en el caso de los fetos corresponde al momento de su obtención, y en el caso de los lechones y de los cerdos corresponde al peso de su nacimiento. Unidades del peso en gramos.

NeuN, un marcador de núcleos neuronales en neuronas maduras, se utilizó para analizar el número y la distribución de neuronas maduras en las áreas CA1 y GD en el hipocampo de fetos de 100 días, cerdos de 1 mes y 6 meses (**Figura 29** y **Figura 30**). Los resultados cuantitativos se resumen en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la inmunotinción de NeuN en el hipocampo de los animales cuyas madres fueron CTRL o suplementadas con HTX.

			Nº neuronas	Área (%)	Tamaño medio (μm^2)
CA1	Fetos 100 días	CTRL	127,84 \pm 8,13	35,70 \pm 1,31	1791,27 \pm 275,44
		HTX	167,74 \pm 6,60	30,42 \pm 0,75	823,86 \pm 42,61
		p-valor	< 0,001	0,001	0,001
	Lechones 1 mes	CTRL	163,36 \pm 5,52	23,20 \pm 1,23	631,97 \pm 51,36
		HTX	180,78 \pm 7,44	22,36 \pm 0,89	555,54 \pm 38,25
		p-valor	0,068	0,579	0,236
	Cerdos 6 meses	CTRL	119,94 \pm 4,58	14,01 \pm 1,20	521,42 \pm 58,01
		HTX	121,59 \pm 6,12	16,84 \pm 1,06	629,58 \pm 61,29
		p-valor	0,831	0,087	0,209
GD	Fetos 100 días	CTRL	79,75 \pm 2,02	27,00 \pm 0,46	1496,11 \pm 49,92
		HTX	87,25 \pm 3,08	23,17 \pm 0,56	1169,11 \pm 50,12
		p-valor	0,039	< 0,001	< 0,001
	Lechones 1 mes	CTRL	58,18 \pm 2,25	23,42 \pm 0,46	1772,04 \pm 66,80
		HTX	60,30 \pm 2,77	23,02 \pm 0,72	1708,03 \pm 91,54
		p-valor	0,557	0,642	0,578
	Cerdos 6 meses	CTRL	28,59 \pm 1,67	19,75 \pm 0,82	3110,39 \pm 193,77
		HTX	39,53 \pm 1,56	20,30 \pm 1,23	2296,83 \pm 204,82
		p-valor	< 0,001	0,709	0,007

Los resultados se presentan como la media \pm SE. Los *p*-valores en negrita indican las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). La significación estadística fue determinada mediante el test UNIANOVA con ajuste de Tukey, con un mínimo de 6 secciones por individuo.

Como se puede observar en las Figuras 29 y 30, y en la Tabla 12, los fetos de 100 días tratados con HTX mostraron un mayor número de células neuronales maduras tanto en CA1 como en GD. Aunque hay un aumento de las neuronas maduras, éstas eran más pequeñas, haciendo que el porcentaje de área que ocupaban fuera menor que en los fetos CTRL.

No se observaron diferencias relevantes en animales de mayor edad (cerdos de 1 mes y 6 meses), excepto por una tendencia a un aumento en el número de células en CA1 al mes de edad, mientras que no hubo efecto de HTX en los animales de 6 meses. Curiosamente, se observó un aumento en el número de neuronas en el GD a los 6 meses de edad en los cerdos tratados con HTX,

aunque el porcentaje del área ocupada por células fue el mismo que en los cerdos CTRL ya que las neuronas estaban más dispersas que en los cerdos HTX.

En general, el ancho de GD en los cerdos tratados con HTX fue menor que en los cerdos del grupo CTRL.

La edad también influyó en la morfología del hipocampo. En los animales del grupo CTRL, el número de neuronas aumentó de fetos de 100 días hasta 1 mes de edad y luego disminuyó hasta los 6 meses de edad, pero el tamaño promedio disminuyó, especialmente entre la etapa fetal y 1 mes de edad (**Tabla 12**).

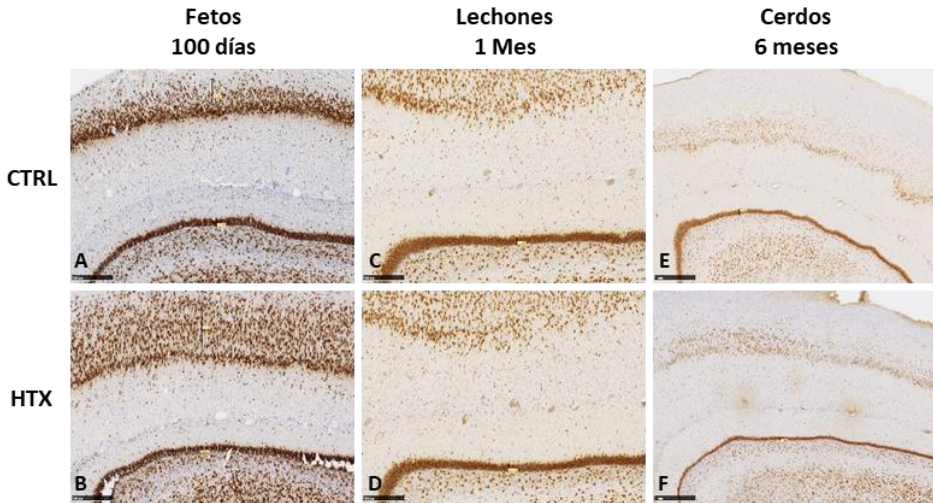


Figura 29. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la inmunotinción con NeuN en el hipocampo de fetos de 100 días (A-B), lechones de 1 mes (C-D) y cerdos de 6 meses (E-F). Imágenes representativas muestran las neuronas maduras de los animales cuyas madres fueron CTRL (A, C, E), o suplementadas con HTX (B, D, F). Barra de escala = 500 μm (A-D) y 1000 μm (E-F).

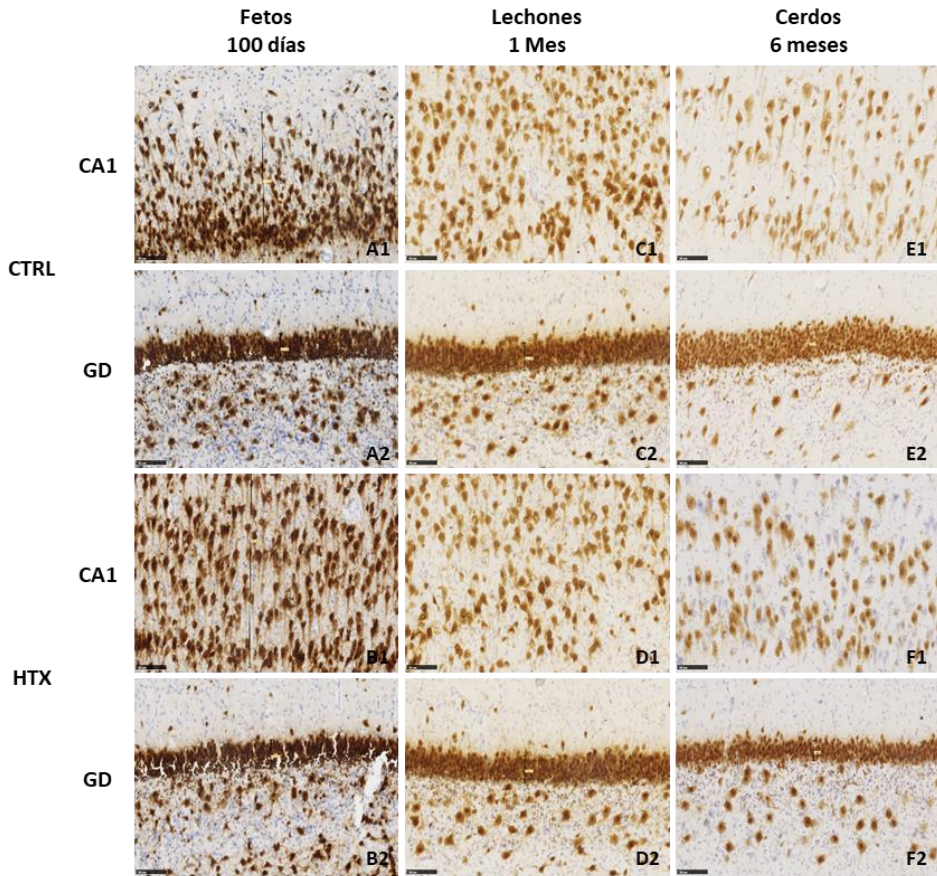


Figura 30. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la inmunotinción con NeuN en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días (A1-A2, B1-B2), lechones de 1 mes (C1-C2, D1-D2) y cerdos de 6 meses (E1-E2, F1-F2). Imágenes representativas muestran las neuronas maduras inmunoteñidas con el anticuerpo NeuN en las áreas CA1 (A1-F1) y GD (A2-F2), de los animales cuyas madres fueron CTRL o suplementadas con HTX respectivamente. Barra de escala = 100 μ m (A1-F1, A2-F2).

La proteína doblecortina (**DCX**) está asociada a microtúbulos del citoesqueleto y se expresa solo en neuronas inmaduras, por lo que se observa en etapas tempranas del desarrollo neuronal. Su inmunotinción se observa principalmente en las neuritas. Como se observa en la **Figura 31** y en la **Figura 32**, se observó una tinción más intensa en los fetos de 100 días del grupo CTRL, es decir, sin suplementación materna con HTX, lo que indica un mayor número de neuronas inmaduras que en el grupo HTX. Esto es especialmente claro en CA1. Este resultado se correlacionó inversamente con los resultados obtenidos con el marcador NeuN. En el GD se procedió a medir la anchura de la capa, y se observó que fue menor en los animales HTX que en los animales CTRL ($31,7 \pm 1,5 \mu\text{m}$ y $44,4 \pm 2,4 \mu\text{m}$, respectivamente), indicando así que en el grupo HTX había menos neuronas inmaduras.

Estas diferencias entre los grupos CTRL y HTX no se observaron en los cerdos de 1 mes y 6 meses. En estos animales de edades más avanzadas, el marcaje con DCX se observó principalmente en el área GD (**Figura 32**).

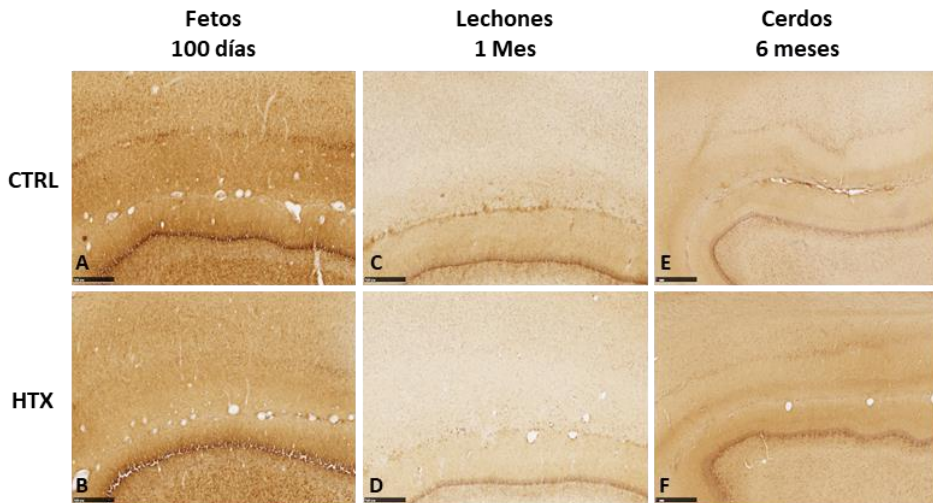


Figura 31. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la inmunotinción con DCX en el hipocampo de fetos de 100 días (A-B), lechones de 1 mes (C-D) y cerdos de 6 meses (E-F). Imágenes representativas muestran las neuronas inmaduras de los animales cuyas madres fueron CTRL (A, C, E), o suplementadas con HTX (B, D, F). Barra de escala = 500 μm (A-D) y 1000 μm (E-F).

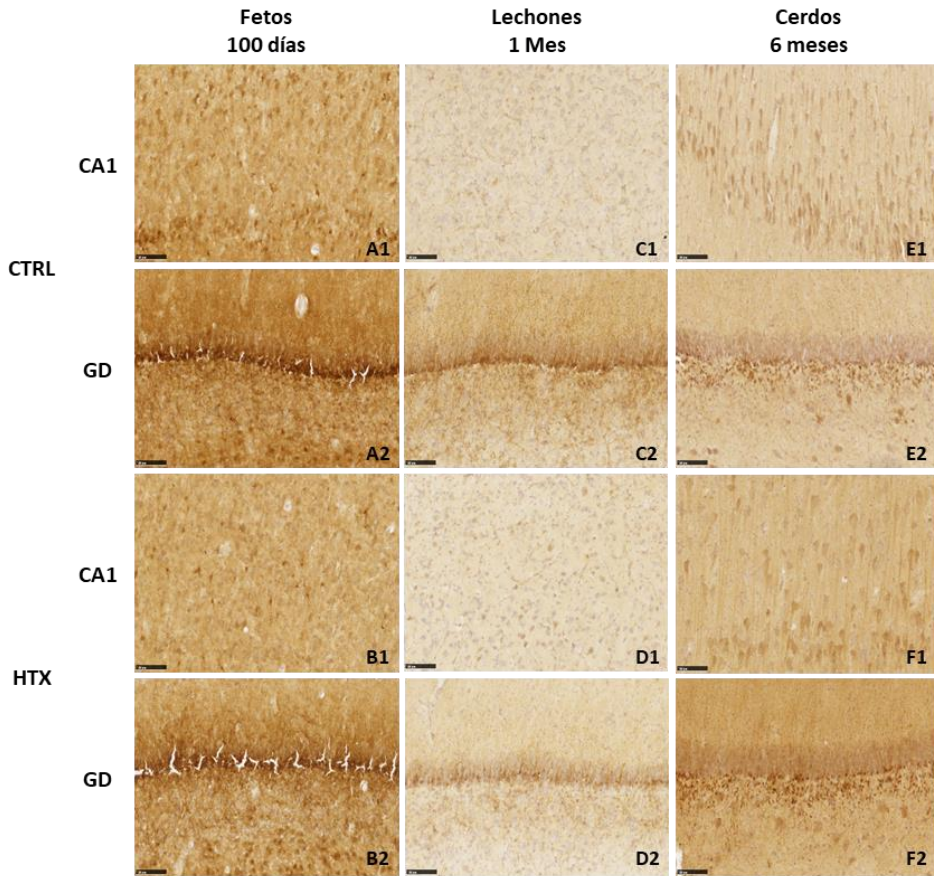


Figura 32. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la inmunotinción con DCX en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días (A1-A2, B1-B2), lechones de 1 mes (C1-C2, D1-D2) y cerdos de 6 meses (E1-E2, F1-F2). Imágenes representativas muestran las neuronas inmaduras inmunoteñidas con el anticuerpo DCX en las áreas CA1 (A1-F1) y GD (A2-F2), de los animales cuyas madres fueron CTRL o suplementadas con HTX respectivamente. Barra de escala = 100 μ m (A1-F1, A2-F2).

Finalmente, la inmunotinción de los neurofilamentos (**NFT**), un marcador del citoesqueleto neuronal marcó fuertemente la neuropila, pero no se observaron diferencias causadas por el tratamiento con HTX a ninguna edad ni en CA1 ni en GD (**Figura 33**).

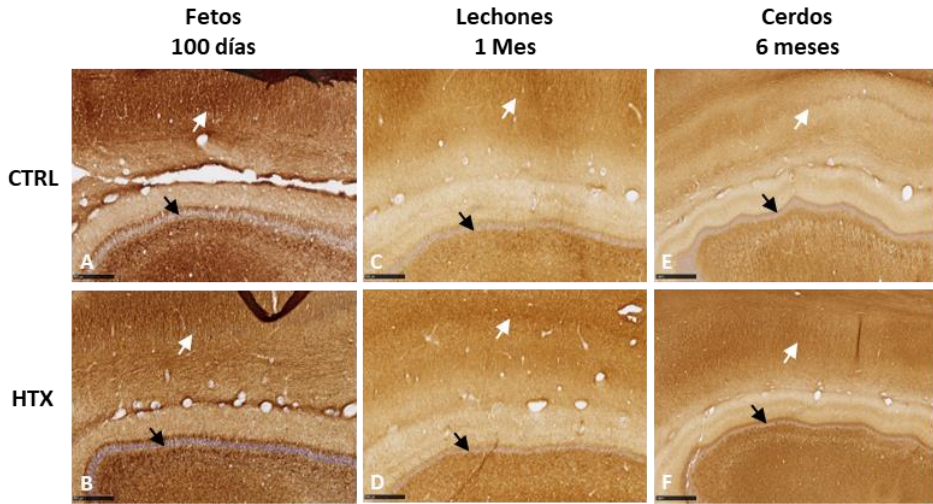


Figura 33. Efecto de la suplementación materna con HTX sobre la inmunotinción de NFT en el hipocampo de fetos de 100 días (A-B), lechones de 1 mes (C-D) y cerdos de 6 meses (E-F). CA1 se indicó con una flecha blanca y GD se mostró con una flecha negra. Barra de escala = 500 μm (A-D) y 1000 μm (E-F).

7. Efecto de la suplementación materna con HTX en el proteoma del hipocampo de los fetos mediante TMT10-plex

Al igual que con los parámetros de estrés oxidativo, se llevó a cabo un experimento proteómico de cuantificación relativa mediante TMT10-plex (ver detalles en **Material y Métodos, apartado 9.1**) para determinar el efecto de la suplementación materna con HTX en el proteoma del hipocampo en fetos de 100 días de edad.

Para identificar las proteínas diferencialmente expresadas en el hipocampo entre las dos condiciones de estudio se utilizaron las mismas muestras de los fetos que en el análisis inmunohistoquímico (**Tabla 11**): 20 muestras (10 de cada condición y de cada sexo).

Para el procesamiento de todas las muestras se realizaron 2 experimentos TMT10-plex. Las muestras se marcaron según la **Tabla 13**, para asegurar aleatoriedad en el marcaje y evitar el posible sesgo introducido por los diferentes *reporter ions*.

Tabla 13. Diseño experimental del TMT10-plex.

	Experimento	
	1	2
126	CH.1	CM.3
127N	CM.5	TH.2
127C	CH.2	TM.3
128N	TM.1	CH.4
128C	TH.5	CM.2
129N	CH.3	TM.4
129C	CM.4	TH.1
130N	TH.4	CM.1
130C	TM.2	CH.5
131	TH.3	TM.5

2 experimentos con 10 marcajes diferenciales para un total de 20 muestras dispuestas aleatoriamente. Las muestras C (CTRL) y T (suplementación con HTX), en las H (hembras) y en los M (machos).

La identificación de los péptidos en la base de datos se realizó mediante el software *Proteome Discoverer v2.5* utilizando un FDR del 1% y la base de datos Uniprot restringida a la taxonomía y contaminantes de *Sus scrofa*. Se identificaron un total de 5745 proteínas, 4479 con al menos 2 péptidos.

La cuantificación de las proteínas se realizó en base a la intensidad de los *reporter ions* derivados del marcaje TMT. La intensidad de marcaje de cada péptido fue normalizada utilizando la abundancia total de cada etiqueta de TMT para minimizar el error debido a la carga de proteína diferente de cada canal, y se calculó la ratio de intensidad de cada proteína entre cada condición (el *fold-change*).

Se realizó un análisis ANOVA de las muestras CTRL frente a las tratadas (HTX) utilizando los datos normalizados. La variabilidad producida por el marcaje de las muestras y también por el sexo de los animales se incluyó en el modelo lineal. Se estableció un *p*-valor ajustado menor de 0,05 y un FC < 0,67 (*down-regulated*) o un FC > 1,5 (*up-regulated*).

Siguiendo estos criterios se identificaron únicamente 11 proteínas diferencialmente abundantes (*differentially abundant proteins*, DAP) (Tabla 14). Tres proteínas eran más abundantes en el grupo cuyas madres habían sido suplementadas con el HTX, y 8 proteínas estaban disminuidas.

El análisis bioinformático de las DAP entre las dos condiciones de estudio se llevó a cabo mediante tres procedimientos.

Tabla 14. Listado de proteínas diferenciales identificadas por TMT10-plex.

Acceso Uniprot	Gen	Identificación	FC	p-valor
F1SMZ6	HSPE1	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	0,06	0,048
F1SP18	TARS1	Threonyl-tRNA synthetase	0,50	0,019
P62863	FAU	40S ribosomal protein S30	0,52	0,002
Q29375	RPL7A	60S ribosomal protein L7a	0,56	0,007
Q29554	HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	0,57	< 0,001
P83884	RPL36	60S ribosomal protein L36	0,60	0,012
A5GFQ0	RPL7	60S ribosomal protein L7	0,60	0,004
F1RQ90	RBMX	RNA-binding motif protein, X chromosome isoform 1	0,65	< 0,001
F1S2X3	ECHDC1	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase 1	1,53	0,049
A0A287ARZ1	TXNDC5	Thioredoxin domain-containing protein 5	1,73	0,020
A0A287A6U0	NRGN	Neurogranin	2,22	0,003

Identificación en Uniprot, gen que codifica la proteína, nombre de la proteína, cambio diferencial entre HTX y CTRL (FC, en rojo *up* aumenta en HTX, en azul *down* disminuye en HTX).

En primer lugar, mediante el *software* PANTHER se obtuvo la clasificación GO (*Gene Ontology*) que agrupó a las proteínas según su **función molecular**. Esta anotación clasificó las 11 DAP en 3 grupos funcionales que se representan en la **Figura 34**.

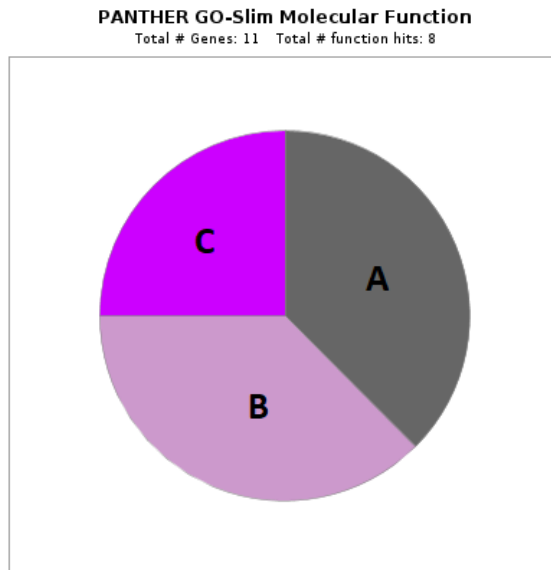


Figura 34. Representación gráfica mediante Panther del análisis de términos GO-Slim según la función molecular de las DAP identificadas. A, de unión; B, actividad catalítica; C, función estructural.

(A) Proteínas de unión (GO: 0005488; 37,5%) que incluye 3 de las proteínas identificadas y representan varias funciones como: unión a iones (GO:0043167; 1 proteína: HSPE1), a compuestos heterocíclicos (GO:1901363; 2 proteínas: RPL7A y RPL7), a compuestos orgánicos (GO:0097159; 2 proteínas: RPL7A y RPL7) y a otras proteínas (GO:0005515; 1 proteína: HSPE1); **(B) Proteínas con actividad catalítica** (GO:0003824; 37,5%) que incluye 3 de las proteínas identificadas y representan actividades como ligasas (GO:0016874; 1 proteína: TARS1), liasas (GO:0016829; 2 proteínas: HADHA y ECHDC1), sobre el RNA (GO:0140098; 1 proteína: TARS1) y oxidoreductasas (GO:0016491; 1 proteína: HADHA); **(C) Proteínas con función estructural** (GO:0005198; 25%) que incluye 2 de las proteínas identificadas, y ambas representan a proteínas estructurales del ribosoma (GO:0003735; RPL36 y RPL7).

Cuando se agruparon las proteínas según los **procesos biológicos** se clasificaron las DAP en 3 grupos representados en la **Figura 35**.

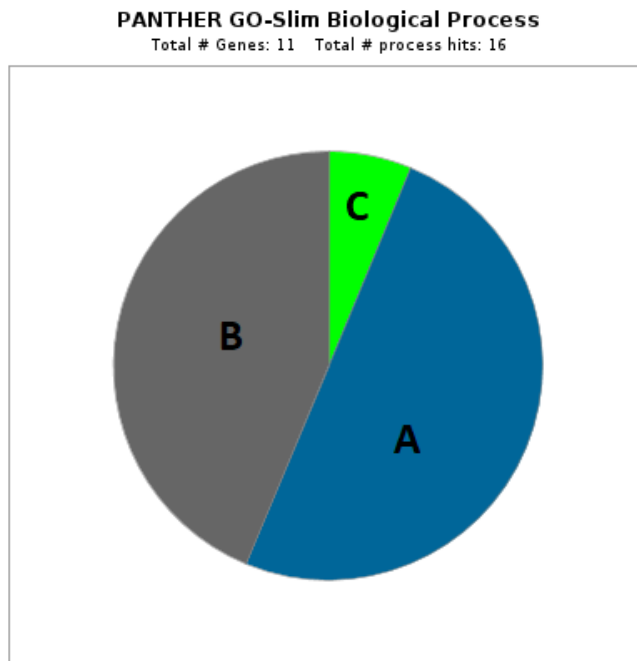


Figura 35. Representación gráfica mediante Panther del análisis de términos GO-Slim según los procesos biológicos de las DAP identificadas. A, procesos celulares; B, regulación metabólica; C, regulación biológica.

(A) Ocho proteínas participan en **procesos celulares** (GO: 0009987; 50%), principalmente metabolismo (GO: 0044237; 7 proteínas: RPL36, RPL7A, RPL7, TARS1, HADHA, ECHDC1 y RBMX), plegamiento de proteínas (GO:0006457; 1 proteína: HSPE1) y organización de componentes celulares o biogénesis (GO:0071840; 2 proteínas: RPL7A y RPL7). **(B)** Siete proteínas (RPL36, RPL7A, RPL7, TARS1, HADHA, ECHDC1 y RBMX) estaban en la categoría de **procesos metabólicos** (GO: 0008152; 44 %), principalmente implicadas en el metabolismo de sustancias orgánicas (GO: 0071704), en el metabolismo celular (GO:0044237) y en el metabolismo primario (GO:0044238). **(C)** Por último, una proteína (RBMX) estaba implicada en la **regulación de procesos biológicos** (GO:0065007; 6%).

En segundo lugar, para la integración del análisis de los términos GO y comprender su interacción y sus vías comunes de función, se realizó un análisis de *pathway* utilizando la herramienta de búsqueda y representación gráfica de *pathways* “KEGG Mapper” del Centro Bioinformático de la Universidad de Kyoto basado en la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG).

Se encontraron destacados los *pathways* de ribosoma o traducción génica con 4 de las proteínas diferenciales involucradas; vías metabólicas con 2 proteínas (involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos y de los aminoácidos), una proteína diferencial involucrada en la biosíntesis de aminoacil-tRNA, una proteína diferencial involucrada en el *spliceosoma* y una proteína diferencial involucrada en el procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico.

El análisis de las vías con Reactome mostró que los nodos principales eran el “Metabolismo” (concretamente β -oxidación de ácidos grasos en la mitocondria); “Metabolismo de las proteínas” (en su mayoría vías relacionadas con la traducción y el plegamiento de proteínas); “Metabolismo del RNA”; “Transducción de señales”; y “Biología del desarrollo” (especialmente guía de axones durante el desarrollo del sistema nervioso).

Finalmente, para la visualización gráfica de estas interacciones se utilizó la herramienta STRING (<http://string-db.org>), que incluye las predicciones de interacciones provenientes de distintas fuentes indicadas en el pie de la **Figura 36**. El análisis mostró la existencia de un nodo principal compuesto por las proteínas ribosómicas.

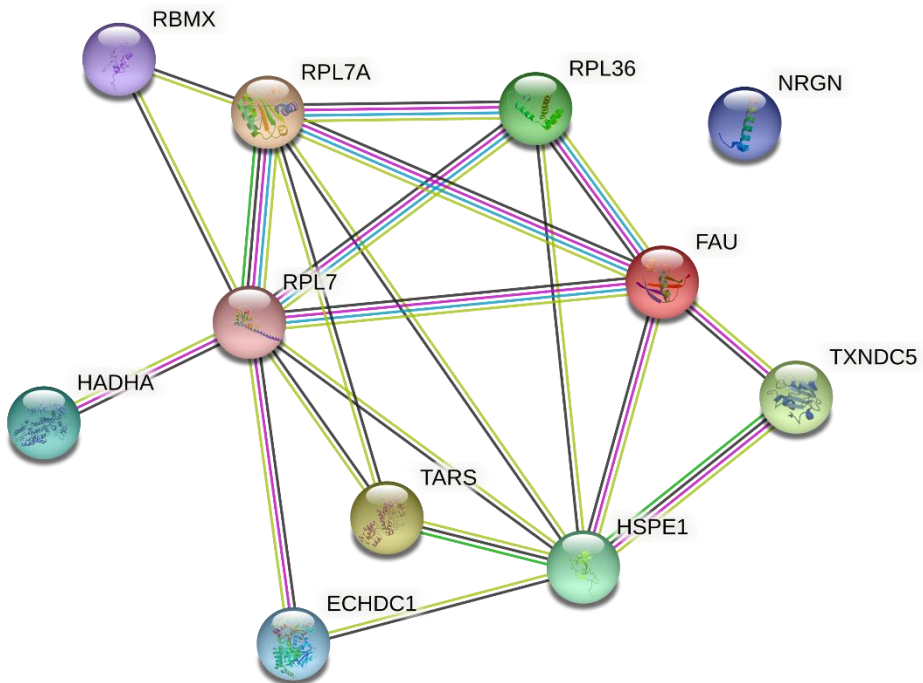


Figura 36. Representación gráfica mediante STRING de las interacciones de las DAP identificadas. Los nodos representan las proteínas identificadas y las líneas representan asociaciones provenientes de distintas fuentes: azul de bases de datos, rosa determinaciones experimentales, verde oscuro predicciones por cercanía de los genes, amarillo por aparición en documentos y negro por co-expresión.

Estudio 2. Efecto de la suplementación materna con el antioxidante hidroxitirosol en el cerebro de fetos de 100 días de gestación afectados por la IUGR.

Dado que hubo un efecto de la suplementación materna con HTX solo en los fetos de 100 días, el siguiente objetivo fue evaluar si el efecto del HTX en esta etapa estaba influenciado por la restricción del crecimiento intrauterino (IUGR).

Al igual que en el estudio anterior, este estudio se llevó a cabo con la colaboración del grupo del Dr. González-Bulnes en el INIA, quienes se encargaron de la cría, mantenimiento, eutanasia y obtención de las muestras.

Este trabajo fue publicado en: N. Yeste et al., "Polyphenols and IUGR Pregnancies: Intrauterine Growth Restriction and Hydroxytyrosol Affect the Development and Neurotransmitter Profile of the Hippocampus in a Pig Model," *Antioxidants*, vol. 10, no. 10, p. 1505, 2021, doi: 10.3390/antiox10101505 [147].

1. Declaración de ética

El estudio fue realizado según la normativa española para la protección de animales RD53/2013, que se encuentra en la Directiva 2010/63/UE de la Unión Europea sobre la protección de animales usados en la investigación. El experimento fue evaluado específicamente y aprobado (Informe CEEA 2013/036) por el Comité de Ética del INIA en investigación animal. Los animales se alojaron en las instalaciones del INIA, que cumple con los requisitos locales, nacionales y europeos de procedimientos científicos.

2. Animales y procedimiento experimental

Para realizar esta parte del proyecto se utilizaron los mismos fetos de 100 días obtenidos en el estudio anterior.

Concretamente, se incluyeron trece cerdas Ibéricas de pura raza que quedaron gestantes tras la sincronización del celo y la inseminación. Desde el inicio del experimento hasta el día 35 de gestación, las cerdas fueron alimentadas con una dieta estándar a base de cereales para cumplir con los requisitos de mantenimiento diario individuales. A partir del día 35 de gestación, fueron alimentadas con la misma dieta estándar pero la cantidad de alimento se redujo el 50% hasta el día del parto. Al reducir la cantidad de comida durante la gestación se produjo un efecto de restricción intrauterina por malnutrición en los fetos. Además, el día 35 de gestación las cerdas se dividieron en dos grupos: 7 hembras permanecieron como grupo de control sin tratar (Grupo CTRL), mientras que las 6 hembras restantes actuaron como grupo tratado al recibir adicionalmente cada día 1,5 mg de hidroxitirosol (HTX) por kg de alimento (Grupo HTX).

Al día 100 de gestación las cerdas fueron eutanasiadas por aturdimiento y exanguinación de acuerdo con los procedimientos estándares RD53/2013. De las 13 hembras gestantes se obtuvieron un total de 100 fetos (55 CTRL y 45 HTX). El día 100 fue elegido porque a partir del día 90 el metabolismo fetal se vuelve independiente de las señales maternas, y es cuando su desarrollo presenta mayor sensibilidad a los requerimientos de nutrientes [148].

Inmediatamente después de obtener los fetos por cesárea, se determinó el sexo mediante inspección visual y se pesaron. Posteriormente, la cabeza fue separada del tronco en la unión atlanto-occipital, y se retiró el encéfalo del cráneo. Finalmente, fueron diseccionadas distintas regiones cerebrales. Para la cuantificación de neurotransmisores se diseccionaron la amígdala, uno de los hipocampos y la corteza prefrontal, que se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C , y para llevar a cabo el análisis inmunohistoquímico se diseccionó el hipocampo restante.

3. Clasificación de los animales

Los animales se catalogaron en dos grupos en función de su peso, “*low body weight*” (LBW, afectados por la IUGR) y “*normal body weight*” (NBW, animales normales) siguiendo el siguiente criterio: se obtuvieron las medias y las desviaciones estándares (SD) de los pesos de las crías agrupándolas por su sexo y por la madre de la que provenían. Una vez calculadas, los animales cuyo peso fueran inferior a su correspondiente promedio menos una SD se catalogaron como LBW, así mismo los que no cumplían esta condición se asignaron como NBW (Tabla 15). Este umbral de peso se usa comúnmente para identificar los efectos de la IUGR y la descendencia con un mayor riesgo de mortalidad perinatal [149].

Mediante estos criterios se obtuvieron 17 fetos afectados por la IUGR: 11 fetos CTRL-LBW (6 hembras y 5 machos) y 6 fetos HTX-LBW (3 hembras y 3 machos) (Figura 37).

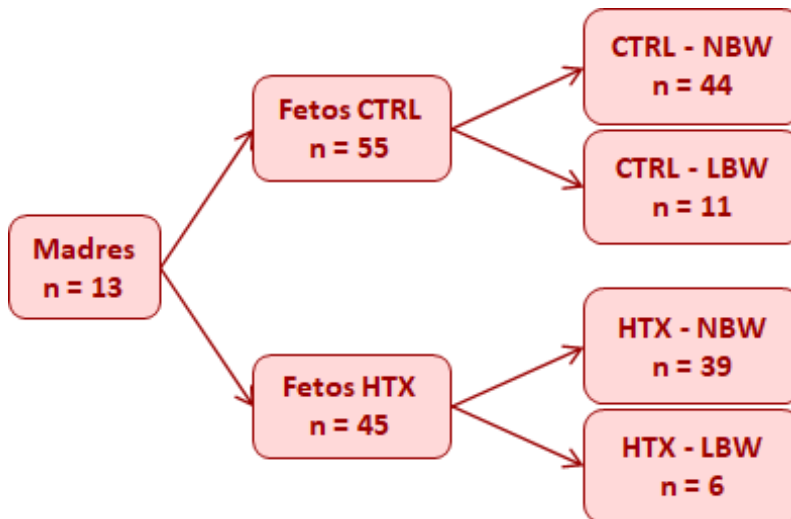


Figura 37. Esquema del diseño experimental de este estudio.

Tabla 15. Información de los fetos utilizados para cada tratamiento.

	Madre	N hijos	Sexo	N	Media \pm SD	NBW	LBW
						(n; media \pm SD)	(n; media \pm SD)
CTRL	1	7	Hembras	6	592,8 \pm 187,9	5; 668,6 \pm 32,9	1; 214
			Machos	1	753,0	1; 753	-
	2	9	Hembras	4	760,3 \pm 115,4	3; 815,7 \pm 39,5	1; 594
			Machos	5	826,0 \pm 64,5	4; 849,0 \pm 45,0	1; 734
	3	10	Hembras	7	634,7 \pm 98,5	5; 684,0 \pm 62,2	2; 511,5 \pm 14,8
			Machos	3	695,3 \pm 47,0	2; 719,0 \pm 32,5	1; 648
	4	5	Hembras	3	798,3 \pm 49,6	3; 798,3 \pm 49,6	-
			Machos	2	781,5 \pm 38,9	2; 781,5 \pm 38,9	-
	5	7	Hembras	2	816,0 \pm 11,3	2; 816,0 \pm 11,3	-
			Machos	5	880,4 \pm 80,0	4; 906,3 \pm 63,8	1; 777
	6	9	Hembras	4	652,5 \pm 51,7	3; 675,3 \pm 29,6	1; 584
			Machos	5	650,6 \pm 106,3	4; 691,3 \pm 63,6	1; 488
	7	8	Hembras	5	817,8 \pm 62,3	4; 838,5 \pm 48,1	1; 735
			Machos	3	726,7 \pm 260,8	2; 874,0 \pm 76,4	1; 432
Total	55	Hembras	31	702,2 \pm 135,5	25; 744,7 \pm 83,6	6; 525,0 \pm 173,0	
		Machos	24	765,3 \pm 131,8	19; 804,6 \pm 96,5	5; 615,8 \pm 150,9	
HTX	8	10	Hembras	4	558,3 \pm 101,2	3; 607,3 \pm 30,0	1; 411
			Machos	6	612,5 \pm 148,3	5; 657,0 \pm 112,4	1; 390
	9	10	Hembras	5	626,0 \pm 162,4	4; 695,0 \pm 58,6	1; 350
			Machos	5	675,8 \pm 184,9	4; 741,5 \pm 129,7	1; 413
	10	9	Hembras	7	734,4 \pm 78,9	7; 734,4 \pm 78,9	-
			Machos	2	664,0 \pm 179,6	1; 791	1; 537
	11	5	Hembras	2	703,0 \pm 1,4	2; 703,0 \pm 1,4	-
			Machos	3	721,7 \pm 21,1	3; 721,7 \pm 21,1	-
	12	3	Hembras	2	667,5 \pm 10,6	2; 667,5 \pm 10,6	-
			Machos	1	704,0	1; 704	-
	13	8	Hembras	6	635,7 \pm 63,2	5; 660,0 \pm 23,6	1; 514
			Machos	2	715,0 \pm 18,4	2; 715,0 \pm 18,4	-
	Total	45	Hembras	26	656,1 \pm 107,1	23; 686,3 \pm 64,6	3; 425,0 \pm 82,9
			Machos	19	667,4 \pm 132,0	16; 708,8 \pm 92,1	3; 446,7 \pm 79,1

Se muestra la identificación de la madre, la cantidad de fetos en la camada, la media de los pesos según el sexo (en gramos) \pm SD, y el número de fetos NBW y LBW con su peso medio.

4. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo con el software SPSS 24.0 (IBM, Chicago, IL, USA). El nivel de significancia fue establecido en $p < 0,05$, y la tendencia fue considerada en $0,05 \leq p \leq 0,1$. Los datos descriptivos se presentan con la media y el error estándar (media \pm SE).

Antes de hacer el análisis estadístico se realizó el test de normalidad Kolmogórov-Smirnov, y en los casos necesarios, los datos fueron transformados a valores logarítmicos para corregir la distribución y permitir el uso de estadística paramétrica.

Todas las variables fueron analizadas usando el test UNIANOVA de SPSS con ajuste de Bonferroni. Cada animal fue introducido como la unidad experimental, los efectos fijos incluidos fueron el sexo (hembra o macho), el peso corporal al nacer (NBW o LBW) y el tratamiento (CTRL o HTX), y la interacción entre ellos.

5. Perfil de neurotransmisores

Los fetos se clasificaron como NBW o LBW como se ha descrito anteriormente, y se analizó el efecto del sexo, de la IUGR (según el peso) y de la suplementación materna con HTX en las tres áreas diseccionadas del cerebro (hipocampo, amígdala y corteza prefrontal) (**Tabla 16**).

Tal como se ha descrito detalladamente en el Estudio 1 se observó un efecto generalizado del HTX sobre el perfil de neurotransmisores, por eso, se pasó a analizar si este efecto era influenciado por la IUGR.

En la **amígdala**, la IUGR no afectó a ninguna variable, ya que no se vieron diferencias entre animales con peso NBW y peso LBW. Tampoco se observaron interacciones entre el tratamiento y el peso corporal, pero llama la atención que en los neurotransmisores principales (NA, DA y 5-HT) el efecto del HTX solo era

significativo en los fetos con peso NBW, mientras que en los fetos LBW no se observaron diferencias para estos neurotransmisores.

En el **hipocampo** no se vieron diferencias entre animales con peso NBW y peso LBW. Sí que se observó una interacción entre el tratamiento con HTX y el peso corporal al nacer en los niveles de 5-HT ($p = 0,016$), una tendencia en los niveles del metabolito 5-HIAA, y en consecuencia un efecto también en las indolaminas totales ($p = 0,021$), lo que indicó que la suplementación materna con HTX afectó diferencialmente a los fetos NBW y LBW.

Al analizar en detalle esta interacción, se encontraron valores más altos de 5-HT (**Figura 38A**), y por lo tanto de indolaminas (**Figura 38B**), en los fetos LBW que en los fetos NBW del grupo CTRL ($p = 0,015$ y $p = 0,016$, respectivamente, en la comparación por pares). Las diferencias debidas al peso corporal desaparecieron en el grupo tratado con HTX ($p = 0,285$ y $p = 0,305$, respectivamente), indicando que el efecto de la IUGR sobre las indolaminas desapareció cuando se produjo la suplementación materna con el HTX.

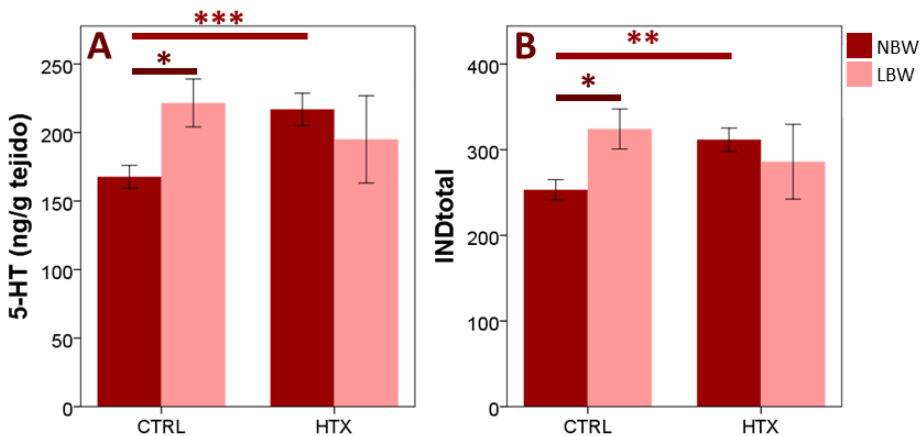


Figura 38. Representación gráfica de la interacción del tratamiento con HTX y del peso sobre la concentración de 5-HT (A) e indolaminas totales (B) en el hipocampo. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales NBW, y las **barras claras** representan los resultados de los animales LBW. Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

En la **corteza prefrontal** hubo una tendencia del peso al nacer sobre los compuestos dopaminérgicos y las catecolaminas totales, indicando que los animales con peso LBW tienden a tener niveles más altos de estos compuestos que los NBW. Al igual que en la amígdala no se observaron interacciones entre el tratamiento y el peso corporal en ninguna de estas dos áreas del cerebro.

Por último, se analizó la interacción entre el peso corporal y el sexo de los fetos (**Tabla Suplementaria 2**), pero no se encontraron diferencias significativas para ninguna variable en ninguna de las tres áreas. Solo se observó en la amígdala que los animales machos tenían mayores niveles de NA (**Figura 39A**). Al separar los animales según el peso, se pudo observar que las diferencias debidas al sexo solo se producían en los animales LBW ($p = 0,009$), mientras que en los animales NBW se quedó en tendencia ($p = 0,055$) (**Figura 39B**).

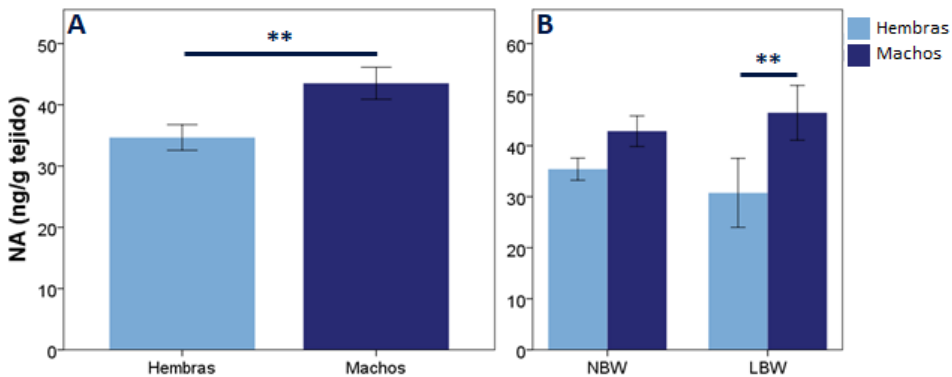


Figura 39. Representación gráfica del efecto del sexo (A), y de la interacción del sexo con el peso (B) sobre la concentración de NA en la amígdala. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras claras** representan los resultados de las hembras, y las **barras oscuras** representan los resultados de los machos. Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p < 0,01$).

Tabla 16. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en las distintas áreas cerebrales en función de la suplementación de la dieta materna con o sin HTX en los fetos de 100 días según su peso.

		NBW	LBW	<i>p</i> -valor			
				Tratamiento	Peso	Interacción	
Amígdala	NA	CTRL	44,21 ± 2,58 ^{Aa}	43,19 ± 6,62 ^{Aa}	0,001	0,416	0,782
		HTX	31,86 ± 2,07 ^{Ba}	28,87 ± 3,29 ^{Aa}			
	DA	CTRL	203,11 ± 15,12 ^{Aa}	209,35 ± 17,91 ^{Aa}	0,007	0,634	0,254
		HTX	323,89 ± 37,27 ^{Ba}	221,13 ± 40,22 ^{Aa}			
	DOPAC	CTRL	96,16 ± 4,96 ^{Aa}	89,59 ± 8,28 ^{Aa}	< 0,001	0,242	0,605
		HTX	146,44 ± 7,86 ^{Ba}	121,89 ± 9,58 ^{Ba}			
	HVA	CTRL	293,51 ± 15,37 ^{Aa}	300,58 ± 26,15 ^{Aa}	< 0,001	0,414	0,811
		HTX	427,84 ± 16,18 ^{Ba}	462,96 ± 37,87 ^{Ba}			
	DOPtotal	CTRL	592,78 ± 31,15 ^{Aa}	599,52 ± 43,49 ^{Aa}	< 0,001	0,882	0,517
		HTX	898,18 ± 53,17 ^{Ba}	805,98 ± 57,19 ^{Aa}			
	CATtotal	CTRL	636,99 ± 30,55 ^{Aa}	642,71 ± 45,21 ^{Aa}	< 0,001	0,805	0,511
		HTX	930,04 ± 52,74 ^{Ba}	834,85 ± 60,05 ^{Aa}			
	5-HT	CTRL	318,35 ± 16,40 ^{Aa}	288,10 ± 28,86 ^{Aa}	< 0,001	0,299	0,977
		HTX	423,20 ± 19,27 ^{Ba}	380,60 ± 42,48 ^{Aa}			
5-HIAA	CTRL	112,38 ± 5,88 ^{Aa}	117,74 ± 12,47 ^{Aa}	< 0,001	0,869	0,614	
	HTX	164,75 ± 6,39 ^{Ba}	154,05 ± 11,72 ^{Ba}				
INDtotal	CTRL	430,73 ± 20,51 ^{Aa}	405,84 ± 36,40 ^{Aa}	< 0,001	0,376	0,813	
	HTX	587,94 ± 23,34 ^{Ba}	534,64 ± 52,34 ^{Aa}				
Corteza Prefrontal	NA	CTRL	27,54 ± 1,37 ^{Aa}	24,79 ± 2,33 ^{Aa}	< 0,001	0,880	0,296
		HTX	19,63 ± 1,03 ^{Ba}	21,81 ± 3,20 ^{Aa}			
	DA	CTRL	93,18 ± 13,94 ^{Aa}	84,36 ± 17,31 ^{Aa}	< 0,001	0,506	0,940
		HTX	19,79 ± 0,62 ^{Ba}	20,84 ± 1,05 ^{Ba}			
	DOPAC	CTRL	16,73 ± 1,19 ^{Aa}	18,97 ± 1,73 ^{Aa}	< 0,001	0,309	0,813
		HTX	24,94 ± 1,57 ^{Ba}	28,99 ± 4,27 ^{Aa}			
	HVA	CTRL	152,01 ± 9,65 ^{Aa}	177,46 ± 14,84 ^{Aa}	< 0,001	0,111	0,781
		HTX	224,55 ± 14,69 ^{Ba}	287,19 ± 26,55 ^{Ba}			
	DOPtotal	CTRL	261,93 ± 19,18 ^{Aa}	280,79 ± 17,51 ^{Aa}	0,297	0,071	0,588
		HTX	269,27 ± 16,40 ^{Aa}	337,02 ± 30,02 ^{Aa}			
	CATtotal	CTRL	289,46 ± 19,52 ^{Aa}	305,57 ± 19,08 ^{Aa}	0,538	0,084	0,498
		HTX	288,90 ± 16,58 ^{Aa}	358,83 ± 32,27 ^{Aa}			
	5-HT	CTRL	76,49 ± 3,27 ^{Aa}	75,76 ± 9,03 ^{Aa}	0,003	0,110	0,239
		HTX	101,91 ± 6,89 ^{Ba}	74,30 ± 9,29 ^{Aa}			
5-HIAA	CTRL	54,70 ± 3,20 ^{Aa}	68,13 ± 7,09 ^{Ab}	< 0,001	0,289	0,401	
	HTX	90,58 ± 5,58 ^{Ba}	93,87 ± 3,39 ^{Ba}				
INDtotal	CTRL	131,19 ± 5,17 ^{Aa}	143,88 ± 12,55 ^{Aa}	< 0,001	0,787	0,216	
	HTX	192,49 ± 9,59 ^{Ba}	168,17 ± 10,33 ^{Aa}				

			NBW	LBW	<i>p</i> -valor		
					Tratamiento	Peso	Interacción
Hipocampo	NA	CTRL	57,82 ± 3,13 ^{Aa}	73,47 ± 10,71 ^{Aa}	< 0,001	0,383	0,235
		HTX	81,20 ± 4,07 ^{Ba}	81,53 ± 13,24 ^{Aa}			
	DA	CTRL	95,86 ± 10,99 ^{Aa}	106,74 ± 13,06 ^{Aa}	0,788	0,414	0,374
		HTX	88,85 ± 5,18 ^{Aa}	85,58 ± 9,92 ^{Aa}			
	DOPAC	CTRL	53,72 ± 7,22 ^{Aa}	57,24 ± 16,99 ^{Aa}	< 0,001	0,703	0,824
		HTX	76,71 ± 8,73 ^{Ba}	97,42 ± 32,47 ^{Aa}			
	HVA	CTRL	197,59 ± 14,50 ^{Aa}	259,56 ± 31,19 ^{Ab}	< 0,001	0,076	0,404
		HTX	270,10 ± 14,04 ^{Ba}	306,08 ± 46,88 ^{Aa}			
	DOPtotal	CTRL	347,17 ± 24,87 ^{Aa}	423,54 ± 49,48 ^{Aa}	0,001	0,140	0,480
		HTX	435,66 ± 19,97 ^{Ba}	489,08 ± 78,44 ^{Aa}			
	CATtotal	CTRL	404,99 ± 26,96 ^{Aa}	497,00 ± 59,46 ^{Aa}	< 0,001	0,151	0,433
		HTX	516,86 ± 22,09 ^{Ba}	570,61 ± 88,46 ^{Aa}			
	5-HT	CTRL	167,74 ± 8,29 ^{Aa}	221,61 ± 17,48 ^{Ab}	0,017	0,482	0,019
		HTX	216,95 ± 11,75 ^{Ba}	195,07 ± 31,84 ^{Aa}			
	5-HIAA	CTRL	85,51 ± 4,57 ^{Aa}	102,58 ± 8,98 ^{Aa}	0,155	0,461	0,096
		HTX	94,76 ± 3,07 ^{Ba}	90,99 ± 12,18 ^{Aa}			
	INDtotal	CTRL	253,25 ± 11,84 ^{Aa}	324,19 ± 23,37 ^{Ab}	0,026	0,468	0,021
		HTX	311,71 ± 13,64 ^{Ba}	286,05 ± 43,64 ^{Aa}			

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Unidades ng/g de tejido. Las filas muestran los neurotransmisores y los metabolitos de cada área cerebral en función del tratamiento (CTRL o HTX). Las columnas dividen los fetos en función de su peso (NBW o LBW). Los superíndices y los *p*-valores en negrita indican las diferencias significativas. Diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas entre los tratamientos en cada grupo de pesos ($p < 0,05$). Diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas entre los pesos en cada tratamiento ($p < 0,05$).

6. Parámetros de estrés oxidativo

Se determinaron varios marcadores de estrés oxidativo y enzimas antioxidantes en la corteza prefrontal y en el hipocampo para determinar si la IUGR podría afectar el estado redox del cerebro, y si la suplementación materna con el HTX podría revertir estos efectos.

Los resultados (**Tabla 17**) muestran que no había diferencias significativas entre los animales NBW y los animales LBW en ningún de los parámetros analizados, ni en la corteza prefrontal ni en el hipocampo, por lo que la IUGR no afectó al estado oxidativo del cerebro.

Tabla 17. Efecto de la IUGR sobre los marcadores de estrés oxidativo y las enzimas antioxidantes en la corteza prefrontal y el hipocampo.

		MDA (pmol/g tejido)	TAS (μ mol/g tejido)	GPX (U/g tejido)	SOD (U/g tejido)
	NBW	1,38 \pm 0,07	7,89 \pm 0,05	1,73 \pm 0,10	10,70 \pm 0,06
PFC	LBW	1,24 \pm 0,10	7,99 \pm 0,10	1,67 \pm 0,19	10,89 \pm 0,15
	p-valor	0,330	0,420	0,790	0,233
	NBW	45,56 \pm 1,16	7,50 \pm 0,07	1,81 \pm 0,12	9,97 \pm 0,09
HPC	LBW	44,69 \pm 2,25	7,48 \pm 0,07	2,05 \pm 0,38	10,07 \pm 0,11
	p-valor	0,811	0,989	0,502	0,681

Los resultados se presentan como la media \pm SE.

También se analizó el efecto de la interacción de la IUGR y de la suplementación materna con HTX. Al no haber efectos de la IUGR, los animales NBW o LBW, independientemente de si las madres habían recibido la suplementación con el HTX o no, presentaban las mismas concentraciones. Las diferencias observadas en la corteza prefrontal en el primer estudio, entre los animales CTRL y HTX, se produjeron por igual entre los animales NBW y LBW.

Por último, también se analizó el efecto del sexo y no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los parámetros.

7. Análisis inmunohistoquímico del hipocampo

Para realizar el estudio IHQ del hipocampo se aplicaron los criterios descritos anteriormente, tanto para la clasificación como la agrupación de los fetos, pero el número de muestras estuvo limitado por el número de individuos LBW (11 en el grupo CTRL y 6 en el grupo HTX).

En el diseño del ensayo inmunohistoquímico se balancearon el número de fetos de los grupos NBW con los LBW. Tomando como factor limitante los individuos LBW, se eligieron parejas de lechones NBW de la misma madre y sexo para cada feto LBW. Por lo tanto, a partir de una misma madre de cada feto LBW se escogió otra cría del mismo sexo que tuviera el peso más elevado (**Tabla 18**). Usando estos criterios de selección en total se obtuvieron 20 animales del grupo CTRL: 10 LBW (5 hembras y 5 machos) y 10 NBW (5 hembras y 5 machos); y 12 animales del grupo HTX: 6 LBW (3 hembras y 3 machos) y 6 NBW (3 hembras y 3 machos).

Tabla 18. Peso corporal medio y número de individuos incluidos en el análisis inmunohistoquímico.

CTRL		HTX	
711,8 ± 34,3 (20)		626,4 ± 60,4 (12)	
NBW	LBW	NBW	LBW
822,1 ± 29,3 (10)	601,5 ± 37,5 (10)	817,0 ± 24,8 (6)	435,8 ± 29,9 (6)

Se muestra la media de los pesos según el tratamiento y el peso (en gramos) ± la desviación estándar de la media (SD), y entre paréntesis el número de fetos usados en cada grupo.

Para analizar los efectos del peso sobre la morfología del hipocampo se utilizaron los anticuerpos contra los marcadores neuronales: NeuN, DCX y NFT, como marcadores de neuronas maduras, neuronas inmaduras, y neurofilamentos, respectivamente.

Los marcadores se evaluaron en distintas áreas del hipocampo, en el *Cornu Ammonis* (CA1, CA2 y CA3) y en el *Gyrus Dentatus* (interno y externo). Las diferencias principales se encontraron en CA1 y en la parte interna del GD,

mientras que no se observó ningún efecto en CA2 y CA3, por lo que CA1 y GD son las áreas que se explican a continuación.

Como se ha descrito en el Estudio 1 se observó un efecto generalizado del HTX, por eso se pasó a analizar si este efecto era influenciado por la IUGR.

El primer marcador usado para evaluar los efectos de la IUGR fue **NeuN**. Es un marcador de los cuerpos y núcleos neuronales en las neuronas maduras, y se utilizó para analizar el número y la distribución de neuronas maduras en las áreas CA1 y GD en el hipocampo de los fetos de 100 días (**Figura 40** y **Figura 41**). Se observó una mayor positividad en los fetos NBW que en los fetos LBW, indicando así que los animales NBW tenían una mayor cantidad de neuronas maduras.

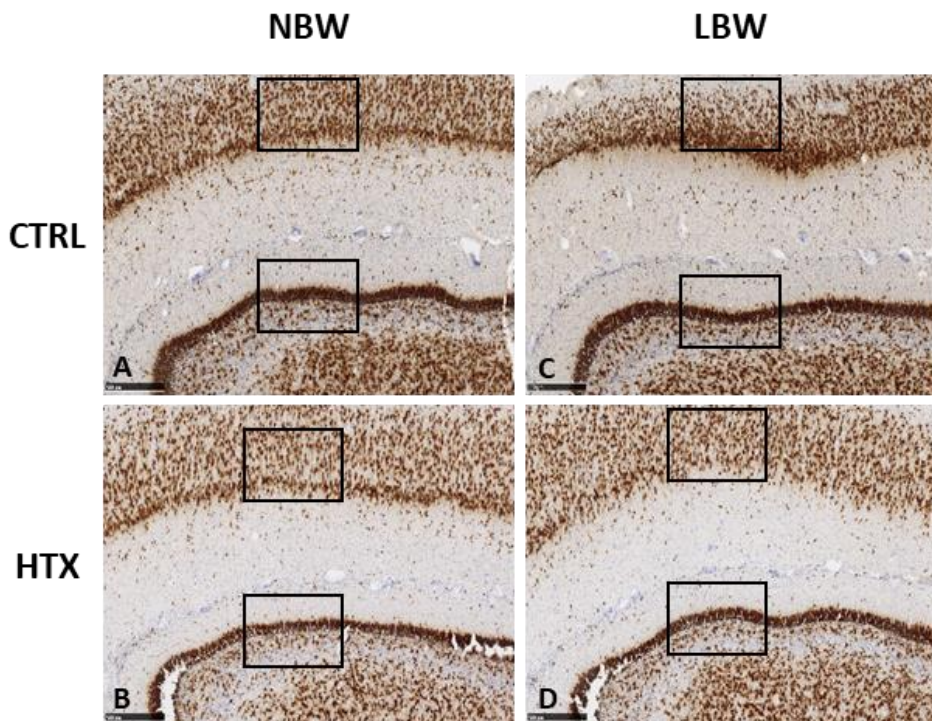


Figura 40. Efecto de la suplementación materna con HTX y de la IUGR sobre la inmunotinción con NeuN en el hipocampo de fetos de 100 días. Imágenes representativas muestran las neuronas maduras de los animales con peso NBW (A-B), o con peso LBW (C-D). En recuadros negros se muestran las áreas CA1 y GD ampliadas en la Figura 41. Barra de escala = 500 μ m (A-D).

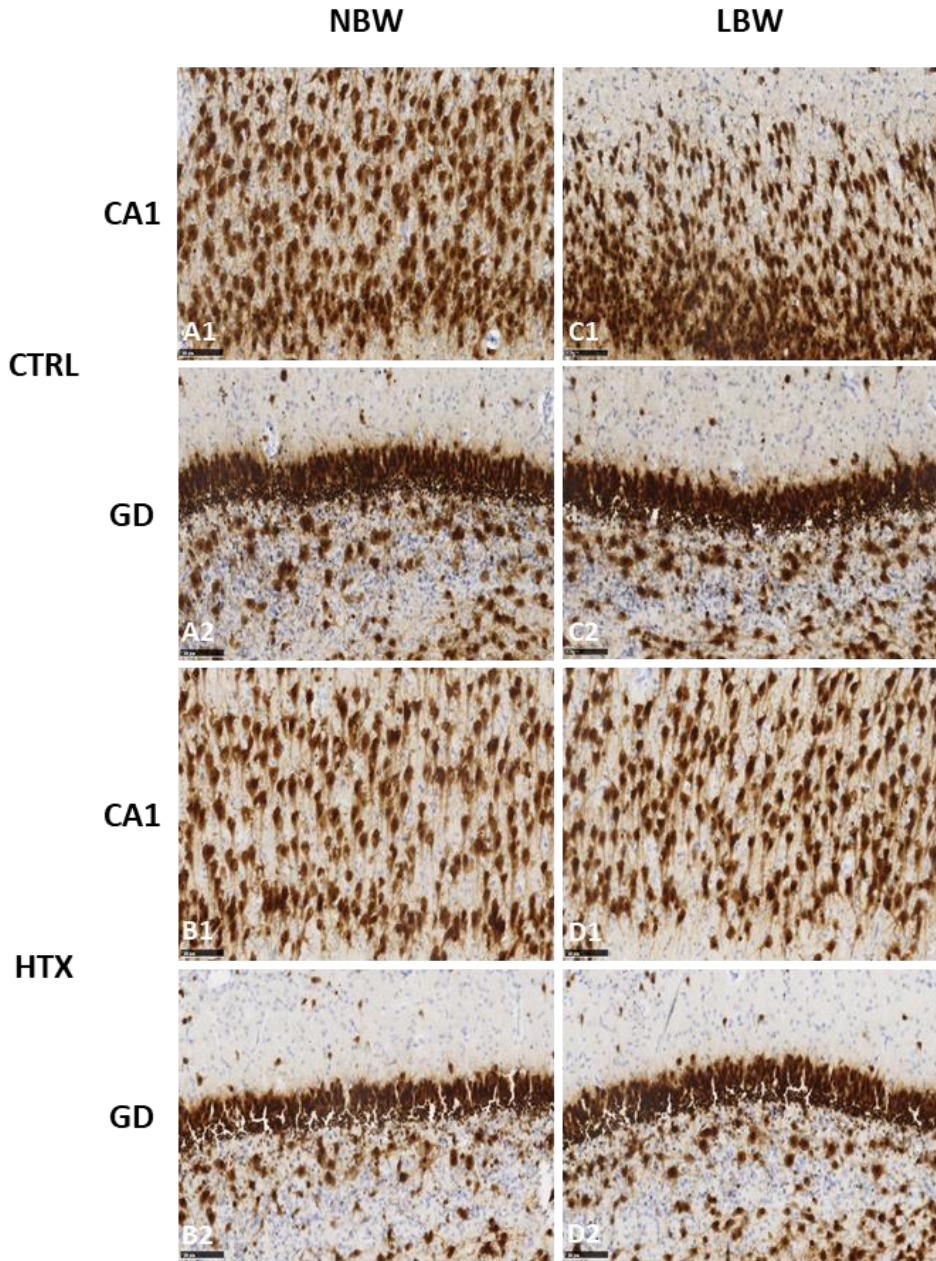


Figura 41. Efecto de la suplementación materna con HTX y de la IUGR sobre la inmunotinción con NeuN en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días. Imágenes representativas muestran las neuronas maduras en las áreas CA1 (A1-D1) y GD (A2-D2), de los animales con peso NBW (A1-A2, B1-B2), o con peso LBW (C1-C2, D1-D2). Barra de escala = 100 μ m (A1-D1, A2-D2).

Los resultados cuantitativos se presentan en la **Tabla 19**. Se observó que el peso al nacer tuvo un efecto significativo solo en el área CA1, pero no en el GD, lo que indica que la IUGR afectó principalmente a esta región. El recuento de neuronas maduras fue menor en los fetos LBW, con un tamaño de núcleo celular medio y un porcentaje de área más altos.

Tabla 19. Efecto de la dieta y del peso al nacer de los fetos sobre la inmunotinción de NeuN en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días.

				<i>p</i> -valor			
		NBW	LBW	Tratamiento	Peso	Interacción	
CA1	Nº neuronas	CTRL	143,06 ± 9,02 ^{Aa}	87,25 ± 11,40 ^{Ab}	< 0,001	0,004	0,035
		HTX	170,86 ± 9,69 ^{Ba}	162,00 ± 6,04 ^{Ba}			
	Tamaño medio (µm ²)	CTRL	1352,44 ± 247,19 ^{Aa}	2961,48 ± 676,06 ^{Ab}	< 0,001	0,013	0,015
		HTX	817,85 ± 61,87 ^{Aa}	834,88 ± 44,94 ^{Ba}			
	Área (%)	CTRL	33,48 ± 1,29 ^{Aa}	41,63 ± 2,76 ^{Ab}	< 0,001	0,007	0,033
		HTX	30,07 ± 0,99 ^{Aa}	31,07 ± 1,14 ^{Ba}			
GD	Nº neuronas	CTRL	79,91 ± 2,25 ^{Aa}	79,33 ± 4,55 ^{Aa}	0,045	0,831	0,719
		HTX	86,50 ± 3,64 ^{Aa}	88,75 ± 6,03 ^{Aa}			
	Tamaño medio (µm ²)	CTRL	1449,37 ± 51,72 ^{Aa}	1620,75 ± 116,92 ^{Aa}	< 0,001	0,677	0,014
		HTX	1248,78 ± 62,85 ^{Ba}	1009,78 ± 48,95 ^{Ba}			
	Área (%)	CTRL	26,34 ± 0,55 ^{Aa}	28,76 ± 0,61 ^{Ab}	< 0,001	0,282	< 0,001
		HTX	24,49 ± 0,49 ^{Ba}	20,52 ± 0,76 ^{Bb}			

Los resultados se presentan como la media ± SE. Las filas muestran cada medida realizada en función del tratamiento (CTRL o HTX). Las columnas dividen los fetos en función de su peso al nacer (NBW o LBW). Los superíndices y los *p*-valores en negrita indican las diferencias significativas. La significación estadística fue determinada mediante el test UNIANOVA con ajuste de Tukey, con un mínimo de 6 secciones por individuo. Diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas entre los tratamientos en cada grupo de pesos (*p* < 0,05). Diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas entre los pesos en cada tratamiento (*p* < 0,05).

En la comparación por pares, es interesante notar que las diferencias entre los animales NBW y LBW en CA1 solo se observaron en aquellos fetos cuyas madres fueron CTRL (nº neuronas, *p* < 0,001; tamaño medio, *p* < 0,001; área, *p* = 0,001), mientras que no se observaron diferencias cuando las madres fueron suplementadas con HTX (nº neuronas, *p* = 0,580; tamaño medio, *p* = 0,971; área, *p* = 0,679).

En cuanto a los efectos de la suplementación materna, el tratamiento con HTX aumentó el número de neuronas y disminuyó el tamaño medio de los núcleos en CA1, especialmente en los fetos LBW (n° neuronas, $p < 0,001$; tamaño medio, $p < 0,001$; área, $p < 0,001$), mientras que este efecto fue mucho menos significativo en los fetos NBW (n° neuronas, $p = 0,027$; tamaño medio, $p = 0,139$; área, $p = 0,069$).

En el GD, no hubo diferencias debido al peso corporal y los efectos de HTX fueron los mismos que en CA1, es decir, hubo un aumento del n° neuronas y una disminución en el tamaño medio de los núcleos tanto en los fetos NBW como en los LBW. En la comparación por pares, se pudo observar que los efectos en los fetos LBW fueron en general más significativos que en los fetos NBW (fetos LBW: n° neuronas, $p = 0,152$; tamaño medio, $p < 0,001$; área, $p < 0,001$; y en los fetos NBW: n° neuronas, $p = 0,135$; tamaño medio, $p = 0,030$; área, $p = 0,025$).

Por lo tanto, las características neuronales del grupo LBW-HTX se parecieron más a las de los fetos NBW, especialmente al grupo NBW-HTX, y las diferencias entre los fetos NBW y LBW observadas en los animales CTRL desaparecieron o fueron menos relevantes en los animales cuyas madres fueron suplementadas con HTX.

Por último, la evaluación de NeuN en el hipocampo mostró que no había influencia del sexo ni en CA1 ni en GD (**Tabla 20**).

Tabla 20. Efecto del sexo de los fetos sobre la inmunotinción de NeuN en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días.

		Nº neuronas	Área (%)	Tamaño medio (μm^2)
CA1	Hembras	140,86 \pm 7,87	34,28 \pm 1,18	1476,26 \pm 230,53
	Machos	150,88 \pm 8,72	32,25 \pm 1,23	1231,52 \pm 234,74
	<i>p</i> -valor	0,398	0,243	0,466
GD	Hembras	81,63 \pm 2,40	25,06 \pm 0,58	1370,16 \pm 59,49
	Machos	83,50 \pm 2,52	26,48 \pm 0,57	1395,74 \pm 54,32
	<i>p</i> -valor	0,601	0,097	0,763

Los resultados se presentan como la media \pm SE. La significación estadística fue determinada mediante el test UNIANOVA con ajuste de Tukey, con un mínimo de 6 secciones por individuo.

Con el marcaje de la proteína doblecortina (**DCX**) se visualizaron células neuronales precursoras durante su migración y diferenciación (neuroblastos). Cabe señalar que el fondo de tinción excesivo no permitió la cuantificación de neuronas positivas a DCX.

Como se puede observar en la **Figura 42** y en la **Figura 43**, si comparamos los grupos cuyas madres eran CTRL, los fetos LBW presentaban un mayor marcaje en el área CA1 que los fetos NBW, indicando así que había un mayor número de neuronas inmaduras. Estos resultados fueron inversos a los resultados obtenidos con el marcaje de NeuN, donde había un menor número de neuronas maduras.

Al observar los individuos LBW cuyas madres recibieron el tratamiento con HTX se pudo ver una inmunotinción de DCX más débil en CA1, lo que condujo a una situación más similar a la de los fetos NBW del grupo CTRL.

En el GD se observaron resultados similares que los descritos en el CA1. Los animales LBW presentaban mayor marcaje que los NBW, y esto se revirtió en los fetos cuyas madres recibieron el HTX. Además, en el GD se procedió a medir su grosor para confirmar los resultados cualitativos, y así determinar la cantidad de neuronas inmaduras que formaban esta área. Se observó que los neuroblastos, las neuronas inmaduras que formaban esta área, formaban una

franja más estrecha en los fetos NBW que en los fetos LBW ($38,3 \pm 2,1 \mu\text{m}$ en los NBW y $46,2 \pm 3,5 \mu\text{m}$ en los LBW, $p = 0,024$), sugiriendo que los NBW tenían menos neuronas inmaduras porque ya estaban migrando hacia las demás áreas.

Al diferenciar los animales en función de si sus madres habían recibido el HTX o no, se observó que el grosor del GD en los animales LBW cuyas madres recibieron el HTX tenían una tendencia a ser menor que el grosor en los fetos que no recibieron el HTX ($38,9 \pm 2,6 \mu\text{m}$ en los LBW-HTX y $53,5 \pm 1,2 \mu\text{m}$ en los LBW-CTRL, $p = 0,063$). Lo mismo ocurrió en los animales NBW, los que recibieron el HTX también presentaban un grosor menor del GD en comparación a los del grupo CTRL ($29,8 \pm 1,3 \mu\text{m}$ en los NBW-HTX y $43,0 \pm 2,6 \mu\text{m}$ en los NBW-CTRL, $p = 0,001$).

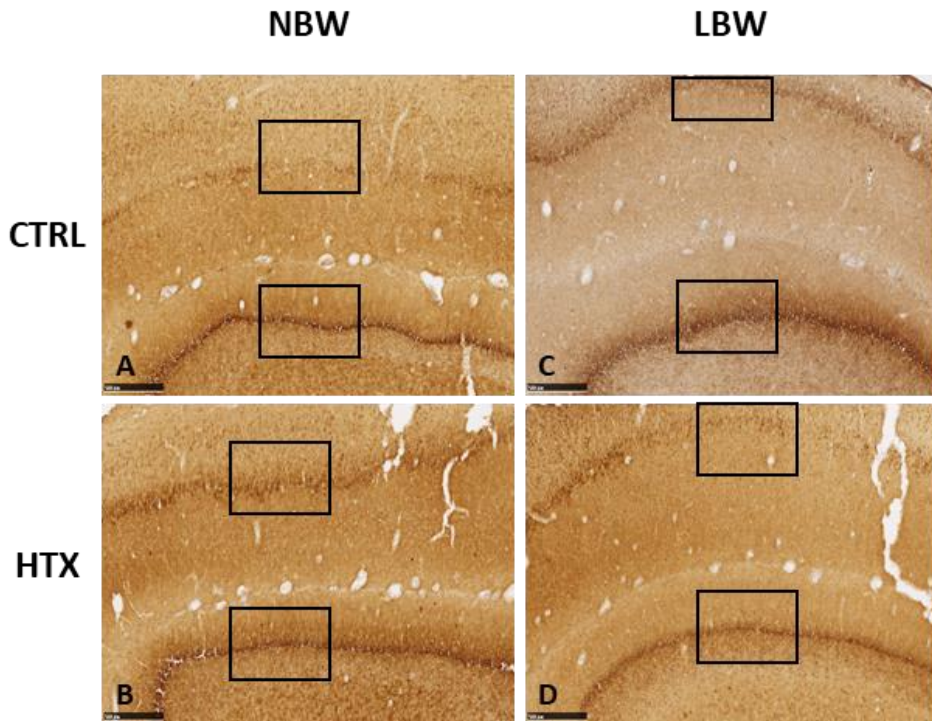


Figura 42. Efecto de la suplementación materna con HTX y de la IUGR sobre la inmunotinción con DCX en el hipocampo de fetos de 100 días. Imágenes representativas muestran las neuronas inmaduras de los animales con peso NBW (A-B), o con peso LBW (C-D). En recuadros negros se muestran las áreas CA1 y GD ampliadas en la Figura 43. Barra de escala = $500 \mu\text{m}$ (A-D).

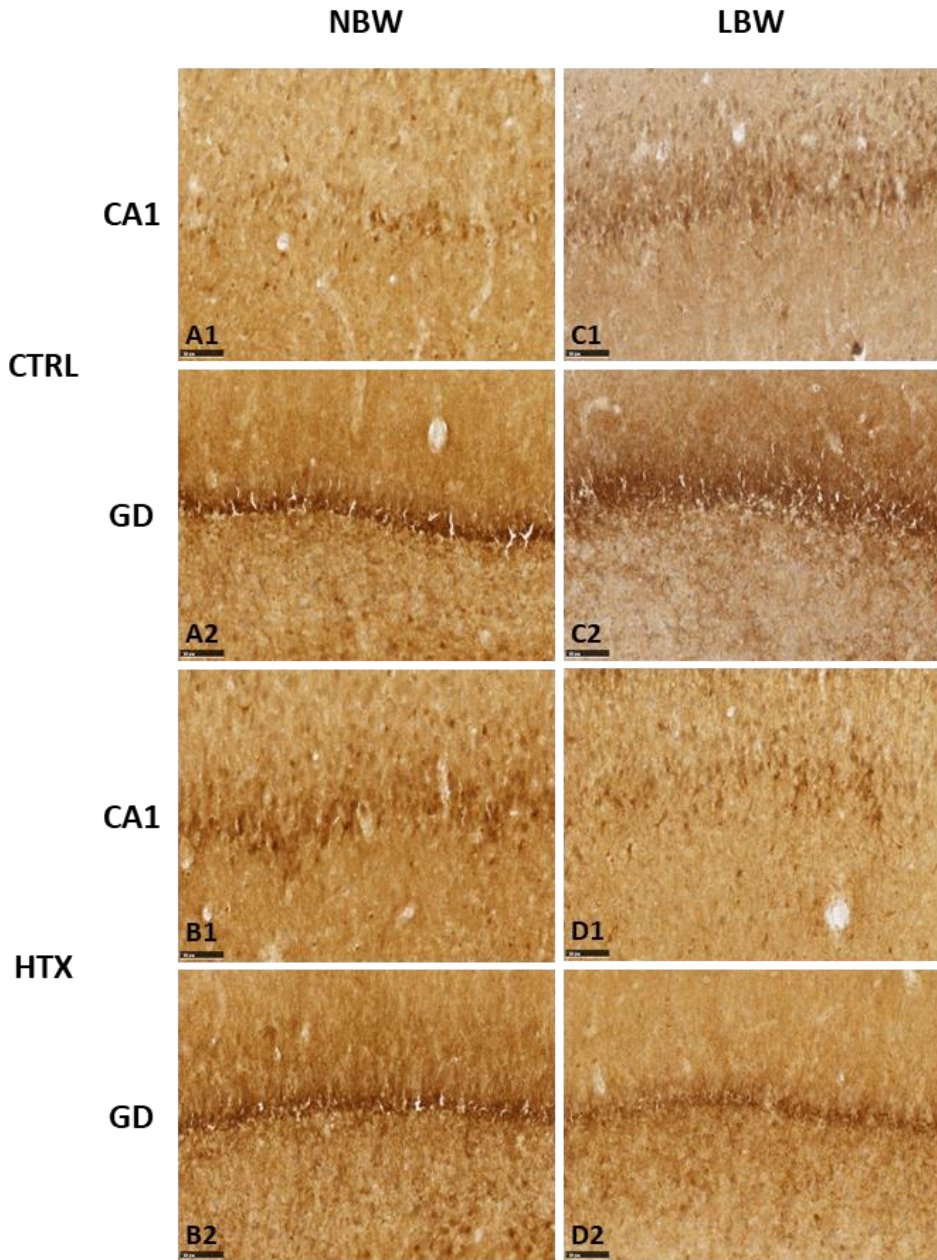


Figura 43. Efecto de la suplementación materna con HTX y de la IUGR sobre la inmunotinción con DCX en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días. Imágenes representativas muestran las neuronas inmaduras en las áreas CA1 (A1-D1) y GD (A2-D2), de los animales con peso NBW (A1-A2, B1-B2), o con peso LBW (C1-C2, D1-D2). Barra de escala = 100 µm (A1-D1, A2-D2).

La inmunotinción de la proteína de los neurofilamentos (**NFT**) proporcionó un marcaje específico de los axones de las neuronas maduras. La tinción positiva se observa como una malla de filamentos en la neuropila, impidiendo la cuantificación del experimento.

Los resultados cualitativos fueron similares a los obtenidos con la inmunotinción de NeuN en CA1 y GD, con un marcaje más intenso en los fetos NBW en comparación a los fetos LBW, pero solamente en los fetos CTRL (**Figura 44 y Figura 45**).

El tratamiento con HTX produjo un incremento de marcaje de NFT en los animales LBW respecto al grupo CTRL, de modo que no se observaron diferencias en el marcaje entre los fetos NBW y LBW en los grupos tratados con HTX, indicando así que los efectos producidos por la IUGR desaparecían en los animales cuyas madres recibieron el HTX.

De manera similar, se observó una mayor conectividad entre las neuronas, especialmente en el GD a través de la capa de células granulares, en los fetos NBW que en los fetos LBW de los grupos CTRL, mientras que no hubo diferencias entre los fetos NBW y LBW de los grupos HTX.

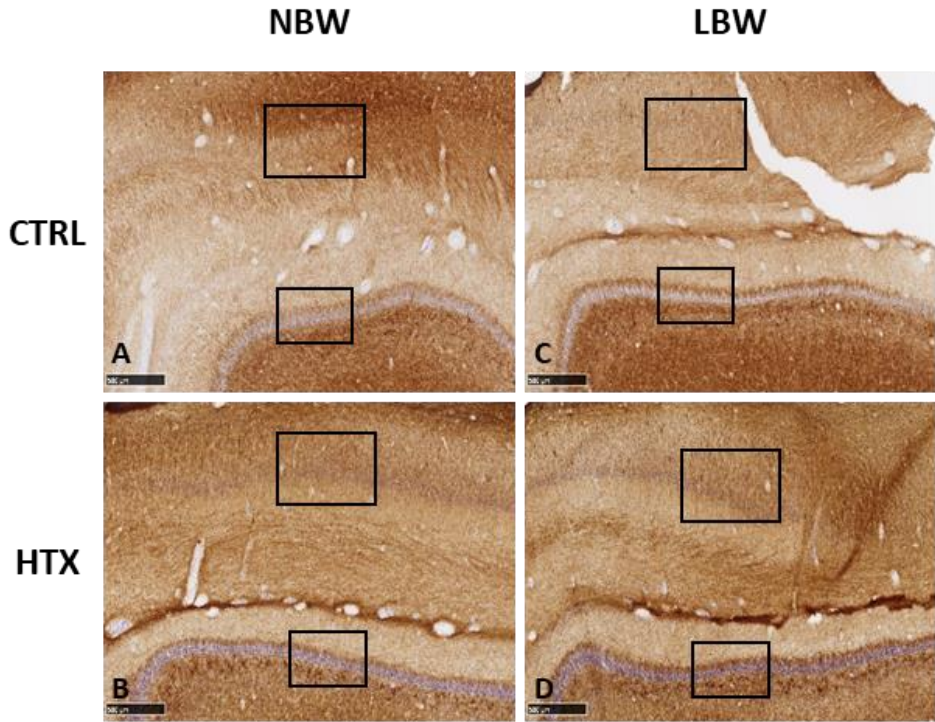


Figura 44. Efecto de la suplementación materna con HTX y de la IUGR sobre la inmunotinción con NFT en el hipocampo de fetos de 100 días. Imágenes representativas muestran los animales con peso NBW (A-B) o con peso LBW (C-D). En recuadros negros se muestran las áreas CA1 y GD ampliadas en la Figura 45. Barra de escala = 500 μ m (A-D).

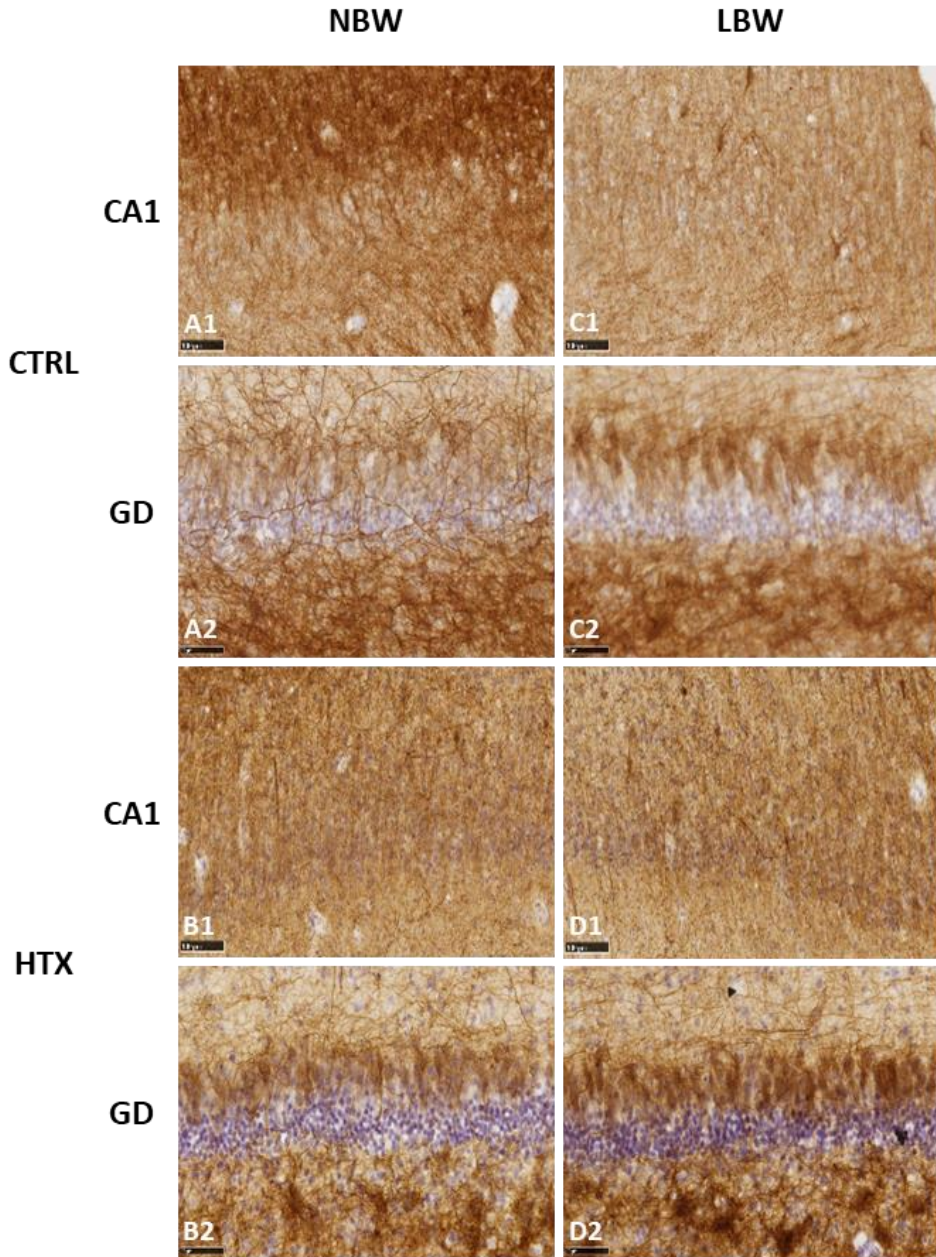


Figura 45. Efecto de la suplementación materna con HTX y de la IUGR sobre la inmunotinción con NFT en las áreas CA1 y GD del hipocampo de fetos de 100 días. Imágenes representativas muestran las áreas CA1 (A1-D1) y GD (A2-D2), de los animales con peso NBW (A1-A2, B1-B2), o con peso LBW (C1-C2, D1-D2). Barra de escala = 100 μ m (A1-D1), y 50 μ m (A2-D2).

Capítulo 2. Efectos de una dieta alta en grasas en el metabolismo y en el sistema nervioso central de animales de 1 año en un modelo porcino de IUGR.

1. Declaración de ética

La parte del estudio correspondiente al uso y manejo de los animales fue realizada en las instalaciones del INIA, que cumple con los requisitos locales, nacionales y europeos para los Establecimientos de Procedimientos Científicos. Se realizó de acuerdo con la política española para la protección de animales RD53/2013, cumpliendo con la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE sobre el cuidado de los animales utilizados para la investigación. El procedimiento experimental fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación Animal del INIA (informe CEEA 2013/036).

2. Animales y procedimiento experimental

En el experimento se incluyeron 48 lechones ibéricos de pura raza, que fueron seleccionados por su sexo (24 hembras y 24 machos).

Al nacer, los lechones fueron pesados, y se clasificaron en dos grupos según su peso al nacer: "peso normal al nacer" (NBW) y "bajo peso al nacer" (LBW), para determinar si habían padecido IUGR. Para la clasificación de los animales se obtuvieron las medias y las SD de los pesos de las crías: dentro de la misma camada aquellos animales cuyo peso era inferior a su correspondiente promedio menos una SD se catalogaron como LBW, así mismo los que estaban entre la media y la media más una SD se asignaron como NBW.

De esta forma, según el peso medio al nacer fueron seleccionados los lechones con peso normal al nacer ($n=24$, grupo NBW) y aquellos con bajo peso al nacer (grupo LBW, $n=24$; $p < 0,001$ respecto al peso NBW). No hubo diferencias significativas en el peso medio al nacer entre machos y hembras dentro de los grupos de NBW y LBW (**Tabla 21** y **Tabla 22**).

Un aspecto importante a tener en cuenta es que, a diferencia del Capítulo anterior, la inducción de la IUGR, y por lo tanto el origen del bajo peso,

fue placentario y no nutricional (a las madres no se les hizo ninguna restricción calórica).

Tabla 21. Peso corporal medio al nacer y al sacrificio según las variables de estudio.

		Peso al nacer	Peso al sacrificio
Dieta	CTRL	1,10 ± 0,06	119,55 ± 3,80
	HFD	1,11 ± 0,06	172,88 ± 3,22
	p-valor	0,970	< 0,001
Peso	NBW	1,34 ± 0,03	155,35 ± 6,44
	LBW	0,85 ± 0,03	141,09 ± 6,51
	p-valor	< 0,001	0,003
Sexo	Machos	1,12 ± 0,06	146,87 ± 6,72
	Hembras	1,09 ± 0,06	150,20 ± 6,56
	p-valor	0,721	0,725

Los resultados se presentan como la media ± SE. Unidades en kg. Los *p*-valores en negrita indican diferencias significativas del peso en las distintas variables ($p < 0,05$).

Tabla 22. Peso corporal medio al nacer y al sacrificio según la dieta recibida y el efecto de la IUGR.

		NBW	LBW
Peso al nacer	CTRL	1,34 ± 0,06 ^{Aa}	0,85 ± 0,04 ^{Ab}
	HFD	1,35 ± 0,03 ^{Aa}	0,85 ± 0,04 ^{Ab}
Peso al sacrificio	CTRL	127,09 ± 5,35 ^{Aa}	111,25 ± 4,24 ^{Ab}
	HFD	179,27 ± 4,73 ^{Ba}	165,96 ± 3,51 ^{Bb}

Los resultados se presentan como la media ± SE. Unidades en kg. Los superíndices indican las diferencias significativas ($p < 0,05$). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las dietas en cada grupo de pesos. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los pesos al nacer en cada dieta.

Después del destete, alrededor de los 28 días de edad, todos los lechones fueron alojados en corrales colectivos (seis animales por corral, para dar espacio y evitar dominancias) separando machos y hembras, y también según la dieta que recibirían posteriormente.

En el primer mes después del destete, todos los lechones fueron alimentados *ad libitum* con la misma dieta estándar con valores medios de 18% de proteína cruda, 4,5% de grasa y 3,35 Mcal/kg de energía metabolizable.

Posteriormente, de 60 a 140 días de edad, los lechones se alimentaron *ad libitum* con una dieta que contenía valores medios de 15,1% de proteína cruda, 2,8% de grasa y 3,08 Mcal / kg de energía metabolizable; la cantidad de comida ofrecida se volvió a calcular con la edad para cumplir con los requisitos de mantenimiento diario. Una hembra y un macho del grupo LBW murieron durante este período, por lo que se utilizaron 46 cerdos para el estudio.

Posteriormente, a partir de los 140 días de edad, hasta los 385 días de edad, los cerdos fueron asignados a diferentes dietas (**Figura 46**). La mitad de las hembras y los machos de ambos grupos NBW y LBW continuaron siendo alimentados *ad libitum* con la misma dieta (dieta de mantenimiento; grupo CTRL). Los cerdos restantes, para inducir obesidad, tuvieron acceso *ad libitum* a la misma dieta, pero enriquecida en grasas (6,3%) y, por tanto, con 3,36 Mcal / kg de energía metabolizable (dieta alta en grasas; grupo HFD).

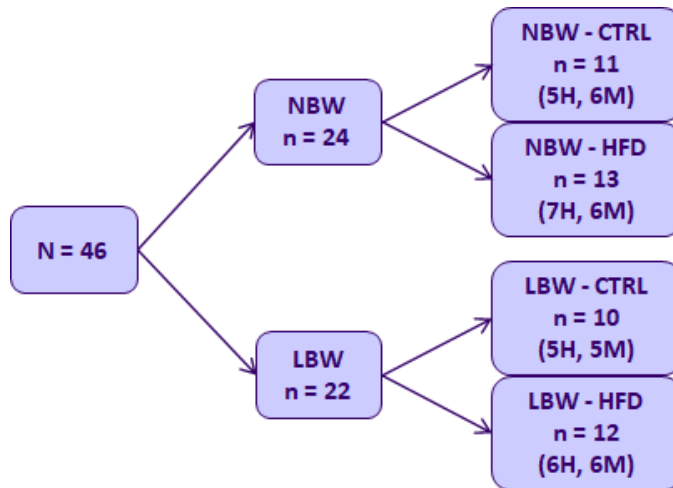


Figura 46. Esquema del diseño experimental de este estudio. H, hembras; M, machos.

A los 385 días de haber nacido, los cerdos, tras un ayuno *overnight*, fueron pesados y sacrificados por aturdimiento y exanguinación de acuerdo con los procedimientos estándar RD53/2013. De la exanguinación se obtuvo una muestra de sangre para la obtención de plasma. Posteriormente, se separó la cabeza del tronco en la unión atlanto-occipital y se extrajo el cerebro del cráneo.

Se diseccionaron rápidamente la amígdala, la corteza prefrontal, el hipotálamo, los hipocampos y el cuerpo estriado de la forma descrita en el **apartado 4.2 de Material y Métodos**.

3. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo con el software SPSS 24.0 (IBM, Chicago, IL, USA). El nivel de significancia fue establecido en $p < 0,05$, y la tendencia fue considerada en $0,05 \leq p \leq 0,1$. Los datos descriptivos se presentan con la media y el error estándar de la media (media \pm SE).

Antes de hacer el análisis estadístico se realizó el test de normalidad Kolmogórov-Smirnov, y en los casos necesarios, los datos fueron transformados a valores logarítmicos para corregir la distribución y permitir el uso de estadística paramétrica.

Las medidas normalmente distribuidas se analizaron mediante el procedimiento UNIANOVA de SPSS con ajuste de Tukey. En todos los modelos, se introdujo cada cerdo como unidad experimental, los efectos fijos incluidos fueron dieta (CTRL y HFD), peso (NBW y LBW), sexo (macho y hembra) y sus interacciones. Además, también se realizaron comparaciones por pares con el ajuste de Bonferroni para las interacciones significativas.

4. Perfil bioquímico del plasma

Se analizó un perfil bioquímico completo del plasma, en el que se midieron los niveles de glucosa, triglicéridos, NEFAs, proteínas totales, colesterol, creatinina, fructosamina, HDL-C, LDL-C, y urea como marcadores del metabolismo energético; enzimas hepáticas del metabolismo de aminoácidos (ALT, AST, GGT); la hormona anabólica insulina; los niveles de CK como marcador de daño muscular; las enzimas antioxidantes SOD y GPx; el neurotransmisor acetilcolina (ACh); las proteínas de fase aguda haptoglobina, CRP y Pig-MAP; y la hormona de estrés cortisol.

En la **Tabla 23** se muestran los valores medios obtenidos para todas las determinaciones según la dieta y el peso al nacer. Se analizaron estadísticamente las diferencias en estos parámetros para ver el efecto de la dieta, el peso al nacer y la interacción entre ambos.

En primer lugar, se observaron diferencias en la concentración de **triglicéridos**, ya que, como era de esperar, los animales con una dieta HFD tenían niveles más altos que los animales con la dieta de mantenimiento (**Figura 47A**). Concretamente se observó que estas diferencias significativas de la dieta se debían a los animales que nacieron con un peso NBW y no se observaron en los animales con un peso LBW (**Figura 47B**). En consecuencia, los animales NBW que recibieron la dieta HFD, tenían concentraciones más elevadas en el plasma que los animales LBW.

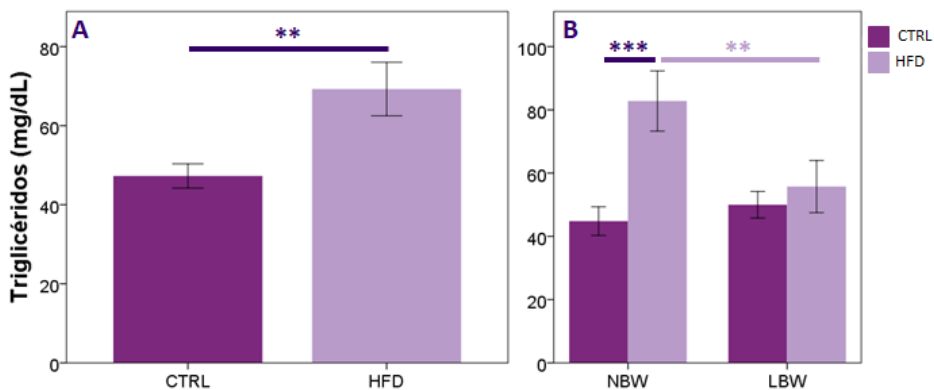


Figura 47. Representación gráfica del efecto de la dieta (A), y de la interacción de la dieta con el peso al nacer (B) sobre la concentración de triglicéridos en el plasma. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales con dieta CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales con dieta HFD. Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Un comportamiento similar se vio en los niveles de **colesterol (total, HDL y LDL)**, aunque el efecto fue significativo solamente en el HDL-C. En los tres parámetros se vio un aumento de su concentración en los animales NBW que recibieron la dieta HFD, mientras que los animales LBW que recibieron la dieta

HFD presentaban concentraciones iguales o más bajas que los que recibieron la dieta CTRL (**Figura 48**).

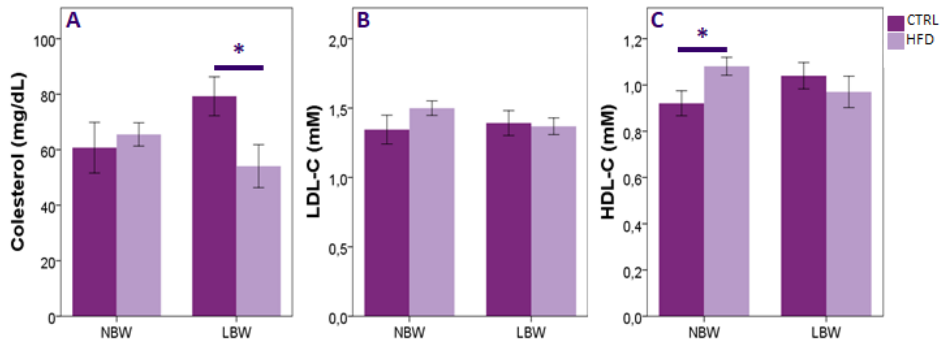


Figura 48. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el peso al nacer sobre la concentración de colesterol total (A), LDL-C (B) y HDL-C (C) en el plasma. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales con dieta CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales con dieta HFD. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$).

La dieta no tuvo un efecto sobre los niveles de glucosa, ni de la hormona insulina, pero sí que se vieron afectados por la IUGR, ya que los animales con peso LBW presentaron niveles de la hormona **insulina** más bajos que los animales NBW, en consecuencia, estos animales tuvieron concentraciones más elevadas de **glucosa** que los NBW.

Al igual que con los triglicéridos y el colesterol, las enzimas antioxidantes se vieron alteradas por la dieta HFD solo en el grupo de animales que nacieron con peso NBW, en los animales LBW estas diferencias debidas a la dieta no se observaron. Concretamente, la dieta HFD provocó un aumento de la actividad **GPx**, y una disminución de la actividad de **SOD**.

La **dieta** HFD tuvo un efecto sobre las enzimas hepáticas **ALT y GGT**, provocando que hubiera menos actividad de ambas enzimas en el plasma en comparación a los animales que recibieron una dieta CTRL. Este efecto se observó tanto en los animales NBW como a los animales LBW.

La hormona **cortisol** (**Figura 49A**) también se vio alterada en los animales con una dieta HFD, presentando unos niveles más elevados que los que recibieron la dieta CTRL. Este efecto destacó más en los animales LBW. Aunque la diferencia no fue significativa, el mismo comportamiento se observó en las concentraciones de la proteína de fase aguda **haptoglobina** (**Figura 49B**), donde los animales LBW que recibieron la dieta HFD tenían concentraciones más elevadas que los animales que recibieron la dieta CTRL.

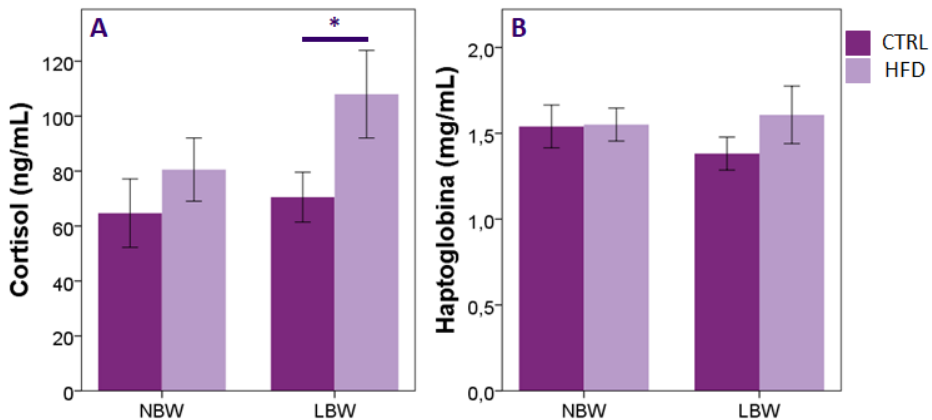


Figura 49. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el peso al nacer sobre la concentración de cortisol (A) y haptoglobina (B) en el plasma. Las barras representan la media ± SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales con dieta CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales con dieta HFD. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$).

No se observaron diferencias significativas para ninguna de las dos variables en los parámetros restantes: acetilcolina, AST, CK, creatinina, CRP, fructosamina, NEFAS, urea, Pig-MAP y proteínas totales.

En todos los casos los valores entraron dentro de los intervalos de referencia de la especie [150].

Tabla 23. Concentración de diferentes parámetros bioquímicos plasmáticos en función de la dieta y del peso al nacer.

		NBW	LBW	<i>p</i> -valor		
				Dieta	Peso	Interacción
ACh (pg/μL)	CTRL	50,94 ± 5,31 ^{Aa}	50,74 ± 3,22 ^{Aa}	0,362	0,735	0,768
	HFD	56,50 ± 4,37 ^{Aa}	53,60 ± 4,26 ^{Aa}			
ALT (U/L)	CTRL	47,02 ± 3,14 ^{Aa}	55,30 ± 3,38 ^{Ab}	< 0,001	0,190	0,059
	HFD	34,53 ± 1,47 ^{Ba}	32,98 ± 2,15 ^{Ba}			
AST (U/L)	CTRL	58,45 ± 8,91 ^{Aa}	71,90 ± 10,50 ^{Aa}	0,158	0,731	0,080
	HFD	61,77 ± 8,55 ^{Aa}	41,91 ± 9,16 ^{Ba}			
CK (U/mL)	CTRL	4386,72 ± 1123,86 ^{Aa}	4680,18 ± 1793,25 ^{Aa}	0,625	0,288	0,196
	HFD	6597,56 ± 1126,96 ^{Aa}	3672,61 ± 721,75 ^{Aa}			
Colesterol (mg/dL)	CTRL	60,74 ± 9,12 ^{Aa}	79,28 ± 7,02 ^{Aa}	0,159	0,620	0,041
	HFD	65,52 ± 4,19 ^{Aa}	54,09 ± 7,73 ^{Ba}			
Cortisol (ng/mL)	CTRL	64,69 ± 12,45 ^{Aa}	70,52 ± 9,07 ^{Aa}	0,039	0,190	0,391
	HFD	80,53 ± 11,51 ^{Aa}	107,99 ± 15,93 ^{Ba}			
Creatinina (mg/dL)	CTRL	0,95 ± 0,04 ^{Aa}	1,04 ± 0,04 ^{Aa}	0,348	0,189	0,461
	HFD	0,94 ± 0,03 ^{Aa}	0,97 ± 0,06 ^{Aa}			
CRP (mg/L)	CTRL	19,29 ± 2,00 ^{Aa}	14,93 ± 1,92 ^{Aa}	0,944	0,401	0,101
	HFD	16,27 ± 1,04 ^{Aa}	17,70 ± 2,02 ^{Aa}			
Fructosamina (μM)	CTRL	275,61 ± 7,49 ^{Aa}	291,30 ± 7,04 ^{Aa}	0,048	0,308	0,257
	HFD	269,18 ± 4,79 ^{Aa}	268,33 ± 8,96 ^{Ba}			
GGT (U/L)	CTRL	46,50 ± 3,79 ^{Aa}	67,22 ± 11,32 ^{Ab}	0,004	0,029	0,110
	HFD	38,85 ± 1,62 ^{Aa}	42,17 ± 3,11 ^{Ba}			
Glucosa (mg/dL)	CTRL	89,27 ± 5,36 ^{Aa}	96,04 ± 3,41 ^{Aa}	0,837	0,033	0,412
	HFD	84,20 ± 2,37 ^{Aa}	99,08 ± 6,76 ^{Ab}			
GPx (U/L)	CTRL	962,53 ± 41,77 ^{Aa}	1114,29 ± 78,03 ^{Ab}	0,401	0,464	0,030
	HFD	1119,78 ± 38,77 ^{Ba}	1042,91 ± 45,13 ^{Aa}			
HDL-C (mM)	CTRL	0,92 ± 0,05 ^{Aa}	1,04 ± 0,06 ^{Aa}	0,420	0,940	0,043
	HFD	1,08 ± 0,04 ^{Ba}	0,97 ± 0,07 ^{Aa}			
Haptoglobina (mg/mL)	CTRL	1,54 ± 0,12 ^{Aa}	1,38 ± 0,10 ^{Aa}	0,357	0,692	0,402
	HFD	1,55 ± 0,10 ^{Aa}	1,61 ± 0,17 ^{Aa}			
Insulina (mU/L)	CTRL	19,56 ± 2,23 ^{Aa}	16,55 ± 1,95 ^{Aa}	0,091	0,009	0,118
	HFD	28,16 ± 3,56 ^{Ba}	16,91 ± 1,83 ^{Ab}			
LDL-C (mM)	CTRL	1,35 ± 0,10 ^{Aa}	1,39 ± 0,09 ^{Aa}	0,397	0,587	0,254
	HFD	1,50 ± 0,05 ^{Aa}	1,37 ± 0,06 ^{Aa}			
NEFAS (mM)	CTRL	0,30 ± 0,03 ^{Aa}	0,32 ± 0,03 ^{Aa}	0,861	0,412	0,801
	HFD	0,30 ± 0,04 ^{Aa}	0,33 ± 0,03 ^{Aa}			
Pig-MAP (mg/mL)	CTRL	0,48 ± 0,06 ^{Aa}	0,33 ± 0,07 ^{Aa}	0,540	0,936	0,028
	HFD	0,28 ± 0,07 ^{Ba}	0,45 ± 0,08 ^{Aa}			
Proteínas totales (g/dL)	CTRL	6,99 ± 0,19 ^{Aa}	7,66 ± 0,27 ^{Ab}	0,240	0,239	0,022
	HFD	7,21 ± 0,12 ^{Aa}	6,99 ± 0,19 ^{Ba}			
SOD (U/mL)	CTRL	0,26 ± 0,02 ^{Aa}	0,22 ± 0,04 ^{Aa}	0,029	0,660	0,410
	HFD	0,16 ± 0,03 ^{Ba}	0,17 ± 0,03 ^{Aa}			
Triglicéridos (mg/dL)	CTRL	44,81 ± 4,52 ^{Aa}	49,99 ± 4,21 ^{Aa}	0,005	0,145	0,034
	HFD	82,81 ± 9,52 ^{Ba}	55,76 ± 8,26 ^{Ab}			
Urea (mg/dL)	CTRL	18,29 ± 1,59 ^{Aa}	22,29 ± 2,79 ^{Aa}	0,770	0,628	0,093
	HFD	21,94 ± 1,30 ^{Aa}	19,71 ± 1,58 ^{Aa}			

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Las filas muestran los parámetros bioquímicos en función de la dieta (CTRL o HFD). Las columnas dividen los animales según el peso al nacer (NBW o LBW). Los superíndices y los *p*-valores en negrita indican las diferencias significativas (*p* < 0,05). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las dietas según el peso al nacer. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los pesos al nacer según la dieta.

5. Perfil de aminoácidos libres en el plasma

Tras la derivatización con el reactivo AQC, que permite la detección UV de los aminoácidos, se cuantificaron los aminoácidos libres presentes en el plasma mediante HPLC.

El análisis estadístico se dividió en dos partes. La primera parte consistió en establecer las diferencias causadas por cada variable por separado: la dieta recibida, el peso al nacer, o el sexo (Tabla 24).

Tabla 24. Concentración de los aminoácidos libres plasmáticos en función de la dieta, del peso al nacer o sexo del animal.

	Dieta		Peso al nacer		Sexo	
	CTRL	HFD	NBW	LBW	Machos	Hembras
Asn + Ser	187,02 ± 6,19^A	225,19 ± 9,37^B	209,22 ± 10,16	205,27 ± 7,52	203,00 ± 7,67	211,56 ± 10,22
Glu	164,97 ± 10,35	164,62 ± 12,43	158,79 ± 8,19	171,04 ± 14,55	169,09 ± 12,13	160,65 ± 11,30
Gly	589,73 ± 20,73	593,17 ± 19,90	583,51 ± 18,84	600,43 ± 21,78	604,08 ± 22,37	579,13 ± 17,67
Gln	542,24 ± 26,74^A	638,64 ± 17,77^B	600,83 ± 22,54	590,03 ± 25,95	579,05 ± 21,14	611,80 ± 26,15
His	110,58 ± 4,92^A	123,83 ± 3,68^B	115,16 ± 3,94	120,63 ± 4,96	120,76 ± 4,84	114,80 ± 3,99
Arg	167,47 ± 9,69	181,40 ± 7,89	174,90 ± 9,69	174,90 ± 7,58	164,02 ± 8,01	185,31 ± 9,03
Cit	92,81 ± 5,46	86,25 ± 4,05	84,05 ± 3,90	94,91 ± 5,33	96,05 ± 4,38^A	82,44 ± 4,67^B
Thr	119,62 ± 6,52^A	142,32 ± 6,91^B	130,55 ± 6,69	133,49 ± 7,73	135,53 ± 6,87	128,39 ± 7,43
Ala	349,48 ± 13,26^A	418,71 ± 17,74^B	393,56 ± 20,37	378,23 ± 12,87	375,73 ± 14,00	396,62 ± 20,16
Pro	213,26 ± 9,25^A	283,88 ± 23,51^B	269,77 ± 23,14	232,76 ± 16,07	266,11 ± 20,05	239,47 ± 21,12
Tyr	83,68 ± 5,48	91,74 ± 3,85	85,55 ± 4,77	90,80 ± 4,51	83,05 ± 4,38	93,07 ± 4,74
Val	420,32 ± 18,05	444,90 ± 13,74	437,10 ± 16,43	429,94 ± 15,25	431,47 ± 15,70	435,88 ± 16,15
Met	31,39 ± 1,72	34,19 ± 1,27	32,34 ± 1,45	33,53 ± 1,56	31,15 ± 1,40	34,67 ± 1,52
Orn	65,16 ± 4,77	61,86 ± 3,92	61,64 ± 3,80	65,25 ± 4,83	69,54 ± 4,67^A	57,19 ± 3,47^B
Lys	231,12 ± 11,23	246,37 ± 9,78	229,85 ± 11,01	249,08 ± 9,63	231,99 ± 10,56	246,85 ± 10,35
Cys	474,68 ± 16,41^A	532,79 ± 20,45^B	482,30 ± 16,32	532,40 ± 22,16	513,82 ± 20,98	498,70 ± 18,71
Ile	167,97 ± 7,89	169,86 ± 5,72	167,11 ± 6,82	171,05 ± 6,56	168,36 ± 7,06	169,63 ± 6,37
Leu	247,74 ± 12,43	255,76 ± 8,70	253,50 ± 10,64	250,58 ± 10,24	253,74 ± 11,27	250,47 ± 9,60
Phe	167,50 ± 6,06^A	196,17 ± 5,43^B	181,59 ± 5,96	184,71 ± 7,02	182,39 ± 6,60	183,77 ± 6,36
Trp	94,73 ± 2,89^A	105,44 ± 3,01^B	98,95 ± 3,33	102,30 ± 2,94	97,41 ± 2,70	103,70 ± 3,47

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Unidades μM. Las filas muestran los aminoácidos medidos en el plasma. Las columnas dividen los animales según la dieta recibida, el peso al nacer o el sexo del animal. Los superíndices y la negrita muestran diferencias significativas dentro que cada variable analizada ($p < 0,05$).

El análisis del efecto de cada variable mostró claramente que una dieta alta en grasas tiene un efecto importante sobre muchos aminoácidos libres en el plasma. Concretamente, la **dieta HFD** provocó un aumento de casi todos los aminoácidos libres, y este aumento fue significativo en los niveles de **asparagina + serina, glutamina, histidina, treonina, alanina, prolina, cisteína, fenilalanina y triptófano (Figura 50)**.

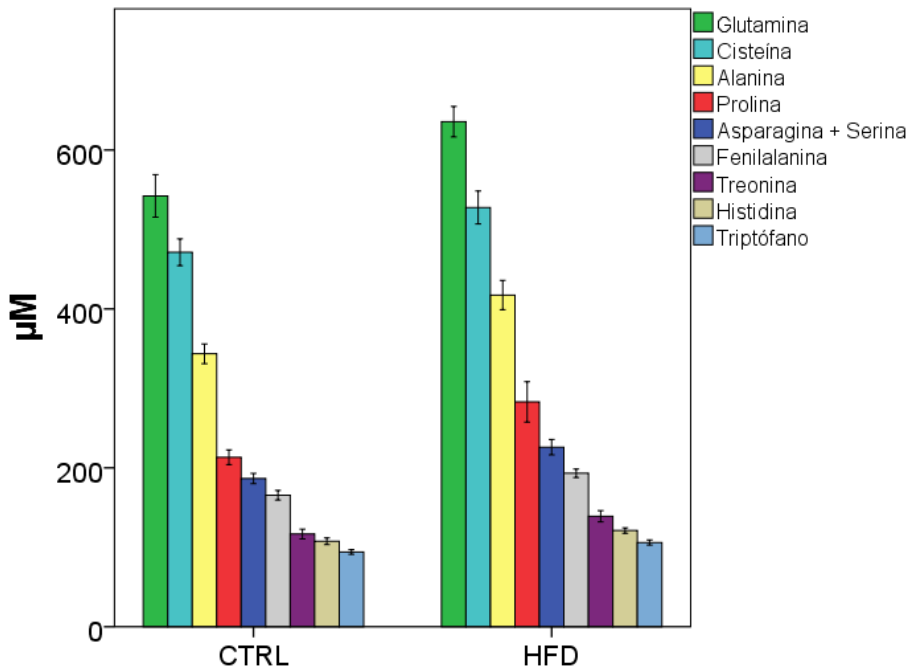


Figura 50. Representación gráfica del efecto de la dieta sobre la concentración de los aminoácidos libres en el plasma. Las barras representan la media \pm SE. Solo se representan aquellos aminoácidos que mostraron diferencias significativas.

Por el contrario, la **IUGR** no tuvo consecuencias en el perfil de aminoácidos cuando los animales tenían 1 año, ya que no se observaron diferencias entre los animales con peso NBW y los LBW.

Por último, se analizaron los resultados de los aminoácidos según el **sexo** de los animales, y se observó que las hembras tenían niveles más bajos de **citrulina y ornitina** en comparación con los machos, pero no hubo una interacción entre la dieta recibida y el sexo de los animales.

5.1. Efecto de la dieta y de la IUGR sobre los aminoácidos libres

La segunda parte del análisis estadístico del perfil de aminoácidos libres se llevó a cabo para determinar el efecto de la interacción entre la dieta recibida y el peso al nacer (**Tabla 25**).

En este caso no hubo ninguna interacción significativa, tanto los animales que habían nacido con un peso NBW, como los que nacieron con peso LBW, si habían recibido la dieta HFD, presentaban mayores niveles de casi todos los aminoácidos en el plasma si se comparaban con los animales que habían recibido la dieta CTRL. Lo que llamó la atención es que este aumento de los aminoácidos con la dieta HFD, solo era estadísticamente significativo para muchos de los aminoácidos dentro del grupo de los animales que habían nacido con peso LBW (**Figura 51**). Los aminoácidos que presentaban este aumento significativo dentro del grupo LBW fueron los mismos que en la primera parte del análisis estadístico: **asparagina + serina, glutamina, histidina, treonina, alanina, prolina, cisteína, fenilalanina y triptófano**.

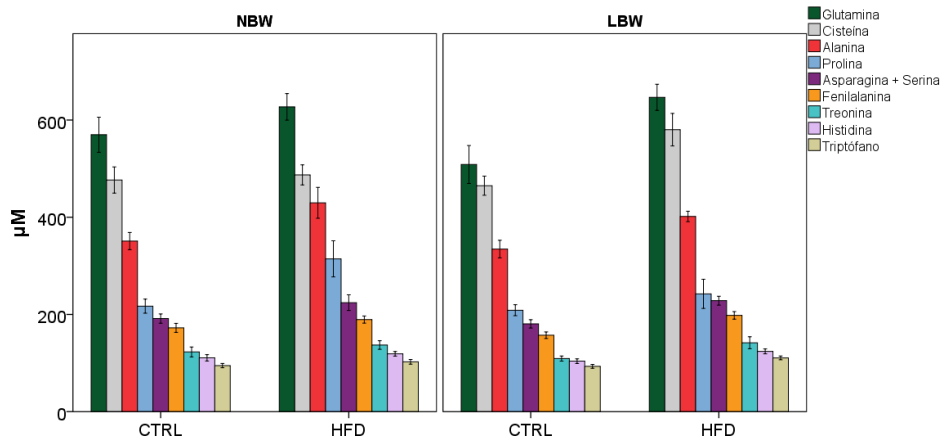


Figura 51. Representación gráfica del efecto de la interacción de la dieta con el peso al nacer sobre la concentración de los aminoácidos libres en el plasma. Las barras representan la media \pm SE. Solo se representan aquellos aminoácidos que mostraron diferencias significativas.

Tabla 25. Concentración de los aminoácidos libres en el plasma en función de la dieta y del peso al nacer.

		NBW	LBW	<i>p</i> -valor		
				Dieta	Peso	Interacción
Asparagina + Serina	CTRL	191,49 ± 9,58 ^{Aa}	182,10 ± 7,85 ^{Aa}	0,002	0,760	0,629
	HFD	224,22 ± 16,11 ^{Ba}	226,34 ± 8,49 ^{Ba}			
Ácido glutámico	CTRL	162,67 ± 9,49 ^{Aa}	167,27 ± 18,99 ^{Aa}	0,999	0,502	0,687
	HFD	155,80 ± 12,80 ^{Aa}	174,18 ± 22,21 ^{Aa}			
Glicina	CTRL	580,20 ± 31,67 ^{Aa}	600,22 ± 27,50 ^{Aa}	0,913	0,563	0,923
	HFD	586,31 ± 23,40 ^{Aa}	600,60 ± 33,82 ^{Aa}			
Glutamina	CTRL	569,78 ± 36,10 ^{Aa}	508,58 ± 39,07 ^{Aa}	0,003	0,554	0,179
	HFD	627,11 ± 27,44 ^{Aa}	651,12 ± 22,79 ^{Ba}			
Histidina	CTRL	110,69 ± 6,51 ^{Aa}	110,45 ± 7,83 ^{Aa}	0,032	0,419	0,397
	HFD	118,95 ± 4,75 ^{Aa}	129,12 ± 5,48 ^{Ba}			
Arginina	CTRL	161,44 ± 14,47 ^{Aa}	174,11 ± 13,16 ^{Aa}	0,301	0,938	0,359
	HFD	186,30 ± 12,70 ^{Aa}	175,62 ± 8,80 ^{Aa}			
Citrulina	CTRL	83,25 ± 6,39 ^{Aa}	103,33 ± 8,11 ^{Ab}	0,289	0,081	0,200
	HFD	84,73 ± 4,98 ^{Aa}	87,89 ± 6,69 ^{Aa}			
Treonina	CTRL	122,89 ± 10,20 ^{Aa}	116,03 ± 8,27 ^{Aa}	0,023	0,833	0,365
	HFD	137,04 ± 8,80 ^{Aa}	148,05 ± 10,95 ^{Ba}			
Alanina	CTRL	350,93 ± 17,61 ^{Aa}	347,89 ± 20,99 ^{Aa}	0,005	0,564	0,655
	HFD	429,63 ± 31,82 ^{Ba}	405,81 ± 10,59 ^{Aa}			
Prolina	CTRL	217,05 ± 14,47 ^{Aa}	208,63 ± 11,27 ^{Aa}	0,015	0,196	0,320
	HFD	314,37 ± 37,22 ^{Ba}	250,86 ± 26,14 ^{Aa}			
Tirosina	CTRL	76,07 ± 5,36 ^{Aa}	92,05 ± 9,48 ^{Aa}	0,247	0,353	0,134
	HFD	93,57 ± 6,96 ^{Aa}	89,76 ± 3,09 ^{Aa}			
Valina	CTRL	422,76 ± 27,48 ^{Aa}	417,62 ± 24,41 ^{Aa}	0,289	0,758	0,932
	HFD	449,23 ± 19,89 ^{Aa}	440,20 ± 19,67 ^{Aa}			
Metionina	CTRL	30,66 ± 2,31 ^{Aa}	32,18 ± 2,68 ^{Aa}	0,201	0,578	0,882
	HFD	33,77 ± 1,83 ^{Aa}	34,65 ± 1,84 ^{Aa}			
Ornitina	CTRL	60,05 ± 3,70 ^{Aa}	70,78 ± 9,10 ^{Aa}	0,562	0,499	0,294
	HFD	62,98 ± 6,41 ^{Aa}	60,64 ± 4,57 ^{Aa}			
Lisina	CTRL	232,25 ± 17,26 ^{Aa}	229,88 ± 14,95 ^{Aa}	0,300	0,235	0,179
	HFD	227,64 ± 14,68 ^{Aa}	265,09 ± 10,99 ^{Aa}			
Cisteína	CTRL	476,55 ± 26,91 ^{Aa}	472,63 ± 19,26 ^{Aa}	0,022	0,080	0,058
	HFD	487,17 ± 20,67 ^{Aa}	582,21 ± 31,13 ^{Bb}			
Isoleucina	CTRL	165,04 ± 10,32 ^{Aa}	171,20 ± 12,56 ^{Aa}	0,856	0,675	0,835
	HFD	168,86 ± 9,44 ^{Aa}	170,94 ± 6,56 ^{Aa}			
Leucina	CTRL	248,34 ± 17,18 ^{Aa}	247,08 ± 18,99 ^{Aa}	0,603	0,854	0,919
	HFD	257,86 ± 13,75 ^{Aa}	253,49 ± 10,93 ^{Aa}			
Fenilalanina	CTRL	172,36 ± 9,27 ^{Aa}	162,15 ± 7,77 ^{Aa}	0,001	0,811	0,140
	HFD	189,39 ± 7,36 ^{Aa}	203,51 ± 7,79 ^{Ba}			
Triptófano	CTRL	94,69 ± 4,39 ^{Aa}	94,79 ± 3,92 ^{Aa}	0,015	0,478	0,492
	HFD	102,56 ± 4,81 ^{Aa}	108,57 ± 3,46 ^{Ba}			

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Unidades μM. Las filas muestran los aminoácidos en función de la dieta (CTRL o HFD). Las columnas dividen los animales según el peso al nacer (NBW o LBW). Los superíndices y los *p*-valores en negrita indican las diferencias significativas (*p* < 0,05). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las dietas según el peso al nacer. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los pesos al nacer según la dieta.

6. Perfil de neurotransmisores

Los neurotransmisores y sus metabolitos se cuantificaron mediante HPLC en las áreas cerebrales diseccionadas en el sacrificio: el hipocampo, la amígdala, la corteza prefrontal, el hipotálamo y el cuerpo estriado. Los resultados se analizaron comparando los grupos del estudio.

La mayor concentración de NA se encontró en el hipotálamo; la DA y sus metabolitos (L-DOPA, DOPAC, HVA, 3-MT) fueron muy abundantes en el estriado; y la 5-HT y su metabolito 5-HIAA tuvieron su mayor concentración en el hipotálamo y en la amígdala. Por último, el glutamato (el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central) y el GABA (el principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central) son los neurotransmisores más abundantes en todas las áreas del cerebro, siendo el glutamato el más abundante de estos dos. Por el contrario, la acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor con menor concentración en todas las áreas del cerebro.

Además de los niveles individuales de los neurotransmisores, se analizó también la concentración total de la vía dopaminérgica (DOPTotal, la suma de las concentraciones de L-DOPA, DA, DOPAC, HVA y 3-MT), la concentración total de catecolaminas (CATTotal, la suma de las concentraciones de NA, L-DOPA, DA, DOPAC, HVA y 3-MT), y la concentración total de indolaminas (INDTotal, la suma de las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA).

El análisis estadístico se dividió en tres partes. La primera parte consistió en establecer las diferencias causadas por cada variable por separado: la dieta recibida, el peso al nacer, o el sexo (**Tabla 26**).

El análisis del efecto de cada variable mostró claramente que una **dieta alta en grasas** tenía principalmente un efecto importante sobre los niveles de **5-HT**, haciendo que estos fueran más elevados en todas las áreas cerebrales de los animales que recibieron una dieta HFD (**Figura 52**).

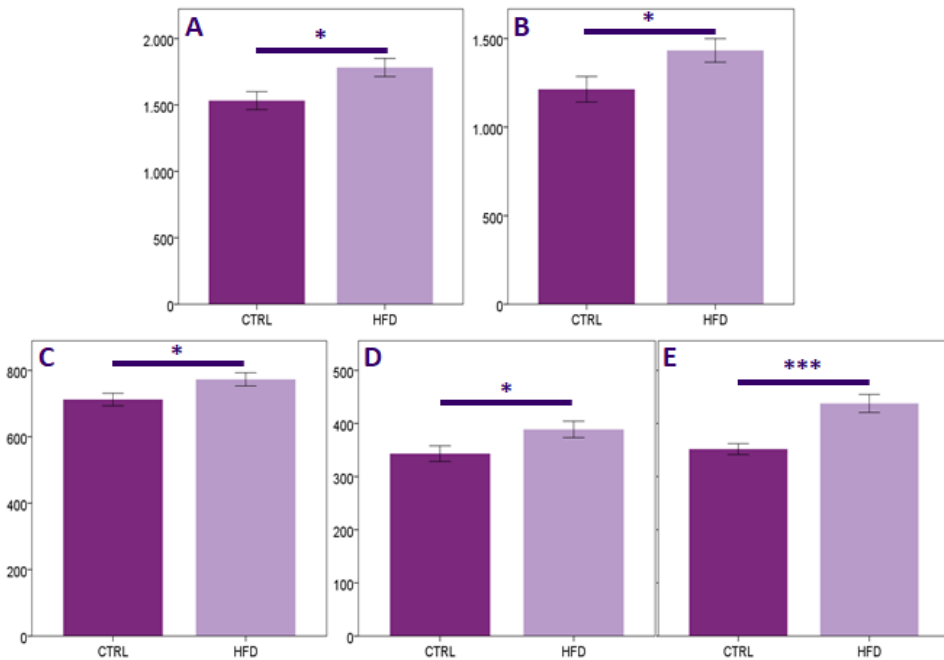


Figura 52. Representación gráfica del efecto de la dieta sobre la concentración de 5-HT en la amígdala (A), el hipotálamo (B), el cuerpo estriado (C), la corteza prefrontal (D) y el hipocampo (E). Unidades en ng/g de tejido. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales con dieta CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales con dieta HFD. Los asteriscos indican diferencias significativas (***) $p < 0,001$; * $p < 0,05$).

Además, se observó un efecto de la dieta HFD sobre el metabolito **DOPAC**, presentando una mayor concentración en el **hipocampo**, y una menor concentración en el **cuerpo estriado**. Por último, en el **hipotálamo** tuvo un efecto significativo sobre los niveles de **DA** haciendo que estos fueran mayores en el grupo HFD.

Por el contrario, las variables del peso al nacer (animales con peso NBW o LBW al nacer) y del sexo del animal tuvieron pocas consecuencias en el perfil de neurotransmisores cuando los animales fueron sacrificados al año de edad.

En la **amígdala** no se observaron efectos del peso al nacer ni del sexo sobre los niveles de ningún neurotransmisor.

En el **hipocampo** y en el **hipotálamo** no se observaron efectos del **peso al nacer** sobre los niveles de ningún neurotransmisor. En la **corteza prefrontal** se observó un efecto significativo en los niveles de **acetilcolina**, que eran menores en los animales afectados por la IUGR (LBW), y en el **cuerpo estriado** tuvo un efecto significativo sobre la **DA** y su metabolito **3-MT**, que fueron más elevados en el grupo con peso LBW.

Por lo que se refiere al efecto del **sexo**, en la **corteza prefrontal** tuvo un efecto sobre la concentración de **HVA** y de **glutamato** donde las hembras tenían menor concentración que los machos. En el **hipocampo**, al igual que en la corteza prefrontal, las hembras presentaban niveles inferiores de **glutamato** que los machos. En el **cuerpo estriado** los machos presentaban una mayor concentración de **NA** en comparación con las hembras. Por último, en el **hipotálamo** se observaron mayores niveles del metabolito **HVA** y de **glutamato** en las hembras que en los machos.

Tabla 26. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en distintas áreas cerebrales en función de la dieta, del peso al nacer o del sexo del animal.

	Dieta		Peso al nacer			Sexo	
	CTRL	HFD	NBW	LBW	Machos	Hembras	
Amígdala							
NA	354,70 ± 36,20 ^A	354,60 ± 25,91 ^A	316,88 ± 20,52 ^A	394,20 ± 36,02 ^A	372,09 ± 39,03 ^A	339,47 ± 20,54 ^A	
DA	695,26 ± 23,10 ^A	687,56 ± 34,11 ^A	684,53 ± 26,06 ^A	699,99 ± 33,63 ^A	677,19 ± 29,73 ^A	706,16 ± 28,67 ^A	
DOPAC	490,59 ± 33,64 ^A	485,38 ± 27,80 ^A	460,02 ± 26,83 ^A	519,33 ± 32,99 ^A	464,62 ± 26,86 ^A	509,77 ± 32,60 ^A	
HVA	835,64 ± 30,06 ^A	898,72 ± 42,35 ^A	865,11 ± 30,63 ^A	875,98 ± 47,51 ^A	828,29 ± 31,26 ^A	908,18 ± 42,09 ^A	
5-HT	1532,74 ± 67,39^A	1781,98 ± 68,26^B	1597,65 ± 63,65 ^A	1734,62 ± 80,04 ^A	1621,62 ± 85,47 ^A	1708,37 ± 52,73 ^A	
5-HIAA	647,07 ± 20,28 ^A	662,96 ± 20,72 ^A	631,95 ± 16,56 ^A	682,51 ± 23,53 ^A	666,60 ± 21,95 ^A	643,98 ± 18,78 ^A	
Glutamato	1378,05 ± 29,57 ^A	1379,02 ± 22,41 ^A	1365,29 ± 25,09 ^A	1393,17 ± 25,51 ^A	1366,06 ± 26,43 ^A	1391,14 ± 24,21 ^A	
GABA	234,41 ± 14,90 ^A	228,83 ± 9,40 ^A	220,78 ± 10,35 ^A	242,58 ± 13,39 ^A	223,87 ± 15,25 ^A	239,35 ± 6,90 ^A	
ACh	25,47 ± 2,27 ^A	29,97 ± 1,96 ^A	29,01 ± 2,28 ^A	27,04 ± 2,00 ^A	25,85 ± 2,23 ^A	30,20 ± 1,96 ^A	
Corteza prefrontal							
NA	140,40 ± 12,82 ^A	127,30 ± 5,21 ^A	137,49 ± 10,18 ^A	128,02 ± 7,18 ^A	138,50 ± 11,46 ^A	127,41 ± 5,12 ^A	
DOPAC	71,41 ± 4,81 ^A	70,04 ± 3,50 ^A	70,90 ± 3,97 ^A	70,32 ± 4,13 ^A	73,99 ± 4,87 ^A	67,40 ± 2,95 ^A	
HVA	154,42 ± 4,38 ^A	148,22 ± 3,94 ^A	150,02 ± 4,12 ^A	151,65 ± 4,29 ^A	157,53 ± 4,20^A	144,40 ± 3,70^B	
5-HT	343,30 ± 14,70^A	388,96 ± 15,44^B	355,58 ± 12,62 ^A	384,19 ± 18,89 ^A	383,08 ± 18,84 ^A	355,39 ± 12,03 ^A	
5-HIAA	167,13 ± 6,75 ^A	174,50 ± 5,11 ^A	167,22 ± 4,65 ^A	175,80 ± 6,91 ^A	179,09 ± 6,64 ^A	163,54 ± 4,36 ^A	
Glutamato	1395,06 ± 53,18 ^A	1363,04 ± 50,82 ^A	1372,83 ± 51,47 ^A	1380,70 ± 53,19 ^A	1451,83 ± 47,17^A	1294,20 ± 51,64^B	
GABA	158,84 ± 6,88 ^A	149,67 ± 6,45 ^A	150,67 ± 6,07 ^A	156,48 ± 7,39 ^A	159,16 ± 7,31 ^A	147,59 ± 5,81 ^A	
ACh	31,28 ± 1,29 ^A	32,56 ± 1,49 ^A	33,91 ± 1,29^A	29,78 ± 1,43^B	33,25 ± 1,71 ^A	30,78 ± 1,05 ^A	
Hipocampo							
NA	146,01 ± 8,33 ^A	157,59 ± 7,46 ^A	149,08 ± 7,68 ^A	155,20 ± 8,16 ^A	154,97 ± 8,47 ^A	149,81 ± 7,48 ^A	
DOPAC	69,14 ± 3,24^A	81,54 ± 3,95^B	73,61 ± 3,76 ^A	78,55 ± 4,07 ^A	75,57 ± 3,97 ^A	76,47 ± 3,93 ^A	
HVA	90,62 ± 3,39 ^A	89,84 ± 3,75 ^A	90,48 ± 3,15 ^A	89,89 ± 4,11 ^A	87,93 ± 3,97 ^A	92,47 ± 3,16 ^A	
5-HT	351,86 ± 10,27^A	437,69 ± 16,89^B	391,84 ± 17,74 ^A	406,17 ± 16,65 ^A	413,31 ± 19,18 ^A	384,04 ± 14,60 ^A	
5-HIAA	202,37 ± 6,11 ^A	214,71 ± 7,14 ^A	203,04 ± 5,77 ^A	215,17 ± 7,69 ^A	210,31 ± 7,58 ^A	207,12 ± 6,00 ^A	
Glutamato	1564,26 ± 43,09 ^A	1542,23 ± 31,59 ^A	1528,05 ± 37,84 ^A	1579,79 ± 35,74 ^A	1623,69 ± 31,45^A	1487,96 ± 36,46^B	
GABA	324,92 ± 19,73 ^A	326,24 ± 14,97 ^A	317,92 ± 14,38 ^A	334,10 ± 19,76 ^A	334,22 ± 14,96 ^A	316,25 ± 19,20 ^A	
ACh	26,44 ± 1,41 ^A	25,56 ± 1,35 ^A	25,38 ± 1,36 ^A	26,59 ± 1,39 ^A	27,63 ± 1,35 ^A	24,39 ± 1,32 ^A	

	Dieta		Peso al nacer			Sexo	
	CTRL	HFD	NBW	LBW	Machos	Hembras	
Cuerpo estriado							
NA	369,41 ± 13,79 ^A	361,72 ± 10,25 ^A	362,73 ± 10,87 ^A	367,65 ± 12,83 ^A	392,53 ± 6,65^A	336,50 ± 13,02^B	
DA	23735,94 ± 1804,63 ^A	25133,40 ± 1537,62 ^A	21595,92 ± 1331,36^A	27804,05 ± 1736,27^B	24779,68 ± 1400,72 ^A	24173,06 ± 1917,56 ^A	
L-DOPA	2126,61 ± 172,94 ^A	2278,61 ± 140,80 ^A	2406,12 ± 163,75 ^A	1980,89 ± 128,51 ^A	2300,49 ± 156,33 ^A	2110,65 ± 154,25 ^A	
DOPAC	4290,25 ± 140,67^A	3801,70 ± 114,06^B	3940,13 ± 127,39 ^A	4101,12 ± 143,20 ^A	4117,79 ± 149,51 ^A	3915,37 ± 115,90 ^A	
HVA	11920,13 ± 539,60 ^A	11016,37 ± 417,44 ^A	10926,26 ± 482,43 ^A	11977,35 ± 453,49 ^A	11228,69 ± 519,96 ^A	11629,22 ± 439,00 ^A	
3-MT	1328,39 ± 64,61 ^A	1218,82 ± 56,06 ^A	1194,76 ± 57,43^A	1350,67 ± 60,00^B	1306,30 ± 58,02 ^A	1226,98 ± 62,96 ^A	
5-HT	712,28 ± 18,78^A	772,98 ± 19,77^B	724,27 ± 18,74 ^A	767,94 ± 21,27 ^A	757,90 ± 22,62 ^A	730,81 ± 17,29 ^A	
5-HIAA	536,56 ± 21,63 ^A	568,49 ± 16,40 ^A	543,98 ± 19,42 ^A	564,57 ± 18,49 ^A	574,00 ± 18,65 ^A	532,25 ± 18,66 ^A	
Glutamato	1306,26 ± 19,69 ^A	1331,95 ± 29,96 ^A	1340,03 ± 26,51 ^A	1295,69 ± 23,40 ^A	1348,97 ± 23,78 ^A	1288,43 ± 26,01 ^A	
GABA	350,40 ± 10,10 ^A	366,95 ± 10,51 ^A	362,93 ± 9,29 ^A	355,60 ± 11,80 ^A	370,31 ± 10,13 ^A	348,55 ± 10,41 ^A	
ACh	29,37 ± 1,64 ^A	32,15 ± 1,55 ^A	30,27 ± 1,60 ^A	31,51 ± 1,63 ^A	29,88 ± 1,48 ^A	31,87 ± 1,73 ^A	
Hipotálamo							
NA	8297,63 ± 703,64 ^A	10690,63 ± 779,06 ^A	9691,90 ± 781,60 ^A	9881,75 ± 896,83 ^A	9130,45 ± 611,61 ^A	10420,87 ± 981,88 ^A	
DA	356,92 ± 21,31^A	419,56 ± 18,24^B	399,83 ± 18,87 ^A	387,29 ± 23,37 ^A	394,44 ± 20,02 ^A	394,56 ± 21,45 ^A	
L-DOPA	631,72 ± 51,15 ^A	730,65 ± 38,73 ^A	728,74 ± 39,39 ^A	645,83 ± 50,18 ^A	696,40 ± 47,47 ^A	689,34 ± 43,03 ^A	
DOPAC	539,48 ± 29,07 ^A	540,55 ± 29,93 ^A	541,69 ± 31,47 ^A	538,00 ± 26,85 ^A	527,82 ± 22,62 ^A	551,25 ± 35,08 ^A	
HVA	612,88 ± 39,66 ^A	605,02 ± 27,38 ^A	616,73 ± 32,86 ^A	596,57 ± 29,81 ^A	555,20 ± 28,34^A	656,08 ± 31,46^B	
5-HT	1213,71 ± 72,23^A	1432,88 ± 66,60^B	1305,82 ± 59,57 ^A	1393,08 ± 92,18 ^A	1299,07 ± 69,12 ^A	1382,89 ± 76,50 ^A	
5-HIAA	636,15 ± 28,47 ^A	673,82 ± 23,26 ^A	657,45 ± 25,46 ^A	661,78 ± 25,90 ^A	646,87 ± 27,13 ^A	671,18 ± 24,31 ^A	
Glutamato	875,05 ± 32,23 ^A	824,57 ± 26,24 ^A	873,10 ± 25,57 ^A	805,17 ± 31,94 ^A	798,56 ± 19,47^A	890,43 ± 33,33^B	
GABA	384,69 ± 24,39 ^A	370,22 ± 11,92 ^A	381,00 ± 15,80 ^A	368,06 ± 17,28 ^A	385,36 ± 16,83 ^A	365,74 ± 16,04 ^A	
ACh	25,81 ± 1,99 ^A	26,64 ± 1,25 ^A	26,68 ± 1,48 ^A	25,97 ± 1,59 ^A	26,09 ± 1,83 ^A	26,54 ± 1,25 ^A	

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Unidades ng/g de tejido para todos los neurotransmisores a excepción del glutamato y GABA que están en µg/g de tejido. Las filas muestran los neurotransmisores y sus metabolitos en cada área cerebral. Las columnas dividen los animales según la dieta recibida, el peso al nacer o el sexo del animal. Los superíndices y la negrita indican las diferencias significativas. Diferentes letras mayúsculas representan diferencias dentro que cada variable analizada ($p < 0,05$).

6.1. Efecto de la dieta y de la IUGR sobre los neurotransmisores

La segunda parte del análisis estadístico del perfil de neurotransmisores en las áreas cerebrales se llevó a cabo para determinar la **interacción entre la dieta recibida y el peso al nacer** (Tabla 27).

No se encontró interacción de ninguno de los neurotransmisores cuantificados en ninguna de las cinco áreas cerebrales analizadas, a excepción del **hipotálamo**, donde se pudo ver una interacción significativa en los niveles de **GABA** ($p = 0,008$), el neurotransmisor inhibitor del SNC (Figura 53). Por un lado, se observó que los animales con un peso NBW que habían tenido una dieta HFD presentaban significativamente ($p = 0,033$) una menor concentración de GABA que los NBW que habían recibido una dieta CTRL. Por otro lado, dentro de los animales con una dieta CTRL los que tenían un peso LBW tenían menores niveles de GABA que los que tenían un peso NBW ($p = 0,014$).

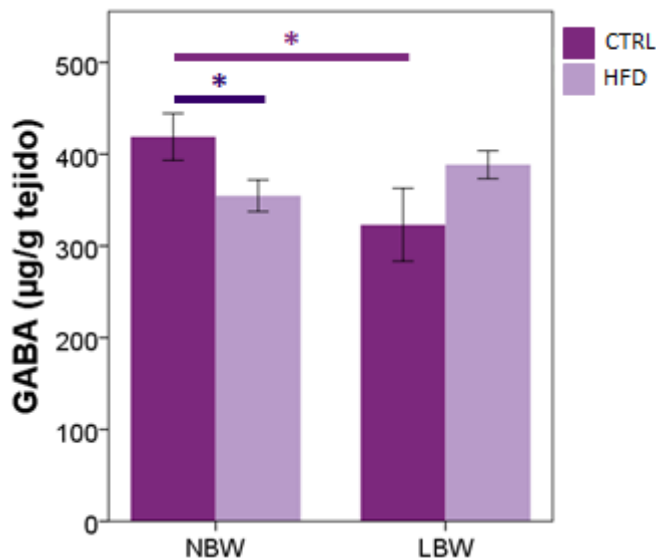


Figura 53. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el peso al nacer sobre la concentración de GABA en el hipotálamo. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales con dieta CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales con dieta HFD. Los asteriscos indican diferencias significativas ($* p < 0,05$).

Aunque no había una interacción significativa, se observó que el aumento de 5-HT en el grupo HFD afectó de manera diferente según el peso corporal al nacer.

En la **amígdala** (Figura 54A; $p = 0,026$), en el **hipotálamo** (Figura 54B; $p = 0,022$) y en el **cuerpo estriado** (Figura 54C; $p = 0,026$) se observó que los niveles más elevados de 5-HT con la dieta HFD fueron solo significativos en el grupo de animales que nacieron con peso LBW. En la **corteza prefrontal** (Figura 54D) y en el **hipocampo** (Figura 54E) el efecto fue similar tanto en los animales NBW como en los animales LBW.

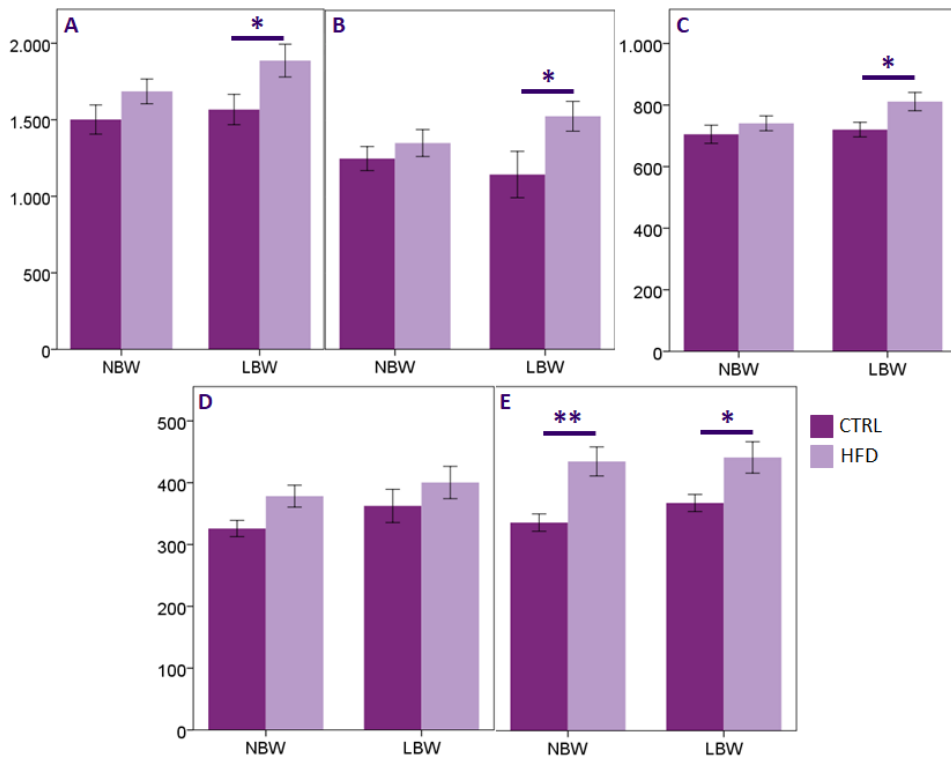


Figura 54. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el peso al nacer sobre la concentración de 5-HT en la amígdala (A), el hipotálamo (B), el cuerpo estriado (C), la corteza prefrontal (D) y el hipocampo (E). Unidades en ng/g de tejido. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales con dieta CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales con dieta HFD. Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Además, en el **cuerpo estriado** la IUGR tuvo un efecto significativo sobre la **DA (Figura 55A)** cuya concentración fue mayor en el grupo con peso LBW que los animales NBW. Aunque la interacción entre la dieta y el peso corporal no fue significativa se observó que la diferencia debida al peso corporal al nacer en los niveles de **DA** se producía solo en aquellos animales que habían recibido la dieta HFD ($p = 0,006$). Por lo tanto, el efecto de la dieta HFD solo era visible en el grupo LBW (Figura 55B).

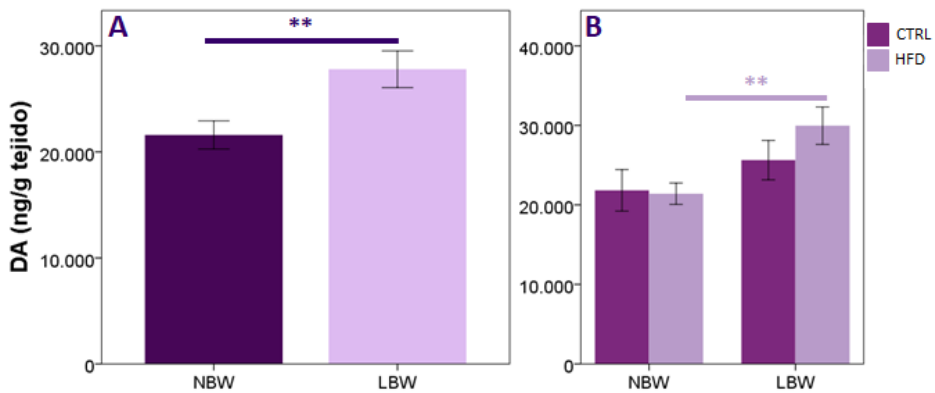


Figura 55. Representación gráfica del efecto del peso al nacer (A), y de la interacción de la dieta con el peso al nacer (B) sobre la concentración de DA en el cuerpo estriado. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales con dieta CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales con dieta HFD. Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p < 0,01$).

Tabla 27. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en distintas áreas cerebrales en función de la dieta recibida y del peso al nacer.

		NBW	LBW	p-valor			
				Dieta	Peso	Interacción	
Hipocampo	NA	CTRL	137,10 ± 10,65	154,93 ± 12,71	0,306	0,558	0,326
		HFD	159,96 ± 10,37	155,42 ± 11,07			
	DOPAC	CTRL	63,87 ± 4,59 ^{Aa}	74,40 ± 4,13 ^{Aa}	0,024	0,287	0,370
		HFD	81,10 ± 4,79 ^{Ba}	82,01 ± 6,62 ^{Aa}			
	HVA	CTRL	87,12 ± 4,33	94,12 ± 5,20	0,836	0,998	0,182
		HFD	93,06 ± 4,47	86,04 ± 6,27			
	DOPtotal	CTRL	145,90 ± 7,95	168,52 ± 8,08	0,253	0,264	0,150
		HFD	168,77 ± 6,30	165,85 ± 11,71			
	CATtotal	CTRL	278,84 ± 15,58 ^{Aa}	323,45 ± 18,22 ^{Aa}	0,072	0,296	0,146
		HFD	337,30 ± 14,84 ^{Ba}	329,91 ± 20,55 ^{Aa}			
	5-HT	CTRL	336,03 ± 14,03 ^{Aa}	367,69 ± 13,88 ^{Aa}	< 0,001	0,371	0,551
		HFD	434,76 ± 23,53 ^{Ba}	441,15 ± 25,38 ^{Ba}			
	5-HIAA	CTRL	191,93 ± 8,13	213,85 ± 8,08	0,209	0,187	0,326
		HFD	213,22 ± 7,27	216,49 ± 13,56			
	INDtotal	CTRL	533,40 ± 18,72 ^{Aa}	581,54 ± 19,35 ^{Aa}	0,001	0,331	0,543
		HFD	655,59 ± 31,81 ^{Ba}	666,77 ± 39,48 ^{Ba}			
	Glutamato	CTRL	1556,39 ± 66,14	1572,91 ± 57,47	0,701	0,351	0,530
		HFD	1502,07 ± 41,39	1586,05 ± 46,56			
	GABA	CTRL	306,66 ± 25,78	347,24 ± 30,42	0,977	0,462	0,371
		HFD	328,24 ± 14,80	324,25 ± 26,79			
ACh	CTRL	27,51 ± 1,82	25,14 ± 2,24	0,658	0,596	0,085	
	HFD	23,25 ± 1,89	27,68 ± 1,77				
Amígdala	NA	CTRL	289,73 ± 18,12 ^{Aa}	419,67 ± 64,69 ^{Ab}	0,987	0,050	0,287
		HFD	335,67 ± 31,99 ^{Aa}	375,10 ± 42,05 ^{Aa}			
	DA	CTRL	705,45 ± 33,80	682,81 ± 32,18	0,947	0,734	0,387
		HFD	665,36 ± 39,76	717,17 ± 60,81			
	DOPAC	CTRL	447,20 ± 41,74	543,63 ± 51,70	0,828	0,150	0,447
		HFD	470,87 ± 36,03	501,09 ± 43,99			
	HVA	CTRL	814,35 ± 19,52	861,67 ± 63,50	0,285	0,809	0,543
		HFD	908,06 ± 52,11	887,69 ± 71,62			
	DOPtotal	CTRL	1966,99 ± 68,37	2088,12 ± 121,17	0,928	0,343	0,862
		HFD	1995,30 ± 90,14	2079,17 ± 143,26			
	CATtotal	CTRL	2441,89 ± 155,78	2569,03 ± 189,88	0,844	0,476	0,911
		HFD	2428,80 ± 134,45	2521,42 ± 135,74			
	5-HT	CTRL	1501,57 ± 95,32 ^{Aa}	1567,02 ± 99,18 ^{Aa}	0,012	0,171	0,482
		HFD	1685,72 ± 80,52 ^{Aa}	1886,99 ± 107,41 ^{Ba}			
	5-HIAA	CTRL	618,86 ± 27,66	678,11 ± 27,91	0,575	0,082	0,786
		HFD	643,03 ± 20,20	686,51 ± 38,39			
	INDtotal	CTRL	2120,43 ± 100,44 ^{Aa}	2245,12 ± 102,41 ^{Aa}	0,013	0,061	0,452
		HFD	2315,06 ± 89,82 ^{Aa}	2601,64 ± 129,96 ^{Ba}			
	Glutamato	CTRL	1346,97 ± 44,67	1412,57 ± 37,09	0,983	0,382	0,371
		HFD	1379,38 ± 29,20	1378,62 ± 35,71			
GABA	CTRL	223,03 ± 16,27	246,93 ± 26,07	0,723	0,208	0,916	
	HFD	218,71 ± 13,75	238,95 ± 12,71				
ACh	CTRL	25,58 ± 3,99	25,38 ± 2,62	0,155	0,607	0,653	
	HFD	31,39 ± 2,63	28,43 ± 3,00				

				p-valor			
		NBW	LBW	Dieta	Peso	Interacción	
Corteza prefrontal	NA	CTRL	150,48 ± 22,44	129,19 ± 11,03	0,338	0,407	0,426
		HFD	127,49 ± 5,17	127,06 ± 9,91			
	DOPAC	CTRL	71,95 ± 8,07	70,87 ± 5,75	0,818	0,910	0,945
		HFD	70,17 ± 4,05	69,91 ± 6,01			
	HVA	CTRL	150,58 ± 5,95	158,25 ± 6,52	0,307	0,697	0,386
		HFD	149,63 ± 5,82	146,70 ± 5,50			
	DOPtotal	CTRL	222,53 ± 7,88	229,12 ± 9,81	0,361	0,838	0,557
		HFD	219,80 ± 8,40	216,60 ± 6,40			
	CATtotal	CTRL	353,69 ± 18,47	358,31 ± 19,71	0,901	0,641	0,827
		HFD	347,29 ± 12,00	360,06 ± 22,12			
	5-HT	CTRL	325,93 ± 13,14	362,59 ± 26,87	0,046	0,189	0,740
		HFD	378,39 ± 17,81	400,40 ± 26,18			
	5-HIAA	CTRL	163,75 ± 9,58	170,88 ± 9,90	0,385	0,326	0,884
		HFD	169,89 ± 3,98	179,48 ± 9,77			
	INDtotal	CTRL	489,68 ± 21,47	533,47 ± 34,18	0,073	0,193	0,832
		HFD	548,29 ± 20,52	579,88 ± 34,62			
	Glutamato	CTRL	1396,34 ± 79,08	1393,78 ± 75,94	0,678	0,932	0,906
		HFD	1355,20 ± 70,38	1370,88 ± 76,40			
	GABA	CTRL	159,40 ± 9,89	158,28 ± 10,18	0,364	0,633	0,554
		HFD	144,63 ± 7,52	155,14 ± 10,81			
ACh	CTRL	34,00 ± 1,61	28,25 ± 1,59	0,507	0,035	0,458	
	HFD	33,84 ± 1,99	31,04 ± 2,25				
Hipotálamo	NA	CTRL	8209,43 ± 871,23	8496,07 ± 1365,02	0,066	0,887	0,709
		HFD	11026,13 ± 1138,69	10385,64 ± 1112,20			
	DA	CTRL	361,95 ± 30,94	348,53 ± 27,16	0,039	0,569	0,905
		HFD	428,97 ± 20,97	408,44 ± 31,99			
	L-DOPA	CTRL	652,69 ± 54,48	600,27 ± 104,22	0,130	0,212	0,653
		HFD	781,39 ± 51,58	670,69 ± 55,58			
	DOPAC	CTRL	511,69 ± 28,01	585,81 ± 60,98	0,817	0,813	0,163
		HFD	564,78 ± 51,55	511,92 ± 24,00			
	HVA	CTRL	616,73 ± 57,76	606,47 ± 50,58	0,876	0,715	0,876
		HFD	616,73 ± 39,71	591,17 ± 38,61			
	DOPtotal	CTRL	2225,07 ± 143,97	2057,62 ± 255,38	0,293	0,176	0,878
		HFD	2391,87 ± 91,40	2182,21 ± 98,13			
	CATtotal	CTRL	10348,32 ± 962,32	9214,08 ± 1685,00	0,053	0,696	0,671
		HFD	12519,83 ± 1409,11	12567,85 ± 1168,97			
	5-HT	CTRL	1250,61 ± 78,97 ^{Aa}	1146,07 ± 151,71 ^{Aa}	0,023	0,732	0,180
		HFD	1352,55 ± 88,09 ^{Aa}	1527,81 ± 97,94 ^{Ba}			
	5-HIAA	CTRL	645,40 ± 37,09	622,28 ± 48,06	0,297	0,943	0,601
		HFD	665,78 ± 35,64	683,32 ± 29,96			
	INDtotal	CTRL	1907,75 ± 100,41 ^{Aa}	1768,35 ± 162,49 ^{Aa}	0,033	0,832	0,191
		HFD	2018,33 ± 110,94 ^{Aa}	2211,14 ± 120,42 ^{Ba}			
Glutamato	CTRL	907,85 ± 40,47	825,85 ± 50,34	0,280	0,108	0,761	
	HFD	849,05 ± 32,60	792,75 ± 42,79				
GABA	CTRL	418,94 ± 25,59 ^{Aa}	323,04 ± 39,74 ^{Ab}	0,978	0,186	0,008	
	HFD	354,73 ± 17,23 ^{Ba}	388,52 ± 15,17 ^{Aa}				
ACh	CTRL	27,68 ± 2,56	23,64 ± 3,11	0,675	0,541	0,250	
	HFD	25,99 ± 1,84	27,24 ± 1,77				

			NBW	LBW	p-valor		
					Dieta	Peso	Interacción
Cuerpo estriado	NA	CTRL	379,88 ± 18,06	358,94 ± 21,28	0,672	0,896	0,177
		HFD	349,54 ± 12,71	374,91 ± 16,02			
	DA	CTRL	21834,51 ± 2607,80 ^{Aa}	25637,38 ± 2479,18 ^{Aa}	0,373	0,007	0,280
		HFD	21412,39 ± 1348,85 ^{Aa}	29970,72 ± 2353,49 ^{Ab}			
	L-DOPA	CTRL	2275,64 ± 248,13	1962,68 ± 242,11	0,528	0,061	0,636
		HFD	2516,53 ± 221,93	1997,44 ± 122,63			
	DOPAC	CTRL	4260,22 ± 217,81 ^{Aa}	4320,28 ± 189,50 ^{Aa}	0,011	0,437	0,653
		HFD	3693,90 ± 116,83 ^{Ba}	3918,48 ± 201,54 ^{Aa}			
	HVA	CTRL	11262,32 ± 795,05	12643,72 ± 689,32	0,175	0,113	0,655
		HFD	10641,91 ± 602,61	11422,03 ± 578,05			
	3-MT	CTRL	1210,46 ± 96,21 ^{Aa}	1472,53 ± 56,29 ^{Ab}	0,151	0,046	0,272
		HFD	1181,48 ± 71,50 ^{Aa}	1259,28 ± 89,19 ^{Aa}			
	DOPtotal	CTRL	38533,33 ± 1575,54 ^{Aa}	46228,27 ± 2016,19 ^{Ab}	0,721	0,002	0,401
		HFD	39446,20 ± 1443,33 ^{Aa}	43976,56 ± 2328,97 ^{Aa}			
	CATtotal	CTRL	38892,93 ± 1595,72 ^{Aa}	46587,21 ± 2033,03 ^{Ab}	0,722	0,002	0,406
		HFD	39795,74 ± 1442,73 ^{Aa}	44343,61 ± 2334,55 ^{Aa}			
	5-HT	CTRL	705,05 ± 29,61 ^{Aa}	720,23 ± 23,70 ^{Aa}	0,024	0,119	0,309
		HFD	740,54 ± 24,01 ^{Aa}	811,32 ± 29,54 ^{Ba}			
	5-HIAA	CTRL	533,18 ± 33,11	540,28 ± 29,01	0,230	0,459	0,629
		HFD	553,12 ± 23,37	586,66 ± 22,67			
	INDtotal	CTRL	1270,54 ± 50,59 ^{Aa}	1260,51 ± 45,79 ^{Aa}	0,057	0,239	0,161
		HFD	1293,66 ± 31,07 ^{Aa}	1406,73 ± 46,71 ^{Ba}			
	Glutamato	CTRL	1312,42 ± 32,41	1299,49 ± 22,72	0,535	0,240	0,409
		HFD	1365,34 ± 41,18	1291,89 ± 42,33			
	GABA	CTRL	355,66 ± 15,33	345,13 ± 13,78	0,283	0,647	0,815
		HFD	368,52 ± 11,76	365,11 ± 18,91			
	ACh	CTRL	30,97 ± 2,41 ^{Aa}	27,60 ± 2,19 ^{Aa}	0,168	0,650	0,054
		HFD	29,69 ± 2,20 ^{Aa}	35,07 ± 1,89 ^{Ba}			

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Unidades ng/g de tejido para todos los neurotransmisores a excepción del glutamato y GABA que están en µg/g de tejido. Las filas muestran los neurotransmisores y los metabolitos de cada área cerebral en función de la dieta (CTRL o HFD). Las columnas dividen los animales según el peso al nacer (NBW o LBW). Los superíndices y los p-valores en negrita indican las diferencias significativas (p < 0,05). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las dietas según el peso al nacer. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los pesos al nacer según la dieta.

6.2. Efecto de la dieta y del sexo sobre los neurotransmisores

Finalmente, en la última parte del análisis estadístico, se comparó el efecto de la dieta HFD sobre los niveles de los neurotransmisores discriminando entre machos y hembras para determinar la interacción entre la dieta recibida y el sexo de los animales (**Tabla 28**).

En la **corteza prefrontal** y en el **hipocampo** no se observaron interacciones significativas entre la dieta y el sexo en ningún neurotransmisor.

En la **amígdala** se observó una interacción significativa en las concentraciones del metabolito **DOPAC** (**Figura 56A**; $p = 0,016$) y de **5-HT** (**Figura 56B**; $p = 0,010$). En ambos neurotransmisores se vio que las hembras con una dieta CTRL presentaban niveles más elevados que los machos que recibieron una dieta CTRL. Además, en los niveles de 5-HT se observó que el aumento producido por la dieta HFD solo se producía en los machos.

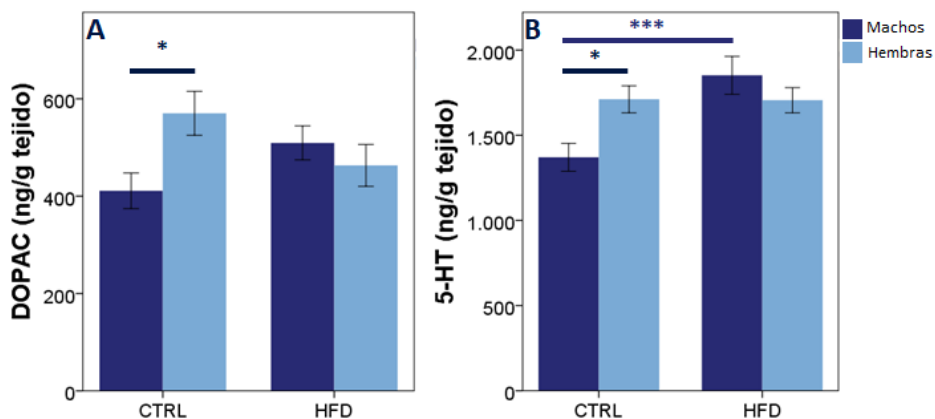


Figura 56. Representación gráfica de la interacción de la dieta con sexo sobre la concentración de DOPAC (A) y de 5-HT (B) en la amígdala. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los machos, y las **barras claras** representan los resultados de las hembras. Los asteriscos indican diferencias significativas (***) $p < 0,001$; * $p < 0,05$).

En el **cuerpo estriado** se encontró una interacción entre la dieta y el sexo en los metabolitos de la DA (**DOPAC, HVA y 3-MT**). Los machos que recibieron la dieta HFD presentaban concentraciones de los tres metabolitos inferiores a los machos que recibieron la dieta CTRL (**Figuras 57A-C**). Además, en los niveles de **3-MT** también se vio que los machos con la dieta CTRL tenían mayores concentraciones que las hembras que recibieron la dieta CTRL. Mientras que en los niveles de **HVA** se vio que los machos con la dieta HFD tenían concentraciones inferiores a las hembras que recibieron la dieta HFD. El efecto contrario se vio en los niveles de **glutamato** (**Figura 57D**) donde los machos con la dieta HFD tenían concentraciones superiores a las hembras que recibieron la dieta HFD.

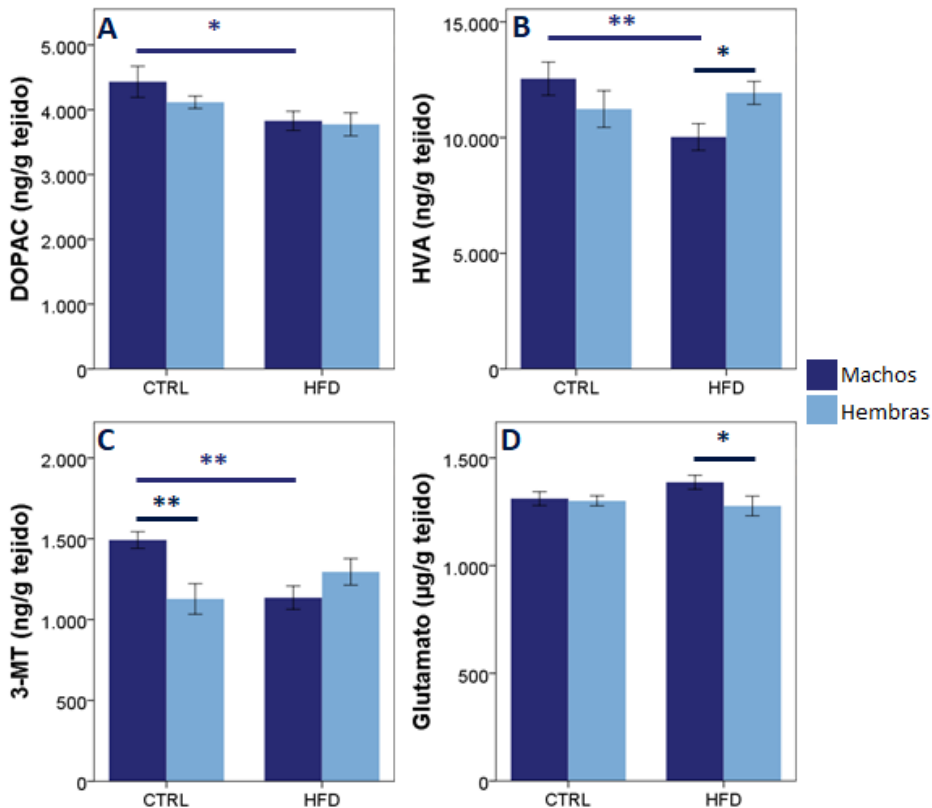


Figura 57. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el sexo sobre la concentración de DOPAC (A), de HVA (B), de 3-MT (C) y de Glutamato (D) en el cuerpo estriado. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los machos, y las **barras claras** representan los resultados de las hembras. Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

En el **hipotálamo** se había observado mayores niveles del metabolito HVA y de glutamato en las hembras que en los machos. Cuando se analizó la interacción se vio una interacción significativa en los niveles del metabolito **HVA** (**Figura 58A**) debido a que las hembras tenían concentraciones más elevadas que los machos solamente en el grupo que habían recibido la dieta CTRL. Este mismo efecto, aunque no mostró una interacción significativa, se observó en los niveles de **glutamato** (**Figura 58B**).

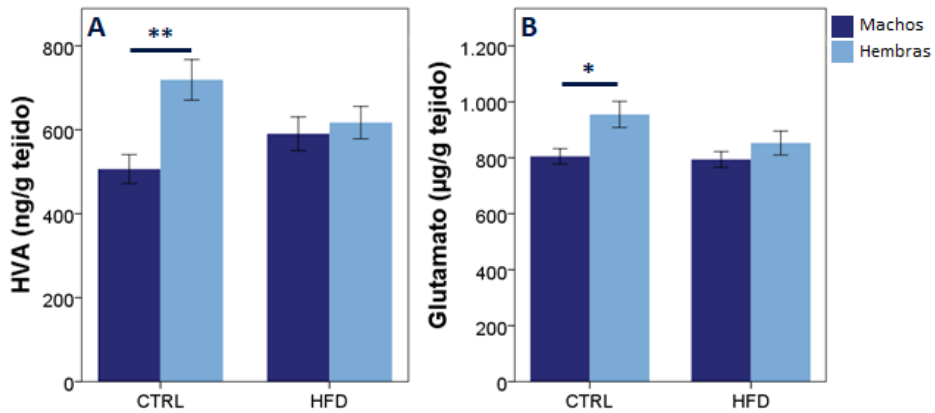


Figura 58. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el sexo sobre la concentración de HVA (A) y de Glutamato (B) en el hipotálamo. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los machos, y las **barras claras** representan los resultados de las hembras. Los asteriscos indican diferencias significativas (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Tabla 28. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en distintas áreas cerebrales en función de la dieta recibida y del sexo.

			Machos	Hembras	p-valor		
					Dieta	Sexo	Interacción
Hipocampo	NA	CTRL	154,76 ± 14,20	137,27 ± 8,61	0,323	0,562	0,341
		HFD	155,17 ± 10,08	159,46 ± 11,00			
	DOPAC	CTRL	68,93 ± 4,72	69,34 ± 4,70	0,027	0,908	0,967
		HFD	81,09 ± 5,81	81,95 ± 5,61			
	HVA	CTRL	86,52 ± 4,68	95,64 ± 4,63	0,807	0,339	0,437
		HFD	89,33 ± 6,63	90,27 ± 4,32			
	DOPtotal	CTRL	152,77 ± 8,99	160,97 ± 8,35	0,281	0,286	0,869
		HFD	161,07 ± 9,67	172,23 ± 8,49			
	CATtotal	CTRL	301,76 ± 20,91	298,24 ± 14,48	0,071	0,833	0,986
		HFD	335,88 ± 20,22	331,68 ± 16,03			
	5-HT	CTRL	362,08 ± 14,70 ^{Aa}	341,65 ± 14,35 ^{Aa}	< 0,001	0,176	0,698
		HFD	456,00 ± 27,86 ^{Ba}	419,37 ± 18,86 ^{Ba}			
	5-HIAA	CTRL	208,47 ± 10,29	195,66 ± 5,92	0,201	0,661	0,377
		HFD	212,35 ± 11,73	216,68 ± 9,16			
	INDtotal	CTRL	577,63 ± 20,62 ^{Aa}	537,31 ± 18,38 ^{Aa}	0,001	0,139	0,880
		HFD	685,38 ± 41,09 ^{Ba}	636,05 ± 26,49 ^{Ba}			
	Glutamato	CTRL	1675,52 ± 33,98 ^{Aa}	1441,87 ± 63,86 ^{Ab}	0,776	0,006	0,053
		HFD	1566,69 ± 50,16 ^{Aa}	1523,42 ± 41,45 ^{Aa}			
	GABA	CTRL	334,66 ± 20,67	313,02 ± 37,00	0,923	0,463	0,897
		HFD	333,82 ± 22,40	318,67 ± 20,62			
ACh	CTRL	27,52 ± 1,63	25,37 ± 2,34	0,685	0,110	0,602	
	HFD	27,74 ± 2,19	23,57 ± 1,48				
Amígdala	NA	CTRL	364,48 ± 65,21	346,87 ± 42,35	0,996	0,494	0,772
		HFD	377,16 ± 50,75	333,78 ± 18,09			
	DA	CTRL	668,82 ± 38,86	721,70 ± 24,25	0,859	0,492	0,581
		HFD	684,79 ± 46,12	690,61 ± 53,18			
	DOPAC	CTRL	410,94 ± 36,55 ^{Aa}	570,25 ± 45,09 ^{Ab}	0,916	0,172	0,016
		HFD	509,35 ± 34,85 ^{Aa}	463,25 ± 43,11 ^{Aa}			
	HVA	CTRL	828,14 ± 47,64	843,15 ± 39,15	0,285	0,181	0,287
		HFD	828,42 ± 43,29	958,21 ± 66,20			
	DOPtotal	CTRL	1907,90 ± 87,73	2135,10 ± 87,76	0,909	0,160	0,458
		HFD	1997,98 ± 96,60	2068,87 ± 131,55			
	CATtotal	CTRL	2516,23 ± 208,74	2481,97 ± 125,52	0,818	0,644	0,494
		HFD	2376,06 ± 76,23	2551,80 ± 161,62			
	5-HT	CTRL	1370,51 ± 81,56 ^{Aa}	1711,19 ± 79,40 ^{Ab}	0,011	0,285	0,010
		HFD	1851,80 ± 111,29 ^{Ba}	1705,81 ± 73,86 ^{Aa}			
	5-HIAA	CTRL	655,92 ± 28,42	637,34 ± 30,20	0,585	0,448	0,889
		HFD	676,40 ± 34,00	649,52 ± 24,63			
	INDtotal	CTRL	2026,43 ± 101,67 ^{Aa}	2348,53 ± 71,06 ^{Ab}	0,017	0,443	0,027
		HFD	2528,20 ± 132,74 ^{Ba}	2369,13 ± 91,61 ^{Aa}			
	Glutamato	CTRL	1359,02 ± 43,23	1399,18 ± 41,35	0,992	0,472	0,723
		HFD	1371,91 ± 34,10	1385,58 ± 30,66			
GABA	CTRL	229,46 ± 27,84	239,86 ± 9,08	0,739	0,385	0,780	
	HFD	218,73 ± 15,50	238,93 ± 10,51				
ACh	CTRL	25,20 ± 3,69	25,77 ± 2,73	0,150	0,216	0,293	
	HFD	26,39 ± 2,85	33,27 ± 2,47				

		Machos	Hembras	p-valor			
				Dieta	Sexo	Interacción	
Corteza prefrontal	NA	CTRL	152,42 ± 23,90	127,04 ± 4,99	0,339	0,344	0,314
		HFD	126,90 ± 6,62	127,69 ± 8,35			
	DOPAC	CTRL	73,33 ± 7,71	69,50 ± 6,16	0,838	0,296	0,688
		HFD	74,49 ± 6,55	65,94 ± 2,80			
	HVA	CTRL	160,75 ± 5,71	148,08 ± 6,23	0,307	0,029	0,969
		HFD	155,11 ± 6,10	141,86 ± 4,62			
	DOPtotal	CTRL	234,08 ± 9,10	217,58 ± 7,83	0,357	0,017	0,731
		HFD	229,60 ± 8,42	207,80 ± 5,15			
	CATtotal	CTRL	367,39 ± 24,35	344,61 ± 10,28	0,894	0,440	0,649
		HFD	356,49 ± 14,15	350,58 ± 19,84			
	5-HT	CTRL	357,30 ± 24,70	327,74 ± 14,35	0,038	0,182	0,991
		HFD	404,57 ± 27,10	374,54 ± 16,10			
	5-HIAA	CTRL	178,08 ± 10,07	154,96 ± 7,36	0,316	0,054	0,437
		HFD	179,93 ± 9,21	169,48 ± 4,91			
	INDtotal	CTRL	535,37 ± 31,64	482,70 ± 20,90	0,057	0,106	0,830
		HFD	584,51 ± 34,71	544,02 ± 19,76			
	Glutamato	CTRL	1475,19 ± 78,31	1294,90 ± 54,94	0,763	0,034	0,775
		HFD	1432,36 ± 59,42	1293,73 ± 79,98			
	GABA	CTRL	169,88 ± 8,83	145,04 ± 9,20	0,420	0,181	0,219
		HFD	150,22 ± 10,86	149,17 ± 7,75			
ACh	CTRL	31,76 ± 2,12	30,74 ± 1,50	0,475	0,243	0,497	
	HFD	34,62 ± 2,67	30,81 ± 1,49				
Hipotálamo	NA	CTRL	7253,11 ± 948,05	9192,93 ± 952,65	0,057	0,190	0,724
		HFD	10154,46 ± 618,65	11280,43 ± 1513,54			
	DA	CTRL	334,33 ± 18,92 ^{Aa}	379,51 ± 37,97 ^{Aa}	0,030	0,850	0,170
		HFD	438,17 ± 24,69 ^{Ba}	403,82 ± 26,50 ^{Aa}			
	L-DOPA	CTRL	556,57 ± 58,05 ^{Aa}	697,47 ± 77,21 ^{Aa}	0,092	0,751	0,060
		HFD	785,39 ± 54,29 ^{Ba}	684,33 ± 53,29 ^{Aa}			
	DOPAC	CTRL	529,86 ± 23,57	549,11 ± 55,13	1,000	0,615	0,938
		HFD	526,34 ± 36,15	552,58 ± 47,14			
	HVA	CTRL	506,58 ± 34,30 ^{Aa}	719,18 ± 48,32 ^{Ab}	0,832	0,007	0,033
		HFD	590,56 ± 40,01 ^{Aa}	617,24 ± 38,69 ^{Aa}			
	DOPtotal	CTRL	1979,28 ± 184,67	2345,28 ± 162,66	0,305	0,289	0,097
		HFD	2340,46 ± 76,69	2257,97 ± 111,43			
	CATtotal	CTRL	8455,13 ± 1122,35 ^{Aa}	11431,34 ± 1019,90 ^{Aa}	0,055	0,247	0,278
		HFD	12494,92 ± 669,72 ^{Ba}	12592,76 ± 1703,87 ^{Aa}			
	5-HT	CTRL	1168,17 ± 97,99	1264,94 ± 110,84	0,043	0,479	0,817
		HFD	1406,16 ± 87,59	1455,48 ± 100,96			
	5-HIAA	CTRL	626,30 ± 42,85	647,42 ± 39,57	0,350	0,573	0,989
		HFD	661,82 ± 36,06	683,98 ± 31,29			
	INDtotal	CTRL	1840,76 ± 138,16	1878,56 ± 103,17	0,057	0,663	0,893
		HFD	2067,99 ± 112,88	2139,45 ± 121,54			
Glutamato	CTRL	804,95 ± 27,59 ^{Aa}	955,16 ± 46,62 ^{Ab}	0,152	0,011	0,247	
	HFD	793,91 ± 28,03 ^{Aa}	852,68 ± 42,84 ^{Aa}				
GABA	CTRL	393,25 ± 32,56	373,29 ± 39,81	0,624	0,459	0,959	
	HFD	379,63 ± 18,26	362,25 ± 16,01				
ACh	CTRL	24,35 ± 3,25	27,52 ± 2,19	0,726	0,699	0,326	
	HFD	27,43 ± 2,13	26,05 ± 1,56				

			Machos	Hembras	p-valor		
					Dieta	Sexo	Interacción
Cuerpo estriado	NA	CTRL	391,79 ± 8,97 ^{Aa}	342,05 ± 26,66 ^{Ab}	0,790	0,001	0,718
		HFD	393,21 ± 10,11 ^{Aa}	332,65 ± 13,08 ^{Ab}			
	DA	CTRL	25252,20 ± 2401,51	21882,74 ± 2756,15	0,525	0,710	0,306
		HFD	24307,15 ± 1558,37	25890,80 ± 2632,54			
	L-DOPA	CTRL	2057,31 ± 189,30	2202,84 ± 307,47	0,501	0,436	0,154
		HFD	2523,40 ± 233,18	2033,82 ± 132,79			
	DOPAC	CTRL	4432,31 ± 240,28 ^{Aa}	4116,62 ± 96,88 ^{Aa}	0,013	0,314	0,473
		HFD	3829,48 ± 147,58 ^{Ba}	3776,05 ± 177,46 ^{Aa}			
	HVA	CTRL	12543,70 ± 717,90 ^{Aa}	11234,20 ± 793,15 ^{Aa}	0,161	0,641	0,016
		HFD	10023,25 ± 575,07 ^{Ba}	11933,09 ± 494,46 ^{Ab}			
	3-MT	CTRL	1492,32 ± 51,41 ^{Aa}	1128,04 ± 94,19 ^{Ab}	0,224	0,189	0,001
		HFD	1135,78 ± 71,93 ^{Ba}	1295,47 ± 81,78 ^{Aa}			
	DOPtotal	CTRL	43765,29 ± 2035,11	41269,96 ± 2423,31	0,603	0,518	0,592
		HFD	41537,36 ± 1889,16	41304,60 ± 2015,58			
	CATtotal	CTRL	44152,66 ± 2035,41	41597,99 ± 2449,43	0,605	0,500	0,595
		HFD	41931,65 ± 1887,71	41627,71 ± 2021,88			
	5-HT	CTRL	719,30 ± 32,17	704,56 ± 19,21	0,033	0,324	0,643
		HFD	793,28 ± 29,33	752,67 ± 26,45			
	5-HIAA	CTRL	554,57 ± 31,17	516,74 ± 30,22	0,224	0,120	0,869
		HFD	591,81 ± 21,51	545,17 ± 23,72			
	INDtotal	CTRL	1309,75 ± 45,20	1221,31 ± 46,73	0,071	0,059	0,915
		HFD	1385,09 ± 41,95	1305,87 ± 38,61			
	Glutamato	CTRL	1311,06 ± 32,08 ^{Aa}	1300,98 ± 23,37 ^{Aa}	0,462	0,094	0,161
		HFD	1386,88 ± 32,52 ^{Aa}	1277,03 ± 45,91 ^{Ab}			
	GABA	CTRL	361,05 ± 15,16	339,75 ± 13,26	0,267	0,148	0,977
		HFD	378,03 ± 13,81	355,88 ± 15,78			
ACh	CTRL	29,43 ± 2,28	29,29 ± 2,49	0,227	0,434	0,398	
	HFD	30,28 ± 2,00	34,02 ± 2,32				

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Unidades ng/g de tejido para todos los neurotransmisores a excepción del glutamato y GABA que están en µg/g de tejido. Las filas muestran los neurotransmisores y los metabolitos de cada área cerebral en función de la dieta (CTRL o HFD). Las columnas dividen los animales según el sexo (machos o hembras). Los superíndices y los p-valores en negrita indican las diferencias significativas ($p < 0,05$). Diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas entre las dietas según el sexo. Diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas entre ambos sexos según la dieta recibida.

7. Perfil de neuropéptidos en el hipotálamo

Los neuropéptidos involucrados en ingesta, Neuropéptido Y (NPY) y Proopiomelanocortina (POMC), se cuantificaron a partir de los homogenados de hipotálamo usando kits de ELISA comerciales específicos para la especie porcina.

Primero, se compararon las concentraciones de cada **neuropéptido según la dieta recibida** teniendo en cuenta todos los animales (CTRL *versus* HFD, **Tabla 29**), y no se observó ninguna diferencia significativa.

Tabla 29. Concentración de los neuropéptidos NPY y POMC en el hipotálamo en función de la dieta y el peso al nacer.

			NBW	LBW	<i>p</i> -valor		
					Dieta	Peso	Interacción
NPY	CTRL	18,69 ± 2,64	15,33 ± 2,86	23,00 ± 4,50	0,309	0,621	0,107
	HFD	23,02 ± 2,33	24,91 ± 3,38	20,79 ± 3,19			
POMC	CTRL	5,28 ± 0,69	6,16 ± 0,89	3,52 ± 0,54	0,306	0,015	0,725
	HFD	5,90 ± 0,93	7,81 ± 1,78	4,33 ± 0,61			

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Unidades ng/g de tejido. Los *p*-valores en negrita indican las diferencias significativas.

En segundo lugar, se analizaron los resultados según la **interacción de la dieta recibida y el peso al nacer** (**Tabla 29**).

El neuropéptido orexigénico **NPY** no presentó diferencias en su concentración entre los animales con la dieta HFD en comparación con los animales que recibieron la dieta CTRL. Tampoco se vio afectado por el peso de los animales al nacer, ni hubo un efecto de la interacción entre ambos factores, aunque estadísticamente salió casi tendencia. Al analizar los resultados más detalladamente se observó que los animales NBW que habían recibido una dieta HFD presentaban una tendencia a niveles más elevados de NPY ($p = 0,052$) que los animales que habían recibido la dieta CTRL (**Figura 59**), mientras que esto no se observó en los animales LBW.

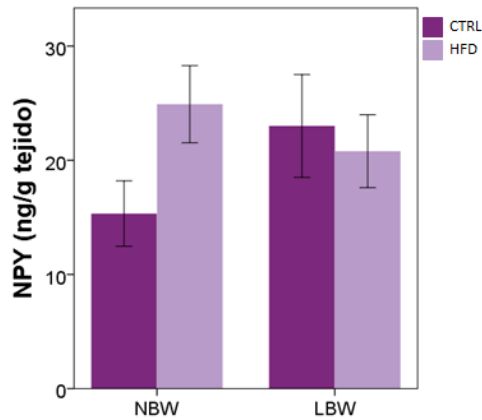


Figura 59. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el peso al nacer sobre la concentración de NPY en el hipotálamo. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales con dieta CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales con dieta HFD.

El neuropéptido anorexigénico **POMC** no fue alterado por la dieta HFD. Por el contrario, se vio afectado por el peso de los animales al nacer, ya que disminuyó su concentración en los animales con peso LBW respecto los animales con peso NBW (**Figura 60A**). Al analizar los resultados con más detalle, se observó que el efecto debido al peso al nacer se producía con ambas dietas, pero solamente era significativo en los animales que recibieron una dieta HFD ($p = 0,027$) (**Figura 60B**).

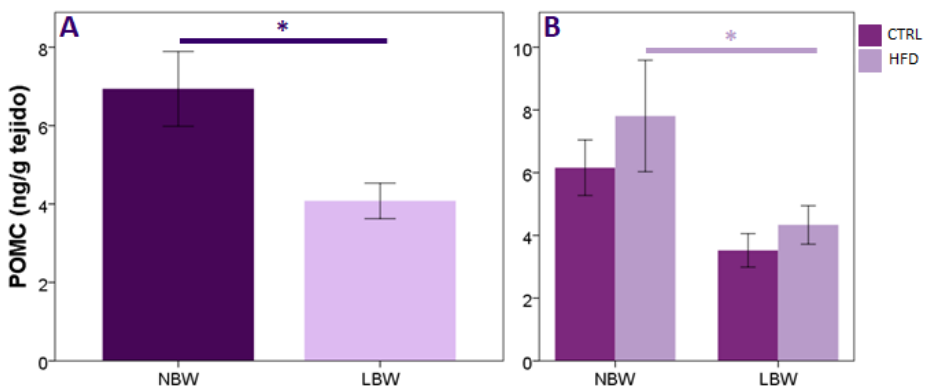


Figura 60. Representación gráfica del efecto del peso al nacer (A), y de la interacción de la dieta con el peso al nacer (B) sobre la concentración de POMC en el hipotálamo. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales con dieta CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales con dieta HFD. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$).

Por último, se analizaron los resultados de los neuropéptidos según el **sexo** de los animales, y se determinó la interacción entre la dieta recibida y el sexo (**Tabla 30**).

Tabla 30. Concentración de los neuropéptidos NPY y POMC en el hipotálamo en función del sexo y de la dieta.

					<i>p</i> -valor		
			CTRL	HFD	Sexo	Dieta	Interacción
NPY	Machos	22,53 ± 2,65	16,64 ± 2,90 ^{Aa}	27,36 ± 3,69 ^{Ab}	0,638	0,221	0,079
	Hembras	20,04 ± 2,36	21,32 ± 4,84 ^{Aa}	19,35 ± 2,68 ^{Ba}			
POMC	Machos	7,10 ± 0,87	6,35 ± 0,96 ^{Aa}	7,85 ± 1,48 ^{Aa}	0,024	0,390	0,687
	Hembras	4,39 ± 0,73*	4,05 ± 0,82 ^{Aa}	4,60 ± 1,08 ^{Ba}			

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Unidades ng/g de tejido. Los superíndices y los *p*-valores en negrita indican las diferencias significativas ($p < 0,05$). El asterisco indica diferencias entre ambos sexos; diferentes letras mayúsculas indican diferencias entre ambos sexos según la dieta recibida; diferentes letras minúsculas indican diferencias entre las dietas según el sexo.

No se observaron diferencias significativas entre machos y hembras en los niveles de NPY, pero sí en los niveles de POMC donde los machos tenían concentraciones más elevadas que las hembras. Además, se observó que las hembras no se veían influenciadas por la dieta, ya que no había diferencias entre las dietas para ninguno de los dos neuropéptidos, mientras que los machos con la dieta HFD presentaban concentraciones más elevadas de ambos neuropéptidos que los machos CTRL (**Figura 61**).

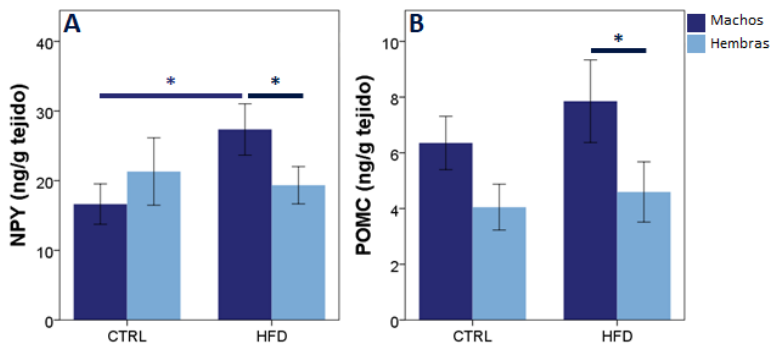


Figura 61. Representación gráfica de la interacción de la dieta con el sexo sobre la concentración de NPY (A) y de POMC (B) en el hipotálamo. Las barras representan la media ± SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los machos, y las **barras claras** representan los resultados de las hembras. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$).

8. Grado de peroxidación lipídica

Se analizó en la amígdala, en el hipocampo, en la corteza prefrontal y en el cuerpo estriado el grado de peroxidación lipídica mediante la determinación de los niveles de uno de los productos finales de la peroxidación lipídica, el malondialdehído (MDA).

Los resultados se muestran en pmoles de MDA en gramo de tejido, junto a los *p*-valores del análisis estadístico en la **Tabla 31**.

Al igual que en los resultados de los neuropéptidos en el hipotálamo, primero se compararon los niveles de **MDA según la dieta recibida** (CTRL *versus* HFD, **Tabla 31**). No se observó ninguna diferencia significativa de este parámetro entre los dos grupos de estudio en la amígdala, la corteza prefrontal, ni el cuerpo estriado. En el **hipocampo** se observó un efecto significativo de la dieta, donde los animales que recibieron la dieta HFD presentaban concentraciones ligeramente inferiores de MDA que los que recibieron la dieta CTRL (**Figura 62A**).

Tabla 31. Concentración de MDA en función de la dieta y el peso al nacer en distintas áreas cerebrales.

			NBW	LBW	<i>p</i> -valor		
					Dieta	Peso	Interacción
AMY	CTRL	132,69 ± 12,37	119,80 ± 13,98	148,45 ± 21,26	0,276	0,121	0,777
	HFD	147,93 ± 9,63	136,96 ± 11,85	159,81 ± 15,19			
HPC	CTRL	135,62 ± 4,09	128,51 ± 5,58	143,44 ± 5,21	0,013	0,107	0,695
	HFD	116,95 ± 5,89*	112,37 ± 7,91	121,53 ± 8,89			
PFC	CTRL	34,53 ± 4,68	30,52 ± 6,14	38,97 ± 7,22	0,367	0,469	0,450
	HFD	28,73 ± 3,09	27,46 ± 3,47	30,11 ± 5,38			
EST	CTRL	76,74 ± 5,69	71,58 ± 9,29	82,41 ± 6,22	0,702	0,879	0,363
	HFD	81,05 ± 7,77	84,76 ± 12,30	77,02 ± 9,63			

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Unidades pmol/g de tejido. Las filas dividen los animales en función de la dieta (CTRL o HFD) en cada área cerebral. La cuarta y quinta columna dividen los animales según el peso al nacer (NBW o LBW). Los *p*-valores en negrita indican las diferencias significativas (*p* < 0,05). El asterisco indica diferencias significativas entre ambas dietas.

En segundo lugar, se analizaron los resultados según la **interacción de la dieta recibida y el peso al nacer**. Estadísticamente no hubo una interacción significativa entre la dieta y el peso al nacer en ninguna de las cuatro áreas analizadas. Pero en el hipocampo se observó que la diferencia observada por el efecto de la dieta, si separábamos los animales según el peso al nacer, solo era significativa en los animales con peso LBW ($p = 0,043$) mientras que no se producía en los animales NBW ($p = 0,122$) (**Figura 62B**).

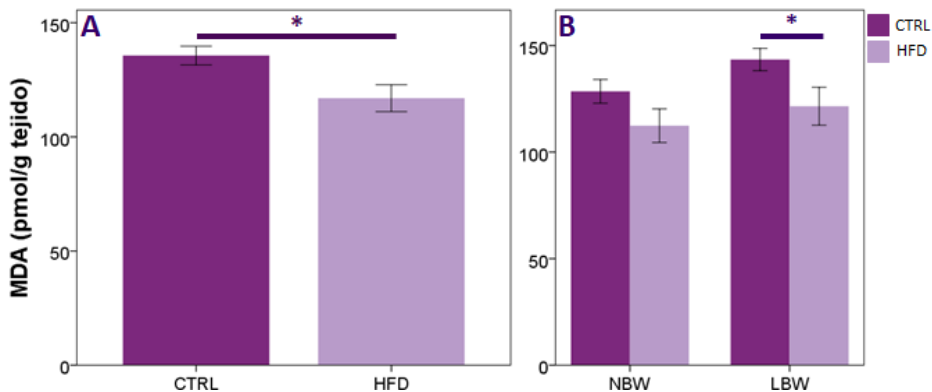


Figura 62. Representación gráfica del efecto de la dieta (A), y de la interacción de la dieta con el peso al nacer (B) sobre la concentración de MDA en el hipocampo. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales con dieta CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales con dieta HFD. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$).

Por último, también se analizó el efecto del **sexo**, pero no se encontraron diferencias significativas en los niveles de MDA en ninguna de las cuatro áreas cerebrales estudiadas.

9. Análisis inmunohistoquímico del hipocampo

Al igual que en los resultados del capítulo 1, para analizar los efectos de la dieta HFD sobre la morfología del hipocampo se utilizaron varios marcadores inmunohistoquímicos, y se evaluaron en distintas áreas del hipocampo, en el *Cornu Ammonis* (CA1, CA2 y CA3) y en el *Gyrus Dentatus* (interno y externo), pero a continuación solo se explican las áreas CA1 y la parte interna del GD, ya que no se observó ninguna diferencia en las otras áreas.

Se utilizaron muestras de ambos grupos, CTRL (n = 12) y HFD (n = 12). Dentro de cada grupo se incluyeron la mitad de peso NBW y la otra mitad de peso LBW. También se incluyó un número igual de machos y hembras (**Figura 63**).

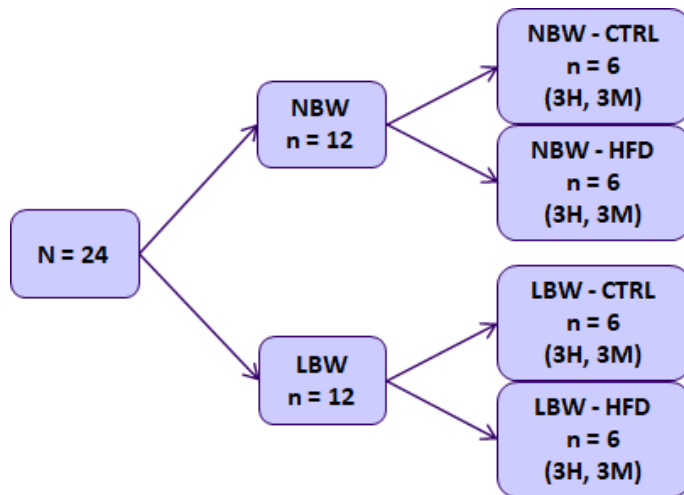


Figura 63. Esquema del diseño experimental para el análisis inmunohistoquímico y proteómico del hipocampo. H, hembras; M, machos.

El primer marcador usado para evaluar los efectos de la dieta HFD fue **NeuN**. Es marcador de los cuerpos y núcleos neuronales en las neuronas maduras, y se utilizó para analizar el número y la distribución de neuronas maduras en las áreas CA1 y GD en el hipocampo (**Figura 64** y **Figura 65**). Los resultados cuantitativos en relación con los efectos de la dieta, el peso al nacer y su interacción se presentan en la **Tabla 32**.

La evaluación de la expresión de este marcador en el hipocampo no se vio influenciado por el sexo del animal ni en CA1 ni en GD.

Tabla 32. Efecto de la dieta HFD y de la IUGR sobre la inmunotinción de NeuN en las áreas CA1 y GD del hipocampo.

				<i>p</i> -valor			
		NBW	LBW	Dieta	Peso	Interacción	
CA1	Nº neuronas	CTRL	352,81 ± 17,18 ^{Aa}	481,00 ± 161,83 ^{Ab}	0,897	< 0,001	0,539
		HFD	336,84 ± 12,63 ^{Aa}	505,50 ± 22,00 ^{Ab}			
	Tamaño medio (µm ²)	CTRL	650,90 ± 52,89 ^{Aa}	626,75 ± 145,43 ^{Aa}	0,521	0,175	0,309
		HFD	767,67 ± 30,49 ^{Ba}	600,20 ± 34,96 ^{Ab}			
	Área (%)	CTRL	12,60 ± 0,61 ^{Aa}	15,00 ± 1,94 ^{Aa}	0,037	0,010	0,759
		HFD	14,45 ± 0,46 ^{Ba}	17,47 ± 0,98 ^{Ab}			
GD	Nº neuronas	CTRL	208,56 ± 10,39 ^{Aa}	217,33 ± 15,34 ^{Aa}	0,084	0,333	0,825
		HFD	226,42 ± 4,74 ^{Aa}	240,38 ± 5,55 ^{Aa}			
	Tamaño medio (µm ²)	CTRL	1345,26 ± 45,64 ^{Aa}	1131,78 ± 164,07 ^{Aa}	0,575	0,050	0,260
		HFD	1307,23 ± 29,95 ^{Aa}	1244,58 ± 26,85 ^{Aa}			
	Área (%)	CTRL	15,92 ± 0,55 ^{Aa}	13,96 ± 1,20 ^{Aa}	0,010	0,322	0,180
		HFD	17,02 ± 0,39 ^{Aa}	17,32 ± 0,48 ^{Ba}			
	Grosor (µm)	CTRL	92,44 ± 2,36 ^{Aa}	92,72 ± 3,29 ^{Aa}	0,008	0,781	0,857
		HFD	84,08 ± 1,75 ^{Ba}	85,39 ± 4,57 ^{Ba}			

Los resultados se presentan como la media ± SE. Las filas muestran las medidas en función de la dieta (CTRL o HFD). Las columnas dividen los animales según el peso al nacer (NBW o LBW). Los superíndices y los *p*-valores en negrita indican las diferencias significativas (*p* < 0,05). La significación estadística fue determinada mediante el test UNIANOVA con ajuste de Tukey, con un mínimo de 6 secciones por individuo. Diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas entre las dietas según el peso al nacer. Diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas entre los pesos según la dieta recibida.

Ambas áreas del hipocampo se vieron afectadas por la dieta HFD. En el área CA1 se observaron diferencias debidas a la dieta HFD en los animales NBW, mientras que en los animales LBW no se observaron. Se pudo observar en estos animales que las neuronas eran más grandes, y, por lo tanto, ocupaban un área mayor que en los animales que recibieron la dieta CTRL.

Un dato que llamó la atención es que los animales que habían sido afectados por la IUGR, y por lo tanto nacieron LBW, independientemente de la dieta que recibieron, presentaban mayor área de marcaje inmunopositivo, y por lo tanto un mayor número de neuronas maduras.

En el GD no se observaron diferencias entre los grupos NBW y LBW. En cuanto al efecto de la dieta HFD, tuvo efecto independientemente de si los animales habían sufrido IUGR o no. Se pudo observar que los animales que habían recibido la dieta HFD presentaban una tendencia a tener mayor número de neuronas ($p = 0,084$), que estaban más dispersas y deslocalizadas que en los animales que recibieron la dieta CTRL. En consecuencia, los animales que recibieron la dieta HFD presentaron un GD de menor grosor que los animales con la dieta CTRL.

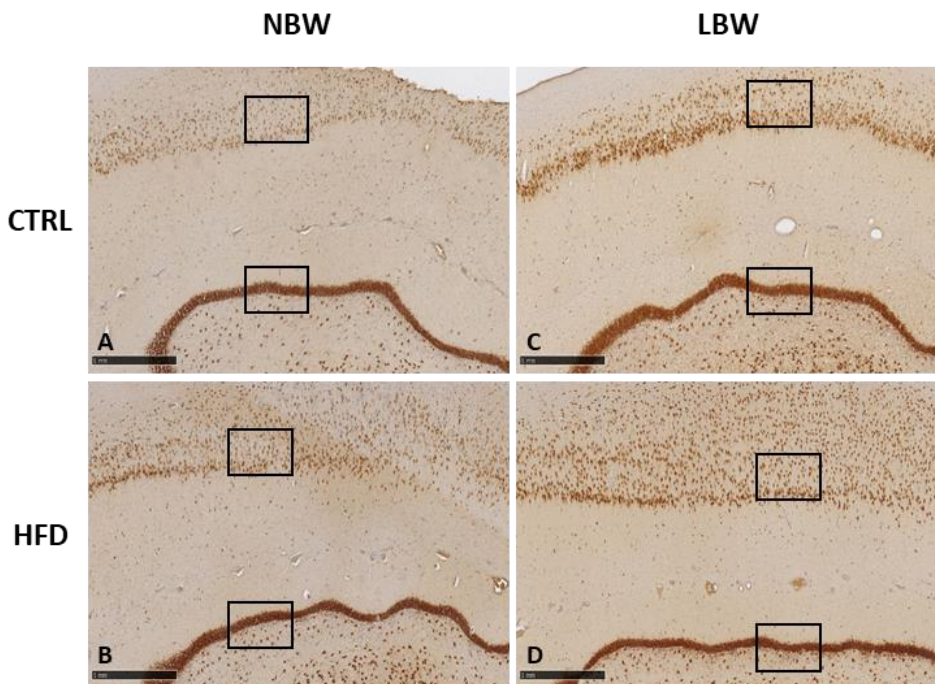


Figura 64. Efecto de la dieta HFD y de la IUGR sobre la inmunotinción con NeuN en el hipocampo. Imágenes representativas muestran las neuronas maduras de los animales que nacieron con peso NBW (A-B), o con peso LBW (C-D) según la dieta recibida. En recuadros negros se muestran las áreas CA1 y GD ampliadas en la Figura 65. Barra de escala = 1000 μm (A-D).

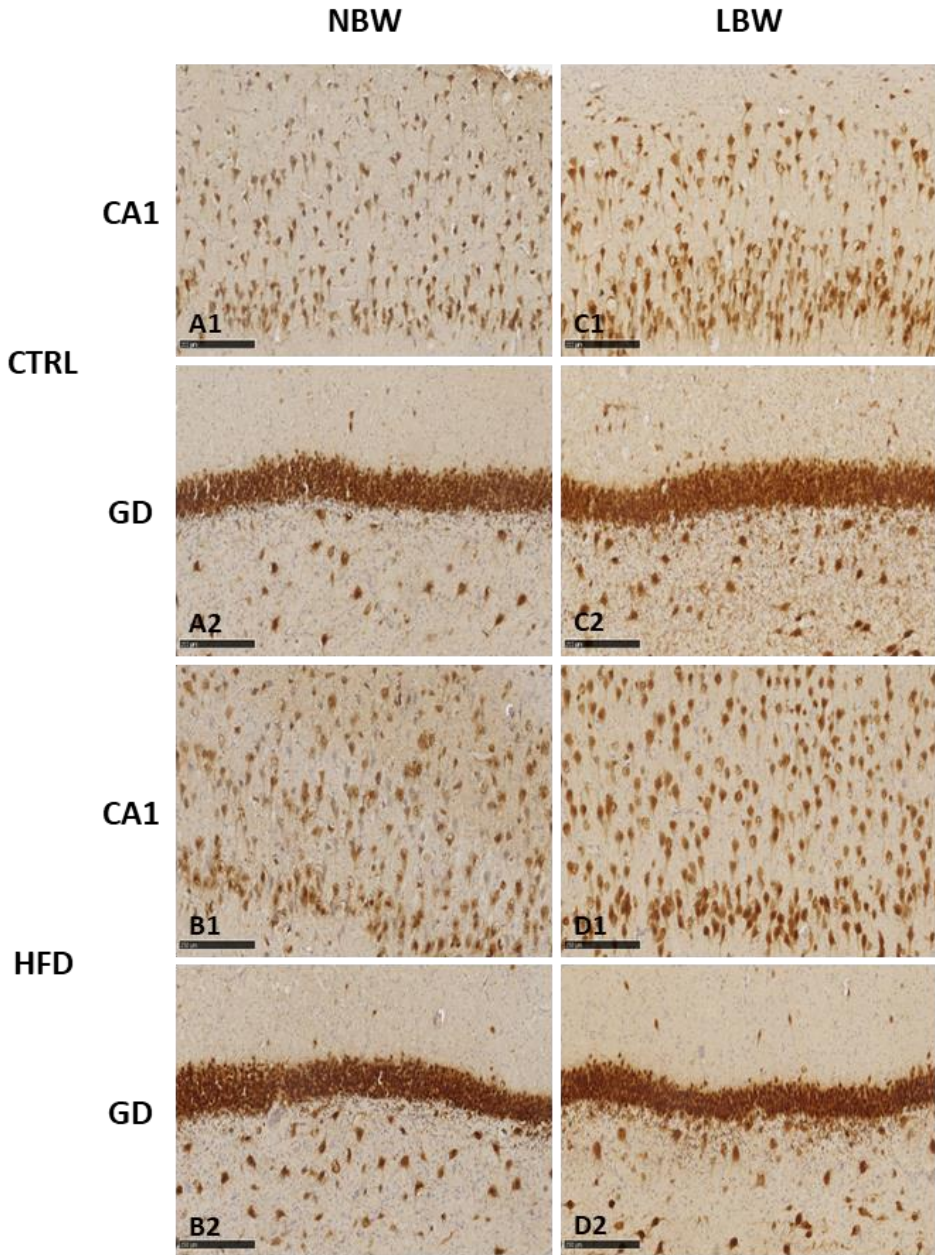


Figura 65. Efecto de la dieta HFD y de la IUGR sobre la inmunotinción con NeuN en las áreas CA1 y GD del hipocampo. Imágenes representativas muestran las neuronas maduras en las áreas CA1 (A1-D1) y GD (A2-D2), de los animales que nacieron con peso NBW (A1-A2, B1-B2), o con peso LBW (C1-C2, D1-D2) según la dieta recibida. Barra de escala = 250 μ m (A1–D1, A2–D2).

El marcaje de la proteína doblecortina (**DCX**) está asociada a microtúbulos del citoesqueleto y se expresa solo en células neuronales precursoras durante su migración y diferenciación (neuroblastos), por lo que se observa en etapas tempranas del desarrollo neuronal.

Al igual que en los cerdos de 1 mes y 6 meses del capítulo 1, en estos animales de un año el marcaje con DCX se observó principalmente en el área GD. Al ser animales adultos el marcaje es muy débil independientemente del grupo, y no se observaron diferencias causadas por la dieta HFD ni en CA1 ni en GD. Sin embargo, como se puede ver en la **Figura 66** los animales LBW que recibieron la dieta HFD tenían un menor marcaje que los otros grupos de animales, resultado que fue inversamente a lo visto con el marcaje de NeuN.

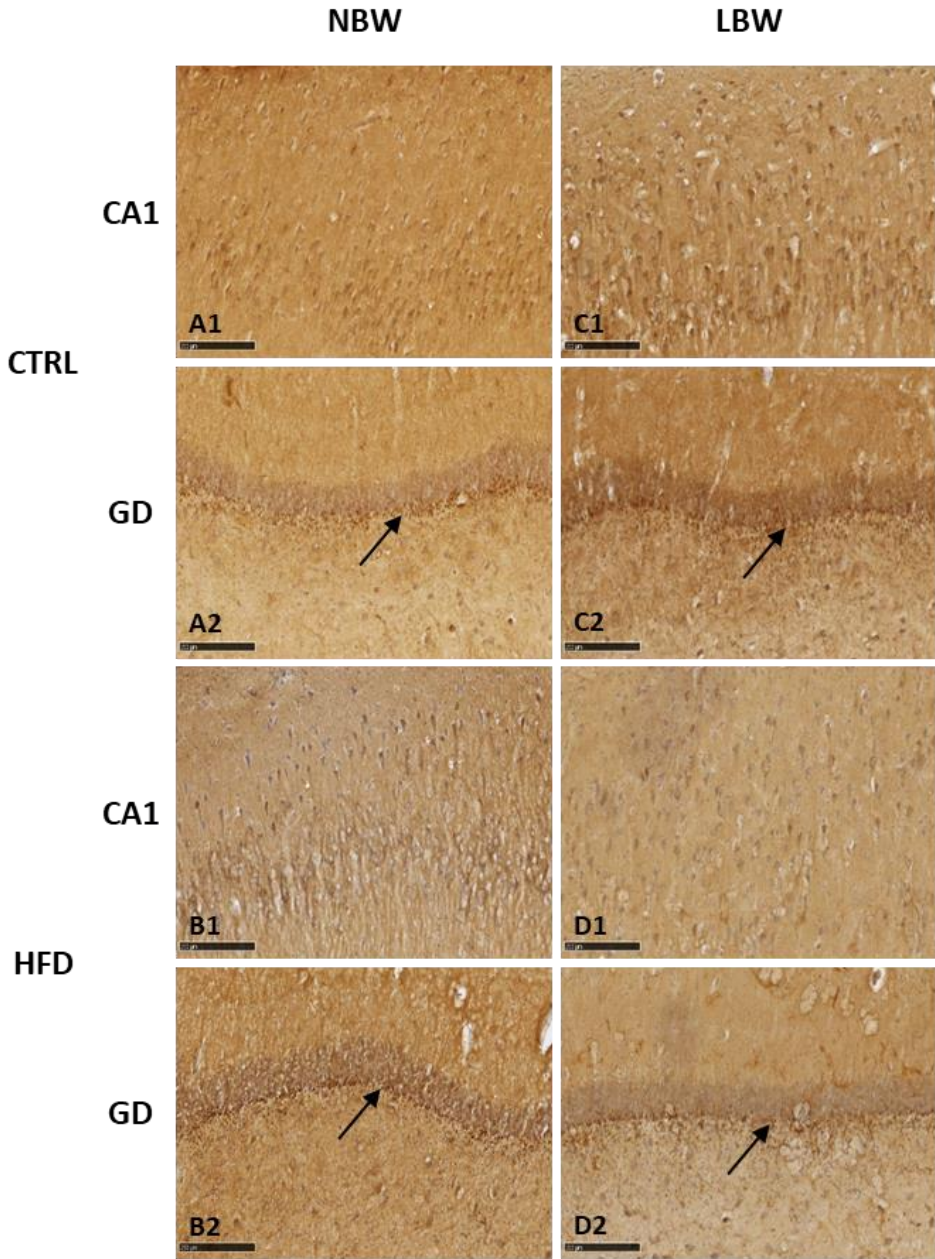


Figura 66. Efecto de la dieta HFD y de la IUGR sobre la inmunotinción con DCX en las áreas CA1 y GD del hipocampo. Imágenes representativas muestran las neuronas inmaduras en las áreas CA1 (A1-D1) y GD (A2-D2), de los animales que nacieron con peso NBW (A1-A2, B1-B2), o con peso LBW (C1-C2, D1-D2) según la dieta recibida. Las flechas negras indican la localización de las neuronas inmaduras en el GD. Barra de escala = 250 μ m (A1-D1, A2-D2).

La inmunotinción de la proteína de los neurofilamentos (**NFT**) proporcionó un marcaje específico del citoesqueleto neuronal marcando fuertemente la neuropila. No se observaron diferencias causadas por la dieta HFD ni por el peso al nacer (**Figura 67**).

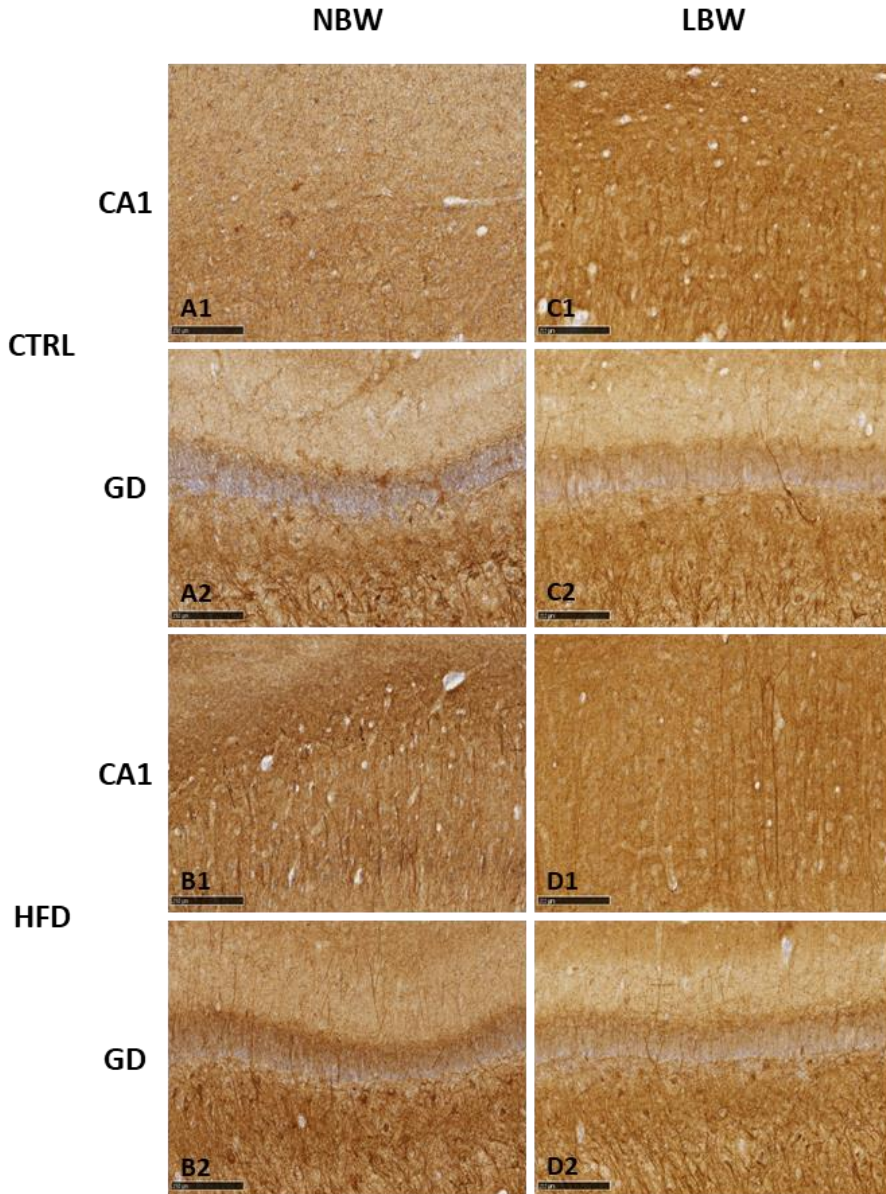


Figura 67. Efecto de la dieta HFD y de la IUGR sobre la inmunotinción con NFT en las áreas CA1 y GD del hipocampo. Imágenes representativas muestran las áreas CA1 (A1-D1) y GD (A2-D2), de los animales que nacieron con peso NBW (A1-A2, B1-B2), o con peso LBW (C1-C2, D1-D2) según la dieta recibida. Barra de escala = 250 μ m (A1-D1, A2-D2).

10. Análisis del proteoma del hipocampo mediante TMT10-plex

Para identificar las proteínas diferencialmente abundantes (DAP) en el hipocampo entre las dos condiciones de estudio se llevó a cabo un experimento proteómico de cuantificación relativa mediante marcaje TMT10-plex (**ver detalles en Material y Métodos, apartado 9.2**).

Se utilizaron las mismas 24 muestras del estudio que en el análisis inmunohistoquímico (**Figura 63**): 12 de cada grupo CTRL y HFD, y dentro de cada grupo la mitad de peso NBW y la otra mitad de peso LBW, además de tres controles que consistieron en un *pool* de estas 24 muestras.

Para el procesamiento de todas las muestras, así como de los controles, se realizaron 3 experimentos TMT10-plex. Las muestras se marcaron según la **Tabla 33**, para asegurar aleatoriedad en el marcaje y evitar el posible sesgo introducido por los diferentes *reporter ions*.

Tabla 33. Diseño experimental del marcaje con TMT10-plex.

	Experimento		
	1	2	3
126	Pool 1a	Pool 2a	Pool 3a
127N	C1.1	C2.2	T2.3
127C	T1.1	T4.2	T3.3
128N	C2.1	C1.2	C3.3
128C	T2.1	C4.2	C1.3
129N	C3.1	T1.2	C2.3
129C	T3.1	T2.2	T1.3
130N	C4.1	T3.2	T4.3
130C	T4.1	C3.2	C4.3
131	Pool 1b	Pool 2b	Pool 3b

3 experimentos con 10 marcajes diferenciales aleatorios para un total de 24 muestras y tres controles. Las muestras C (dieta CTRL) y T (dieta HFD).

Se obtuvieron 56413 patrones de fragmentación peptídica correspondientes a 23128 péptidos que a su vez correspondían a 3508 proteínas identificadas en la especie porcina. Las proteínas no caracterizadas fueron anotadas por homología (> 98 %) con las secuencias de proteínas de otros mamíferos.

La intensidad de marcaje de cada péptido fue normalizada según lo descrito en **Material y Métodos, apartado 9.2.6**. Eliminamos la muestra C1.1 del análisis porque se consideró un valor atípico. Esta muestra tenía una menor cantidad de proteína en comparación con las otras y las proteínas menos abundantes parecían estar menos representadas.

Después del procesado de las muestras, 2736 proteínas pudieron ser cuantificadas y comparadas entre los grupos de estudio. Se estableció un *p*-valor ajustado menor de 0,05 y un FC \geq 1,5.

Siguiendo estos criterios se identificaron 31 proteínas distintas que mostraron diferencias significativas en alguna de las comparaciones hechas en este estudio: variable Sexo, variable Peso al nacer, o variable Dieta.

Los resultados mostraron 10 DAP en la comparación por Sexo (Machos *versus* Hembras), 13 en la comparación por Peso al nacer (LBW *versus* NBW), y 8 en la comparación por Dieta (HFD *versus* CTRL). Como muestra el diagrama de Venn no hubo ninguna DAP que estuviera en más de una comparación (**Figura 68**).

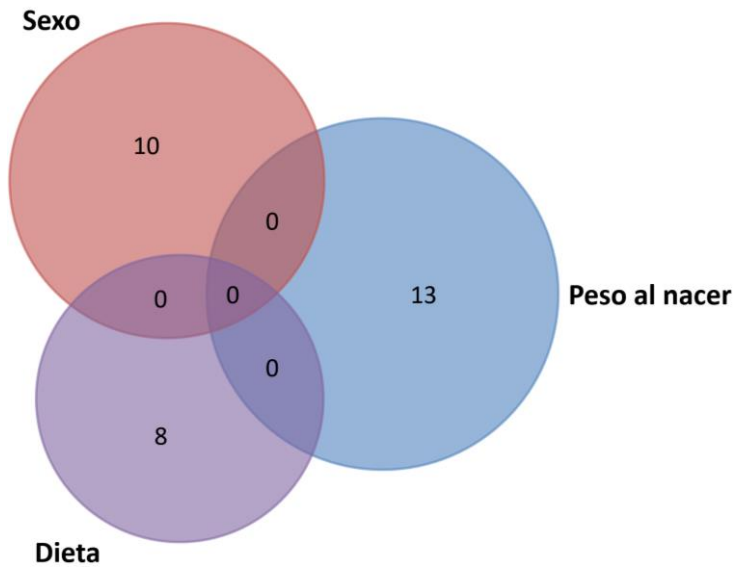


Figura 68. Diagrama de Venn con el número de DAP identificadas en las comparaciones por sexo, peso al nacer y dieta.

De las 10 DAP en la comparación según el sexo del animal, seis de ellas eran más abundantes en los machos que en las hembras, mientras que las cuatro restantes estaban disminuidas. En la comparación según el peso al nacer, de las 13 DAP, cinco de ellas eran más abundantes en los animales LBW que en los animales NBW, mientras que ocho estaban disminuidas. En la comparación de la dieta recibida, de las 8 DAP, tres de ellas eran más abundantes con la dieta HFD, mientras que cinco estaban disminuidas en comparación con la dieta CTRL (**Tabla 34**).

Por tanto, este análisis identificó muy pocas DAP analizando las variables por separado. Además, no se observaba ningún patrón ni nexo entre ellas, por lo que se decidió analizar las proteínas según la interacción del peso al nacer con la dieta, es decir, analizar si los individuos NBW y LBW presentaban diferencias entre sí dependiendo del tipo de dieta recibida.

Tabla 34. Listado de proteínas diferencialmente abundantes en función del sexo, del peso al nacer o de la dieta.

	Acceso UniProt	Gen	Identificación	FC	p-valor
Machos vs. Hembras	F1RTV5	PAICS	AIR carboxylase	0,61	0,001
	F1RY11	CCDC93	Coiled-coil domain-containing protein 93	0,61	0,018
	I3LLA0	RBM25	RNA-binding protein 25	0,65	0,015
	M3TYW5	QARS1	Glutamyl-tRNA synthetase	0,66	0,023
	F1RK50	PAM16	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM16	1,50	0,016
	I3LR62	COA1	Cytochrome c oxidase assembly factor 1 homolog	1,52	0,018
	F1S0V3	ANXA6	Annexin A6	1,53	0,024
	AOA287B0D3	GRIN1	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 1	1,54	0,047
	I3LDD5	PRTFDC1	Phosphoribosyl transferase domain containing 1	1,70	0,008
	F2Z4Y3	LIMK2	LIM domain kinase 2	2,61	0,002
LBW vs. NBW	AOA287AH65	ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6	0,40	0,009
	F1RKQ4	TKFC	ATP-dependent dihydroxyacetone kinase	0,44	0,033
	F1S6K2	JPH3	Junctophilin	0,59	0,045
	F1SSF5	BLVRA	Biliverdin reductase A	0,62	0,009
	F1RKE9	FBXO21	F-box only protein 21	0,63	0,044
	F6Q4L6	SLC25A24	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	0,64	0,001
	E3US74	HECW2	HECT-type E3 ubiquitin transferase	0,66	0,032
	AOA5G2R504	NRXN2	Neurexin-2	0,67	0,010
	F1SQN4	RPS6KA3	Non-specific serine/threonine protein kinase	1,51	0,026
	F1S9X3	PPP1R13B	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 13B	1,56	0,001
	I3LC46	HTATSF1	HIV Tat-specific factor 1	1,57	0,040
	Q06AA9	UBE2D2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2	1,57	0,039
	AOA287A2D7	TRIP11	Thyroid hormone receptor interactor 11	1,62	0,047
HFD vs. CTRL	F1RVV6	HID1	HID1 domain containing	0,56	0,001
	F1SJF2	CTTNBP2	Cortactin-binding protein 2	0,62	0,017
	AOA4X1TPC2	RPL23A	60S ribosomal protein L23a	0,62	0,011
	P79281	PTN	Pleiotrophin	0,63	0,044
	F1SHD2	ADAM23	ADAM metalloproteinase domain 23	0,66	0,022
	F1RSZ8	ENPP6	Choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase	1,51	0,012
	F1SHF4	SCFD1	Sec1 family domain-containing protein 1 isoform a	1,52	0,019
	F1S1M4	TSPAN6	Tetraspanin	1,53	0,016

Identificación en Uniprot, gen que codifica la proteína, nombre de la proteína, cambio diferencial según la variable analizada (FC, en rojo *up* aumenta, en azul *down* disminuye).

10.1. Efecto de la interacción dieta*peso sobre la abundancia diferencial de proteínas

Siguiendo los criterios establecidos, al comparar entre pesos al nacer teniendo en cuenta la dieta (LBW y NBW dentro de cada grupo CTRL y HFD), se identificaron 72 DAP en la comparación Dieta*Peso, de las cuales 10 habían sido identificadas previamente al ver el efecto del peso al nacer. La cantidad de proteínas diferenciales que se observaron en las comparaciones por dieta respecto a las que se observaron por peso al nacer indicaron que la variable Peso al nacer fue la que tuvo mayor relevancia en esta parte del estudio (**Figura 69**).

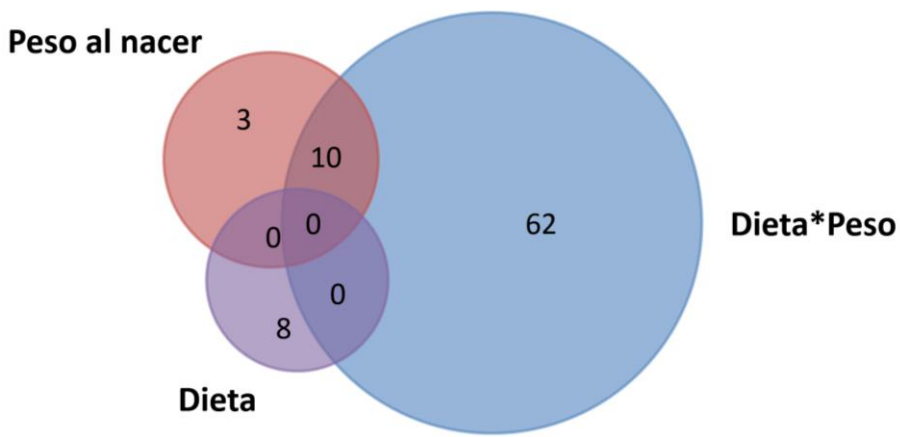


Figura 69. Diagrama de Venn con el número de DAP identificadas en las comparaciones por peso al nacer, dieta y la interacción dieta*peso.

De estas 72 proteínas, 35 se encontraron al comparar CTRL-LBW con CTRL-NBW. Por otro lado, en la comparación de los dos grupos de animales que recibieron la dieta HFD se obtuvieron 38 proteínas con distinta abundancia. Las proteínas identificadas en esta comparación se muestran en la **Tabla 35** junto con los FC correspondientes para cada comparación. De ellas, solo una proteína (SLC25A24) fue común en ambos grupos (**Figura 70**).

Tabla 35. Listado de proteínas diferencialmente abundantes identificadas entre CTRL-LBW/NBW y HFD-LBW/NBW.

	Acceso UniProt	Gen	Identificación	FC	p-valor
HFD-LBW vs. HFD-NBW	F1SSF5	BLVRA	Biliverdin reductase A	0,59	0,042
	D7RA22	ATG4B	Cysteine protease	0,66	0,038
	F1RX45	DIP2C	Disco-interacting protein 2 homolog C	0,63	0,030
	E3US74	HECW2	HECT-type E3 ubiquitin transferase	0,49	0,008
	A0A287AUF9	ITGB8	Integrin beta-8	0,52	0,020
	A0A287AYY7	LRRC47	Leucine-rich repeat-containing protein 47	0,59	0,026
	I3LSP1	METAP2	Methionine aminopeptidase 2	0,60	0,025
	A0A5G2R504	NRXN2	Neurexin-2	0,52	0,003
	I3L973	PARVA	Parvin alpha	0,62	0,009
	I3LRG2	PEX19	Peroxin-19	0,64	0,046
	A0A287AH65	ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6	0,31	0,020
	Q29554	HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	0,54	0,001
	F1RK61	UFD1	Ubiquitin recognition factor in ER associated degradation 1	0,65	0,031
	A0A5G2QH63	UBE4A	Ubiquitination factor E4A	0,61	0,004
	F1RTR6	PFKFB2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2	1,58	0,049
	I3LFV9	AKAP9	A-kinase anchor protein 9 isoform 2	1,62	0,038
	F1RFM7	AIMP2	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	1,71	0,037
	A0A287AI55	KCTD8	BTB domain-containing protein	1,89	0,039
	F1RQS5	CDC5L	Cell division cycle 5-like protein	1,98	0,042
	F1RUN0	CELF2	CUGBP Elav-like family member 2 isoform 2	1,60	0,019
	I3LU05	DOCK10	Dedicator of cytokinesis 10	1,52	0,041
	A0PFK7	CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta	1,69	0,003
	A0A287ACW7	FDX2	Ferredoxin-2, mitochondrial	1,77	0,010
	A0A287AA47	GCLM	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	1,90	0,031
	I3LLY2	GDE1	Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1	1,53	0,043
	I3LIA4	GAMT	Guanidinoacetate N-methyltransferase	1,57	0,040
	Q06AT0	HPCAL1	Hippocalcin-like protein 1	1,65	0,009
	I3LC46	HTATSF1	HIV Tat-specific factor 1	2,16	0,010
	F1STT6	MTFR1L	Mitochondrial fission regulator 1 like	1,96	0,004
	A0A287BKD6	NPDC1	Neural proliferation differentiation and control protein 1	1,55	0,008
	Q29099	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1	1,72	0,046
	F1RIY9	PRKAR1B	Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit beta	1,95	0,046
F2Z5M4	S100A16	Protein S100-A16	2,67	0,042	
F1RTP2	ARHGEF9	Rho guanine nucleotide exchange factor 9	1,50	0,043	
A0A5G2QVT2	TMEM263	Transmembrane protein 263	1,59	0,046	
Q06AA9	UBE2D2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2	1,88	0,040	
I3LGA1	WDR37	WD repeat domain 37	1,70	0,031	
F6Q4L6	SLC25A24	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	0,62	0,013	
CTRL-LBW vs. CTRL-NBW	F1RUZ6	AIP	AH receptor-interacting protein	0,61	0,021
	I3LH41	ANKS1B	Ankyrin repeat and sterile alpha motif domain-containing protein 1B	0,56	0,025
	F1RKQ4	TKFC	ATP-dependent dihydroxyacetone kinase	0,23	0,011
	P0C267	CCDC127	Coiled-coil domain-containing protein 127	0,64	0,025
	F1RQZ4	CCDC43	Coiled-coil domain-containing protein 43	0,57	0,041
	M3V819	COL4A1	Collagen alpha-1(IV) chain	0,59	0,031
	A0A480DP04	DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein	0,66	0,037
	A0A287BSL9	G6PD	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,62	0,009

Resultados. Capítulo 2

	Acceso UniProt	Gen	Identificación	FC	p-valor
CTRL-LBW vs. CTRL-NBW	F1SSA6	MYH10	Myosin-10	0,61	0,025
	F1SE82	OCIAD2	OCIA domain containing 2	0,37	0,008
	F1RMV5	ETHE1	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial	0,62	0,043
	F2Z5R2	RHEB	Ras homolog, mTORC1 binding	0,59	0,020
	F1S4P0	STRN	Striatin	0,65	0,045
	Q06AA7	TRA2B	Transformer 2 beta homolog	0,56	0,006
	F1SD96	RAD23A	UV excision repair protein RAD23 homolog A	0,65	0,041
	F1RPD2	UQCRC2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	0,49	0,025
	I3LM15	AGPS	Alkylglycerone-phosphate synthase	1,98	0,017
	I3LV26	CLSTN3	Calsyntenin 3	1,65	0,048
	F1S820	PDE4B	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B	1,78	0,045
	F1RG57	C1orf198	Chromosome 14 C1orf198 homolog	1,94	0,008
	I3LBK9	DNAJC3	DnaJ homolog subfamily C member 3	1,86	0,040
	F1S010	CYBC1	Essential for reactive oxygen species protein	1,75	0,032
	P48321	GAD2	Glutamate decarboxylase 2	1,54	0,038
	M3TYW5	QARS1	Glutamyl-tRNA synthetase	1,68	0,044
	F1S0R7	NSUN2	NOL1/NOP2/Sun domain family member 2	1,58	0,050
	F1SQN4	RPS6KA3	Non-specific serine/threonine protein kinase	1,94	0,017
	F1S618	KCNC4	Potassium voltage-gated channel subfamily C member 4	1,50	0,035
	I3LNG8	STIP1	Stress induced phosphoprotein 1	2,45	0,019
F1SPI1	TMEM43	Transmembrane protein 43	1,63	0,013	
F1SSJ0	TCAF1	TRPM8 channel-associated factor 1	1,66	0,025	
A0A5G2R8G0	TBCE	Tubulin-folding cofactor E	1,66	0,017	
G9JM01	TSG101	Tumor susceptibility gene 101 protein	1,55	0,042	
F2Z5M8	STXBP6	V-SNARE coiled-coil homology domain-containing protein	1,73	0,031	
F1S9X3	PPP1R13B	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 13B	1,72	0,007	

Identificación en Uniprot, gen que codifica la proteína, nombre de la proteína, cambio diferencial según la variable analizada (FC, en rojo *up* aumenta en los animales LBW, en azul *down* disminuye en los animales LBW, dentro de cada dieta).

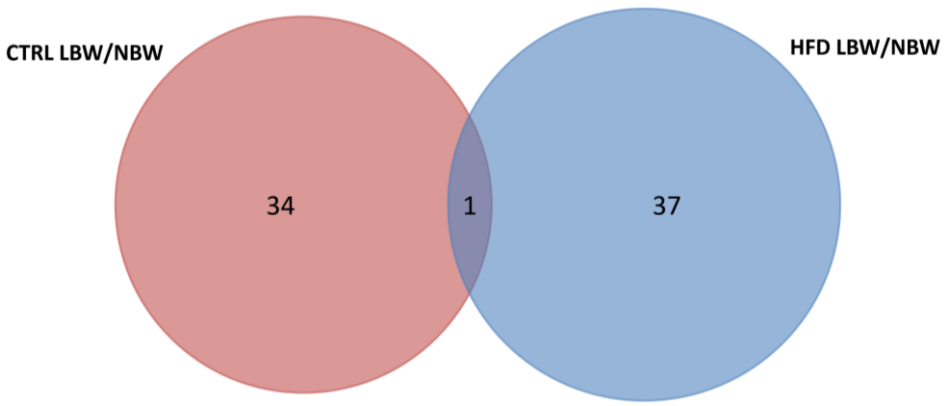


Figura 70. Diagrama de Venn con el número de DAP identificadas en las comparaciones entre CTRL-LBW/NBW y HFD-LBW/NBW.

El análisis bioinformático de las DAP entre las dos condiciones de estudio se llevó a cabo mediante el *software* PANTHER, con el que se obtuvo la clasificación GO (*Gene Ontology*) que agrupó a las proteínas según su **función molecular**. Esta anotación clasificó las 72 DAP (35 en CTRL-LBW vs. CTRL-NBW, y 38 en HFD-LBW vs. HFD-NBW) en 4 grupos funcionales que se representan en la **Figura 71**.

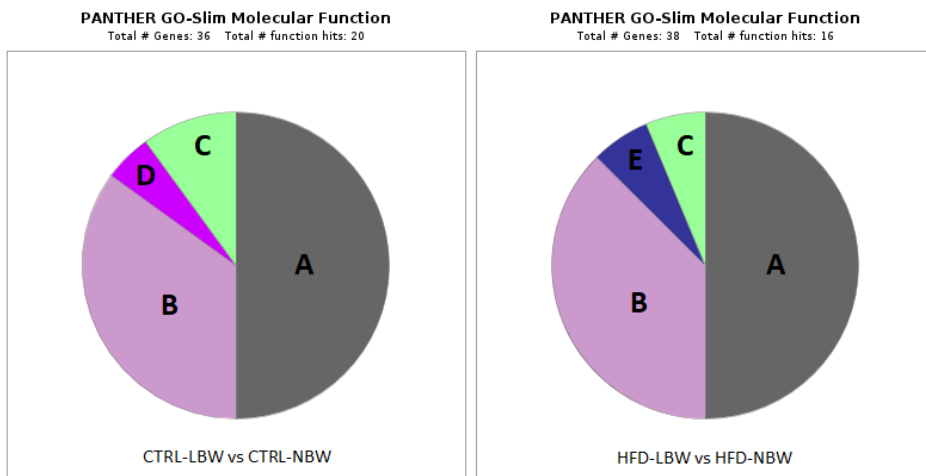


Figura 71. Representación gráfica mediante Panther del análisis de términos GO-Slim según la función molecular de las DAP identificadas en la comparación Dieta*Peso. A, de unión; B, actividad catalítica; C, de transporte; D, función estructural; E, función reguladora.

En la comparación CTRL-LBW *versus* CTRL-NBW:

A. Proteínas de unión (GO: 0005488) incluye 10 de las proteínas identificadas (STXBP6, RAD23A, NSUN2, PPP1R13B, PDE4B, STIP1, TBCE, RHEB, DNAJC3, STRN) y representan varias funciones, pero la principal es la de unión a otras proteínas (GO:0005515).

B. Proteínas con actividad catalítica (GO:0003824) incluye 7 de las proteínas identificadas (ETHE1, NSUN2, TKFC, RPS6KA3, PDE4B, QARS1, RHEB) y están implicadas en muchas actividades.

C. Proteínas con función transportadora (GO:0005215) incluye dos de las proteínas identificadas (SLC25A24 y KCNC4), y ambas representan a proteínas de transporte transmembrana (GO:0022857)

D. Proteínas con función estructural (GO:0005198) hay una de las proteínas identificadas (COL4A1), una proteína estructural de la matriz extracelular (GO:0005201).

En la comparación HFD-LBW *versus* HFD-NBW:

A. Proteínas de unión (GO: 0005488) incluye 8 de las proteínas identificadas (UFD1, PTBP1, PARVA, CAPZB, PEX19, CELF2, ITGB8, HTATSF1) y representan muchas funciones.

B. Proteínas con actividad catalítica (GO:0003824) incluye 6 de las proteínas identificadas (UBE4A, UBE2D2, PFKFB2, HADHA, GAMT, GCLM) y representan varias actividades, pero las principales son transferasas (GO:0016740) y catalítica sobre otras proteínas (GO:0140096).

C. Proteínas con función transportadora (GO:0005215) hay una de las proteínas identificadas (SLC25A24), concretamente es una proteína de transporte transmembrana (GO:0022857).

E. Proteínas reguladoras (GO:0098772) con una de las proteínas identificadas (GCLM), concretamente regula la actividad enzimática (GO:0030234).

Cuando se agruparon las proteínas según los **procesos biológicos** se clasificaron las DAP en los grupos representados en la **Figura 72**.

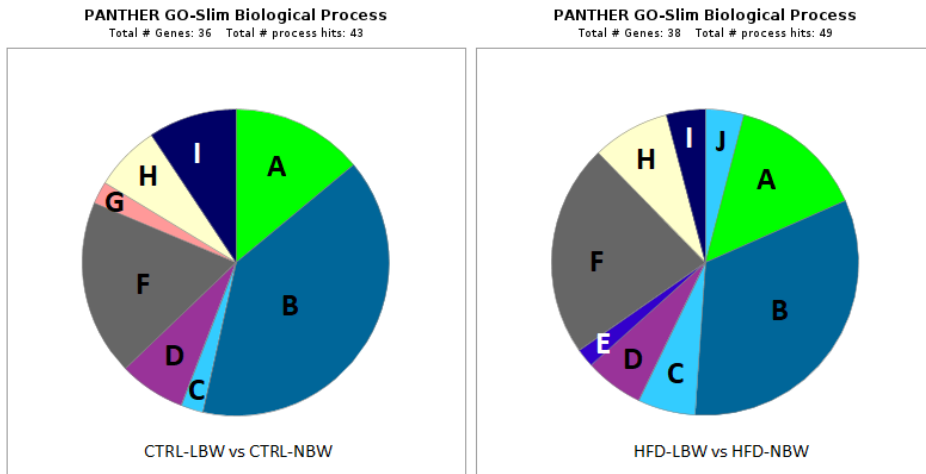


Figura 72. Representación gráfica mediante Panther del análisis de términos GO-Slim según los procesos biológicos de las DAP identificadas en la comparación Dieta*Peso. A, regulación biológica; B, procesos celulares; C, de desarrollo; D, de localización; E, de locomoción; F, procesos metabólicos; G, procesos multicelulares; H, de respuesta a estímulos; I, de señalización; J, de adhesión biológica.

En la comparación CTRL-LBW *versus* CTRL-NBW:

- A.** Seis proteínas participan en la **regulación de procesos biológicos** (GO:0065007).
- B.** Diecisiete proteínas están implicadas en **procesos celulares** (GO:0009987).
- C.** Una proteína (CLSTN3) está en la categoría de **procesos de desarrollo** (GO:0032502), concretamente en el desarrollo de las estructuras anatómicas (GO:0048856).
- D.** Tres proteínas están en **procesos de localización** (GO: 0051179).
- F.** Ocho proteínas participan en varios **procesos metabólicos** (GO:0008152).
- G.** Una proteína (CLSTN3) está en la categoría de **procesos multicelulares** (GO:0032501).

H. Tres proteínas están implicadas en **procesos de respuesta a estímulos** (GO: 0050896).

I. Cuatro proteínas están implicadas en **procesos de señalización** (GO:0023052).

En la comparación HFD-LBW *versus* HFD-NBW:

A. Siete proteínas participan en **la regulación de procesos biológicos** (GO:0065007).

B. Dieciséis proteínas están implicadas en muchos **procesos celulares** (GO:0009987).

C. Tres proteínas están en **procesos de desarrollo** (GO:0032502).

D. Tres proteínas están en **procesos de localización** (GO: 0051179).

E. Una proteína (ITGB8) está implicada en **procesos de locomoción** (GO:0040011), concretamente en la motilidad celular (GO: 0048870).

F. Once proteínas participan en muchos **procesos metabólicos** (GO:0008152).

H. Cuatro proteínas están en la categoría de **procesos de respuesta a estímulos** (GO: 0050896).

I. Dos proteínas están implicadas en **procesos de señalización** (GO:0023052), ambas en la transducción de señales (GO: 0007165).

J. Dos proteínas están implicadas en **procesos de adhesión** (GO:0022610), concretamente en adhesión celular (GO: 0007155).

Este análisis de las DAP no dio mucha información. Aunque las proteínas identificadas no fueron las mismas en cada comparativa, el tipo de proteínas según sus GO sí que lo era. Según mostró el análisis de *pathways* mediante STRING, no se observó ninguna característica ni perfil biológico o funcional del conjunto de proteínas que sugiriese una hipótesis de trabajo concreta (**Figura 73**), por lo que se decidió detener el análisis aquí.

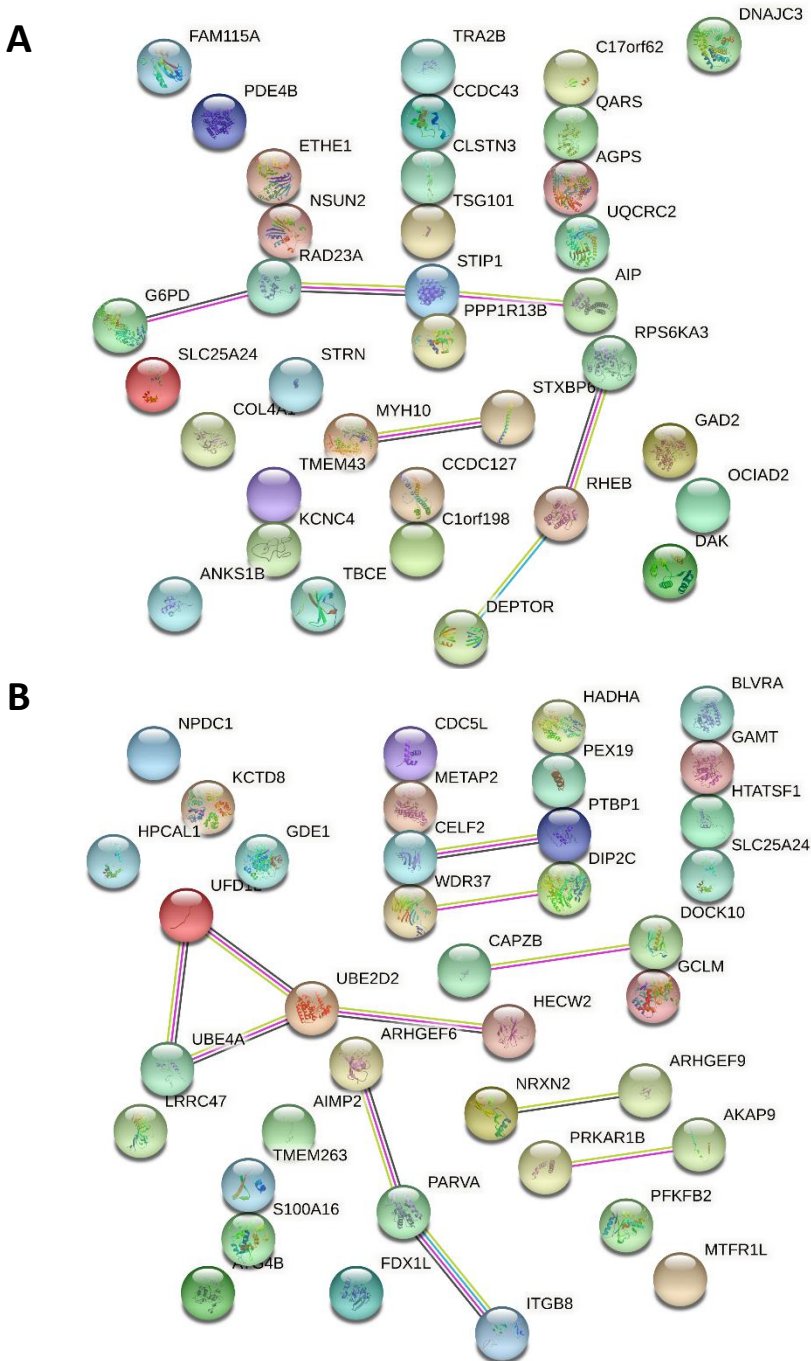


Figura 73. Representación gráfica mediante STRING de las interacciones de las DAP identificadas en la comparación de los animales con distinto peso alimentados con la dieta CTRL (A), y con la dieta HFD (B). Los nodos representan a las proteínas identificadas y las líneas representan asociaciones provenientes de distintas fuentes: azul de bases de datos, rosa determinaciones experimentales, verde oscuro predicciones por cercanía de los genes, amarillo por aparición en documentos y negro por co-expresión.

10.2. Efecto de la interacción peso*dieta sobre la abundancia diferencial de proteínas

Visto que el análisis previo no daba mucha información, se cambió el enfoque de la interacción. Se pasó a analizar la interacción peso*dieta con el objetivo de observar si los animales LBW y los NBW reaccionaban de manera diferente a la dieta HFD.

En la comparación entre las dos dietas teniendo en cuenta el peso al nacer (CTRL y HFD dentro de cada grupo NBW y LBW) se identificaron 328 proteínas, de las cuales seis ya habían sido identificadas previamente al analizar el efecto del peso al nacer, y solamente una había sido identificada previamente al analizar el efecto de la dieta, por lo tanto, la variable Peso al nacer fue la que tuvo mayor relevancia en esta parte del estudio (**Figura 74**).

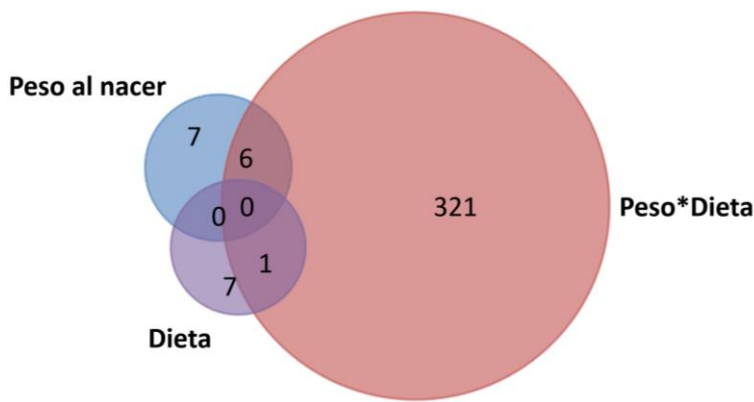


Figura 74. Diagrama de Venn con el número de DAP identificadas en las comparaciones por peso al nacer, dieta y la interacción peso*dieta.

De estas 328 proteínas, 194 se encontraron al comparar CTRL-LBW con HFD-LBW. Por otro lado, en la comparación de los animales que nacieron con el peso NBW (CTRL-NBW con HFD-NBW) se obtuvieron 175 proteínas con distinta abundancia. De ellas, 41 DAP fueron comunes en ambos grupos (**Figura 75**). Las proteínas identificadas para cada comparación se muestran en la **Tabla Suplementaria 3** para los animales NBW, y en la **Tabla Suplementaria 4** para los animales LBW, junto con los FC correspondientes.

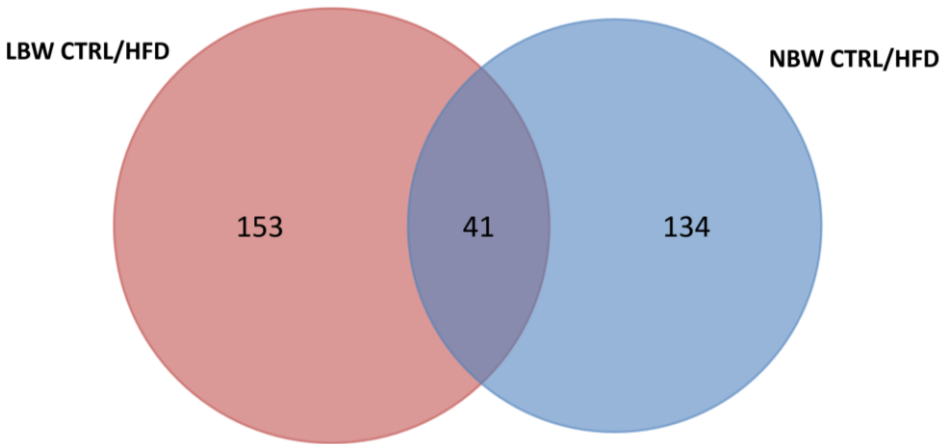


Figura 75. Diagrama de Venn con el número de DAP identificadas en las comparaciones entre NBW-CTRL/HFD y LBW-CTRL/HFD.

El análisis bioinformático de las DAP entre las dos condiciones de estudio se llevó a cabo mediante tres procedimientos.

En primer lugar, mediante el *software* PANTHER se obtuvo la clasificación GO (*Gene Ontology*) que agrupó a las proteínas según su **función molecular**. Esta anotación clasificó las DAP en distintos grupos funcionales que se representan en la **Figura 76**.

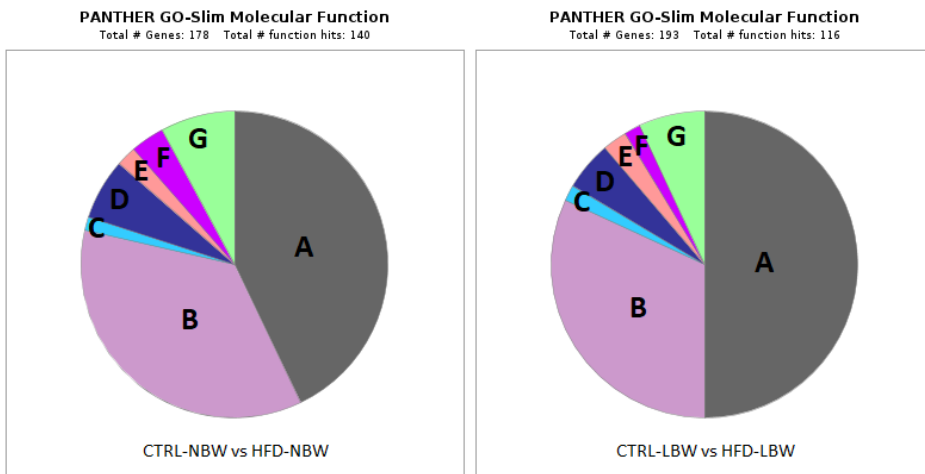


Figura 76. Representación gráfica mediante Panther del análisis de términos GO-Slim según la función molecular de las DAP identificadas en la comparación **Peso*Dieta**. A, de unión; B, actividad catalítica; C, adaptación molecular; D, función reguladora; E, transducción molecular; F, función estructural; G, función transportadora.

En la comparación CTRL-NBW *versus* HFD-NBW:

A. Proteínas de unión (GO: 0005488) que incluye 60 de las proteínas identificadas y representan varias funciones, pero las principales son la de unión a otras proteínas (GO:0005515), a compuestos heterocíclicos (GO:1901363), y a compuestos orgánicos cíclicos (GO:0097159).

B. Proteínas con actividad catalítica (GO:0003824) que incluye 50 de las proteínas identificadas, representan principalmente actividad transferasa (GO:0016740), hidrolasa (GO:0016787), y catalítica sobre otras proteínas (GO:0140096).

C. Proteínas con actividad de adaptación molecular (GO:0060090) que incluye dos de las proteínas identificadas

D. Proteínas con función reguladora (GO:0098772) que incluye nueve de las proteínas identificadas, y principalmente regulan la actividad de las enzimas (GO:0030234) y de los canales (GO: 0016247)

E. Proteínas de transducción (GO:0060089) que incluye tres de las proteínas identificadas y todas están implicadas en la señalización de receptores (GO:0038023)

F. Proteínas con función estructural (GO:0005198) que incluye cinco de las proteínas identificadas, y son proteínas estructurales de la matriz extracelular (GO:0005201), de los poros nucleares (GO:0017056) y de los ribosomas (GO:0003735)

G. Proteínas con función transportadora (GO:0005215) incluye once de las proteínas identificadas, y son proteínas de transporte transmembrana (GO:0022857), a excepción de una (SLC27A4) que es transportadoras de lípidos (GO:0005319).

En la comparación CTRL-LBW *versus* HFD-LBW:

A. Proteínas de unión (GO: 0005488) que incluye 58 de las proteínas identificadas y representan varias funciones, pero las principales son la de unión a otras proteínas (GO:0005515), a compuestos heterocíclicos (GO:1901363), y a compuestos orgánicos cíclicos (GO:0097159).

B. Proteínas con actividad catalítica (GO:0003824) que incluye 37 de las proteínas identificadas, implicadas en muchas actividades, pero las principales son transferasa (GO:0016740), hidrolasa (GO:0016787), y catalítica sobre otras proteínas (GO:0140096).

C. Proteínas con actividad de adaptación molecular (GO:0060090) que incluye dos de las proteínas identificadas.

D. Proteínas con función reguladora (GO:0098772) que incluye seis de las proteínas identificadas que regulan actividades como la de las enzimas (GO:0030234), de los canales (GO: 0016247), de la transcripción (GO: 0140110), y de los receptores (GO: 0030545).

E. Proteínas de transducción (GO:0060089) incluye tres de las proteínas identificadas y todas ellas están implicadas en la señalización de receptores (GO:0038023).

F. Proteínas con función estructural (GO:0005198) incluye dos de las proteínas identificadas que son tubulinas.

G. Proteínas con función transportadora (GO:0005215) incluye ocho de las proteínas identificadas, y son proteínas de transporte transmembrana (GO:0022857), a excepción de una (PLS1) que transporta lípidos (GO:0005319).

Cuando se agruparon las proteínas según los **procesos biológicos** se clasificaron las DAP en los grupos representados en la **Figura 77**.

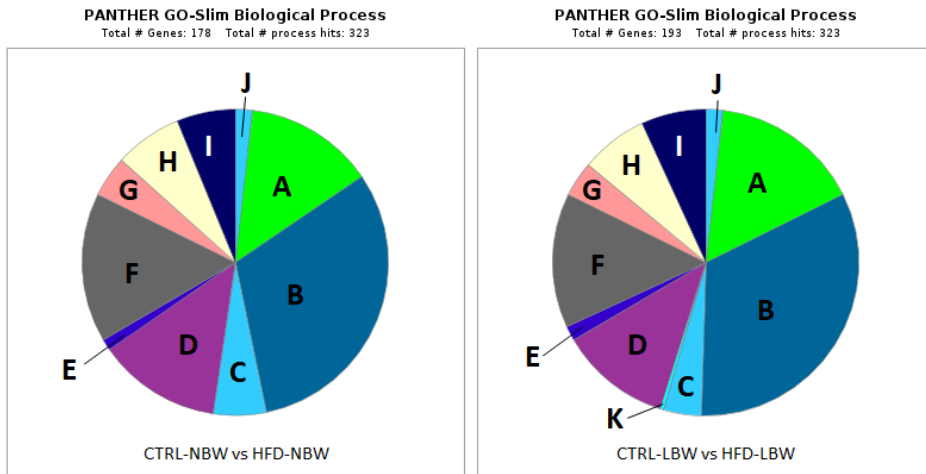


Figura 77. Representación gráfica mediante Panther del análisis de términos GO-Slim según los procesos biológicos de las DAP identificadas en la comparación **Peso*Dieta**. A, regulación biológica; B, procesos celulares; C, de desarrollo; D, de localización; E, de locomoción; F, procesos metabólicos; G, procesos multicelulares; H, de respuesta a estímulos; I, de señalización; J, de adhesión biológica; K, de crecimiento.

En la comparación CTRL-NBW *versus* HFD-NBW:

- A.** 44 proteínas participan en la **regulación de procesos biológicos** (GO:0065007).
- B.** 101 proteínas están implicadas en muchos **procesos celulares** (GO:0009987), pero principalmente en procesos metabólicos a nivel celular (GO: 0044237) y en la organización de componentes celulares o biogénesis (GO:0071840).
- C.** Dieciocho proteínas están en la categoría de **procesos de desarrollo** (GO:0032502), concretamente en el desarrollo (GO:0048856) y morfogénesis (GO:0009653) de las estructuras anatómicas.
- D.** 42 proteínas están implicadas en distintos **procesos de localización** (GO: 0051179), principalmente en la localización celular (GO:

0051641), en establecer la localización (GO:0051234) y en la localización de macromoléculas (GO:0033036).

E. Cuatro proteínas están implicadas en **procesos de locomoción** (GO:0040011), concretamente en la motilidad celular (GO: 0048870).

F. 51 proteínas participan en muchos **procesos metabólicos** (GO:0008152), principalmente en el metabolismo primario (GO: 0044238), de sustancias orgánicas (GO: 0071704), en el metabolismo celular (GO: 0044237), y en el metabolismo de compuestos nitrogenados (GO: 0006807).

G. Catorce proteínas se encuentran en la categoría de **procesos multicelulares** (GO:0032501), concretamente implicadas en el desarrollo de los organismos multicelulares (GO:0007275).

H. 23 proteínas están implicadas en varios **procesos de respuesta a estímulos** (GO: 0050896), principalmente en la respuesta celular a los estímulos (GO: 0051716), y en la respuesta al estrés (GO: 0006950).

I. Veinte proteínas están implicadas en **procesos de señalización** (GO:0023052), tanto en la transducción de señales (GO: 0007165) como en la señalización entre células (GO: 0007267).

J. Seis proteínas están implicadas en **procesos de adhesión** (GO:0022610), concretamente en la adhesión celular (GO: 0007155).

En la comparación CTRL-LBW *versus* HFD-LBW:

A. 51 proteínas participan en **la regulación de procesos biológicos** (GO:0065007).

B. 106 proteínas están implicadas en muchos **procesos celulares** (GO:0009987), pero principalmente en procesos metabólicos a nivel celular (GO: 0044237) y en la organización de componentes celulares o biogénesis (GO:0071840).

C. Trece proteínas están en la categoría de **procesos de desarrollo** (GO:0032502), concretamente en el desarrollo (GO:0048856) y morfogénesis (GO:0009653) de las estructuras anatómicas.

D. 38 proteínas están implicadas en distintos **procesos de localización** (GO: 0051179), principalmente en la localización celular (GO: 0051641), en establecer la localización (GO:0051234) y en la localización de macromoléculas (GO:0033036).

E. Cinco proteínas están implicadas en **procesos de locomoción** (GO:0040011), concretamente en la motilidad celular (GO: 0048870).

F. 46 proteínas participan en muchos **procesos metabólicos** (GO:0008152), principalmente en el metabolismo primario (GO: 0044238), de sustancias orgánicas (GO: 0071704), en el metabolismo celular (GO: 0044237), y en el metabolismo de compuestos nitrogenados (GO: 0006807).

G. Doce proteínas se encuentran en la categoría de **procesos multicelulares** (GO:0032501), concretamente implicadas en el desarrollo de los organismos multicelulares (GO:0007275).

H. 23 proteínas están implicadas en varios **procesos de respuesta a estímulos** (GO: 0050896), principalmente en la respuesta celular a los estímulos (GO: 0051716), y en la respuesta al estrés (GO: 0006950) y a los químicos (GO: 0042221).

I. Veintidós proteínas están implicadas en **procesos de señalización** (GO:0023052), tanto en la transducción de señales (GO: 0007165) como en la señalización entre células (GO: 0007267).

J. Seis proteínas están implicadas en **procesos de adhesión** (GO:0022610), concretamente en adhesión celular (GO: 0007155).

K. Una proteína (RPTOR) está implicada en **procesos de crecimiento** (GO:0040007), concretamente en el crecimiento celular (GO: 0016049).

Por último, mediante el *software* PANTHER se agruparon las proteínas según su **componente celular**. Esta anotación clasificó las DAP, tanto en los animales NBW como en los animales LBW, en tres grupos funcionales: entidad anatómica celular (GO: 0110165), intracelular (GO: 0005622) y complejo de proteínas (GO: 0032991), pero no hubo diferencias entre grupos.

En segundo lugar, para la integración del análisis de los términos GO y comprender su interacción y sus vías comunes de función, se realizó un análisis de *pathways* utilizando la herramienta de búsqueda y representación gráfica de *pathways* “KEGG Mapper” del Centro Bioinformático de la Universidad de Kyoto basado en la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto.

En la comparativa entre dietas dentro de los animales NBW (**Tabla 36**) la principal vía a destacar con 27 proteínas fue la que engloba las vías metabólicas. A continuación, también se encontraron 10 DAP involucradas en la termogénesis, 7 en la autofagia, 7 en la adhesión focal, 7 en la fosforilación oxidativa, 6 en vías de señalización mediante cAMP, 6 en vías de señalización de la insulina, 5 en vías de señalización de la MAPK, y 5 implicadas en lisosomas.

Tabla 36. Agrupación de las DAP identificadas mediante KEGG en los animales NBW según las vías más representativas de las que forman parte.

<i>Pathways</i>	Nº	Proteínas
Metabolic pathways	27	COQ7; ATP5PD; CKMT2; COX6B1; COX7A2; COX15; STT3B; ALDH1A3; AK2; PLCH1; GLUD2; GNS; GSTP1; APRT; ARSA; ND1; MVD; NDUFS5; ACOX1; PKM; UQCRC2; CA4; DGKE; AGPS; KYAT1; SRSF1; NUP98
Thermogenesis	10	ATP5PD; COX6B1; COX7A2; COX15; ND1; NDUFS5; COA1; MAP2K3; RHEB; UQCRC2
Oxidative phosphorylation	7	ATP5PD; COX6B1; COX7A2; COX15; ND1; NDUFS5; UQCRC2
Autophagy	7	AKT2; ATG4B; ITPR1; LAMP2; ZFYVE1; RHEB; ATG3
Focal adhesion	7	COL4A1; AKT2; PARVB; ITGA7; PPP1CA; RAP1B; BRAF
Insulin signaling	6	AKT2; PPP1CA; PRKAR1B; PTPRF; RHEB; BRAF
cAMP signaling	6	AKT2; ATP2A1; ACOX1; PPP1CA; RAP1B; BRAF
Lysosome	5	NPC2; GNS; LAMP2; ARSA; AP3B1
MAPK signaling	5	AKT2; NF1; MAP2K3; RAP1B; BRAF
Metabolism of RNA	2	SRSF1; NUP98

El análisis de las vías mediante Reactome (**Figura 78**) mostró que los nodos principales eran el “Metabolismo” (concretamente con proteínas relacionadas con la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa); “Metabolismo del RNA” (proteínas involucradas en el transporte del mRNA maduro); “Metabolismo de las proteínas” y “Transporte mediado por vesículas”.

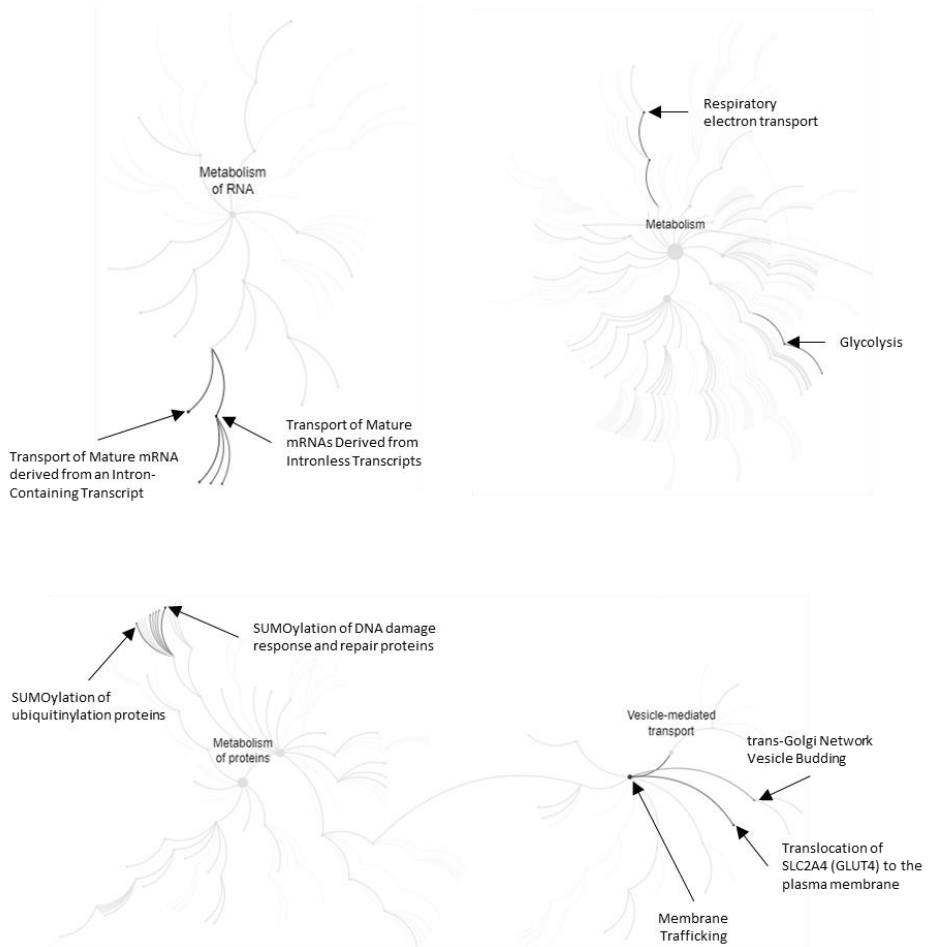


Figura 78. Diagrama del Reactome de los principales procesos identificados en la comparativa de dietas en los animales NBW: **metabolismo de RNA, metabolismo, metabolismo de proteínas y vías de transporte mediadas por vesículas.** Resaltadas en negrita están las vías sobrerrepresentadas con su correspondiente identificación.

Al igual que en los animales NBW, al comparar entre dietas en los animales LBW (**Tabla 37**) la principal vía que se encontró fue la de las vías metabólicas con 31 proteínas (principalmente vías de metabolismo de los aminoácidos). A continuación, se encontraron 7 proteínas del *spliceosoma*, 7 involucradas en la termogénesis, 6 en la autofagia, 6 involucradas en el procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico, 5 en vías de señalización mediante cAMP, 4 en vías de señalización del calcio, 4 en vías de señalización de la insulina, y 4 en vías de señalización de mTOR.

Tabla 37. Agrupación de las DAP identificadas mediante KEGG en los animales LBW según las vías más representativas de las que forman parte.

<i>Pathways</i>	Nº	Proteínas
Metabolic pathways	31	CBS; CDIPT; PAICS; DGKB; FASN; PLCH1; SIRT5; TKFC; GCSH; GFPT1; ACAD8; MAT2B; GMPPA; HADHA; ARSB; ND1; NDUFS5; ALDH7A1; PDE4B; COQ3; PIK3C3; PMM1; CYCS; UCKL1; PPT1; ECHDC1; CHPT1; CBR1; CBS; KYAT1; PIGS
Thermogenesis	7	ND1; NDUFS5; COA1; RPTOR; RHEB; RPS6KA3; SMARCC1
Spliceosome	7	U2AF2; DDX5; HNRNPK; SRSF4; SRSF6; TRA2B; RBM8A
Autophagy	6	PIK3R4; PIK3C3; MAPK10; RPTOR; RHEB; DEPTOR
Protein processing in endoplasmic reticulum	6	SEC61B; DNAJB2; NPLOC4; MAPK10; SEC62; UFD1
cAMP signaling	5	GRIA4; AFDN; ATP2A1; PDE4B; MAPK10
Lysosome	5	AP3S1; FUCA1; ARSB; PPT1; SORT1
mTOR signaling	4	RPTOR; RHEB; RPS6KA3; DEPTOR
Focal adhesion	4	DIAPH1; ITGB8; PARVA; MAPK10
Calcium signaling	4	PPIF; GNA15; ATP2A1; CACNA1E
Apoptosis	4	CYCS; MAPK10; TUBA1A; TUBA1C
Insulin signaling	4	FASN; MAPK10; RPTOR; RHEB

El análisis de las vías con Reactome (**Figura 79**) mostró que los nodos principales eran “Metabolismo del RNA” (proteínas relacionadas con el *splicing* del mRNA); “Metabolismo de las proteínas” (concretamente proteínas relacionadas con el transporte de otras proteínas a Golgi y las modificaciones posteriores) que a la vez está relacionado con el “Transporte mediado por vesículas” (para el transporte anterógrado y retrógrado entre el retículo endoplasmático y Golgi).

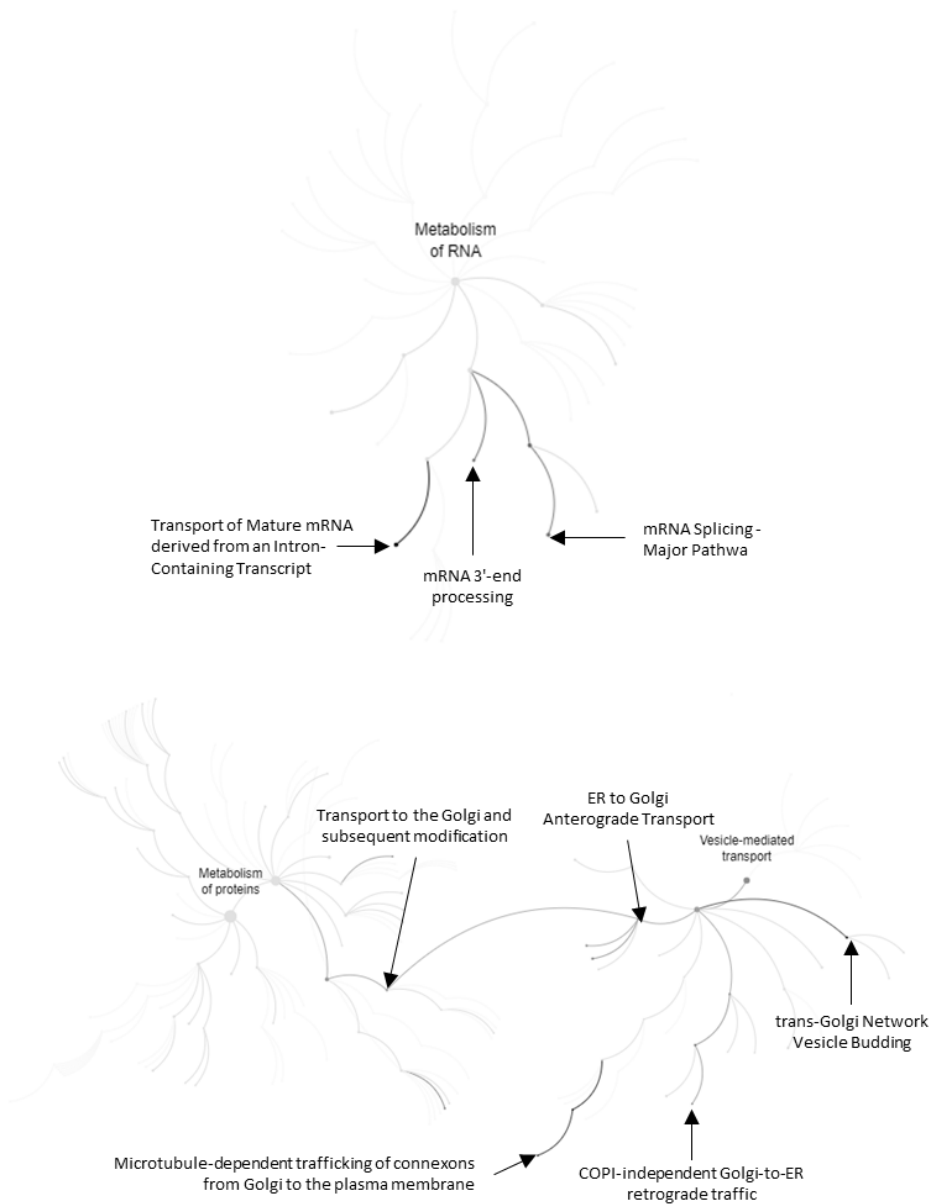


Figura 79. Diagrama del Reactome de los principales procesos identificados en la comparativa de dietas en los animales LBW: metabolismo de RNA, metabolismo de proteínas y vías de transporte mediados por vesículas. Resaltadas en negrita están las vías sobrerrepresentadas con su correspondiente identificación.

Finalmente, para la visualización gráfica de estas interacciones entre las proteínas se utilizó la herramienta STRING.

En la comparativa de dietas dentro de los animales NBW (**Figura 80**), el análisis mostró la existencia de dos nodos principales, uno estaba compuesto por proteínas involucradas en la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, y el otro por proteínas que intervienen en la maduración del RNA. También se observaron otros dos nodos más pequeños con proteínas que forman parte de la matriz extracelular, y el otro con proteínas ribosomales y de tRNA involucradas en la síntesis proteica.

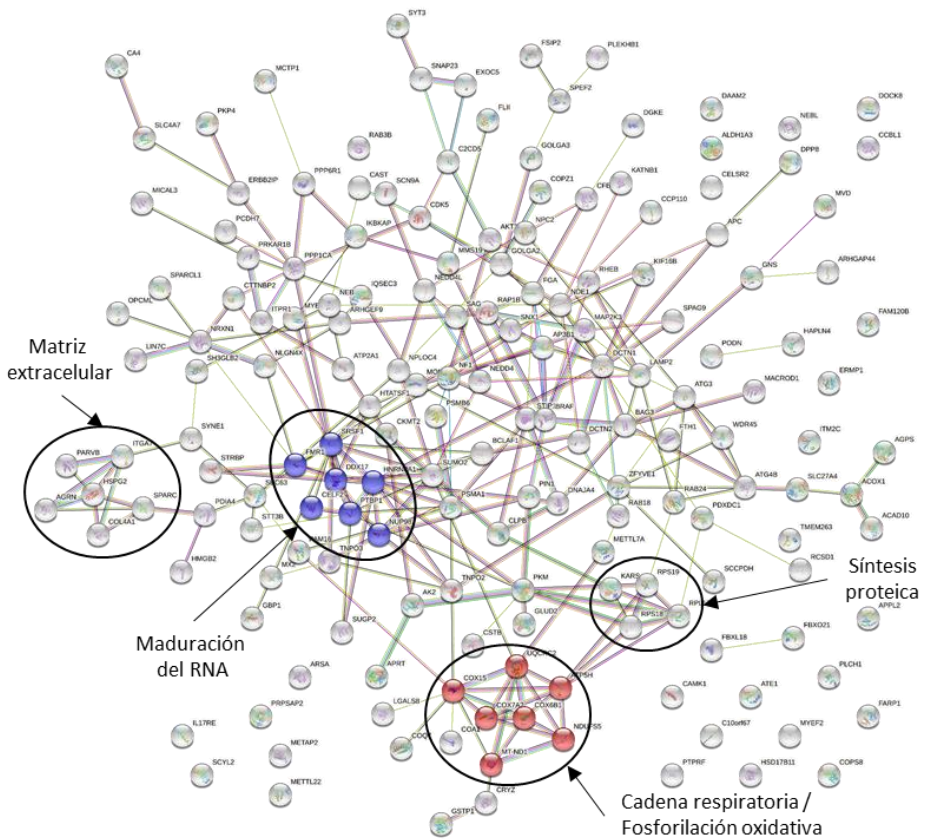


Figura 80. Representación gráfica mediante STRING de las interacciones de las DAP identificadas en la comparación entre dietas de los animales NBW. Los nodos representan a las proteínas identificadas y las líneas representan asociaciones provenientes de distintas fuentes: azul de bases de datos, rosa determinaciones experimentales, verde oscuro predicciones por cercanía de los genes, amarillo por aparición en documentos y negro por co-expresión.

Las proteínas que forman parte de estos nodos identificados mediante STRING se muestran en la **Tabla 38**.

Tabla 38. Identificación y agrupación de las DAP identificadas en los nodos STRING de los animales NBW sujetos a dieta CTRL y dieta HFD.

Acceso UniProt	Gen	Identificación
Cadena respiratoria / Fosforilación oxidativa		
F1RPD2	UQCRC2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial
F1S8W1	COX15	Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog isoform 1
F1S4V0	COX7A2	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial
I3LR62	COA1	Cytochrome c oxidase assembly factor 1 homolog
F1SV23	NDUFS5	Complex I-15 kDa
O79874	NADH1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1
A0A5G2QL31	COX6B1	Cytochrome c oxidase subunit 6B1
F1SMF9	ATP5PD	ATP synthase subunit d, mitochondrial
Maduración del RNA		
K7GNF4	FMR1	Synaptic functional regulator FMR1
Q3YLA6	SRSF1	Serine/arginine-rich splicing factor 1
F1SKQ0	DDX17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17
F1RUN0	CELF2	CUGBP Elav-like family member 2
F1S6R7	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1
F6Q9I4	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
F1SUZ2	NUP98	Nuclear pore complex protein Nup96
Matriz extracelular / Adhesión celular		
I3LGD9	AGRN	Agrin
F1SJU4	PARVB	Parvin beta
A0A481B0D0	ITGA7	Integrin alpha-2
M3V819	COL4A1	Collagen alpha-1(IV) chain isoform 1 preproprotein
F1RW32	SPARCL1	SPARC like 1
F1SU03	HSPG2	Heparan sulfate proteoglycan 2
Síntesis proteica		
F1S458	KARS1	Lysine--tRNA ligase
I3LT81	RPL17	60S ribosomal protein L17
P62272	RPS18	40S ribosomal protein S18
Q29308	RPS19	40S ribosomal protein S19

Identificación en Uniprot, gen que codifica la proteína, nombre de la proteína. El color del gen indica el cambio diferencial, en **rojo** *up* aumenta en los animales HFD respecto los CTRL, en **azul** *down* disminuye en los animales HFD respecto los CTRL.

En la comparativa de las dietas dentro de los animales LBW (**Figura 81**), el análisis mostró la existencia de dos nodos principales, uno compuesto por proteínas involucradas en el transporte anterógrado y retrógrado de Golgi mediado por vesículas, y el otro por proteínas que intervienen en el *splicing* del mRNA. También se observaron otros dos nodos más pequeños con proteínas que forman parte de la vía mTOR, y con proteínas involucradas en el metabolismo.

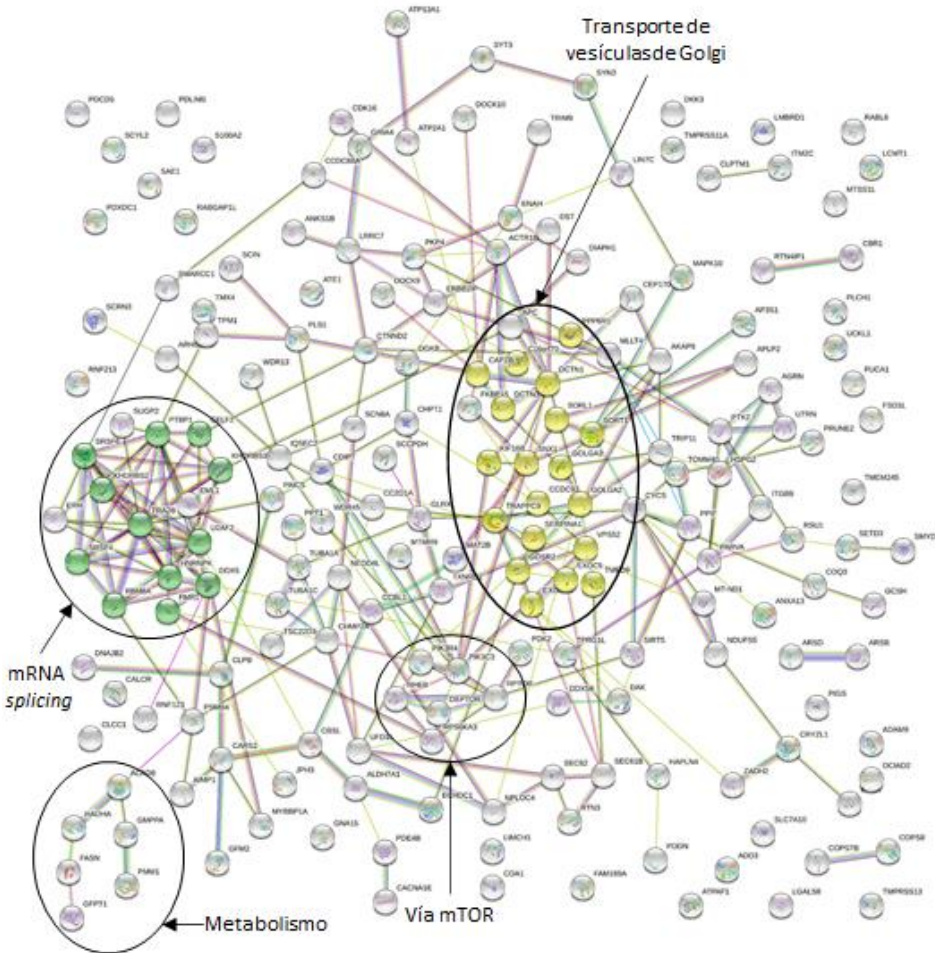


Figura 81. Representación gráfica mediante STRING de las interacciones de las DAP identificadas en la comparación entre dietas de los animales LBW. Los nodos representan a las proteínas identificadas y las líneas representan asociaciones provenientes de distintas fuentes: azul de bases de datos, rosa determinaciones experimentales, verde oscuro predicciones por cercanía de los genes, amarillo por aparición en documentos y negro por co-expresión.

Las proteínas que forman parte de estos nodos identificadas por STRING se muestran en la **Tabla 39**.

Tabla 39. Identificación y agrupación de las DAP identificadas en los nodos STRING de los animales LBW sujetos a dieta CTRL y dieta HFD.

Acceso UniProt	Gen	Identificación
mRNA splicing		
I3LFJ5	SUGP2	SURP and G-patch domain containing 2
F1S6R7	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1
F1RZV6	KHDRBS2	KH RNA binding domain containing, signal transduction associated 2
P80230	ERH	Enhancer of rudimentary homolog
Q06AA7	TRA2B	Transformer 2 beta homolog
I3LDY1	EML1	Echinoderm microtubule-associated protein-like 1
F6QB00	SRSF4	Serine/arginine-rich splicing factor 4 isoform X1
I3W8V7	U2AF2	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit
I3LI59	RBM8A	RNA-binding protein 8A
A0A286ZM27	DDX5	DEAD box protein 5
I3LQS0	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
K7GNF4	FMR1	Synaptic functional regulator FMR1
F1RUN0	CELF2	CUGBP Elav-like family member 2
A0A4X1TTZ9	SRSF6	Serine/arginine-rich splicing factor 6
K7GNY3	KHDRBS3	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 3
Transporte de vesículas de Golgi		
F1RMN3	PPP6R1	Protein phosphatase 6 regulatory subunit 1
A0A287BJH7	C16orf70	Chromosome 6 C16orf70 homolog
A0PFK7	CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta
F1SEC0	DCTN3	Dynactin subunit 3
I3L8K1	SORL1	Low-density lipoprotein receptor relative with 11 ligand-binding repeats
F1S5Z7	SORT1	Sortilin 1
I3LEQ5	KIF16B	Kinesin-like protein KIF16B
I3LIX0	GOLGA2	Golgin subfamily A member 2
F1RSJ3	TRAPPC9	Trafficking protein particle complex 9
A0A287BIC8	GOSR2	Golgi SNAP receptor complex member 2 isoform A
F1SSM0	EXOC5	Exocyst complex component 5
I3LRV0	EXOC6B	Exocyst complex component 6B
F1S3E0	TMED9	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9
F1SNT8	DCTN1	Dynactin subunit 1
F1RI72	GOLGA3	Golgin subfamily A member 3
I3LJ78	SNX1	Sorting nexin-1
F1RY11	CCDC93	Coiled-coil domain containing 93
F1RZT5	VPS52	Vacuolar protein sorting-associated protein 52 homolog
P50447	SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin
F1SN89	FKBP15	FK506-binding protein 15

Acceso UniProt	Gen	Identificación
Metabolismo		
F1SPM7	GFPT1	Glutamine--fructose-6-phosphate transaminase
A0A4X1V8T0	ACAD8	Isobutyryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
I3LUP1	GMPPA	Mannose-1-phosphate guanyltransferase alpha
F1SRD8	PMM1	Phosphomannomutase
I3LCW1	FASN	Fatty acid synthase (Fragment)
Q29554	HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial
Vía mTOR		
Q5D891	PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3
K9IWD2	PIK3R4	Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4
A0A480DP04	DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
I3L942	RPTOR	Regulatory associated protein of MTOR complex 1
F1SQN4	RPS6KA3	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3
F2Z5R2	RHEB	GTP-binding protein Rheb

Identificación en Uniprot, gen que codifica la proteína, nombre de la proteína. El color del gen indica el cambio diferencial, en **rojo** *up* aumenta en los animales HFD respecto los CTRL, en **azul** *down* disminuye en los animales HFD respecto los CTRL.

Capítulo 3. Evaluación de la suplementación de triptófano en dietas con lacto reemplazantes en terneros lactantes.

Esta investigación fue apoyada por el Ministerio de Economía y Competitividad de España (AGL2015-68463-C2-1-P y AGL2015-68463-C2-2-P, “Estudio molecular de los efectos de la suplementación de aminoácidos en terneros amamantados mediante una aproximación bioquímica y proteómica”).

Este estudio se llevó a cabo con la colaboración del grupo de la Dra. Marta Terré en el IRTA, quienes se encargaron del cuidado de los animales, de la obtención de las muestras y de los resultados conductuales y productivos.

Este trabajo fue publicado en: N. Yeste et al., “Evaluating the potential role of tryptophan in calf milk replacers to facilitate weaning,” *Journal of Dairy Science*, vol. 103, no. 8, pp. 7009–7017, 2020, doi: 10.3168/jds.2019-18088 [151].

1. Animales

Para este estudio el modelo experimental a usar fue la especie bovina (*Bos primigenius*), concretamente de la raza Holstein. Se usaron un total de 27 terneros machos recién nacidos procedentes de una sola explotación ($48 \pm 0,8$ días de edad; $82 \pm 2,6$ kg de peso corporal).

Se optó por utilizar animales del mismo sexo ya que los parámetros a evaluar en los primeros meses de vida no están ligados al sexo de los animales, y a que los machos y las hembras tienen destinos diferentes (engorde o reposición).

2. Condiciones ambientales

Los animales se criaron en las instalaciones del IRTA en Torre Marimón (Caldes de Montbui, Spain), en un entorno que garantizó su adecuado estado general y en el que pudieron satisfacer sus necesidades fisiológicas y etológicas. Los terneros fueron manejados bajo la supervisión de técnicos del IRTA y la aprobación del Comité de Cuidado Animal de la Generalitat de Catalunya (código de autorización 9733). Las instalaciones para la cría de terneros amamantados constaron de:

- Una sala de almacenaje para los distintos tipos de pienso y forraje, y para el material de granja (básculas, carretillas, palas, horcas...).

- Una nave principal donde se alojaron los terneros individualmente en corrales (1,6 × 3,2 m). En ellos los animales tenían un contacto visual con el resto, y se equiparon con tres anillas en la parte frontal con 3 cubos: para pienso, paja y agua. Además, se estableció que serían encamados diariamente con virutas de madera para mejorar su bienestar.
- Una lechería para preparar la leche en polvo de los terneros.
- Seis casetas para alojar terneros en grupo una vez destetados, de 2 x 2,10 m de cubierta y un parque de 2 x 3 m. Cada caseta tenía capacidad para 3 animales, y se encontraban en el exterior.
- Una sala de necropsias donde también se guardaban los medicamentos y material más sensible (material de limpieza y desinfección, agujas, jeringas...).
- Iluminación con tubos fluorescentes.
- Sistema de ventilación natural con ventanas con un sistema de cortinas que se abren y se cierran manualmente, para regular la entrada de aire a la nave en función de las condiciones climáticas del momento.

3. Programa de alimentación

Antes de iniciar el tratamiento con la suplementación de Trp, todos los terneros fueron alimentados con biberón usando el lacto reemplazante (“*milk replacer*”, MR) del grupo control durante 10 días (**Tabla 40** y **Tabla 41**).

Durante todo el estudio, los terneros tuvieron acceso *ad libitum* al agua, al alimento de inicio granulado (19,3% CP, 16,2% NDF, 5,8 % ADF, 46,2% de almidón, 3,5% de grasa en base a DM), y a paja de cebada picada (3,3% CP, 80,3% NDF, 54,6% ADF sobre una base de DM). Además, la paja se troceó con un picador de forraje (Seco, Curtalo, Italy) para alcanzar la siguiente distribución granulométrica: > 20 mm: 84,9%; entre 8 y 20 mm: 7,0%; y < 8 mm: 8%, de acuerdo con lo establecido en “*Penn State Particle Separator*” [152].

4. Lacto reemplazantes y tratamientos

Se siguió un diseño desequilibrado, pero completamente aleatorizado. Después de los 10 días tomando el MR los terneros fueron asignados al azar a uno de los siguientes dos grupos: CTRL (n = 13) sin suplementación adicional; TRP (n = 14) a los que se les proporcionó 4,5 g adicionales de L-Trp (Livzon Group, Fuxing Pharmaceutical, Ningxia, China) por día (**Tabla 40**). Los perfiles de aminoácidos del MR y de los piensos concentrados de iniciación se muestran en la **Tabla 41**.

Tabla 40. Ingredientes y composición química de los lacto reemplazantes.

	CTRL	TRP
Ingredientes (%)		
Leche desnatada en polvo	39	39
Concentrado de proteína de suero 35	15	15
Concentrado de proteína de suero 60	4	3,3
50 suero graso	39	39,2
Premix ¹	3	3
Trp	-	0,5
Composición química (% DM)		
DM	96,6	96,9
CP	24,1	24,0
Grasa	20,5	21,8
Lactosa	43,1	44,3
Ash	6,8	6,9

CTRL, terneros sin suplementación en el lacto reemplazante; TRP, terneros alimentados con una dosis diaria adicional de 4,5 g/día de Trp en el lacto reemplazante.

¹ vitamina A, 25.000 UI; vitamina D3, 4.500 UI; vitamina C, 300 mg/kg; vitamina B1, 16 mg/kg; vitamina B2, 10 mg/kg; vitamina B6, 10 mg/kg; vitamina B12, 80 µg/kg; vitamina K3, 5,5 mg/kg; biotina, 160 µg/kg; niacina, 50 mg/kg; ácido pantoténico, 23 mg/kg; ácido fólico, 1 mg/kg; Fe, 150 mg/kg; Cu, 10 mg/kg; Zn, 170 mg/kg; Mn, 40 mg/kg; I, 1,3 mg/kg; Se, 0,4 mg/kg.

Fueron alimentados dos veces al día (a las 07:00 h, y a las 16:00 h) con 3 L a una concentración del 15% del MR (ingesta total de MR: 900 g/d) durante los primeros 7 días. Posteriormente, cada toma de MR se redujo a 2 L también del 15% (600 g/d) durante los siguientes 7 días, y luego el MR se limitó a una única comida de 2 L también al 15% (300 g/d) durante los siguientes 7 días, de modo que los terneros estaban completamente destetados a los 22 días de estudio.

Los terneros del grupo TRP recibieron una leche con una cantidad fija de 0,5% de Trp. La suplementación se hizo sólo en la toma de la mañana. Debido a que el MR iba disminuyendo a lo largo del estudio, la concentración adicional de Trp requerido en el MR para alcanzar los 4,5 g diarios se añadió individualmente a cada biberón antes de cada alimentación por MR.

Tabla 41. Composición de aminoácidos de los lacto reemplazantes y de los piensos concentrados de iniciación.

AA g/100 g	Lacto reemplazante		Piensos concentrados de iniciación
	CTRL	TRP	
Ácido aspártico	2,30	2,42	1,49
Ácido glutámico	5,37	5,72	2,89
Serina	1,27	1,37	0,78
Histidina	0,63	0,70	0,49
Glicina	0,46	0,50	0,76
Treonina	1,49	1,47	0,61
Arginina	0,76	0,79	1,14
Alanina	1,00	1,04	0,78
Tirosina	0,93	1,02	0,60
Valina	1,66	1,76	0,66
Metionina	0,55	0,61	0,26
Fenilalanina	1,00	1,06	0,79
Isoleucina	1,48	1,55	0,68
Leucina	2,76	2,82	1,22
Lisina	2,08	2,13	0,81
Hidroxiprolina	< 0,04	< 0,04	0,14
Prolina	2,11	2,21	1,00
Triptófano	0,35	0,83	0,20

CTRL, terneros sin suplementación en el lacto reemplazante; TRP, terneros alimentados con una dosis diaria adicional de 4,5 g/día de Trp en el lacto reemplazante.

5. Obtención de las muestras

Siendo el día 0 el inicio de la suplementación con Trp se obtuvieron muestras de sangre al día -4 (semana -1), día 4 (semana 1), día 16 (semana 3) y día 23 (semana 4). La extracción de la muestra se realizó a partir de la vena yugular justo antes (tiempo 0) y 3 horas después de la alimentación con la primera toma del MR del día.

Concretamente, se obtuvieron muestras de suero y plasma de la forma descrita en el **apartado 4.1 de Material y Métodos**. Con estas muestras se procedió posteriormente a la obtención del perfil bioquímico y del perfil de aminoácidos.

6. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo con el software SPSS 24.0 (IBM, Chicago, IL, USA). El nivel de significancia fue establecido en $p < 0,05$ y la tendencia fue considerada en $0,05 \leq p \leq 0,1$. Los datos descriptivos son presentados con la media y el error estándar de la media (media \pm SE).

Se realizó el test de normalidad Kolmogórov-Smirnov y en los casos necesarios, los datos fueron transformados a valores logarítmicos para corregir la distribución y permitir el uso de estadística paramétrica.

Se utilizó el modelo lineal general (GLM) de medidas repetidas para poder comparar los valores de las tomas de muestras a los dos tiempos de las distintas semanas. En el modelo factorial, cada animal fue introducido como unidad experimental, las distintas tomas de muestra como efecto intra-sujetos, y el tratamiento (CTRL o TRP) como efecto inter-sujetos, así como la interacción entre ambos. Posteriormente se realizaron comparaciones por pares con ajuste de Bonferroni para aquellos casos en los que la interacción entre efectos era significativa.

El análisis se realizó por separado a las 0 y a las 3 horas, teniendo en cuenta la semana de muestreo utilizando el modelo descrito anteriormente. Además, para evaluar el efecto del tiempo en relación con la alimentación sobre los metabolitos sanguíneos, los datos sanguíneos de todas las semanas se promediaron por tiempo en relación con la alimentación, y se ejecutó el mismo modelo de medidas repetidas descrito anteriormente usando el tiempo (hora en relación con la alimentación) en lugar de la semana como medida repetida.

7. Perfil de aminoácidos libres en plasma

Tras la derivatización de las muestras de plasma con heparina se cuantificaron los aminoácidos proteínogénicos y los aminoácidos no proteínogénicos citrulina y ornitina libres mediante HPLC. En este experimento se obtuvieron resultados correspondientes a la toma de muestras basales y a las 3 horas después de tomar el lacto reemplazante, durante cuatro semanas (**Tabla 42**). Mediante este análisis se comprobó que la absorción del Trp se producía correctamente, y se estudió si afectaba a los demás aminoácidos.

Se analizaron estadísticamente las diferencias en estos parámetros para ver el efecto del tratamiento antes de tomar el MR (0h), y 3h después de tomarlo. Los *p*-valores de este análisis se muestran en la **Tabla 43**.

Los resultados obtenidos fueron similares en ambos grupos. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de aminoácidos libres en plasma, excepto por los esperados niveles más elevados de **Trp** 3 horas después de la alimentación matutina en el grupo de TRP (**Figura 82**).

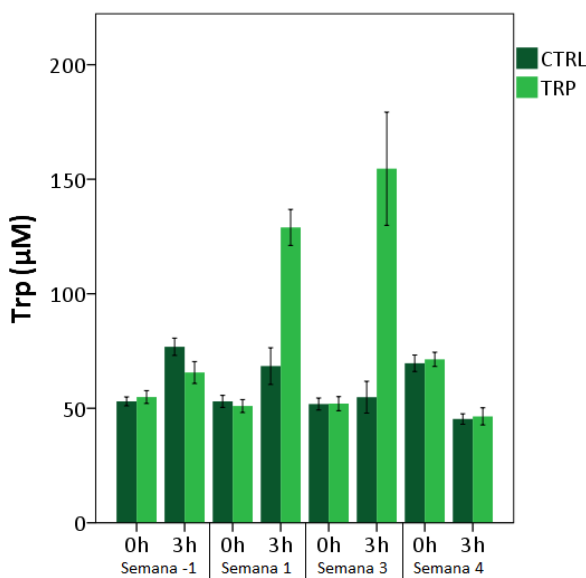


Figura 82. Representación gráfica de la concentración de Trp en plasma. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales del grupo TRP.

Únicamente se observó, después de la alimentación con MR por la mañana, que la concentración plasmática de **ácido glutámico** tendió ($p = 0,080$) a disminuir en el grupo de animales TRP en comparación con los animales CTRL.

Por último, también se miró la concentración plasmática de Trp en relación con los otros aminoácidos neutros grandes (**LNAA**; Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, His, Trp, Met, Thr). Se observaron concentraciones séricas similares de Trp y LNAA antes de la alimentación matutina, pero la concentración sérica de Trp y la relación Trp/LNAA aumentaron en el grupo de terneros TRP en comparación con los terneros CTRL 3 horas después de la alimentación matutina.

Además de la síntesis de 5-HT, una gran mayoría del Trp que se ingiere se dirige hacia la formación de quinurenina (**Kyn**). La proporción Kyn/Trp indica el destino metabólico del Trp, y los cambios en esta proporción se han relacionado con la función cerebral y los trastornos neuroendocrinos [109]. En el presente estudio, los cambios en la Kyn plasmática (**Figura 83**) y la relación Kyn/Trp (**Tabla 42** y **Tabla 43**) fueron paralelos a los de Trp, lo que indica que las tasas metabólicas de Trp fueron las mismas en ambos grupos.

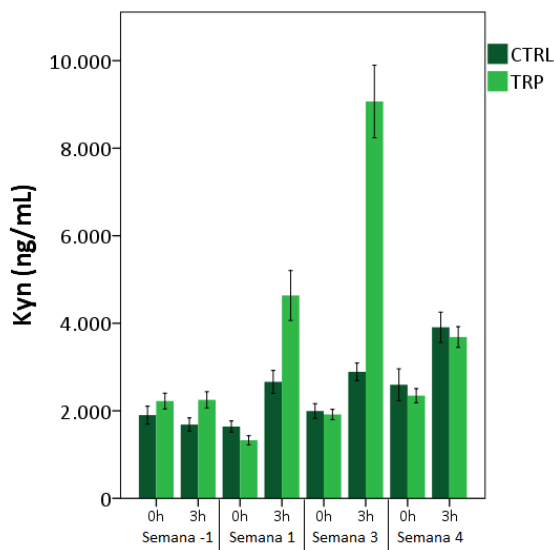


Figura 83. Representación gráfica de la concentración de Kyn en plasma. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales del grupo TRP.

Tabla 42. Perfil de aminoácidos libres en el plasma en los terneros según el tiempo de la toma de muestra y la suplementación del MR sin o con Trp.

	Semana -1		Semana 1		Semana 3		Semana 4		
	0h	3h	0h	3h	0h	3h	0h	3h	
Asn + Ser	CTRL	140,43 ± 6,42	263,10 ± 18,82	141,03 ± 8,53	219,35 ± 13,31	124,50 ± 7,90	147,13 ± 20,52	208,79 ± 16,57	135,55 ± 10,85
	TRP	161,59 ± 8,97	246,86 ± 16,37	141,11 ± 8,57	274,06 ± 26,93	129,43 ± 9,57	143,05 ± 17,70	200,91 ± 12,99	134,08 ± 12,67
Glu	CTRL	105,35 ± 6,65	125,85 ± 6,62	103,54 ± 5,00	116,36 ± 6,13	114,31 ± 14,93	105,51 ± 11,92	156,99 ± 12,86	97,73 ± 6,95
	TRP	104,32 ± 4,58	113,74 ± 5,58	95,99 ± 4,31	107,40 ± 3,63	104,67 ± 6,96	98,57 ± 7,54	137,74 ± 7,91	84,77 ± 7,96
Gly	CTRL	446,61 ± 33,18	425,52 ± 44,72	364,69 ± 15,57	369,73 ± 24,86	306,56 ± 19,12	265,86 ± 23,28	459,73 ± 39,57	305,86 ± 18,29
	TRP	517,40 ± 28,09	419,49 ± 25,69	394,17 ± 21,20	411,95 ± 21,87	335,18 ± 22,49	291,64 ± 27,78	462,08 ± 33,77	306,29 ± 26,99
Gln	CTRL	296,57 ± 13,26	618,50 ± 34,61	325,89 ± 21,95	507,50 ± 37,49	293,23 ± 14,27	364,97 ± 45,12	407,16 ± 22,11	309,65 ± 16,63
	TRP	339,23 ± 17,30	614,33 ± 40,06	300,70 ± 14,59	531,31 ± 22,79	287,09 ± 13,30	342,90 ± 42,50	385,42 ± 16,70	287,39 ± 14,81
His	CTRL	59,65 ± 3,16	106,10 ± 7,78	70,01 ± 4,19	106,92 ± 7,30	78,98 ± 4,18	82,58 ± 9,12	114,07 ± 8,24	79,71 ± 5,42
	TRP	63,67 ± 4,45	100,11 ± 7,91	68,85 ± 3,94	124,52 ± 8,87	78,90 ± 5,72	84,80 ± 11,90	112,35 ± 6,38	79,09 ± 5,31
Arg	CTRL	202,07 ± 15,25	420,82 ± 41,85	210,77 ± 14,14	251,27 ± 14,75	199,48 ± 10,28	150,97 ± 13,98	243,27 ± 12,44	157,79 ± 9,17
	TRP	223,32 ± 12,64	395,66 ± 28,74	192,47 ± 15,49	253,67 ± 17,54	196,38 ± 16,00	148,11 ± 21,80	222,58 ± 11,91	155,92 ± 11,40
Cit	CTRL	121,13 ± 10,03	160,83 ± 16,51	110,67 ± 14,01	148,78 ± 8,16	133,96 ± 11,05	138,46 ± 12,56	185,29 ± 22,94	116,87 ± 10,54
	TRP	140,75 ± 14,52	149,29 ± 11,49	118,71 ± 12,37	168,69 ± 11,14	132,09 ± 12,16	135,79 ± 14,59	185,36 ± 14,62	112,33 ± 10,42
Thr	CTRL	138,36 ± 8,85	269,89 ± 24,13	154,98 ± 14,59	250,38 ± 19,77	100,33 ± 3,06	135,04 ± 17,96	128,33 ± 9,54	84,20 ± 4,90
	TRP	166,06 ± 13,04	259,80 ± 22,93	124,94 ± 11,25	222,00 ± 17,10	92,46 ± 6,24	112,83 ± 14,17	121,13 ± 7,59	79,78 ± 5,25
Ala	CTRL	174,37 ± 6,07	425,59 ± 26,34	197,73 ± 10,23	398,02 ± 24,88	231,73 ± 11,80	251,76 ± 38,19	345,18 ± 16,22	210,25 ± 16,59
	TRP	197,30 ± 9,73	411,21 ± 34,15	199,31 ± 13,05	441,83 ± 31,59	228,03 ± 17,28	247,87 ± 25,10	331,50 ± 17,03	200,87 ± 15,97
Pro	CTRL	98,93 ± 4,16	238,17 ± 15,04	95,06 ± 4,95	191,09 ± 15,35	92,76 ± 6,60	132,88 ± 19,15	139,25 ± 9,88	96,09 ± 6,37
	TRP	113,38 ± 5,86	229,72 ± 17,26	96,77 ± 5,19	213,56 ± 14,55	91,88 ± 6,22	129,64 ± 14,83	127,66 ± 7,36	91,45 ± 8,13
Tyr	CTRL	47,68 ± 2,48	97,45 ± 6,40	58,80 ± 3,24	84,02 ± 8,53	67,79 ± 3,15	66,18 ± 9,70	91,40 ± 6,03	64,14 ± 3,49
	TRP	48,87 ± 2,68	84,66 ± 7,64	53,29 ± 3,16	89,47 ± 9,48	61,22 ± 3,45	59,89 ± 8,86	81,66 ± 4,46	59,27 ± 5,29
Val	CTRL	170,29 ± 12,07	326,75 ± 18,82	245,87 ± 20,53	417,15 ± 32,02	346,55 ± 17,40	411,95 ± 48,19	571,35 ± 37,08	438,81 ± 22,68
	TRP	177,08 ± 11,95	295,73 ± 23,00	230,72 ± 15,88	442,26 ± 29,89	323,25 ± 21,47	369,36 ± 39,89	518,14 ± 24,95	396,69 ± 29,15

	Semana -1				Semana 1				Semana 3				Semana 4			
	Oh		3h		Oh		3h		Oh		3h		Oh		3h	
	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP
Met	34,12 ± 3,08	41,82 ± 4,54	135,72 ± 11,12	138,12 ± 13,58	22,17 ± 1,97	20,63 ± 2,83	49,31 ± 3,60	50,32 ± 4,64	15,93 ± 2,11	13,58 ± 2,62	27,91 ± 3,25	24,76 ± 3,12	25,70 ± 2,22	24,79 ± 2,56	20,63 ± 1,09	19,71 ± 1,60
Orn	87,74 ± 5,95	84,55 ± 6,39	154,43 ± 10,52	140,00 ± 8,66	101,74 ± 8,08	95,63 ± 8,54	146,06 ± 9,53	166,11 ± 10,64	150,10 ± 10,57	138,95 ± 8,78	132,46 ± 13,05	125,92 ± 19,43	201,93 ± 12,57	201,25 ± 9,61	139,28 ± 7,16	130,90 ± 9,40
Lys	121,34 ± 6,04	122,26 ± 8,88	496,23 ± 42,44	481,17 ± 58,15	139,35 ± 8,77	121,16 ± 8,18	311,37 ± 26,15	325,76 ± 23,76	148,19 ± 7,45	140,43 ± 12,40	197,83 ± 31,15	184,67 ± 30,12	221,59 ± 15,42	194,20 ± 9,65	147,82 ± 10,21	132,51 ± 13,01
Cys	154,33 ± 5,34	161,65 ± 4,84	131,96 ± 8,48	140,20 ± 9,98	142,80 ± 11,97	123,51 ± 9,58	177,80 ± 6,43	173,83 ± 8,22	102,06 ± 6,92	105,05 ± 6,01	138,49 ± 7,35	129,27 ± 4,70	148,25 ± 6,02	147,11 ± 5,45	142,18 ± 5,26	138,23 ± 7,41
Ile	97,91 ± 7,38	99,44 ± 6,97	182,42 ± 8,64	155,30 ± 14,08	123,53 ± 10,38	114,65 ± 9,13	175,44 ± 14,55	194,30 ± 14,78	159,24 ± 8,62	151,84 ± 11,04	176,35 ± 18,33	159,21 ± 17,11	248,33 ± 16,56	220,03 ± 10,86	185,04 ± 10,01	161,90 ± 13,14
Leu	112,66 ± 7,60	113,69 ± 8,63	249,63 ± 13,41	220,39 ± 19,86	148,10 ± 11,72	132,85 ± 10,13	291,39 ± 22,32	295,37 ± 23,12	200,65 ± 10,81	186,66 ± 12,49	262,29 ± 30,89	249,65 ± 29,96	316,33 ± 20,44	284,69 ± 15,24	230,72 ± 12,32	205,56 ± 17,86
Phe	74,67 ± 2,93	83,59 ± 3,58	126,93 ± 5,83	117,34 ± 6,68	83,48 ± 3,85	77,20 ± 2,52	113,18 ± 6,23	118,52 ± 13,37	90,97 ± 4,12	89,64 ± 4,98	97,86 ± 10,07	95,88 ± 9,65	128,98 ± 6,66	121,38 ± 4,99	97,44 ± 5,31	90,04 ± 6,43
Trp	53,01 ± 1,95	54,89 ± 2,81	76,86 ± 3,76	65,62 ± 4,78	53,02 ± 2,63	50,98 ± 2,86	68,43 ± 8,01	128,97 ± 7,89	51,85 ± 2,64	52,03 ± 3,08	54,85 ± 6,97	54,85 ± 6,97	69,67 ± 3,58	71,37 ± 3,13	45,31 ± 2,29	46,46 ± 3,72
LNAa	788,4 ± 34,6	849,1 ± 46,1	1571,8 ± 86,2	1437,1 ± 107,3	959,9 ± 61,6	874,1 ± 49,1	1556,2 ± 103,4	1665,7 ± 104,6	1112,3 ± 49,7	1049,6 ± 65,7	1315,0 ± 148,2	1311,0 ± 152,7	1694,2 ± 103,9	1555,6 ± 71,7	1246,0 ± 61,2	1138,5 ± 84,2
Trp / LNAa	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Kyn	1899,9 ± 206,8	2195,6 ± 168,2	1686,1 ± 152,4	2212,7 ± 174,4	1641,1 ± 128,4	1371,7 ± 105,2	2661,3 ± 260,2	4635,3 ± 569,3	1995,3 ± 166,6	1964,8 ± 119,4	2890,2 ± 202,3	2890,2 ± 202,3	2595,9 ± 363,0	2438,9 ± 176,3	3908,0 ± 345,7	3651,6 ± 223,0
Kyn / Trp	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,23 ± 0,04	0,25 ± 0,07	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,34 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,44 ± 0,05	0,41 ± 0,03

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Unidades μM para todos los aminoácidos a excepción de la quinurenina (Kyn) que está en ng/mL . Las filas muestran las concentraciones de aminoácidos según el grupo de estudio CTRL y TRP. Las columnas dividen los grupos de estudio según las distintas semanas y horas de la toma de muestra. LNAa, large neutral amino acids (Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, His, Trp, Met, Thr).

Tabla 43. Valoración de la absorción de aminoácidos tras la toma del lacto reemplazante. Se muestra el *p*-valor de la comparación entre la media de las cuatro semanas de la concentración de cada aminoácido en el grupo CTRL con el correspondiente valor en el grupo TRP, antes y a las 3 horas de tomar el lacto reemplazante.

	<i>p</i> -valor	
	T0	T3
Asparagina + Serina	0,603	0,532
Ácido glutámico	0,234	0,080
Glicina	0,186	0,504
Glutamina	0,853	0,848
Histidina	0,964	0,662
Arginina	0,658	0,707
Citrulina	0,557	0,977
Treonina	0,544	0,281
Alanina	0,893	0,854
Prolina	0,873	0,896
Tirosina	0,147	0,451
Valina	0,331	0,410
Metionina	0,725	0,975
Ornitina	0,518	0,794
Lisina	0,176	0,804
Cisteína	0,522	0,653
Isoleucina	0,308	0,293
Leucina	0,238	0,388
Fenilalanina	0,682	0,504
Triptófano	0,878	< 0,001
LNAA	0,341	0,696
Trp / LNAA	0,217	< 0,001
Quinurenina	0,768	< 0,001
Kyn / Trp	0,763	0,460

T0, efecto de la suplementación con Trp antes de la alimentación por la mañana con el MR; T3, efecto de la suplementación con Trp 3 horas después de la alimentación por la mañana con el MR; LNAA, large neutral amino acids (Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, His, Trp, Met, Thr). Los *p*-valores en negrita indican las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

8. Perfil bioquímico

Se analizó un perfil bioquímico completo en suero, en el que se midieron los niveles de glucosa, triglicéridos, NEFAs, proteína total, colesterol, creatinina y urea como marcadores del metabolismo energético; enzimas hepáticas del metabolismo de aminoácidos (ALT, AST, GGT); de la hormona anabólica insulina; de la citoquina proinflamatoria IFN γ ; de los niveles de CK como marcador de daño muscular; de las enzimas antioxidantes (SOD y GPx); la proteína de fase aguda haptoglobina; y de la hormona de estrés cortisol. En la **Tabla 44** se muestran los valores medios obtenidos para todas las determinaciones según los grupos comparados: tiempo y tratamiento.

La bioquímica sérica mostró una concentración sérica de **NEFAs** mayor ($p = 0,040$) antes de la alimentación por la mañana en el grupo de terneros TRP en comparación con los terneros CTRL, a excepción de la semana 4 (**Figura 84**).

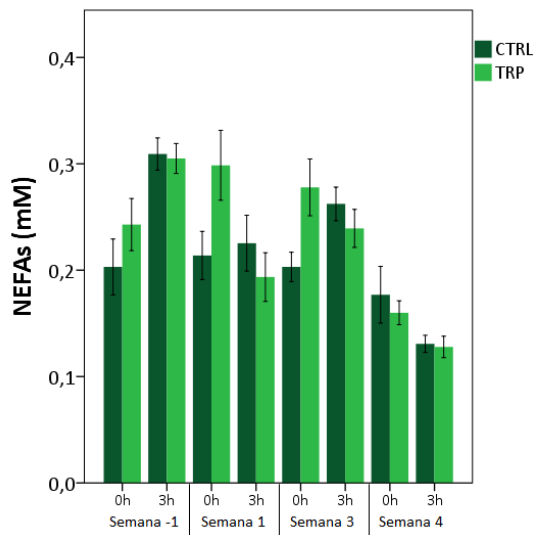


Figura 84. Representación gráfica de la concentración de NEFAs en suero. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales del grupo TRP.

También se observó una tendencia hacia una actividad de la enzima antioxidante **SOD** más baja ($p = 0,086$) antes de comer en los terneros TRP en comparación con los terneros CTRL.

También se observó en el grupo TRP, 3 horas después de la alimentación matutina, una tendencia a disminuir la concentración de **glucosa** sérica ($p = 0,091$; **Figura 85**), al igual que la actividad de **GPx** ($p = 0,097$) en comparación con los terneros CTRL.

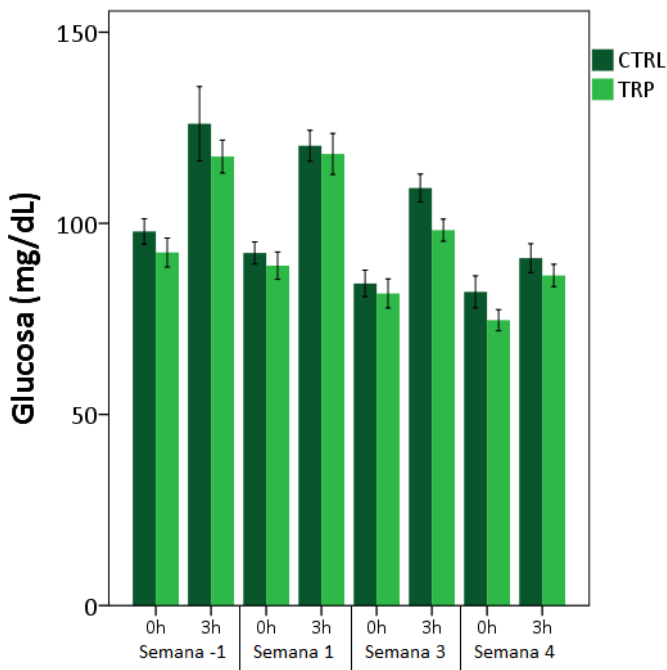


Figura 85. Representación gráfica de la concentración de glucosa en suero. Las barras representan la media \pm SE. Las **barras oscuras** representan los resultados de los animales CTRL, y las **barras claras** representan los resultados de los animales del grupo TRP.

Ningún otro analito metabólico se alteró en el suero, incluyendo marcadores de inflamación como la citoquina IFN γ , y la proteína de fase aguda haptoglobina.

Aunque no se observó ningún efecto de la suplementación con Trp en los niveles de la hormona de estrés cortisol, la concentración de cortisol sérico cambió durante las semanas y la hora de muestreo del estudio, y estuvo relacionada con el proceso de alimentación de los animales, independientemente de la suplementación con el Trp.

La concentración de **cortisol** sérico fue mayor al comienzo del estudio antes de la alimentación matutina en comparación a la concentración de cortisol 3 horas después de alimentarse, lo que indicó que la comida tranquilizaba a los terneros, disminuyendo su grado de estrés y por tanto los niveles de cortisol. Este efecto era más evidente en los animales más jóvenes (semana -1 del estudio). A medida que los terneros crecieron y consumieron más alimento de inicio concentrado, los niveles de cortisol sérico antes de la alimentación fueron disminuyendo (**Figura 86**). Sorprendentemente, los niveles de cortisol sérico en la semana 4 (después del destete, cuando ya empezaron a comer pienso) difirieron entre antes y después de la alimentación, pero fueron más bajos que las concentraciones de cortisol sérico antes del destete 3 horas después de la alimentación.

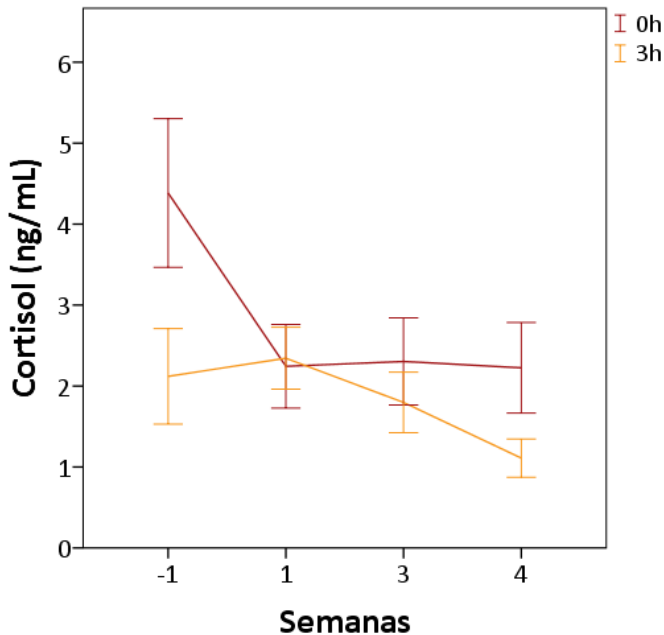


Figura 86. Evolución de la concentración de cortisol sérico a lo largo de las distintas semanas del proceso de destete. **0h**, muestreo antes de la alimentación del MR por la mañana; **3h**, 3 horas después de la alimentación del MR por la mañana.

Tabla 44. Concentraciones séricas de los parámetros bioquímicos según el tiempo de la toma de muestra y la suplementación del MR sin o con Trp.

	Semana -1			Semana 1			Semana 3			Semana 4		
	0h	3h	0h	3h	0h	3h	0h	3h	0h	3h	0h	3h
Glucosa (mg/dL)	CTRL	97,9 ± 3,3	126,1 ± 9,7	92,3 ± 2,9	120,3 ± 4,1	84,3 ± 3,5	109,2 ± 3,7	82,1 ± 4,2	90,9 ± 3,8			
	TRP	92,4 ± 3,8	117,5 ± 4,3	88,9 ± 3,6	118,2 ± 5,4	81,6 ± 3,8	98,2 ± 2,9	74,7 ± 2,8	86,4 ± 2,9			
Insulina (µg/L)	CTRL	0,3 ± 0,0	6,8 ± 2,3	0,3 ± 0,1	3,2 ± 1,0	0,3 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,2			
	TRP	0,2 ± 0,0	6,0 ± 1,8	0,2 ± 0,1	4,7 ± 1,4	0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,2			
Insulina/Glucosa	CTRL	0,2 ± 0,0	4,6 ± 1,3	0,4 ± 0,1	2,5 ± 0,8	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2			
	TRP	0,2 ± 0,0	4,8 ± 1,4	0,2 ± 0,1	3,7 ± 1,0	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,1 ± 0,2			
Triglicéridos (mg/dL)	CTRL	13,4 ± 0,9	36,6 ± 4,9	13,8 ± 1,4	23,7 ± 3,8	20,4 ± 1,9	28,6 ± 3,1	22,7 ± 1,7	20,9 ± 1,2			
	TRP	13,6 ± 1,2	29,1 ± 2,2	14,6 ± 1,5	23,2 ± 2,8	18,2 ± 1,4	23,8 ± 2,0	22,5 ± 2,4	22,7 ± 3,3			
NEFAS (mM)	CTRL	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0			
	TRP	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0			
Colesterol (mg/dL)	CTRL	76,1 ± 4,3	74,5 ± 6,3	76,5 ± 6,6	68,7 ± 4,8	77,9 ± 4,3	79,4 ± 7,1	67,9 ± 5,2	65,2 ± 4,1			
	TRP	75,8 ± 6,2	68,4 ± 5,4	75,8 ± 7,7	65,8 ± 5,3	70,7 ± 6,5	72,2 ± 6,8	61,3 ± 5,5	66,1 ± 4,6			
Proteínas totales (g/dL)	CTRL	4,9 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,6 ± 0,1			
	TRP	5,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1	5,3 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,4 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,8 ± 0,1			
Creatinina (mg/dL)	CTRL	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0			
	TRP	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0			
Urea (mg/dL)	CTRL	15,3 ± 1,3	15,7 ± 1,0	16,8 ± 0,7	16,9 ± 1,1	20,8 ± 1,4	22,1 ± 1,3	25,8 ± 1,1	24,9 ± 1,2			
	TRP	15,0 ± 0,9	15,9 ± 0,9	16,9 ± 1,1	16,7 ± 1,3	21,2 ± 0,8	22,5 ± 1,1	27,6 ± 1,8	27,4 ± 1,5			

	Semana -1						Semana 1						Semana 3						Semana 4					
	0h		3h		0h		3h		0h		3h		0h		3h		0h		3h		0h		3h	
	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP	CTRL	TRP
GGT (U/L)	18,1 ± 0,9	18,6 ± 1,4	19,1 ± 1,1	19,3 ± 1,2	16,4 ± 0,9	16,6 ± 1,0	16,5 ± 1,0	16,7 ± 1,1	16,1 ± 1,6	15,6 ± 0,9	16,8 ± 0,8	17,2 ± 1,7	16,6 ± 1,6	16,9 ± 1,3	18,5 ± 1,7	19,1 ± 1,4								
AST (U/L)	40,1 ± 2,9	44,1 ± 3,6	39,1 ± 1,9	40,5 ± 2,2	43,3 ± 3,6	44,3 ± 3,4	40,3 ± 2,7	40,6 ± 5,1	55,1 ± 4,0	50,1 ± 5,1	54,0 ± 5,0	54,0 ± 5,0	67,4 ± 7,7	65,2 ± 9,5										
ALT (U/L)	9,2 ± 0,5	9,9 ± 0,5	9,6 ± 0,3	10,1 ± 0,4	10,1 ± 0,6	9,6 ± 0,4	10,9 ± 0,6	10,1 ± 0,6	12,3 ± 0,6	11,8 ± 0,7	12,4 ± 0,6	11,9 ± 0,5	14,1 ± 0,8	13,5 ± 0,7										
GPx (U/L)	473,5 ± 35,0	461,8 ± 43,2	467,2 ± 14,5	452,1 ± 43,7	488,9 ±	451,4 ±	532,4 ± 28,8	465,1 ± 35,8	467,9 ± 24,1	423,7 ± 36,5	498,6 ± 34,9	427,1 ± 26,1	437,1 ± 35,7	463,8 ± 23,5										
SOD (U/mL)	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0										
Haptoglobina (mg/mL)	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0										
Cortisol (ng/mL)	4,1 ± 0,9	4,7 ± 1,6	1,9 ± 0,5	2,6 ± 1,0	1,6 ± 0,4	2,6 ± 1,1	1,8 ± 0,5	1,8 ± 0,6	1,4 ± 0,3	3,1 ± 0,9	1,5 ± 0,3	2,9 ± 1,1	1,9 ± 0,4	1,4 ± 0,4										
IFN γ (ng/mL)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0										
CK (U/mL)	92,7 ± 9,2	105,2 ± 10,7	58,4 ± 9,7	53,8 ± 8,4	83,4 ± 12,3	92,2 ± 17,9	89,8 ± 23,3	55,6 ± 7,9	83,5 ± 4,0	112,6 ± 19,3	76,1 ± 6,4	108,8 ± 27,7	175,1 ± 72,9	86,9 ± 7,5										

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Las filas muestran las concentraciones de aminoácidos libres en el plasma según el grupo de estudio CTRL y TRP. Las columnas dividen los grupos de estudio según las distintas semanas y horas de la toma de muestra.

Finalmente, se analizó el perfil bioquímico estadísticamente de la misma forma que con el perfil de aminoácidos, para comprobar si la suplementación con Trp alteraba el metabolismo. Los *p*-valores de este análisis se muestran en la **Tabla 45**. No se observaron diferencias exceptuando los niveles de NEFAs a T0.

Tabla 45. Valoración de las consecuencias en los parámetros bioquímicos séricos tras la toma del lacto reemplazante. Se muestra el *p*-valor de la comparación entre la media de las cuatro semanas de cada parámetro bioquímico en el grupo CTRL con el correspondiente valor en el grupo TRP, antes y a las 3 horas de tomar el lacto reemplazante.

	<i>p</i> -valor	
	T0	T3
Glucosa	0,210	0,091
Insulina	0,143	0,934
Insulina / Glucosa	0,262	0,618
Triglicéridos	0,836	0,252
NEFAs	0,040	0,298
Colesterol	0,508	0,454
Proteínas totales	0,751	0,650
Creatinina	0,173	0,268
Urea	0,705	0,557
ALT	0,721	0,682
AST	0,630	0,837
GGT	0,941	0,904
GPx	0,193	0,097
SOD	0,086	0,175
Haptoglobina	0,252	0,251
Cortisol	0,211	0,216
IFN γ	0,488	0,069
CK	0,649	0,868

T0, efecto de la suplementación con Trp antes de la alimentación por la mañana con el MR; T3, efecto de la suplementación con Trp 3 horas después de la alimentación por la mañana con el MR. Los *p*-valores en negrita indican las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).



DISCUSIÓN

Capítulo 1. Efecto de la suplementación de la dieta materna con el antioxidante hidroxitirosol en el desarrollo cerebral de un modelo porcino de restricción del crecimiento intrauterino.

El efecto de la restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) se caracteriza por un déficit en el crecimiento y en el peso del individuo debido a la falta de nutrientes, oxígeno o una alteración en la placenta que provoca carencia de componentes esenciales para el desarrollo. En la IUGR se produce el efecto "*brain-sparing*", en el cual se prioriza el desarrollo cerebral, para asegurar las funciones fisiológicas críticas del recién nacido. Sin embargo, el "*brain-sparing*" no garantiza el desarrollo normal del cerebro ni su función [41]–[43]. Los aspectos relacionados con la IUGR y el cerebro se tratan más ampliamente en la Introducción.

Como se ha comentado anteriormente, la restricción calórica en las cerdas durante el tercer trimestre de gestación afecta el desarrollo fetal e induce un menor peso al nacer en los recién nacidos, siendo un modelo animal bien conocido de IUGR. En este modelo, los animales NBW y LBW nacen de las mismas madres, evitando así el efecto de la madre en la evaluación estadística de los resultados.

En estudios anteriores realizados con el mismo modelo [149], se había comprobado que la suplementación materna con HTX estaba asociada a una menor incidencia de lechones de bajo peso al nacer. Los efectos positivos de la administración de HTX se mantuvieron durante la lactancia, lo que condujo a un mayor peso corporal días posteriores al destete [146]. También dio lugar a desviaciones en la composición corporal y los índices metabólicos, lo que sugiere un mayor potencial de crecimiento y viabilidad que se confirmó en un estudio posterior [146].

El HTX (2-(3,4-dihidroxifenil)etanol, **Figura 87**) es el principal compuesto fenólico que se encuentra en el aceite de oliva y se sabe que presenta una elevada actividad antioxidante. Además, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que posee efectos beneficiosos en enfermedades como el cáncer, cardiovasculares o neurodegenerativas [153].

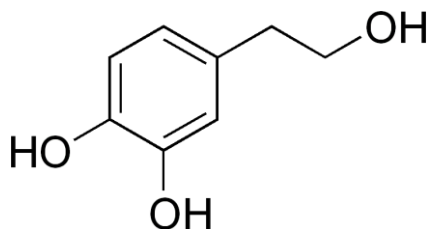


Figura 87. Estructura química del hidroxitirosol.

Si bien muchos estudios han demostrado los beneficios de la suplementación dietética con antioxidantes, incluido el HTX, durante la vida adulta y su papel como neuroprotectores en varias patologías humanas y modelos animales [154]–[159], la literatura sobre los efectos potenciales de la exposición prenatal a antioxidantes es escasa.

Aunque se ha descrito que la administración materna de HTX mejora la neurogénesis y la función cognitiva en la descendencia de ratas estresadas prenatalmente [160] y mejora la función mitocondrial y reduce el estrés oxidativo en el cerebro de los ratones [161], existen pocos datos experimentales sobre los efectos en el SNC de la suplementación con HTX durante la gestación. Como se ha comentado en la Introducción, el cerdo es un buen modelo animal para estudios del SNC, ya que su cerebro es más parecido al de los humanos: es girencefálico y tiene una proporción similar de materia gris a blanca, así como un crecimiento acelerado del cerebro en el período perinatal [85], [162].

Estudio 1. Efecto de la suplementación materna de la dieta con el antioxidante hidroxitirosol en el cerebro de fetos de 100 días de gestación, de cerdos de 1 mes y de 6 meses de edad.

Los resultados de esta tesis mostraron claramente que los efectos prenatales y postnatales de la suplementación materna con HTX durante la gestación no se limitaban al crecimiento o las características metabólicas del individuo adulto, como se ha descrito abundantemente [146], [149], [163], sino que se extendían al desarrollo del cerebro. Así pues, el tratamiento de las madres modificaba el perfil de neurotransmisores en fetos tardíos (100 días de gestación), así como el desarrollo del hipocampo evaluado mediante un estudio proteómico y con marcadores moleculares que permitieron la identificación de neuronas inmaduras y maduras.

Los resultados demostraron que los efectos de la suplementación con el antioxidante HTX se observaban prenatalmente en la descendencia cuyas madres habían sido suplementadas, mientras que no se observaba en individuos en el periodo postnatal, indicando que se necesita la presencia continua del antioxidante para mantener sus efectos. Esto concuerda con informes que indican que el papel protector de la dieta mediterránea durante el embarazo para la salud de la madre y el niño se debe principalmente a los antioxidantes que aportan los componentes de esta dieta, como el aceite de oliva [164], [165]. Es importante señalar que el HTX es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica llegando así al cerebro en concentraciones fisiológicamente relevantes [166].

Uno de los puntos a estudiar fue si la suplementación de las madres con HTX podía modificar el estado redox del cerebro de los fetos debido a su carácter antioxidante. Concretamente, en el presente estudio se analizaron directamente los efectos potenciales del HTX sobre marcadores de estrés oxidativo y enzimas antioxidantes en la corteza prefrontal y en el hipocampo. Los resultados mostraron que el efecto antioxidante del HTX era evidente en la corteza

prefrontal, ya que hubo una clara disminución en el estado de oxidación de los lípidos (ensayo MDA) y cambios en las actividades de las enzimas SOD y GPx. La enzima SOD es la responsable de la conversión de O_2^- en H_2O_2 , que luego se reduce a H_2O por la GPx (con la oxidación del glutatión). Sin embargo, los resultados de los mismos ensayos en el hipocampo no arrojaron diferencias significativas entre los grupos CTRL y HTX. Las diferencias entre las dos áreas pueden deberse a varias razones, por ejemplo, que la corteza prefrontal sea más susceptible al estrés oxidativo, o tal vez que el HTX pueda llegar más fácilmente a la corteza prefrontal.

De todos modos, en este estudio no se esperaban grandes cambios en los parámetros de estrés oxidativo en el cerebro de la descendencia de madres suplementadas con HTX. Eso es debido a que muchos hallazgos en la literatura que analizan los efectos del HTX o derivados en el cerebro se refieren a experimentos que se han realizado en roedores sometidos a un estrés oxidativo y tratados concomitantemente con el HTX, mientras que en nuestro caso no se había aplicado ninguna fuente de estrés oxidativo. En la mayoría de los casos revisados en la bibliografía, la condición oxidante provocaba aumentos importantes de MDA y una disminución de las enzimas antioxidantes, que se revertían parcialmente con el tratamiento con HTX [161], [167]–[170]. En experimentos realizados en cultivos celulares, ocurría una situación similar [171].

En cambio, en aquellos casos en que se determinó el efecto directo del HTX, sin la existencia de un agente oxidante, y por tanto con un diseño similar al realizado en esta tesis, el efecto era leve o no significativo. Por ejemplo, no hubo cambios en el MDA cerebral ni en la actividad de la enzima SOD cuando se compararon ratas suplementadas con HTX en la dieta *versus* una dieta CTRL [158].

Otro factor importante a tener en cuenta que explicaría porque no hemos detectado grandes cambios en el estado redox de las áreas cerebrales, es

la dosis/concentración administrada de HTX. La mayoría de los estudios *in vivo* realizados en roedores utilizan de 5 a 100 mg/kg, mientras que para la realización de este estudio se ha utilizado 1,5 mg/kg. La dosis se seleccionó a partir de datos no publicados proporcionados por la empresa fabricante, antes del primer estudio realizado en 2017, que mostró su eficacia para ejercer efectos metabólicos y de desarrollo en la descendencia de cerdas suplementadas [146], [149], [172], [173].

1. Efectos del HTX sobre el perfil de neurotransmisores en distintas áreas cerebrales.

Aunque hay mucha información sobre los efectos neuroprotectores del HTX, hay una escasez de datos sobre su papel específico en la neurotransmisión. Los resultados obtenidos sobre el efecto del HTX en el perfil de neurotransmisores en fetos de 100 días dependen del área del cerebro. Así, en la **amígdala** hubo un aumento de DA y sus metabolitos, DOPAC y HVA, provocando un aumento relevante de los compuestos dopaminérgicos totales. Las proporciones entre metabolitos y DA no se alteraron significativamente, lo que indica que la tasa de metabolización de la DA no se ve afectada por el antioxidante. Se observó un efecto similar para la 5-HT y su metabolito 5-HIAA. En el **hipocampo**, la DA no cambiaba, pero la concentración de DOPAC y HVA aumentaba significativamente, lo que indica que la tasa de catabolización de DA aumenta con el tratamiento con el HTX. El efecto en la vía serotoninérgica fue menos relevante en esta área del cerebro. Finalmente, en la **corteza prefrontal** hubo una importante disminución en la concentración de DA acompañada de un aumento en la concentración de metabolitos, indicando nuevamente un aumento en la tasa de metabolización. El efecto sobre la vía serotoninérgica nuevamente no fue tan relevante cuantitativamente, aunque continuaba siendo significativo.

Por tanto, el efecto de HTX parece ser, en general, más relevante en la vía de la DA que en la de otros neurotransmisores. Esto podría deberse a la conexión entre el metabolismo de la DA y el estrés oxidativo. Se ha demostrado claramente que el metabolismo de la DA es una fuente importante de producción de ROS intracelulares [174]. De hecho, la enzima reguladora en la síntesis de DA, la tirosina hidroxilasa es una monooxigenasa que utiliza oxígeno molecular (O_2) como sustrato para oxidar la L-tirosina a L-DOPA. Asimismo, la principal responsable de la degradación de la DA, la MAO, cataliza la desaminación oxidativa de las catecolaminas utilizando el O_2 y produciendo peróxido de hidrógeno y el 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL), que es un potente neurotóxico [174], [175] (**Figura 88**).

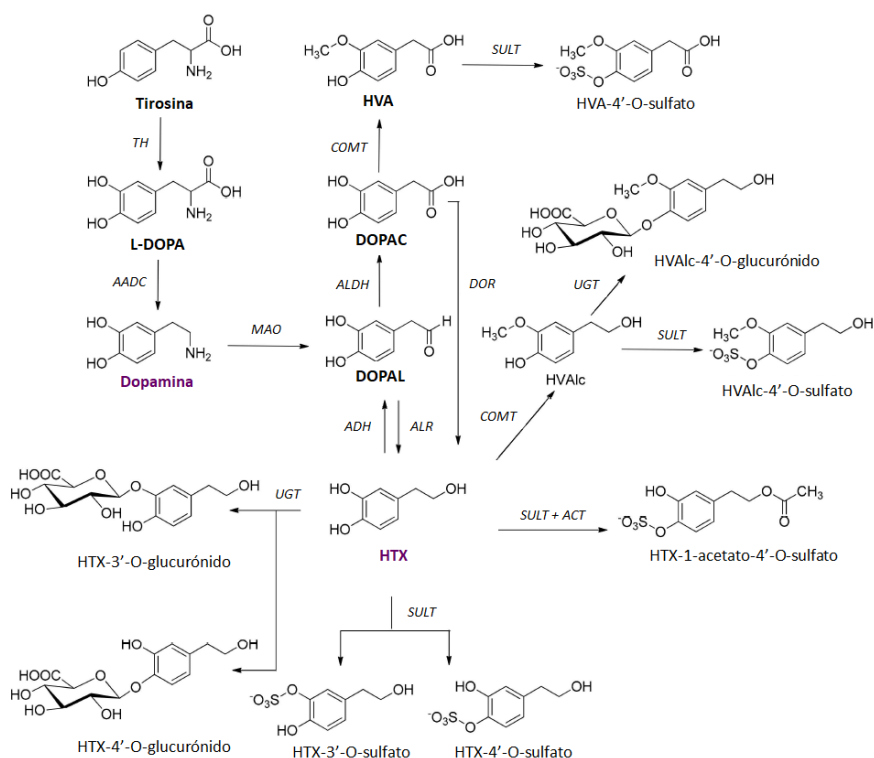


Figura 88. Vía metabólica común entre la DA y el HTX. AADC, L-aminoácido aromático descarboxilasa; ACT, O-acetiltransferasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; ALDH, aldehído deshidrogenasa; ALR, aldehído reductasa; COMT, catecol-O metiltransferasa; DOR, DOPAC reductasa; HVA, ácido homovanílico; HVAIc, alcohol homovanílico; MAO, monoaminooxidasa; SULT, sulfotransferasa; TH, tirosina hidroxilasa; UGT, uridina 5'-difosfoglucuronosil transferasa. Adaptada de Meiser et al. (2013) [174].

Así, tanto la síntesis como la degradación de DA, y también de NA, la otra catecolamina, están fuertemente asociadas con la generación de estrés oxidativo. No solo las catecolaminas, sino también las indolaminas pueden ser una fuente de ROS, ya que el metabolismo de la 5-HT sigue una ruta similar con las enzimas triptófano hidroxilasa y MAO como las principales reguladoras en su síntesis y degradación, respectivamente, y ambas usan O_2 como sustratos, mientras que MAO produce H_2O_2 como producto de la reacción [176].

Nuestros resultados están de acuerdo con diversos autores que han propuesto que el HTX es un protector neuronal dopaminérgico, debido al hecho de que el HTX es capaz de llegar al tejido cerebral (por su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica) y a su posible interacción con las vías dopaminérgicas [177], [178] (**Figura 88**).

Este papel neuroprotector del HTX puede originarse directamente de su capacidad captadora de ROS, que puede dirigirse contra el peróxido de hidrógeno y ROS [179] o por mecanismos indirectos, ya que el HTX puede inducir varios sistemas antioxidantes en la célula aumentando las actividades de las enzimas SOD, GPx o glutatión reductasa, y también de mantener altos niveles de glutatión reducido [179], [180]. Los efectos neuroprotectores de HTX se han descrito *in vivo* [160], [161] e *in vitro* [181], [182].

Otro posible mecanismo que explicaría los efectos de HTX sobre la vía dopaminérgica es que HTX puede reducir los efectos tóxicos de los productos de oxidación derivados de DA, como el DOPAL, mediante la inducción de enzimas de fase II implicadas en las vías de detoxificación de la célula. Las enzimas implicadas en las reacciones de fase II son las sulfotransferasas (SULT), uridina 5'-difosfoglucuronosil transferasas (UGT) y COMT. El mismo HTX es metabolizado por estas enzimas hasta formar compuestos O-glucurónidos, O-sulfatos, HVA, alcohol homovanílico (3-O-metil-hidroxitirosol, HVAIc) y el metabolito DOPAC [182] (**Figura 88**).

Por lo tanto, en presencia de una mayor actividad antioxidante en la célula, el metabolismo de la DA podría aumentar su velocidad sin que incrementara la concentración de metabolitos tóxicos, y por lo tanto sin obstaculizar la viabilidad celular. Este puede ser el mecanismo que explique el aumento del metabolismo de DA (DA y sus metabolitos, DOPAC y HVA) en el cerebro de fetos cuyas madres habían sido suplementadas con HTX.

Los niveles más altos de DOPAC y HVA pueden explicarse también por mecanismos enzimáticos. De manera similar a nuestros resultados, se observó un aumento de DOPAC después de la administración de HTX en el cuerpo estriado de la rata, mientras que los efectos sobre el HVA fueron variables ya que los mismos autores encontraron que este metabolito aumentaba o disminuía [183], [184]. Los autores propusieron que HTX actúa como inhibidor de COMT, la enzima que convierte DOPAC en HVA. Este mecanismo explicaría el aumento de DOPAC, pero no de HVA. Se ha informado que la inhibición de la formación de HVA puede requerir un mayor grado de inhibición de COMT [185] lo que explicaría los resultados variables encontrados en la literatura.

Otro mecanismo para explicar el aumento de HVA sería la conversión del propio HTX en HVA_{1c} y posteriormente a HVA [184], [186], [187]. De hecho, el HVA_{1c} es el principal metabolito biológico del HTX, se origina por la acción de la enzima COMT y recientemente se ha asociado a los efectos protectores del aceite de oliva [187].

Aun así, otra posibilidad sería la metabolización del HTX en DOPAC, por las acciones posteriores de las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) y ALDH, y posteriormente en HVA por la enzima COMT. De hecho, DA y HTX comparten sus reacciones catabólicas y ambos compuestos pueden convertirse en DOPAC, lo que sugiere que el HTX podría interactuar con las vías metabólicas de la DA debido a su similitud estructural [179] (**Figura 88**).

Por último, nuestros resultados mostraron que el efecto del HTX no es equivalente en las tres áreas del cerebro (amígdala, hipocampo, corteza prefrontal), lo que sugiere que existen diferencias según el área cerebral entre el metabolismo del HTX y los efectos celulares y/o su conexión con las vías dopaminérgicas.

2. Efectos del HTX en el desarrollo del hipocampo.

El hipocampo está relacionado con procesos de memoria, funciones cognitivas, capacidades de aprendizaje y habilidades motoras, que son esenciales para el desarrollo neurológico normal [188].

El hipocampo está formado por el CA y el GD (**Figura 14**). El GD es el lugar principal de aferencias del hipocampo, y sus principales células son neuronas granulares con abundantes dendritas que se extienden en todas direcciones. El CA se divide en CA1, CA2, y CA3, sus neuronas principales son de tipo piramidal, y se pliega sobre sí mismo para semi-envolver el GD [88].

Es una estructura laminada en la que todas las fibras que se originan de una fuente aferente particular terminan en segmentos dendríticos idénticos. Las células piramidales y granulares se originan en las capas germinativas ventriculares que se encuentran debajo de la pared ventricular adyacente. Por lo tanto, los neuroblastos que se multiplican migran desde la zona ventricular a su región objetivo final (**Figura 89**). Las neuronas piramidales de CA se originan en la segunda mitad de la vida embrionaria. La ruta de migración es corta porque el hipocampo sigue de cerca la curva del ventrículo. Las futuras neuronas CA1 forman filas de células perpendiculares a la capa germinativa ventricular. Al nacer, la capa piramidal es gruesa, pero se vuelve más delgada después del nacimiento. Por otro lado, la generación de células granulares en el GD comienza en la mitad de la gestación, pero continúa durante mucho tiempo en el período posnatal y, en un nivel reducido, hasta la edad adulta [88], [189].

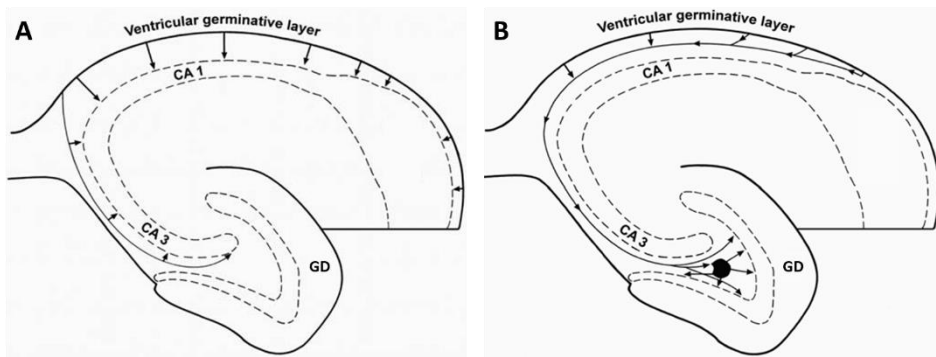


Figura 89. Ruta de migración (indicado con flechas) de las células piramidales hacia CA (A) y de las células granulares hacia GD (B) desde la capa germinativa ventricular. Adaptada del libro Hippocampus Book [88].

En CA1, nuestros resultados demostraron que los fetos de 100 días del grupo HTX mostraron un mayor número de células neuronales maduras (inmunopositivas a NeuN) mientras que la inmunotinción de neuronas inmaduras (inmunopositivas a DCX) fue menor, lo que indicó que HTX induce una reacción más rápida del proceso de diferenciación neuronal en esta capa. El área ocupada por las neuronas maduras fue menor en los individuos HTX, indicando nuevamente que la diferenciación celular se produjo más rápidamente en este grupo. Cabe señalar que el fondo de tinción excesivo no permitió la cuantificación de neuronas positivas para DCX.

Se observó un efecto similar pero más leve en el GD, ya que el número de neuronas NeuN-positivas fue mayor en los animales HTX, mientras que la inmunotinción para las neuronas inmaduras (DCX-positivas) fue menor, sugiriendo nuevamente que la suplementación materna con HTX induce un proceso de diferenciación neuronal más rápido también en el GD.

Después del nacimiento, las diferencias entre los grupos para la inmunotinción de NeuN y DCX tendieron a ser menores y desaparecieron por completo a los 6 meses de edad, de manera similar a lo que sucedió con el perfil de neurotransmisores. Es decir, es necesaria la presencia continua de HTX para

que se produzcan sus efectos, aunque otra posibilidad sería que los efectos de HTX fuesen específicos para esta fase del desarrollo del hipocampo.

Nuestro estudio no incluyó un análisis del comportamiento de los animales, por lo que no es posible concluir acerca de las implicaciones funcionales de los cambios observados. Aun así, se ha descrito que la administración materna de HTX mejora la neurogénesis y la función cognitiva en la descendencia de ratas con estrés prenatal [160].

También es interesante remarcar que el marcaje de CA1 se observó de nuevo a los 6 meses de edad en los grupos CTRL y HTX, lo que indicó que la neurogénesis en esta área se produce en animales cuando ya son adultos [190].

En contraste con los efectos metabólicos y el estado antioxidante del plasma [172], [173], no se observaron efectos del HTX dependientes del sexo cuando se analizaron los neurotransmisores y el desarrollo del hipocampo.

3. Efectos del HTX sobre el proteoma del hipocampo.

Por último, dado que los efectos del tratamiento con HTX se observaron solo en los fetos de 100 días y no en edades postnatales, se realizó un experimento proteómico para determinar realmente el efecto de la suplementación materna con HTX en el proteoma del hipocampo de los fetos de 100 días de edad.

Los resultados obtenidos indicaron que el HTX producía muy pocos cambios en el proteoma del hipocampo, ya que solamente se identificaron 11 DAP utilizando como criterios de selección un p -valor ajustado menor de 0,05 y un FC de 1,5. Este resultado indica que el HTX cambia el estado redox de las células, pero no cambia de manera sustancial las proteínas que las forman.

De las 11 DAP identificadas, tres de ellas (ECHDC1, TXNDC5, NRG1) eran más abundantes en los fetos cuyas madres habían sido suplementadas con el HTX.

La ECHDC1 es la enzima etilmalonil-CoA descarboxilasa, y se encarga de descarboxilar el etilmalonil-CoA, un metabolito potencialmente tóxico, para formar butiril-CoA [191]. La TXNDC5 es una tiorredoxina, una proteína del retículo endoplásmico con actividad reductora, y su expresión es inducida por condiciones como la hipoxia para así proteger a las células de la apoptosis [192]. La proteína neurogranina (NRG1) se expresa en las espinas dendríticas del cerebro y actúa como mensajero en las cascadas de señalización de la proteína quinasa C durante la sinapsis [193]. Que esta última proteína esté aumentada en el grupo HTX se puede relacionar con los resultados obtenidos con las IHQ, ya que se vio que con el HTX había más neuronas maduras, y por lo tanto se podría trasladar a una mayor actividad sináptica.

En resumen, las proteínas que se vieron aumentadas por la suplementación con el HTX tienen un efecto detoxificante y protector de las células, y están implicadas en formación de sinapsis, lo que sugiere un posible mecanismo para el potencial neuroprotector del HTX.

Referente a las proteínas que estaban disminuidas en los fetos cuyas madres estaban suplementadas con el HTX se encontraron 8 DAP (HSPE1, TARS1, FAU, RPL7A, RPL36, RPL7, HADHA, RBMX). El nodo principal (**Figura 36**) estaba compuesto por cuatro proteínas ribosomales: FAU (*40S ribosomal protein S30*), RPL7A, RPL36 y RPL7, que forman parte tanto de la subunidad 40S como de la 60S.

Las proteínas ribosomales están involucradas en la síntesis proteica. Si hay una disminución de estas proteínas podría sugerir que hay una menor síntesis proteica en el hipocampo, tal vez innecesaria en este caso en que la diferenciación celular prevalece sobre la proliferación. Se puede especular que,

si este efecto se trasladara a otros tejidos y órganos, podría explicar el hecho de que los fetos HTX tuvieran un peso inferior a los fetos CTRL (**Tabla 8**). Vázquez-Gómez et al. [149] evaluaron los pesos relativos de diferentes órganos y describieron que los animales del grupo HTX tenían pesos relativos más bajos de la cabeza y del cerebro en comparación a los animales del grupo CTRL. Como ya indicaron los autores, este fue un resultado inesperado, y lo corroboraron en 2019 con otro estudio [146] donde describieron los cambios en el peso corporal desde el destete (a los 25 días de edad) hasta los 180 días, y vieron que el grupo HTX tenía menor peso corporal que el grupo CTRL hasta los 60 días. A partir de los 60 días el grupo HTX tuvo mayor peso corporal que el grupo CTRL.

HSPE1 es una *heat shock protein* implicada en la importación de proteínas mitocondriales y en el ensamblaje macromolecular. Además, previene el plegado incorrecto y promueve el replegamiento y el ensamblaje adecuado en condiciones de estrés en la matriz mitocondrial [194]. Este hecho puede estar ligado a la disminución de la síntesis proteica y a una necesidad menor de mecanismos de corrección de errores.

Otras proteínas que se encontraron disminuidas en los animales suplementados con HTX fueron: **TARS1**, una enzima que cataliza la unión del aminoácido treonina al tRNA [195]. **RBMX** es una proteína de unión al RNA regula los procesos pre- y post-transcripcionales, y también forma parte del *spliceosoma* regulando el *splicing* del mRNA [196]. Estas dos proteínas están relacionadas con el metabolismo y la síntesis de proteínas, lo que podría reforzar la disminución de las proteínas ribosomales. **HADHA** forma parte de un complejo enzimático llamado proteína trifuncional mitocondrial, que es esencial para la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga ya que cataliza los tres últimos pasos de la beta-oxidación [197]. Es posible especular que la disminución de síntesis de proteínas suponga una necesidad menor de energía, y por tanto también una menor degradación de ácidos grasos.

Discusión

De todos modos, se necesitan más estudios para confirmar la variación de estas proteínas y analizar qué efectos pueden acarrear estas diferencias.

En conclusión, nuestros resultados mostraron claramente que los efectos del HTX sobre los parámetros cerebrales están restringidos al período prenatal, ya que solo se observaron en los fetos de 100 días, concomitantemente con el período de suplementación materna. Estos efectos no se extendieron después del nacimiento, ya que no se observaron diferencias importantes entre el grupo CTRL y el grupo suplementado con HTX en los cerdos de 1 mes y 6 meses de edad, indicando que se necesita la presencia continua del HTX para mantener sus efectos en el cerebro. No obstante, son necesarios más estudios sobre los efectos del HTX sobre la neurotransmisión y específicamente en el hipocampo dada la importancia de esta área del cerebro para la prevención de enfermedades neurodegenerativas. Igualmente, sería muy interesante complementar estos estudios con análisis del comportamiento.

Estudio 2. Efecto de la suplementación materna con el antioxidante hidroxitirosol en el cerebro de fetos de 100 días de gestación afectados por la IUGR.

Dado que los efectos de la suplementación materna con el HTX sobre la neurotransmisión y la morfología del hipocampo se observaron solo en los fetos de 100 días, y no en los cerdos de 1 mes y de 6 meses, decidimos evaluar si los efectos de HTX estaban influenciados por el peso corporal de la descendencia al nacer, es decir, si el HTX afectaba de modo distinto a los fetos LBW (afectados por la IUGR) en comparación con los fetos NBW.

1. Efectos de la IUGR sobre el perfil de neurotransmisores en varias áreas del cerebro.

Respecto a los niveles de neurotransmisores, no se observó un efecto de la IUGR, ya que no había diferencias entre los individuos NBW y LBW, en ninguna de las tres áreas estudiadas (amígdala, corteza prefrontal e hipocampo) cuando se analizó solamente el efecto del peso.

Aun así, en el hipocampo se observó una interacción entre el efecto del tratamiento con HTX y la IUGR. En la comparación por pares, se encontraron concentraciones más elevadas de 5-HT y 5-HIAA, y por lo tanto de indolaminas, en los fetos LBW que en los fetos NBW solamente en el grupo CTRL.

Por lo tanto, el peso corporal al nacer afectó principalmente la vía serotoninérgica en el hipocampo. Existe una creciente evidencia que apunta que las indolaminas, especialmente la 5-HT, son cruciales para la modulación de los procesos del neurodesarrollo, y por lo tanto en el desarrollo del cerebro fetal [198]. Así, se ha descrito que los cambios en el sistema serotoninérgico durante las etapas prenatales pueden contribuir a una alteración del desarrollo fetal a través de mecanismos de programación fetal y a un mayor riesgo de enfermedades psiquiátricas durante la infancia y la edad adulta [199]. Durante la vida postnatal, las indolaminas están principalmente involucradas con

aspectos importantes como la ingesta de alimento, el estado de ánimo y las interacciones sociales [200]. De manera similar a nuestros resultados, otros autores también han descrito que la IUGR aumenta significativamente los niveles de 5-HT y de su metabolito 5-HIAA, afectando la vía serotoninérgica en modelos animales de roedores [201], [202].

Es posible que las escasas diferencias observadas en los niveles de neurotransmisores entre los fetos LBW y los fetos NBW esté relacionada con el crecimiento asimétrico y la priorización del desarrollo del cerebro durante la IUGR. En cualquier caso, las alteraciones en la concentración y el metabolismo de las indolaminas en el sistema límbico (principalmente en el hipocampo) pueden comprometer una función neural adecuada. Específicamente, en humanos, se ha encontrado que individuos con LBW presentan una mayor incidencia de trastornos de comportamiento relacionados con la movilidad, la cognición, la memoria y las funciones neuropsicológicas [203], [204].

Estas diferencias debidas al peso corporal al nacer desaparecieron en el grupo cuyas madres fueron tratadas con HTX, indicando que el efecto causado por la IUGR sobre las indolaminas desaparecía cuando se producía la suplementación materna con HTX.

Por otro lado, el tratamiento de las madres con HTX afectó principalmente a la vía dopaminérgica en el hipocampo, como se había observado previamente, y eso podría estar relacionado con el hecho de que el metabolismo de la DA es una fuente importante de producción de ROS intracelulares, como se ha comentado en el apartado anterior [174]. HTX tiene una potente capacidad de eliminación de ROS y puede inducir varios sistemas enzimáticos antioxidantes en la célula y mantener altos niveles de glutatión reducido [161], [180]. Otras posibilidades serían los efectos del HTX sobre mecanismos enzimáticos que actúan sobre las enzimas de fase II, COMT u otras enzimas relacionadas con la DA, como se ha discutido en el estudio anterior.

2. Efectos de la IUGR en el desarrollo del hipocampo.

El hipocampo está relacionado con procesos de memoria, funciones cognitivas, capacidades de aprendizaje y habilidades motoras, que son esenciales para el desarrollo neurológico normal [188]. Por tanto, el segundo objetivo de este trabajo fue estudiar mediante marcadores inmunohistoquímicos los cambios inducidos en el hipocampo por la IUGR en fetos de 100 días de edad y el efecto de la suplementación de la dieta materna con HTX.

Varios estudios señalan que el hipocampo es muy vulnerable a la hipoxia, la desnutrición y la alteración del suministro de micronutrientes, lo cual está presente en la IUGR [66]. Dada la vulnerabilidad del hipocampo a las condiciones asociadas con la IUGR, la hipótesis de este trabajo fue que el desarrollo del hipocampo se vería afectado por el IUGR en los fetos LBW. Para ello, mediante distintos marcadores neuronales se estudió la estructura del hipocampo, sus componentes, la distribución neuronal y su relación con los efectos de la IUGR.

Como se ha comentado anteriormente (**Figura 89**), en el hipocampo las neuronas piramidales del CA se originan en la segunda mitad de la vida embrionaria. Los neuroblastos en multiplicación migran desde la zona ventricular a su región objetivo final. Las futuras neuronas CA1 forman filas de células perpendiculares a la capa germinal ventricular. Por otro lado, la generación de células granulares en la DG comienza en la mitad de la gestación, pero continúa durante mucho tiempo en el período posnatal y, en un nivel reducido, hasta la edad adulta [205].

Los resultados obtenidos gracias al marcaje de NeuN y de la proteína de los neurofilamentos (NFT), ambos marcadores de neuronas maduras, permitieron ver que había un déficit neuronal en las áreas CA1 y GD de los fetos afectados por la IUGR (LBW), y que las neuronas existentes presentaban cambios en la morfología de los cuerpos neuronales, de las dendritas y de los axones, así

como una alteración de la conectividad entre neuronas. Se encontró un número menor de neuronas positivas a NeuN en fetos LBW, indicando que la diferenciación celular avanzaba más lentamente en estos animales que en los animales NBW. Además, mediante el marcaje de DCX, se observó que los fetos LBW presentaban una mayor cantidad de neuronas inmaduras y de apariencia desorganizada que los fetos NBW. Este resultado era lo inverso a lo visto con los anteriores marcadores.

Al comparar estos animales según el tratamiento materno con HTX, se observó que aquellos animales con peso LBW y cuyas madres habían recibido HTX mostraban un mayor número de neuronas NeuN positivas volviéndose más similares a los animales NBW. Además, el tratamiento materno con HTX disminuyó el número de neuronas DCX positivas de los animales LBW, volviéndose más similar a los animales NBW. Por lo tanto, el tratamiento de las madres con HTX revirtió los efectos de la IUGR en el hipocampo.

En conclusión, nuestros resultados indicaron que el proceso de maduración del hipocampo era más lento en los fetos LBW, los cuales presentaban un menor número de neuronas maduras, una mayor cantidad de neuronas inmaduras y menor número de sinapsis, presumiblemente asociado a una menor actividad sináptica. Se ha descrito que, cuando se forman las células precursoras de neuronas, éstas expresan la proteína DCX siendo un marcador de neuronas inmaduras. Una vez reciben una señal sináptica, extienden las dendritas y los axones y expresan una serie de marcadores de neuronas maduras (por ejemplo, NeuN) [190]. Los cambios observados en los fetos LBW son especialmente relevantes en el GD, un área de generación de nuevas neuronas de forma continua a lo largo de toda la vida del individuo (neurogénesis) [35], [206].

Los resultados presentados en este estudio confirman los descritos previamente en la bibliografía. Hay estudios de resonancia magnética en

humanos que confirman que el hipocampo es susceptible a la IUGR, mostrando un volumen reducido en periodos neonatales [66]. Debido a la relevancia del correcto desarrollo del hipocampo y su importante papel en diversas funciones [207], [208], nuestros resultados apoyan otros estudios de investigación que indican que los cambios morfológicos observados en los individuos afectados por la IUGR pueden afectar al desarrollo neurológico, y estar asociados a defectos en la función cognitiva, como la memoria y el aprendizaje en humanos o modelos animales [61], [89], [160]. Además, se ha descrito que la IUGR puede afectar el volumen y el número de neuronas [89], [209] así como la neurotransmisión [210], alterando así el desarrollo del hipocampo.

En un modelo porcino similar al nuestro, se encontró que el cerebro de los lechones con IUGR tenían menos células NeuN-positivas en la corteza parietal, junto con otras alteraciones que afectaban la morfología glial, daño neuronal, alteración de la materia blanca, e inflamación [162]. Del mismo modo, hay estudios con roedores que demuestran que la IUGR afecta al número total de neuronas piramidales en CA1 [211], y que las neuronas supervivientes presentan una morfología axonal y dendrítica anormal, así como alteración de la conectividad entre ellas [212], [213].

Por último, los resultados indicaron que el HTX puede contrarrestar el efecto de la IUGR. La suplementación materna con HTX provocó un aumento en el número de neuronas positivas para NeuN y una disminución en el número de neuronas positivas para DCX en los fetos LBW, por lo que parecían más similares a los fetos NBW. En los fetos NBW el HTX causó efectos más leves, que se observaron solo como una disminución significativa en el tamaño de los núcleos celulares en las muestras teñidas con NeuN. Es decir, los efectos de la suplementación materna con HTX afectan a los fetos NBW y LBW de la misma manera, pero los efectos son más significativos en los fetos LBW. Por lo tanto, el tratamiento de las madres con HTX limitó los efectos de la IUGR en el hipocampo de los fetos LBW. Como consecuencia, las diferencias observadas entre los fetos

NBW y los LBW en el grupo CTRL desaparecieron o eran más débiles cuando se comparaban los grupos HTX-NBW y HTX-LBW. Aunque en este trabajo no se han llevado a cabo análisis funcionales, esto concuerda con estudios que indicaron que la administración materna de HTX mejora la neurogénesis y la función cognitiva en la descendencia de ratas con estrés prenatal [161].

En conclusión, los resultados indicaron que las condiciones de la IUGR modificaron el perfil de neurotransmisores en los fetos, así como el desarrollo del hipocampo evaluado con marcadores moleculares que permitieron la identificación de neuronas inmaduras y maduras. El tratamiento de las madres con la suplementación de la dieta con HTX pudo revertir estos cambios, llevando ambas características a valores más similares a los fetos NBW.

Por lo tanto, los resultados apoyan la utilidad de la suplementación materna con el antioxidante HTX para mejorar el desarrollo prenatal en un modelo porcino con IUGR, ya que los resultados mostraron claramente que los efectos durante la gestación no se limitan al rendimiento o las características metabólicas, sino que se extienden al desarrollo del encéfalo.

Capítulo 2. Efectos de una dieta alta en grasas en el metabolismo y en el sistema nervioso central de animales de 1 año en un modelo porcino de IUGR.

El estado nutricional y metabólico de la madre se considera determinante para el crecimiento fetal, ya que los sustratos administrados al feto tanto en animales como en humanos son el principal factor ambiental que regula el crecimiento fetal. La nutrición eficiente depende de niveles adecuados de sustrato y requiere un flujo sanguíneo fetal-placentario normal; cualquier desequilibrio perjudica la entrega de sustratos, comprometiendo importantes mecanismos que regulan el desarrollo normal y conduce a la restricción del crecimiento intrauterino.

La IUGR se está convirtiendo en un tema de mayor relevancia en los países desarrollados, debido a su relación con las enfermedades metabólicas y sus potenciales implicaciones neurológicas. Como se ha comentado en el capítulo anterior, debido a la IUGR el feto adapta su metabolismo y fisiología para sobrevivir. La principal adaptación es el "*brain-sparing*", que prioriza el desarrollo del cerebro, pero no garantiza su desarrollo normal. A su vez, esta adaptación conduce a otras alteraciones sistémicas que afectan el metabolismo energético, induciendo así la aparición de un fenotipo bastante caracterizado denominado "fenotipo ahorrativo" (la hipótesis de Barker comentada en la Introducción). Este fenotipo es responsable de las alteraciones metabólicas que se prolongan hasta la edad adulta, aumentando así la incidencia de algunas enfermedades como la diabetes y el síndrome metabólico. Aprender más sobre este tema podría traducirse en nuevos enfoques preventivos o terapéuticos para limitar o incluso eliminar los efectos patológicos producidos por la IUGR a largo plazo.

A diferencia del estudio del capítulo anterior, en este estudio no se produjo una restricción calórica en las cerdas durante el tercer trimestre de gestación. La inducción de la restricción que tuvieron los animales durante su

desarrollo fetal, y por lo tanto el origen de la IUGR, fue solamente placentaria. El cerdo es un buen modelo animal también para este tipo de IUGR debido a que, al tener camadas numerosas, el nacimiento espontáneo de animales con bajos pesos (afectados por la IUGR) es frecuente. Al igual que en el modelo anterior, los animales NBW y LBW nacieron de las mismas madres, evitando así el efecto de la madre en la evaluación estadística de los resultados. Es por eso por lo que no se esperaban grandes cambios debido a la IUGR, ya que la restricción aplicada no fue tan agresiva como en el modelo anterior.

Utilizando este modelo porcino de IUGR, los animales se clasificaron según su peso al nacer en NBW o LBW. Nuestra hipótesis era que aquellos animales que fueron afectados por la IUGR durante la gestación, y por lo tanto nacieron LBW, tendrían una mayor susceptibilidad a una dieta alta en grasas (HFD), en comparación a los animales NBW, cuando tuvieran un año. Por lo que, el objetivo de este estudio fue dilucidar los efectos de una dieta HFD en un modelo porcino de IUGR para así estudiar sus efectos metabólicos, y en tres aspectos del desarrollo del cerebro: el estudio de los niveles de neurotransmisores en diversas áreas del encéfalo, el análisis morfológico y el análisis proteómico del hipocampo.

El estado nutricional y la ingesta dietética adecuados son esenciales para el correcto funcionamiento del cerebro. Las emociones, el comportamiento, los procesos cognitivos, las funciones neuroendocrinas y la plasticidad sináptica pueden verse afectados por una ingesta nutricional excesiva con un posible resultado perjudicial para la fisiología neuronal. Concretamente, el consumo de una dieta HFD y la consecuente obesidad está relacionada con déficits cognitivos, demencia y un mayor riesgo de enfermedades neurodegenerativas, al exacerbar la inflamación cerebral y acelerar el envejecimiento cerebral [214]–[216].

Estudios previos con roedores sugirieron que una dieta HFD a menudo puede inducir alteraciones de comportamiento, como déficits de aprendizaje y

memoria, y comportamientos similares a la ansiedad [217]–[221]. Una cosa a tener en cuenta es que los efectos negativos de la HFD varían según el porcentaje de grasa en la dieta, la edad, la raza, el sexo y el estado de las hormonas gonadales [222]–[224].

1. Efectos de la dieta HFD sobre la IUGR en el perfil bioquímico.

En primer lugar, se analizó el perfil bioquímico plasmático de los animales. El principal efecto observado fue sobre los niveles de triglicéridos y de colesterol, que como era de esperar fueron más elevados con la dieta HFD. Además, también se alteraron las enzimas antioxidantes, habiendo un aumento de la actividad GPx, y una disminución de la actividad de SOD. Sin embargo, la dieta HFD afectó de distinta forma a los animales NBW y a los animales LBW, ya que todos estos efectos solo se observaron en los animales NBW, mientras que sorprendentemente no hubo diferencias en los animales LBW en los que, a pesar de la dieta HFD, disminuyó la concentración plasmática de triglicéridos.

Aun así, hay estudios que confirman nuestros resultados. Bol et al. realizaron un estudio en ratas a las que aplicaron una restricción de la dieta durante la gestación, concretamente una dieta baja en proteínas, y una vez nacieron los animales se les administró una dieta HFD. Los resultados que obtuvieron es que estas ratas presentaban triglicéridos plasmáticos inferiores con la dieta HFD en comparación con los animales alimentados con pienso estándar, y no observaron diferencias significativas en los ácidos grasos libres plasmáticos entre los grupos [225].

Una posible explicación de estos resultados es que según la hipótesis del fenotipo ahorrativo los animales LBW tienden a almacenar los lípidos que reciben de la dieta, captándolos hacia los tejidos y por tanto disminuyendo su concentración plasmática. En cambio, en los animales NBW esto no sucede, y por tanto estos últimos presentan niveles más elevados de triglicéridos en plasma.

Estudios realizados con ratas demostraron que la dieta HFD aumentó el apetito y la acumulación de grasa en las ratas nacidas con IUGR como consecuencia de la malnutrición materna [226]. A pesar de ello, también observaron una disminución del peso corporal en los animales con IUGR incluso en aquellos animales alimentados con una dieta enriquecida con alto contenido de grasas y/o azúcar en el período posnatal [227]–[229]. Esta observación concuerda con los resultados obtenidos en este estudio (**Tabla 22**), donde los animales LBW que habían recibido la dieta HFD tenían un menor peso corporal al sacrificio en comparación a los animales NBW alimentados con la misma dieta.

Estudios realizados en humanos, han indicado que los niños con IUGR también tienen una predisposición a la disminución de su peso corporal, concretamente de la masa magra, y a la acumulación de masa grasa, particularmente de la grasa intraabdominal [230], [231].

Ramos-Nieves et al. [232] analizaron el efecto de la IUGR y de la dieta grasa sobre la ingesta y la composición corporal en corderos recién nacidos. Estos autores hipotetizaron que los corderos con IUGR serían menos capaces de realizar un ajuste homeostático del apetito y el gasto energético al ofrecerles una dieta HFD y, como consecuencia, experimentarían un aumento en la acumulación de grasa. Sin embargo, la ingesta energética de los corderos con IUGR no difirió de la de los corderos CTRL durante las primeras 8 semanas de vida cuando se les administró la dieta HFD. Probablemente se deba a que el consumo de leche depende de la capacidad intestinal en los rumiantes, y no de otros factores como el apetito [233], [234]. Sin embargo, la dieta HFD provocó una mayor acumulación de grasa visceral en los animales afectados por la IUGR. La grasa visceral se asocia con inflamación, resistencia a la insulina y enfermedades futuras [235]. De igual modo, Greenwood et al. [236] también describieron que corderos con IUGR tenían un mayor contenido de grasa.

Para poder establecer una hipótesis similar faltaría relacionar la bioquímica obtenida con los resultados productivos y de comportamiento que se encargaron de obtener y analizar nuestros colaboradores en el INIA, donde se criaron los animales. Así conociendo los resultados de comportamiento de los animales (si con la dieta HFD han comido más o menos), y conociendo la composición de las distintas grasas (visceral, subcutánea o intermuscular), podríamos confirmar si los animales LBW tienen una menor concentración de triglicéridos en plasma debido a que hay una mayor captación por parte de los tejidos y redistribución de la grasa.

El tejido adiposo, órgano endocrino importante, juega un papel crucial en la homeostasis metabólica y media la regulación de los niveles de glucosa por la insulina a través de diferentes mecanismos [237]. Los efectos de la IUGR en este estudio se asociaron también con una alteración en los niveles de glucosa, ya que los animales LBW presentaban concentraciones más elevadas que los animales NBW. Esto estaría directamente relacionado con el hecho de que la HFD no provocaba un aumento en los niveles de insulina en los animales LBW en comparación con los NBW. Se ha descrito que el aumento de la adiposidad como consecuencia de un entorno uterino desfavorable para el desarrollo fetal está relacionado con un aumento de la resistencia a la insulina y la hiperglucemia en humanos [238].

Por último, los animales NBW alimentados con la dieta HFD no presentaron cambios ni para la hormona de estrés cortisol, ni para la proteína de fase aguda haptoglobina, indicando que no estaban sujetos a una situación de estrés. Por el contrario, este efecto sí que se observó en los animales LBW.

Aun habiéndose producido todas estas alteraciones, a nivel biológico no tuvieron un efecto patológico, ya que todos los valores entraron dentro de los intervalos de referencia para la especie porcina [150].

2. Efectos de la dieta HFD sobre la IUGR en el perfil de aminoácidos libres del plasma.

En cuanto a los aminoácidos libres en plasma se observó que hubo un aumento de la concentración de varios de ellos debido a la dieta HFD en comparación a los animales que habían recibido la dieta CTRL. Este efecto se vio tanto en los animales NBW como en los animales LBW, ya que no se observaron interacciones significativas entre las dos variables. Aun así, este aumento fue mayor y significativo en los animales que habían sido afectados por IUGR, y por tanto nacieron LBW. Los aminoácidos libres que presentaron concentraciones más elevadas en plasma fueron: asparagina + serina, glutamina, histidina, treonina, alanina, prolina, cisteína, fenilalanina y triptófano.

Este aumento de la concentración de aminoácidos en el plasma no puede ser debido a que se produce una mayor absorción de estos en el intestino, ya que la dieta CTRL y la dieta HFD se diferencian solamente por el porcentaje de grasa que las componen, mientras que el porcentaje de proteína es el mismo para las dos dietas.

No hay una explicación clara de porque la dieta HFD provoca el aumento de estos aminoácidos en plasma, y solo podemos especular que estos aminoácidos están implicados en el ciclo de Krebs.

Se sabe que los diez aminoácidos seleccionados se utilizan para reponer los intermediarios del ciclo de Krebs para asegurar su función continua, proceso bioquímico clave conocido como anaplerosis [239]. Por ejemplo, la asparagina se puede convertir en oxalacetato; la prolina, la glutamina y la histidina se pueden convertir en α -cetoglutarato; la alanina, la serina y la cisteína en piruvato; la fenilalanina se puede convertir tanto en fumarato como en acetil-CoA; y el triptófano y la treonina se pueden convertir tanto en piruvato como en acetil-CoA (**Figura 90**).



Figura 90. Anaplerosis y cataplerosis en el ciclo de Krebs. Las reacciones catapleróticas de la figura ilustran el vínculo de este proceso con la gluconeogénesis y la lipogénesis. Adaptada de Owen et al. (2002) [239].

Conociendo estas reacciones de anaplerosis y cataplerosis, podemos hipotetizar que debido a la dieta HFD los animales no tienen la necesidad de realizar lipogénesis ni gluconeogénesis, en comparación a los animales que recibieron la dieta CTRL. Como resultado, estos animales no tienen la necesidad de “rellenar” el ciclo de Krebs mediante reacciones de anaplerosis, lo que explicaría este aumento de los aminoácidos libres en el plasma. Xie et al. también describieron un aumento en la concentración plasmática de aminoácidos libres en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa [240].

En cuanto al sexo, el incremento de ornitina y citrulina en machos podría ser debido a que ambos compuestos son precursores de la espermina, una poliamina abundante en el plasma de los machos [241].

3. Efectos de la dieta HFD sobre la IUGR en el perfil de neurotransmisores de varias áreas del cerebro, y en los neuropéptidos del hipotálamo.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que las alteraciones neuroquímicas producidas por la IUGR (estudiadas en el estudio 2 del capítulo 1) no persisten en el tiempo, ya que no se detectaron diferencias entre los grupos NBW y LBW en estos animales de un año, lo que confirma el efecto del "*brain-sparing*". De todos modos, se debe recordar que el modelo de IUGR no es exactamente el mismo en los dos experimentos.

Por otro lado, los resultados mostraron que una dieta HFD tuvo un efecto significativo en el perfil de neurotransmisores de las áreas cerebrales estudiadas (hipocampo, amígdala, hipotálamo, cuerpo estriado y corteza prefrontal). El neurotransmisor que se vio más alterado en todas las áreas fue la 5-HT, lo que afectó a la vía de las indolaminas. Concretamente, hubo un aumento de la concentración de 5-HT debido a la dieta HFD en comparación a los animales que habían recibido la dieta CTRL, y afectó por igual a los animales NBW y a los animales LBW, ya que no se observaron interacciones significativas entre las dos variables. Aun así, este aumento fue mayor y significativo en el hipotálamo, la amígdala y el hipocampo de aquellos animales que habían padecido IUGR.

No hay estudios en la literatura en la especie porcina que relacionen el efecto de la dieta HFD con los niveles de 5-HT en las áreas cerebrales. Sin embargo, diversos estudios con roedores han descrito que los animales alimentados con una dieta HFD presentan niveles más altos de 5-HT en plasma [242]–[244]. También se han observado niveles elevados de 5-HIAA, el principal metabolito de la serotonina, en el plasma [245] y la orina [246] de humanos con obesidad.

Estudios previos de nuestro grupo utilizando el modelo porcino demostraron que una dieta HFD es capaz de alterar el perfil de

neurotransmisores en el hipocampo y el hipotálamo [247]. En el estudio de esta tesis se ha encontrado que los niveles de 5-HT son más elevados en los individuos del grupo HFD, siguiendo una tendencia similar al estudio anterior, incluso teniendo en cuenta que la edad, la raza de los animales y la dieta obesogénica utilizada en ambos estudios eran distintos.

La 5-HT regula muchas respuestas fisiológicas y de comportamiento, como se mencionó anteriormente. La función más relevante por discutir en este estudio es su papel en el control del apetito y la ingesta de alimentos, lo que a su vez afecta el peso corporal. Está descrito que la 5-HT actúa inhibiendo la ingesta [248], uniéndose a los receptores 5-HTR, que son los responsables de la transducción de esta respuesta, y están muy distribuidos por el cerebro. Como se ha descrito en la introducción de la tesis, hay 7 familias de receptores serotoninérgicos ampliamente distribuidos, por lo que cada uno puede afectar a la ingesta de alimentos de manera diferente según el área en la que actúe [14], [20], lo que significa que el efecto final causado por la 5-HT consiste en una integración de las diversas vías de señalización que activa cada receptor. El efecto anorexigénico de la 5-HT contribuiría al efecto saciante que tiene una dieta HFD.

Además, las consecuencias funcionales de la alteración del perfil de neurotransmisores pueden ser otras además de los cambios en el apetito, ya que el hipocampo y la amígdala están involucrados en muchas funciones complejas. Por ejemplo, se ha descrito que un aumento similar de 5-HT en el hipocampo de ratas alimentadas con HFD, probablemente está relacionado con una modulación de la ansiedad y el rendimiento cognitivo [249].

Existen dos niveles de control del apetito a nivel cerebral: el control homeostático, relacionado con la ingesta de alimento para cubrir las necesidades energéticas del organismo, y el control hedónico, relacionado con el apetito como fuente de placer. Las principales áreas del cerebro relacionadas con la

ingesta de alimentos son el hipotálamo (responsable del control homeostático) y el hipocampo (relacionado con el control hedónico) [250].

En el hipotálamo, la 5-HT regula el comportamiento de la ingesta de alimentos actuando sobre dos poblaciones de neuronas diferentes: neuronas orexigénicas (relacionadas con la ingesta que expresan neuropéptidos orexigénicos como NPY) y neuronas anorexigénicas (estimulan el gasto energético mediante la expresión de neuropéptidos anorexigénicos como POMC). Es capaz de inhibir las neuronas orexigénicas y activar las anorexigénicas, lo que conduce a un estado de saciedad [251]. En el hipocampo y la amígdala, la 5-HT no es tan relevante con respecto a la ingesta básica de alimentos como lo es en el hipotálamo. No obstante, regula algunos aspectos emocionales de la ingesta de alimentos como la motivación y la sensación de recompensa, es decir, la regulación hedónica del apetito [13].

Además, en el grupo de animales con dieta HFD se observó un aumento en la concentración de DA en el hipotálamo. Se considera que la DA ejerce una señal anorexigénica en el hipotálamo, por lo que está involucrada en el control homeostático de la ingesta [252]. Por lo tanto, al igual que la serotonina, la DA al actuar en el hipotálamo tiene un efecto saciante. Por consiguiente, el aumento de 5-HT y de DA en nuestro estudio indica que la dieta HFD induce un estado de saciedad en estos animales.

En referencia a los niveles de neuropéptidos se analizaron los cambios provocados por la dieta HFD en el hipotálamo, teniendo en cuenta que es el área donde se localizan estos neuropéptidos y además es responsable del control homeostático de la ingesta. No se observaron efectos significativos ejercidos por la HFD ni sobre NPY ni sobre POMC, aunque sí se detectó una disminución del péptido anorexigénico POMC en animales LBW respecto a NBW, que se observó tanto en animales sometidos a dieta control como HFD.

En el estudio realizado previamente por nuestro grupo sí que se vio que la dieta HFD es capaz de alterar los niveles de neuropéptidos en el hipotálamo [247]. Más específicamente, se observó una disminución en los niveles de NPY y un aumento en los niveles de POMC, lo que potencialmente puede conducir a un estado de menor apetito. Una cosa a tener en cuenta es que en ese estudio se utilizaron únicamente cerdas hembras. En nuestro caso, los resultados indican un efecto diferencial de la dieta HFD sobre los neuropéptidos según el sexo, siendo los machos más sensibles, mientras que las hembras siguieron la misma tendencia que en el estudio anterior, pero sin llegar a ser significativo.

Los animales del presente experimento fueron alimentados con dietas que cumplieron con sus requerimientos energéticos diarios, lo que atenuaría la necesidad de un fuerte control hipotalámico de la ingesta de alimentos.

A pesar de que los efectos específicos pueden depender de la duración y el tipo de dieta, se ha descrito generalmente que una dieta HFD disminuye los niveles de NPY en el hipotálamo, tanto a nivel peptídico como a nivel de mRNA, especialmente durante una dieta HFD prolongada [253]–[256], como la que se llevó a cabo en este estudio con modelo porcino. Por otro lado, se ha demostrado que las ratas genéticamente propensas a la obesidad alimentadas con una dieta HFD durante 2 semanas muestran un aumento en la expresión de POMC en el hipotálamo [256], [257]. En nuestro estudio, las diferencias en la concentración de neuropéptidos entre las dos dietas no alcanzaron una significancia estadística debido a una alta variabilidad interindividual.

Lo que sí se observó es un efecto de la IUGR sobre los niveles de POMC, ya que los animales LBW tenían concentraciones inferiores a los animales NBW independientemente de la dieta que recibieron. Por lo tanto, este resultado nos indicó que posiblemente estos animales no se veían saciados. Los resultados de comportamiento sobre el consumo de alimentos, de los animales NBW y LBW, nos ayudarían a confirmar esta hipótesis.

4. Efectos del sexo sobre la dieta HFD en el perfil de neurotransmisores de varias áreas del cerebro.

Por otro lado, también se ha encontrado que existe un dimorfismo sexual con respecto a los niveles de diversos neurotransmisores en la amígdala y en el cuerpo estriado debido a la dieta HFD.

Hasta la fecha, no hay mucha literatura con respecto a las diferencias en los niveles de neurotransmisores según el sexo. Los datos disponibles sobre este tema se centran en las diferencias relacionadas con la incidencia de algunas enfermedades psiquiátricas, como la depresión o la migraña [258]–[260].

La mayoría de los estudios describen que las diferencias en el metabolismo neuronal entre machos y hembras son sutiles. No obstante, estas diferencias del metabolismo neuronal se exacerban en situaciones de privación de nutrientes [261], aunque no hay datos sobre los posibles efectos contrarios, es decir, si se administra una dieta hipercalórica o HFD como en nuestro caso.

Los resultados obtenidos parecen indicar que los machos se ven más afectados por la dieta HFD que las hembras. En la amígdala se ha observado que el aumento de 5-HT debido a la dieta HFD se produce solo en los machos, mientras que no se produce en las hembras. En el cuerpo estriado se ha observado que la dieta HFD afectó a la vía dopaminérgica de los machos, ya que tenían concentraciones inferiores de los metabolitos de la dopamina (DOPAC, HVA y 3-MT), en comparación a las hembras y a los machos que recibieron la dieta CTRL, mientras que presentaban un aumento de la concentración de glutamato. Que las hembras no se vieran afectadas por la dieta respalda la hipótesis de que las neuronas femeninas tienen mejores aptitudes para su supervivencia y su desarrollo [262], [263].

Dado que las diferencias observadas no se han producido ni en el hipocampo ni en el hipotálamo, las dos áreas que principalmente regulan el apetito y se verían afectadas por la dieta, hipotetizamos que estas diferencias en

la amígdala y en el cuerpo estriado se deben principalmente al propio sexo de los animales.

Esta descrito que existen diferencias específicas del sexo en la transcripción, concentración y función de receptores de neurotransmisores pudiendo contribuir a las diferencias en el metabolismo neuronal. El mRNA del receptor de la serotonina 5-HT₁ es más elevado en ratas hembra en el hipocampo y más bajo en el hipotálamo [264], mientras que la tasa de síntesis de 5-HT es mayor en los hombres [265].

En el caso del sistema dopaminérgico, por ejemplo, en roedores adultos la sustancia negra contiene más neuronas dopaminérgicas en los machos que en las hembras [266], sin embargo, ocurre lo contrario en el ATV [267].

También es conocido que el sistema dopaminérgico contiene una alta densidad de receptores de estrógeno, lo que sugiere que las diferencias basales en la anatomía, así como los mecanismos reguladores y de liberación, son debidos a la influencia de las hormonas ováricas sobre la función dopaminérgica. Estos receptores de estrógeno se localizan en las terminales de las neuronas dopaminérgicas del estriado ventral, mientras que no se expresan en el estriado dorsal [268], [269]. Por lo tanto, las concentraciones extracelulares de DA en el cuerpo estriado varían con las etapas del ciclo estral en las mujeres [270], con niveles más altos durante el proestro y el estro (cuando las hormonas ováricas son más altas (proestro) e inmediatamente después (estro)) y niveles más bajos durante el metestro y diestro, lo que indica que los ciclos hormonales son reguladores críticos de la liberación de DA. En nuestro caso, todas las cerdas se encontraban en la misma etapa del ciclo estral, por lo que sus niveles hormonales eran similares y no influyeron en los resultados de los neurotransmisores.

Hasta la fecha, no hay mucha literatura con respecto a las diferencias de sexo en el sistema de glutamatérgico. Algunos estudios mediante espectroscopía de resonancia magnética han demostrado un ligero aumento de los niveles de

glutamato en la materia gris parietal de los hombres [271]. Sin embargo, otros estudios han demostrado que las mujeres presentan niveles más altos de glutamato en el cuerpo estriado, y el cerebelo [272], resultado contrario al que hemos observado.

5. Efectos de la dieta HFD sobre la IUGR en la morfología del hipocampo.

Posteriormente, se analizó el efecto de la dieta HFD y de la IUGR sobre el hipocampo, tanto a nivel morfológico mediante inmunohistoquímica, como a nivel proteómico.

Los lípidos, en particular, tienen efectos importantes sobre la estructura y función neuronal [273]. Se sabe que, en las enfermedades metabólicas y durante el envejecimiento, las gotitas de lípidos se acumulan en muchos órganos, incluidos el hígado, los músculos y el cerebro. Se identificaron gotitas de lípidos en regiones cerebrales meníngeas, corticales y neurogénicas correspondientes a distintos fenotipos celulares, incluidos astrocitos, células microgliales y neuronales [274].

Una región cerebral importante y crítica para la consolidación de la memoria y la recuperación es el hipocampo [188], [275], [276], una estructura que ha demostrado ser muy vulnerable a los efectos de la obesidad o la mala nutrición [277], [278]. Varios estudios demostraron que roedores con una ingesta excesiva de grasas y azúcares en la dieta durante meses sufren alteraciones en la plasticidad sináptica [279], [280], y en las tareas de memoria dependientes del hipocampo [281]–[284]. Concretamente, Yaseen et al. [285] y Khazen et al. [286] informaron que la exposición aguda a una dieta HFD durante la juventud en ratas está relacionada con un deterioro de la memoria de reconocimiento social, y está asociada con una alteración de la memoria y la plasticidad dependientes del hipocampo. Además, varios estudios han indicado que la HFD durante la juventud tiene mayor efecto negativo sobre la plasticidad

y la memoria dependientes del hipocampo en comparación con la exposición a la HFD durante la edad adulta [287]–[289].

Los resultados inmunohistoquímicos de esta tesis mostraron que la dieta HFD no provocaba efectos importantes sobre la morfología de las neuronas que forman el hipocampo en animales de un año. Parece ser que la dieta HFD, independientemente de si los animales se vieron o no afectados por la IUGR, hizo que los animales presentaran una tendencia a un mayor número de neuronas maduras en el GD, lo que indicó que la dieta no afectó a la viabilidad de las neuronas, aunque estaban más dispersas y deslocalizadas. Esto se vio reflejado en el grosor que tenía el GD, ya que, al estar más dispersas, era menor en el grupo de animales que recibieron la dieta HFD.

En referencia a CA1, no hubo un efecto significativo de la dieta a excepción del área ocupada por las neuronas. Sí que se observó un efecto de la IUGR, ya que los animales LBW presentaban un mayor número de neuronas maduras, pero éstas eran más pequeñas y dispersas que en los animales NBW. Aun así, faltaría comprobar la funcionalidad de estas neuronas, y ver si la plasticidad neuronal se ha visto afectada como indican los estudios comentados anteriormente. Este resultado es opuesto al observado en el capítulo anterior, donde los fetos IUGR mostraban un mayor número de neuronas que los fetos NBW. Es posible especular que al principio del desarrollo la IUGR afectase negativamente al número de neuronas, pero que en la edad adulta la proliferación neuronal se prolongase durante más tiempo.

De todos modos, estos resultados indican que la dieta HFD afectó de manera distinta a los animales LBW, ya que estos animales presentaron un mayor número de neuronas maduras y un menor número de neuronas inmaduras en comparación a los animales LBW que recibieron la dieta CTRL. Al igual que en el apartado del análisis neuroquímico, no hay literatura que

relacione el efecto de la dieta HFD en modelos de IUGR que explique los resultados obtenidos.

6. Efectos de la dieta HFD sobre la IUGR en el proteoma del hipocampo.

Por lo que hace referencia a los resultados proteómicos obtenidos en el hipocampo, mostraron que la IUGR o la dieta HFD por si solas no afectaron de manera relevante al proteoma del hipocampo de estos animales, pero la combinación de ambos factores demostró que los animales LBW y NBW se ven afectados de manera distinta por la dieta HFD. El *heatmap* mostrando el perfil de las proteínas reguladas en cada grupo demuestra que todos los individuos de cada grupo se agrupan en un *clúster*, y que los cuatro grupos (NBW-CTRL, NBW-HFD, LBW-CTRL y LBW-HFD) tiene perfiles de respuesta distintos (**Figura 91**).

Hay que destacar que, al igual que en los apartados anteriores, la literatura disponible sobre los cambios en el proteoma no trata los efectos de la HFD y/o la IUGR en el cerebro, sino que se centran en otros órganos metabólicos como tejido adiposo, músculo esquelético o hígado. Por tanto, este es el primer estudio que se ha realizado sobre los efectos de la dieta HFD y la IUGR en el proteoma del hipocampo.

El análisis del *heatmap* evidenció que existen diferencias entre los grupos NBW y LBW en condiciones CTRL, es decir, que la IUGR causó un efecto en el proteoma de estos animales, aunque no se viese claramente en el análisis considerando únicamente la variable peso al nacer. También quedó de manifiesto que la dieta HFD provocó cambios en el proteoma que eran similares hasta cierto punto en el grupo NBW y LBW. Es decir, el *clúster* correspondiente a los animales NBW-HFD quedaba cercano al *clúster* LBW-HFD.

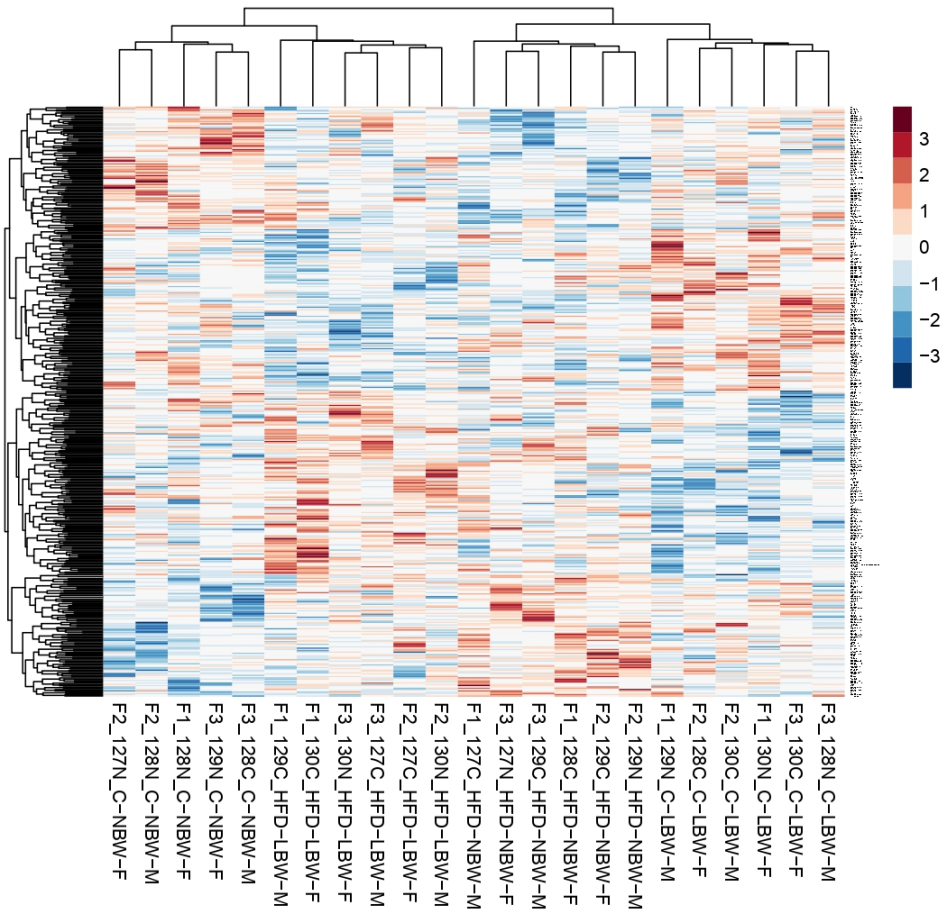


Figura 91. Heatmap del patrón de las DAP en las comparaciones CTRL-LBW versus HFD-LBW y CTRL-NBW versus HFD-NBW. El color indica el cambio diferencial de las DAP, en rojo *up* aumenta en los animales CTRL respecto los HFD, en azul *down* disminuye en los animales CTRL respecto los HFD.

De todos modos, también quedó claro que la respuesta de los animales NBW y LBW a la HFD no fue la misma. En los animales **NBW** (no afectados por la IUGR), se pudo observar que la dieta HFD afectó principalmente a proteínas involucradas en el metabolismo, como era de esperar. Aumentó la abundancia tanto de proteínas de la cadena respiratoria como de componentes de la matriz extracelular, y disminuyó la abundancia de proteínas involucradas en la maduración del RNA, mientras que tuvo un efecto variable sobre proteínas relacionadas con la síntesis proteica.

La cadena de transporte de electrones tiene lugar en las mitocondrias y está formada por complejos de proteínas que acoplan reacciones redox, produciendo ATP mediante la fosforilación oxidativa. El problema es que como un subproducto de la respiración celular también se genera ROS [290].

A diferencia de nuestros resultados, está descrito que el consumo de una HFD reduce la expresión de genes implicados en la oxidación mitocondrial en el músculo esquelético [291] y en el tejido adiposo [292]. Además, también se ha demostrado que el consumo prolongado de una dieta alta en grasas en ratones reduce la capacidad mitocondrial del músculo esquelético [293]. Aunque estos resultados sean contradictorios a los obtenidos, hay que señalar que las particularidades metabólicas de estos tejidos son muy diferentes de las del cerebro, y que estos estudios se realizaron con animales diabéticos o prediabéticos, con resistencia a la insulina. Está descrito que la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 se asocian con un deterioro de la función mitocondrial en varios tejidos [294]–[296], así, como una disminución de la expresión génica de las proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial [297]–[299]. Nuestros animales no presentaban resistencia a la insulina, ya que no eran hiperglucémicos, y es esperable que haya un aumento de las proteínas de la cadena respiratoria, ya que si hay un mayor aporte de grasas hay más sustratos metabólicos con los que obtener energía.

Por otro lado, los resultados indican que la composición de la matriz extracelular es distinta con la dieta HFD en los animales NBW. Así, incrementó la Agrina, una glicoproteína que induce la formación de filopodios y sinapsis en neuronas hipocampales [300]. También incrementaron la proteína Integrina- $\alpha 2$, una de las subunidades alfa de las integrinas, que interviene en el mantenimiento del citoesqueleto [301]; y la proteína Parvin, que interviene en la señalización de las integrinas a través de la *integrin-linked protein kinase* (ILK) para modular la adhesión, la propagación y la migración celular [302]. Además, también aparecen incrementadas proteínas extracelulares, como un tipo de

colágeno (COL4A1) y SPARCL1, una proteína con capacidad para interactuar con ligandos como diversos colágenos [303]. Los colágenos también son ligandos para las integrinas, por lo que aparece un nódulo de señalización que podría estar activado en neuronas de los animales NBW.

En un estudio realizado en individuos a los que administraron una infusión de lípidos se observó, en el músculo esquelético, un aumento de mRNA de múltiples genes relacionados con la matriz extracelular, incluidos los colágenos, fibronectina, proteoglicanos, laminina, metaloproteinasas de matriz, inhibidor tisular de metaloproteinasas y miembros de la familia de las trombospondinas [304].

Respecto a los animales **LBW**, que estaban afectados por la IUGR, la dieta HFD afectó principalmente a proteínas involucradas en el *splicing* del mRNA, en el transporte vesicular de Golgi y en la vía mTOR. También como era de esperar afectó a proteínas involucradas en el metabolismo.

El *splicing* del mRNA es un mecanismo importante que aumenta la complejidad del transcriptoma [305], [306] y expande la diversidad y función del proteoma, concretamente contribuyendo a la especialización de diferentes tipos celulares dentro del organismo [307], [308]. Desafortunadamente, aunque se han estudiado ampliamente las alteraciones en la expresión génica de distintos órganos en respuesta al consumo excesivo de nutrientes, hasta donde sabemos, hay pocos estudios que analicen el efecto de la HFD sobre el *splicing* del mRNA, y aun menos en el sistema nervioso central. Recientemente, se ha descrito que la HFD induce en el hipotálamo la formación de nuevos *sites* de poliadenilación, una característica que dicta el destino de moléculas de RNA recién sintetizadas e influye en su *splicing* alternativo [309]. Por otro lado, se ha descrito que la HFD puede modificar el *splicing* de la proteína Tau, implicada en la enfermedad de Alzheimer [310], cuyo riesgo también se ha relacionado con el consumo crónico de dietas ricas en grasas [311].

Estudios con adultos han asociado la diabetes tipo 2 con la enfermedad de Alzheimer, ya que se ha descubierto una relación entre las características de la resistencia a la insulina con la hiperfosforilación de los microtúbulos asociados a la proteína Tau [312], [313]. Dicha hiperfosforilación es necesaria para la formación de ovillos neurofibrilares que comienzan a iniciar la acumulación extracelular de proteína amiloide que finalmente forma placas que destruyen las neuronas, lo que conduce a las características clínicas de la enfermedad de Alzheimer [314], [315].

Es interesante especular que el bajo peso al nacer producido por la IUGR y sus consecuencias metabólicas puedan ser una variable que introducir al valorar el riesgo de padecer esta enfermedad. En este sentido, se ha propuesto que diversos factores que influyen en los periodos prenatales y perinatales pueden tener consecuencias en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas en el adulto [316], [317].

mTOR es un regulador central de la homeostasis celular que integra señales ambientales y de nutrientes para controlar el crecimiento, la proliferación, el metabolismo y la supervivencia celular. Extensos estudios sobre mTOR han resaltado la importancia de este complejo proteico en la regulación de una amplia gama de funciones metabólicas. Se ha demostrado que la señalización de mTOR controla casi todos los procesos celulares fundamentales, como la síntesis de nucleótidos, proteínas y lípidos, la autofagia y la apoptosis. Una desregulación de esta vía se asocia frecuentemente con enfermedades, como cáncer, enfermedades metabólicas y trastornos cardiovasculares y neurodegenerativos [318], [319].

En los animales, las señales de mTOR se rigen en gran medida por la ingesta dietética de nutrientes, incluidos glucosa y aminoácidos, y los factores de crecimiento, por lo que su actividad es estimulada por la alimentación e inhibida por el ayuno [320], [321].

Recientemente, mTOR ha surgido como una molécula de señalización clave en la regulación de la entrada a un estado hipometabólico (depresión metabólica) como estrategia de supervivencia adaptativa para muchos animales en respuesta a entornos desfavorables, como exposición a temperaturas altas o bajas prolongadas, disponibilidad limitada de alimentos o agua, y falta de oxígeno [319], [322], [323]. Este sería el caso también de los individuos sometidos a IUGR. Se ha descrito que la IUGR provoca una inactivación de la vía mTOR en la placenta y el feto [324]. Una de las dianas principales de mTOR es la proteína S6 quinasa (responsable de la fosforilación de la proteína ribosomal S6, que conduce a la activación de la síntesis de proteínas en el ribosoma) [325]. La inactivación de mTOR durante la IUGR sería un mecanismo principal en la disminución del peso fetal.

En nuestro caso, observamos en los animales LBW con una dieta HFD una activación de la vía metabólica regulada por mTOR, que sería consecuencia del fenotipo ahorrativo (hipótesis de Barker). Aunque los animales ya no se ven en la necesidad de estar en un estado hipometabólico porque comen diariamente, su metabolismo está siempre en alerta y favorece las reacciones anabólicas en presencia de nutrientes. Como se ha descrito en la Introducción, este hecho está bien caracterizado en cuanto al metabolismo de grasas y glúcidos. Nuestros resultados indican que también puede extenderse al metabolismo de proteínas.

Por último, también se vieron afectadas proteínas responsables del transporte vesicular en Golgi. *In vitro*, algunas neuronas en condiciones adversas recurren a un sistema de supervivencia a través de la formación de vesículas lipídicas a partir de la membrana celular y su oxidación lipídica para obtener energía, mientras que otras neuronas catabolizan proteínas sometidas a procesos de autofagia [326], [327]. La adaptación metabólica y la abundancia de proteínas implicadas en el transporte asociado a vesículas sugieren que este también puede ser el caso *in vivo*. Por eso, debido a que las neuronas de los animales que han recibido la dieta HFD no se ven con la necesidad de formar

Discusión

vesículas lipídicas para obtener energía, se modifica el metabolismo de las células, y esto se ve reflejado en cambios en los procesos que controlan la secreción de proteínas y el tráfico de membranas. Estos cambios en la dinámica del procesamiento de proteínas en los orgánulos subcelulares como el retículo endoplasmático y Golgi pueden estar relacionados con el incremento de proteínas implicadas en la glicosilación de proteínas (GFPT1, GMPPA, PMM1), que aparecen bajo el epígrafe "Metabolismo" en la **Tabla 39**.

Como conclusión de este estudio pudimos establecer que, aunque los animales ya eran adultos (tenían un año), aquellos que se vieron afectados por la IUGR durante su gestación respondieron de manera diferente a la dieta HFD.

Capítulo 3. Evaluación de la suplementación de triptófano en dietas con lacto reemplazantes en terneros lactantes.

La suplementación del lacto reemplazante (MR) con aminoácidos es un tema importante en la nutrición de pre-rumiantes. En este estudio se analizó el impacto de la suplementación del MR con el aminoácido Trp, precursor de la 5-HT, un neurotransmisor que participa en el control del estado anímico del animal. El objetivo era comprobar si la adición de Trp a la dieta era capaz de mejorar el bienestar de los terneros, controlando sus posibles efectos bioquímicos. Se evaluaron los efectos de la suplementación del MR con Trp a una dosis de 4,5 g/día sobre parámetros de rendimiento y de comportamiento, y el perfil bioquímico y de aminoácidos sanguíneo después de alimentar a los terneros con MR control o suplementado con Trp hasta el destete.

La concentración plasmática de Trp 3 horas después de la alimentación matutina fue mayor en el grupo suplementado con TRP en comparación con los animales CTRL, lo que indica que el Trp fue absorbido fácilmente por el intestino. Sin embargo, el aumento de la absorción de Trp no garantiza un aumento de la absorción de Trp por parte del cerebro, ya que depende de la concentración plasmática de Trp en relación con los otros aminoácidos neutros grandes (LNAA; Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, His, Trp, Met, Thr) [176]. En el presente estudio, se observaron concentraciones séricas similares de Trp y LNAA antes de la alimentación matutina, pero la concentración sérica de Trp y la relación Trp/LNAA aumentaron en TRP en comparación con los terneros CTRL 3 horas después de la alimentación matutina, lo que podría haber potenciado la captación de Trp de la sangre a través de la barrera hematoencefálica.

Además de la síntesis de 5-HT, una gran parte del Trp de la dieta se dirige hacia la vía de la Kyn a través de la acción de la enzima TDO en el hígado, y de la enzima indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) en otros tejidos, principalmente en células del sistema inmunológico y del cerebro (**Figura 92**). La vía de la Kyn

produce muchos metabolitos biológicamente activos, y su degradación culmina en la generación de cofactores redox oxidados NAD(P)^+ y sus formas reducidas NAD(P)H , una importante fuente de energía celular [328], [329].

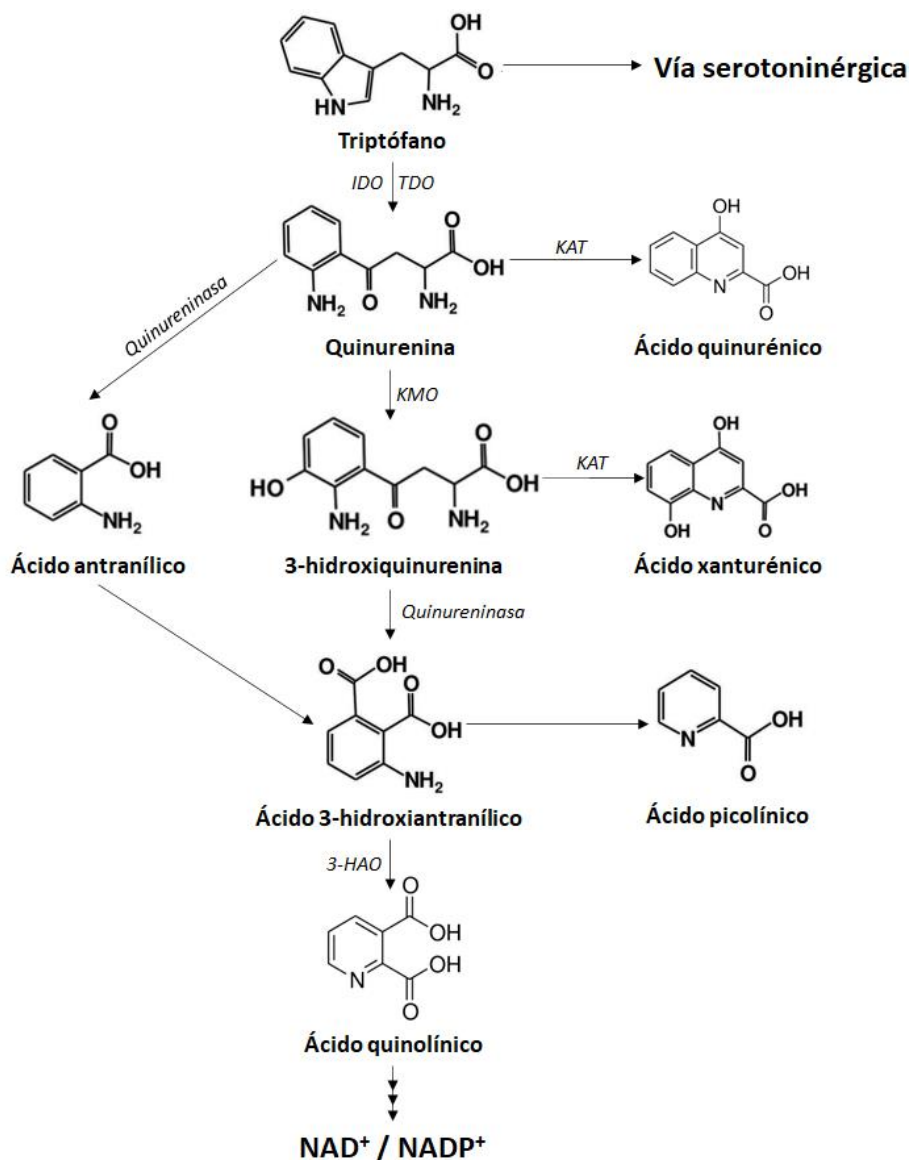


Figura 92. Vía metabólica de la quinurenina de la degradación del triptófano. 3-HAO, 3,4-dioxigenasa del ácido 3-hidroxiantranílico; IDO, indolamina 2,3-dioxigenasa; KAT, quinurenina aminotransferasa; KMO, quinurenina monooxigenasa; QPRT, quinolinato fosforribosiltransferasa; TDO, triptófano 2,3-dioxigenasa. Adaptada de Savitz et al. (2019) [329].

El cálculo de la relación Kyn/Trp es indicador del destino metabólico del Trp, y cambios en esta proporción se han relacionado con la función cerebral y los trastornos neuroendocrinos [109]. En el presente estudio, los cambios en la concentración de Kyn y de la relación Kyn/Trp fueron paralelos a los cambios de concentración del Trp, indicando así que la tasa metabólica del Trp fue igual para ambos grupos.

A las 3 horas después de la alimentación de la mañana, los terneros del grupo TRP mostraron una tendencia hacia una concentración de glucosa sérica más baja en comparación con los terneros del grupo CTRL. Esta menor concentración de glucosa en los terneros TRP puede explicarse porque la 5-HT, un derivado de Trp, tiene un efecto de liberación de insulina en condiciones de alimentación, y mayores niveles de insulina en el grupo de TRP causarían una captación más rápida de la glucosa en los tejidos periféricos [111]. En el presente estudio, los niveles de insulina fueron similares en ambos tratamientos en ambos momentos de muestreo, y esta explicación solo pudo ser respaldada por un aumento numérico en la relación insulina / glucosa en TRP en comparación con los terneros CTRL 3 horas después de la alimentación matutina.

También se observó una concentración sérica de NEFAs mayor antes de la alimentación del MR por la mañana en los animales TRP en comparación con los terneros CTRL. La vía catabólica del Trp lo convierte en Acetil-CoA (KEGG *pathway* map00380), un precursor de la biosíntesis de ácidos grasos, siendo una posible explicación del aumento de las concentraciones plasmáticas de NEFAs antes de la alimentación matutina con el MR en los terneros del grupo TRP.

Ningún otro analito metabólico se alteró en el plasma, excepto por una tendencia a disminuir la actividad enzimática de GPx 3 horas después de la alimentación matutina en el grupo de TRP. Aunque no se observaron alteraciones en otros marcadores redox como la SOD, la disminución en la actividad de GPx podría deberse al efecto de la suplementación con Trp en las

defensas oxidativas. La enzima triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) es metabolizadora del Trp en la vía quinurenina, y tiene actividad antioxidante [330]. Podría haber atenuado la actividad antioxidante GPx como se ha descrito en lechones destetados [331].

La obtención y el análisis de los resultados de rendimiento y conductuales se realizaron en las instalaciones del IRTA, y se relacionaron con los resultados bioquímicos y metabólicos obtenidos de esta tesis.

La suplementación con Trp no afectó a los parámetros de rendimiento de los terneros ni a la ingesta de concentrado y de MR. Tampoco se observaron diferencias entre los dos tratamientos del MR en las vocalizaciones, medida no invasiva utilizada ampliamente para evaluar el grado de estrés [332].

Los terneros del grupo TRP pasaron más tiempo acostados ($p < 0,05$) 1 hora después de la alimentación matutina en el día 4 (semana 1) del estudio, pero el tiempo dedicado a la postura fue similar durante los días de observación restantes.

Después del destete, los terneros, independientemente del tratamiento, dedicaron más tiempo ($p < 0,05$) a rumiar que durante el período previo al destete, lo cual es una clara consecuencia del cambio en la dieta (totalmente dependiente de los sólidos) y la necesidad de incrementar la actividad de rumia.

Se observó que los terneros CTRL consumieron más agua ($p < 0,05$) 1 hora después de la alimentación de la mañana que los terneros del grupo TRP, durante todo el estudio. Se podría especular que un mayor consumo de agua 1 hora después de la alimentación matutina con MR en los terneros CTRL era debido a que tenían un mayor grado de estrés que los terneros TRP, porque beber agua se ha descrito como una respuesta fisiológica al estrés [333]. Esta hipótesis no fue apoyada por cambios en los niveles plasmáticos de la hormona

del estrés cortisol o la proteína de fase aguda haptoglobina, que también ha sido reconocida como un marcador de estrés [116].

Esto contrasta con los resultados descritos por Hernández-Castellano et al. [334], quienes informaron un aumento en los niveles de mRNA de haptoglobina en las células sanguíneas después de la suplementación de calostro y leche con 5-hidroxitriptófano (5-HTP) durante los primeros 15 días después del nacimiento, sugiriendo un aumento de la protección inmunológica en terneros suplementados con 5-HTP. Hernández-Castellano et al. utilizaron 5-HTP como precursor de la 5-HT, en contraste con el L-Trp utilizado en este estudio. Esto podría explicar la divergencia en los resultados, ya que la enzima que convierte L-Trp en 5-HTP representa un paso limitante para la síntesis de 5-HT, y hay varios factores que pueden inhibir esta vía de la serotonina. Por el contrario, el 5-HTP no compite con otros aminoácidos para ser absorbido y puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica [335]. Las diferencias en el tipo de muestra también pueden explicar los resultados divergentes entre los dos estudios, ya que en nuestro trabajo la haptoglobina se ha determinado en suero (se sintetiza principalmente en el hígado y se secreta al plasma), mientras que Hernández-Castellano et al. [334] determinaron la expresión de haptoglobina en las células sanguíneas.

Aunque no se observó ningún efecto de la suplementación con Trp en los niveles de hormonas del estrés, la concentración de cortisol sérico cambió durante las semanas y la hora de muestreo del estudio, y se relacionó con el proceso de alimentación. La concentración de cortisol sérico fue mayor al comienzo del estudio antes de la alimentación matutina lo que sugiere que los terneros estaban estresados debido al hambre (esperando la alimentación con leche). A medida que los terneros crecieron y consumieron más alimento de inicio concentrado, los niveles de cortisol sérico antes de la alimentación disminuyeron. Sorprendentemente, los niveles de cortisol sérico en la semana 4 (2 días después del destete) difirieron entre antes y después del tiempo de

Discusión

alimentación, pero fueron más bajos que las concentraciones de cortisol sérico antes del destete a las 3 horas después de la alimentación. Estos valores sugieren que el estrés asociado con la limitación de la asignación de MR parece más agudo para los terneros jóvenes que el estrés causado por un proceso de destete gradual.

En conclusión, la suplementación del MR con 4,5 g/día de Trp no tuvo ningún efecto sobre el rendimiento y el comportamiento de los terneros durante el proceso de destete. Se observaron cambios metabólicos modestos que podrían sugerir algunos beneficios en la absorción del Trp o mejora de las defensas oxidativas.



CONCLUSIONES

Capítulo 1. Efecto de la suplementación de la dieta materna con el antioxidante hidroxitirosol en el desarrollo cerebral de un modelo porcino de restricción del crecimiento intrauterino.

Estudio 1. Efecto de la suplementación materna de la dieta con el antioxidante hidroxitirosol en el cerebro de fetos de 100 días de gestación, de cerdos de 1 mes y de 6 meses de edad.

- En los fetos de 100 días de gestación la suplementación de la dieta materna con HTX:
 - Alteró tanto los niveles de catecolaminas como de indolaminas en todas las áreas cerebrales.
 - Afectó en la morfología del hipocampo aumentando el número de neuronas maduras y disminuyendo las neuronas inmaduras.
 - El análisis proteómico del hipocampo muestra una disminución de las proteínas ribosómicas, y por lo tanto hay evidencias de que el HTX provoca una menor síntesis proteica que podría afectar al peso corporal de los animales.
- La suplementación materna con el antioxidante HTX no tuvo efecto sobre el perfil de neurotransmisores de ninguna área cerebral ni en la morfología del hipocampo a ninguna de las edades postnatales, lo que indica que se necesita la presencia continua del HTX para mantener sus efectos en el cerebro.
- El efecto del antioxidante HTX no se vio influenciado por el sexo de los animales.

Estudio 2. Efecto de la suplementación materna con el antioxidante hidroxitirosol en el cerebro de fetos de 100 días de gestación afectados por la IUGR.

- La IUGR no tuvo efecto sobre el perfil de neurotransmisores de la amígdala ni de la corteza prefrontal.
- En el hipocampo hubo una interacción entre la suplementación materna con HTX y la IUGR:
 - Los animales LBW (afectados por la IUGR) presentaron concentraciones más elevadas de 5-HT que los animales NBW.
 - La IUGR afectó la morfología del hipocampo disminuyendo el número de neuronas maduras y aumentando las neuronas inmaduras.
 - Las diferencias entre los animales NBW y los animales LBW desaparecieron con la suplementación materna con HTX.
- El efecto de la IUGR no se vio influenciado por el sexo de los animales.

Capítulo 2. Efectos de una dieta alta en grasas en el metabolismo y en el sistema nervioso central de animales de 1 año en un modelo porcino de IUGR.

- La HFD causó un incremento en los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol únicamente en el grupo NBW, sugiriendo que los animales afectados por la IUGR tienden a absorber y almacenar más grasas.
- Los animales LBW sujetos a la dieta HFD presentaron un aumento en los niveles de cortisol y haptoglobina, indicando un mayor grado de estrés.
- La dieta HFD provocó un aumento de los aminoácidos libres plasmáticos, tanto en los animales NBW como en los LBW, pero tuvo un mayor efecto en los animales LBW.
- Los animales que recibieron la dieta HFD presentaron un aumento de la concentración de serotonina en las cinco áreas estudiadas: amígdala, hipocampo, hipotálamo, cuerpo estriado y corteza prefrontal.
- No hubo interacción entre la dieta recibida y la IUGR sobre el perfil de neurotransmisores, aun así, el aumento de 5-HT en los grupos HFD solo fue significativo en los animales LBW.
- La HFD en los animales LBW hizo que presentaran un mayor número de neuronas maduras y un menor número de neuronas inmaduras en el hipocampo en comparación a los que recibieron la dieta CTRL.
- El análisis proteómico del hipocampo indicó que la dieta HFD alteraba determinadas vías en animales NBW y LBW, pero que también había efectos diferenciales.
- En los animales NBW la dieta HFD afectó a proteínas involucradas en el metabolismo y la matriz extracelular.
- En los animales LBW la dieta HFD afectó a proteínas involucradas en el *splicing* del mRNA, en el transporte vesicular de Golgi y en la vía mTOR.
- El efecto de la dieta HFD no se vio influenciado por el sexo de los animales, a excepción del perfil de neurotransmisores en la amígdala y en el cuerpo estriado donde afectó más a los animales machos.

Capítulo 3. Evaluación de la suplementación de triptófano en dietas con lacto reemplazantes en terneros lactantes.

- La concentración de Triptófano y de su metabolito quinurenina incrementaron en el plasma a las 3 horas posprandial en el grupo TRP, indicando una adecuada absorción del aminoácido.
- Se produjeron los cambios esperados en triglicéridos, NEFAs y glucosa a las 3 horas de la alimentación, independientemente del grupo. Estas variaciones desaparecen o son muy leves a las 4 semanas, indicando que los terneros empiezan a comportarse como rumiantes.
- Los efectos metabólicos causados por la suplementación con triptófano son escasos, aunque parece producir una menor movilización de lípidos.
- No hay variaciones significativas en los niveles de cortisol ni haptoglobina (indicadores de estrés), entre los dos grupos de estudio.
- La suplementación del MR con Trp no tuvo ningún efecto sobre el rendimiento y el comportamiento de los terneros durante el proceso de destete.
- No hubo un efecto positivo directo del Trp en ayudar a los terneros a afrontar el estrés asociado con el destete gradual.



REFERENCIAS

- [1] D. Fraser, "Assessing animal welfare: Different philosophies, different scientific approaches," *Zoo Biology*, vol. 28, no. 6, pp. 507–518, 2009, doi: 10.1002/zoo.20253.
- [2] D. Fraser *et al.*, "General Principles for the welfare of animals in production systems: The underlying science and its application," *Veterinary Journal*, vol. 198, no. 1, pp. 19–27, 2013, doi: 10.1016/j.tvjl.2013.06.028.
- [3] P. J. Lang, M. Davis, and A. Öhman, "Fear and anxiety: Animal models and human cognitive psychophysiology," *Journal of Affective Disorders*, vol. 61, no. 3, pp. 137–159, 2000, doi: 10.1016/S0165-0327(00)00343-8.
- [4] K. Pacák and M. Palkovits, "Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders," *Endocrine Reviews*, vol. 22, no. 4, pp. 502–548, 2001, doi: 10.1210/edrv.22.4.0436.
- [5] D. Valent *et al.*, "SWATH-MS quantitative proteomic investigation of intrauterine growth restriction in a porcine model reveals sex differences in hippocampus development.," *Journal of proteomics*, vol. 204, p. 103391, 2019, doi: 10.1016/j.jprot.2019.103391.
- [6] G. P. Chrousos, "Stress and disorders of the stress system," *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 5, no. 7, pp. 374–381, 2009, doi: 10.1038/nrendo.2009.106.
- [7] J. E. LeDoux, "Emotion circuits in the brain," *Annual Review of Neuroscience*, vol. 23, pp. 155–184, 2000, doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.155.
- [8] J. LeDoux, "The emotional brain, fear, and the amygdala," *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 23, no. 4–5, pp. 727–738, 2003, doi: 10.1023/A:1025048802629.
- [9] J. P. Herman *et al.*, "Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness," *Frontiers in Neuroendocrinology*, vol. 24, no. 3, pp. 151–180, 2003, doi: 10.1016/j.yfrne.2003.07.001.
- [10] M. S. Fanselow, "Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear," *Psychonomic Bulletin & Review*, vol. 1, no. 4, pp. 429–438, 1994, doi: 10.3758/BF03210947.
- [11] P. Tovote, J. P. Fadok, and A. Lüthi, "Neuronal circuits for fear and anxiety," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 16, no. 6, pp. 317–331, 2015, doi: 10.1038/nrn3945.
- [12] D. Purves *et al.*, *Neuroscience*, 6th Ed. Oxford University Press, 2018.
- [13] E. R. Kandel, J. D. Koester, S. H. Mack, and S. A. Siegelbaum, *Principles of Neural Science*, 6th Ed. McGraw-Hill Education, 2021.
- [14] O. von Bohlen und Halbach and R. Dermietzel, *Neurotransmitters and Neuromodulators: Handbook of Receptors and Biological Effects*, 2nd Ed. John Wiley & Sons, 2006.

Referencias

- [15] C. Missale, S. Russel Nash, S. W. Robinson, M. Jaber, and M. G. Caron, "Dopamine receptors: From structure to function," *Physiological Reviews*, vol. 78, no. 1, pp. 189–225, 1998, doi: 10.1152/physrev.1998.78.1.189.
- [16] J. M. Beaulieu and R. R. Gainetdinov, "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors," *Pharmacological Reviews*, vol. 63, no. 1, pp. 182–217, 2011, doi: 10.1124/pr.110.002642.
- [17] M. Jaber, S. W. Robinson, C. Missale, and M. G. Caron, "Dopamine receptors and brain function," *Neuropharmacology*, vol. 35, no. 11, pp. 1503–1519, 1996, doi: 10.1016/S0028-3908(96)00100-1.
- [18] J. M. Ritter, R. J. Flower, G. Henderson, Y. K. Loke, H. P. Rang, and D. MacEwan, *Rang and Dale's Pharmacology*, 9th Ed. Elsevier, 2019.
- [19] P. B. Molinoff, " α - and β -Adrenergic Receptor Subtypes: Properties, Distribution and Regulation," *Drugs*, vol. 28, no. 2, pp. 1–15, 1984, doi: 10.2165/00003495-198400282-00002.
- [20] M. Pytliak, V. Vargová, V. Mechírová, and M. Felšci, "Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications," *Physiological Research*, vol. 60, no. 1, pp. 15–25, 2011, doi: 10.33549/physiolres.931903.
- [21] E. Heilbronn and T. Bartfai, "Muscarinic acetylcholine receptor," *Progress in Neurobiology*, vol. 11, no. 3–4, pp. 171–188, 1978, doi: 10.1016/0301-0082(78)90011-4.
- [22] C. Gotti, M. Zoli, and F. Clementi, "Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 27, no. 9, pp. 482–491, 2006, doi: 10.1016/j.tips.2006.07.004.
- [23] S. F. Traynelis *et al.*, "Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function," *Pharmacological Reviews*, vol. 62, no. 3, pp. 405–496, 2010, doi: 10.1124/pr.109.002451.
- [24] C. M. Niswender and P. J. Conn, "Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 50, pp. 295–322, 2010, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533.
- [25] F. Ferraguti and R. Shigemoto, "Metabotropic glutamate receptors," *Cell and Tissue Research*, vol. 326, no. 2, pp. 483–504, 2006, doi: 10.1007/s00441-006-0266-5.
- [26] Y. Zhou and N. C. Danbolt, "Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain," *Journal of Neural Transmission*, vol. 121, no. 8, pp. 799–817, 2014, doi: 10.1007/s00702-014-1180-8.
- [27] L. Hertz, "Glutamate, a neurotransmitter-And so much more. A synopsis of Wierzba III," *Neurochemistry International*, vol. 48, no. 6–7, pp. 416–425, 2006, doi: 10.1016/j.neuint.2005.12.021.

- [28] L. K. Bak, A. Schousboe, and H. S. Waagepetersen, "The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer," *Journal of Neurochemistry*, vol. 98, no. 3, pp. 641–653, 2006, doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x.
- [29] M. Jembrek and J. Vlajnic, "GABA Receptors: Pharmacological Potential and Pitfalls," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 21, no. 34, pp. 4943–4959, 2015, doi: 10.2174/1381612821666150914121624.
- [30] Y. S. Kim and B. E. Yoon, "Altered GABAergic signaling in brain disease at various stages of life," *Experimental Neurobiology*, vol. 26, no. 3, pp. 122–131, 2017, doi: 10.5607/en.2017.26.3.122.
- [31] J. P. Herman and W. E. Cullinan, "Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis," *Trends in Neurosciences*, vol. 20, no. 2, pp. 78–84, 1997, doi: 10.1016/S0166-2236(96)10069-2.
- [32] A. S. P. Jansen, X. van Nguyen, V. Karpitskiy, T. C. Mettenleiter, and A. D. Loewy, "Central command neurons of the sympathetic nervous system: Basis of the fight-or-flight response," *Science*, vol. 270, no. 5236, pp. 644–646, 1995, doi: 10.1126/science.270.5236.644.
- [33] S. M. Smith and W. W. Vale, "The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress," *Dialogues in Clinical Neuroscience*, vol. 8, no. 4, pp. 383–395, 2006, doi: 10.31887/dcns.2006.8.4/ssmith.
- [34] D. E. Haines and G. A. Mihailoff, *Principios de Neurociencia: Aplicaciones Básicas Y Clínicas*, 5th Ed. Elsevier Health Sciences, 2019.
- [35] G. Kempermann, H. Song, and F. H. Gage, "Neurogenesis in the Adult Hippocampus," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 7, no. 9, p. a018812, 2015, doi: 10.1101/cshperspect.a018812.
- [36] R. J. Mullen, C. R. Buck, and A. M. Smith, "NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates.," *Development*, vol. 116, no. 1, pp. 201–211, 1992, doi: 10.1242/dev.116.1.201.
- [37] K. K. Kim, R. S. Adelstein, and S. Kawamoto, "Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 45, pp. 31052–31061, 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.052969.
- [38] D. Lind, S. Franken, J. Kappler, J. Jankowski, and K. Schilling, "Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization.," *Journal of neuroscience research*, vol. 79, no. 3, pp. 295–302, 2005, doi: 10.1002/jnr.20354.
- [39] G. Friocourt *et al.*, "Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes.," *Cerebral cortex*, vol. 13, no. 6, pp. 620–626, 2003, doi: 10.1093/cercor/13.6.620.

Referencias

- [40] T. Iwanaga, Y. Takahashi, and T. Fujita, "Immunohistochemistry of neuron-specific and glia-specific proteins.," *Archives of histology and cytology*, vol. 52 Suppl, pp. 13–24, 1989, doi: 10.1679/aohc.52.suppl_13.
- [41] D. Sharma, S. Shastri, N. Farahbakhsh, and P. Sharma, "Intrauterine growth restriction—part 1," *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, vol. 29, no. 24, pp. 3977–3987, 2016, doi: 10.3109/14767058.2016.1152249.
- [42] H. A. Wollmann, "Intrauterine growth restriction: Definition and etiology," *Hormone Research*, vol. 49 Suppl 2, pp. 1–6, 1998, doi: 10.1159/000053079.
- [43] E. Cohen, W. Baerts, and F. van Bel, "Brain-Sparing in Intrauterine Growth Restriction: Considerations for the Neonatologist," *Neonatology*, vol. 108, no. 4, pp. 269–276, 2015, doi: 10.1159/000438451.
- [44] C. García-Contreras *et al.*, "Fetal growth-retardation and brain-sparing by malnutrition are associated to changes in neurotransmitters profile," *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 57, pp. 72–76, 2017, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2017.01.005.
- [45] D. Batalle *et al.*, "Altered resting-state whole-brain functional networks of neonates with intrauterine growth restriction," *Cortex*, vol. 77, pp. 119–131, 2016, doi: 10.1016/j.cortex.2016.01.012.
- [46] D. Sharma, N. Farahbakhsh, S. Shastri, and P. Sharma, "Intrauterine growth restriction—part 2," *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, vol. 29, no. 24, pp. 4037–4048, 2016, doi: 10.3109/14767058.2016.1154525.
- [47] D. J. P. Barker, A. R. Bull, C. Osmond, and S. J. Simmonds, "Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life," *British Medical Journal*, vol. 301, no. 6746, pp. 259–262, 1990, doi: 10.1136/bmj.301.6746.259.
- [48] D. J. P. Barker and C. Osmond, "Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales," *The Lancet*, vol. 327, no. 8489, pp. 1077–1081, 1986, doi: 10.1016/S0140-6736(86)91340-1.
- [49] D. J. P. Barker, C. Osmond, J. Golding, D. Kuh, and M. E. J. Wadsworth, "Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease," *British Medical Journal*, vol. 298, no. 6673, pp. 564–567, 1989, doi: 10.1136/bmj.298.6673.564.
- [50] S. Bo, P. Cavallo-Perin, L. Scaglione, G. Ciccone, and G. Pagano, "Low birthweight and metabolic abnormalities in twins with increased susceptibility to type 2 diabetes mellitus," *Diabetic Medicine*, vol. 17, no. 5, pp. 365–370, 2000, doi: 10.1046/j.1464-5491.2000.00288.x.
- [51] A. H. Barnett, C. Eff, R. D. G. Leslie, and D. A. Pyke, "Diabetes in identical twins - A study of 200 pairs," *Diabetologia*, vol. 20, no. 2, pp. 87–93, 1981, doi: 10.1007/BF00262007.

- [52] K. Calkins and S. U. Devaskar, "Fetal origins of adult disease," *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, vol. 41, no. 6, pp. 158–176, 2011, doi: 10.1016/j.cppeds.2011.01.001.
- [53] A. T. Hattersley and J. E. Tooke, "The fetal insulin hypothesis: An alternative explanation of the association of low birthweight with diabetes and vascular disease," *Lancet*, vol. 353, no. 9166, pp. 1789–1792, 1999, doi: 10.1016/S0140-6736(98)07546-1.
- [54] J. v. Neel, "Diabetes mellitus: a 'thrifty' genotype rendered detrimental by 'progress'?", *American journal of human genetics*, vol. 14, no. 4, pp. 353–362, 1962.
- [55] D. J. P. Barker, "The origins of the developmental origins theory," *Journal of Internal Medicine*, vol. 261, no. 5, pp. 412–417, 2007, doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x.
- [56] S. Cianfarani *et al.*, "Effect of intrauterine growth retardation on liver and long-term metabolic risk," *International Journal of Obesity*, vol. 36, no. 10, pp. 1270–1277, 2012, doi: 10.1038/ijo.2012.54.
- [57] A. L. Fowden, D. A. Giussani, and A. J. Forhead, "Intrauterine programming of physiological systems: Causes and consequences," *Physiology*, vol. 21, no. 1, pp. 29–37, 2006, doi: 10.1152/physiol.00050.2005.
- [58] K. Sedaghat, S. Zahediasl, and A. Ghasemi, "Intrauterine programming," *Iranian journal of basic medical sciences*, vol. 18, no. 3, pp. 212–220, 2015, doi: 10.22038/IJBMS.2015.4115.
- [59] K. Maršál, "Physiological adaptation of the growth-restricted fetus," *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, vol. 49, pp. 37–52, 2018, doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.02.006.
- [60] A. Malhotra *et al.*, "Detection and assessment of brain injury in the growth-restricted fetus and neonate," *Pediatric Research*, vol. 82, no. 2, pp. 184–193, 2017, doi: 10.1038/pr.2017.37.
- [61] J. A. Wixey, K. K. Chand, P. B. Colditz, and S. T. Bjorkman, "Review: Neuroinflammation in intrauterine growth restriction," *Placenta*, vol. 54, pp. 117–124, 2017, doi: 10.1016/j.placenta.2016.11.012.
- [62] N. Padilla, J. Perapoch, A. Carrascosa, R. Acosta-Rojas, F. Botet, and E. Gratacós, "Twelve-month neurodevelopmental outcome in preterm infants with and without intrauterine growth restriction," *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, vol. 99, no. 10, pp. 1498–1503, Oct. 2010, doi: 10.1111/j.1651-2227.2010.01848.x.
- [63] L. A. Ramenghi *et al.*, "Cerebral Maturation in IUGR and Appropriate for Gestational Age Preterm Babies," *Reproductive Sciences*, vol. 18, no. 5, pp. 469–475, 2011, doi: 10.1177/19337191110388847.

Referencias

- [64] N. Padilla *et al.*, "Differential vulnerability of gray matter and white matter to intrauterine growth restriction in preterm infants at 12 months corrected age," *Brain Research*, vol. 1545, pp. 1–11, 2014, doi: 10.1016/j.brainres.2013.12.007.
- [65] C. B. Tolsa *et al.*, "Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction," *Pediatric Research*, vol. 56, no. 1, pp. 132–138, 2004, doi: 10.1203/01.PDR.0000128983.54614.7E.
- [66] G. A. Lodygensky *et al.*, "Intrauterine growth restriction affects the preterm infant's hippocampus," *Pediatric Research*, vol. 63, no. 4, pp. 438–443, 2008, doi: 10.1203/PDR.0b013e318165c005.
- [67] N. Padilla *et al.*, "Differential effects of intrauterine growth restriction on brain structure and development in preterm infants: A magnetic resonance imaging study," *Brain Research*, vol. 1382, pp. 98–108, 2011, doi: 10.1016/j.brainres.2011.01.032.
- [68] J. Dubois *et al.*, "Primary cortical folding in the human newborn: An early marker of later functional development," *Brain*, vol. 131, no. 8, pp. 2028–2041, 2008, doi: 10.1093/brain/awn137.
- [69] Y. Wang, W. Fu, and J. Liu, "Neurodevelopment in children with intrauterine growth restriction: Adverse effects and interventions," *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, vol. 29, no. 4, pp. 660–668, 2016, doi: 10.3109/14767058.2015.1015417.
- [70] D. Batalle *et al.*, "Altered small-world topology of structural brain networks in infants with intrauterine growth restriction and its association with later neurodevelopmental outcome," *NeuroImage*, vol. 60, no. 2, pp. 1352–1366, 2012, doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.01.059.
- [71] A. Lapillonne, P. Braillon, O. Claris, P. G. Chatelain, P. D. Delmas, and B. L. Salle, "Body composition in appropriate and in small for gestational age infants," *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, vol. 86, no. 2, pp. 196–200, 1997, doi: 10.1111/j.1651-2227.1997.tb08868.x.
- [72] A. L. Fowden and A. J. Forhead, "Endocrine mechanisms of intrauterine programming," *Reproduction*, vol. 127, no. 5, pp. 515–526, 2004, doi: 10.1530/rep.1.00033.
- [73] P. Ye, J. Carson, and A. J. D'Ercole, "In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on brain myelination: Studies of IGF-I and IGF binding protein-1 (IGFBP-1) transgenic mice," *Journal of Neuroscience*, vol. 15, no. 11, pp. 7344–7356, 1995, doi: 10.1523/jneurosci.15-11-07344.1995.
- [74] A. Joseph D'Ercole *et al.*, "Brain growth retardation due to the expression of human insulin like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: an in vivo model for the analysis of igf function in the brain," *Developmental Brain Research*, vol. 82, no. 1–2, pp. 213–222, 1994, doi: 10.1016/0165-3806(94)90164-3.

- [75] E. Herrera, I. López-Soldado, M. Limones, E. Amusquivar, and M. P. Ramos, "Lipid metabolism during the perinatal phase, and its implications on postnatal development," *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, vol. 76, no. 4, pp. 216–224, 2006, doi: 10.1024/0300-9831.76.4.216.
- [76] A. Vaiserman and O. Lushchak, "Prenatal malnutrition-induced epigenetic dysregulation as a risk factor for type 2 diabetes," *International Journal of Genomics*, vol. 2019, p. 3821409, 2019, doi: 10.1155/2019/3821409.
- [77] A. Snoeck, C. Remacle, B. Reusens, and J. J. Hoet, "Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas," *Neonatology*, vol. 57, no. 2, pp. 107–118, 1990, doi: 10.1159/000243170.
- [78] K. M. Godfrey and D. J. P. Barker, "Maternal nutrition in relation to fetal and placental growth," *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 61, no. 1, pp. 15–22, 1995, doi: 10.1016/0028-2243(95)02148-L.
- [79] J. von Ehr and F. von Versen-Höynck, "Implications of maternal conditions and pregnancy course on offspring's medical problems in adult life," *Archives of Gynecology and Obstetrics*, vol. 294, no. 4, pp. 673–679, 2016, doi: 10.1007/s00404-016-4178-7.
- [80] V. Mericq, A. Martinez-Aguayo, R. Uauy, G. Iñiguez, M. van der Steen, and A. Hokken-Koelega, "Long-term metabolic risk among children born premature or small for gestational age," *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 13, no. 1, pp. 50–62, 2017, doi: 10.1038/nrendo.2016.127.
- [81] R. Mierzynski *et al.*, "Intra-uterine Growth Retardation as a Risk Factor of Postnatal Metabolic Disorders," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 17, no. 7, pp. 587–596, 2016, doi: 10.2174/1389201017666160301104323.
- [82] G. Kopec, P. S. Shekhawat, and M. J. Mhanna, "Prevalence of diabetes and obesity in association with prematurity and growth restriction," *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, vol. 10, pp. 285–295, 2017, doi: 10.2147/DMSO.S115890.
- [83] P. M. Vuguin, "Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease," *Hormone Research*, vol. 68, no. 3, pp. 113–123, 2007, doi: 10.1159/000100545.
- [84] A. M. Swanson and A. L. David, "Animal models of fetal growth restriction: Considerations for translational medicine," *Placenta*, vol. 36, no. 6, pp. 623–630, 2015, doi: 10.1016/j.placenta.2015.03.003.
- [85] A. Bassols, C. Costa, P. D. Eckersall, J. Osada, J. Sabrià, and J. Tibau, "The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective," *PROTEOMICS - Clinical Applications*, vol. 8, no. 9–10, pp. 715–731, 2014, doi: 10.1002/prca.201300099.

Referencias

- [86] A. Gonzalez-Bulnes, S. Astiz, V. H. Parraguez, C. Garcia-Contreras, and M. Vazquez-Gomez, "Empowering Translational Research in Fetal Growth Restriction: Sheep and Swine Animal Models.," *Current pharmaceutical biotechnology*, vol. 17, no. 10, pp. 848–855, 2016, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27194361>
- [87] V. H. Parraguez *et al.*, "Effects of antioxidant vitamins on newborn and placental traits in gestations at high altitude: Comparative study in high and low altitude native sheep," *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 23, no. 2, pp. 285–296, 2011, doi: 10.1071/RD10016.
- [88] P. Andersen *et al.*, *The Hippocampus Book*, 1st Ed. Oxford University Press, 2006.
- [89] S. L. Miller, P. S. Hüppi, and C. Mallard, "The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome," *The Journal of Physiology*, vol. 594, no. 4, pp. 807–823, 2016, doi: 10.1113/JP271402.
- [90] H. Uno *et al.*, "Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus," *Developmental Brain Research*, vol. 53, no. 2, pp. 157–167, 1990, doi: 10.1016/0165-3806(90)90002-G.
- [91] C. A. Ruff *et al.*, "The extent of intrauterine growth restriction determines the severity of cerebral injury and neurobehavioural deficits in rodents," *PLoS ONE*, vol. 12, no. 9, p. e0184653, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0184653.
- [92] E. Morsing *et al.*, "Brain volumes and developmental outcome in childhood following fetal growth restriction leading to very preterm birth," *Frontiers in Physiology*, vol. 9, p. 1583, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.01583.
- [93] B. J. Kerr, L. L. Southern, T. D. Bidner, K. G. Friesen, and R. A. Easter, "Influence of dietary protein level, amino acid supplementation, and dietary energy levels on growing-finishing pig performance and carcass composition," *Journal of Animal Science*, vol. 81, no. 12, pp. 3075–3087, 2003, doi: 10.2527/2003.81123075x.
- [94] E. R. Otto, M. Yokoyama, P. K. Ku, N. K. Amest, and N. L. Trottier, "Nitrogen balance and ileal amino acid digestibility in growing pigs fed diets reduced in protein concentration," *Journal of Animal Science*, vol. 81, no. 7, pp. 1743–1753, 2003, doi: 10.2527/2003.8171743x.
- [95] E. J. DePeters and L. W. George, "Rumen transfaunation," *Immunology Letters*, vol. 162, no. 2, pp. 69–76, 2014, doi: 10.1016/j.imlet.2014.05.009.
- [96] A. A. Jackson, "The glycine story," *European journal of clinical nutrition*, vol. 45, no. 2, pp. 59–65, 1991.
- [97] J. Foldager, J. T. Huber, and W. G. Bergen, "Methionine and Sulfur Amino Acid Requirement in the Preruminant Calf," *Journal of Dairy Science*, vol. 60, no. 7, pp. 1095–1104, 1977, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(77)83994-5.

- [98] A. P. Williams and D. Hewitt, "The amino acid requirements of the preruminant calf," *British Journal of Nutrition*, vol. 41, no. 2, pp. 311–319, 1979, doi: 10.1079/bjn19790040.
- [99] D. Tzeng and C. L. Davis, "Amino Acid Nutrition of the Young Calf. Estimation of Methionine and Lysine Requirements," *Journal of Dairy Science*, vol. 63, no. 3, pp. 441–450, 1980, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(80)82951-1.
- [100] T. M. Hill, H. G. Bateman, J. M. Aldrich, R. L. Schlotterbeck, and K. G. Tanan, "Optimal concentrations of lysine, methionine, and threonine in milk replacers for calves less than five weeks of age," *Journal of Dairy Science*, vol. 91, no. 6, pp. 2433–2442, 2008, doi: 10.3168/jds.2007-0610.
- [101] M. Terré, A. Bach, and M. Devant, "Performance and behaviour of calves reared in groups or individually following an enhanced-growth feeding programme," *Journal of Dairy Research*, vol. 73, no. 4, pp. 480–486, 2006, doi: 10.1017/S0022029906002019.
- [102] K. Yao, J. Fang, Y. L. Yin, Z. M. Feng, Z. R. Tang, and G. Wu, "Tryptophan metabolism in animals: Important roles in nutrition and health," *Frontiers in Bioscience - Scholar*, vol. 3, pp. 286–297, 2011, doi: 10.2741/s152.
- [103] J. A. Stamey, N. A. Janovick, A. F. Kertz, and J. K. Drackley, "Influence of starter protein content on growth of dairy calves in an enhanced early nutrition program 1," *Journal of Dairy Science*, vol. 95, no. 6, pp. 3327–3336, 2012, doi: 10.3168/jds.2011-5107.
- [104] K. C. Horvath and E. K. Miller-Cushon, "The effect of milk-feeding method and hay provision on the development of feeding behavior and non-nutritive oral behavior of dairy calves," *Journal of Dairy Science*, vol. 100, no. 5, pp. 3949–3957, 2017, doi: 10.3168/jds.2016-12223.
- [105] L. E. Hulbert, C. J. Cobb, J. A. Carroll, and M. A. Ballou, "The effects of early weaning on innate immune responses of Holstein calves," *Journal of Dairy Science*, vol. 94, no. 5, pp. 2545–2556, 2011, doi: 10.3168/jds.2010-3983.
- [106] M. A. Khan *et al.*, "Pre- and postweaning performance of Holstein female calves fed milk through step-down and conventional methods," *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no. 2, pp. 876–885, 2007, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(07)71571-0.
- [107] E. Eckert, H. E. Brown, K. E. Leslie, T. J. DeVries, and M. A. Steele, "Weaning age affects growth, feed intake, gastrointestinal development, and behavior in Holstein calves fed an elevated plane of nutrition during the preweaning stage," *Journal of Dairy Science*, vol. 98, no. 9, pp. 6315–6326, 2015, doi: 10.3168/jds.2014-9062.
- [108] Y. B. Shen, G. Voilqué, J. D. Kim, J. Odle, and S. W. Kim, "Effects of increasing tryptophan intake on growth and physiological changes in nursery pigs," *Journal of Animal Science*, vol. 90, no. 7, pp. 2264–2275, 2012, doi: 10.2527/jas.2011-4203.
- [109] E. L. Gibson, "Tryptophan supplementation and serotonin function: Genetic variations in behavioural effects," *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 77, no. 2, pp. 174–188, 2018, doi: 10.1017/S0029665117004451.

Referencias

- [110] C. R. Markus *et al.*, "The bovine protein α -lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 71, no. 6, pp. 1536–1544, 2000, doi: 10.1093/ajcn/71.6.1536.
- [111] J. M. Yabut, J. D. Crane, A. E. Green, D. J. Keating, W. I. Khan, and G. R. Steinberg, "Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule," *Endocrine Reviews*, vol. 40, no. 4, pp. 1092–1107, 2019, doi: 10.1210/er.2018-00283.
- [112] A. Dukes *et al.*, "The aromatic amino acid tryptophan stimulates skeletal muscle IGF1/p70s6k/mTor signaling in vivo and the expression of myogenic genes in vitro," *Nutrition*, vol. 31, no. 7–8, pp. 1018–1024, 2015, doi: 10.1016/j.nut.2015.02.011.
- [113] Y. Liu and B. L. Fanburg, "Serotonin-induced growth of pulmonary artery smooth muscle requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine protein kinase B/mammalian target of rapamycin/p70 ribosomal S6 kinase 1," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 34, no. 2, pp. 182–191, 2006, doi: 10.1165/rcmb.2005-0163OC.
- [114] K. O. Schubert, M. Föcking, K. Wynne, and D. R. Cotter, "Proteome and pathway effects of chronic haloperidol treatment in mouse hippocampus," *Proteomics*, vol. 16, no. 3, pp. 532–538, 2016, doi: 10.1002/pmic.201500242.
- [115] S. Sethi, D. Chourasia, and I. S. Parhar, "Approaches for targeted proteomics and its potential applications in neuroscience," *Journal of Biosciences*, vol. 40, no. 3, pp. 607–627, 2015, doi: 10.1007/s12038-015-9537-1.
- [116] A. Marco-Ramell, A. M. de Almeida, S. Cristobal, P. Rodrigues, P. Roncada, and A. Bassols, "Proteomics and the search for welfare and stress biomarkers in animal production in the one-health context," *Molecular bioSystems*, vol. 12, no. 7, pp. 2024–2035, 2016, doi: 10.1039/c5mb00788g.
- [117] L. Arroyo *et al.*, "Neurobiology of environmental enrichment in pigs: changes in monoaminergic neurotransmitters in several brain areas and in the hippocampal proteome," *Journal of Proteomics*, vol. 229, p. 103943, 2020, doi: 10.1016/j.jprot.2020.103943.
- [118] A. Bassols, R. Turk, and P. Roncada, "A Proteomics Perspective: From Animal Welfare to Food Safety," *Current Protein & Peptide Science*, vol. 15, no. 2, pp. 156–168, 2014, doi: 10.2174/1389203715666140221125958.
- [119] B. Domon and R. Aebersold, "Mass spectrometry and protein analysis," *Science*, vol. 312, no. 5771, pp. 212–217, 2006, doi: 10.1126/science.1124619.
- [120] R. Aebersold and M. Mann, "Mass spectrometry-based proteomics," *Nature*, vol. 422, no. 6928, pp. 198–207, 2003, doi: 10.1038/nature01511.

- [121] N. Rauniyar and J. R. Yates, "Isobaric labeling-based relative quantification in shotgun proteomics," *Journal of Proteome Research*, vol. 13, no. 12, pp. 5293–5309, 2014, doi: 10.1021/pr500880b.
- [122] O. Chahrour, D. Cobice, and J. Malone, "Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 113, pp. 2–20, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.04.013.
- [123] S. Aggarwal, N. C. Talukdar, and A. K. Yadav, "Advances in Higher Order Multiplexing Techniques in Proteomics," *Journal of Proteome Research*, vol. 18, no. 6, pp. 2360–2369, 2019, doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00228.
- [124] A. Marco-Ramell *et al.*, "Biochemical and proteomic analyses of the physiological response induced by individual housing in gilts provide new potential stress markers," *BMC Veterinary Research*, vol. 12, no. 1, p. 265, 2016, doi: 10.1186/s12917-016-0887-1.
- [125] A. Marco-Ramell *et al.*, "Proteomic analysis reveals oxidative stress response as the main adaptative physiological mechanism in cows under different production systems," *Journal of Proteomics*, vol. 75, no. 14, pp. 4399–4411, 2012, doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.002.
- [126] Y. Saco, M. Fina, M. Giménez, R. Pato, J. Piedrafita, and A. Bassols, "Evaluation of serum cortisol, metabolic parameters, acute phase proteins and faecal corticosterone as indicators of stress in cows," *Veterinary Journal*, vol. 177, no. 3, pp. 439–441, 2008, doi: 10.1016/j.tvjl.2007.05.019.
- [127] L. Arroyo *et al.*, "Housing and road transport modify the brain neurotransmitter systems of pigs: Do pigs raised in different conditions cope differently with unknown environments?," *PLoS ONE*, vol. 14, no. 1, p. e0210406, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0210406.
- [128] L. Arroyo *et al.*, "Effect of handling on neurotransmitter profile in pig brain according to fear related behaviour," *Physiology and Behavior*, vol. 167, pp. 374–381, 2016, doi: 10.1016/j.physbeh.2016.10.005.
- [129] D. Valent *et al.*, "Effects on pig immunophysiology, PBMC proteome and brain neurotransmitters caused by group mixing stress and human-animal relationship," *PLoS ONE*, vol. 12, no. 5, p. e0176928, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0176928.
- [130] M. Vázquez-Gómez *et al.*, "Sex and intrauterine growth restriction modify brain neurotransmitters profile of newborn piglets," *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, vol. 55, pp. 9–14, 2016, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2016.09.004.
- [131] J. Sabrià, D. Torres, M. Pastó, J. M. Peralba, A. Allali-Hassani, and X. Parés, "Release of neurotransmitters from rat brain nerve terminals after chronic ethanol ingestion: Differential effects in cortex and hippocampus," *Addiction Biology*, vol. 8, no. 3, pp. 287–294, 2003, doi: 10.1080/13556210310001602194.

Referencias

- [132] M. Castellanos, C. van van Eendenburg, C. Gubern, and J. M. Sanchez, "Ethyl-bridged hybrid column as an efficient alternative for HPLC analysis of plasma amino acids by pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate," *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 1029–1030, pp. 137–144, 2016, doi: 10.1016/j.jchromb.2016.07.004.
- [133] D. Valent López, "Estudio proteómico y neurofisiológico del estrés psicosocial y metabólico en un modelo porcino," Bellaterra, 2018. [Online]. Available: <https://ddd.uab.cat/record/202141>
- [134] K. Yagi, "Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma.," *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 108, pp. 101–106, 1998, doi: 10.1385/0-89603-472-0:101.
- [135] D. Armstrong and R. Browne, "The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 366, pp. 43–58, 1994, doi: 10.1007/978-1-4615-1833-4_4.
- [136] E. D. Wills, "Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues.," *The Biochemical journal*, vol. 99, no. 3, pp. 667–676, 1966, doi: 10.1042/bj0990667.
- [137] J. R. Wiśniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, and M. Mann, "Universal sample preparation method for proteome analysis," *Nature Methods*, vol. 6, no. 5, pp. 359–362, 2009, doi: 10.1038/nmeth.1322.
- [138] J. M. Chick *et al.*, "Defining the consequences of genetic variation on a proteome-wide scale," *Nature*, vol. 534, no. 7608, pp. 500–505, 2016, doi: 10.1038/nature18270.
- [139] H. Mi *et al.*, "PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements," *Nucleic Acids Research*, vol. 45, no. D1, pp. D183–D189, 2017, doi: 10.1093/NAR/GKW1138.
- [140] B. Jassal *et al.*, "The reactome pathway knowledgebase," *Nucleic Acids Research*, vol. 48, no. D1, pp. D498–D503, 2020, doi: 10.1093/NAR/GKZ1031.
- [141] M. Kanehisa and Y. Sato, "KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences," *Protein Science*, vol. 29, no. 1, pp. 28–35, 2020, doi: 10.1002/PRO.3711.
- [142] N. Yeste *et al.*, "Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of the Antioxidant Hydroxytyrosol on Brain Neurochemistry and Development in a Porcine Model," *Antioxidants*, vol. 10, no. 6, p. 884, 2021, doi: 10.3390/antiox10060884.
- [143] C. T. Whittemore, M. J. Hazzledine, and W. H. Close, *Nutrient requirement standards for pigs*. BSAS, British Society of Animal Science, 2003.
- [144] A. Gonzalez-Bulnes *et al.*, "Developmental Origins of Health and Disease in swine: implications for animal production and biomedical research.," *Theriogenology*, vol. 86, no. 1, pp. 110–119, 2016, doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.03.024.

- [145] A. Gonzalez-Bulnes *et al.*, "Gender-specific early postnatal catch-up growth after intrauterine growth retardation by food restriction in swine with obesity/leptin resistance," *Reproduction*, vol. 144, no. 2, pp. 269–278, 2012, doi: 10.1530/REP-12-0105.
- [146] M. Vazquez-Gomez *et al.*, "Polyphenols and IUGR pregnancies: Effects of maternal hydroxytyrosol supplementation on postnatal growth, metabolism and body composition of the offspring," *Antioxidants*, vol. 8, no. 11, p. 535, 2019, doi: 10.3390/antiox8110535.
- [147] N. Yeste *et al.*, "Polyphenols and IUGR Pregnancies: Intrauterine Growth Restriction and Hydroxytyrosol Affect the Development and Neurotransmitter Profile of the Hippocampus in a Pig Model," *Antioxidants*, vol. 10, no. 10, p. 1505, 2021, doi: 10.3390/antiox10101505.
- [148] L. S. Walsh Hentges and R. J. Martin, "Serum and lipoprotein lipids of fetal pigs and their dams during gestation as compared with man.," *Biology of the neonate*, vol. 52, no. 3, pp. 127–134, 1987, doi: 10.1159/000242701.
- [149] M. Vazquez-Gomez *et al.*, "Polyphenols and IUGR pregnancies: Maternal hydroxytyrosol supplementation improves prenatal and early-postnatal growth and metabolism of the offspring," *PLoS ONE*, vol. 12, no. 5, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0177593.
- [150] J. Jerry Kaneko, J. J. Harvey, and M. L. Bruss, "Appendixes," in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Sixth Ed., J. J. Kaneko, J. W. Harvey, and M. L. B. T. Bruss, Eds. San Diego: Academic Press, 2008, pp. 873–904. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.00033-7>.
- [151] N. Yeste, A. Bassols, M. Vidal, A. Bach, and M. Terré, "Evaluating the potential role of tryptophan in calf milk replacers to facilitate weaning," *Journal of Dairy Science*, vol. 103, no. 8, pp. 7009–7017, 2020, doi: 10.3168/jds.2019-18088.
- [152] J. Heinrichs, "The Penn State Particle Separator," *DSE - Penn State Extension*, vol. 186, pp. 1–8, 2013.
- [153] K. L. Tuck, P. J. Hayball, and I. Stupans, "Structural characterization of the metabolites of hydroxytyrosol, the principal phenolic component in olive oil, in rats," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 8, pp. 2404–2409, 2002, doi: 10.1021/jf011264n.
- [154] E. Aravidou *et al.*, "Protein expression in the brain of rat offspring in relation to prenatal caloric restriction," *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, vol. 29, no. 16, pp. 2707–2714, 2016, doi: 10.3109/14767058.2015.1102222.
- [155] F. Casamenti and M. Stefani, "Olive polyphenols: new promising agents to combat aging-associated neurodegeneration," *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 17, no. 4, pp. 345–358, 2017, doi: 10.1080/14737175.2017.1245617.

Referencias

- [156] Y. Sawikr, N. S. Yarla, I. Peluso, M. A. Kamal, G. Aliev, and A. Bishayee, "Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: The Preventive and Therapeutic Potential of Polyphenolic Nutraceuticals," in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, vol. 108, Academic Press Inc., 2017, pp. 33–57. doi: 10.1016/bs.apcsb.2017.02.001.
- [157] M. Soni, C. Prakash, S. Sehwal, and V. Kumar, "Protective effect of hydroxytyrosol in arsenic-induced mitochondrial dysfunction in rat brain," *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol. 31, no. 7, p. e21906, 2017, doi: 10.1002/jbt.21906.
- [158] M. Soni, C. Prakash, R. Dabur, and V. Kumar, "Protective Effect of Hydroxytyrosol Against Oxidative Stress Mediated by Arsenic-Induced Neurotoxicity in Rats," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 186, no. 1, pp. 27–39, 2018, doi: 10.1007/s12010-018-2723-5.
- [159] R. Hornedo-Ortega *et al.*, "Phenolic compounds characteristic of the mediterranean diet in mitigating microglia-mediated neuroinflammation," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 12, p. 373, 2018, doi: 10.3389/fncel.2018.00373.
- [160] A. Zheng *et al.*, "Maternal hydroxytyrosol administration improves neurogenesis and cognitive function in prenatally stressed offspring," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 26, no. 2, pp. 190–199, 2015, doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.10.006.
- [161] A. Zheng *et al.*, "Hydroxytyrosol improves mitochondrial function and reduces oxidative stress in the brain of db/db mice: Role of AMP-activated protein kinase activation," *British Journal of Nutrition*, vol. 113, no. 11, pp. 1667–1676, 2015, doi: 10.1017/S0007114515000884.
- [162] J. A. Wixey *et al.*, "Neuropathology in intrauterine growth restricted newborn piglets is associated with glial activation and proinflammatory status in the brain," *Journal of Neuroinflammation*, vol. 16, no. 1, p. 5, 2019, doi: 10.1186/s12974-018-1392-1.
- [163] C. Garcia-Contreras *et al.*, "Polyphenols and IUGR pregnancies: Effects of maternal hydroxytyrosol supplementation on hepatic fat accretion and energy and fatty acids profile of fetal tissues," *Nutrients*, vol. 11, no. 7, p. 1534, 2019, doi: 10.3390/nu11071534.
- [164] K. H. Al-Gubory, "Maternal nutrition, oxidative stress and prenatal developmental outcomes," in *Studies on Women's Health*, Humana Press Inc., 2013, pp. 1–31. doi: 10.1007/978-1-62703-041-0_1.
- [165] M. Mariscal-Arcas, C. Monteagudo, and F. Olea-Serrano, "Diet quality in pregnancy: A focus on requirements and the protective effects of the Mediterranean diet," in *Diet Quality: An Evidence-Based Approach*, vol. 1, Springer New York, 2013, pp. 81–92. doi: 10.1007/978-1-4614-7339-8_7.
- [166] R. Domínguez-Perles, D. Auñón, F. Ferreres, and A. Gil-Izquierdo, "Physiological linkage of gender, bioavailable hydroxytyrosol derivatives, and their metabolites with systemic catecholamine metabolism," *Food and Function*, vol. 8, no. 12, pp. 4570–4581, Dec. 2017, doi: 10.1039/c7fo01124e.

- [167] S. Cabrerizo *et al.*, "Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 24, no. 12, pp. 2152–2157, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.08.007.
- [168] M. Rizzo *et al.*, "Antioxidant activity of oleuropein and semisynthetic acetyl-derivatives determined by measuring malondialdehyde in rat brain," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 69, no. 11, pp. 1502–1512, 2017, doi: 10.1111/jphp.12807.
- [169] M. J. Ramírez-Expósito, M. P. Carrera-González, M. D. Mayas, and J. M. Martínez-Martos, "Gender differences in the antioxidant response of oral administration of hydroxytyrosol and oleuropein against N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced glioma," *Food Research International*, vol. 140, p. 110023, 2021, doi: 10.1016/j.foodres.2020.110023.
- [170] O. E. Adebisi, J. O. Olopade, and F. O. Olayemi, "Sodium metavanadate induced cognitive decline, behavioral impairments, oxidative stress and down regulation of myelin basic protein in mice hippocampus: Ameliorative roles of β -spinasterol, and stigmasterol," *Brain and Behavior*, vol. 8, no. 7, p. e01014, 2018, doi: 10.1002/brb3.1014.
- [171] R. Manzoor *et al.*, "Synergistic neuroprotective effect of endogenously-produced hydroxytyrosol and synaptic vesicle proteins on pheochromocytoma cell line against salsolinol," *Molecules*, vol. 25, no. 7, p. 1715, 2020, doi: 10.3390/molecules25071715.
- [172] C. Garcia-Contreras *et al.*, "Polyphenols and iugr pregnancies: Effects of maternal hydroxytyrosol supplementation on placental gene expression and fetal antioxidant status, dna-methylation and phenotype," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 5, p. 1187, 2019, doi: 10.3390/ijms20051187.
- [173] C. Garcia-Contreras *et al.*, "Polyphenols and IUGR pregnancies: Effects of maternal hydroxytyrosol supplementation on hepatic fat accretion and energy and fatty acids profile of fetal tissues," *Nutrients*, vol. 11, no. 7, p. 1534, 2019, doi: 10.3390/nu11071534.
- [174] J. Meiser, D. Weindl, and K. Hiller, "Complexity of dopamine metabolism," *Cell Communication and Signaling*, vol. 11, no. 1, p. 34, 2013, doi: 10.1186/1478-811X-11-34.
- [175] W. J. Burke, S. W. Li, E. A. Williams, R. Nonneman, and D. S. Zahm, "3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde is the toxic dopamine metabolite in vivo: Implications for Parkinson's disease pathogenesis," *Brain Research*, vol. 989, no. 2, pp. 205–213, 2003, doi: 10.1016/S0006-8993(03)03354-7.
- [176] E. Höglund, Ø. Øverli, and S. Winberg, "Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: A comparative review," *Frontiers in Endocrinology*, vol. 10, p. 158, 2019, doi: 10.3389/fendo.2019.00158.

Referencias

- [177] S. Schaffer, H. Asseburg, S. Kuntz, W. E. Müller, and G. P. Eckert, "Effects of polyphenols on brain ageing and Alzheimer's disease: Focus on mitochondria," *Molecular Neurobiology*, vol. 46, no. 1, pp. 161–178, 2012, doi: 10.1007/s12035-012-8282-9.
- [178] S. Schaffer, W. E. Müller, and G. P. Eckert, "Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells," *Pharmacological Research*, vol. 62, no. 4, pp. 322–327, 2010, doi: 10.1016/j.phrs.2010.06.004.
- [179] M. Robles-Almazan *et al.*, "Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications," *Food Research International*, vol. 105, pp. 654–667, 2018, doi: 10.1016/j.foodres.2017.11.053.
- [180] M. A. Martin *et al.*, "Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxifying enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/ protein kinase B pathways in HepG2 cells," *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 54, no. 7, pp. 956–966, 2010, doi: 10.1002/mnfr.200900159.
- [181] D. S. Goldstein, Y. Jinsmaa, P. Sullivan, C. Holmes, I. J. Kopin, and Y. Sharabi, "3,4-Dihydroxyphenylethanol (Hydroxytyrosol) Mitigates the Increase in Spontaneous Oxidation of Dopamine During Monoamine Oxidase Inhibition in PC12 Cells," *Neurochemical Research*, vol. 41, no. 9, pp. 2173–2178, 2016, doi: 10.1007/s11064-016-1959-0.
- [182] G. Yu, A. Deng, W. Tang, J. Ma, C. Yuan, and J. Ma, "Hydroxytyrosol induces phase II detoxifying enzyme expression and effectively protects dopaminergic cells against dopamine- and 6-hydroxydopamine induced cytotoxicity," *Neurochemistry International*, vol. 96, pp. 113–120, 2016, doi: 10.1016/j.neuint.2016.03.005.
- [183] E. Gallardo, A. Madrona, R. Palma-Valdés, M. Trujillo, J. L. Espartero, and M. Santiago, "The effect of hydroxytyrosol and its nitroderivatives on catechol-O-methyl transferase activity in rat striatal tissue," *RSC Advances*, vol. 4, no. 105, pp. 61086–61091, 2014, doi: 10.1039/c4ra09872b.
- [184] E. Gallardo, A. Madrona, R. Palma-Valdés, J. L. Espartero, and M. Santiago, "Effect of intracerebral hydroxytyrosol and its nitroderivatives on striatal dopamine metabolism: A study by in vivo microdialysis," *Life Sciences*, vol. 134, pp. 30–35, 2015, doi: 10.1016/j.lfs.2015.04.026.
- [185] M. Huotari *et al.*, "Effect of intracerebral 6-nitronoradrenaline, an endogenous catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibitor, on striatal dopamine metabolism in anaesthetised rats," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 109, no. 1, pp. 47–52, 2001, doi: 10.1016/S0165-0270(01)00400-9.
- [186] E. Gallardo, R. Palma-Valdés, J. L. Espartero, and M. Santiago, "In vivo striatal measurement of hydroxytyrosol, and its metabolite (homovanillic alcohol), compared with its derivative nitrohydroxytyrosol," *Neuroscience Letters*, vol. 579, pp. 173–176, 2014, doi: 10.1016/j.neulet.2014.07.037.

- [187] R. de La Torre *et al.*, "Protective effect of homovanillyl alcohol on cardiovascular disease and total mortality: Virgin olive oil, wine, and catechol-methylthion," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 105, no. 6, pp. 1297–1304, 2017, doi: 10.3945/ajcn.116.145813.
- [188] R. P. Kesner, I. Lee, and P. Gilbert, "A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis," *Reviews in the Neurosciences*, vol. 15, no. 5, pp. 333–351, 2004, doi: 10.1515/REVNEURO.2004.15.5.333.
- [189] O. Lazarov and C. Hollands, "Hippocampal neurogenesis: Learning to remember," *Progress in Neurobiology*, vol. 138–140, pp. 1–18, 2016, doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.12.006.
- [190] J. T. Gonçalves, S. T. Schafer, and F. H. Gage, "Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior," *Cell*, vol. 167, no. 4, pp. 897–914, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.10.021.
- [191] C. L. Linster *et al.*, "Ethylmalonyl-CoA Decarboxylase, a New Enzyme Involved in Metabolite Proofreading," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 50, pp. 42992–43003, 2011, doi: 10.1074/JBC.M111.281527.
- [192] E. Horna-Terrón, A. Pradilla-Dieste, C. Sánchez-de-Diego, and J. Osada, "TXNDC5, a Newly Discovered Disulfide Isomerase with a Key Role in Cell Physiology and Pathology," *International Journal of Molecular Sciences 2014, Vol. 15, Pages 23501-23518*, vol. 15, no. 12, pp. 23501–23518, 2014, doi: 10.3390/IJMS151223501.
- [193] C. M. de Arrieta, L. P. Jurado, J. Bernal, and A. Coloma, "Structure, Organization, and Chromosomal Mapping of the Human Neurogranin Gene (NRGN)," *Genomics*, vol. 41, no. 2, pp. 243–249, 1997, doi: 10.1006/GENO.1997.4622.
- [194] A. S. Bie *et al.*, "Effects of a Mutation in the HSPE1 Gene Encoding the Mitochondrial Co-chaperonin HSP10 and Its Potential Association with a Neurological and Developmental Disorder," *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 3, p. 65, 2016, doi: 10.3389/FMOLB.2016.00065.
- [195] A. F. Theil *et al.*, "Bi-allelic TARS Mutations Are Associated with Brittle Hair Phenotype," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 105, no. 2, pp. 434–440, 2019, doi: 10.1016/J.AJHG.2019.06.017.
- [196] J. Rappsilber, U. Ryder, A. I. Lamond, and M. Mann, "Large-Scale Proteomic Analysis of the Human Spliceosome," *Genome Research*, vol. 12, no. 8, pp. 1231–1245, 2002, doi: 10.1101/GR.473902.
- [197] M. T. Nakamura, B. E. Yudell, and J. J. Loor, "Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids," *Progress in Lipid Research*, vol. 53, no. 1, pp. 124–144, 2014, doi: 10.1016/J.PLIPRES.2013.12.001.
- [198] J. C. Velasquez, N. Goeden, and A. Bonnin, "Placental serotonin: implications for the developmental effects of SSRIs and maternal depression.," *Frontiers in cellular neuroscience*, vol. 7, p. 47, 2013, doi: 10.3389/fncel.2013.00047.

Referencias

- [199] J. St-Pierre, L. Laurent, S. King, and C. Vaillancourt, "Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development," *Placenta*, vol. 48 Suppl 1, pp. S66–S71, 2016, doi: 10.1016/j.placenta.2015.11.013.
- [200] L. C. Berumen, A. Rodríguez, R. Miledi, and G. García-Alcocer, "Serotonin Receptors in Hippocampus," *The Scientific World Journal*, vol. 2012, pp. 1–15, 2012, doi: 10.1100/2012/823493.
- [201] A. Jensen, H. Klönne, A. Detmer, and A. Carter, "Catecholamine and serotonin concentrations in fetal guinea-pig brain: relation to regional cerebral blood flow and oxygen delivery in the growth-restricted fetus," *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 8, no. 3, p. 355, 1996, doi: 10.1071/RD9960355.
- [202] G. G. Manjarrez, V. M. Magdaleno, G. Chagoya, and J. Hernández-r, "Nutritional recovery does not reverse the activation of brain serotonin synthesis in the ontogenetically malnourished rat," *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 14, no. 5, pp. 641–648, 1996, doi: 10.1016/0736-5748(96)00028-7.
- [203] R. Bauer, B. Walter, P. Brust, F. Füchtner, and U. Zwiener, "Impact of asymmetric intrauterine growth restriction on organ function in newborn piglets," *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 110, pp. S40–S49, 2003, doi: 10.1016/S0301-2115(03)00171-4.
- [204] R. Geva, Y. Leitner, and S. Harel, "Children Born with Intrauterine Growth Restriction: Neurodevelopmental Outcome," in *Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease*, New York: Springer New York, 2012, pp. 193–208. doi: 10.1007/978-1-4419-1795-9_12.
- [205] M. Frotscher and L. Seress, "Morphological development of the hippocampus," in *The hippocampus book*, O. J. Amaral DG, Andersen P, Bliss T, Morris RGM, Ed. Oxford University Press, 2007, pp. 115–131.
- [206] P. S. Eriksson *et al.*, "Neurogenesis in the adult human hippocampus.," *Nature medicine*, vol. 4, no. 11, pp. 1313–1317, 1998, doi: 10.1038/3305.
- [207] E. R. Kandel, Y. Dudai, and M. R. Mayford, "The Molecular and Systems Biology of Memory," *Cell*, vol. 157, no. 1, pp. 163–186, 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.03.001.
- [208] D. Dupret *et al.*, "Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis.," *PloS one*, vol. 3, no. 4, p. e1959, 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0001959.
- [209] A. L. Cumberland, H. K. Palliser, P. Rani, D. W. Walker, and J. J. Hirst, "Effects of combined IUGR and prenatal stress on the development of the hippocampus in a fetal guinea pig model," *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, vol. 8, no. 5, pp. 584–596, 2017, doi: 10.1017/S2040174417000307.
- [210] P. J. Morgane, D. J. Mokler, and J. R. Galler, "Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation," *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 26, no. 4, pp. 471–483, 2002, doi: 10.1016/S0149-7634(02)00012-X.

- [211] C. Mallard, M. Loeliger, D. Copolov, and S. Rees, "Reduced number of neurons in the hippocampus and the cerebellum in the postnatal guinea-pig following intrauterine growth-restriction.," *Neuroscience*, vol. 100, no. 2, pp. 327–333, 2000, doi: 10.1016/S0306-4522(00)00271-2.
- [212] S. Dieni and S. Rees, "Dendritic morphology is altered in hippocampal neurons following prenatal compromise.," *Journal of neurobiology*, vol. 55, no. 1, pp. 41–52, 2003, doi: 10.1002/neu.10194.
- [213] A. Basilio, J. Yager, and M. G. Fehlings, "Neurological outcomes of animal models of uterine artery ligation and relevance to human intrauterine growth restriction: a systematic review.," *Developmental medicine and child neurology*, vol. 57, no. 5, pp. 420–430, 2015, doi: 10.1111/dmcn.12599.
- [214] L. M. Besser *et al.*, "Body mass index, weight change, and clinical progression in mild cognitive impairment and alzheimer disease," *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, vol. 28, no. 1, pp. 36–43, 2014, doi: 10.1097/WAD.0000000000000005.
- [215] I. D. Bloor and M. E. Symonds, "Sexual dimorphism in white and brown adipose tissue with obesity and inflammation," *Hormones and Behavior*, vol. 66, no. 1, pp. 95–103, 2014, doi: 10.1016/J.YHBEH.2014.02.007.
- [216] S. J. Leigh and M. J. Morris, "Diet, inflammation and the gut microbiome: Mechanisms for obesity-associated cognitive impairment," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1866, no. 6, p. 165767, 2020, doi: 10.1016/J.BBADIS.2020.165767.
- [217] H. Ahmed *et al.*, "A free-choice high-fat, high-sucrose diet induces hyperphagia, obesity, and cardiovascular dysfunction in female cycling and pregnant rats," *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, vol. 316, no. 5, pp. R472–R485, 2019, doi: 10.1152/AJPREGU.00391.2018.
- [218] K. H. Alzoubi, F. A. Mayyas, R. Mahafzah, and O. F. Khabour, "Melatonin prevents memory impairment induced by high-fat diet: Role of oxidative stress," *Behavioural Brain Research*, vol. 336, pp. 93–98, 2018, doi: 10.1016/J.BBR.2017.08.047.
- [219] E. L. Underwood and L. T. Thompson, "A high-fat diet causes impairment in hippocampal memory and sex-dependent alterations in peripheral metabolism," *Neural Plasticity*, vol. 2016, p. 7385314, 2016, doi: 10.1155/2016/7385314.
- [220] S. Wang *et al.*, "Chronic rhin treatment improves recognition memory in high-fat diet-induced obese male mice," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 36, pp. 42–50, 2016, doi: 10.1016/J.JNUTBIO.2016.07.008.
- [221] J. E. Beilharz, N. O. Kaakoush, J. Maniam, and M. J. Morris, "The effect of short-term exposure to energy-matched diets enriched in fat or sugar on memory, gut microbiota and markers of brain inflammation and plasticity," *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 57, pp. 304–313, 2016, doi: 10.1016/J.BBI.2016.07.151.

Referencias

- [222] R. N. Dharavath, S. Arora, M. Bishnoi, K. K. Kondepudi, and K. Chopra, "High fat-low protein diet induces metabolic alterations and cognitive dysfunction in female rats," *Metabolic Brain Disease*, vol. 34, no. 6, pp. 1531–1546, 2019, doi: 10.1007/S11011-019-00459-4.
- [223] S. Duthheil, K. T. Ota, E. S. Wohleb, K. Rasmussen, and R. S. Duman, "High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation," *Neuropsychopharmacology*, vol. 41, no. 7, pp. 1874–1887, 2015, doi: 10.1038/npp.2015.357.
- [224] B. Pletzer, T.-A. Harris, A. Scheuringer, and E. Hidalgo-Lopez, "The cycling brain: menstrual cycle related fluctuations in hippocampal and fronto-striatal activation and connectivity during cognitive tasks," *Neuropsychopharmacology*, vol. 44, no. 11, pp. 1867–1875, 2019, doi: 10.1038/s41386-019-0435-3.
- [225] V. v. Bol, A.-I. Delattre, B. Reusens, M. Raes, and C. Remacle, "Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice," *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, vol. 297, no. 2, pp. 291–299, 2009, doi: 10.1152/AJPREGU.90497.2008.
- [226] M. H. Vickers, B. H. Breier, W. S. Cutfield, P. L. Hofman, and P. D. Gluckman, "Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition," *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, vol. 279, no. 1, pp. E83–E87, 2000, doi: 10.1152/AJPENDO.2000.279.1.E83.
- [227] L. C. de A. Silva, A. C. de Oliveira, V. Cavalcante-Silva, M. do C. Franco, and V. D'Almeida, "Hyperlipidic diet affects body composition and induces anxiety-like behaviour in intrauterine growth-restricted adult mice," *Experimental Physiology*, vol. 105, no. 12, pp. 2061–2072, 2020, doi: 10.1113/EP088859.
- [228] S. Intapad, J. H. Dasinger, J. M. Johnson, A. D. Brown, N. B. Ojeda, and B. T. Alexander, "Male and Female Intrauterine Growth-Restricted Offspring Differ in Blood Pressure, Renal Function, and Glucose Homeostasis Responses to a Postnatal Diet High in Fat and Sugar," *Hypertension*, vol. 73, no. 3, pp. 620–629, 2019, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12134.
- [229] Y. Wu, G. Yin, P. Wang, Z. Huang, and S. Lin, "Effects of different diet-induced postnatal catch-up growth on glycolipid metabolism in intrauterine growth retardation male rats," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 20, no. 6, 2020, doi: 10.3892/ETM.2020.9263.
- [230] G. v Araújo de França *et al.*, "Associations of birth weight, linear growth and relative weight gain throughout life with abdominal fat depots in adulthood: the 1982 Pelotas (Brazil) birth cohort study," *International Journal of Obesity*, vol. 40, no. 1, pp. 14–21, 2015, doi: 10.1038/ijo.2015.192.

- [231] W. K. Cho and B.-K. Suh, "Catch-up growth and catch-up fat in children born small for gestational age," *Korean Journal of Pediatrics*, vol. 59, no. 1, pp. 1–7, 2016, doi: 10.3345/KJP.2016.59.1.1.
- [232] J. M. Ramos-Nieves, S. L. Giesy, M. M. McGuckin, and Y. R. Boisclair, "Effects of birth weight and dietary fat on intake, body composition, and plasma thyroxine in neonatal lambs," *Journal of Animal Science*, vol. 98, no. 12, 2020, doi: 10.1093/JAS/SKAA364.
- [233] P. W. S. Chiou and R. M. Jordan, "Ewe Milk Replacer Diets for Young Lambs. IV. Protein and Energy Requirements of Young Lambs," *Journal of Animal Science*, vol. 37, no. 2, pp. 581–587, 1973, doi: 10.2527/JAS1973.372581X.
- [234] E. Abrams, P. Guthrie, and B. Harris, "Effect of Dry Matter Intake from Whole Goat Milk and Calf Milk Replacer on Performance of Nubian Goat Kids," *Journal of Dairy Science*, vol. 68, no. 7, pp. 1748–1751, 1985, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(85)81022-5.
- [235] A. J. Hulbert, N. Turner, L. H. Storlien, and P. L. Else, "Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease," *Biological Reviews*, vol. 80, no. 1, pp. 155–169, 2005, doi: 10.1017/S1464793104006578.
- [236] P. L. Greenwood, A. S. Hunt, J. W. Hermanson, and A. W. Bell, "Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: I. Body growth and composition, and some aspects of energetic efficiency," *Journal of Animal Science*, vol. 76, no. 9, pp. 2354–2367, 1998, doi: 10.2527/1998.7692354X.
- [237] E. D. Rosen and B. M. Spiegelman, "Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis," *Nature*, vol. 444, no. 7121, pp. 847–853, 2006, doi: 10.1038/NATURE05483.
- [238] S. R. Thorn, P. J. Rozance, L. D. Brown, and W. W. Hay, "The Intrauterine Growth Restriction Phenotype: Fetal Adaptations and Potential Implications for Later Life Insulin Resistance and Diabetes," *Seminars in Reproductive Medicine*, vol. 29, no. 03, pp. 225–236, 2011, doi: 10.1055/S-0031-1275516.
- [239] O. E. Owen, S. C. Kalhan, and R. W. Hanson, "The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 34, pp. 30409–30412, 2002, doi: 10.1074/JBC.R200006200.
- [240] Z. X. Xie, S. F. Xia, Y. Qiao, Y. H. Shi, and G. W. Le, "Effect of GABA on oxidative stress in the skeletal muscles and plasma free amino acids in mice fed high-fat diet," *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, vol. 99, no. 3, pp. 492–500, 2015, doi: 10.1111/JPN.12254.
- [241] I. Samarra *et al.*, "Gender-Related Differences on Polyamine Metabolome in Liquid Biopsies by a Simple and Sensitive Two-Step Liquid-Liquid Extraction and LC-MS/MS," *Biomolecules*, vol. 9, no. 12, p. 779, 2019, doi: 10.3390/BIOM9120779.
- [242] A. Stępniewska, K. Tutaj, J. Juśkiewicz, and K. Ognik, "Effect of a high-fat diet and chromium on hormones level and Cr retention in rats," *Journal of Endocrinological Investigation*, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1007/S40618-021-01677-3.

Referencias

- [243] H.-J. Kim *et al.*, "Metabolomic Analysis of Livers and Serum from High-Fat Diet Induced Obese Mice," *Journal of Proteome Research*, vol. 10, no. 2, pp. 722–731, 2010, doi: 10.1021/PR100892R.
- [244] R. L. Bertrand *et al.*, "A Western Diet Increases Serotonin Availability in Rat Small Intestine," *Endocrinology*, vol. 152, no. 1, pp. 36–47, 2011, doi: 10.1210/EN.2010-0377.
- [245] M. Fukui *et al.*, "High Plasma 5-Hydroxyindole-3-Acetic Acid Concentrations in Subjects With Metabolic Syndrome," *Diabetes Care*, vol. 35, no. 1, pp. 163–167, 2012, doi: 10.2337/DC11-1619.
- [246] T. Takahashi *et al.*, "Sarpogrelate hydrochloride, a serotonin_{2A} receptor antagonist, reduces albuminuria in diabetic patients with early-stage diabetic nephropathy," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 58, no. 2, pp. 123–129, 2002, doi: 10.1016/S0168-8227(02)00105-5.
- [247] D. Valent *et al.*, "Effects of a high-fat-diet supplemented with probiotics and ω 3-fatty acids on appetite regulatory neuropeptides and neurotransmitters in a pig model," *Beneficial microbes*, vol. 11, no. 4, pp. 347–359, 2020, doi: 10.3920/BM2019.0197.
- [248] D. D. Lam, A. S. Garfield, O. J. Marston, J. Shaw, and L. K. Heisler, "Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight," *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 97, no. 1, pp. 84–91, 2010, doi: 10.1016/J.PBB.2010.09.003.
- [249] D. J. Haleem and K. Mahmood, "Brain serotonin in high-fat diet-induced weight gain, anxiety and spatial memory in rats," *Nutritional neuroscience*, vol. 24, no. 3, pp. 226–235, 2019, doi: 10.1080/1028415X.2019.1619983.
- [250] J. H. Yu and M.-S. Kim, "Molecular Mechanisms of Appetite Regulation," *Diabetes & Metabolism Journal*, vol. 36, no. 6, pp. 391–398, 2012, doi: 10.4093/DMJ.2012.36.6.391.
- [251] M. M. Meguid *et al.*, "Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake," *Nutrition*, vol. 16, no. 10, pp. 843–857, 2000, doi: 10.1016/S0899-9007(00)00449-4.
- [252] M. W. Schwartz, S. C. Woods, D. Porte, R. J. Seeley, and D. G. Baskin, "Central nervous system control of food intake," *Nature 2000 404:6778*, vol. 404, no. 6778, pp. 661–671, 2000, doi: 10.1038/35007534.
- [253] M. J. Morris, H. Chen, R. Watts, A. Shulkes, and D. Cameron-Smith, "Brain neuropeptide Y and CCK and peripheral adipokine receptors: temporal response in obesity induced by palatable diet," *International Journal of Obesity*, vol. 32, no. 2, pp. 249–258, 2007, doi: 10.1038/sj.ijo.0803716.
- [254] M. C. R. Gumbs, J. K. van den Heuvel, and S. E. la Fleur, "The effect of obesogenic diets on brain Neuropeptide Y," *Physiology & Behavior*, vol. 162, pp. 161–173, 2016, doi: 10.1016/J.PHYSBEH.2016.04.049.

- [255] A. Stricker-Krongrad, F. Cumin, C. Bulet, and B. Beck, "Hypothalamic neuropeptide Y and plasma leptin after long-term high-fat feeding in the rat," *Neuroscience Letters*, vol. 254, no. 3, pp. 157–160, 1998, doi: 10.1016/S0304-3940(98)00678-8.
- [256] B. Dziedzic, J. Szemraj, J. Bartkowiak, and A. Walczewska, "Various Dietary Fats Differentially Change the Gene Expression of Neuropeptides Involved in Body Weight Regulation in Rats," *Journal of Neuroendocrinology*, vol. 19, no. 5, pp. 364–373, 2007, doi: 10.1111/J.1365-2826.2007.01541.X.
- [257] M. Ziotopoulou, C. S. Mantzoros, S. M. Hileman, and J. S. Flier, "Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice," *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, vol. 279, no. 4, pp. 838–845, 2000, doi: 10.1152/AJPENDO.2000.279.4.E838.
- [258] H. Li, A. Fernández-Guasti, Y. Xu, and D. Swaab, "Sexual orientation, neuropsychiatric disorders and the neurotransmitters involved," *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 131, pp. 479–488, 2021, doi: 10.1016/J.NEUBIOREV.2021.09.048.
- [259] M. Spies, P. A. Handschuh, R. Lanzenberger, and G. S. Kranz, "Sex and the serotonergic underpinnings of depression and migraine," in *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 175, Elsevier, 2020, pp. 117–140. doi: 10.1016/B978-0-444-64123-6.00009-6.
- [260] D. F. Swaab and A. M. Bao, "Sex differences in stress-related disorders: Major depressive disorder, bipolar disorder, and posttraumatic stress disorder," in *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 175, Elsevier, 2020, pp. 335–358. doi: 10.1016/B978-0-444-64123-6.00023-0.
- [261] M. D. Manole, R. Tehranian-DePasquale, L. Du, H. Bayir, P. M. Kochanek, and R. S.B. Clark, "Unmasking Sex-Based Disparity in Neuronal Metabolism," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 17, no. 35, pp. 3854–3860, 2011, doi: 10.2174/138161211798357737.
- [262] C. E. Aiken and S. E. Ozanne, "Sex differences in developmental programming models," *Reproduction*, vol. 145, no. 1, pp. R1–R13, 2013, doi: 10.1530/REP-11-0489.
- [263] L. Du *et al.*, "Starving Neurons Show Sex Difference in Autophagy," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 4, pp. 2383–2396, 2009, doi: 10.1074/JBC.M804396200.
- [264] L. Zhang, W. Ma, J. L. Barker, and D. R. Rubinow, "Sex differences in expression of serotonin receptors (subtypes 1A and 2A) in rat brain: a possible role of testosterone," *Neuroscience*, vol. 94, no. 1, pp. 251–259, 1999, doi: 10.1016/S0306-4522(99)00234-1.
- [265] S. Nishizawa *et al.*, "Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 10, pp. 5308–5313, 1997, doi: 10.1073/PNAS.94.10.5308.

Referencias

- [266] P. Dewing *et al.*, “Direct Regulation of Adult Brain Function by the Male-Specific Factor SRY,” *Current Biology*, vol. 16, no. 4, pp. 415–420, 2006, doi: 10.1016/J.CUB.2006.01.017.
- [267] S. McArthur, E. McHale, and G. E. Gillies, “The Size and Distribution of Midbrain Dopaminergic Populations are Permanently Altered by Perinatal Glucocorticoid Exposure in a Sex- Region- and Time-Specific Manner,” *Neuropsychopharmacology*, vol. 32, no. 7, pp. 1462–1476, 2006, doi: 10.1038/sj.npp.1301277.
- [268] A. Almey, T. A. Milner, and W. G. Brake, “Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females,” *Hormones and Behavior*, vol. 74, pp. 125–138, 2015, doi: 10.1016/J.YHBEH.2015.06.010.
- [269] A. Almey, E. J. Filardo, T. A. Milner, and W. G. Brake, “Estrogen Receptors Are Found in Glia and at Extranuclear Neuronal Sites in the Dorsal Striatum of Female Rats: Evidence for Cholinergic But Not Dopaminergic Colocalization,” *Endocrinology*, vol. 153, no. 11, pp. 5373–5383, 2012, doi: 10.1210/EN.2012-1458.
- [270] L. Xiao and J. B. Becker, “Quantitative microdialysis determination of extracellular striatal dopamine concentration in male and female rats: effects of estrous cycle and gonadectomy,” *Neuroscience Letters*, vol. 180, no. 2, pp. 155–158, 1994, doi: 10.1016/0304-3940(94)90510-X.
- [271] M. M. Wickens, D. A. Bangasser, and L. A. Briand, “Sex Differences in Psychiatric Disease: A Focus on the Glutamate System,” *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol. 11, p. 197, 2018, doi: 10.3389/FNMOL.2018.00197.
- [272] N. Sailasuta, T. Ernst, and L. Chang, “Regional variations and the effects of age and gender on glutamate concentrations in the human brain,” *Magnetic Resonance Imaging*, vol. 26, no. 5, pp. 667–675, 2008, doi: 10.1016/J.MRI.2007.06.007.
- [273] R. Chianese *et al.*, “Impact of Dietary Fats on Brain Functions,” *Current Neuropharmacology*, vol. 16, no. 7, p. 1059, 2018, doi: 10.2174/1570159X15666171017102547.
- [274] M. K. Shimabukuro *et al.*, “Lipid-laden cells differentially distributed in the aging brain are functionally active and correspond to distinct phenotypes,” *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1038/srep23795.
- [275] L. R. Squire, L. Genzel, J. T. Wixted, and R. G. Morris, “Memory Consolidation,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 7, no. 8, p. a021766, 2015, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A021766.
- [276] C. Anacker and R. Hen, “Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility — linking memory and mood,” *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 18, no. 6, pp. 335–346, 2017, doi: 10.1038/nrn.2017.45.
- [277] S. E. Kanoski and T. L. Davidson, “Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity,” *Physiology & Behavior*, vol. 103, no. 1, pp. 59–68, 2011, doi: 10.1016/J.PHYSBEH.2010.12.003.

- [278] M. R. Yeomans, "Adverse effects of consuming high fat–sugar diets on cognition: implications for understanding obesity," *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 76, no. 4, pp. 455–465, 2017, doi: 10.1017/S0029665117000805.
- [279] K. Schmitt, E. Holsboer-Trachsler, and A. Eckert, "BDNF in sleep, insomnia, and sleep deprivation," *Annals of medicine*, vol. 48, no. 1–2, pp. 42–51, 2016, doi: 10.3109/07853890.2015.1131327.
- [280] J. Yang *et al.*, "Neurotrophin 3 Transduction Augments Remyelinating and Immunomodulatory Capacity of Neural Stem Cells," *Molecular Therapy*, vol. 22, no. 2, pp. 440–450, 2014, doi: 10.1038/MT.2013.241.
- [281] R. Molteni, R. J. Barnard, Z. Ying, C. K. Roberts, and F. Gómez-Pinilla, "A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning," *Neuroscience*, vol. 112, no. 4, pp. 803–814, 2002, doi: 10.1016/S0306-4522(02)00123-9.
- [282] A. Wu, R. Molteni, Z. Ying, and F. Gomez-Pinilla, "A saturated-fat diet aggravates the outcome of traumatic brain injury on hippocampal plasticity and cognitive function by reducing brain-derived neurotrophic factor," *Neuroscience*, vol. 119, no. 2, pp. 365–375, 2003, doi: 10.1016/S0306-4522(03)00154-4.
- [283] A. D. Goldbart, B. W. Row, L. Kheirandish-Gozal, Y. Cheng, K. R. Brittan, and D. Gozal, "High fat/refined carbohydrate diet enhances the susceptibility to spatial learning deficits in rats exposed to intermittent hypoxia," *Brain Research*, vol. 1090, no. 1, pp. 190–196, 2006, doi: 10.1016/J.BRAINRES.2006.03.046.
- [284] A. M. Stranahan *et al.*, "Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats," *Hippocampus*, vol. 18, no. 11, pp. 1085–1088, 2008, doi: 10.1002/HIPO.20470.
- [285] A. Yaseen, K. Shrivastava, Z. Zuri, O. A. Hatoum, and M. Maroun, "Prefrontal Oxytocin is Involved in Impairments in Prefrontal Plasticity and Social Memory Following Acute Exposure to High Fat Diet in Juvenile Animals," *Cerebral Cortex*, vol. 29, no. 5, pp. 1900–1909, 2019, doi: 10.1093/CERCOR/BHY070.
- [286] T. Khazen, O. A. Hatoum, G. Ferreira, and M. Maroun, "Acute exposure to a high-fat diet in juvenile male rats disrupts hippocampal-dependent memory and plasticity through glucocorticoids," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-48800-2.
- [287] I. Valladolid-Acebes *et al.*, "Spatial memory impairment and changes in hippocampal morphology are triggered by high-fat diets in adolescent mice. Is there a role of leptin?," *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 106, pp. 18–25, 2013, doi: 10.1016/J.NLM.2013.06.012.
- [288] C. Boitard *et al.*, "Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats," *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 40, pp. 9–17, 2014, doi: 10.1016/J.BBI.2014.03.005.

Referencias

- [289] A. Vinuesa *et al.*, "Juvenile exposure to a high fat diet promotes behavioral and limbic alterations in the absence of obesity," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 72, pp. 22–33, 2016, doi: 10.1016/J.PSYNEUEN.2016.06.004.
- [290] D. Nolfi-Donagan, A. Braganza, and S. Shiva, "Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement," *Redox Biology*, vol. 37, p. 101674, 2020, doi: 10.1016/J.REDOX.2020.101674.
- [291] L. M. Sparks *et al.*, "A High-Fat Diet Coordinately Downregulates Genes Required for Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Skeletal Muscle," *Diabetes*, vol. 54, no. 7, pp. 1926–1933, 2005, doi: 10.2337/DIABETES.54.7.1926.
- [292] M. S. Choi, Y. J. Kim, E. Y. Kwon, J. Y. Ryoo, S. R. Kim, and U. J. Jung, "High-fat diet decreases energy expenditure and expression of genes controlling lipid metabolism, mitochondrial function and skeletal system development in the adipose tissue, along with increased expression of extracellular matrix remodelling- and inflamm," *British Journal of Nutrition*, vol. 113, no. 6, pp. 867–877, 2015, doi: 10.1017/S0007114515000100.
- [293] C. Bonnard *et al.*, "Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 2, pp. 789–800, 2008, doi: 10.1172/JCI32601.
- [294] E. Phielix *et al.*, "Lower Intrinsic ADP-Stimulated Mitochondrial Respiration Underlies In Vivo Mitochondrial Dysfunction in Muscle of Male Type 2 Diabetic Patients," *Diabetes*, vol. 57, no. 11, pp. 2943–2949, 2008, doi: 10.2337/DB08-0391.
- [295] V. B. Schrauwen-Hinderling *et al.*, "Impaired in vivo mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects," *Diabetologia*, vol. 50, no. 1, pp. 113–120, 2007, doi: 10.1007/S00125-006-0475-1/FIGURES/5.
- [296] K. F. Petersen, S. Dufour, D. Befroy, R. Garcia, and G. I. Shulman, "Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes," *The New England Journal of Medicine*, vol. 350, no. 7, pp. 664–671, 2009, doi: 10.1056/NEJMOA031314.
- [297] V. K. Mootha *et al.*, "PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes," *Nature Genetics*, vol. 34, no. 3, pp. 267–273, Jun. 2003, doi: 10.1038/ng1180.
- [298] D. E. Kelley, J. He, E. v. Menshikova, and V. B. Ritov, "Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes," *Diabetes*, vol. 51, no. 10, pp. 2944–2950, 2002, doi: 10.2337/DIABETES.51.10.2944.
- [299] M. E. Patti *et al.*, "Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, no. 14, pp. 8466–8471, 2003, doi: 10.1073/PNAS.1032913100.

- [300] S. McCroskery, A. Bailey, L. Lin, and M. P. Daniels, "Transmembrane agrin regulates dendritic filopodia and synapse formation in mature hippocampal neuron cultures," *Neuroscience*, vol. 163, no. 1, pp. 168–179, 2009, doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.06.012.
- [301] S. Schöber *et al.*, "The Role of Extracellular and Cytoplasmic Splice Domains of α 7-Integrin in Cell Adhesion and Migration on Laminins," *Experimental Cell Research*, vol. 255, no. 2, pp. 303–313, 2000, doi: 10.1006/EXCR.2000.4806.
- [302] Y. Zhang, K. Chen, Y. Tu, and C. Wu, "Distinct Roles of Two Structurally Closely Related Focal Adhesion Proteins, α -Parvins and β -Parvins, in Regulation of Cell Morphology and Survival," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 40, pp. 41695–41705, 2004, doi: 10.1074/JBC.M401563200.
- [303] P. Bornstein and E. H. Sage, "Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 14, no. 5, pp. 608–616, 2002, doi: 10.1016/S0955-0674(02)00361-7.
- [304] D. K. Richardson *et al.*, "Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 11, pp. 10290–10297, 2005, doi: 10.1074/JBC.M408985200/ATTACHMENT/1E07839F-CC6B-4CE0-ABF7-9ADF7AA943EC/MMC1.PDF.
- [305] Q. Pan, O. Shai, L. J. Lee, B. J. Frey, and B. J. Blencowe, "Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing," *Nature Genetics*, vol. 40, no. 12, pp. 1413–1415, 2008, doi: 10.1038/ng.259.
- [306] E. T. Wang *et al.*, "Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes," *Nature*, vol. 456, no. 7221, pp. 470–476, 2008, doi: 10.1038/nature07509.
- [307] T. W. Nilsen and B. R. Graveley, "Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing," *Nature*, vol. 463, no. 7280, pp. 457–463, 2010, doi: 10.1038/nature08909.
- [308] X. Yang *et al.*, "Widespread Expansion of Protein Interaction Capabilities by Alternative Splicing," *Cell*, vol. 164, no. 4, pp. 805–817, 2016, doi: 10.1016/J.CELL.2016.01.029.
- [309] J. N. Brutman *et al.*, "Mapping diet-induced alternative polyadenylation of hypothalamic transcripts in the obese rat," *Physiology & Behavior*, vol. 188, pp. 173–180, 2018, doi: 10.1016/J.PHYSBEH.2018.01.026.
- [310] M. Takalo *et al.*, "High-fat diet increases tau expression in the brain of T2DM and AD mice independently of peripheral metabolic status," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 25, no. 6, pp. 634–641, 2014, doi: 10.1016/J.JNUTBIO.2014.02.003.
- [311] J. M. Walker and F. E. Harrison, "Shared Neuropathological Characteristics of Obesity, Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease: Impacts on Cognitive Decline," *Nutrients*, vol. 7, no. 9, p. 7332, 2015, doi: 10.3390/NU7095341.

Referencias

- [312] C. Hölscher, "Diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: insulin signalling impairment in the brain as an alternative model of Alzheimer's disease," *Biochemical Society Transactions*, vol. 39, no. 4, pp. 891–897, 2011, doi: 10.1042/BST0390891.
- [313] E. Carro and I. Torres-Aleman, "The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease," *European Journal of Pharmacology*, vol. 490, no. 1–3, pp. 127–133, 2004, doi: 10.1016/J.EJPHAR.2004.02.050.
- [314] J. T. R. Keeney *et al.*, "Cell Cycle Proteins in Brain in Mild Cognitive Impairment: Insights into Progression to Alzheimer Disease," *Neurotoxicity Research*, vol. 22, no. 3, pp. 220–230, 2011, doi: 10.1007/S12640-011-9287-2.
- [315] M. D. Kirkitadze and A. Kowalska, "Molecular mechanisms initiating amyloid beta-fibril formation in Alzheimer's disease.," *Acta biochimica Polonica*, vol. 52, no. 2, pp. 417–423, 2005.
- [316] D. Fanni *et al.*, "The role of neuropathological markers in the interpretation of neuropsychiatric disorders: Focus on fetal and perinatal programming," *Neuroscience Letters*, vol. 669, pp. 75–82, 2018, doi: 10.1016/J.NEULET.2016.10.063.
- [317] G. Faa, M. Manchia, R. Pintus, C. Gerosa, M. A. Marcialis, and V. Fanos, "Fetal programming of neuropsychiatric disorders," *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, vol. 108, no. 3, pp. 207–223, 2016, doi: 10.1002/BDRC.21139.
- [318] H. Querfurth and H.-K. Lee, "Mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes in neurodegeneration," *Molecular Neurodegeneration*, vol. 16, no. 1, pp. 1–25, 2021, doi: 10.1186/S13024-021-00428-5.
- [319] G. Y. Liu and D. M. Sabatini, "mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 21, no. 4, pp. 183–203, 2020, doi: 10.1038/s41580-019-0199-y.
- [320] R. A. Saxton and D. M. Sabatini, "mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease," *Cell*, vol. 168, no. 6, pp. 960–976, 2017, doi: 10.1016/J.CELL.2017.02.004.
- [321] N. Deleyto-Seldas and A. Efeyan, "The mTOR–Autophagy Axis and the Control of Metabolism," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9, p. 655731, 2021, doi: 10.3389/FCELL.2021.655731.
- [322] K. B. Storey and J. M. Storey, "Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls," *Biological Reviews*, vol. 79, no. 1, pp. 207–233, 2004, doi: 10.1017/S1464793103006195.
- [323] Y. Chun and J. Kim, "AMPK–mTOR Signaling and Cellular Adaptations in Hypoxia," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 18, p. 9765, 2021, doi: 10.3390/IJMS22189765.
- [324] B. Hart, E. Morgan, and E. U. Alejandro, "Nutrient sensor signaling pathways and cellular stress in fetal growth restriction," *Journal of molecular endocrinology*, vol. 62, no. 2, pp. R155–R165, 2019, doi: 10.1530/JME-18-0059.

- [325] M. B. Gupta and T. Jansson, "Novel roles of mechanistic target of rapamycin signaling in regulating fetal growth," *Biology of reproduction*, vol. 100, no. 4, pp. 872–884, 2019, doi: 10.1093/BIOLRE/IOY249.
- [326] M. D. Manole, R. Tehranian-DePasquale, L. Du, H. Bayır, P. M. Kochanek, and R. S.B. Clark, "Unmasking Sex-Based Disparity in Neuronal Metabolism," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 17, no. 35, pp. 3854–3860, 2011, doi: 10.2174/138161211798357737.
- [327] L. Du *et al.*, "Starving Neurons Show Sex Difference in Autophagy," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 4, pp. 2383–2396, 2009, doi: 10.1074/JBC.M804396200.
- [328] A. A. B. Badawy, "Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects," *International Journal of Tryptophan Research*, vol. 10, pp. 1–20, 2017, doi: 10.1177/1178646917691938.
- [329] J. Savitz, "The kynurenine pathway: a finger in every pie," *Molecular Psychiatry*, vol. 25, no. 1, pp. 131–147, 2019, doi: 10.1038/s41380-019-0414-4.
- [330] S. Christen, E. Peterhans, and R. Stocker, "Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: Possible implication for inflammatory diseases," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 7, pp. 2506–2510, 1990, doi: 10.1073/pnas.87.7.2506.
- [331] X. Mao *et al.*, "The effect of dietary tryptophan levels on oxidative stress of liver induced by diquat in weaned piglets," *Journal of Animal Science and Biotechnology*, vol. 5, no. 1, pp. 1–7, 2014, doi: 10.1186/2049-1891-5-49.
- [332] S. L. Bolt, N. K. Boyland, D. T. Mlynski, R. James, and D. P. Croft, "Pair housing of dairy calves and age at pairing: Effects on weaning stress, health, production and social networks," *PLoS ONE*, vol. 12, no. 1, pp. 1–18, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0166926.
- [333] E. G. Krause *et al.*, "Hydration state controls stress responsiveness and social behaviors," *Journal of Neuroscience*, vol. 31, no. 14, pp. 5470–5476, 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.6078-10.2011.
- [334] L. E. Hernández-Castellano, R. Özçelik, L. L. Hernandez, and R. M. Bruckmaier, "Short communication: Supplementation of colostrum and milk with 5-hydroxy-L-tryptophan affects immune factors but not growth performance in newborn calves," *Journal of Dairy Science*, vol. 101, no. 1, pp. 794–800, 2018, doi: 10.3168/jds.2017-13501.
- [335] T. C. Birdsall, "5-Hydroxytryptophan: A Clinically-Effective Serotonin Precursor," *Alternative Medicine Review*, vol. 3, no. 4, pp. 271–280, 1998.



APÉNDICES

Tabla Suplementaria 1. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en distintas áreas del cerebro en función de la suplementación materna con el HTX y del sexo a las distintas edades.

		Fetos		Lechones 1 mes		Cerdos 6 meses		
		Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	
Amígdala	NA	CTRL	39,1 ± 3,4 ^a	50,3 ± 3,1 ^b	123,7 ± 39,8	99,3 ± 10,7	108,8 ± 8,3	104,3 ± 7,9
		HTX	29,4 ± 1,8	34,5 ± 3,6	108,8 ± 7,2	133,5 ± 12,5	162,6 ± 19,5	158,9 ± 34,1
	DA	CTRL	211,3 ± 18,5	195,4 ± 16,3	575,0 ± 81,1	453,2 ± 74,5	318,8 ± 75,7	273,7 ± 27,2
		HTX	329,1 ± 48,9	282,2 ± 39,6	365,0 ± 33,5	420,6 ± 34,2	489,7 ± 85,5	313,2 ± 63,0
	DOPAC	CTRL	95,4 ± 5,1	94,2 ± 7,3	158,6 ± 36,2	119,1 ± 12,4	119,7 ± 12,0	109,9 ± 6,7
		HTX	149,3 ± 10,0	134,2 ± 9,2	145,6 ± 5,7	169,0 ± 18,4	154,5 ± 15,6	122,6 ± 26,6
	HVA	CTRL	296,1 ± 14,7	293,4 ± 24,2	399,1 ± 106,1	247,7 ± 26,7	272,4 ± 35,0	269,2 ± 17,7
		HTX	448,5 ± 20,1	409,7 ± 21,3	273,5 ± 27,7	268,6 ± 25,3	359,9 ± 37,1	329,0 ± 78,3
	DOPtotal	CTRL	602,8 ± 32,9	583,0 ± 43,3	1132,8 ± 217,5	820,0 ± 108,2	710,9 ± 119,3	652,8 ± 49,8
		HTX	926,8 ± 68,7	826,1 ± 55,5	784,2 ± 57,1	858,2 ± 68,2	1004,1 ± 130,9	764,8 ± 160,8
	CATtotal	CTRL	641,9 ± 32,6	633,3 ± 42,6	1256,5 ± 255,8	919,3 ± 109,3	819,6 ± 123,2	757,1 ± 56,4
		HTX	956,2 ± 68,0	860,6 ± 56,1	893,0 ± 52,1	991,7 ± 77,3	1166,7 ± 144,5	923,7 ± 193,2
	5-HT	CTRL	319,1 ± 22,4	303,5 ± 15,8	795,3 ± 69,8	696,9 ± 54,0	846,0 ± 66,7	934,9 ± 51,9
		HTX	414,7 ± 25,6	421,2 ± 22,7	876,5 ± 65,2	891,3 ± 60,3	968,8 ± 95,0	1032,9 ± 179,7
	5-HIAA	CTRL	120,3 ± 7,6	104,7 ± 6,9	192,2 ± 12,9	156,9 ± 9,1	181,0 ± 11,4	186,4 ± 9,4
		HTX	164,5 ± 8,1	161,5 ± 8,1	215,5 ± 16,4	188,3 ± 15,6	176,4 ± 23,6	192,0 ± 30,7
	INDtotal	CTRL	439,4 ± 27,7	408,1 ± 20,0	987,5 ± 77,4	853,8 ± 60,2	1027,1 ± 72,0	1121,3 ± 57,9
		HTX	579,3 ± 30,8	582,7 ± 28,3	1092,0 ± 62,5	1079,6 ± 68,5	1145,2 ± 114,5	1224,9 ± 208,6
Corteza Prefrontal	NA	CTRL	26,7 ± 1,7	27,3 ± 1,6	89,2 ± 7,1	83,6 ± 5,7	90,9 ± 5,7	106,4 ± 6,8
		HTX	21,1 ± 1,3	18,2 ± 1,5	101,3 ± 10,3	83,6 ± 4,5	93,7 ± 7,6	107,9 ± 9,0
	DA	CTRL	95,8 ± 17,5	85,9 ± 14,7	14,6 ± 3,6	18,6 ± 5,7	8,0 ± 0,6	10,2 ± 2,3
		HTX	20,4 ± 0,7	19,3 ± 0,9	11,7 ± 4,6	14,8 ± 1,6	8,6 ± 1,5	11,9 ± 2,8
	DOPAC	CTRL	17,9 ± 1,1	16,4 ± 1,8	25,1 ± 4,7	20,7 ± 5,0	15,4 ± 2,3	15,1 ± 1,8
		HTX	26,0 ± 2,1	24,7 ± 2,0	24,0 ± 3,8	19,6 ± 2,0	18,4 ± 3,4	18,4 ± 6,3
	HVA	CTRL	157,0 ± 10,0	157,6 ± 14,1	24,8 ± 1,6	32,2 ± 7,6	39,9 ± 4,8	36,3 ± 4,9
		HTX	244,5 ± 19,6	216,6 ± 16,9	28,9 ± 4,2	26,2 ± 3,3	42,5 ± 6,5	52,5 ± 14,9
	DOPtotal	CTRL	270,7 ± 24,0	259,9 ± 19,1	60,7 ± 18,3	108,8 ± 48,2	63,3 ± 7,0	61,6 ± 6,7
		HTX	290,9 ± 21,8	260,6 ± 18,9	59,6 ± 20,0	57,9 ± 9,1	69,6 ± 8,2	82,8 ± 20,7
	CATtotal	CTRL	297,4 ± 24,7	287,3 ± 19,2	124,0 ± 7,5	198,5 ± 83,2	154,2 ± 10,1	168,0 ± 9,7
		HTX	312,0 ± 21,9	278,8 ± 19,7	135,4 ± 44,1	125,8 ± 15,2	163,2 ± 12,0	190,7 ± 25,4
	5-HT	CTRL	75,0 ± 4,6	78,0 ± 4,2	245,4 ± 18,2	242,3 ± 6,6	252,7 ± 26,2	335,4 ± 58,1
		HTX	99,6 ± 9,2	96,0 ± 7,6	269,2 ± 19,6	253,0 ± 12,6	322,1 ± 29,8	276,0 ± 24,2
	5-HIAA	CTRL	56,9 ± 3,6	58,2 ± 5,1	50,6 ± 3,6	56,3 ± 8,7	63,7 ± 4,9	57,8 ± 4,8
		HTX	97,6 ± 7,4	81,5 ± 4,2	55,6 ± 9,7	44,3 ± 3,1	73,9 ± 5,6	55,4 ± 7,6
	INDtotal	CTRL	131,9 ± 6,4	136,2 ± 7,5	296,0 ± 19,4	298,7 ± 11,7	316,3 ± 29,4	393,2 ± 58,0
		HTX	197,2 ± 12,6	177,5 ± 9,7	324,8 ± 24,5	297,3 ± 14,2	396,0 ± 33,0	331,4 ± 30,7

Apéndices

		Fetos		Lechones 1 mes		Cerdos 6 meses		
		Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	
Hipocampo	NA	CTRL	58,8 ± 3,9	63,1 ± 5,6	91,4 ± 7,1	91,1 ± 4,9	109,0 ± 7,0	111,3 ± 4,6
		HTX	82,1 ± 4,8	80,0 ± 6,7	82,8 ± 5,1	96,5 ± 6,1	120,5 ± 6,5	94,6 ± 11,7
	DA	CTRL	95,4 ± 14,5	101,0 ± 10,6	15,8 ± 4,9	20,0 ± 2,5	50,0 ± 4,9	48,2 ± 5,7
		HTX	91,5 ± 6,2	84,0 ± 7,0	20,7 ± 3,5	19,1 ± 2,3	50,1 ± 7,3	36,2 ± 2,6
	DOPAC	CTRL	51,2 ± 6,8	58,3 ± 12,4	23,2 ± 7,0	12,9 ± 0,8	29,3 ± 1,0	28,0 ± 0,9
		HTX	86,4 ± 13,5	69,6 ± 8,2	17,7 ± 2,7	20,9 ± 3,1	32,8 ± 2,7	30,5 ± 1,8
	HVA	CTRL	205,0 ± 17,2	214,2 ± 21,6	33,0 ± 3,1	37,5 ± 2,5	39,6 ± 1,4	42,1 ± 1,7
		HTX	275,4 ± 17,5	274,5 ± 22,2	39,4 ± 4,2	34,7 ± 2,8	45,3 ± 4,8	48,1 ± 3,9
	DOPtotal	CTRL	351,6 ± 29,0	373,4 ± 35,6	72,0 ± 12,5	70,4 ± 3,7	118,9 ± 5,3	118,2 ± 6,0
		HTX	453,3 ± 25,6	428,0 ± 32,6	77,9 ± 9,1	74,7 ± 6,7	128,2 ± 11,5	114,8 ± 5,7
	CATtotal	CTRL	410,4 ± 31,3	436,6 ± 40,4	163,4 ± 18,3	161,5 ± 7,5	227,8 ± 10,6	229,5 ± 8,4
		HTX	535,4 ± 28,1	508,0 ± 36,8	160,6 ± 13,5	171,2 ± 10,7	248,7 ± 13,6	209,4 ± 12,4
	5-HT	CTRL	172,9 ± 10,9	183,8 ± 11,7	280,2 ± 38,1	255,7 ± 16,2	220,5 ± 14,0	240,3 ± 17,7
		HTX	214,6 ± 14,5	213,1 ± 17,3	259,5 ± 18,3	280,8 ± 22,9	240,0 ± 22,5	232,4 ± 36,6
	5-HIAA	CTRL	87,0 ± 4,8	90,8 ± 7,3	96,2 ± 11,1	93,4 ± 5,8	95,3 ± 5,3	92,3 ± 5,1
		HTX	95,1 ± 3,4	93,0 ± 5,8	98,4 ± 8,8	92,5 ± 6,3	96,9 ± 6,9	96,6 ± 7,1
	INDtotal	CTRL	259,9 ± 14,8	274,5 ± 17,2	376,4 ± 47,3	349,1 ± 19,7	315,8 ± 14,5	332,6 ± 21,1
		HTX	309,7 ± 16,3	306,1 ± 22,0	357,9 ± 22,1	373,3 ± 26,6	336,9 ± 29,1	328,9 ± 37,6

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Unidades ng/g de tejido. Las filas muestran los neurotransmisores y los metabolitos de cada área cerebral en función del tratamiento (CTRL o HTX). Las columnas dividen los animales según la edad y el sexo (hembras o machos). Los superíndices en negrita muestran las diferencias significativas entre los sexos según el tratamiento a cada edad (p < 0,05).

Tabla Suplementaria 2. Concentración de neurotransmisores y sus metabolitos en distintas áreas del cerebro en función del peso corporal al nacer y del sexo en los fetos de 100 días de gestación.

				p-valor			
		Hembras	Machos	Peso	Sexo	Interacción	
Amígdala	NA	NBW	35,40 ± 2,16	42,84 ± 3,00	0,529	0,002	0,111
		LBW	30,76 ± 6,75	46,44 ± 5,37			
	DA	NBW	277,76 ± 29,62	232,71 ± 24,33	0,774	0,896	0,296
		LBW	197,00 ± 23,13	232,07 ± 26,93			
	DOPAC	NBW	124,46 ± 7,30	112,39 ± 7,43	0,213	0,826	0,414
		LBW	95,87 ± 7,29	106,74 ± 13,37			
	HVA	NBW	370,63 ± 17,90	334,78 ± 19,68	0,781	0,854	0,363
		LBW	338,95 ± 28,88	379,20 ± 52,39			
	DOPtotal	NBW	772,85 ± 48,46	679,89 ± 44,70	0,769	0,891	0,263
		LBW	631,82 ± 38,75	718,01 ± 77,01			
	CATtotal	NBW	808,25 ± 47,59	722,73 ± 44,02	0,716	0,932	0,215
		LBW	662,58 ± 41,03	764,46 ± 74,55			
	5-HT	NBW	375,95 ± 19,57	354,21 ± 18,45	0,222	0,321	0,180
		LBW	292,32 ± 38,52	352,72 ± 31,82			
	5-HIAA	NBW	142,82 ± 7,07	127,94 ± 7,43	0,692	0,523	0,627
		LBW	127,79 ± 11,06	133,66 ± 17,62			
	INDtotal	NBW	518,77 ± 24,78	482,15 ± 24,16	0,297	0,570	0,231
		LBW	420,11 ± 45,67	486,38 ± 46,98			
Corteza Prefrontal	NA	NBW	24,20 ± 1,30	23,20 ± 1,48	0,853	0,890	0,777
		LBW	23,23 ± 2,33	24,31 ± 3,12			
	DA	NBW	60,11 ± 12,08	55,90 ± 11,17	0,511	0,775	0,891
		LBW	60,41 ± 18,25	63,66 ± 20,97			
	DOPAC	NBW	21,29 ± 1,44	19,74 ± 1,59	0,302	0,239	0,753
		LBW	23,90 ± 2,27	20,94 ± 3,91			
	HVA	NBW	195,23 ± 13,79	174,61 ± 12,19	0,101	0,606	0,696
		LBW	214,61 ± 23,03	217,96 ± 31,02			
	DOPtotal	NBW	276,63 ± 19,05	250,25 ± 14,85	0,067	0,738	0,739
		LBW	298,92 ± 19,95	302,56 ± 28,13			
	CATtotal	NBW	300,83 ± 19,35	273,45 ± 15,01	0,078	0,728	0,716
		LBW	322,15 ± 20,80	326,87 ± 30,18			
	5-HT	NBW	89,47 ± 5,86	87,34 ± 4,89	0,124	0,482	0,482
		LBW	72,06 ± 10,21	78,82 ± 8,32			
	5-HIAA	NBW	76,40 ± 5,62	65,44 ± 4,15	0,246	0,685	0,407
		LBW	74,94 ± 7,10	79,77 ± 9,19			
	INDtotal	NBW	165,87 ± 9,35	152,78 ± 7,67	0,853	0,960	0,415
		LBW	146,99 ± 12,38	158,59 ± 14,15			

			Hembras	Machos	p-valor		
					Peso	Sexo	Interacción
Hipocampo	NA	NBW	68,58 ± 3,56	68,76 ± 4,65	0,421	0,915	0,990
		LBW	75,95 ± 10,79	77,03 ± 12,90			
	DA	NBW	93,89 ± 9,38	90,81 ± 7,82	0,316	0,546	0,656
		LBW	91,75 ± 12,57	105,85 ± 13,58			
	DOPAC	NBW	65,19 ± 7,76	63,23 ± 8,49	0,928	0,413	0,534
		LBW	81,90 ± 25,69	62,72 ± 21,23			
	HVA	NBW	228,31 ± 13,48	235,27 ± 18,19	0,107	0,715	0,619
		LBW	293,77 ± 39,25	260,24 ± 35,56			
	DOPtotal	NBW	387,38 ± 21,60	389,30 ± 27,33	0,170	0,735	0,700
		LBW	467,42 ± 60,54	428,80 ± 61,21			
	CATtotal	NBW	455,96 ± 23,58	458,07 ± 30,75	0,185	0,747	0,753
		LBW	543,38 ± 70,25	505,83 ± 72,12			
	5-HT	NBW	188,55 ± 10,20	193,35 ± 11,11	0,316	0,819	0,576
		LBW	214,33 ± 21,08	208,98 ± 25,20			
	5-HIAA	NBW	88,64 ± 3,18	91,43 ± 5,30	0,314	0,427	0,371
		LBW	103,44 ± 8,53	93,03 ± 11,72			
	INDtotal	NBW	277,19 ± 12,29	284,79 ± 15,06	0,300	0,693	0,514
		LBW	317,76 ± 28,64	302,01 ± 34,02			

Las concentraciones se presentan como la media ± SE. Unidades ng/g de tejido. Las filas muestran los neurotransmisores y los metabolitos de cada área cerebral en función del peso al nacer (NBW o LBW). Las columnas dividen los animales según el sexo (hembras o machos). Los p-valores en negrita muestran las diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla Suplementaria 3. Listado de proteínas diferencialmente abundantes identificadas al comparar los animales NBW-CTRL con los NBW-HFD.

Acceso UniProt	Gen	Identificación	FC	p-valor
AOA4X1UX13	IL17RE	Interleukin-17 receptor E	0,40	0,034
F1S269	RCSD1	RCSD domain containing 1	0,43	0,038
I3LNG8	STIP1	Stress induced phosphoprotein 1	0,46	0,035
F1RTP2	ARHGEF9	Collybistin	0,47	0,026
P80031	GSTP1	GST class-pi	0,48	0,005
F1SM07	COPS8	COP9 signalosome complex subunit 8	0,48	0,023
F1S6G3	RAB3B	RAB3B, member RAS oncogene family	0,48	0,009
Q29290	CSTB	Cystatin B	0,49	0,001
F1RT28	SEC63	J domain-containing protein	0,49	0,028
I3LLH5	PIN1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0,49	0,011
F1SEX5	TNPO2	Transportin-2	0,49	0,002
Q0MVN8	CRYZ	Quinone oxidoreductase	0,49	0,011
O97763	NPC2	NPC intracellular cholesterol transporter 2	0,51	0,026
F2Z5M5	LIN7C	Protein lin-7 homolog C	0,51	0,033
A7VK00	MX2	Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	0,52	0,006
AOA287AT54	FLII	Protein flightless-1 homolog isoform 1	0,53	0,028
K9IVU5	GNS	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	0,54	0,028
F1RPD2	UQCRC2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	0,54	0,031
F1S8W1	COX15	Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog	0,54	0,004
I3LFF0	PLCH1	Phosphoinositide phospholipase C	0,54	0,042
F1RR62	KYAT1	Kynurenine-oxoglutarate transaminase 1	0,55	0,004
I3LEB7	PODN	Podocan	0,55	0,015
O79874	NADH1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	0,55	0,014
AOA287B2K7	PDXDC1	Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	0,55	0,021
AOA287A6C1	METTL7A	Methyltransferase-like protein 7A	0,56	0,008
F1RGZ0	LGALS8	Galectin	0,56	0,020
Q2HYU1	CKMT2	Creatine kinase	0,56	0,024
P62272	RPS18	40S ribosomal protein S18	0,56	0,044
I3LSP1	METAP2	Methionine aminopeptidase 2	0,56	0,010
F1SF18	C2CD5	C2 calcium dependent domain containing 5	0,57	0,015
I3LIX0	GOLGA2	Golgin subfamily A member 2	0,57	0,023
F1S8P1	SCCPDH	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	0,57	0,018
AOA287BC42	NLGN4X	Neuroigin-4, X-linked	0,57	0,011
K7GNK7	MAP2K3	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3	0,57	0,026
F1SRQ1	BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	0,58	0,046
Q2IA00	SPEF2	Sperm flagellar protein 2	0,58	0,015
F1SHM0	PKM	Pyruvate kinase	0,58	0,005
AOA286ZVJ2	RAP1B	Ras-related protein Rap-1b isoform 1	0,58	0,038
I3L8G0	NDE1	Nuclear distribution protein nudE homolog 1	0,58	0,002
F1RH13	SYT3	Synaptotagmin 3	0,58	0,036
F1RW32	SPARCL1	SPARC like 1	0,59	0,032
F1RUC0	LAMP2	Lysosomal associated membrane protein 2	0,59	0,022
F1S1C3	CA4	Carbonate dehydratase IV	0,59	0,008
F1S818	PRPSAP2	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	0,59	0,022
AOA4X1V3P0	SNAP23	Synaptosome associated protein 23	0,59	0,034
F1SKU5	STRBP	Spermatid perinuclear RNA-binding protein	0,59	0,007
F1S1U4	PARVB	Parvin beta	0,60	0,028
Q29308	RPS19	40S ribosomal protein S19	0,60	0,018
F1S1Y7	SCN9A	Sodium channel protein type 9 subunit alpha	0,60	0,007
M3VH72	MVD	Diphosphomevalonate decarboxylase	0,60	0,033
I3L5K3	HSD17B13	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11	0,60	0,005
F1RF38	KATNB1	Katanin p80 WD40 repeat-containing subunit B1	0,60	0,025
P61958	SUMO2	Small ubiquitin-related modifier	0,60	0,021
AOA480W7Z5	SYNE1	Nesprin-1	0,60	0,042

Apéndices

Acceso UniProt	Gen	Identificación	FC	p-valor
F1S2G1	AP3B1	AP-3 complex subunit beta	0,60	0,027
F2Z5S7	COPZ1	Coatomer subunit zeta	0,61	0,030
Q197W4	CDK5	Cyclin-dependent kinase 5 (Fragment)	0,61	0,009
F1SSM0	EXOC5	Exocyst complex component 5	0,61	0,043
F1RSC5	DGKE	Diacylglycerol kinase epsilon	0,62	0,016
F1SMQ0	TNPO3	Transportin 3	0,62	0,007
F1SMM0	ERMP1	Endoplasmic reticulum metalloproteinase 1	0,62	0,044
F1SHR1	MICAL3	F-actin monooxygenase	0,62	0,044
F1S6K5	APRT	Adenine phosphoribosyltransferase	0,62	0,039
F1SS49	ARHGAP44	Rho GTPase activating protein 44	0,62	0,042
I3L8T0	NRXN1	Neurexin-1	0,62	0,028
F1RRH2	SLC4A7	Anion exchange protein	0,62	0,043
I3LR62	COA1	Cytochrome c oxidase assembly factor 1 homolog	0,63	0,006
AOA286ZL35	HAPLN4	Hyaluronan and proteoglycan link protein 4	0,63	0,045
AOA481B0D0	ITGA2	Integrin alpha-2	0,63	0,024
I3LDN0	C10H10orf67	Chromosome 10 C10orf67 homolog	0,63	0,028
K7GNH1	WDR45	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4	0,64	0,032
F1SNT8	DCTN1	Dynactin subunit 1	0,64	0,023
F1S415	BAG3	BAG family molecular chaperone regulator 3	0,64	0,011
K7GPT9	CFB	C3/C5 convertase	0,64	0,036
I3LH23	ITPR1	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 isoform	0,64	0,026
G9BWQ2	AKT2	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	0,64	0,025
P79260	SAG	S-arrestin	0,64	0,038
F1SJF2	CTTNBP2	Cortactin-binding protein 2	0,65	0,039
M3V819	COL4A1	Collagen alpha-1(IV) chain isoform 1 preproprotein	0,65	0,010
F1SR94	ALDH1A3	Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3	0,65	0,028
F1SUZ2	NUP98	Nuclear pore complex protein Nup96	0,65	0,011
F6PUU1	DNAJA4	DnaJ homolog subfamily A member 4	0,65	0,049
F1S4V0	COX7A2	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	0,65	0,012
P42174	GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	0,65	0,026
F1RX36	FGA	Fibrinogen alpha chain	0,65	0,001
F1RJ58	NF1	Neurofibromin	0,65	0,022
I3LFJ5	SUGP2	SURP and G-patch domain containing 2	0,65	0,023
I3LUV2	FAM120B	Family with sequence similarity 120B	0,66	0,022
F1SV23	NDUF55	Complex I-15 kDa	0,66	0,035
AOA4X1VHY6	CASK	Peripheral plasma membrane protein CASK	0,67	0,028
I3LGD9	AGRN	Agrin	0,67	0,041
P20112	SPARC	Osteonectin (Fragment)	1,50	0,021
AOA287AEM7	CELSR2	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	1,50	0,039
AOA480ECQ3	PCDH7	Protocadherin-7 isoform d	1,51	0,006
F1RIY9	PRKAR1B	Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit beta	1,52	0,029
I3LEQ5	KIF16B	Kinesin-like protein KIF16B	1,52	0,043
F1S458	KARS1	Lysine--tRNA ligase	1,53	0,025
F1SUT1	PLEKHB1	Pleckstrin homology domain containing B1	1,54	0,004
AOA286ZTA6	ARSA	Arylsulfatase A	1,55	0,009
I3LRY9	METTL22	Methyltransferase like 22	1,55	0,024
F1SKS3	ERBIN	Erbin isoform 1	1,55	0,019
AOA480PKE7	PTPRF	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F isoform 6	1,55	0,036
F1SQU2	SCYL2	SCY1 like pseudokinase 2	1,56	0,002
Q2EHH8	PPP1CA	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	1,56	0,011
F1S3L2	ZFYVE1	Zinc finger FYVE-type containing 1	1,56	0,017
I3L6R7	NEDD4	HECT-type E3 ubiquitin transferase	1,56	0,011
F1RVG6	NEBL	Nebulette	1,56	0,009
F1SK81	IQSEC3	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 3	1,56	0,019
I3LT81	RPL17	60S ribosomal protein L17	1,56	0,006
AOA5G2QKQ8	AK2	Adenylate kinase 2, mitochondrial	1,57	0,023
F1RVZ1	ACOX1	Acyl-coenzyme A oxidase	1,58	0,023
AOA480JXS2	SPAG9	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4 isoform X1	1,58	0,019

Acceso UniProt	Gen	Identificación	FC	p-valor
Q3YLA6	SRSF1	Serine/arginine-rich splicing factor 1	1,58	0,016
Q2IA00	SPEF2	Sperm flagellar protein 2	1,58	0,039
F1RMN3	PPP6R1	Protein phosphatase 6 regulatory subunit 1	1,58	0,045
I3LFJ9	MCTP1	Multiple C2 and transmembrane domain containing 1	1,59	0,040
F1RK50	PAM16	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM16	1,59	0,036
F1SP27	ELP1	Elongator complex protein 1	1,59	0,011
F6Q9I4	HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	1,59	0,035
F1S6R7	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1	1,60	0,038
F1SQF8	CAMK1	Calcium/calmodulin dependent protein kinase I	1,60	0,027
AOA5G2QZZ8	MACROD1	Mono-ADP ribosylhydrolase 1	1,60	0,034
AOA4X1UX60	CLPB	Caseinolytic peptidase B protein homolog	1,60	0,040
P17741	HMGB2	High mobility group protein B2	1,60	0,035
AOA5G2QVT2	TMEM263	Transmembrane protein 263	1,60	0,034
F1SN63	MYEF2	Myelin expression factor 2	1,60	0,024
I3LEG0	FARP1	FERM, ARH/RhoGEF and pleckstrin domain protein 1	1,61	0,028
I3LGD9	AGRN	Agrin	1,61	0,032
F1RUN0	CELF2	CUGBP Elav-like family member 2	1,62	0,045
B3GLY4	FATP4	Fatty acid transport protein 4 (Fragment)	1,62	0,026
F1RFV5	PSMB6	Proteasome subunit beta type-6	1,64	0,033
F6Q7B0	APPL2	Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 2	1,64	0,050
I3LUB3	SH3GLB2	SH3 domain containing GRB2 like, endophilin B2	1,64	0,048
P19130	FTH1	Ferritin heavy chain	1,65	0,012
K7GNF4	FMR1	Synaptic functional regulator FMR1	1,65	0,025
F1S4D7	LOC100523668	GB1/RHD3-type G domain-containing protein	1,66	0,012
AOA4X1W3V6	FSIP2	Fibrous sheath-interacting protein 2	1,67	0,041
F1RVQ5	DAAM2	Dishevelled associated activator of morphogenesis 2	1,68	0,032
AOA480IG74	OPCML	Opioid-binding protein/cell adhesion molecule isoform X1	1,68	0,016
F1SU03	HSPG2	Heparan sulfate proteoglycan 2	1,68	0,027
F1RI72	GOLGA3	Golgin subfamily A member 3	1,69	0,013
D7RA22	ATG4B	Cysteine protease	1,69	0,047
M3TYM9	DOCK8	Dedicator of cytokinesis protein 8	1,69	0,023
F1SAD9	PDIA4	Protein disulfide-isomerase	1,69	0,021
AOA5G2QL31	COX6B1	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	1,70	0,014
AOA4X1W511	MON2	Protein MON2 homolog	1,70	0,035
F1S684	BCLAF1	BCL2 associated transcription factor 1	1,71	0,033
F1RGP1	MYBBP1A	MYB binding protein 1a	1,71	0,048
Q06AV4	ITM2C	Integral membrane protein 2C	1,71	0,014
F1S2E7	KCNMA1	BK channel	1,72	0,019
I3LJ78	SNX1	Sorting nexin-1	1,73	0,038
AOA4X1VKX5	COQ7	5-demethoxyubiquinone hydroxylase, mitochondrial	1,75	0,039
D4PEB7	APC	APC regulator of WNT signaling pathway	1,75	0,017
F1SMF9	ATP5PD	ATP synthase subunit d, mitochondrial	1,76	0,022
P12675	CAST	Calpastatin	1,76	0,007
F1SM37	NEDD4L	HECT-type E3 ubiquitin transferase	1,78	0,018
F1SLS7	ATG3	Autophagy related 3	1,79	0,020
F1SHX0	NEB	Nebulin	1,79	0,012
F1SKF9	DCTN2	Dynactin subunit 2	1,81	0,019
F2Z5L7	PSMA1	Proteasome subunit alpha type 1 (Fragment)	1,84	0,034
F1RRF2	STT3B	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycotransferase	1,85	0,050
I3L829	NPLOC4	NPL4 homolog, ubiquitin recognition factor	1,85	0,034
F1S3C2	RAB24	RAB24, member RAS oncogene family	1,86	0,007
F1SHR1	MICAL3	F-actin monooxygenase	1,89	0,034
K7GN07	DPP8	Dipeptidyl peptidase 8	1,91	0,037
I3LC46	HTATSF1	HIV Tat-specific factor 1	1,93	0,046
AOA481B0D0	ITGA7	Integrin alpha-7	1,95	0,013
AOA287AT54	FLII	Protein flightless-1 homolog isoform 1	1,95	0,022
F1RR85	SLC27A4	Long-chain fatty acid transport protein 4	1,96	0,023

Apéndices

Acceso UniProt	Gen	Identificación	FC	p-valor
F2Z5R2	RHEB	GTP-binding protein Rheb	1,96	0,033
F1RKE9	FBXO21	F-box only protein 21	1,96	0,016
F1RFH9	ATP2A1	Calcium-transporting ATPase	1,98	0,038
I3LEB7	PODN	Podocan	1,99	0,038
F1RL48	ACAD10	Acyl-CoA dehydrogenase family member 10	2,00	0,014
F1SKQ0	DDX17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	2,05	0,026
I3LC07	RAB18	Ras-related protein Rab-18	2,10	0,005
I3LAA1	CCP110	Centriolar coiled-coil protein 110	2,12	0,018
O79874	NADH1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	2,16	0,039
F1S8Y2	MMS19	MMS19 nucleotide excision repair protein	2,20	0,012
I3LM15	AGPS	Alkylglycerone-phosphate synthase	2,24	0,001
F1SEH8	ATE1	Arginyl-tRNA--protein transferase 1	2,30	0,006
I3LFF0	PLCH1	Phosphoinositide phospholipase C	2,36	0,002
F1RPT5	PKP4	Plakophilin 4	2,45	0,008
A0A5G2QUW9	FBXL18	F-box and leucine rich repeat protein 18	2,49	0,011

Identificación en Uniprot, gen que codifica la proteína, nombre de la proteína, cambio diferencial según la variable analizada (FC, en rojo *up* aumenta en los animales HFD respecto los CTRL, en azul *down* disminuye en los animales HFD respecto los CTRL).

Tabla Suplementaria 4. Listado de proteínas diferencialmente abundantes identificadas al comparar los animales LBW-CTRL con los LBW-HFD.

Acceso UniProt	Gen	Identificación	FC	p-valor
F1SP51	FSD1L	Fibronectin type III and SPRY domain containing 1 like	0,39	0,003
K7GQ95	S100A2	S100 calcium binding protein A2	0,44	0,049
O79874	NADH1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	0,47	0,002
F1S8F1	GNA15	G protein subunit alpha 15	0,48	0,015
AOA287BA16	TRIP11	Thyroid hormone receptor interactor 11	0,48	0,010
P80220	TSC2D3	TSC22 domain family protein 3	0,48	0,004
F1RJS6	PTK2	Non-specific protein-tyrosine kinase	0,49	0,018
F1SKS3	ERBIN	Erbin isoform 1	0,49	0,021
F1RUI3	IQSEC2	IQ motif and Sec7 domain ArfGEF 2	0,50	0,007
F1SE82	OCIAD2	OCIA domain containing 2	0,51	0,027
F1RKM1	ALDH7A1	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	0,51	0,041
AOA286ZRA1	PRUNE2	Protein prune homolog 2	0,51	0,029
K9IWD2	PIK3R4	Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4	0,51	0,029
Q29297	SCIN	Adseverin	0,51	0,033
I3LUP1	GMPPA	Mannose-1-phosphate guanyltransferase alpha	0,52	0,037
Q06AV4	ITM2C	Integral membrane protein 2C	0,52	0,015
F1RMN3	PPP6R1	Protein phosphatase 6 regulatory subunit 1	0,53	0,025
AOA480DP04	DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein	0,54	0,001
F1RFH9	ATP2A1	Calcium-transporting ATPase	0,54	0,046
Q9GLV6	DDX58	Antiviral innate immune response receptor RIG-I	0,54	0,009
F1RFE3	LCMT1	Leucine carboxyl methyltransferase 1	0,54	0,024
I3LEQ5	KIF16B	Kinesin-like protein KIF16B	0,54	0,035
I3L942	RPTOR	Regulatory associated protein of MTOR complex 1	0,55	0,036
AOA287B7T8	CHPT1	Choline phosphotransferase 1	0,55	0,015
I3L8K1	SORL1	Low-density lipoprotein receptor relative with 11 ligand-binding repeats	0,55	0,011
A0PFK7	CAPZB	F-actin-capping protein subunit beta	0,55	0,003
F1RM03	SAE1	SUMO1 activating enzyme subunit 1	0,55	0,026
F1RZV6	KHDRBS2	KH RNA binding domain containing, signal transduction associated 2	0,56	0,005
F1S5M9	ADD3	Gamma-adducin	0,56	0,010
I3LU04	MAT2B	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	0,56	0,030
D0G6R6	CDIPT	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase	0,56	0,015
F1RMT5	DIAPH1	Diaphanous related formin 1	0,56	0,008
F1RM44	TOMM40	Translocase of outer mitochondrial membrane 40	0,56	0,021
F1RNX2	PDCD5	Programmed cell death 5	0,57	0,005
F1S2J5	FAM169A	Family with sequence similarity 169 member A	0,57	0,004
F1S2J6	GFM2	Ribosome-releasing factor 2, mitochondrial	0,57	0,038
F1S725	RABGAP1L	Rab GTPase-activating protein 1-like	0,57	0,022
F1RPT5	PKP4	Plakophilin 4	0,57	0,005
F1RR62	KYAT1	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 1	0,58	0,020
F1SPM7	GFPT1	Glutamine--fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)	0,58	0,045
I3LTY2	DOCK9	Dedicator of cytokinesis 9	0,58	0,012
I3LU72	CEP170	Centrosomal protein of 170 kDa	0,58	0,002
F1SD63	CC2D1A	Coiled-coil and C2 domain containing 1A	0,58	0,034
AOA4X1V8T0	ACAD8	Isobutyryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	0,58	0,014
F2Z5P0	SEC61B	SEC61 translocon subunit beta	0,58	0,027
AOA5K1VI30	AIMP1	Aminoacyl tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein 1	0,58	0,031
I3LFJ5	SUGP2	SURP and G-patch domain containing 2	0,59	0,012
F1RPY3	RTN3	Reticulon 3	0,59	0,030
I3LFF0	PLCH1	Phosphoinositide phospholipase C	0,59	0,014
F1RH13	SYT3	Synaptotagmin 3	0,59	0,029
F1SQT8	ANKS1B	Ankyrin repeat and sterile alpha motif domain-containing protein 1B	0,59	0,007
I3LNS9	FUCA1	Alpha-L-fucosidase	0,59	0,020
F1S5Y7	CLCC1	Chloride channel CLIC-like protein 1	0,60	0,033
F1S820	PDE4B	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B	0,60	0,014

Apéndices

Acceso UniProt	Gen	Identificación	FC	p-valor
F1RNW8	SLC7A10	Asc-type amino acid transporter 1	0,60	0,032
AOA286ZM27	DDX5	DEAD box protein 5	0,60	0,023
F15F62	DGKB	Diacylglycerol kinase beta	0,60	0,009
P80230	ERH	Enhancer of rudimentary homolog	0,61	0,001
I3LND2	SEC62	Translocation protein SEC62	0,61	0,037
F158S4	ENAH	Protein enabled homolog isoform a	0,61	0,039
I3LSS2	CHMP2A	Charged multivesicular body protein 2a	0,61	0,039
F1RGZ0	LGALS8	Galectin	0,61	0,016
I3LR05	AKAP9	A-kinase anchoring protein 9	0,61	0,015
F1SLI6	SMARCC1	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	0,61	0,039
AOA4X1T255	ARSB	Arylsulfatase B	0,61	0,013
I3LI59	RBM8A	RNA-binding protein 8A	0,61	0,016
K7GRV3	CDK16	Cyclin dependent kinase 16	0,62	0,049
I3L8U8	SCRN3	Secernin 3	0,62	0,027
F157C4	ATP13A1	ATPase 13A1	0,62	0,030
I3L8N9	GRIA4	Glutamate receptor 4	0,62	0,017
I3LDY1	EML1	Echinoderm microtubule-associated protein-like 1	0,62	0,031
F15QN4	RPS6KA3	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	0,62	0,033
I3LEB7	PODN	Podocan	0,62	0,038
F15SM0	EXOC5	Exocyst complex component 5	0,62	0,045
F15S27	SORT1	Sortilin 1	0,63	0,047
I3LQ50	HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	0,63	0,014
AOA287BI8	GOSR2	Golgi SNAP receptor complex member 2 isoform A	0,63	0,027
M3UZ96	UCKL1	Uridine-cytidine kinase	0,63	0,042
I3LIX0	GOLGA2	Golgin subfamily A member 2	0,63	0,011
F1RWW4	PDLIM5	PDZ and LIM domain 5	0,63	0,032
C7C1H8	APLP2	Amyloid-like protein 2 isoform 1	0,63	0,023
A7E1S5	TUBA1C	Tubulin alpha-1C chain	0,63	0,022
K9J6K2	UTRN	Utrophin	0,63	0,001
D4PEB7	APC	APC regulator of WNT signaling pathway	0,63	0,017
F1RGP1	MYBBP1A	MYB binding protein 1a	0,63	0,039
P62895	CYCS	Cytochrome c	0,63	0,002
F1RT47	RTN4IP1	Reticulon 4 interacting protein 1	0,64	0,038
P79379	MT2A	Metallothionein-2	0,64	0,030
F15RD8	PMM1	Phosphomannomutase	0,64	0,027
F156R7	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1	0,64	0,036
F15TD5	ACTR1B	Beta-centractin	0,64	0,027
I3L829	NPL0C4	NPL4 homolog, ubiquitin recognition factor	0,64	0,027
F2Z5M5	LIN7C	Protein lin-7 homolog C	0,64	0,015
F153E0	TMED9	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	0,65	0,016
I3W8V7	U2AF2	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	0,65	0,031
F1RTT5	LMBRD1	LMBR1 domain containing 1	0,65	0,036
AOA480WKW9	MTSS2	MTSS 2 protein	0,65	0,008
F1RSJ3	TRAPPC9	Trafficking protein particle complex 9	0,65	0,031
F6QB00	SRSF4	Serine/arginine-rich splicing factor 4 isoform X1	0,65	0,044
Q06AA7	TRA2B	Transformer 2 beta homolog	0,66	0,024
AOA4X1SFJ5	GCSH	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	0,66	0,006
AOA287BJH7	C16orf70	Chromosome 6 C16orf70 homolog	0,66	0,044
F15832	LRRC7	Leucine-rich repeat-containing protein 7	0,66	0,027
F154D7	LOC100523668	GB1/RHD3-type G domain-containing protein	0,66	0,026
P42639	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	0,66	0,010
AOA287BNI4	TMPRSS13	Transmembrane serine protease 13	0,66	0,025
I3LRK9	PIGS	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class S	0,66	0,036
P12309	GLRX	Glutaredoxin-1	0,66	0,022
F15V23	NDUF55	Complex I-15 kDa	0,66	0,026
F15EC0	DCTN3	Dynactin subunit 3	0,66	0,034
Q5D891	PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	0,66	0,039
F152X3	ECHDC1	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase 1	0,66	0,027

Acceso UniProt	Gen	Identificación	FC	p-valor
I3LRV0	EXOC6B	Exocyst complex component 6B	0,67	0,012
F1SQU2	SCYL2	SCY1 like pseudokinase 2	1,50	0,018
F1S2J6	GFM2	Ribosome-releasing factor 2, mitochondrial	1,50	0,035
F1RZL4	ADAM9	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9	1,51	0,041
F1RY11	CCDC93	Coiled-coil domain containing 93	1,51	0,014
F1RI72	GOLGA3	Golgin subfamily A member 3	1,52	0,040
AOA480X055	DST	Dystonin isoform 1eA	1,52	0,029
K7GNY3	KHDRBS3	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 3	1,52	0,032
AOA5G2R4H0	MTMR9	Myotubularin-related protein 9	1,52	0,031
F1S820	PDE4B	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B	1,52	0,036
F6Q5E9	DKK3	Dickkopf_N domain-containing protein	1,53	0,036
F1SPS2	SYN3	Synapsin-3	1,53	0,005
F1SBY5	AFDN	Afadin, adherens junction formation factor	1,53	0,030
AOA4X1U688	CARS2	Cysteinyl-tRNA synthetase	1,53	0,041
I3LB23	TMX4	Thioredoxin domain-containing protein	1,55	0,015
I3LCW1	FASN	Fatty acid synthase (Fragment)	1,55	0,026
AOA286ZL35	HAPLN4	Hyaluronan and proteoglycan link protein 4	1,55	0,049
I3LFZ7	RNF123	E3 ubiquitin-protein ligase RNF123	1,55	0,038
P02550	TUBA1A	Tubulin alpha-1A chain	1,56	0,038
F1RW98	RSU1	Ras suppressor protein 1	1,57	0,021
K7GNH1	WDR45	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4	1,57	0,034
I3L973	PARVA	Parvin alpha	1,57	0,009
F1S4D7	LOC100523668	GB1/RHD3-type G domain-containing protein	1,58	0,024
I3LR62	COA1	Cytochrome c oxidase assembly factor 1 homolog	1,58	0,030
AOA287B2K7	PDXDC1	Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	1,59	0,012
F1S8P1	SCCPDH	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	1,59	0,037
I3LPLO	WDR13	WD repeat-containing protein 13 isoform X1	1,60	0,024
Q29384	PSMB4	Proteasome subunit beta type-4	1,60	0,014
F1SKF1	PLS1	Plastin 1	1,61	0,046
F1SM07	COPS8	COP9 signalosome complex subunit 8	1,62	0,040
F1RZT5	VPS52	Vacuolar protein sorting-associated protein 52 homolog	1,62	0,041
O79874	NADH1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	1,63	0,036
P50447	SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin	1,63	0,036
F1RTV5	PAICS	AIR carboxylase	1,64	0,042
Q28960	CBR1	Carbonyl reductase [NADPH] 1	1,64	0,034
AOA287ANF8	ATPAF1	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	1,66	0,031
F1SRN5	CTNND2	Catenin delta-2	1,66	0,022
I3LFF0	PLCH1	Phosphoinositide phospholipase C	1,67	0,014
F1RJA8	TPRG1L	Tumor protein p63 regulated 1 like	1,69	0,021
F1RT56	PDK2	Protein-serine/threonine kinase	1,69	0,007
F1RKQ4	TKFC	Triokinase/FMN cyclase	1,69	0,003
AOA4X1TFA8	COPS7B	COP9 signalosome complex subunit 7b	1,70	0,004
P25117	CALCR	Calcitonin receptor	1,70	0,015
AOA4X1U4C2	AP3S1	AP-3 complex subunit sigma-1	1,70	0,011
F1SLF4	SMYD5	SMYD family member 5	1,70	0,015
F1SQK4	CCDC88A	Coiled-coil domain containing 88A	1,71	0,026
F1RM47	CLPTM1	CLPTM1 regulator of GABA type A receptor forward trafficking	1,71	0,014
AOA287AUF9	ITGB8	Integrin beta-8	1,71	0,004
F1S2E3	PPIF	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial	1,71	0,009
F1SEH8	ATE1	Arginyl-tRNA--protein transferase 1	1,71	0,008
F1S6K2	JPH3	Junctophilin	1,72	0,021
AOA287AYK3	CBS	Cystathionine beta-synthase	1,72	0,021
F1SGK6	SCN8A	Sodium channel protein type 8 subunit alpha	1,73	0,002
F1RG57	C14H1orf198	Chromosome 14 C1orf198 homolog	1,73	0,007
F1RVY4	RABL6	RAB, member RAS oncogene family like 6	1,73	0,029
AOA4X1UV89	AIMP1	Aminoacyl tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein 1	1,74	0,009
F1SR79	DNAJB2	DnaJ homolog subfamily B member 2	1,75	0,026
AOA287AYH9	PPT1	Palmitoyl-protein hydrolase 1	1,76	0,015

Apéndices

Acceso UniProt	Gen	Identificación	FC	p-valor
F1SNP7	DOCK10	Dedicator of cytokinesis protein 10 isoform X9-like	1,76	0,026
F1RTP2	ARHGEF9	Collybistin	1,76	0,015
F1RK61	UFD1	Ubiquitin recognition factor in ER associated degradation 1	1,77	0,049
AOA4X1UX60	CLPB	Caseinolytic peptidase B protein homolog	1,79	0,010
AOA287BEC5	TMPRSS11A	Transmembrane protease serine	1,80	0,018
F1S4G7	LIMCH1	LIM and calponin homology domains 1	1,80	0,013
F1SAQ4	SETD3	Protein-histidine N-methyltransferase	1,81	0,017
F1SFF7	TRIM9	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM9	1,82	0,035
F1SNT8	DCTN1	Dynactin subunit 1	1,83	0,036
I3LM95	ARSD	Arylsulfatase D isoform alpha	1,83	0,006
F1SP25	TMEM245	Transmembrane protein 245	1,84	0,021
I3LR05	AKAP9	A-kinase anchoring protein 9	1,84	0,018
I3LD55	COQ3	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase, mitochondrial	1,84	0,017
F1RRP6	ANXA13	Annexin A13	1,86	0,008
K7GP94	MAPK10	Mitogen-activated protein kinase	1,87	0,032
F2Z5R2	RHEB	GTP-binding protein Rheb	1,87	0,014
F1S675	CACNA1E	Voltage-dependent R-type calcium channel subunit alpha	1,89	0,005
I3LJ78	SNX1	Sorting nexin-1	1,89	0,028
P80220	TSC22D3	TSC22 domain family protein 3	1,91	0,016
A7XXV9	SIRT5	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-5, mitochondrial	1,93	0,039
I3LGD9	AGRN	Agrin	1,93	0,011
AOA4X1TTZ9	SRSF6	Serine/arginine-rich splicing factor 6	1,94	0,033
F1SN89	FKBP15	FK506-binding protein 15	1,98	0,029
K7GNF4	FMR1	Synaptic functional regulator FMR1	1,98	0,002
AOA287A6F5	ZADH2	Prostaglandin reductase 3 isoform 1	2,02	0,000
F1SM37	NEDD4L	HECT-type E3 ubiquitin transferase	2,02	0,025
I3LQA0	CRYZL1	Crystallin zeta like 1	2,06	0,003
I3LU04	MAT2B	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	2,08	0,004
Q29554	HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	2,10	0,002
F1RUN0	CELF2	CUGBP Elav-like family member 2	2,24	0,014
F1RHN4	TXNRD2	Thioredoxin-disulfide reductase 2	2,27	0,009
AOA480YJW7	RNF213	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213 isoform 3	2,38	0,021
F1SU03	HSPG2	Heparan sulfate proteoglycan 2	2,56	0,008

Identificación en Uniprot, gen que codifica la proteína, nombre de la proteína, cambio diferencial según la variable analizada (FC, en rojo *up* aumenta en los animales HFD respecto los CTRL, en azul *down* disminuye en los animales HFD respecto los CTRL).



ARTÍCULOS

Artículos de la tesis:

Yeste, N., Bassols, A., Vidal, M., Bach, A., & Terré, M. (2020). Evaluating the potential role of tryptophan in calf milk replacers to facilitate weaning. *Journal of Dairy Science*, *103*(8), 7009–7017. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-18088>

Yeste, N., Valent, D., Arroyo, L., Vázquez-Gómez, M., García-Contreras, C., Pumarola, M., González-Bulnes, A., & Bassols, A. (2021). Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of the Antioxidant Hydroxytyrosol on Brain Neurochemistry and Development in a Porcine Model. *Antioxidants*, *10*(6), 884. <https://doi.org/10.3390/antiox10060884>

Yeste, N., Gómez, N., Vázquez-Gómez, M., García-Contreras, C., Pumarola, M., González-Bulnes, A., & Bassols, A. (2021). Polyphenols and IUGR Pregnancies: Intrauterine Growth Restriction and Hydroxytyrosol Affect the Development and Neurotransmitter Profile of the Hippocampus in a Pig Model. *Antioxidants*, *10*(10), 1505. <https://doi.org/10.3390/antiox10101505>

Colaboraciones:

Valent, D., **Yeste, N.**, Hernández-Castellano, L. E., Arroyo, L., Wu, W., García-Contreras, C., Vázquez-Gómez, M., González-Bulnes, A., Bendixen, E., & Bassols, A. (2019). SWATH-MS quantitative proteomic investigation of intrauterine growth restriction in a porcine model reveals sex differences in hippocampus development. *Journal of Proteomics*, *204*, 103391. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103391>

Yu, K., Matzapetakis, M., Horvatić, A., Terré, M., Bach, A., Kuleš, J., **Yeste, N.**, Gómez, N., Arroyo, L., Rodríguez-Tomás, E., Peña, R., Guillemin, N., de Almeida, A. M., Eckersall, P. D., & Bassols, A. (2020). Metabolome and proteome changes in skeletal muscle and blood of pre-weaning calves fed leucine and threonine supplemented diets. *Journal of Proteomics*, *216*, 103677. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103677>

Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Mateo-Otero, Y., Dordas-Perpinyà, M., Gacem, S., **Yeste, N.**, Bassols, A., Yeste, M., & Miró, J. (2021). Extracellular Reactive Oxygen Species (ROS) Production in Fresh Donkey Sperm Exposed to Reductive Stress, Oxidative Stress and NETosis. *Antioxidants*, *10*(9), 1367. <https://doi.org/10.3390/antiox10091367>



Evaluating the potential role of tryptophan in calf milk replacers to facilitate weaning

N. Yeste,¹ A. Bassols,¹ M. Vidal,² A. Bach,^{2,3} and M. Terré^{2*}

¹Department de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona Cerdanyola del Vallès, 08193, Barcelona, Spain

²Department of Ruminant Production, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), 08140 Caldes de Montbui, Spain

³Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), 08010 Barcelona, Spain

ABSTRACT

Tryptophan is a precursor of serotonin, a neurotransmitter that participates in the control of the affective state of an animal. We hypothesized that Trp supplementation could help dairy calves to cope with weaning stress. Twenty-seven Holstein male calves (48 ± 0.8 d old; 82 ± 2.6 kg of body weight) were used to evaluate the effects of Trp supplementation at a rate of 4.5 g/d via milk replacer (MR) on performance and behavioral parameters around weaning. All calves received the same feeding program (6 L/d at 15% dry matter from d 1 to 7, 4 L/d at 15% dry matter from d 8 to 14, and 2 L/d at 15% dry matter in one feeding until d 21 of study) and were completely weaned 22 d after the beginning of the study (around 70 d of life). Calves were fed a starter feed (19.3% crude protein and 16.2% neutral detergent fiber, on a dry matter basis) and chopped straw *ad libitum*. Animals were weighed weekly, dry matter intakes were recorded daily, lying behavior was recorded using accelerometers throughout the study, and scan sampling was performed twice a week, 1 h after the morning feeding, to record behavioral activity (nonnutritive oral behaviors, suckling a neighbor calf, standing, resting, rumination, vocalizations, eating, and drinking). Tryptophan supplementation did not affect calf performance or concentrate and MR intake, but straw intake tended to be greater in nonsupplemented compared with Trp-supplemented calves (153 vs. 129 ± 9.0 g/d, respectively). Lying time, lying bouts, and lying duration decreased when changes in the MR feeding program occurred, independent of treatment. Similarly, differences in behavioral observations occurred along days of study, with no effect of Trp supplementation. The main changes observed in calf behavior were an increase in vocalizations and standing time 1 h after the

morning feeding at weaning, but again these changes were independent of treatment. Parameters measured in serum and plasma indicated an increase in Trp, kynurenine, and the kynurenine/Trp ratio after feeding in the Trp calves. A tendency for lower plasma glucose concentration after feeding was observed in the Trp group. No changes in stress markers such as cortisol and haptoglobin in serum were detected. In conclusion, supplementing 4.5 g/d of Trp via MR between 48 and 62 d of life had no effect on performance or behavior in calves around weaning.

Key words: dairy calves, tryptophan, weaning

INTRODUCTION

The weaning process in most mammalian species (i.e., swine, ruminants) reared in intensive conditions is a stressful event, which may entail a decrease in growth performance (Stamey et al., 2012), an increase in oral stereotypies (nonnutritive oral behaviors, cross-sucking) due to the lack of teat-sucking (Horvath and Miller-Cushon, 2017), and suppression of innate immune responses (Hulbert et al., 2011). Offering high planes of nutrition to dairy calves early in life can exacerbate this situation if weaning is not performed properly (Khan et al., 2007) or performed too early (Eckert et al., 2015). Tryptophan is an EAA precursor of serotonin (5-hydroxytryptamine), which has been proposed to help piglets coping with weaning stress, thus improving performance, reducing stress-related hormone serum concentrations, and modulating lying behavior (Shen et al., 2012). An additional biological implication of serotonin, besides modulating anxiety and regulating social behavior and appetite (Gibson, 2018), is the regulation of glucose and lipid metabolism in the peripheral system inducing insulin release in response to glucose and adipogenesis under fed conditions (Yabut et al., 2019). Recently, Hernández-Castellano et al. (2018) supplemented newborn calves with serotonin and reported an increase in mRNA abundance of sev-

Received December 19, 2019.

Accepted March 23, 2020.

*Corresponding author: marta.terre@irta.cat

eral immune factors, supporting the role of serotonin in initiating and potentiating the immune response (Yabut et al., 2019).

Based on the benefits of Trp supplementation at the rate of 0.45% and 0.6% reported in piglets (Shen et al., 2012; Mao et al., 2014), we hypothesized that Trp supplementation in the milk replacer (MR) may help calves to modulate lying behavior and oral stereotypies at weaning, and potentially improve performance at that stage. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effects of supplementing 4.5 g of Trp/d the weeks preceding weaning on calf performance, selected serum analytes, and lying and oral stereotype behaviors.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Feeding Program

Twenty-seven male Holstein newborn calves (48 ± 0.8 d old; 82 ± 2.6 kg of BW) from a single farm were enrolled in this study between March and June 2018 and raised in the facilities of IRTA at Torre Marimon (Caldes de Montbui, Spain) following an unbalanced but completely randomized design. Calves were managed under common animal management conditions under the supervision of IRTA technicians and the approval of the Animal Care Committee of the Government of Catalonia (authorization code 9733). Before enrollment with Trp supplementation, calves were fed a common diet using the control MR for a period of 10 d.

Table 1. Ingredient and chemical composition (% DM) of milk replacers¹

Item	CTRL	TRP
Ingredient, %		
Skim milk powder	39	39
Whey protein concentrate 35	15	15
Whey protein concentrate 60	4	3.3
50 fattened whey	39	39.2
Premix ²	3	3
Trp	—	0.5
Chemical composition, % DM		
DM	96.6	96.9
CP	24.1	24.0
Fat	20.5	21.8
Lactose	43.1	44.3
Ash	6.8	6.9

¹CTRL = calves without amino acid supplementation in the milk replacer; TRP = calves fed a milk replacer with a daily dose of 4.5 g/d of Trp.

²Vitamin A, 25,000 IU; vitamin D₃, 4,500 IU; vitamin C, 300 mg/kg; vitamin B₁, 16 mg/kg; vitamin B₂, 10 mg/kg; vitamin B₆, 10 mg/kg; vitamin B₁₂, 80 µg/kg; vitamin K₃, 5.5 mg/kg; biotin, 160 µg/kg; niacin, 50 mg/kg; pantothenic acid, 23 mg/kg; folic acid, 1 mg/kg; Fe, 150 mg/kg; Cu, 10 mg/kg; Zn, 170 mg/kg; Mn, 40 mg/kg; I, 1.3 mg/kg; and Se, 0.4 mg/kg.

Calves were individually housed in pens (1.6 × 3.2 m) equipped with 3 buckets for water, 2 for concentrate, and 1 for forage. Hutches were bedded with sawdust on a daily basis and calves were bottle-fed MR. For the duration of the trial, calves had ad libitum access to water, chopped barley straw (3.3% CP, 80.3% NDF, 54.6% ADF on a DM basis), and pelleted starter feed (19.3% CP, 16.2% NDF, 5.8% ADF, 46.2% starch, 3.5% fat on a DM basis). Straw was chopped using a forage chopper (Seco, Curtalo, Italy) to reach the following particle size distribution: >20 mm: 84.9%, between 8 and 20 mm: 7.0%, and <8 mm: 8%, according to the Penn State Particle Separator (Heinrichs, 2013). Calves were fed 2 meals (at 0700 and at 1600 h) of 3 L at 15% MR concentration (total MR intake: 900 g/d) for the first 7 d; subsequently, MR was decreased to 2 L also at 15% (600 g/d) for the next 7 d, and then MR was limited to a single offer of 2 L also at 15% (300 g/d) for the next 7 d, when calves were fully weaned at 22 d of study.

Milk Replacer and Treatments

Calves were randomly assigned to one of the following 2 MR: **CTRL** (n = 13) without additional Trp supplementation; **TRP** (n = 14) providing an extra 4.5 g/d L-Trp (Livzon Group, Fuxing Pharmaceutical, Ningxia, China) per day (Table 1). Amino acid profiles of MR and starter concentrate are depicted in Table 2. Calves in the TRP treatment received a fixed amount of Trp. Because the MR offer was decreased throughout the study, the additional Trp required concentration in the MR to reach the daily 4.5 g was individually added to each bottle before each MR feeding.

Measurements and Chemical Analysis

Calves were weighed using an electronic weighing scale (Mobba SC-01, Badalona, Spain) at farm arrival and on a weekly basis thereafter. Individual MR and solid feed consumption (pellet and straw) were determined by measuring daily offers and refusals, and then subtracting the leftovers from the offers. Feeds were analyzed for DM (4 h at 103°C), ash (550°C calcination), CP with an automatic distiller Kjeldahl (Kjeltec Auto 1030 Analyzer, Tecator) with copper sulfate/selenium as a catalyst instead of copper sulfate/titanium dioxide (method 988.05; AOAC International, 2000), NDF was analyzed using sodium sulfite and heat-stable α-amylase (Van Soest et al., 1991), ADF was analyzed following Robertson and Van Soest (1981), ether extract following the method 920.39 from AOAC International (1999) with petroleum ether used for distillation instead of diethyl ether (AOAC International,

2000) with previous acid hydrolysis, and total AA and total tryptophan were determined using fluorescence-HPLC and UV-HPLC, respectively, after a strong acid hydrolyzation with *o*-phthalaldehyde and 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (UNE-EN-ISO 13903:2005 and UNE-EN-ISO 13904:2005, respectively; UNE, 2005a,b).

At -4, 4, 16, and 23 d of study, blood samples were obtained from the jugular vein right before and 3 h after the MR morning feeding and were kept in 10-mL evacuated tubes without anticoagulant to obtain serum for subsequent biochemistry profiles or with lithium heparin for subsequent plasma AA analyses. Serum and plasma were obtained by centrifugation at $1,500 \times g$ for 10 min at room temperature and stored in aliquots at -20°C until further analysis. Plasma AA were measured by HPLC as described (Yu et al., 2018) with some modifications. Amino acids were derivatized with AccQ Fluor (Waters, Milford, MA) following the instructions provided by the manufacturer. An Elite LaChrom (Hitachi, Tokyo, Japan) equipped with an UV detector (L-24200, Hitachi) with a Novapak C18 column (300 mm \times 3.9 mm) from Waters were used. The flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was kept at 42°C . The injection volume was 10 μL and the detection wavelength was set at 254 nm. The solvent system consisted of 2 eluents: (A) 140 mM sodium acetate trihydrate, 12 mM triethylamine, and 1 mg/L EDTA at pH 5.02 and (B) 60% acetonitrile/40% water. The software EZChrom Elite system V3.1.7

(Agilent, Santa Clara, CA) was used for system control and data acquisition.

Serum biochemistry analyses (glucose, urea, triglycerides, cholesterol, creatinine, total proteins, gamma-glutamyl transferase, aspartate aminotransferase, and alanine aminotransferase) were determined with OSR reagents (Olympus System Reagent, Beckman Coulter, Hamburg, Germany), free fatty acids (**NEFA**) were determined with a reagent from Wako (Richmond, VA), antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase (**GPx**) were determined with Randox reagents (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK), and haptoglobin was determined by a colorimetric method (Tridelta, Maynooth, County Kildare, Ireland). All determinations were performed with an Olympus AU400 analyzer (Beckman Coulter, Hamburg, Germany).

Cortisol, insulin, and kynurenine were determined by ELISA (salivary cortisol ELISA and insulin ELISA, DRG Diagnostics, Marburg, Germany; L-kynurenine ELISA, Immusmol, Bordeaux, France) according to the manufacturer's instructions. The iEMS Reader MF reader (Thermo Scientific, Waltham, MA) with the Ascent software (version 2.6, Thermo Scientific) was used.

From 2 d before starting Trp supplementation to 25 d of study, pendant data loggers (Hobo Pendant G Acceleration Data Loggers, Onset Computer Corp., Pocasset, MA) were placed on the right hind leg of each calf using cohesive bandages (Eurimexflex, Divasa Farmavic, Barcelona, Spain) to record position measurements every minute to evaluate calf lying behavior. Data collected for the Hobo data loggers were recovered and processed as described in Yunta et al. (2012) to calculate daily lying time, number of lying bouts per day, and side of recumbency.

Feeding and lying behaviors and oral stereotypies were monitored at 2, 4, 9, 11, 16, 18, 23, and 25 d of study for all calves 1 h after the morning feeding using 5-min scan sample technique recording the following behaviors: lying, standing, eating solid feed, drinking water, ruminating, nonnutritive oral behaviors (when calves were licking any surface or tongue rolling), suckling the neighbor calves, and vocalizations.

Statistical Analysis

Performance, lying behavior, and blood data were analyzed using a mixed-effects model accounting for the fixed effects of treatment, time of measurement, and their 2-way interaction, plus the random effect of calf. Time entered the model as a repeated measure using an autoregressive variance-covariance matrix. Initial BW was used as covariate. Blood data were analyzed separately at 0 and 3 h, accounting in the effect

Table 2. Amino acid composition of milk replacers and starter concentrate feed

AA, g/100 g	Milk replacer ¹		Concentrate
	CTRL	TRP	
Aspartic acid	2.30	2.42	1.49
Glutamic acid	5.37	5.72	2.89
Serine	1.27	1.37	0.78
Histidine	0.63	0.70	0.49
Glycine	0.46	0.50	0.76
Threonine	1.49	1.47	0.61
Arginine	0.76	0.79	1.14
Alanine	1.00	1.04	0.78
Tyrosine	0.93	1.02	0.60
Valine	1.66	1.76	0.66
Methionine	0.55	0.61	0.26
Phenylalanine	1.00	1.06	0.79
Isoleucine	1.48	1.55	0.68
Leucine	2.76	2.82	1.22
Lysine	2.08	2.13	0.81
Hydroxyproline	<0.040	<0.040	0.14
Proline	2.11	2.21	1.00
Tryptophan	0.35	0.83	0.20

¹CTRL = calves without amino acid supplementation in the milk replacer (Nukamel Productions B.V., Weert, the Netherlands); TRP = calves fed a milk replacer with a daily dose of 4.5 g/d of Trp.

Yeste et al.: TRYPTOPHAN FOR WEANING CALVES

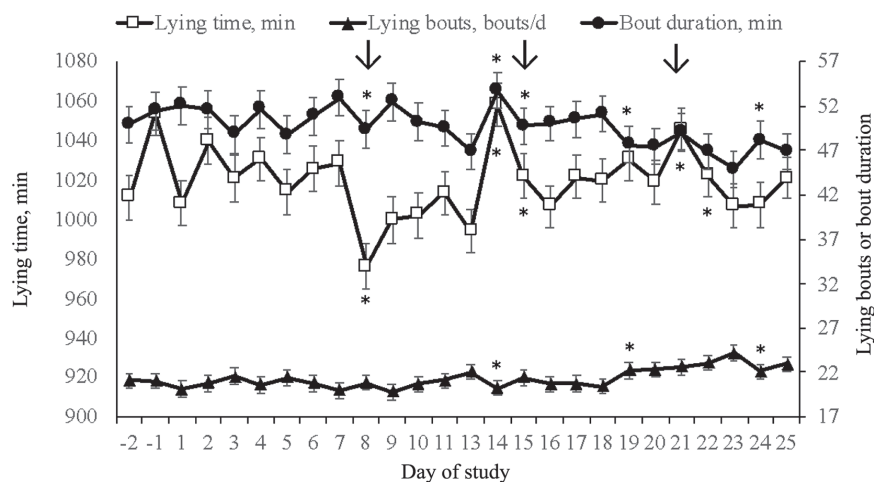


Figure 1. Evolution of lying behavior throughout the study. The arrows denote changes in the milk replacer (MR) feeding program (the first arrow indicates a decrease from 0.9 kg of MR/d to 0.6 kg of MR/d, the second denotes a change from 2 feedings of 0.3 kg to 1 feeding, and the third indicates the weaning day) and the asterisks show differences between days of the study. Error bars are SEM.

of week of sampling using the same model described above. Also, to assess the potential effect of time relative to feeding on blood metabolites, blood data from all weeks were averaged by time relative to feeding, and the same mixed-effects model described above was run using time (hour relative to feeding) instead of week as a repeated measure.

Scan sampling observations were summarized as the number of times each calf performed a given behavior. Data were analyzed with a generalized linear model following a Poisson distribution considering Trp supplementation, the observation day, and their interaction as the fixed effects.

RESULTS AND DISCUSSION

Tryptophan supplementation did not affect calf performance or concentrate and MR intake, but straw intake tended ($P = 0.07$) to be greater in CTRL compared with TRP calves (153 vs. 129 \pm 9.0 g/d, respectively). A study conducted with 6-wk-old pigs reported benefits of L-Trp supplementation improving feed efficiency, in part because of an improvement in nitrogen utilization (Shen et al., 2012), but these benefits were not observed in calves herein. Similar to performance parameters, no differences in lying behavior were observed between MR treatments. However, when changes in the MR feeding program occurred (i.e., reducing MR allowance, number of daily MR feedings, or weaning), lying time, lying bouts, and bout duration decreased (Figure 1). Although Marrero et al. (2019) reported an increase in

serotonin bioavailability by feeding 90 mg of 5-hydroxytryptophan (5-HTP)/d to young calves for a period of 10-d, total lying activity was not affected.

Calves in CTRL treatment devoted more time ($P < 0.01$) to consume concentrate 1 h after the morning feeding at 11 d, but they devoted less time at 18 d of study compared with TRP calves (Figure 2A). Calves in the CTRL treatment were observed more ($P < 0.05$) times consuming water 1 h after the MR morning feeding than TRP calves throughout the study (Figure 2A). More time spent consuming water could indicate that CTRL animals had a greater degree of stress than TRP calves because drinking water has been described as a physiological stress response (Krause et al., 2011). Calves in the TRP treatment spent more time ($P < 0.05$) lying 1 h after the morning feeding at 4 d of study, but time devoted to lying down was similar during the remaining observation days (Figure 2B). After weaning, calves, independent of MR treatment, devoted more time ($P < 0.05$) to ruminate than during the preweaning period, which is a clear consequence of the change in diet (fully dependent on solids) and the consequent need to increase rumination activity. Oral stereotypies did not differ between MR treatments, but vocalizations increased ($P < 0.001$) after weaning (Figure 2C). Vocalizations have been widely used as a noninvasive stress measure (Bolt et al., 2017), but in the present study vocalizations did not differ between MR treatments. In the present study, most of the changes observed in lying time and behavior observations were related to the changes in MR allowance and

weaning process rather than the Trp supplementation treatment.

Serum biochemistry (Table 3) tended to be influenced by MR treatments at 3 h after the morning MR feeding ($P = 0.08$) with a tendency toward a lower serum glucose concentration in TRP calves after feeding compared with CTRL calves, whereas serum NEFA concentration was greater ($P < 0.05$) before the MR morning feeding in TRP compared with CTRL calves. The lower glucose concentration in TRP calves may be explained because serotonin, a derivative of Trp, has an insulin-releasing effect in fed conditions, and greater levels of insulin in the TRP group would cause a faster uptake of glucose in the peripheral tissues (Yabut et al., 2019). In the present study, insulin levels were similar in both treatments at both sampling times, and this explanation could only be supported by a numerical increase in insulin and insulin to glucose ratio in TRP compared with CTRL calves 3 h after the morning feeding. The Trp catabolic pathway converts this AA into acetyl-CoA (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway map00380), a precursor for fatty acid biosynthesis, representing a potential explanation to the increased NEFA plasma concentrations before the MR morning feeding of MR in the TRP group. No other metabolic analytes were altered in plasma, except for a tendency ($P = 0.09$) to decrease GPx activity 3 h after the morning feeding in the TRP group. Although alterations in other redox markers such as superoxide dismutase were not observed, the decrease in GPx activity might be due to the effect of Trp supplementation in oxidative defenses. Tryptophan 2,3-dioxygenase, a tryptophan-metabolizing enzyme of the kynurenine pathway, has antioxidant activity (Christen et al., 1990), and might have had attenuated GPx antioxidant activity as described in weaned piglets (Mao et al., 2014). Plasma concentration of Trp 3 h after the morning feeding were greater ($P < 0.001$) in the TRP-supplemented group compared with CTRL animals, indicating that Trp was readily absorbed by the intestine. However, the increase of Trp absorption does not guarantee an increased uptake of Trp by the brain, as it depends on the plasma concentration of Trp in relation to the other large neutral amino acids (LNAA; Höglund et al., 2019). In the present study, similar Trp and LNAA serum concentrations were observed before the morning feeding, but serum Trp concentration and the ratio Trp/LNAA increased in TRP compared with CTRL calves 3 h after the morning feeding (Table 4), which might have potentiated the uptake of Trp from blood across the brain barrier. In addition to serotonin synthesis, a large majority of dietary Trp is directed toward kynurenine, derived from Trp through the ac-

tion of the enzymes indoleamine-2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase (Badawy, 2017). The ratio kynurenine/Trp indicates the metabolic destination of Trp, and changes in this ratio have been linked to brain function and neuroendocrine disorders (Gibson, 2018). In the present study, changes in plasma kynurenine and the kynurenine/Trp ratio were parallel to those in Trp, indicating that Trp metabolic rates were the same in both groups.

Although the increase in time consuming water 1 h after the morning MR feeding in CTRL calves was related in a previous paragraph to a greater degree of stress in CTRL animals, this hypothesis was not supported by changes in plasma levels of the stress hormone cortisol or haptoglobin, an acute phase protein, which has been also acknowledged as a stress marker (Marco-Ramell et al., 2016). Although no Trp-supplementation effect was observed in stress hormone levels, serum cortisol concentration changed within the weeks and sampling hour of the study, and it was related to the feeding process. Serum cortisol concentrations were greater at the beginning of the study before the morning feeding (Figure 3), suggesting that calves were stressed because of hunger (waiting for the milk feeding). As calves grew up and consumed more concentrate starter feed, serum cortisol levels before feeding decreased (Figure 3). Surprisingly, serum cortisol levels at wk 4 (2 d after weaning) differed between before and after feeding time, but they were lower than serum cortisol concentrations before weaning at 3 h after feeding. These values suggest that the stress associated with limiting MR allowance seems more acute for young calves than the stress caused by a gradual weaning process. Data regarding the lack of changes in serum haptoglobin concentrations in the present study were in contrast with the results described by Hernández-Castellano et al. (2018), who reported an increase in haptoglobin mRNA levels in blood cells after supplementation of colostrum and milk with 1.5 mg of 5-HTP/kg of birth weight during the first 15 d following birth, suggesting an improvement in the immune function in 5-HTP supplemented calves. Hernández-Castellano et al. (2018) used 5-HTP as a serotonin precursor, in contrast to L-Trp, which was used in the present study. This may also explain the divergence in the results, because the enzyme that converts L-Trp to 5-HTP represents a rate-limiting step for serotonin synthesis, and several factors can inhibit this serotonin pathway. In contrast, 5-HTP does not compete with other AA to be absorbed and can easily cross the brain-blood barrier (Birdsall, 1998). Marrero et al. (2019) demonstrated that 5-HTP increased serotonin bioavailability, and probably 5-HTP is more effective than L-Trp for serotonin synthesis. Therefore, further

Yeste et al.: TRYPTOPHAN FOR WEANING CALVES

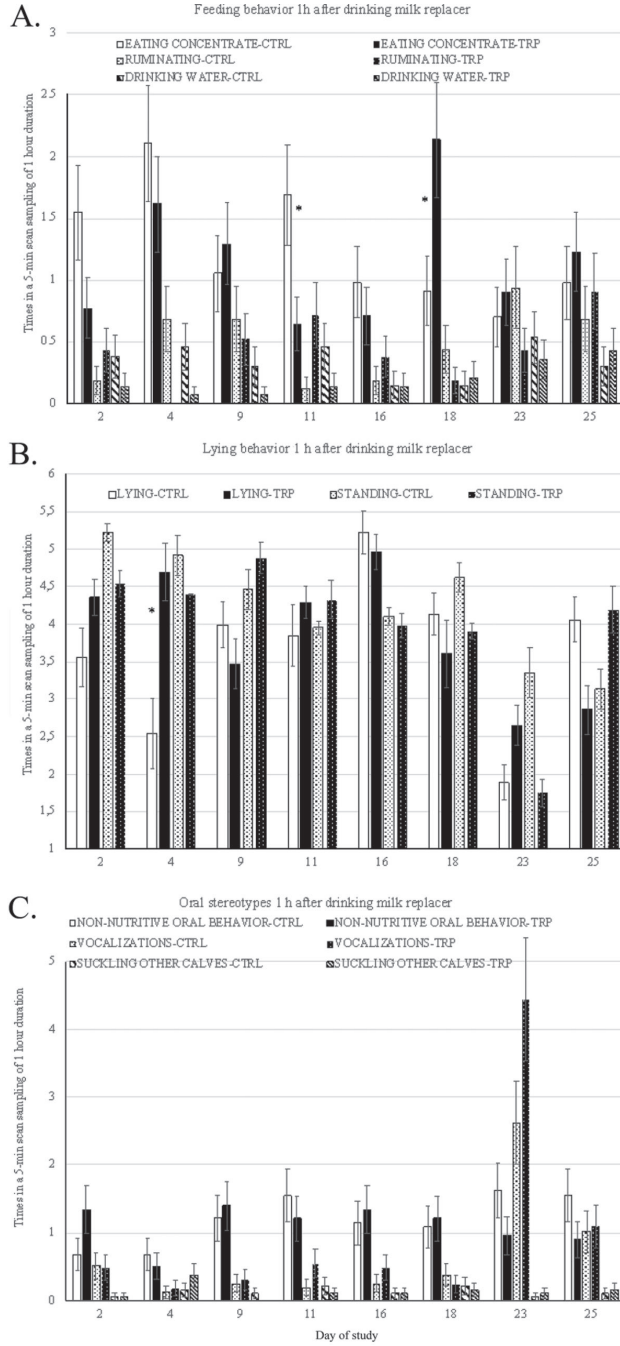


Figure 2. Times of feeding (A) and lying behaviors (B), and oral stereotypes (C) of calves supplemented (TRP) or not (CTRL) with 4.5 g/d of Trp 1 h after the morning milk replacer offer using a 5-min scan technique. Error bars are SEM.

Table 3. Performance and feed intake of calves as affected by supplementation of 4.5 g of Trp/d

Item	Treatment ¹			P-value ²		
	CTRL (n = 13)	TRP (n = 14)	SEM	T	Time	T × time
Initial age, d	47.7	48.8	0.79	0.34	—	—
Initial BW, kg	83.5	80.7	2.57	0.44	—	—
Final BW, kg	103	101	0.99	0.148	<0.001	0.409
ADG, g/d	1,308	1,206	54.5	0.192	<0.001	0.898
DMI, g/d						
Milk replacer	439	431	4.4	0.233	<0.001	0.492
Concentrate	1,985	1,798	98.7	0.185	<0.001	0.512
Straw	153	129	9.0	0.07	<0.001	0.722
Total	2,577	2,358	95.6	0.112	<0.001	0.583
Gain-to-feed ratio	0.52	0.51	0.011	0.847	<0.001	0.582

¹CTRL = calves without amino acid supplementation in the milk replacer; TRP = calves fed a milk replacer with a daily dose of 4.5 g/d of Trp.

²T = effect of 4.5 g/d of Trp supplementation in the milk replacer; time = effect of week of study; T × time = effect of the interaction of Trp supplementation with week of study.

studies to evaluate the effects of serotonin on calf behavior are encouraged to use 5-HTP instead of L-Trp to avoid the enzyme-limiting step to transform L-Trp to 5-HTP. Plasma haptoglobin is mainly synthesized in the liver, and Hernández-Castellano et al. (2018) determined the expression of genes coding for haptoglobin in blood cells; thus, differences in the sample site and

type of measure may also explain the divergent results between studies.

Last, plasma AA profile was similar in both groups, except for the expected greater levels of Trp at 3 h after the morning feeding in the TRP group (Table 5). A tendency ($P = 0.09$) for lower plasma Tyr and greater Gly concentration, and lower ($P < 0.01$) plasma Lys

Table 4. Selected serum parameters of calves as affected by supplementation of 4.5 g of Trp/d

Item	Treatment ¹				SEM	P-value ²	
	0 h		3 h			0 h	3 h
	CTRL	TRP	CTRL	TRP		T ₀	T ₃
Glucose, mg/dL	89.1	84.4	111.6	105.1	2.61	0.20	0.08
Insulin, mIU/L	130.8	100.5	338.3	363.5	24.1	0.20	0.62
Ratio of insulin to glucose, mIU/mg	14.9	12.3	30.7	34.9	2.35	0.30	0.38
Urea, mg/dL	19.7	20.2	19.9	20.6	0.86	0.70	0.55
Total proteins, g/dL	5.3	5.3	5.3	5.4	0.09	0.75	0.65
Creatinine, mg/dL	0.67	0.71	0.67	0.72	0.020	0.16	0.13
Gamma-glutamyl transferase, U/L	16.8	16.9	17.8	17.9	1.08	0.94	0.90
Alanine aminotransferase, U/L	11.4	11.2	11.6	11.8	0.68	0.72	0.68
Aspartate aminotransferase, U/L	51.5	49.5	49.7	48.8	2.85	0.63	0.84
Glutathione peroxidase, U/L	467	433	490	448	17.8	0.19	0.09
Superoxide dismutase, U/mL	0.40	0.36	0.25	0.20	0.026	0.27	0.17
Cholesterol, mg/dL	74.6	70.9	71.9	68.1	3.72	0.50	0.45
Triglycerides, mg/dL	17.6	17.2	27.5	24.7	1.40	0.83	0.24
NEFA, ³ mM	0.20	0.24	0.23	0.22	0.013	0.03	0.29
Haptoglobin, mg/mL	0.14	0.17	0.14	0.17	0.020	0.25	0.24
Cortisol, ng/dL	2.29	5.86	1.52	3.70	1.61	0.32	0.61
Interferon- γ , ng/mL	0.08	0.09	0.09	0.10	0.016	0.66	0.38
Kynurenine, ng/mL	2,033	1,993	2,786	5,467	280.6	0.95	<0.001
Trp, ng/mL	11,620	11,707	12,534	20,203	774.5	0.88	<0.001
Ratio of kynurenine to Trp	0.18	0.17	0.27	0.29	0.015	0.97	<0.001
Trp, μ M	56.9	56.9	61.4	92.8	2.79	0.99	<0.001
LNAA, ⁴ μ M	1,139	1,078	1,422	1,342	47.9	0.32	0.29
Ratio of Trp to LNAA	0.053	0.055	0.043	0.070	0.0017	0.24	<0.001

¹CTRL = calves without amino acid supplementation in the milk replacer; TRP = calves fed a milk replacer with a daily dose of 4.5 g/d of Trp.

²T₀ = effect of 4.5 g/d of Trp supplementation before the milk replacer morning feeding; T₃ = effect of 4.5 g/d of Trp supplementation 3-h after the morning feeding.

³NEFA = nonesterified fatty acids.

⁴LNAA = large neutral amino acids: Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, His, Trp, Met, and Thr.

Table 5. Plasma AA profile of calves as affected by supplementation of 4.5 g of Trp/d

AA, $\mu\text{mol}/100\text{ L}$	Treatment ¹				SEM	<i>P</i> -value ²	
	0 h		3 h			0 h	3 h
	CTRL	TRP	CTRL	TRP		T ₀	T ₃
Asn/Ser	4.71	4.90	4.69	4.91	0.113	0.21	0.20
Glu	3.67	3.47	2.91	2.71	0.119	0.24	0.26
Gly	12.4	13.5	8.8	9.4	0.46	0.09	0.37
Gln	10.3	10.4	11.1	11.1	0.26	0.82	0.99
His	2.46	2.50	2.38	2.49	0.076	0.74	0.29
Arg	6.71	6.58	5.92	5.88	0.163	0.53	0.87
Cit	4.18	4.45	3.70	3.73	0.176	0.31	0.88
Thr	4.17	4.01	4.40	4.05	0.135	0.41	0.06
Ala	7.24	7.37	7.88	8.11	0.180	0.53	0.46
Pro	3.29	3.36	3.99	4.08	0.068	0.43	0.36
Tyr	2.03	1.91	1.96	1.85	0.056	0.08	0.25
Val	9.77	9.43	10.60	10.09	0.311	0.40	0.29
Met	0.78	0.78	1.32	1.34	0.044	0.93	0.84
Orn	4.06	3.95	3.74	3.68	0.100	0.50	0.62
Lys	4.81	4.45	6.80	6.58	0.178	0.018	0.54
Cys	4.34	4.30	3.97	3.97	0.113	0.83	0.99
Ile	4.66	4.46	4.73	4.41	0.138	0.30	0.11
Leu	5.75	5.44	6.70	6.30	0.180	0.19	0.14
Phe	2.91	2.91	2.81	2.75	0.047	0.93	0.36
Trp	1.78	1.80	1.56	2.57	0.061	0.73	<0.001

¹CTRL = calves without amino acid supplementation in the milk replacer; TRP = calves fed a milk replacer with a daily dose of 4.5 g/d of Trp.

²T₀ = effect of 4.5 g/d of Trp supplementation before the milk replacer morning feeding; T₃ = effect of 4.5 g/d of Trp supplementation 3-h after the morning feeding.

concentration were observed in TRP calves compared with CTRL calves before the morning feeding. After the morning MR feeding, plasma Thr concentration tended ($P = 0.06$) to decrease in TRP compared with CTRL animals.

CONCLUSIONS

Supplementing 4.5 g/d Trp via MR between 48 and 62 d of life did not have any effect on performance and behavior in calves during the weaning process. Modest metabolic changes might suggest some benefits in the Trp uptake or implications in oxidative defenses, but direct positive effects on helping calves coping with the stress associated with limited MR allowance or gradual weaning of young calves were not observed.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL2015-68463-C2-1-P and AGL2015-68463-C2-2-P). A partial support was also received from the Centre de Recerca de Catalunya (CERCA) program from Generalitat de Catalunya (Barcelona, Spain). We also thank Jordi Casino, Clara Jiménez, and Àlex Campreciós from the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries for their help with calf management and care, Granja Muruc for providing the calves, and Laura Arroyo from Universitat Autònoma of Barcelona (UAB) for collaboration with laboratory analyses. Natalia Yeste is recipient of a fellowship from the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. The authors have no conflicts of interest.

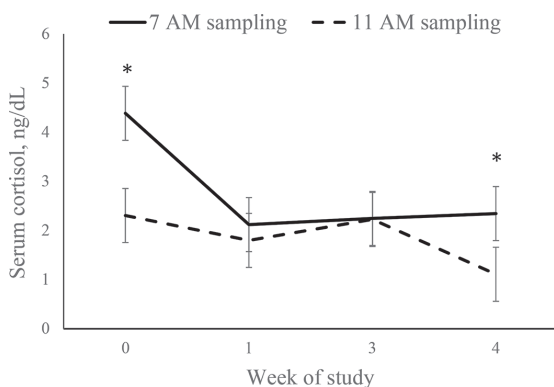


Figure 3. Evolution of serum cortisol concentration throughout the weaning process [0700 h sampling corresponds to sampling before the milk replacer (MR) morning feeding, and 1100 h sampling corresponds to 3-h after the MR morning feeding at 0, 1, and 3 wk of study]. Asterisks denote differences between 0700 and 1100 h sampling. Error bars are SEM.

REFERENCES

- AOAC International. 1999. Official Methods of Analysis. 16th ed. AOAC, Arlington, VA.
- AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis. 17th ed. AOAC, Arlington, VA.
- Badawy, A. A. 2017. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. *Int. J. Tryptophan Res.* 10:1–20. <https://doi.org/10.1177/1178646917691938>.
- Birdsall, T. C. 1998. 5-hydroxytryptophan: A clinically-effective serotonin precursor. *Altern. Med. Rev.* 3:271–280.
- Bolt, S. L., N. K. Boyland, D. T. Mlynski, R. James, and D. P. Croft. 2017. Pair housing of dairy calves and age at pairing: Effects on weaning stress, health, production and social networks. *PLoS One* 12:e0166926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166926>.
- Christen, S., E. Peterhans, and R. Stocker. 1990. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: Possible implication for inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2506–2510. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2506>.
- Eckert, E., H. E. Brown, K. E. Leslie, T. J. DeVries, and M. A. Steele. 2015. Weaning age affects growth, feed intake, gastrointestinal development, and behavior in Holstein calves fed an elevated plane of nutrition during the preweaning stage. *J. Dairy Sci.* 98:6315–6326. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9062>.
- Gibson, E. L. 2018. Tryptophan supplementation and serotonin function: Genetic variations in behavioural effects. *Proc. Nutr. Soc.* 77:174–188. <https://doi.org/10.1017/S0029665117004451>.
- Heinrichs, J. 2013. The Penn State Particle Separator. Cooperative Extension, College of Agricultural Sciences. DSE 2013-186:1–8.
- Hernández-Castellano, L. E., L. L. Özçelik, R. Hernandez, and R. M. Brockmaier. 2018. Short communication: Supplementation of colostrum and milk with 5-hydroxy-L-tryptophan affects immune factors but not growth performance in newborn calves. *J. Dairy Sci.* 101:794–800. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13501>.
- Höglund, E., Ø. Øverli, and S. Winberg. 2019. Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: A comparative review. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 10:158. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00158>.
- Horvath, K. C., and E. K. Miller-Cushon. 2017. The effect of milk-feeding method and hay provision on the development of feeding behavior and non-nutritive oral behavior of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 100:3949–3957. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12223>.
- Hulbert, L. E., C. J. Cobb, J. A. Carroll, and M. A. Ballou. 2011. The effects of early weaning on innate immune responses of Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 94:2545–2556. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3983>.
- Khan, M. A., H. J. Lee, W. S. Lee, H. S. Kim, S. B. Kim, K. S. Ki, J. K. Ha, H. G. Lee, and Y. J. Choi. 2007. Pre- and postweaning performance of Holstein female calves fed milk through step-down and conventional methods. *J. Dairy Sci.* 90:876–885. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71571-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71571-0).
- Krause, E. G., A. D. de Kloet, J. N. Flak, M. D. Smeltzer, M. B. Solomon, N. K. Evanson, S. C. Woods, R. R. Sakai, and J. P. Herman. 2011. Hydration state controls stress responsiveness and social behaviors. *J. Neurosci.* 31:5470–5476. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6078-10.2011>.
- Mao, X., M. Lv, B. Yu, J. He, P. Zheng, J. Yu, Q. Wang, and D. Chen. 2014. The effect of dietary tryptophan levels on oxidative stress of liver induced by diquat in weaned piglets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5:49. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-49>.
- Marco-Ramell, A., A. M. De Almeida, S. Cristobal, P. Rodrigues, P. Roncada, and A. Bassols. 2016. Proteomics and the search for welfare and stress biomarkers in animal production in the one-health context. *Mol. Biosyst.* 12:2024–2035. <https://doi.org/10.1039/C5MB00788G>.
- Marrero, M. G., B. Dado.Senn, S. L. Field, D. R. da Silva, A. L. Skibiell, and J. Laporta. 2019. Increasing serotonin bioavailability in preweaned dairy calves impacts hematology, growth, and behavior. *Domest. Anim. Endocrinol.* 69:42–50. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.04.007>.
- Robertson, J. B., and P. J. Van Soest. 1981. The detergent system of analysis. Chapter 9, pages 123–158 in *The Analysis of Dietary Fiber in Food*. W. P. T. James and O. Theander, ed. Marcel Dekker, New York, NY.
- Shen, Y. B., G. Voilqué, J. D. Kim, J. Odle, and S. W. Kim. 2012. Effects of increasing tryptophan intake on growth and physiological changes in nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 90:2264–2275. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4203>.
- Stamey, J. A., N. A. Janovick, A. F. Kertz, and J. K. Drackley. 2012. Influence of starter protein content on growth of dairy calves in an enhanced early nutrition program. *J. Dairy Sci.* 95:3327–3336. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5107>.
- UNE. 2005a. Animal feeding stuffs. Determination of amino acids content. ISO13903:2005. UNE, Madrid, Spain.
- UNE. 2005b. Animal feeding stuffs. Determination of tryptophan content. ISO13904:2005. UNE, Madrid, Spain.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- Yabut, J. M., J. D. Crane, A. E. Green, D. J. Keating, W. I. Khan, and G. R. Steinberg. 2019. Emerging roles for serotonin in regulating metabolism: New implications for an ancient molecule. *Endocr. Rev.* 40:1092–1107. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00283>.
- Yu, K., M. Matzapetakis, D. Valent, Y. Saco, A. M. De Almeida, M. Terré, and A. Bassols. 2018. Skeletal muscle metabolomics and blood biochemistry analysis reveal metabolic changes associated with dietary amino acid supplementation in dairy calves. *Sci. Rep.* 8:13850. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32241-4>.
- Yunta, C., I. Guasch, and A. Bach. 2012. Short communication: Lying behavior of lactating dairy cows is influenced by lameness especially around feeding time. *J. Dairy Sci.* 95:6546–6549. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5670>.

ORCID

- N. Yeste  <https://orcid.org/0000-0003-2471-2064>
- A. Bassols  <https://orcid.org/0000-0003-4213-2274>
- A. Bach  <https://orcid.org/0000-0001-6804-2002>
- M. Terré  <https://orcid.org/0000-0002-2815-9035>



Article

Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of the Antioxidant Hydroxytyrosol on Brain Neurochemistry and Development in a Porcine Model

Natalia Yeste ¹, Daniel Valent ¹, Laura Arroyo ¹, Marta Vázquez-Gómez ², Consolación García-Contreras ², Martí Pumarola ³, Antonio González-Bulnes ^{2,4,5} and Anna Bassols ^{1,*}

- ¹ Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, 08193 Barcelona, Spain; natalia.yeste@uab.cat (N.Y.); danivalent457@gmail.com (D.V.); laura.arroyo88@gmail.com (L.A.)
 - ² Faculty of Veterinary Sciences, UCM, Ciudad Universitaria s/n., 28040 Madrid, Spain; mvgomez@ucm.es (M.V.-G.); garcia.consolacion@inia.es (C.G.-C.); antonio.gonzalezbulnes@uchceu.es (A.G.-B.)
 - ³ Unitat de Patologia Murina i Comparada, Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, 08193 Barcelona, Spain; marti.pumarola@uab.cat
 - ⁴ Comparative Physiology Group, INIA, Avda, Puerta de Hierro s/n., 28040 Madrid, Spain
 - ⁵ Departamento de Produccion y Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, Tirant lo Blanc, 7, Alfara del Patriarca, 46115 Valencia, Spain
- * Correspondence: anna.bassols@uab.cat



Citation: Yeste, N.; Valent, D.; Arroyo, L.; Vázquez-Gómez, M.; García-Contreras, C.; Pumarola, M.; González-Bulnes, A.; Bassols, A. Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of the Antioxidant Hydroxytyrosol on Brain Neurochemistry and Development in a Porcine Model. *Antioxidants* **2021**, *10*, 884. <https://doi.org/10.3390/antiox10060884>

Academic Editor: Domenico Nuzzo

Received: 26 April 2021

Accepted: 22 May 2021

Published: 31 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Supplementation of a mother's diet with antioxidants, such as hydroxytyrosol (HTX), has been proposed to ameliorate the adverse phenotypes of fetuses at risk of intrauterine growth restriction. In the present study, sows were treated daily with or without 1.5 mg of HTX per kilogram of feed from day 35 of pregnancy (at 30% of total gestational period), and individuals were sampled at three different ages: 100-day-old fetuses and 1-month- and 6-month-old piglets. After euthanasia, the brain was removed and the hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex were dissected. The profile of the catecholaminergic and serotonergic neurotransmitters (NTs) was characterized and an immunohistochemical study of the hippocampus was performed. The results indicated that maternal supplementation with HTX during pregnancy affected the NT profile in a brain-area-dependant mode and it modified the process of neuron differentiation in the hippocampal CA1 and GD areas, indicating that cell differentiation occurred more rapidly in the HTX group. These effects were specific to the fetal period, concomitantly with HTX maternal supplementation, since no major differences remained between the control and treated groups in 1-month- and 6-month-old pigs.

Keywords: hydroxytyrosol; neurotransmitters; hippocampus; neuron differentiation; intrauterine growth restriction; brain; pig; oxidative stress

1. Introduction

Polyphenols are the most common antioxidants found in food since they are abundant in many vegetal sources. One of the most potent polyphenols is hydroxytyrosol (HTX), which is present in olive fruits (and hence in virgin olive oil) and is one of the main compounds responsible for the benefits of the Mediterranean diet [1]. HTX has recognized antioxidant activity and regulatory properties on metabolism, inflammation, and immuno-modulation [2,3]. HTX is easily absorbed, leading to biologically active concentrations in plasma, and it is metabolized in polyphenol derivatives, which also have positive effects [4] and are able to cross the blood–brain barrier [5]. There is increasing clinical and epidemiological evidence on its relevance against pathologies, such as cancer, inflammatory, cardiovascular, metabolic, infectious, and neurodegenerative diseases [6–9].

The neuroprotective effect of polyphenols, such as HTX, is related to their antioxidant effect and the improvement in mitochondrial function, reducing the overall brain oxidative damage. Thanks to all these findings, HTX has been postulated as a nutraceutical for preventing and treating different diseases [2,10,11]. Besides pathological conditions, diets rich in antioxidants are believed to behave as potential anti-aging agents and promote a healthy aging brain [12,13].

While many studies have demonstrated the goodness of diet supplementation with antioxidants, including HTX, during adult life and their role as neuroprotectors in several human pathologies and animal models [14–19], the literature on the potential effects of prenatal exposure to antioxidants is scarcer [20]. Excessive production of reactive oxygen species (ROS) may occur at certain windows in placental development and pathologic pregnancies and, for this reason, the efficacy of antioxidants at ameliorating adverse phenotypes was investigated (e.g., antioxidant vitamins and melatonin) [21,22]. Indeed, animal studies have shown that using antioxidant treatments in either hypoxic or complicated pregnancies can prevent the deleterious effects of the oxidative status in the fetoplacental unit [23–25]. A consequence of inadequate maternal nutrition and/or placental efficiency is intrauterine growth restriction (IUGR), which leads to the birth of small-for-gestational-age (SGA, also known as low-birth-weight (LBW)) offspring [26,27]. In humans, SGA is associated with an increased risk of perinatal morbidity and mortality, and surviving offspring are predisposed to chronic disorders, such as obesity, type II diabetes, and cardiovascular diseases [28,29]. In veterinary medicine and animal production, offspring with a low birth weight are prone to perinatal death, which causes substantial economic losses to farms [30].

Previous studies from our groups using a porcine model for IUGR have described that, besides its consequences on growth and metabolism, IUGR affects the neurotransmitter (NT) profile in several brain areas [31,32] and alters the proteome of the hippocampus [33]. Specifically, an increase in dopamine metabolites, mostly in the hippocampus of low-birth-weight newborn piglets in comparison to normal-birth-weight neonates, was shown [31]. Chemical NTs are principal actors in all neuronal operations. Noradrenergic, dopaminergic, and serotonergic pathways are the most important and well-characterized systems controlling homeostasis and underlying the response to many external signals [34]. Catecholamines include noradrenergic and dopaminergic systems. They are synthesized from tyrosine via hydroxylation to form L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) via tyrosine hydroxylase. This initial step is rate-limiting and controls the synthesis of catecholamines throughout the entire pathway. Afterward, it is decarboxylated to form dopamine (DA), which is subsequently converted into noradrenaline (NA) in noradrenergic neurons. DA is catabolized by the combined action of monoamine oxidase (MAO) and catechol-O-methyltransferase (COMT), mainly to its metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) [35]. In a parallel pathway, the indoleamine serotonin (5-HT, 5-hydroxytryptamine) is synthesized from tryptophan by the enzyme tryptophan hydroxylase and is catabolized to 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) by MAO and COMT. Other authors, also using a porcine model, have described that the IUGR piglet brain has fewer NeuN-positive cells and reduced myelination in the parietal cortex, and emphasize the similarity between pigs and humans [36]. The consequences of IUGR in HC development depend on the type and onset of the restriction and can affect the volume and number of neurons [37,38], as well as neurotransmission [39–43].

Previous studies by our research groups using a porcine animal model of IUGR determined that maternal HTX supplementation was able to improve the growth and metabolism of the offspring during prenatal, early-postnatal, and juvenile periods [44,45]. Specifically, treatment with HTX was associated with a higher mean birth weight and a lower incidence of low-birth-weight piglets. Afterward, during the lactation period, piglets in the treated group showed a higher body weight than the control piglets, suggesting that maternal supplementation with HTX may improve the development of offspring in pregnancies at risk of IUGR. Further studies demonstrated that the effects of HTX were

pleiotropic and also affected the antioxidant status, glucose, and fatty acid metabolism, as well as the placental gene expression and DNA methylation of the fetuses [46,47].

The objectives of the present work were to extend these results in the same group of animals by examining the effects of maternal HTX supplementation in the brain of the offspring at risk of restricted growth by assessing the following: first, the catecholaminergic and serotonergic NT profiles in the amygdala, hippocampus, and prefrontal cortex, which are brain areas involved in complex functions (memory, learning, mood, emotion, stress, cognition, etc.); secondly, the hippocampus morphology and development by using neuronal immunohistochemical markers.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

The study was performed according to the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63/UE about the protection of animals used in research. The experiment was specifically assessed and approved (report CEEA 2013/036) by the INIA Committee of Ethics in Animal Research, which is the named Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) for the INIA. The sows were housed at the animal facilities of the INIA, which meets the local, national, and European requirements for Scientific Procedure Establishments.

2.2. Animals and Experimental Procedure

The study involved 99 fetuses and 102 piglets obtained from 51 purebred Iberian sows that became pregnant after cycle synchronization with Altrenogest (Regumate, MSD, Boxmeer, The Netherlands) and insemination with cooled semen from a purebred Iberian boar. Subjects and experimental procedures were the same that in previous studies [44–47].

Sows were fed with a standard grain-based diet that was adjusted to fulfill individual daily maintenance requirements based on data from the British Society of Animal Science [48]. On gestational day 35, all sows were weighed and the food amount from that day until delivery was adjusted to fulfill 50% of the daily maintenance requirements. This diet restriction was previously found to affect fetal development and to induce a higher incidence of low birth weight in newborns [30,49]. Furthermore, on gestational day 35, sows were pair-matched according to body weight such that 26 females became the untreated control group (Ctrl), whilst the 25 remaining females acted as the treated group by receiving 1.5 mg of HTX per kg of feed each day from day 35 of pregnancy to delivery (HTX).

Fetuses were obtained at day 100 of pregnancy, sexed, and weighed immediately after retrieval (55 Ctrl and 44 HTX). Piglets were identified at birth, tagged with earrings, and underwent within-group fostering in order to equalize the number of piglets among sows and avoid effects due to postnatal nutrition. Afterward, all piglets remained with sows in individual pens (one sow per pen) until weaning at 1 month old, when 52 piglets were sampled (18 Ctrl and 34 HTX). Piglets sampled at 6 months old (31 Ctrl and 19 HTX) were kept in collective pens, separated by sex and weight, but mixing treatments, and fed with commercial maintenance diets [45,46].

The sample size, sex distribution, and mean body weight for each group of animals are summarized in Supplementary Table S1. Data about the effect of HTX supplementation on phenotypic traits during prenatal and postnatal stages concomitant to the present study were previously published [44–47].

Sampling was performed after stunning and exsanguination in compliance with RD53/2013 standard procedures. Subsequently, the head was separated from the trunk at the atlanto-occipital union and the brain was removed from the skull and weighted. Both hippocampi, both amygdala, and the prefrontal cortex were dissected. The amygdala, prefrontal cortex, and one of the hippocampi were snap-frozen in liquid nitrogen and biobanked at -80°C until neurotransmitter quantification. The remaining hippocampus

was fixed in 4% formalin in PBS (Amresco, Solon, OH, USA) for 24 h at 4 °C, preserved in 30% sucrose in PBS at 4 °C, and used for immunohistochemistry.

2.3. Quantification of Neurotransmitters

Samples were weighed and homogenized using sonication (Branson Digital Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA) in a lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, and 1% NP-40) with a 0.3 mg tissue/mL lysis buffer relation. Dihydroxybenzylamine (DHBA) was added to the lysis buffer at 300 pg/ μ L as an internal standard for HPLC. Proteins in brain lysates were precipitated by adding 0.25 M perchloric acid containing 0.1 M sodium metabisulfite and 0.25 M EDTA in a 1.5 (*v/v*) ratio. Finally, samples were centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min at 4 °C and kept at -80 °C until analysis.

Concentrations of catecholamines (NA, DA, DOPAC, and HVA) and indoleamines (5-HT, 5-HIAA) were determined using HPLC (EliteLaChrom, Merck-Hitachi, Prague, The Czech Republic) equipped with a Cromolith Rp-18e column (Merck, Darmstadt, Germany) with electrochemical detection (ESA Coulochem II 5200). The mobile phase consisted of a 0.05 M citrate buffer pH 2.8, 0.05 mM EDTA, 1.2 mM sodium octyl sulphate (SOS), and 1% acetonitrile. The applied voltage was set at 0.4 mV and the flow rate was 1.2 mL/min. All procedures are described in detail in [50].

2.4. Determination of Parameters Related to Oxidative Stress

Tissue homogenates of the prefrontal cortex and hippocampus obtained as above were centrifuged at $14,000 \times g$ for 10 min. The following antioxidant parameters were determined in the supernatants: total antioxidant status (TAS) and activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). All parameters were assayed using diagnostic kits manufactured by RANDOX (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, County Antrim, UK). The assays were performed using an Olympus AU400 automatic analyzer (Beckman Coulter, Hamburg, Germany).

To confirm the redox status, malondialdehyde (MDA) was measured as an indicator of fatty acid peroxidation in tissue homogenates by using the TBARS/TCA assay kit (thio-barbituric acid reactive substances, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, item number 700870) according to the manufacturer's instructions. MDA-thio-barbituric acid adducts were generated in acidic and high-temperature (100 °C) conditions. MDA concentrations were measured based on the absorbance of thio-barbituric acid reactive substances using spectrophotometry at 530 nm.

2.5. Immunohistochemical Analysis of the Hippocampus

Hippocampal samples were frozen in OCT medium (Aname, Madrid, Spain) using molds, an isopentane bath (Sigma, St. Louis, MO, USA), and dry ice, controlling the freezing temperature between -40 °C and -60 °C. The OCT blocks were cut with a cryostat (SME Cryotome Thermo Electron Corporation, Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) into 40 μ m thick sections in a longitudinal orientation, collecting them in flotation with an antifreeze solution pH 7.4 (40% ethylene glycol, 30% glycerol, and 30% phosphate buffer 0.1 M pH 7.4).

For immunohistochemistry, a minimum of 6 sections per individual were analyzed. Sections were washed using a phosphate buffer 0.1 M pH 7.4, and endogenous peroxidase activity was blocked using 1% H_2O_2 . Sections were blocked with 2% normal goat serum (NGS) and incubated with the corresponding primary antibodies with NGS overnight at 4 °C. The antibodies used were raised against NeuN (1:1000, Mouse monoclonal anti-neuronal nuclei; Merck Millipore, Chemicon, Billerica, MA, USA, Ref. MAB377), doublecortin (DCX, 1:750, Rabbit polyclonal anti-doublecortin; Abcam, Cambridge, MA, USA, Ref. ab18723), and neurofilaments (NFT, 1:10,000, Mouse monoclonal anti-neurofilament 200; Sigma, St. Louis, MO, USA, Ref. N0142). Afterward, the sections were washed and incubated with biotinylated goat secondary antibodies (1:500, anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG; Agilent Technologies, Dako, Glostrup, Denmark). Next, sections were

incubated with an avidin–biotin–peroxidase complex (Standard ABC Peroxidase Staining Kit; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) and revealed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB Liquid Substrate System; Sigma, St. Louis, MO, USA). Sections were transferred to Superfrost Plus™ adherent slides, counterstained with hematoxylin, and mounted in resinous DPX mounting medium (Sigma, St. Louis, MO, USA).

2.6. Image Processing and Analysis

Slides were digitally scanned with 2.0HT Nanozoomer (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) at the Histopathology Service of the Biomedicine Research Institute (IRB, Barcelona, Spain). The scanned images were visualized and analyzed using NDP.view 2 software (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan).

NeuN immunostaining was analyzed using ImageJ 1.52p free software from the website of the National Institutes of Health [51] (NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>, accessed on 19 May 2021). The whole tissue area, neuron area, and neuron area percentage were calculated. To obtain the level of the specific DAB signal on the whole tissue in the photograph, the actual area of neurons was calculated by subtracting the blank areas that contained no tissue (e.g., lumina of vessels and artifacts). Moreover, the DAB-positive area outside the neuron area was excluded. Individual neuron clusters were numbered to obtain information regarding a particular neuron (size, circularity, area, etc.) from the tabulated results.

2.7. Statistical Analyses

All statistical analyses were performed in SPSS 24.0 software (IBM, Chicago, IL, USA). The significance level was established at $p < 0.05$ and a tendency was considered for $0.05 \leq p \leq 0.1$. Descriptive data are presented with the means and the standard error (mean \pm SE).

Normal distributions of the variables were confirmed using a Kolmogorov–Smirnov test. Whenever possible, data were log-transformed to correct the distribution and hence permit the use of parametric statistics.

Normally distributed measures were analyzed using the UNIANOVA procedure of SPSS with Tukey's adjustment. In all models, each pig was introduced as the experimental unit, the fixed effects included were treatment (Ctrl and HTX), age (fetuses and 1 month and 6 months old), sex (male and female), and their interactions. In addition, pairwise comparisons with a Bonferroni adjustment were also performed for significant interactions.

3. Results

3.1. Effects of Maternal Supplementation with HTX on the Neurotransmitter Profile in Several Brain Areas of the Progeny

3.1.1. Amygdala

The results are shown in Table 1 and Figure 1.

Maternal supplementation with HTX caused a decrease in NA concentration in the fetuses, whereas there were no differences at 1 month of age and an increase at 6 months old.

All dopaminergic compounds followed similar patterns. Maternal supplementation with HTX increased DA, DOPAC, and HVA in the fetuses, whereas the effect was not significant at 1 month or 6 months. When analyzing the total dopaminergic compounds (DOP total), an important effect of the treatment was observed. The ratios between the metabolites and DA were also calculated (DOPAC/DA, HVA/DA, and (DOPAC + HVA)/DA) as indicators of the metabolization rate of the functional neurotransmitters. In this case, there was no effect of the treatment with HTX.

Table 1. Effects of the supplementation of the maternal diet without (Ctrl) or with HTX on the mean values of the concentration of neurotransmitters in the amygdala of 100-day fetuses and 1-month- and 6-month-old pigs.

		Fetuses	1 Month	6 Months	Treatment	<i>p</i> -Values Age	Interaction
NA	Ctrl	44.00 ± 2.42 ^{Aa}	107.93 ± 15.13 ^{Ab}	106.33 ± 5.65 ^{Ab}	0.143	<0.001	<0.001
	HTX	31.46 ± 1.84 ^{Ba}	126.21 ± 9.21 ^{Ab}	160.86 ± 18.45 ^{Bb}			
DA	Ctrl	204.36 ± 12.56 ^{Aa}	496.22 ± 56.40 ^{Ab}	294.06 ± 36.78 ^{Ac}	0.062	<0.001	0.032
	HTX	309.88 ± 32.97 ^{Ba}	404.25 ± 26.16 ^{Ab}	406.63 ± 56.90 ^{Bab}			
DOPAC	Ctrl	94.84 ± 4.28 ^{Aa}	133.03 ± 15.14 ^{Ab}	114.31 ± 6.48 ^{Aab}	<0.001	0.008	0.072
	HTX	143.09 ± 7.00 ^{Ba}	162.14 ± 13.17 ^{Aa}	139.50 ± 15.03 ^{Aa}			
HVA	Ctrl	294.93 ± 13.26 ^{Aa}	301.14 ± 43.09 ^{Aa}	270.65 ± 18.18 ^{Aa}	0.002	<0.001	0.001
	HTX	432.63 ± 14.85 ^{Ba}	270.08 ± 19.39 ^{Ab}	345.39 ± 40.52 ^{Ab}			
DOPAC/DA	Ctrl	0.51 ± 0.02 ^{Aa}	0.28 ± 0.02 ^{Ab}	0.46 ± 0.03 ^{Aa}	0.082	<0.001	0.008
	HTX	0.70 ± 0.17 ^{Aa}	0.41 ± 0.02 ^{Bb}	0.39 ± 0.03 ^{Ab}			
HVA/DA	Ctrl	1.62 ± 0.09	0.63 ± 0.04	1.08 ± 0.07	0.763	<0.001	0.429
	HTX	2.23 ± 0.43	0.70 ± 0.04	0.98 ± 0.08			
(DOPAC + HVA)/DA	Ctrl	2.14 ± 0.11	0.91 ± 0.06	1.54 ± 0.09	0.422	<0.001	0.206
	HTX	2.93 ± 0.59	1.11 ± 0.06	1.37 ± 0.11			
DOP total	Ctrl	594.13 ± 26.24 ^{Aa}	930.39 ± 106.55 ^{Ab}	679.01 ± 59.47 ^{Aa}	0.001	0.034	0.002
	HTX	885.61 ± 46.65 ^{Ba}	836.47 ± 50.81 ^{Aa}	891.51 ± 103.69 ^{Ba}			
5-HT	Ctrl	312.30 ± 14.32	731.64 ± 43.08	894.76 ± 41.52	<0.001	<0.001	0.111
	HTX	417.39 ± 17.59	886.94 ± 46.18	998.98 ± 95.43			
5-HIAA	Ctrl	113.45 ± 5.28 ^{Aa}	169.36 ± 8.33 ^{Ab}	184.00 ± 7.19 ^{Ab}	0.008	<0.001	<0.001
	HTX	163.29 ± 5.73 ^{Ba}	196.31 ± 12.09 ^{Aa}	183.75 ± 18.56 ^{Aa}			
5-HIAA/5-HT	Ctrl	0.39 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.321	<0.001	0.059
	HTX	0.41 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.18 ± 0.01			
IND total	Ctrl	425.75 ± 17.86 ^{Aa}	901.00 ± 48.81 ^{Ab}	1078.76 ± 45.48 ^{Ab}	<0.001	<0.001	0.021
	HTX	580.68 ± 21.36 ^{Ba}	1083.25 ± 51.18 ^{Bb}	1182.73 ± 111.92 ^{Ab}			

Concentrations are presented as the mean ± SE. Units ng/g tissue. Different capital letters (Aa = Ab = Ac = Aab) ≠ (Ba = Bb = Bab) represent significant differences between treatments for each age ($p < 0.05$). Different lowercase letters (Aa = Ba = Aab = Bab) ≠ (Ab = Bb = Aab = Bab) ≠ Ac represent significant differences between ages for the same treatment ($p < 0.05$). NA: noradrenalin; DA: dopamine; DOPAC: 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid; HVA: homovanillic acid; 5-HT: serotonin/5-hydroxytryptamine; 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid; DOP total: total dopaminergic neurotransmitters; IND total: total serotonergic neurotransmitters.

Regarding serotonergic compounds, an increase in 5-HT and 5-HIAA was observed in the fetuses in the HTX group, whereas differences were not significant at 1 month and 6 months old. No effect of HTX treatment in the ratio 5-HIAA/5-HT was observed.

In general, it could be concluded that the effects of HTX were clear in the fetuses, whereas they were milder or nonexistent at the postnatal ages (Figure 1).

Regarding the effect of age, NA, DA, and its metabolite DOPAC largely increased after birth in the control and HTX-treated animals. The metabolite HVA was not altered with age in the control animals, whereas there was a decrease in the HTX-treated animals. Correspondingly, an important effect of age on the total dopaminergic compounds was observed. There was also a significant effect of age on the ratios between metabolites and DA. Finally, a large increase in 5-HT and its metabolite 5-HIAA with age was observed in the control and HTX-treated animals. The ratio 5-HIAA/5-HT decreased at 1 month and 6 months old.

Finally, the effect of sex was analyzed and found to be non-significant, except for NA and HVA. The potential interactions between the HTX-treatment and sex were also analyzed but were found to be non-significant for any variable (Supplementary Tables S2 and S3).

3.1.2. Hippocampus

The results are shown in Table 2 and Figure 1.

HTX increased the concentration of NA in the fetuses, whereas there were no differences at 1 and 6 months of age.

Regarding dopaminergic neurotransmitters, maternal supplementation with HTX increased DOPAC and HVA in fetuses, whereas there was no significant effect at 1 month

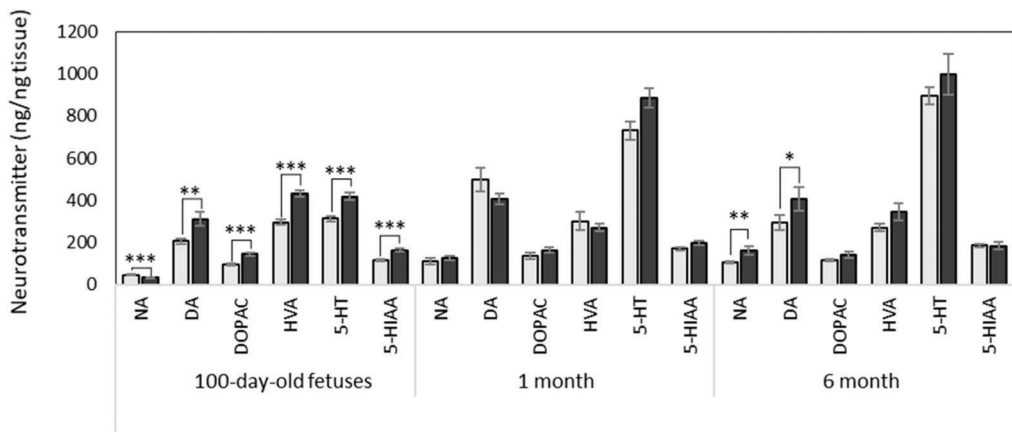
and 6 months old. The ratios between metabolites indicated the same trend since all of them were altered in fetuses, but no changes were observed at older ages.

When analyzing the effects of the HTX treatment on serotonergic compounds, an increase in 5-HT was observed in fetuses, whereas differences were not significant at 1 month old and 6 months old. No effect of HTX treatment was observed on the ratio 5-HIAA/5-HT.

As it was observed in the amygdala, the effects of HTX were clear in fetuses, whereas they were very mild or nonexistent at the postnatal stage (Figure 1).

Regarding age, NA increased at 1 and 6 months compared with the fetuses in the control and HTX-treated animals. DA and its metabolites DOPAC and HVA decreased at 1 month old and later increased again at 6 months old, following similar patterns in the control and HTX-treated groups. A large increase in 5-HT at 1 month old versus fetuses was observed in Ctrl and HTX-treated animals, and later stabilized at 6 months old. The ratio 5-HIAA/5-HT decreased at 1 and 6 months old compared to the fetuses (Table 2).

A) Amygdala



B) Hippocampus

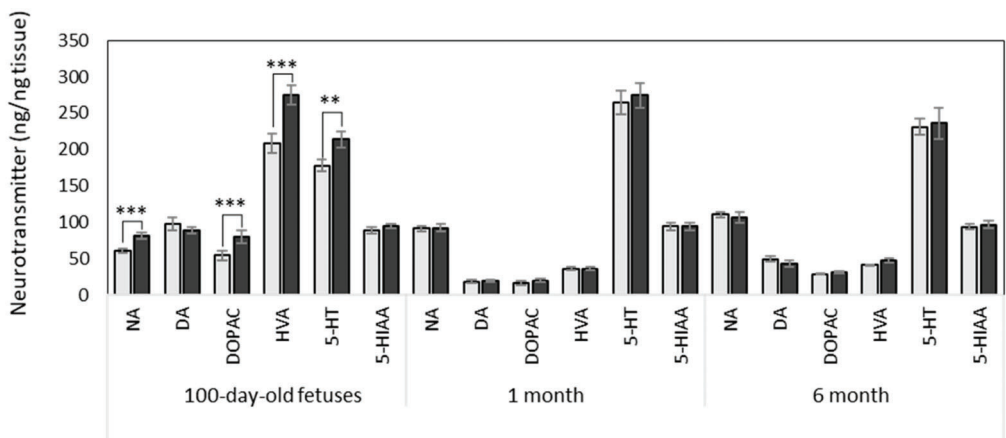


Figure 1. Cont.

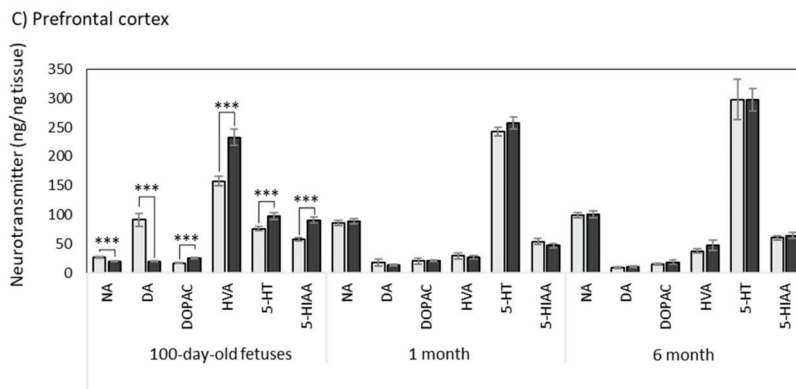


Figure 1. Effect of maternal supplementation with HTX on the concentration of neurotransmitters in the amygdala (A), hippocampus (B), and prefrontal cortex (C) of 100-day old fetuses and 1-month- and 6-month-old pigs. Values in bars (mean \pm SE, ng/g tissue) represent noradrenaline (NA), dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), serotonin (5-HT), and 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA). Light bars represent results from the control groups, and dark bars represent results from individuals whose mothers were treated with HTX. Asterisks indicate significant differences between the control group and the HTX group for the respective ages (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

Finally, the effect of sex was also analyzed and an increase of dopaminergic compounds in females was observed. The potential interactions between the HTX treatment and sex were also analyzed but were found to be non-significant for any variable (Supplementary Tables S2 and S3).

3.1.3. Prefrontal Cortex

The results are shown in Table 3 and Figure 1.

Maternal supplementation with HTX caused a decrease in NA in the fetuses, whereas there were no differences at 1 and 6 months of age.

When analyzing the dopaminergic pathways, supplementation with HTX decreased DA and increased its metabolites DOPAC and HVA in the fetuses, whereas there was no significant effect at 1 month and 6 months old. The ratios between metabolites followed the same trend since all of them were altered in fetuses, indicating a faster metabolization of DA, but no changes were observed at older ages.

When analyzing the effects of HTX on serotonergic compounds, an increase in 5-HT and 5-HIAA was observed in the fetuses, whereas the differences were not significant at 1 month and 6 months old. Treatment with HTX increased the 5-HIAA/5-HT ratio only in fetuses, but no effect was observed at older ages.

Again, and in general, the effects of HTX were clear in the fetuses, whereas they were milder or nonexistent at the postnatal stage (Figure 1).

Regarding age, NA increased at 1 and 6 months compared with the fetuses in the control and HTX-treated animals. Amongst the dopaminergic neurotransmitters, DA markedly decreased at 1 and 6 months old in the control group. Its metabolite, namely, HVA, followed a similar pattern, whereas DOPAC remained constant throughout the development. 5-HT increased with age, where it was much higher at the postnatal stage than in the fetuses. The ratio 5-HIAA/5-HT decreased at 1 and 6 months old compared to the fetuses.

Table 2. Effects of the supplementation of the maternal diet without (Ctrl) or with HTX on the mean values of the concentration of neurotransmitters in the hippocampus of 100-day-old fetuses, and 1-month- and 6-month-old pigs.

		Fetuses	1 Month	6 Months	Treatment	<i>p</i> -Values Age	Interaction
NA	Ctrl	60.71 ± 3.28 ^{Aa}	91.21 ± 3.88 ^{Ab}	110.24 ± 3.98 ^{Ab}	0.096	<0.001	0.001
	HTX	81.25 ± 3.89 ^{Ba}	92.42 ± 4.64 ^{Aab}	106.90 ± 7.34 ^{Ab}			
DA	Ctrl	97.87 ± 9.25	18.55 ± 2.31	48.99 ± 3.78	0.643	<0.001	0.312
	HTX	88.40 ± 4.64	19.56 ± 1.88	42.76 ± 3.96			
DOPAC	Ctrl	54.37 ± 6.60 ^{Aa}	16.51 ± 2.66 ^{Ab}	28.57 ± 0.67 ^{Aa}	0.002	<0.001	0.023
	HTX	79.54 ± 8.64 ^{Ba}	19.95 ± 2.32 ^{Ab}	31.61 ± 1.60 ^{Ac}			
HVA	Ctrl	209.07 ± 13.43 ^{Aa}	35.91 ± 1.97 ^{Ab}	40.94 ± 1.11 ^{Ab}	0.024	<0.001	0.015
	HTX	275.01 ± 13.60 ^{Ba}	36.12 ± 2.33 ^{Ab}	46.74 ± 3.01 ^{Ac}			
DOPAC/DA	Ctrl	0.79 ± 0.10	2.04 ± 0.91	0.66 ± 0.04	0.037	0.001	0.066
	HTX	1.04 ± 0.15	1.10 ± 0.10	0.80 ± 0.06			
HVA/DA	Ctrl	2.60 ± 0.18 ^{Aa}	4.50 ± 1.77 ^{Aa}	0.95 ± 0.06 ^{Ab}	0.208	<0.001	0.004
	HTX	3.22 ± 0.13 ^{Ba}	2.08 ± 0.13 ^{Ab}	1.20 ± 0.10 ^{Ac}			
(DOPAC + HVA)/DA	Ctrl	3.40 ± 0.26 ^{Aa}	6.54 ± 2.68 ^{Aa}	1.61 ± 0.10 ^{Ab}	0.100	<0.001	0.011
	HTX	4.26 ± 0.22 ^{Ba}	3.18 ± 0.18 ^{Ab}	2.00 ± 0.15 ^{Ac}			
DOP total	Ctrl	361.31 ± 22.42	70.97 ± 4.77	118.50 ± 4.00	0.063	<0.001	0.061
	HTX	442.95 ± 20.04	75.64 ± 5.34	121.11 ± 6.22			
5-HT	Ctrl	177.71 ± 7.96	264.34 ± 16.57	231.35 ± 11.55	0.203	<0.001	0.216
	HTX	213.97 ± 10.95	274.56 ± 16.94	235.98 ± 21.42			
5-HIAA	Ctrl	88.67 ± 4.15	94.39 ± 5.23	93.66 ± 3.61	0.414	0.475	0.547
	HTX	94.24 ± 3.06	94.21 ± 5.11	96.70 ± 4.84			
5-HIAA/5-HT	Ctrl	0.52 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.502	<0.001	0.410
	HTX	0.47 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.45 ± 0.03			
IND total	Ctrl	266.38 ± 11.14	358.73 ± 20.38	325.01 ± 13.17	0.209	<0.001	0.278
	HTX	308.21 ± 13.05	368.77 ± 19.72	332.68 ± 23.46			

Concentrations are presented as the mean ± SE. Units ng/g tissue. Different capital letters (Aa = Ab = Ac = Aab) ≠ (Ba = Bb = Bab) represent significant differences between treatments for each age ($p < 0.05$). Different lowercase letters (Aa = Ba = Aab = Bab) ≠ (Ab = Bb = Aab = Bab) ≠ Ac represent significant differences between ages for the same treatment ($p < 0.05$). NA: noradrenalin; DA: dopamine; DOPAC: 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid; HVA: homovanillic acid; 5-HT: serotonin/5-hydroxytryptamine; 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid; DOP total: total dopaminergic neurotransmitters; IND total: total serotonergic neurotransmitters.

Finally, the effect of sex was also analyzed and it was found not significant, except NA, HVA, and indoleamines. The potential interactions between HTX treatment and sex were also analyzed but were found to be non-significant for all variables, except for 5-HIAA (Supplementary Tables S2 and S3).

3.2. Effects of Maternal Supplementation with HTX on Oxidative Stress Parameters in Fetuses

Since the effects of the HTX treatment were observed only in the fetuses and to ascertain whether HTX could really affect the oxidative status of the brain, several markers for oxidative stress and antioxidant enzymes were determined in the prefrontal cortex and hippocampus (Table 4).

Our results show that the antioxidant effect of HTX was evident in the PFC since there was a clear decrease in the oxidation status of lipids (MDA assay) and changes in SOD and GPx activities. SOD slightly decreased, whereas GPx increased by 20%, although with a statistical tendency. The results from the same assays in the hippocampus did not yield significant differences between the control and HTX groups.

The effect of sex was also analyzed and it was not found to be significant for any of the parameters.

Table 3. Effects of the supplementation of the maternal diet without (Ctrl) or with HTX on the mean values of the concentration of neurotransmitters in the prefrontal cortex of 100-day-old fetuses and 1-month- and 6-month-old pigs.

		Fetuses	1 Month	6 Months	Treatment	p-Values Age	Interaction
NA	Ctrl	26.97 ± 1.19 ^{Aa}	85.57 ± 4.40 ^{Ab}	99.41 ± 4.68 ^{Ab}	0.067	<0.001	0.003
	HTX	19.92 ± 0.98 ^{Ba}	88.78 ± 4.49 ^{Ab}	101.17 ± 6.01 ^{Ac}			
DA	Ctrl	91.35 ± 11.56 ^{Aa}	18.55 ± 5.72 ^{Ab}	9.22 ± 1.26 ^{Ab}	0.032	<0.001	<0.001
	HTX	19.93 ± 0.56 ^{Ba}	14.08 ± 1.53 ^{Aab}	10.33 ± 1.63 ^{Ab}			
DOPAC	Ctrl	17.20 ± 1.01	20.70 ± 5.03	15.23 ± 1.43	0.121	0.001	0.100
	HTX	25.49 ± 1.47	20.77 ± 1.79	18.39 ± 3.59			
HVA	Ctrl	157.29 ± 8.31 ^{Aa}	29.60 ± 4.92 ^{Ab}	37.93 ± 3.41 ^{Ab}	0.019	<0.001	0.011
	HTX	233.09 ± 13.50 ^{Ba}	27.00 ± 2.64 ^{Ab}	47.79 ± 8.27 ^{Ac}			
DOPAC/DA	Ctrl	0.54 ± 0.08 ^{Aa}	1.46 ± 0.28 ^{Ab}	2.19 ± 0.30 ^{Ab}	0.034	<0.001	<0.001
	HTX	1.27 ± 0.05 ^{Ba}	1.72 ± 0.26 ^{Aa}	2.80 ± 0.74 ^{Aa}			
HVA/DA	Ctrl	5.24 ± 0.80 ^{Aa}	3.14 ± 1.16 ^{Aa}	5.30 ± 0.70 ^{Aa}	0.232	0.010	<0.001
	HTX	11.60 ± 0.45 ^{Ba}	1.67 ± 0.28 ^{Ab}	6.42 ± 1.39 ^{Ac}			
(DOPAC + HVA)/DA	Ctrl	5.78 ± 0.88 ^{Aa}	4.59 ± 0.87 ^{Aab}	7.48 ± 0.98 ^{Ab}	0.097	0.334	<0.001
	HTX	12.87 ± 0.48 ^{Ba}	3.39 ± 0.41 ^{Ab}	9.22 ± 2.08 ^{Ac}			
DOP total	Ctrl	265.84 ± 15.60	108.75 ± 48.17	62.38 ± 4.78	0.291	<0.001	0.076
	HTX	278.51 ± 15.05	58.30 ± 7.94	76.52 ± 11.38			
5-HT	Ctrl	76.34 ± 3.15	243.39 ± 7.37	298.03 ± 34.34	0.043	<0.001	0.208
	HTX	98.14 ± 6.22	257.78 ± 10.50	297.83 ± 19.26			
5-HIAA	Ctrl	57.49 ± 3.00 ^{Aa}	54.33 ± 5.72 ^{Aa}	60.44 ± 3.41 ^{Aa}	0.027	<0.001	<0.001
	HTX	91.03 ± 4.83 ^{Ba}	47.61 ± 3.60 ^{Ab}	64.19 ± 5.15 ^{Ac}			
5-HIAA/5-HT	Ctrl	0.81 ± 0.06 ^{Aa}	0.22 ± 0.02 ^{Ab}	0.23 ± 0.02 ^{Ab}	0.762	<0.001	0.006
	HTX	1.05 ± 0.06 ^{Ba}	0.19 ± 0.01 ^{Ab}	0.22 ± 0.02 ^{Ab}			
IND total	Ctrl	133.83 ± 4.85 ^{Aa}	281.18 ± 18.96 ^{Ab}	358.46 ± 34.67 ^{Ab}	0.003	<0.001	0.001
	HTX	189.17 ± 8.47 ^{Ba}	305.40 ± 12.30 ^{Ab}	362.02 ± 23.13 ^{Ab}			

Concentrations are presented as the mean ± SE. Units ng/g tissue. Different capital letters (Aa = Ab = Ac = Aab) ≠ (Ba = Bb = Bab) represent significant differences between treatments for each age (p < 0.05). Different lowercase letters (Aa = Ba = Aab = Bab) ≠ (Ab = Bb = Aab = Bab) ≠ Ac represent significant differences between ages for the same treatment (p < 0.05). NA: noradrenalin; DA: dopamine; DOPAC: 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid; HVA: homovanillic acid; 5-HT: serotonin/5-hydroxytryptamine; 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid; DOP total: total dopaminergic neurotransmitters; IND total: total serotonergic neurotransmitters.

Table 4. Effect of maternal supplementation with HTX on oxidative stress markers and antioxidant enzymes in the 100-day-old fetuses (mean ± SE).

		MDA (pmol/g Tissue)	TAS (µmol/g Tissue)	GPX (U/g Tissue)	SOD (U/g Tissue)
Prefrontal cortex	Ctrl	1.49 ± 0.092	7.97 ± 0.06	1.58 ± 0.10	11.09 ± 0.06
	HTX	1.19 ± 0.046	7.83 ± 0.07	1.89 ± 0.14	10.30 ± 0.07
	p-Value	0.003	0.134	0.090	0.000
Hippocampus	Ctrl	43.96 ± 2.58	7.43 ± 0.09	1.80 ± 0.16	9.95 ± 0.15
	HTX	46.20 ± 0.99	7.54 ± 0.08	1.85 ± 0.16	10.00 ± 0.09
	p-Value	0.424	0.383	0.838	0.771

3.3. Effects of Maternal Supplementation with HTX on Immunohistochemical Markers in the Hippocampus of the Progeny

Several markers were used to analyze the effects of maternal supplementation with HTX on the hippocampus’s morphology. Major differences were observed in the *Cornu Ammonis* (CA1) and *Gyrus Dentatus* (GD) areas, whereas no effect of HTX supplementation was seen on CA2 and CA3. The quantitative results are summarized in Table 5.

NeuN, which is a marker for neuronal nuclei in mature neurons, was used to analyze the number and distribution of mature neurons in the CA1 and GD areas in the hippocampus of 100-day-old fetuses and 1-month- and 6-month-old pigs (Figure 2). As seen in Figure 2 and Table 5, HTX-treated 100-day-old fetuses showed a higher number of mature neuronal cells in the CA1, as well as in the GD, and cell nuclei were smaller and represented a minor area percentage than in the control pigs. The width of the pyramidal layer was larger in HTX-animals than in control animals (632 μm and 355 μm , respectively). No main differences were observed in the older animals (1-month- and 6-month-old pigs), except for a tendency toward an increase in cell number in the CA1 at 1 month of age, whereas there was no effect of HTX in 6-month-old pigs. An increase in the number of neurons was observed in the GD at 6 months of age in HTX-treated pigs, although the percentage of the area occupied by cells was the same as that in the control pigs. Overall, the width of the GD in HTX-treated pigs was smaller than in the control pigs.

Table 5. Effect of maternal supplementation with HTX on NeuN immunostaining in the hippocampus of control (Ctrl) and HTX-treated pigs. ImageJ was used for the quantification (mean \pm SE).

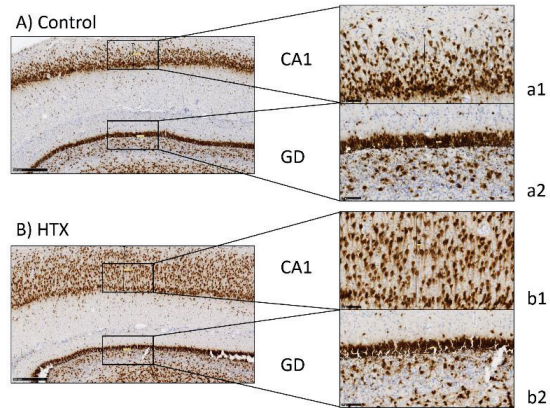
		CA1			GD		
		Cell Count	Area (%)	Mean Size (μm^2)	Cell Count	Area (%)	Mean Size (μm^2)
Fetuses	Ctrl	127.84 \pm 8.13	35.70 \pm 1.31	1791.27 \pm 275.44	79.75 \pm 2.02	27.00 \pm 0.46	1496.11 \pm 49.92
	HTX	167.74 \pm 6.60	30.42 \pm 0.75	823.86 \pm 42.61	87.25 \pm 3.08	23.17 \pm 0.56	1169.11 \pm 50.12
	<i>p</i> -Values	<0.001	0.001	0.001	0.039	<0.001	<0.001
1 month	Ctrl	163.36 \pm 5.52	23.20 \pm 1.23	631.97 \pm 51.36	58.18 \pm 2.25	23.42 \pm 0.46	1772.04 \pm 66.80
	HTX	180.78 \pm 7.44	22.36 \pm 0.89	555.54 \pm 38.25	60.30 \pm 2.77	23.02 \pm 0.72	1708.03 \pm 91.54
	<i>p</i> -Values	0.068	0.579	0.236	0.557	0.642	0.578
6 months	Ctrl	119.94 \pm 4.58	14.01 \pm 1.20	521.42 \pm 58.01	28.59 \pm 1.67	19.75 \pm 0.82	3110.39 \pm 193.77
	HTX	121.59 \pm 6.12	16.84 \pm 1.06	629.58 \pm 61.29	39.53 \pm 1.56	20.30 \pm 1.23	2296.83 \pm 204.82
	<i>p</i> -Values	0.831	0.087	0.209	<0.001	0.709	0.007

Age also influenced the hippocampus morphology. In the control animals, the number of neurons increased from 100-day-old fetuses up to 1 month old and then decreased up to 6 months old, but the average size decreased, especially between the fetal stage and 1 month of age (Table 5).

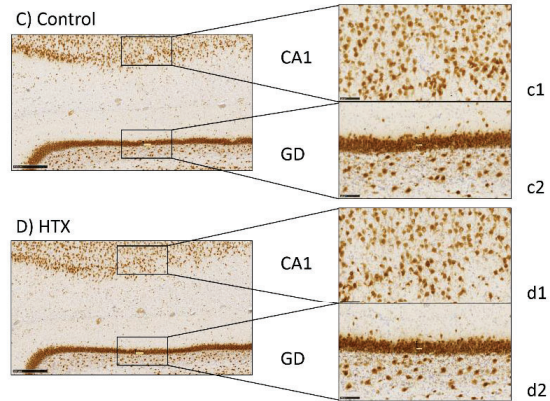
The DCX protein is associated with microtubules in the cytoskeleton and it is expressed only in immature neurons, thus it is observed in the early stages of neuronal development. As observed in Figure 3, more intense staining was observed in the control 100-day-old fetuses, i.e., without maternal supplementation with HTX, indicating a higher number of immature neurons than in the HTX group. This is especially clear in the CA1. This result was inversely correlated with the results obtained with the NeuN marker. These differences between the control and HTX groups were not observed in the 1-month- and 6-month-old pigs. In these animals, the DCX labeling was mainly observed in the GD.

Finally, for the labeling of neurofilaments, a marker for the neuronal cytoskeleton heavily immunostained the neuropile, but no differences caused by the HTX treatment were observed at any age in the CA1 nor the GD (Supplementary Figure S1).

100-days-old fetuses



1-month-old pigs



6-month-old pigs

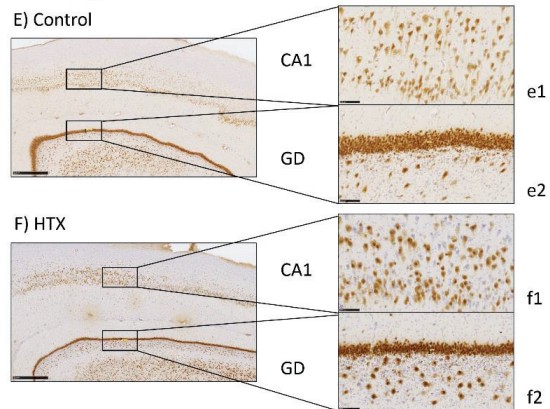
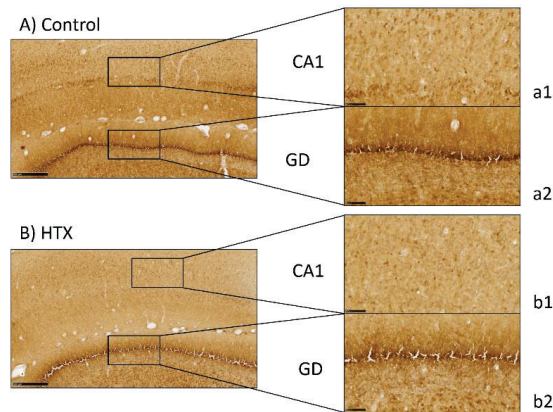
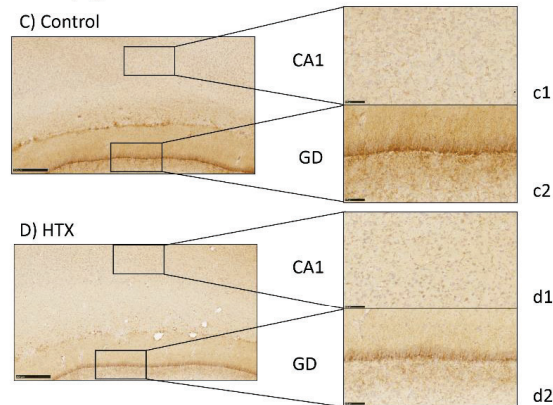


Figure 2. Effect of maternal supplementation with HTX on NeuN immunostaining on the hippocampus of 100-day-old fetuses (A,B) and 1-month-old (C,D) and 6-month-old pigs (E,F). Representative images show the mature neurons immunostained with the NeuN antibody, where their mothers were in the control group or supplemented with HTX. Panels are magnifications of the CA1 (a1–f1) and GD (a2–f2) areas shown using black boxes. Scale bars: 1000 μm (E,F), 500 μm (A–D), and 100 μm (a1–f1,a2–f2).

100-day-old fetuses



1-month-old pigs



6-month-old pigs

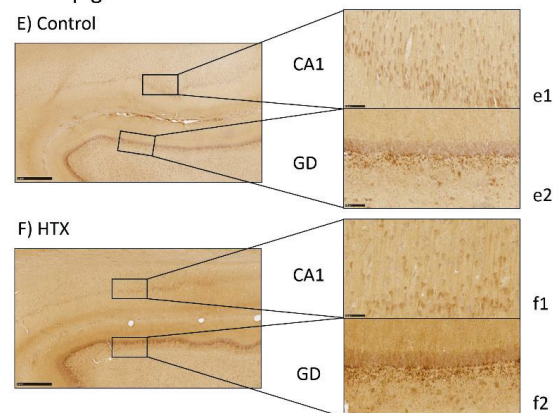


Figure 3. Effect of maternal supplementation with HTX on DCX immunostaining of the hippocampus of 100-day-old fetuses (A,B) and 1-month-old (C,D) and 6-month-old pigs (E,F). Representative images show the immature neurons that were immunostained with the DCX antibody, where their mothers were in the control group or supplemented with HTX. Panels are magnifications of the CA1 (a1–f1) and GD (a2–f2) areas shown using black boxes. Scale bars: 1000 μm (E,F), 500 μm (A–D), and 100 μm (a1–f1,a2–f2).

4. Discussion

In our previous studies, maternal supplementation with HTX was associated with a higher mean birth weight and a decreased incidence of low-birth-weight piglets. The positive effects of HTX administration remained during lactation, leading to higher body weight at weaning [44]. It also led to deviations in body composition and metabolic indices, suggesting a greater growth potential and viability, which was confirmed in a later study [45]. Following the series of results on performance characteristics, glucose and lipid metabolism, and DNA-methylation, the present work aimed to elucidate the effects (positive or negative) of maternal HTX supplementation on brain neurotransmission and the hippocampal development of fetuses at risk of restricted growth.

In these studies, the antioxidant activity of HTX was confirmed by measuring the total antioxidant capacity of the fetal plasma [46]. In contrast, stopping HTX supplementation at birth was related to a lack of differences in both plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation during the postnatal stages (2 months and 6 months of age) [52]. In the present work, we directly analyzed the potential effects of HTX on oxidative stress markers and antioxidant enzymes in the PFC and hippocampus. Unfortunately, we did not have enough samples from the amygdala to include this brain area. Our results show that the antioxidant effect of HTX was evident in the PFC since there was a clear decrease in the oxidation status of lipids (MDA assay) and changes in the SOD and GPx activities. SOD is the enzyme responsible for the conversion of O_2^* into H_2O_2 , which is then reduced to H_2O by GPx (with the concomitant oxidation of glutathione). In the PFC, GPx increased by 20% with a statistical tendency, whereas SOD slightly decreased. Results from the same assays in the hippocampus did not yield significant differences between the control and HTX groups. Differences between this area and the PFC may have been due to several reasons, for example, the PFC being more susceptible to oxidative stress, or maybe HTX could reach the PFC area easier.

Large changes in oxidative stress parameters in the brain of the offspring of HTX-supplemented mothers were not expected. Many findings in the literature looking at the effects of HTX or derivatives in the brain refer to experiments that were performed in rodents subjected to an oxidative insult and concomitantly treated with HTX. In most of the cases, the oxidant condition is able to cause relevant increases in MDA and a decrease in antioxidant enzymes, which are partially reversed by HTX treatment [10,53–57]. In experiments performed in cell cultures, a similar situation occurs [58]. In those cases where the direct effect of HTX without the existence of an oxidative agent is determined, the effect of HTX is slight or not significant. For example, there were no changes in brain MDA or SOD when comparing dietary-HTX-supplemented rats with control rats [15]. In cultured keratinocytes treated with hydroxytyrosyl oleate, which is a lipophilic derivative of HTX, decreases in MDA, SOD, and glutathione-S-transferase (GST) were found [59]. The authors proposed that when the cellular redox state is lower, detoxifications mediated by enzyme activities are also lower. This may also be an explanation for the minor changes observed by us in the current work. Another important question is the dose/concentration of HTX used: whereas most of the *in vivo* studies performed in rodents used doses ranging from 5 to 100 mg/kg, we used 1.5 mg/kg. This dose was selected from non-published data given by the manufacturer before our first study in 2017, which showed its effectiveness to exert developmental and metabolic effects on the offspring of supplemented sows.

Overall, we consider that these results consistently support the antioxidant effect of HTX *in vivo*. Together with the reasons given above, the complexity of working with the whole tissue after the sacrifice of the animals, and considering that we were looking at the effects in the fetuses, not in the mothers (who were those supplemented with HTX in their diets) may explain why we did not find more general effects.

Our results clearly show that the effects of maternal supplementation with HTX during pregnancy were not limited to growth or metabolic characteristics, but extended to the development of the brain. Treatment of the mothers modified the neurotransmitter profile in late fetuses, as well as the development of the hippocampus, as assessed with

molecular markers that allowed for the identification of immature and mature neurons. The results presented here demonstrate that the effects of antioxidant supplementation in the offspring were observed when mothers were supplemented prenatally. It is important to note that HTX is able to cross the blood–brain barrier, thus reaching the brain at physiologically relevant concentrations [5]. Although it has been described that maternal HTX administration improves neurogenesis and cognitive function in the offspring of prenatally stressed rats [10] and improves mitochondrial function and reduces oxidative stress in the brain of mice [56], there is a need for more experimental data on the effects of HTX supplementation during gestation on the brain. The piglet brain is a good animal model since it is gyrencephalic and has a grey-to-white-matter ratio and a brain growth spurt in the perinatal period that is similar to humans [36,60].

These effects do not extend postnatally since no major differences between the control and HTX-supplemented groups were observed in 1-month-old and 6-month-old pigs, indicating that the continuous presence of HTX is needed to maintain its effects on the brain. Nevertheless, more studies on the effects of HTX on neurotransmission, specifically in the hippocampus, are necessary given the importance of this brain area for the prevention of neurodegenerative diseases.

4.1. Effects of HTX on the Neurotransmitter Profile in Several Brain Areas

Although there is plenty of information about the neuroprotective effects of HTX, there is a paucity of data about its specific role in neurotransmission. Our results clearly show that, unlike the effects on weight and metabolic parameters, the effects of HTX on brain parameters seemed to be restricted to the prenatal period since they were only observed in 100-day-old fetuses, concomitantly to the period of maternal supplementation.

The effects of HTX on the neurotransmitter profile in the 100-day-old fetuses depended on the brain area. Thus, in the amygdala, there was an increase in DA and its metabolites, DOPAC and HVA, causing a relevant increase in total dopaminergic compounds. The ratios between the metabolites and DA were not significantly altered, indicating that the metabolization rate of DA was not affected by the antioxidant. A similar effect was seen for 5-HT and its metabolite 5-HIAA. In the hippocampus, DA was not changed, but the concentration of DOPAC and HVA were significantly increased, indicating that the catabolization rate of DA increased after the HTX treatment. The effect in the serotonergic pathway was less relevant in this brain area. Finally, in the prefrontal cortex, there was an important decrease in the DA concentration, accompanied by an increase in the metabolites' concentrations, again indicating an increase in the metabolization rate. The effect on the serotonergic pathway was again not as quantitatively relevant, although it remained significant. Other authors have also described using different IUGR models (caloric restriction, protein restriction, or chirurgic techniques) and animal species (pig, rat, mouse), that IUGR increases the levels of monoamines, including dopamine, in various brain regions [39–42].

Overall, the effect of HTX seemed to be more relevant on the DA pathways than for other neurotransmitters. This could have been due to the connection between DA metabolism and oxidative stress. It has been clearly demonstrated that DA metabolism is a major source of intracellular ROS production [35]. The main enzyme responsible for DA degradation is monoaminooxidase (MAO), which catalyzes the oxidative deamination of catecholamines using O₂ and producing hydrogen peroxide and the reactive 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde (DOPAL), which is a potent neurotoxic [35,61].

The neuroprotective effects of HTX were described *in vivo* [10,56] and *in vitro* [62,63]. The neuroprotective role of HTX can originate directly from its ROS scavenger capacity, which can be directed against hydrogen peroxide and ROS [2] or by indirect mechanisms since HTX can induce several antioxidant systems in the cell by increasing superoxide dismutase (Mn-SOD), glutathione peroxidase (GPx), or glutathione reductase (GR) enzymatic activities and also maintaining high levels of reduced glutathione [2,56,64]. HTX can also reduce the toxic effects of DA-derived oxidation products, such as DOPAL, through

the induction of phase II enzymes, which would participate in their metabolism [63]. Thus, in the presence of increased antioxidant activity in the cell, DA metabolism could increase its rate without hampering cell viability. This may be the mechanism explaining the increase in DA metabolism in the fetuses from HTX-supplemented mothers (DA and its metabolites, namely, DOPAC and HVA).

The higher levels of DOPAC and HVA can also be explained by enzymatic mechanisms. Thus, similar to our results, an increase in DOPAC was observed after HTX administration in the rat striatum using microdialysis, whereas the effects on HVA were variable since the same authors found the presence of this metabolite to be increased or decreased after the infusion [65,66]. The authors proposed that HTX acts as an inhibitor of COMT, which is the enzyme that converts DOPAC into HVA. This mechanism would explain the increase in DOPAC but not in HVA. It has been reported that the inhibition of HVA formation may require a higher degree of COMT inhibition [67], which explains the variable results found in the literature. Nevertheless, another mechanism to explain the increase in HVA would be the conversion of HTX itself into homovanillic alcohol (HVAL, also known as 3-O-methyl-hydroxytyrosol), and subsequently to HVA, and hence increase its levels [66,68,69]. In fact, HVAL is the main biological metabolite of HTX; it originates from the action of the COMT enzyme and it has been recently associated with the protective effects of olive oil [69]. Still, another possibility would be the metabolism of HTX into DOPAC by the subsequent actions of aldehyde reductase (ALR) and aldehyde dehydrogenase (ALDH), and subsequently into HVA [2]. In fact, DA and HTX share their catabolic reactions and both compounds may be converted into DOPAC, suggesting that HTX could interact with DA metabolic pathways because of their structural similarity [2]. Our results show that the effects of HTX were not equivalent in the three brain areas (amygdala, hippocampus, prefrontal cortex), thus suggesting that differences exist between HTX metabolism and cellular effects and/or its connection to the dopaminergic pathways.

As commented above, other more general mechanisms may be behind the action of HTX on neurotransmission. Its anti-inflammatory effect on glial cells and microglia [19,70,71] or the protection against DNA or protein nitrosative damage [72] could indirectly affect neurotransmission.

4.2. Effects of HTX on Hippocampal Development

The hippocampus is related to memory processes, cognitive functions, learning capacities, and motor abilities, which are essential for normal neurological development [73]. It is a laminated structure in which all fibers originating from a particular afferent source terminate at identical dendritic segments. Pyramidal and granule cells originate from the ventricular germinal layers that are located below the adjacent ventricular wall. Therefore, the multiplying neuroblasts migrate from the ventricular zone to their final target region. Pyramidal neurons from the CA originate in the second half of embryonic life. The route of migration is short because the hippocampus closely follows the curve of the ventricle. Future CA1 neurons form cell rows that are perpendicular to the ventricular germinal layer. At birth, the pyramidal layer is thick but it becomes thinner postnatally. In contrast, the generation of the granule cells in the GD starts at the middle of gestation but continues long into the postnatal period and, at a reduced level, into adulthood [74].

In the CA1, our results demonstrated that 100-day-old fetuses in the HTX-group showed a higher number of mature neuronal cells (immunopositive to NeuN), whereas the immunostaining of immature neurons (immunopositive to DCX) was lower, indicating that HTX induced a faster neuron differentiation process in this layer. The area occupied by mature neurons was smaller in HTX pigs, again indicating that cell differentiation occurred more rapidly in this group. It has to be noted that the excessive staining background did not allow for the quantification of DCX-positive neurons. A similar but milder effect was observed in the GD since the number of NeuN-positive neurons was higher in HTX animals, whereas the immunostaining for immature neurons (DCX-positive) was lower, again suggesting that maternal supplementation with HTX also induced a faster neuron

differentiation process in the GD. This is especially relevant when taking into account that it has been described that the IUGR newborn piglet brain displays fewer NeuN-positive cells in the parietal cortex [36], suggesting that HTX may counteract the deleterious effect of growth restriction.

After birth, differences between groups for NeuN and DCX immunostaining tended to be minor and completely disappeared at 6 months old, similar to what happens in the neurotransmitter profile. Therefore, the effects of HTX were only observed in a specific phase of the hippocampus development or the continuous presence of HTX is necessary throughout the life of the individuals.

In contrast to the metabolic effects and antioxidant status [46], no sex-dependent effects of HTX were observed when analyzing neurotransmitters and hippocampal development.

5. Conclusions

The results presented here indicate that maternal supplementation with HTX during pregnancies at risk of IUGR affected catecholaminergic and serotonergic neurotransmission in several brain areas. Likewise, HTX treatment modified the process of neuron differentiation in the hippocampal CA1 and GD areas, suggesting that cell differentiation occurred more rapidly in this group. These effects did not extend postnatally since no major differences between the control and HTX-supplemented groups were observed in 1-month-old and 6-month-old pigs, indicating that the continuous presence of HTX is needed to maintain its effects on the brain.

This study has some limitations since it has been performed in the whole animal and specific mechanistic explanations cannot be provided. Furthermore, the immunohistochemical analysis was limited to a few markers and would benefit in the future from more comprehensive profiling.

The combination of morphological and biochemical techniques reinforces the strength of the present approach. The results of the present study warrant the interest in pursuing research on maternal supplementation with HTX during pregnancy, especially in those cases at risk of IUGR.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox10060884/s1>, Table S1: Mean body weight (g, mean \pm SEM) and number of individuals (n) included in the NT analysis. Table S2: Concentration of neurotransmitters (ng/g tissue) in different brain areas for treatment, age, and sex (mean \pm SE). Table S3: Effects of treatment, sex, and their interactions in the concentration of neurotransmitters (ng/g tissue) in different brain areas (mean \pm SE). Figure S1: Effect of maternal supplementation with HTX on NFT immunostaining in the hippocampi of fetuses at 100 days of gestation (A1,A2), 1-month-old pigs (B1,B2), and 6-months-old pigs (C1,C2). The CA1 is indicated with a white arrow and the GD is shown with a black arrow. Scale bar: 500 μ m (A1,A2 and B1,B2), and 1 mm (C1,C2).

Author Contributions: Conceptualization, A.G.-B. and A.B.; methodology, N.Y., L.A., D.V., M.V.-G., and C.G.-C.; formal analysis and investigation, N.Y.; data curation, N.Y.; writing—original draft preparation, A.B.; writing—review and editing, N.Y., M.P., and A.G.-B.; supervision, A.G.-B. and A.B.; project administration, A.G.-B. and A.B.; funding acquisition, A.G.-B. and A.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL2015-68463-C2-2-P to A.B. and projects AGL2013-48121-C3-R and AGL2016-79321-C2-1-R to A.G.B.), co-funded by FEDER. N.Y. and M.V.G. are recipients of graduate student fellowships from the Spanish FPU National Program Grant (Ministry of Science, Innovation and Universities; numbers FPU17/01881 and FPU14/01285) and CGC is a recipient of an FPI National Program Grant (number BES-2014-070464).

Institutional Review Board Statement: The study was performed according to the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63/UE. The experiment was specifically assessed and approved (re-port CEEA 2013/036) by the INIA Committee of Ethics in Animal Research.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Acknowledgments: We are grateful to Susana Benitez (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, UAB) for her help with the HPLC analysis, Ester Blasco (Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, UAB) for her help with immunohistochemistry, and Elena Gil (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, UAB) for her excellent technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.

References

1. Servili, M.; Sordini, B.; Esposto, S.; Urbani, S.; Veneziani, G.; Di Maio, I.; Selvaggini, R.; Taticchi, A. Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants* **2013**, *3*, 1–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Robles-Almazan, M.; Pulido-Moran, M.; Moreno-Fernandez, J.; Ramirez-Tortosa, C.; Rodriguez-Garcia, C.; Quiles, J.L.; Ramirez-Tortosa, M. Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Res. Int.* **2018**, *105*, 654–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bertelli, M.; Kiani, A.K.; Paolacci, S.; Manara, E.; Kurti, D.; Dhuli, K.; Bushati, V.; Miertus, J.; Pangallo, D.; Baglivo, M.; et al. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. *J. Biotechnol.* **2020**, *309*, 29–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Serreli, G.; Deiana, M. Biological relevance of extra virgin olive oil polyphenols metabolites. *Antioxidants* **2018**, *7*, 170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Domínguez-Perles, R.; Auñón, D.; Ferreres, F.; Gil-Izquierdo, A. Physiological linkage of gender, bioavailable hydroxytyrosol derivatives, and their metabolites with systemic catecholamine metabolism. *Food Funct.* **2017**, *8*, 4570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vilaplana-Perez, C.; Auñón, D.; Garcí a-Flores, L.A.; Gil-Izquierdo, A. Hydroxytyrosol and potential uses in cardiovascular diseases, cancer, and AIDS. *Front. Nutr.* **2014**, *1*. [[CrossRef](#)]
7. Angeloni, C.; Malaguti, M.; Barbalace, M.C.; Hrelia, S. Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2230. [[CrossRef](#)]
8. Peyrol, J.; Riva, C.; Amiot, M.J. Hydroxytyrosol in the prevention of the metabolic syndrome and related disorders. *Nutrients* **2017**, *9*, 306. [[CrossRef](#)]
9. Ditano-Vázquez, P.; Torres-Peña, J.D.; Galeano-Valle, F.; Pérez-Caballero, A.I.; Demelo-Rodríguez, P.; Lopez-Miranda, J.; Katsiki, N.; Delgado-Lista, J.; Alvarez-Sala-Walther, L.A. The fluid aspect of the mediterranean diet in the prevention and management of cardiovascular disease and diabetes: The role of polyphenol content in moderate consumption of wine and olive oil. *Nutrients* **2019**, *11*, 2833. [[CrossRef](#)]
10. Zheng, A.; Li, H.; Cao, K.; Xu, J.; Zou, X.; Li, Y.; Chen, C.; Liu, J.; Feng, Z. Maternal hydroxytyrosol administration improves neurogenesis and cognitive function in prenatally stressed offspring. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26*, 190–199. [[CrossRef](#)]
11. Leri, M.; Scuto, M.; Ontario, M.L.; Calabrese, V.; Calabrese, E.J.; Bucciantini, M.; Stefani, M. Healthy effects of plant polyphenols: Molecular mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1250. [[CrossRef](#)]
12. Varghese, N.; Werner, S.; Grimm, A.; Eckert, A. Dietary mitophagy enhancer: A strategy for healthy brain aging? *Antioxidants* **2020**, *9*, 932. [[CrossRef](#)]
13. de Pablos, R.M.; Espinosa-Oliva, A.M.; Hornedo-Ortega, R.; Cano, M.; Arguelles, S. Hydroxytyrosol protects from aging process via AMPK and autophagy; a review of its effects on cancer, metabolic syndrome, osteoporosis, immune-mediated and neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Res.* **2019**, *143*, 58–72. [[CrossRef](#)]
14. Hornedo-Ortega, R.; Cerezo, A.B.; de Pablos, R.M.; Krisa, S.; Richard, T.; García-Parrilla, M.C.; Troncoso, A.M. Phenolic compounds characteristic of the mediterranean diet in mitigating microglia-mediated neuroinflammation. *Front. Cell. Neurosci.* **2018**, *12*, 373. [[CrossRef](#)]
15. Soni, M.; Prakash, C.; Dabur, R.; Kumar, V. Protective effect of hydroxytyrosol against oxidative stress mediated by arsenic-induced neurotoxicity in rats. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2018**, *186*, 27–39. [[CrossRef](#)]
16. Soni, M.; Prakash, C.; Sehwal, S.; Kumar, V. Protective effect of hydroxytyrosol in arsenic-induced mitochondrial dysfunction in rat brain. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2017**, *31*, e21906. [[CrossRef](#)]
17. Casamenti, F.; Stefani, M. Olive polyphenols: New promising agents to combat aging-associated neurodegeneration. *Expert Rev. Neurother.* **2017**, *17*, 345–358. [[CrossRef](#)]
18. Aravidou, E.; Eleftheriades, M.; Malamitsi-Puchner, A.; Anagnostopoulos, A.K.; Aravantinos, L.; Dontas, I.; Aravidis, C.; Creatsas, G.; Tsangaris, G.; Chrousos, G.P. Protein expression in the brain of rat offspring in relation to prenatal caloric restriction. *J. Matern. Neonatal Med.* **2015**, *29*, 1–8. [[CrossRef](#)]

19. Sawikr, Y.; Yarla, N.S.; Peluso, I.; Kamal, M.A.; Aliev, G.; Bishayee, A. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: The preventive and therapeutic potential of polyphenolic nutraceuticals. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Donev, R., Ed.; Academic Press Inc.: Cambridge, MA, USA, 2017; pp. 33–57.
20. Perez, M.; Robbins, M.E.; Revhaug, C.; Saugstad, O.D. Oxygen radical disease in the newborn, revisited: Oxidative stress and disease in the newborn period. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *142*, 61–72. [[CrossRef](#)]
21. Rashid, C.S.; Bansal, A.; Simmons, R.A. Oxidative stress, intrauterine growth restriction, and developmental programming of type 2 diabetes. *Physiology* **2018**, *33*, 348–359. [[CrossRef](#)]
22. Aljunaidy, M.M.; Morton, J.S.; Cooke, C.L.M.; Davidge, S.T. Prenatal hypoxia and placental oxidative stress: Linkages to developmental origins of cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2017**, *313*, R395–R399. [[CrossRef](#)]
23. Richter, H.G.; Camm, E.J.; Modi, B.N.; Naeem, F.; Cross, C.M.; Cindrova-Davies, T.; Spasic-Boskovic, O.; Dunster, C.; Mudway, I.S.; Kelly, F.J.; et al. Ascorbate prevents placental oxidative stress and enhances birth weight in hypoxic pregnancy in rats. *J. Physiol.* **2012**, *590*, 1377–1387. [[CrossRef](#)]
24. Wang, Y.; Fu, W.; Liu, J. Neurodevelopment in children with intrauterine growth restriction: Adverse effects and interventions. *J. Matern. Neonatal Med.* **2016**, *29*, 660–668. [[CrossRef](#)]
25. Yzydorczyk, C.; Armengaud, J.B.; Peyter, A.C.; Chehade, H.; Cachat, F.; Juvet, C.; Siddeek, B.; Simoncini, S.; Sabatier, F.; Dignat-George, F.; et al. Endothelial dysfunction in individuals born after fetal growth restriction: Cardiovascular and renal consequences and preventive approaches. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2017**, *8*, 448–464. [[CrossRef](#)]
26. Vuguin, P.M. Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease. *Horm. Res.* **2007**, *68*, 113–123. [[CrossRef](#)]
27. Wu, G.; Bazer, F.W.; Wallace, J.M.; Spencer, T.E. Board-invited review: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *J. Anim. Sci.* **2006**, *84*, 2316–2337. [[CrossRef](#)]
28. Hovi, P.; Andersson, S.; Eriksson, J.G.; Järvenpää, A.-L.; Strang-Karlsson, S.; Mäkitie, O.; Kajantie, E. Glucose regulation in young adults with very low birth weight. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 2053–2063. [[CrossRef](#)]
29. Ross, M.G.; Desai, M. Developmental programming of offspring obesity, adipogenesis, and appetite. *Clin. Obstet. Gynecol.* **2013**, *56*, 529–536. [[CrossRef](#)]
30. Gonzalez-Bulnes, A.; Astiz, S.; Ovilo, C.; Lopez-Bote, C.J.; Torres-Rovira, L.; Barbero, A.; Ayuso, M.; Garcia-Contreras, C.; Vazquez-Gomez, M. Developmental Origins of Health and Disease in swine: Implications for animal production and biomedical research. *Theriogenology* **2016**, *86*, 110–119. [[CrossRef](#)]
31. Vázquez-Gómez, M.; Valent, D.; García-Contreras, C.; Arroyo, L.; Óvilo, C.; Isabel, B.; Bassols, A.; González-Bulnes, A. Sex and intrauterine growth restriction modify brain neurotransmitters profile of newborn piglets. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2016**, *55*, 9–14. [[PubMed](#)]
32. García-Contreras, C.; Valent, D.; Vázquez-Gómez, M.; Arroyo, L.; Isabel, B.; Astiz, S.; Bassols, A.; Gonzalez-Bulnes, A. Fetal growth-retardation and brain-sparing by malnutrition are associated to changes in neurotransmitters profile. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2017**, *57*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Valent, D.; Yeste, N.; Hernández-Castellano, L.E.; Arroyo, L.; Wu, W.; García-Contreras, C.; Vázquez-Gómez, M.; González-Bulnes, A.; Bendixen, E.; Bassols, A. SWATH-MS quantitative proteomic investigation of intrauterine growth restriction in a porcine model reveals sex differences in hippocampus development. *J. Proteom.* **2019**, *204*, 103391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessell, T.M.; Siegelbaum, S.A.; Hudspeth, A.J. *Principles of Neural Science*, 5th ed.; Sydor, A., Lebowitz, H., Eds.; McGraw-Hill Companies, Inc.: New York, NY, USA, 2013.
35. Meiser, J.; Weindl, D.; Hiller, K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun. Signal.* **2013**, *11*, 34. [[CrossRef](#)]
36. Wixey, J.A.; Lee, K.M.; Miller, S.M.; Goasdoue, K.; Colditz, P.B.; Tracey Bjorkman, S.; Chand, K.K. Neuropathology in intrauterine growth restricted newborn piglets is associated with glial activation and proinflammatory status in the brain 11 Medical and Health Sciences 1109 Neurosciences. *J. Neuroinflamm.* **2019**, *16*, 5.
37. Miller, S.L.; Huppi, P.S.; Mallard, C. The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome. *J. Physiol.* **2016**, *594*, 807–823. [[CrossRef](#)]
38. Cumberland, A.L.; Palliser, H.K.; Rani, P.; Walker, D.W.; Hirst, J.J. Effects of combined IUGR and prenatal stress on the development of the hippocampus in a fetal guinea pig model. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2017**, *8*, 584–596. [[CrossRef](#)]
39. Bauer, R.; Walter, B.; Vorwieger, G.; Bergmann, R.; Fuchtnner, F.; Brust, P. Intrauterine growth restriction induces up-regulation of cerebral aromatic amino acid decarboxylase activity in newborn piglets: [18F] Fluorodopa positron emission tomographic study. *Pediatr. Res.* **2001**, *49*, 474–480. [[CrossRef](#)]
40. Bauer, R.; Walter, B.; Brust, P.; Fuchtnner, F.; Zwiener, U. Impact of asymmetric intrauterine growth restriction on organ function in newborn piglets. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2003**, *110*, S40–S49. [[CrossRef](#)]
41. Hernández-Andrade, E.; Cortés-Camberos, A.J.; Díaz, N.F.; Flores-Herrera, H.; García-López, G.; González-Jiménez, M.; Santamaría, A.; Molina-Hernández, A. Altered levels of brain neurotransmitter from new born rabbits with intrauterine restriction. *Neurosci. Lett.* **2015**, *584*, 60–65. [[CrossRef](#)]
42. Vucetic, Z.; Totoki, K.; Schoch, H.; Whitaker, K.W.; Hill-Smith, T.; Lucki, I.; Reyes, T.M. Early life protein restriction alters dopamine circuitry. *Neuroscience* **2010**, *168*, 359–370. [[CrossRef](#)]
43. Morgane, P.J.; Mokler, D.J.; Galler, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2002**, *26*, 471–483. [[CrossRef](#)]

44. Vazquez-Gomez, M.; Garcia-Contreras, C.; Torres-Rovira, L.; Pesantez, J.L.; Gonzalez-Añoover, P.; Gomez-Fidalgo, E.; Sanchez-Sanchez, R.; Ovilo, C.; Isabel, B.; Astiz, S.; et al. Polyphenols and IUGR pregnancies: Maternal hydroxytyrosol supplementation improves prenatal and early-postnatal growth and metabolism of the offspring. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177593. [[CrossRef](#)]
45. Vazquez-Gomez, M.; Heras-Molina, A.; Garcia-Contreras, C.; Pesantez-Pacheco, J.L.; Torres-Rovira, L.; Martinez-Fernandez, B.; Gonzalez, J.; Encinas, T.; Astiz, S.; Ovilo, C.; et al. Polyphenols and IUGR pregnancies: Effects of maternal hydroxytyrosol supplementation on postnatal growth, metabolism and body composition of the offspring. *Antioxidants* **2019**, *8*, 535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Garcia-Contreras, C.; Vazquez-Gomez, M.; Barbero, A.; Pesantez, J.L.; Zinellu, A.; Berlinguer, F.; Gonzalez-Añoover, P.; Gonzalez, J.; Encinas, T.; Torres-Rovira, L.; et al. Polyphenols and iugr pregnancies: Effects of maternal hydroxytyrosol supplementation on placental gene expression and fetal antioxidant status, DNA-methylation and phenotype. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Garcia-Contreras, C.; Vazquez-Gomez, M.; Pardo, Z.; Heras-Molina, A.; Pesantez, J.L.; Encinas, T.; Torres-Rovira, L.; Astiz, S.; Nieto, R.; Ovilo, C.; et al. Polyphenols and IUGR pregnancies: Effects of maternal hydroxytyrosol supplementation on hepatic fat accretion and energy and fatty acids profile of fetal tissues. *Nutrients* **2019**, *11*, 1534. [[CrossRef](#)]
48. Whittemore, C.T.; Hazzledine, M.J.; Close, W.H. *Nutrient Requirement Standards for Pigs*; BSAS, British Society of Animal Science: Essex, UK, 2003; ISBN 0906562422.
49. Gonzalez-Bulnes, A.; Ovilo, C.; Lopez-Bote, C.J.; Astiz, S.; Ayuso, M.; Perez-Solana, M.; Sanchez-Sanchez, R.; Torres-Rovira, L. Gender-specific early postnatal catch-up growth after intrauterine growth retardation by food restriction in swine with obesity/leptin resistance. *Reproduction* **2012**, *144*, 269–278. [[CrossRef](#)]
50. Arroyo, L.; Carreras, R.; Valent, D.; Peña, R.; Mainau, E.; Velarde, A.; Sabrià, J.; Bassols, A. Effect of handling on neurotransmitter profile in pig brain according to fear related behaviour. *Physiol. Behav.* **2016**, *167*, 374–381. [[CrossRef](#)]
51. ImageJ. Available online: <https://imagej.nih.gov/ij/index.html> (accessed on 15 August 2020).
52. Heras-Molina, A.; Pesantez-Pacheco, J.L.; Astiz, S.; Garcia-Contreras, C.; Vazquez-Gomez, M.; Encinas, T.; Óvilo, C.; Isabel, B.; Gonzalez-Bulnes, A. Maternal supplementation with polyphenols and omega-3 fatty acids during pregnancy: Effects on growth, metabolism, and body composition of the offspring. *Animals* **2020**, *10*, 1946. [[CrossRef](#)]
53. Cabrerizo, S.; De La Cruz, J.P.; López-Villodres, J.A.; Muñoz-Marín, J.; Guerrero, A.; Reyes, J.J.; Labajos, M.T.; González-Correa, J.A. Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 2152–2157. [[CrossRef](#)]
54. Rizzo, M.; Ventrice, D.; Giannetto, F.; Cirinnà, S.; Santagati, N.A.; Procopio, A.; Mollace, V.; Muscoli, C. Antioxidant activity of oleuropein and semisynthetic acetyl-derivatives determined by measuring malondialdehyde in rat brain. *J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, *69*, 1502–1512. [[CrossRef](#)]
55. Ramirez-Expósito, M.J.; Carrera-González, M.P.; Mayas, M.D.; Martínez-Martos, J.M. Gender differences in the antioxidant response of oral administration of hydroxytyrosol and oleuropein against N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced glioma. *Food Res. Int.* **2021**, *140*, 110023. [[CrossRef](#)]
56. Zheng, A.; Li, H.; Xu, J.; Cao, K.; Li, H.; Pu, W.; Yang, Z.; Peng, Y.; Long, J.; Liu, J.; et al. Hydroxytyrosol improves mitochondrial function and reduces oxidative stress in the brain of *db/db* mice: Role of AMP-activated protein kinase activation. *Br. J. Nutr.* **2015**, *113*, 1667–1676. [[CrossRef](#)]
57. Adebijoyi, O.E.; Olopade, J.O.; Olayemi, F.O. Sodium metavanadate induced cognitive decline, behavioral impairments, oxidative stress and down regulation of myelin basic protein in mice hippocampus: Ameliorative roles of β -spinasterol, and stigmasterol. *Brain Behav.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)]
58. Manzoor, R.; Rasool, A.; Ahmed, M.; Kaleem, U.; Duru, L.N.; Ma, H.; Deng, Y. Synergistic neuroprotective effect of endogenously-produced hydroxytyrosol and synaptic vesicle proteins on pheochromocytoma cell line against salsolinol. *Molecules* **2020**, *25*, 1715. [[CrossRef](#)]
59. Benincasa, C.; La Torre, C.; Plastina, P.; Fazio, A.; Perri, E.; Caroleo, M.C.; Gallelli, L.; Cannataro, R.; Cione, E. Hydroxytyrosyl oleate: Improved extraction procedure from olive oil and by-products, and in vitro antioxidant and skin regenerative properties. *Antioxidants* **2019**, *8*, 233. [[CrossRef](#)]
60. Bassols, A.; Costa, C.; Eckersall, P.D.; Osada, J.; Sabrià, J.; Tibau, J. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *Proteom. Clin. Appl.* **2014**, *8*, 715–731. [[CrossRef](#)]
61. Burke, W.J.; Li, S.W.; Williams, E.A.; Nonneman, R.; Zahm, D.S. 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde is the toxic dopamine metabolite in vivo: Implications for Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Res.* **2003**, *989*, 205–213. [[CrossRef](#)]
62. Goldstein, D.S.; Jinsmaa, Y.; Sullivan, P.; Holmes, C.; Kopin, I.J.; Sharabi, Y. 3,4-Dihydroxyphenylethanol (hydroxytyrosol) mitigates the increase in spontaneous oxidation of dopamine during monoamine oxidase inhibition in PC12 cells. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 2173–2178. [[CrossRef](#)]
63. Yu, G.; Deng, A.; Tang, W.; Ma, J.; Yuan, C.; Ma, J. Hydroxytyrosol induces phase II detoxifying enzyme expression and effectively protects dopaminergic cells against dopamine- and 6-hydroxydopamine induced cytotoxicity. *Neurochem. Int.* **2016**, *96*, 113–120. [[CrossRef](#)]
64. Martín, M.A.; Ramos, S.; Granado-Serrano, A.B.; Rodríguez-Ramiro, I.; Trujillo, M.; Bravo, L.; Goya, L. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxicant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 956–966. [[CrossRef](#)]

65. Gallardo, E.; Madrona, A.; Palma-Valdés, R.; Trujillo, M.; Espartero, J.L.; Santiago, M. The effect of hydroxytyrosol and its nitroderivatives on catechol-O-methyl transferase activity in rat striatal tissue. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 61086–61091. [[CrossRef](#)]
66. Gallardo, E.; Madrona, A.; Palma-Valdés, R.; Espartero, J.L.; Santiago, M. Effect of intracerebral hydroxytyrosol and its nitroderivatives on striatal dopamine metabolism: A study by in vivo microdialysis. *Life Sci.* **2015**, *134*, 30–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Huotari, M.; Passlin, M.; Nordberg, H.L.; Forsberg, M.; Kotisaari, S.; Tuomisto, L.; Shintani, F.; Tanaka, K.F.; Reenilä, I.; Laitinen, K.; et al. Effect of intracerebral 6-nitronoradrenaline, an endogenous catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibitor, on striatal dopamine metabolism in anaesthetised rats. *J. Neurosci. Methods* **2001**, *109*, 47–52. [[CrossRef](#)]
68. Gallardo, E.; Palma-Valdés, R.; Espartero, J.L.; Santiago, M. In vivo striatal measurement of hydroxytyrosol, and its metabolite (homovanillic alcohol), compared with its derivative nitrohydroxytyrosol. *Neurosci. Lett.* **2014**, *579*, 173–176. [[CrossRef](#)]
69. De La Torre, R.; Corella, D.; Castañer, O.; Martínez-González, M.A.; Salas-Salvador, J.; Vila, J.; Estruch, R.; Sorli, J.V.; Arós, F.; Fiol, M.; et al. Protective effect of homovanillyl alcohol on cardiovascular disease and total mortality: Virgin olive oil, wine, and catechol-methylthion. *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, *105*, 1297–1304. [[CrossRef](#)]
70. Luo, G.; Huang, Y.; Mo, D.; Ma, N.; Gao, F.; Song, L.; Sun, X.; Xu, X.; Liu, L.; Huo, X.; et al. Tyrosol attenuates pro-inflammatory cytokines from cultured astrocytes and NF- κ B activation in in vitro oxygen glucose deprivation. *Neurochem. Int.* **2018**, *121*, 140–145. [[CrossRef](#)]
71. Gallardo-Fernández, M.; Hornedo-Ortega, R.; Alonso-Bellido, I.M.; Rodríguez-Gómez, J.A.; Troncoso, A.M.; García-Parrilla, M.C.; Venero, J.L.; Espinosa-Oliva, A.M.; de Pablos, R.M. Hydroxytyrosol decreases LPS- and α -synuclein-induced microglial activation in vitro. *Antioxidants* **2019**, *9*, 36. [[CrossRef](#)]
72. Deiana, M.; Aruoma, O.I.; Bianchi, M.D.L.P.; Spencer, J.P.E.; Kaur, H.; Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Banni, S.; Dessi, M.A.; Corongiu, F.P. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**. [[CrossRef](#)]
73. Kesner, R.P.; Lee, I.; Gilbert, P. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev. Neurosci.* **2004**, *15*, 333–351. [[CrossRef](#)]
74. Frotscher, M.; Seress, L. Morphological development of the hippocampus. In *The Hippocampus Book*; Amaral, D.G., Andersen, P., Bliss, T., Morris, R.G.M., O'Keefe, J., Eds.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2007; pp. 115–131.



Article

Polyphenols and IUGR Pregnancies: Intrauterine Growth Restriction and Hydroxytyrosol Affect the Development and Neurotransmitter Profile of the Hippocampus in a Pig Model

Natalia Yeste ¹, Néstor Gómez ¹, Marta Vázquez-Gómez ², Consolación García-Contreras ³, Martí Pumarola ⁴, Antonio González-Bulnes ^{2,3,5} and Anna Bassols ^{1,*}

- ¹ Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, 08193 Barcelona, Spain; natalia.yeste@uab.cat (N.Y.); nestor.gomez@uab.cat (N.G.)
 - ² Faculty of Veterinary Sciences, UCM, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain; mvgomez@ucm.es (M.V.-G.); antonio.gonzalezbulnes@uchceu.es (A.G.-B.)
 - ³ Comparative Physiology Group, INIA, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain; garcia.consolacion@inia.es
 - ⁴ Unitat de Patologia Murina i Comparada, Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, 08193 Barcelona, Spain; marti.pumarola@uab.cat
 - ⁵ Departamento de Producción y Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, Tirant lo Blanc, 7, Alfara del Patriarca, 46115 Valencia, Spain
- * Correspondence: anna.bassols@uab.cat



Citation: Yeste, N.; Gómez, N.; Vázquez-Gómez, M.; García-Contreras, C.; Pumarola, M.; González-Bulnes, A.; Bassols, A. Polyphenols and IUGR Pregnancies: Intrauterine Growth Restriction and Hydroxytyrosol Affect the Development and Neurotransmitter Profile of the Hippocampus in a Pig Model. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1505. <https://doi.org/10.3390/antiox10101505>

Academic Editor: Domenico Nuzzo

Received: 30 July 2021

Accepted: 15 September 2021

Published: 22 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Intrauterine growth restriction (IUGR) refers to poor growth of a fetus during pregnancy due to deficient maternal nutrition or oxygen supply. Supplementation of a mother's diet with antioxidants, such as hydroxytyrosol (HTX), has been proposed to ameliorate the adverse phenotypes of IUGR. In the present study, sows were treated daily with or without 1.5 mg of HTX per kilogram of feed from day 35 of pregnancy (at 30% of the total gestational period), and fetuses were sampled at day 100 of gestation. Fetuses were classified as normal body weight (NBW) or low body weight (LBW) as a consequence of IUGR, constituting four groups: NBW-Control, NBW-HTX, LBW-Control, and LBW-HTX. The brain was removed, and the hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex were rapidly dissected. Neuronal markers were studied by immunohistochemistry, and a decrease in the number of mature neurons in the hippocampal *Cornu Ammonis* subfield 1 (CA1) and the *Dentate Gyrus* (DG) regions was observed in LBW fetuses together with a higher number of immature neurons and other alterations in neuronal morphology. Furthermore, IUGR conditions altered the neurotransmitter (NT) profile, since an increase in the serotonin (5-HT) pathway was observed in LBW fetuses. Supplementation with HTX was able to reverse the morphological and neurochemical changes, leading both characteristics to values similar to those of NBW fetuses.

Keywords: hydroxytyrosol; neurotransmitters; intrauterine growth restriction; hippocampus; brain; pig

1. Introduction

The effect of intrauterine growth restriction (IUGR, also known as fetal growth restriction, FGR) is characterized by a deficit in growth and weight of the individual due to a lack of nutrients or oxygen or an alteration in the placenta that can lead to a lack of these essential components for development [1]. In IUGR, the “brain-sparing” effect occurs, in which blood flow to the brain increases to ensure its development. That is, there is an asymmetric growth of the individual in such a way that brain development is prioritized to ensure the maintenance of the critical physiological functions of the newborn, such as breathing, suckling, and other autonomic functions, which improve the chances of vitality and survival. This effect has been described in different species of mammals, including pigs, sheep, humans, and guinea pigs [1,2].

However, “brain-sparing” does not completely guarantee the normal development of the brain or its function, since it has been described that the offspring affected by IUGR (low body weight, LBW) can suffer from behavioral disorders related to mobility and cognitive, memory, and neurophysiological dysfunctions [3,4]. The animal models studied have shown that individuals affected by IUGR presented alterations in the hippocampus with consequences in normal neurological development [5]. IUGR is also associated with excessive production of reactive oxygen species (ROS), which may occur at specific windows of placental development and, for these reasons, supplementation of maternal diets with antioxidants (e.g., antioxidant vitamins and melatonin) has been investigated as a potential way to ameliorate adverse phenotypes [6–10]. Hydroxytyrosol (HTX) is a potent antioxidant, present in olive fruits and virgin olive oil, that presents regulatory properties in metabolism, inflammation, and immunomodulation and also acts as neuroprotector in human pathologies and animal models [11–14]. The beneficial effects of HTX are mainly attributed to its potent antioxidant and ROS scavenger activities, which are able to counteract the pernicious consequences of oxidative stress in the organism. Furthermore, other potential mechanisms with a direct effect on regulatory enzymes such as p38 and JNK have been proposed [11].

Caloric restriction in sows during the third trimester of gestation affects fetal development and induces lower birth weight in newborns, being a well-known animal model of IUGR widely used by our groups in previous studies [15,16]. In this model, the NBW and LBW animals are born from the same mothers, thus avoiding the effect of the mother in the statistical evaluation of the results.

In previous studies from our laboratories, maternal HTX supplementation in this porcine model was associated with higher mean birth weight and lower incidence of low-birth-weight piglets. The positive effects of HTX administration were sustained during lactation, leading to increased body weight at weaning [17]. It also resulted in deviations in body composition and metabolic indices, suggesting increased potential for growth and viability that was confirmed in a later study [18]. Later, the effects of HTX on fetal antioxidant status, placental gene expression, and fat metabolism were demonstrated [19–21]. Nonetheless, maternal supplementation with HTX during pregnancy also influenced brain parameters since it affected the neurotransmitter (NT) profile in a brain-area-dependent mode and it modified the process of neuron differentiation in the hippocampal *Cornu Ammonis* subfield 1 (CA1) and *Dentate Gyrus* (DG) areas, indicating that cell differentiation occurred more rapidly in the HTX group than in the control group [22]. These effects were specific to the fetal period, concomitantly with HTX maternal supplementation, since no major differences were detected in 1-month- and 6-month-old pigs.

Since the effects of maternal HTX supplementation on neurotransmission and hippocampal morphology were observed only in 100-day fetuses [22], we decided to evaluate whether the effects of HTX were influenced by the body weight of the offspring. Thus, the specific goals of the present work were to study whether the body weight of the fetuses (NBW or LBW) could differentially influence the morphological analysis of the hippocampus and the NT levels in various areas of the brain, and if HTX supplementation of the maternal diet could partially or totally reverse the effects of IUGR.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

The study was carried out at the INIA animal facilities, which meet local, national, and European requirements for Scientific Procedure Establishments, and was performed according to the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which complies with the European Union Directive 2010/63/UE on the care of animals used for research. The experimental procedure was assessed and approved by the INIA Committee of Ethics in Animal Research (report CEEA 2013/036).

2.2. Animals and Experimental Procedure

The study involved 13 purebred Iberian sows that became pregnant after cycle synchronization with altrenogest (Regumate, MSD, Boxmeer, The Netherlands) and insemination with cooled semen from a purebred Iberian boar.

The sows were fed with a standard grain-based food diet adjusted to fulfil individual daily maintenance requirements based on data from the British Society of Animal Science [23]. On gestational day 35, all sows were weighed and the food amount from that day until delivery was adjusted to fulfil 50% of daily maintenance requirements. This diet restriction has previously been found to affect fetal development and to induce a higher incidence of low birth weight in newborns [24,25]. Additionally, on gestational day 35, sows were pair-matched according to bodyweight and seven females remained as an untreated control group (CTRL), whilst the six remaining females acted as the treated group by receiving 1.5 mg of HTX per kg of feed each day from day 35 of pregnancy to delivery (HTX).

Fetuses were obtained at day 100 of pregnancy (55 Ctrl and 44 HTX). Immediately after retrieval, all fetuses were sexed and weighed and classified into two groups: low body weight (LBW) and normal body weight (NBW). LBW fetuses were defined by a weight lower than one standard deviation of the mean value of the littermates after adjusting for sex. This weight threshold is commonly used to identify IUGR effects and offspring at a higher risk of perinatal mortality [17]. Applying these criteria, 10 and 6 LBW fetuses were classified in the CTRL and the HTX group, respectively.

Sampling was performed after stunning and exsanguination in compliance with RD53/2013 standard procedures. Subsequently, the head was separated from the trunk at the atlanto-occipital union and the brain was removed from the skull and weighed. Both hippocampi, both amygdalae, and the prefrontal cortex were dissected. One of the hippocampi, one of the amygdalae, and the prefrontal cortex were snap-frozen in liquid nitrogen and biobanked at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until neurotransmitter quantification. The remaining hippocampus was fixed in 4% buffered formalin in PBS (Amresco, Solon, OH, USA) for 24 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, preserved in 30% sucrose in PBS at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, and used for immunohistochemistry.

2.3. Sample Preparation and Neurotransmitter Quantification

Samples were weighted and homogenized by sonication (Branson Digital Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA) in a lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, and 1% NP-40) with a 0.3 mg tissue/mL of lysis buffer relation. Dihydroxybenzylamine (DHBA) was added to the lysis buffer at 100 pg/ μL as an internal standard for HPLC. Proteins in brain lysates were precipitated by adding 0.25 M perchloric acid containing 0.1 M sodium metabisulfite and 0.25 M EDTA in a 1.5 (*v/v*) ratio. Finally, samples were centrifuged at $12,000\times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and kept at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

Concentrations of catecholamines (NA, DA, DOPAC, and HVA) and indoleamines (5-HT, 5-HIAA) were determined by HPLC (EliteLaChrom, Merck-Hitachi, Prague, Czech Republic) equipped with a Cromolith Rp-18e column (Merck, Darmstadt, Germany) with electrochemical detection (ESA Coulochem II 5200, Thermo Scientific, Braunschweig, Germany). The mobile phase consisted of 0.05 M citrate buffer pH 2.8, 0.05 mM EDTA, 1.2 mM sodium octyl sulphate (SOS), and 1% acetonitrile. The applied voltage was set at 0.4 mV and the flow rate was 1.2 mL/min. All procedures are described in detail in [26].

2.4. Immunohistochemical Analysis of the Hippocampus

LBW individuals (10 in the CTRL group and 6 in the HTX group) were matched with NBW individuals. Litter, sex, and weight were considered when choosing the NBW fetuses. Therefore, from the same mother, another individual of the same sex with the highest weight was chosen (Supplementary Table S1). Using these selection criteria, 20 animals from the CTRL group were obtained: 10 LBW (5 females and 5 males) and 10 NBW (5 females and 5 males); and 12 animals from the HTX group: 6 LBW (3 females and 3 males) and 6 NBW (3 females and 3 males).

Hippocampal samples were frozen in OCT medium (Aname, Madrid, Spain) using molds, an isopentane bath (Sigma, St. Louis, MO, USA), and dry ice, controlling the freezing temperature between $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. The OCT blocks were cut with a cryostat (SME Cryotome Thermo Electron Corporation, Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) into $40\text{-}\mu\text{m}$ -thick sections in a longitudinal orientation, collecting them in flotation with an antifreeze solution pH 7.4 (40% ethylene glycol, 30% glycerol, and 30% phosphate buffer 0.1 M pH 7.4).

For immunohistochemistry, a minimum of 6 sections per individual were analyzed. Sections were washed using a phosphate buffer 0.1 M pH 7.4, and endogenous peroxidase activity was blocked using 1% H_2O_2 . Sections were blocked with 2% normal goat serum (NGS) and incubated with the corresponding primary antibodies with NGS overnight at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The antibodies used were raised against NeuN (1:1000, Mouse monoclonal anti-neuronal nuclei; Merck Millipore, Chemicon, Billerica, MA, USA, Ref. MAB377), doublecortin (DCX, 1:750, Rabbit polyclonal anti-doublecortin; Abcam, Cambridge, MA, USA, Ref. ab18723), and neurofilaments (NFT, 1:10,000, Mouse monoclonal anti-neurofilament 200; Sigma, St. Louis, MO, USA, Ref. N0142). Afterward, the sections were washed and incubated with biotinylated goat secondary antibodies (1:500, anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG; Agilent Technologies, Dako, Glostrup, Denmark). Next, sections were incubated with an avidin-biotin-peroxidase complex (Standard ABC Peroxidase Staining Kit; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) and revealed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB Liquid Substrate System; Sigma, St. Louis, MO, USA). Sections were transferred to Superfrost PlusTM adherent slides, counterstained with hematoxylin, and mounted in resinous DPX mounting medium (Sigma, St. Louis, MO, USA).

2.5. Image Processing and Analysis

Slides were digitally scanned with a 2.0 HT Nanozoomer (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) at the Histopathology Service of the Biomedicine Research Institute (IRB, Barcelona, Spain). The scanned images were visualized and analyzed using NDP.view 2 software (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Only CA1 and DG were analyzed since those were the only areas affected by HTX treatment in our previous work [22].

NeuN immunostaining was analyzed using ImageJ 1.52p software (NIH, Bethesda, MD, USA) from the website of the National Institutes of Health. The procedure performed to analyze the images was: convert the scanned color image to grayscale (8-bit); set the measurement scale; threshold the image using "Make Binary"; and finally analyze particles. The entire tissue area, neuron area, and neuron area percentage were calculated. To obtain the level of the specific DAB signal on all of the tissue in the photograph, the actual area of neurons was calculated by subtracting the blank areas that contained no tissue (e.g., lumina of vessels and artifacts). Moreover, the DAB-positive area outside the neuron area was excluded. Individual neuron clusters were numbered to obtain information regarding a particular neuron (size, circularity, area, etc.) from the tabulated results.

2.6. Statistical Analyses

All statistical analyses were performed in SPSS 24.0 software (IBM, Chicago, IL, USA). The significance level was established at $p < 0.05$ and a tendency was considered at $0.05 \leq p \leq 0.1$. Descriptive data are presented with the means and the standard error (mean \pm SE).

Normal distribution of the variables was confirmed with a Kolmogorov-Smirnov test. Whenever possible, data were log transformed to correct the distribution and hence permit use of parametric statistics.

Normally distributed measures were analyzed using the UNIANOVA procedure of SPSS with Tukey's adjustment. In all models, each pig was introduced as the experimental unit, and the fixed effects included were treatment (CTRL and HTX), body weight (NBW and LBW), sex (male and female), and their interactions. In addition, pairwise comparisons with Bonferroni's adjustment were also performed for significant interactions.

3. Results

3.1. Effects of Maternal Supplementation with HTX on Immunohistochemical Markers in the Hippocampus of NBW and LBW Fetuses

Antibodies against NeuN, DCX, and NFT, markers of mature neurons, immature neurons, and neurofilaments, respectively, were used to analyze the effects of IUGR and HTX on the morphology and development of the hippocampus.

NeuN is a marker of neuronal bodies and nuclei in mature neurons and, thus, NeuN staining was used to analyze the number and distribution of mature neurons in CA1 and DG areas in the hippocampus of 100-day fetuses and to assess the effects of IUGR and HTX (Figure 1). Higher positivity was observed in the NBW fetuses than in the LBW fetuses, thus indicating that the NBW animals had a higher number of mature neurons. The quantitative results obtained after image analysis are presented in Table 1. Quantitatively, the effect of weight was significant only in CA1, but not in DG, indicating that IUGR affected mainly this region. The cell count was lower in LBW fetuses, with a higher mean cell nuclei size and area percentage.

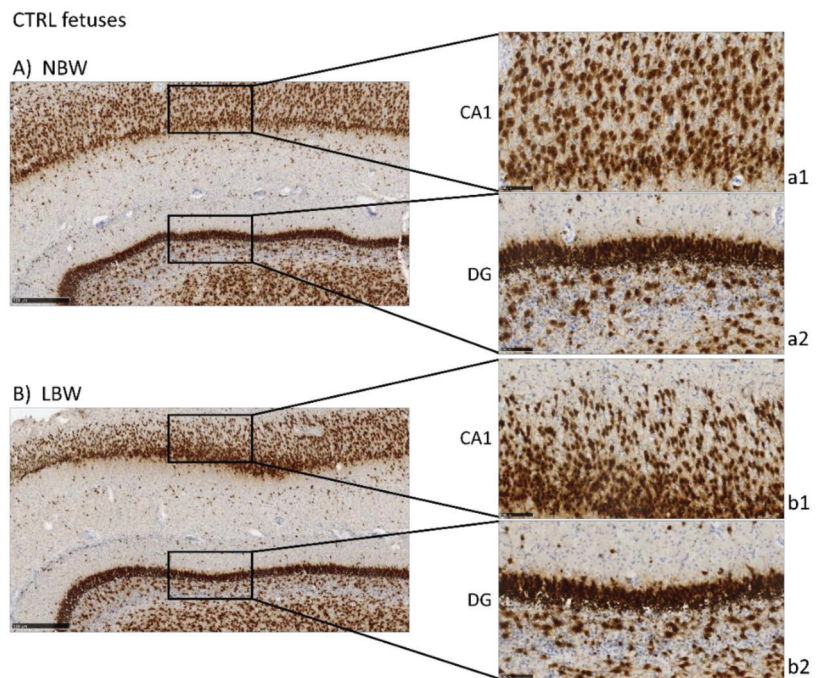


Figure 1. Cont.

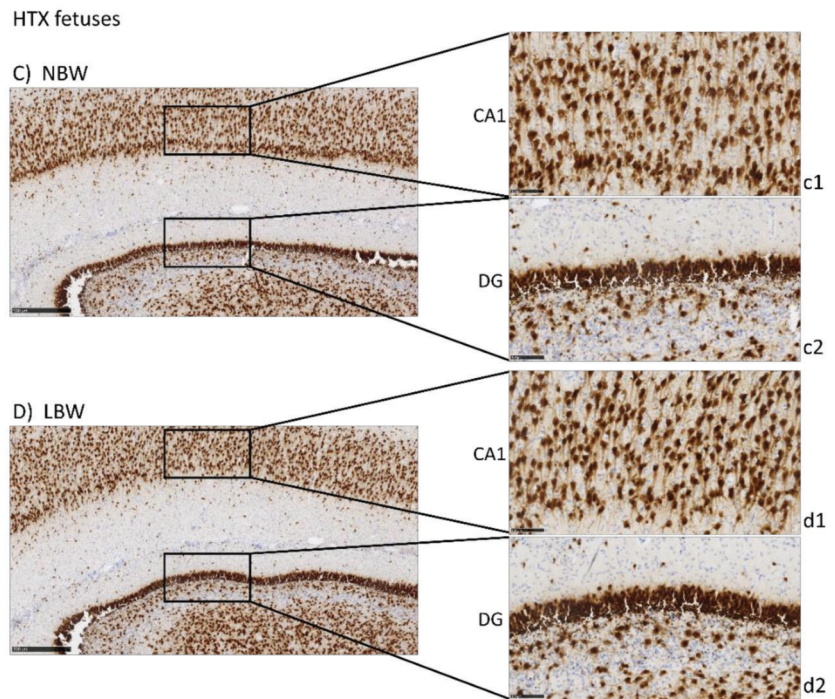


Figure 1. Effect of Intrauterine growth restriction (IUGR) on NeuN immunostaining on the hippocampus of fetuses whose mothers were not HTX-supplemented (A,B) or were HTX-supplemented (C,D). Representative images show the mature neurons immunostained with the NeuN antibody. Panels are magnifications of the CA1 (a1–d1) and GD (a2–d2) areas shown using black boxes. Scale bars: 500 μ m (A–D), and 100 μ m (a1–d1, a2–d2).

Table 1. Effect of body weight and supplementation of the maternal diet with hydroxytyrosol (HTX) on NeuN immunostaining in the CA1 and DG areas of the hippocampus of 100-day-old fetuses.

			NBW	LBW	Treatment	<i>p</i> -Values Body Weight	Interaction
CA1	Cell Count	CTRL	143.06 \pm 9.02 ^{Aa}	87.25 \pm 11.40 ^{Ab}	<0.001	0.004	0.035
		HTX	170.86 \pm 9.69 ^{Ba}	162.00 \pm 6.04 ^{Ba}			
	Mean size (μ m ²)	CTRL	1352.44 \pm 247.19 ^{Aa}	2961.48 \pm 676.06 ^{Ab}	<0.001	0.013	0.015
		HTX	817.85 \pm 61.87 ^{Aa}	834.88 \pm 44.94 ^{Ba}			
	Area (%)	CTRL	33.48 \pm 1.29 ^{Aa}	41.63 \pm 2.76 ^{Ab}	<0.001	0.007	0.033
		HTX	30.07 \pm 0.99 ^{Aa}	31.07 \pm 1.14 ^{Ba}			
DG	Cell Count	CTRL	79.91 \pm 2.25 ^{Aa}	79.33 \pm 4.55 ^{Aa}	0.045	0.831	0.719
		HTX	86.50 \pm 3.64 ^{Aa}	88.75 \pm 6.03 ^{Aa}			
	Mean size (μ m ²)	CTRL	1449.37 \pm 51.72 ^{Aa}	1620.75 \pm 116.92 ^{Aa}	<0.001	0.677	0.014
		HTX	1248.78 \pm 62.85 ^{Ba}	1009.78 \pm 48.95 ^{Ba}			
	Area (%)	CTRL	26.34 \pm 0.55 ^{Aa}	28.76 \pm 0.61 ^{Ab}	<0.001	0.282	<0.001
		HTX	24.49 \pm 0.49 ^{Ba}	20.52 \pm 0.76 ^{Bb}			

The results are presented as the mean \pm SE. The superscripts and *p*-values in bold show the significant differences. Different capital letters (Aa = Ab \neq Ba = Bb) represent significant differences between treatments for the same group of body weight (*p* < 0.05). Different lowercase letters (Aa = Ba \neq Ab = Bb) represent significant differences between groups of body weight for the same treatment (*p* < 0.05). Statistical significance was determined by UNIANOVA with Tukey’s adjustment.

In the pairwise comparison, it is interesting to note that the differences between NBW and LBW in CA1 were only observed in fetuses whose mothers were supplemented with the control (cell count, $p < 0.001$; mean size, $p < 0.001$; and area, $p = 0.001$), while they were not observed when the mothers were supplemented with HTX (cell count, $p = 0.580$; mean size, $p = 0.971$; and area, $p = 0.679$).

Regarding the effects of maternal supplementation, HTX treatment increased the cell number and decreased the mean nuclei size in CA1, especially in LBW fetuses (cell count, $p < 0.001$; mean size, $p < 0.001$; and area, $p < 0.001$), while this effect was much less significant in the NBW fetuses (cell count, $p = 0.027$; mean size, $p = 0.139$; and area, $p = 0.069$).

In DG, there were no differences due to body weight and the effects of HTX were the same as in CA1, i.e., there was an increase in the cell number and a decrease in the mean nuclei size in both NBW and LBW fetuses. In the pairwise comparison, it can be observed that the effects on LBW fetuses were in general more significant than in NBW animals (LBW fetuses: cell count, $p = 0.152$; mean size, $p < 0.001$; and area, $p < 0.001$ and NBW fetuses: cell count, $p = 0.135$; mean size, $p = 0.030$; and area, $p = 0.025$). Thus, the neuronal characteristics of the HTX-treated LBW group became more like those of the NBW animals, especially the HTX-treated NBW group, and the differences between NBW and LBW observed in control animals disappeared or were less relevant in HTX-treated animals.

Precursor neuronal cells (neuroblasts) were visualized during their migration and differentiation with doublecortin protein staining (DCX), which is associated with microtubules. As can be observed in Figure 2, LBW fetuses presented more intense staining in the CA1 area than the NBW fetuses, thus indicating that there was a greater number of immature neurons. It has to be noted that the excessive staining background did not allow for the quantification of DCX-positive neurons. These results were inverse to the results obtained with NeuN staining, indicating that these regions in the hippocampus of LBW individuals contained fewer mature neurons concomitantly with a higher number of immature cells. Similar results were observed in DG. Treatment of the mothers with HTX produced LBW individuals who presented weaker DCX immunostaining in CA1 as well as in DG areas, leading to a situation more similar to that of NBW control individuals.

In addition, the thickness of the DG area was measured to confirm the qualitative results. DCX-positive neurons formed a narrower band in NBW than in LBW ($38.3 \pm 2.1 \mu\text{m}$ versus $46.2 \pm 3.5 \mu\text{m}$, $p = 0.024$), suggesting that the NBW animals had fewer immature neurons because they were already migrating to the other areas. When differentiating the animals according to whether their mothers had received HTX or not, it was observed that the thickness of LBW animals whose mothers received HTX had a tendency to be lower than that of animals from the CTRL group ($38.9 \pm 2.6 \mu\text{m}$ versus $53.5 \pm 1.2 \mu\text{m}$, $p = 0.063$, panels d2 and b2). The same occurred in NBW animals; those that received HTX presented a narrower band compared with the control group ($29.8 \pm 1.3 \mu\text{m}$ versus $43.0 \pm 2.6 \mu\text{m}$, $p = 0.001$, panels c2 and a2).

Neurofilament protein immunostaining (NFT) provided specific immunostaining of axons in mature neurons. Positive staining is observed as a mesh of filaments, preventing the quantification of the experiment. Results were similar to those of NeuN in CA1 and DG, with a more intense labeling in the NBW fetuses compared with LBW (Figure 3), only in the control group. In LBW animals whose mothers had received HTX supplementation, a more intense staining was observed, thus suggesting again that HTX was able to reverse the effects produced by IUGR. Similarly, more connectivity through the granular cell layer was observed in NBW than in LBW individuals in the control groups, whereas there were no differences between the HTX groups.

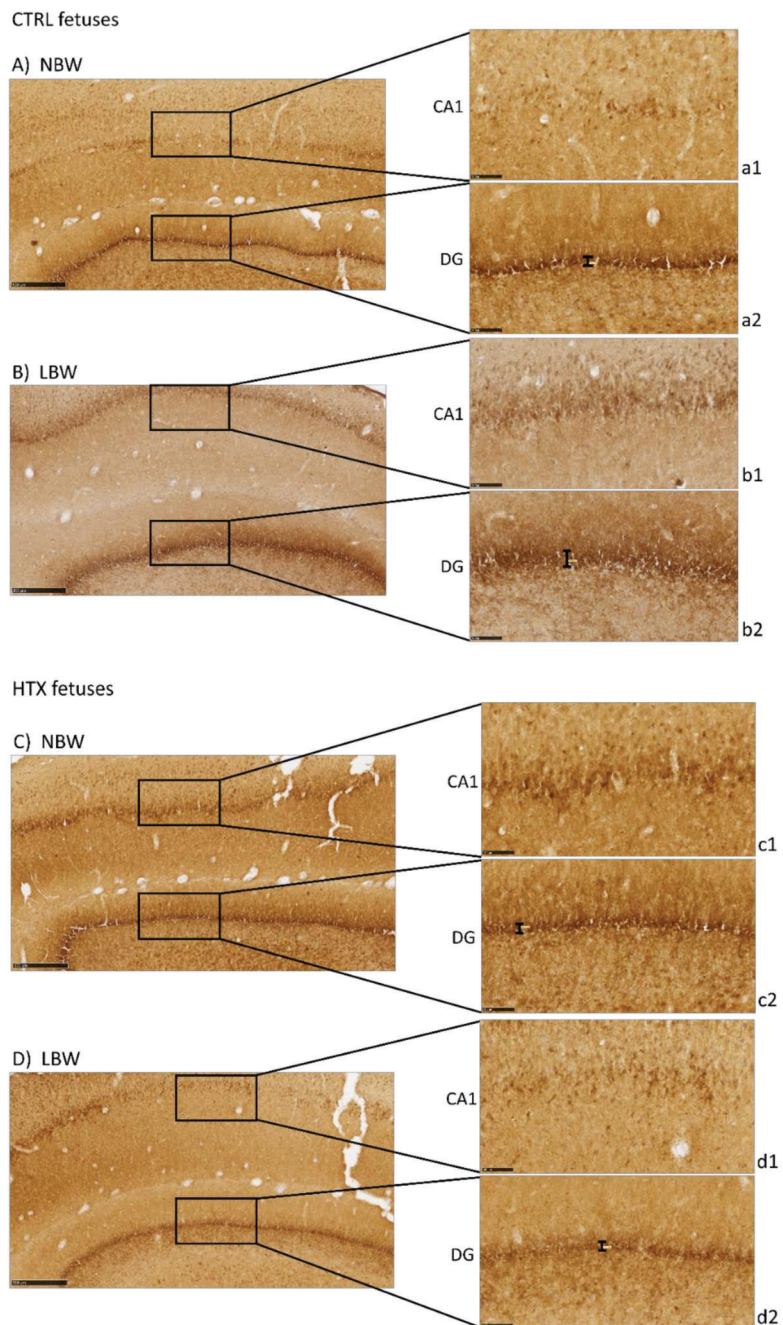


Figure 2. Effect of IUGR on DCX immunostaining on the hippocampus of fetuses whose mothers were not HTX-supplemented (A,B) or were HTX-supplemented (C,D). Representative images show the immature neurons immunostained with the DCX antibody. Panels are magnifications of the CA1 (a1–d1) and DG (a2–d2) areas shown using black boxes. Scale bars: 500 μ m (A–D), and 100 μ m (a1–d1, a2–d2). The thickness of the DG area is indicated by a black bar.

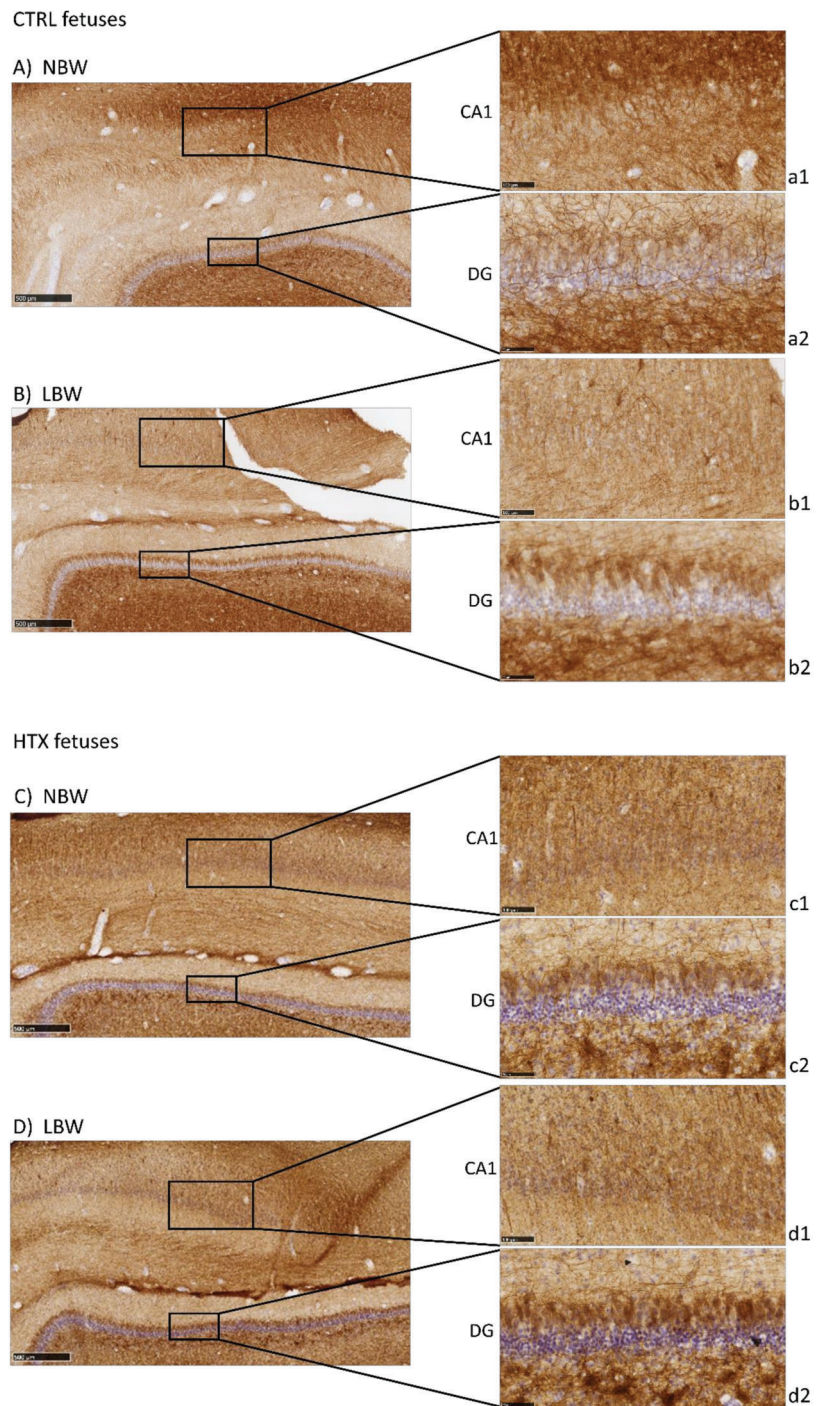


Figure 3. Effect of IUGR on neurofilaments (NFT) immunostaining on the hippocampus of fetuses whose mothers were not HTX-supplemented (A,B) or were HTX-supplemented (C,D). Panels are magnifications of the CA1 (a1–d1) and DG (a2–d2) areas shown using black boxes. Scale bars: 500 µm (A–D), 100 µm (a1–d1), and 50 µm (a2–d2).

3.2. Effects of Maternal Supplementation with HTX on the Neurotransmitter Profile in Several Brain Areas of NBW and LBW Fetuses

The effect of weight and maternal supplementation with HTX on the NT profile of the hippocampus was analyzed and it is shown in Table 2. No differences were seen between NBW and LBW animals, but an effect of HTX on several NTs, especially on the dopaminergic pathway, was observed as described in our previous work [22]. Nevertheless, an interaction between HTX treatment and body weight was observed in 5-HT, a tendency in 5-HIAA, and consequently an effect in total indoleamines (INDtotal), indicating that maternal supplementation with HTX differentially affected NBW and LBW offspring. When analyzing in detail this interaction, higher values of 5-HT and, therefore, of INDtotal were found in LBW fetuses than in NBW fetuses of the control group ($p = 0.015$ and $p = 0.016$, respectively, in the pairwise comparison). Differences due to body weight disappeared in the HTX-treated group ($p = 0.285$ and $p = 0.305$, respectively), indicating that the effect caused by IUGR on indoleamines was not observed in the case of maternal supplementation with HTX.

Table 2. Concentration of neurotransmitters and their metabolites in the hippocampus of 100-day-old fetuses as a function of maternal supplementation with HTX according to their body weight.

		NBW	LBW	Treatment	<i>p</i> -Values Body Weight	Interaction
NA	CTRL	57.82 ± 3.13 ^{Aa}	73.47 ± 10.71 ^{Aa}	<0.001	0.383	0.235
	HTX	81.20 ± 4.07 ^{Ba}	81.53 ± 13.24 ^{Aa}			
DA	CTRL	95.86 ± 10.99 ^{Aa}	106.74 ± 13.06 ^{Aa}	0.788	0.414	0.374
	HTX	88.85 ± 5.18 ^{Aa}	85.58 ± 9.92 ^{Aa}			
DOPAC	CTRL	53.72 ± 7.22 ^{Aa}	57.24 ± 16.99 ^{Aa}	<0.001	0.703	0.824
	HTX	76.71 ± 8.73 ^{Ba}	97.42 ± 32.47 ^{Aa}			
HVA	CTRL	197.59 ± 14.50 ^{Aa}	259.56 ± 31.19 ^{Ab}	<0.001	0.076	0.404
	HTX	270.10 ± 14.04 ^{Ba}	306.08 ± 46.88 ^{Aa}			
DOPtotal	CTRL	347.17 ± 24.87 ^{Aa}	423.54 ± 49.48 ^{Aa}	0.001	0.140	0.480
	HTX	435.66 ± 19.97 ^{Ba}	489.08 ± 78.44 ^{Aa}			
CATtotal	CTRL	404.99 ± 26.96 ^{Aa}	497.00 ± 59.46 ^{Aa}	<0.001	0.151	0.433
	HTX	516.86 ± 22.09 ^{Ba}	570.61 ± 88.46 ^{Aa}			
5-HT	CTRL	167.74 ± 8.29 ^{Aa}	221.61 ± 17.48 ^{Ab}	0.017	0.482	0.019
	HTX	216.95 ± 11.75 ^{Ba}	195.07 ± 31.84 ^{Aa}			
5-HIAA	CTRL	85.51 ± 4.57 ^{Aa}	102.58 ± 8.98 ^{Aa}	0.155	0.461	0.096
	HTX	94.76 ± 3.07 ^{Ba}	90.99 ± 12.18 ^{Aa}			
INDtotal	CTRL	253.25 ± 11.84 ^{Aa}	324.19 ± 23.37 ^{Ab}	0.026	0.468	0.021
	HTX	311.71 ± 13.64 ^{Ba}	286.05 ± 43.64 ^{Aa}			

Concentrations are presented as the mean ± SE. Units are ng/g tissue. The rows divide fetuses as a function of their body weight (NBW or LBW). The columns show the neurotransmitters and metabolites as a function of the treatment (CTRL or HTX). The superscripts and *p*-values in bold indicate significant differences. Different capital letters (Aa = Ab ≠ Ba) represent significant differences between treatments for the same group of body weight ($p < 0.05$). Different lowercase letters (Aa = Ba ≠ Ab) represent significant differences between groups of body weight for the same treatment ($p < 0.05$). NA, noradrenalin; DA, dopamine; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid; HVA, homovanillic acid; 5-HT, serotonin/5-hydroxytryptamine; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; DOP total, total dopaminergic neurotransmitters; CAT total, total catecholaminergic neurotransmitters; IND total, total serotonergic neurotransmitters. Statistical significance was determined by UNIANOVA with Tukey's adjustment.

Finally, interactions between the body weight and sex of fetuses were analyzed but not found to be significant for any variable (Table 3).

Neurotransmitters were also quantified in amygdalae and the prefrontal cortex. Differences between control and HTX groups were observed as described before [22], but no effect of body weight was seen on any of the NTs or brain area (Supplementary Table S2). Similarly, no effect of sex or interaction between sex and body weight was observed in these two brain areas, except for sex and NA in the amygdalae (Supplementary Table S3).

Table 3. Concentration of neurotransmitters and their metabolites in the hippocampus of 100-day-old fetuses as a function of body weight and sex.

		Females	Males	Body Weight	<i>p</i> -Values Sex	Interaction
NA	NBW	68.58 ± 3.56	68.76 ± 4.65	0.421	0.915	0.990
	LBW	75.95 ± 10.79	77.03 ± 12.90			
DA	NBW	93.89 ± 9.38	90.81 ± 7.82	0.316	0.546	0.656
	LBW	91.75 ± 12.57	105.85 ± 13.58			
DOPAC	NBW	65.19 ± 7.76	63.23 ± 8.49	0.928	0.413	0.534
	LBW	81.90 ± 25.69	62.72 ± 21.23			
HVA	NBW	228.31 ± 13.48	235.27 ± 18.19	0.107	0.715	0.619
	LBW	293.77 ± 39.25	260.24 ± 35.56			
DOPtotal	NBW	387.38 ± 21.60	389.30 ± 27.33	0.170	0.735	0.700
	LBW	467.42 ± 60.54	428.80 ± 61.21			
CATtotal	NBW	455.96 ± 23.58	458.07 ± 30.75	0.185	0.747	0.753
	LBW	543.38 ± 70.25	505.83 ± 72.12			
5-HT	NBW	188.55 ± 10.20	193.35 ± 11.11	0.316	0.819	0.576
	LBW	214.33 ± 21.08	208.98 ± 25.20			
5-HIAA	NBW	88.64 ± 3.18	91.43 ± 5.30	0.314	0.427	0.371
	LBW	103.44 ± 8.53	93.03 ± 11.72			
INDtotal	NBW	277.19 ± 12.29	284.79 ± 15.06	0.300	0.693	0.514
	LBW	317.76 ± 28.64	302.01 ± 34.02			

Concentrations are presented as the mean ± SE. Units ng/g tissue. The rows divide fetuses as a function of their sex (females or males). The columns show the neurotransmitters and metabolites as a function of their body weight (NBW or LBW). NA, noradrenalin; DA, dopamine; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid; HVA, homovanillic acid; 5-HT, serotonin/5-hydroxytryptamine; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; DOP total, total dopaminergic neurotransmitters; CAT total, total catecholaminergic neurotransmitters; IND total, total serotonergic neurotransmitters. Statistical significance was determined by UNIANOVA with Tukey's adjustment.

4. Discussion

4.1. Effects on Hippocampal Development

The hippocampus is related to memory processes, cognitive functions, learning capacities, and motor skills, which are essential for normal neurological development [27]. Several studies indicate that the hippocampus is very vulnerable to hypoxia, malnutrition, and altered micronutrient supply, which are present in IUGR [28]. In the hippocampus, pyramidal neurons from CA originate in the second half of the embryonic life. The multiplying neuroblasts migrate from the ventricular zone to their final target region and the route of migration is short because the hippocampus closely follows the curve of the ventricle. Future CA1 neurons form cell rows perpendicular to the ventricular germinal layer. At birth, the pyramidal layer is thick but it becomes thinner postnatally. On the other side, the generation of the granule cells in the DG starts at the middle of gestation but continues long into the postnatal period and, at a reduced level, into adulthood [29].

In the present work, labeling with NeuN and NFT antibodies, both markers of mature neurons, indicated that there is a neuronal deficit in the CA1 and DG areas of the hippocampi of LBW fetuses (affected by IUGR). Inversely, DCX labeling suggested that LBW fetuses had a higher number of immature and disorganized neurons than NBW fetuses. Neuron precursor cells express the DCX protein and, once they receive a synaptic signal, they extend dendrites and axons and express a series of markers from mature neurons (e.g., NeuN) [30]. Thus, our results indicate that cell differentiation proceeds more slowly in LBW than in NBW animals. The changes observed in LBW fetuses are especially relevant in DG, an area where new neurons are generated continuously throughout the individual's life [31,32].

These results confirm those previously described in the literature. Thus, MRI studies in humans confirm that the hippocampus is susceptible to IUGR, showing a reduced volume in neonatal periods [28]. In laboratory animals, it has been shown that IUGR affects the total number of pyramidal neurons in CA1 [33] and that the surviving neurons present an abnormal axonal and dendritic morphology as well as impaired connectivity between

them [34,35]. Furthermore, it has been described that IUGR can affect the volume and number of neurons [5,36] as well as neurotransmission [37], thus altering the development of the hippocampus. Taken together, our results indicate that the hippocampal maturation process is slower in LBW fetuses, which present a greater number of immature neurons. Due to the relevance of the correct development of the hippocampus and its important role in various functions [38], our results support other research findings indicating that the morphological changes observed in individuals affected by IUGR may be associated with defects in cognitive function, such as memory and learning, in humans or animal models [1,5,13,39]. In a porcine model similar to ours, it was found that the IUGR newborn piglet brain displays less NeuN-positive cells in the parietal cortex, together with other alterations affecting glial morphology, neuronal damage, white matter disruption, and inflammation [40].

Our results indicate that HTX may counteract the deleterious effect of growth restriction. Importantly, maternal treatment with HTX caused an increase in the number of NeuN-positive neurons and a decrease in the number of DCX-positive neurons in LBW fetuses, thus appearing more similar to NBW individuals. In NBW fetuses, HTX caused milder effects, which were observed only as a significant decrease in cell nuclei size in NeuN-stained samples. That is, the effects of maternal supplementation with HTX affect NBW and LBW fetuses in the same way, but the effects are more significant in LBW fetuses. Therefore, treatment of the mothers with HTX reversed the effects of IUGR in the hippocampus of the LBW fetuses. As a consequence, the differences observed between NBW and LBW individuals in the control groups disappear or are weaker when comparing HTX-NBW and HTX-LBW groups. This would be in agreement with reports indicating that maternal HTX administration improves neurogenesis and cognitive function in the offspring of prenatally stressed rats [41]. It is widely accepted that the protective role of a Mediterranean diet during pregnancy for the health of the mother and child is mainly due to the antioxidants supplied by components of this diet, such as olive oil [42,43], and it is important to note that HTX is able to cross the blood–brain barrier (BBB), thus reaching the brain at physiologically relevant concentrations [44].

4.2. Effects on the Neurotransmitter Profile in the Hippocampus

The effect of IUGR in relation to HTX supplementation of the mother's diet primarily altered the serotonergic pathway in the hippocampus. There is a growing body of evidence indicating that indoleamines, especially serotonin, are crucial for the modulation of neurodevelopmental processes, and therefore in the development of the fetal brain [45]. Thus, it has been described that changes in the serotonergic system during the prenatal stages can contribute to an alteration in development through fetal programming mechanisms and an increased risk of psychiatric diseases during childhood and adulthood [46]. During postnatal life, indoleamines are involved in such important aspects such as food intake, mood, and social interactions [47]. Similar to our results, other authors have also described that IUGR significantly increases the levels of 5-HT and its metabolite 5-HIAA, affecting the serotonergic pathway in rodent animal models [48,49].

It is possible that the small differences observed in neurotransmitter levels between LBW and NBW fetuses are related to asymmetric growth and prioritization of brain development during IUGR. However, alterations in the concentration and metabolism of indoleamines in the limbic system (mainly in the hippocampus) can compromise adequate neural function. Specifically, in humans, individuals with LBW have been found to have a higher incidence of behavioural disorders related to mobility, cognition, memory, and neuropsychological functions [50,51].

Again, an interaction between body weight and maternal supplementation with HTX was observed since the effect caused by IUGR on indoleamines was not observed in the treated group. In the pairwise comparison, LBW individuals showed different indoleamine concentrations to NBW individuals in the control groups, but these differences disappear between HTX-supplemented groups.

On the other hand, treatment of the mothers with HTX mainly affected the dopaminergic pathway in the hippocampus and that could be related to the fact that DA metabolism is a major source of intracellular ROS production [52]. HTX has a potent ROS scavenger capacity and it can induce several antioxidant enzymatic systems in the cell and maintain high levels of reduced glutathione [11,41,53]. Other possibilities would be enzymatic mechanisms by acting on Phase II enzymes, COMT, or other dopamine-related enzymes as discussed in our previous work [22].

5. Conclusions

In 100-day-old fetuses, IUGR conditions altered the immunohistochemical characteristics of the hippocampus as well as the neurotransmitter profile. Supplementation with HTX was able to reverse these changes, leading both characteristics to values more similar to those in NBW pigs. The results of the present study support the usefulness of maternal supplementation with HTX to improve prenatal development in a swine model of IUGR pregnancies.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox10101505/s1>, Table S1: Mean body weight and number of individuals included in the immunohistochemical analysis. Table S2: Concentration of neurotransmitters and their metabolites in the amygdala and prefrontal cortex as a function of maternal supplementation with or without HTX in 100-day-old fetuses according to their body weight. Table S3: Concentration of neurotransmitters and their metabolites in the amygdala and prefrontal cortex as a function of body weight and sex in fetuses at 100 days' gestation.

Author Contributions: Conceptualization, A.G.-B. and A.B.; methodology, N.Y., N.G., M.V.-G. and C.G.-C.; formal analysis and investigation, N.Y.; data curation, N.Y.; writing—original draft preparation, A.B.; writing—review and editing, N.Y., M.P. and A.G.-B.; supervision, A.G.-B. and A.B.; project administration, A.G.-B. and A.B.; funding acquisition, A.G.-B. and A.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL2015-68463-C2-2-P to AB and projects AGL2013-48121-C3-R and AGL2016-79321-C2-1-R to AGB), co-funded by FEDER. NY and MVG are recipients of a graduate student fellowship from the Spanish FPU National Program Grant (Ministry of Science, Innovation and Universities; number FPU17/01881 and FPU14/01285) and CGC is recipient of a FPI National Program Grant (number BES-2014-070464).

Institutional Review Board Statement: The study was performed according to the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63/UE. The experiment was specifically assessed and approved (report CEEA 2013/036) by the INIA Committee of Ethics in Animal Research.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Acknowledgments: We are grateful to Susana Benitez (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, UAB) for her help with the HPLC analysis and Elena Gil (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, UAB) for her excellent technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Sharma, D.; Shastri, S.; Sharma, P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin. Med. Insights. Pediatr.* **2016**, *10*, 63–87. [[CrossRef](#)]
2. Wollmann, H. Intrauterine growth restriction: Definition and etiology. *Horm. Res.* **1998**, *49* (Suppl. S2), 1–6. [[CrossRef](#)]
3. Cohen, E.; Baerts, W.; van Bel, F. Brain-Sparing in Intrauterine Growth Restriction: Considerations for the Neonatologist. *Neonatology* **2015**, *108*, 269–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Garcia-Contreras, C.; Vazquez-Gomez, M.; Astiz, S.; Torres-Rovira, L.; Sanchez-Sanchez, R.; Gomez-Fidalgo, E.; Gonzalez, J.; Isabel, B.; Rey, A.; Ovilo, C.; et al. Ontogeny of Sex-Related Differences in Foetal Developmental Features, Lipid Availability and Fatty Acid Composition. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Miller, S.; Huppi, P.; Mallard, C. The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome. *J. Physiol.* **2016**, *594*, 807–823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Rashid, C.S.; Bansal, A.; Simmons, R.A. Oxidative stress, intrauterine growth restriction, and developmental programming of type 2 diabetes. *Physiology* **2018**, *33*, 348–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Aljunaidy, M.M.; Morton, J.S.; Cooke, C.L.M.; Davidge, S.T. Prenatal hypoxia and placental oxidative stress: Linkages to developmental origins of cardiovascular disease. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2017**, *313*, R395–R399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Richter, H.G.; Camm, E.J.; Modi, B.N.; Naem, F.; Cross, C.M.; Cindrova-Davies, T.; Spasic-Boskovic, O.; Dunster, C.; Mudway, I.S.; Kelly, F.J.; et al. Ascorbate prevents placental oxidative stress and enhances birth weight in hypoxic pregnancy in rats. *J. Physiol.* **2012**, *590*, 1377–1387. [[CrossRef](#)]
9. Wang, Y.; Fu, W.; Liu, J. Neurodevelopment in children with intrauterine growth restriction: Adverse effects and interventions. *J. Matern. Neonatal Med.* **2016**, *29*, 660–668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Zyzdorzcyk, C.; Armengaud, J.B.; Peyter, A.C.; Chehade, H.; Cachat, F.; Juvet, C.; Siddeek, B.; Simoncini, S.; Sabatier, F.; Dignat-George, F.; et al. Endothelial dysfunction in individuals born after fetal growth restriction: Cardiovascular and renal consequences and preventive approaches. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2017**, *8*, 448–464. [[CrossRef](#)]
11. Robles-Almazan, M.; Pulido-Moran, M.; Moreno-Fernandez, J.; Ramirez-Tortosa, C.; Rodriguez-Garcia, C.; Quiles, J.L.; Ramirez-Tortosa, M.C. Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Res. Int.* **2018**, *105*, 654–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bertelli, M.; Kiani, A.K.; Paolacci, S.; Manara, E.; Kurti, D.; Dhuli, K.; Bushati, V.; Miertus, J.; Pangallo, D.; Bagliolo, M.; et al. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. *J. Biotechnol.* **2020**, *309*, 29–33. [[CrossRef](#)]
13. Zheng, A.; Li, H.; Cao, K.; Xu, J.; Zou, X.; Li, Y.; Chen, C.; Liu, J.; Feng, Z. Maternal hydroxytyrosol administration improves neurogenesis and cognitive function in prenatally stressed offspring. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26*, 190–199. [[CrossRef](#)]
14. de Pablos, R.M.; Espinosa-Oliva, A.M.; Hornedo-Ortega, R.; Cano, M.; Arguelles, S. Hydroxytyrosol protects from aging process via AMPK and autophagy; a review of its effects on cancer, metabolic syndrome, osteoporosis, immune-mediated and neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Res.* **2019**, *143*, 58–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Óvilo, C.; González-Bulnes, A.; Benítez, R.; Ayuso, M.; Barbero, A.; Pérez-Solana, M.L.; Barragán, C.; Astiz, S.; Fernández, A.; López-Bote, C. Prenatal programming in an obese swine model: Sex-related effects of maternal energy restriction on morphology, metabolism and hypothalamic gene expression. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 735–746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gonzalez-Bulnes, A.; Astiz, S.; Parraguez, V.H.; Garcia-Contreras, C.; Vazquez-Gomez, M. Empowering Translational Research in Fetal Growth Restriction: Sheep and Swine Animal Models. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2016**, *17*, 848–855. [[CrossRef](#)]
17. Vazquez-Gomez, M.; Garcia-Contreras, C.; Torres-Rovira, L.; Pesantez, J.L.; Gonzalez-Añover, P.; Gomez-Fidalgo, E.; Sanchez-Sanchez, R.; Ovilo, C.; Isabel, B.; Astiz, S.; et al. Polyphenols and IUGR pregnancies: Maternal hydroxytyrosol supplementation improves prenatal and early-postnatal growth and metabolism of the offspring. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177593. [[CrossRef](#)]
18. Vazquez-Gomez, M.; Heras-Molina, A.; Garcia-Contreras, C.; Pesantez-Pacheco, J.L.; Torres-Rovira, L.; Martinez-Fernandez, B.; Gonzalez, J.; Encinas, T.; Astiz, S.; Ovilo, C.; et al. Polyphenols and IUGR pregnancies: Effects of maternal hydroxytyrosol supplementation on postnatal growth, metabolism and body composition of the offspring. *Antioxidants* **2019**, *8*, 535. [[CrossRef](#)]
19. Garcia-Contreras, C.; Vazquez-Gomez, M.; Barbero, A.; Pesantez, J.L.; Zinellu, A.; Berlinguer, F.; Gonzalez-Añover, P.; Gonzalez, J.; Encinas, T.; Torres-Rovira, L.; et al. Polyphenols and iugr pregnancies: Effects of maternal hydroxytyrosol supplementation on placental gene expression and fetal antioxidant status, dna-methylation and phenotype. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1187. [[CrossRef](#)]
20. Garcia-Contreras, C.; Vazquez-Gomez, M.; Pardo, Z.; Heras-Molina, A.; Pesantez, J.L.; Encinas, T.; Torres-Rovira, L.; Astiz, S.; Nieto, R.; Ovilo, C.; et al. Polyphenols and IUGR pregnancies: Effects of maternal hydroxytyrosol supplementation on hepatic fat accretion and energy and fatty acids profile of fetal tissues. *Nutrients* **2019**, *11*, 534. [[CrossRef](#)]
21. Heras-Molina, A.; Pesantez-Pacheco, J.L.; Astiz, S.; Garcia-Contreras, C.; Vazquez-Gomez, M.; Encinas, T.; Óvilo, C.; Isabel, B.; Gonzalez-Bulnes, A. Maternal supplementation with polyphenols and omega-3 fatty acids during pregnancy: Effects on growth, metabolism, and body composition of the offspring. *Animals* **2020**, *10*, 1946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yeste, N.; Valent, D.; Arroyo, L.; Vázquez-Gómez, M.; García-Contreras, C.; Pumarola, M.; González-Bulnes, A.; Bassols, A. Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of the Antioxidant Hydroxytyrosol on Brain Neurochemistry and Development in a Porcine Model. *Antioxidants* **2021**, *10*, 884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Whittemore, C.T.; Hazzledine, M.J.; Close, W.H. *Nutrient Requirement Standards for Pigs*; BSAS, British Society of Animal Science: Essex, UK, 2003; ISBN 0906562422.
24. Gonzalez-Bulnes, A.; Ovilo, C.; Lopez-Bote, C.J.; Astiz, S.; Ayuso, M.; Perez-Solana, M.; Sanchez-Sanchez, R.; Torres-Rovira, L. Gender-specific early postnatal catch-up growth after intrauterine growth retardation by food restriction in swine with obesity/leptin resistance. *Reproduction* **2012**, *144*, 269–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gonzalez-Bulnes, A.; Astiz, S.; Ovilo, C.; Lopez-Bote, C.J.; Torres-Rovira, L.; Barbero, A.; Ayuso, M.; Garcia-Contreras, C.; Vazquez-Gomez, M. Developmental Origins of Health and Disease in swine: Implications for animal production and biomedical research. *Theriogenology* **2016**, *86*, 110–119. [[CrossRef](#)]
26. Arroyo, L.; Carreras, R.; Valent, D.; Peña, R.; Mainau, E.; Velarde, A.; Sabrià, J.; Bassols, A. Effect of handling on neurotransmitter profile in pig brain according to fear related behaviour. *Physiol. Behav.* **2016**, *167*, 374–381. [[CrossRef](#)]

27. Kesner, R.P.; Lee, I.; Gilbert, P. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev. Neurosci.* **2004**, *15*, 333–351. [[CrossRef](#)]
28. Lodygensky, G.A.; Seghier, M.L.; Warfield, S.K.; Tolsa, C.B.; Sizonenko, S.; Lazeyras, F.; Hüppi, P.S. Intrauterine Growth Restriction Affects the Preterm Infant's Hippocampus. *Pediatr. Res.* **2008**, *63*, 438–443. [[CrossRef](#)]
29. Frotscher, M.; Seress, L. Morphological development of the hippocampus. In *The Hippocampus Book*; Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J., Eds.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2007; pp. 115–131.
30. von Bohlen Und Halbach, O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* **2007**, *329*, 409–420. [[CrossRef](#)]
31. Gonçalves, J.T.; Schafer, S.T.; Gage, F.H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* **2016**, *167*, 897–914. [[CrossRef](#)]
32. Eriksson, P.; Perfilieva, E.; Björk-Eriksson, T.; Alborn, A.; Nordborg, C.; Peterson, D.; Gage, F. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 1313–1317. [[CrossRef](#)]
33. Mallard, C.; Loeliger, M.; Copolov, D.; Rees, S. Reduced number of neurons in the hippocampus and the cerebellum in the postnatal guinea-pig following intrauterine growth-restriction. *Neuroscience* **2000**, *100*, 327–333. [[CrossRef](#)]
34. Dieni, S.; Rees, S. Dendritic morphology is altered in hippocampal neurons following prenatal compromise. *J. Neurobiol.* **2003**, *55*, 41–52. [[CrossRef](#)]
35. Basiliou, A.; Yager, J.; Fehlings, M.G. Neurological outcomes of animal models of uterine artery ligation and relevance to human intrauterine growth restriction: A systematic review. *Dev. Med. Child Neurol.* **2015**, *57*, 420–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cumberland, A.L.; Palliser, H.K.; Rani, P.; Walker, D.W.; Hirst, J.J. Effects of combined IUGR and prenatal stress on the development of the hippocampus in a fetal Guinea pig model. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2017**, *8*, 584–596. [[CrossRef](#)]
37. Morgane, P.J.; Mokler, D.J.; Galler, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2002**, *26*, 471–483. [[CrossRef](#)]
38. Dupret, D.; Revest, J.-M.; Koehl, M.; Ichas, F.; De Giorgi, F.; Costet, P.; Abrouts, D.N.; Piazza, P.V. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e1959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Wixey, J.A.; Chand, K.K.; Colditz, P.B.; Bjorkman, S.T. Review: Neuroinflammation in intrauterine growth restriction. *Placenta* **2017**, *54*, 117–124. [[CrossRef](#)]
40. Wixey, J.A.; Lee, K.M.; Miller, S.M.; Goasdoue, K.; Colditz, P.B.; Tracey Bjorkman, S.; Chand, K.K. Neuropathology in intrauterine growth restricted newborn piglets is associated with glial activation and proinflammatory status in the brain 11 Medical and Health Sciences 1109 Neurosciences. *J. Neuroinflamm.* **2019**, *16*. [[CrossRef](#)]
41. Zheng, A.; Li, H.; Xu, J.; Cao, K.; Li, H.; Pu, W.; Yang, Z.; Peng, Y.; Long, J.; Liu, J.; et al. Hydroxytyrosol improves mitochondrial function and reduces oxidative stress in the brain of *db/db* mice: Role of AMP-activated protein kinase activation. *Br. J. Nutr.* **2015**, *113*, 1667–1676. [[CrossRef](#)]
42. Al-Gubory, K.H. Maternal nutrition, oxidative stress and prenatal developmental outcomes. In *Studies on Women's Health*; Humana Press Inc.: New York, NY, USA, 2013; pp. 1–31. ISBN 9781627030410.
43. Mariscal-Arcas, M.; Monteagudo, C.; Olea-Serrano, F. Diet quality in pregnancy: A focus on requirements and the protective effects of the Mediterranean diet. In *Diet Quality: An Evidence-Based Approach*; Springer: New York, NY, USA, 2013; Volume 1, pp. 81–92, ISBN 9781461473398.
44. Domínguez-Perles, R.; Auñón, D.; Ferreres, F.; Gil-Izquierdo, A. Physiological linkage of gender, bioavailable hydroxytyrosol derivatives, and their metabolites with systemic catecholamine metabolism. *Food Funct.* **2017**, *8*, 4570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Velasquez, J.C.; Goeden, N.; Bonnin, A. Placental serotonin: Implications for the developmental effects of SSRIs and maternal depression. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*, 47. [[CrossRef](#)]
46. St-Pierre, J.; Laurent, L.; King, S.; Vaillancourt, C. Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. *Placenta* **2016**, *48* (Suppl. S1), S66–S71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Berumen, L.C.; Rodríguez, A.; Mileli, R.; García-Alcocer, G. Serotonin Receptors in Hippocampus. *Sci. World J.* **2012**, *2012*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Jensen, A.; Klonne, H.J.; Detmer, A.; Carter, A.M. Catecholamine and serotonin concentrations in fetal guinea-pig brain: Relation to regional cerebral blood flow and oxygen delivery in the growth-restricted fetus. *Reprod. Fertil. Dev.* **1996**, *8*, 355–364. [[CrossRef](#)]
49. Manjarrez, G.G.; Magdaleno, V.M.; Chagoya, G.; Hernández, J. Nutritional recovery does not reverse the activation of brain serotonin synthesis in the ontogenetically malnourished rat. *Int. J. Dev. Neurosci.* **1996**, *14*, 641–648. [[CrossRef](#)]
50. Bauer, R.; Walter, B.; Brust, P.; Füchtner, F.; Zwiener, U. Impact of asymmetric intrauterine growth restriction on organ function in newborn piglets. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2003**, *110*, S40–S49. [[CrossRef](#)]
51. Geva, R.; Leitner, Y.; Harel, S. Children Born with Intrauterine Growth Restriction: Neurodevelopmental Outcome. In *Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease*; Springer: New York, NY, USA, 2012; pp. 193–208.
52. Meiser, J.; Weindl, D.; Hiller, K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun. Signal.* **2013**, *11*, 34. [[CrossRef](#)]
53. Martin, M.A.; Ramos, S.; Granada-Serrano, A.B.; Rodríguez-Ramiro, I.; Trujillo, M.; Bravo, L.; Goya, L. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxicant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 956–966. [[CrossRef](#)]



FACULTAT DE VETERINÀRIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Universitat Autònoma de Barcelona