

Universidad de Navarra

Facultad de Farmacia



Modificaciones transcriptómicas y control epigenético inducido por una dieta hipercalórica y la suplementación con sustancias prometilantes: efectos perinatales y durante la vida adulta

Transcriptomic modifications and epigenetic control induced by a hypercaloric diet and the supplementation with methyl donors: perinatal effects and during adult life

Paúl Cordero Sánchez

Pamplona, 2012

Universidad de Navarra

Facultad de Farmacia



Memoria presentada por D. **Paúl Cordero Sánchez** para aspirar al grado de Doctor en farmacia por la Universidad de Navarra

Paúl Cordero Sánchez

El presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología y autorizamos su presentación ante el tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 27 de Septiembre de 2012

V^oB^o Director

V^oB^o Director

V^oB^o Director

Dr.J. Alfredo Martínez Hernández

Dr. Javier Campión Zabalza

Dr. Fermín I. Milagro Yoldi

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra (beca predoctoral 2008-2012) y “Línea Especial” de Nutrición, Obesidad y Salud de la Universidad de Navarra (LE/97).

Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto y pensar lo que nadie más ha pensado.

Research is to see what everybody else has seen and to think what nobody else has thought.

Albert Szent-Györgi

La frase más excitante que se puede decir en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es “¡Eureka!” sino “Es extraño...”

The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not “Eureka!” but “That’s funny...”

Isaac Asimov

A mi familia

He aquí la parte más personal, menos científica y a la vez, curiosamente, la más leída de cualquier tesis doctoral. Antes de nada, para mi un agradecimiento es un sentimiento y como tal, me veo impotente a la hora de intentar plasmarlo en palabras, ya que lo considero más un gesto cotidiano y una forma de ser que un documento escrito. A todos los que agradezco estos años, independiente de estas líneas, lo saben. Y eso basta.

Lo más importante es la familia. El pasado, el presente y los planes futuros que conforman a una persona. Así, agradezco a mi padre José Juan y a mi madre Lourdes todo lo que me han enseñado y me han dado durante toda mi vida. Ya que, al final, somos como nos han enseñado a ser nuestros padres. Con ellos he compartido estos años y, aunque mi padre no haya podido ver cómo he iniciado esta carrera investigadora, espero que estuviera orgulloso de cómo lo he hecho. Cuando decidí dedicarme a la investigación, él no lo veía muy claro (obviamente una farmacia es un negocio más lucrativo y cómodo), así que una vez tomado este camino decidí que tenía que ser el mejor, o bueno, lo mejor que pudiera. Y así lo intento cada día.

A mi hermana, Irene, que como tal es mi nexo con el pasado y quien me acompañe en el futuro. Mi confidente.

A los abuelos, aunque no sepan muy bien qué hago con mis *ratitas* o si esto de la tesis es un trabajo o no. Han sido una buena piedra de toque, ya que, según Einstein “*no entiendes realmente algo a menos que seas capaz de explicárselo a tu abuela*”, por lo que podría concluir que no he entendido muchas cosas, aunque sí alguna.

A mi pequeña Marie Curie particular. Quien supongo, tras tres años, terminará formando parte en algún momento del apartado familia. ¿Quién lo diría cuando nos conocimos en el animalario recogiendo heces de rata? Pero ya ves, la frustración de la investigación infructuosa nos unió tomando cañas tras días de fracasos continuos en el laboratorio. La pija y el hippie; magnetismo de polos opuestos. ¡Y más de tres años desde entonces aguantándome!

Tres directores de tesis. Sí, a veces puede ser complicado tener un jefe. Cuando son dos, saber combinar sus opiniones y deberes suele complicarse. Pero tres... puro encaje de bolillos. Al final, con el tiempo, es cuestión de saber extraer de cada uno de ellos lo mejor para la formación propia. El problema es que nunca puede llover a gusto de todos y cuatro cabezas (me incluyo, ya que como mi tesis, tengo bastante voto en todo lo que se decide) son muy complicadas de poner de acuerdo en todo momento.

Alfredo, gracias por acogerme en el departamento desde antes incluso de terminar la carrera, en mi *bypass* hacia el máster, durante éste y después, en la tesis. No sé que viste en mí en el primer momento pero siempre me has apoyado. Por estar ahí tanto tiempo y por la confianza que has puesto en mí. Me has dedicado todo el tiempo que has podido, y de calidad, y has apostado por mí en becas, proyectos, futuro... Espero haberte devuelto parcialmente durante estos años la inversión realizada en forma de trabajo, ya que es lo único que puedo ofrecer.

Gracias Javier. Me has enseñado a tener una visión científica crítica, a comprender lo que buscaba en cada momento y a utilizar las herramientas adecuadas para hacerlo. Claro, que hay que admitir que también me has ayudado a potenciar mi faceta de laboratorio más neurótica. Vale, ya era maniático de base. Espero haber estado a la altura en cada momento y que te sientas orgulloso como mentor (sé que odias esta palabra) de la existencia de un nuevo doctor.

Gracias Fermín. También a ti te he intentado robar/aprender todo lo que he podido; templanza, practicidad y saber qué es necesario hacer en cada momento. Gracias por estar ahí y por tu eficiencia siempre que he necesitado tu ayuda. Intentaré aplicarlo en mi futura carrera investigadora.

Por tanto, gracias a mis tres jefes. He intentado aprovechar y aprender de cada uno vuestras mejores cualidades. Hacer un cóctel de todo lo positivo y aplicármelo en el presente pensando cómo podré administrarlo en el futuro. Y lo más importante, he sobrevivido a tres jefes y conservo parte de mi cordura, aunque sólo parte. Bueno, tampoco era demasiada si decidí dedicarme a investigar.

Todos necesitamos ejemplos. Existen los ídolos de masas, futbolistas, actores, modelos... Pero luego están los anónimos, aquéllos a los que te gustaría imitar en tu trabajo y llegar a tener sus cualidades después de unos cuantos años de esfuerzo. A estos ejemplos me gustaría dar sinceramente las gracias.

El primero de ellos fue Estíbaliz Goyenechea, que conocí durante mi primer año coincidiendo con el final de su estancia en la Universidad. Trabajé cerca de ella; una persona alegre, inteligente, aplicada, trabajadora... Desde mi punto de vista, muy buena científica. Pero se fue. Me dio pena pero sirvió para darme cuenta de que en el laboratorio, como PIFs, estamos todos de paso. Da igual cuán bueno seas; conseguirás tu título de doctor, si tienes suerte podrás estar ahí con un contrato por un año mientras encuentras una beca post-doc y luego volarás. Así es.

A Diego le conocí durante mi quinto año de carrera, como alumno interno. Pero en aquel momento mi perspectiva no me permitía valorar cómo trabajaba o si era un ejemplo. Luego, con mi incorporación permanente al departamento vi que era ejemplo. Una persona inteligente y muy madura, e independiente. De hecho creo que muchos post-docs probablemente estén más verdes que él como doctorando. Si algún PIF tenía una duda, un problema, acudía a él.

Y mi tercer PIF ejemplo de trabajo es Helen. Creo que ambos compartimos la misma atracción enfermiza hacia la investigación. La misma obsesión por el trabajo, trabajo bien hecho y perfeccionista. Su orden en el trabajo, su ansia de saber... siempre he intentado dirigirme hacia ella. Y además, he compartido muchos momentos buenos con ella y con su marido, Pablo, fuera del trabajo; feixoadas, comidas, fiestas... Unos enormes amigos brasileños que espero les vaya bien en el futuro y con quien poder colaborar laboralmente durante muchos años. Siempre he ansiado que nuestra relación fuera como la de Alfredo y Josefina, que después de haber trabajado juntos han seguido en contacto y colaborando durante décadas.

La población del laboratorio es itinerante. Parece que sólo los técnicos son impasibles al paso del tiempo. Que siempre han estado y continuarán ahí cuando todos volemós de la seguridad del laboratorio. Verónica, siempre dispuesta a echar una mano con una sonrisa. Ana Lorente, una de las personas más eficientes que he conocido y de la que

he aprendido todo lo que he podido, aunque me queden muchos años para estar a su altura en un laboratorio. Y en el piso de abajo, Asun, dejando un reguero alegría por donde pasa. ¿María? ¿Te meto aquí? Venga sí. A María, la Zabala, con quien espero seguir teniendo una relación estrecha en el futuro y estar siempre en contacto. Con ella y con “su David”, que creo que son esa pareja de amigos con los que siempre iríamos de vacaciones o a cualquier plan. Amigos sinceros, de verdad, y navarros para toda la vida.

Sigamos en el laboratorio. Gracias a la Pili, Valdecantos, por todas las conversaciones científicas compartidas, debates con distintos puntos de vista y por dejarme sacar faltas a tus figuras y a tus trabajos. Fuera del laboratorio gracias también por tu espíritu alegre contagioso, tu vitalidad y por dejar abajo los estereotipos que afirman que dos personas tan distintas como tú y yo no podríamos ser buenos y sinceros amigos.

Gracias también a nuestra vecina de laboratorio, Teresa. Gracias primero por tu apoyo en el laboratorio, del que quizá hemos abusado un poco como enlace de Bioquímica. Y gracias también por habernos hecho partícipes la formación de tu nueva familia, con Tony y vuestro pequeño Alvarito. Os deseo lo mejor a los tres.

Muchas personas relacionadas con el laboratorio han pasado por mi vida a lo largo de estos años dejando una pequeña muesca en mi forma de ver la vida y afrontarla. Pedro, hemos convivido juntos más de tres años y hemos pasado muchos buenos y malos momentos. Hemos reído, festejado, despotricado y lamentado juntos y guardo en una pequeña bolsita todos los buenos recuerdos e historias que hemos vivido juntos. Noemí, ha sido un placer conocerte y pasar tiempo contigo; me encanta la calma y buenas vibraciones que transmites. Carmen, maravillosa; eres un espíritu libre, puro, sin ninguna maldad. Eres una de las personas más sinceras que he conocido y con un fondo mucho mayor de lo que la mayor parte de la gente cree. Ellos se lo pierden. Rocío, me llegaste de mano de mi Ana con su máster. Me alegro de que así fuera y que hayamos podido compartir tantos momentos llenos de historias que recordar. Lorena, pequeña cabra loca. Me encanta y hace gracia tu hiperactividad y espontaneidad. Espero que tengas mucha suerte y también que sigamos siempre en

contacto contigo y con tu enorme Santi, un abrazo muy fuerte para él. Carlos, o Sancho, eres un pieza. No hay otro como tú (es un cumplido). Bien te dediques a la ciencia, o bien a la política espero tener noticias tuyas (buenas, eh? pórtate bien). Ari, cosmopolita; Venezolana, Portuguesa, Española de adopción... No te dedicas a la ciencia pero esta proyección internacional es todo un ejemplo que ahora, una vez terminada la tesis, tendremos que aprender los demás. Espero ser en ese aspecto por lo menos la mitad de valiente que tú. Jose, gracias por jugarte el tipo en el animalario con tu alergia; momentos sufridos. Espero que ahora te vaya todo muy bien y que seas muy feliz con Nerea. André, mi amigo brasileño de la perpetua sonrisa. Me encantó compartir tiempo contigo durante tu estancia. Da gusto rodearse de alguien tan positivo, siempre dispuesto para alegrarte el día. Espero te vaya todo muy bien por Brasil con Polly. Pablo, mi compañero canario, gracias por compartir todo este tiempo trabajando codo con codo (literalmente). Mucha suerte en tu nueva etapa de trotamundos; espero que coincidamos en un futuro cercano.

Podría explayarme. Podría continuar uno a uno, enumerando el granito de arena que cada persona del trabajo ha aportado para conformar mi visión de la investigación, del trabajo o de la vida, en general. Pero agruparé aquí para no aburrir a los lectores y dejarles ganas de continuar, por lo menos un poco, con lo que viene siendo la tesis en sí. Así, quedo tranquilo sabiendo que la nueva hornada de doctorandos que entró en 2011/2012 (Miguel, Usune, Idoia y Sonia) va a continuar realizando una buena labor de investigación y a la vez humana. Y también a todos aquéllos compañeros con los que he coincidido durante estos años y he compartido momentos en el laboratorio, en ordenadores, en los cafés y en los descansos; gracias a Patri, Jonai, Ana Laura, Aurora, Tara, Ceci, Marta, Adri, Laura, Itxi, Silvia, Ana Belén, Almudena, Santi, Isabel, Sonia, Catia, Alex, Richar... Y seguro que me dejo gente, gente importante. Pero que aunque se me olviden, les estoy agradecido.

Tras este repaso a los doctorandos, núcleo y masa social del departamento, recordaré que también necesitamos personas que dirijan el timón de nuestros barcos para llevarlos a buen puerto. Y ahí entran los jefes (obvio a mi trío de ases particular). Pedro, GonMun, el psicólogo de medio departamento. ¿Por qué todo el mundo va a contarte sus problemas? ¿Volviste de tu post-doc en Liverpool contratado como

psicólogo? Aunque a veces me parezca que sí, no. Pero muchas gracias por ejercerlo con la gente que me importa y por crear un buen ambiente dentro de las preocupaciones y obligaciones del mundo de los PIFs del laboratorio. Estaremos en contacto, lo sabes. Y volveré algún día a llamar a tu puerta, aunque sólo sea de visita. Un abrazo y gracias. Gracias Jaione por haber estado ahí durante todo este último año organizando todas las prácticas y así quitándome un peso de encima, además de por los buenos momentos que creas, cuando toca, con tu forma de ser. Gracias Maria Luisa por aportar alegría en el laboratorio y estar siempre dispuesta a aclararme dudas o comentar alguna curiosidad científica. Gracias Marian por preocuparte de que todo esté correcto y por preocuparte por los PIFs del laboratorio como una madre. Gracias Ángel por preguntar. Y te lo digo de verdad; me gusta el pequeño estrés de tenerte como público y saber que vas a preguntar y ponerme en algún pequeño aprieto. Yo no estoy aquí para que me den cera. Prefiero que seas duro estando en familia, ya que luego así es la vida real en una tesis, congreso, exposición... Gracias Maria Jesús por toda esa labor de vicedecanato que puede no parecer muy agradecida (aunque nunca te quita la sonrisa) pero que nos hace a todos los PIFs la vida más fácil. Gracias Diana por esa sonrisa, interés, pregunta que siempre me haces al cruzarnos en la calle o por el pasillo, creo que los dos liados, con prisas, mil cosas por hacer pero con una sonrisa. Gracias Ana por ese trato tan agradable que hemos tenido estos años. Espero que la nueva etapa que se abre ante ti con la jubilación esté llena de alegrías y momentos viendo crecer a toda la familia. Gracias también a Pilar, por las continuas muestras de ánimo e interés tanto por mí como por todos los niños que estamos en este laboratorio. Gracias Adela por ser siempre tan cercana y por facilitar una conversación, unos buenos días, una sonrisa... Y perdona por los portazos en el animalario junto a tu despacho, por el que he pasado infinidad de veces debido a esta ubicación estratégica. Muchas gracias también al resto de profesorado e investigadores del departamento que contribuyen a hacer del CAFT un buen lugar en el que aprender y formarse en todos los aspectos.

Por otra parte, existen muchas personas alrededor de este pequeño mundo de ciencia que son engranajes necesarios para su funcionamiento. Así, desde la secretaría del

departamento Paula y Beatriz siempre se han preocupado de tenernos informados y actualizados sobre noticias del departamento y actividades, además de cualquier trabajo engorroso administrativo y trámites que se escapan de nuestro conocimiento. Y lo más importante, siempre parando lo que estén haciendo para atenderte y con una sonrisa. Y un paso más allá, hacia el Hexágono (formalmente Edificio de Ciencias), también me gustaría agradecer a la secretaría y gerencia de la Facultad de Farmacia por su eficiente labor que también contruye a facilitarnos la vida y por su trato tan cercano, paciente y agradable (gracias a Reyes, Gonzalo y Teresa).

Otros servicios necesarios de los que he dependido y agradezco su efectividad han sido los distintos bedeles que han pasado por nuestro edificio (nunca he tenido ningún problema; si tratas bien a la gente, la gente te trata bien a ti) y el personal de limpieza (perdón por pisar suelos fregados en horarios poco habituales). Además, me gustaría agradecer profundamente, de verdad, al servicio de animalario de CIFA, sobre todo a Juan y Eneko, con los que más he trabajado. Casi destrozo la infraestructura del animalario (hasta 700 ratas al mismo tiempo) y además en verano, pero siempre habéis eficientes y me habéis ayudado a poder sacar adelante todos mi proyectos en el animalario. Sin vosotros habría sido imposible.

Me gustaría también agradecer a Esteban Ballestar por su acogida en el ICO (Instituto Catalán de Oncología) en 2009 que me permitió tener una experiencia en los mejores laboratorios de epigenética de España, en los que pude aprender nuevas técnicas para aplicar después en Pamplona y compartir buenos momentos con todo su equipo (Biola, Javi, Henar, Lorenzo...).

Miguel, muchas gracias por acogerme en tu laboratorio de Cambridge. Ha sido una estancia maravillosa en la que he aprendido mucho de todos los integrantes de tu equipo e intentado trabajar para estar a la altura. Gracias por haberme recibido con los brazos abiertos, a mi, un doctorando que había conocido en un congreso y sin ningún vínculo con su grupo o universidad. Eres una persona honesta, agradable y que te

gusta la ciencia. Muchas gracias por dejarme las puertas abiertas para el futuro; estamos en contacto. Y gracias por darme la oportunidad de poder trabajar con Yoichi, Ionel, Constanze, Diogo, Wendy... de todos ellos he intentado aprender algo, tanto en el laboratorio como fuera de él.

Miguel, thank you very much for accepting me in your laboratory in Cambridge. It has been a great stage in which I learned from all your research team and I tried to work the best I could to rise to the challenge. I am much obliged for the way you received me, with open arms, when I was only an unknown PhD student briefly met in a congress. I am also very grateful for keeping the doors of your lab open for me, for the future. I also appreciate having met Yoichi, Ionel, Diogo, Wendy, Constanze, Ilona, Rachel, Jumoye.... I tried to learn something from all of them; at the lab and out of the lab.

Muchas gracias a todos mis amigos de Bilbao. No, no enumeraremos. En general a todos los Gróbulos, a las Toreras y a tod@s l@s consortes. Siempre habéis estado ahí. Llevamos más de la mitad de nuestras vidas todos juntos y, aunque nuestras vidas han cambiado y ha habido cierta diáspora, siempre, cada fin de semana (que yo entre semana no puedo) ahí estamos.

Por último, he dejado para final a unas personas anónimas sin las que ni mi tesis, ni muchas otras podrían haberse llevado a cabo. Son la a Asociación de Amigos de la Universidad. Es curioso, no conozco ninguna otra Universidad con unas becas a la investigación de donantes anónimos. Son gente que no tienen relación directa conmigo, no saben exactamente lo que hago o sí, pero es demasiado abstracto para ellos y además me pagan sin esperar nada a cambio. Este sistema de “apadrinamiento” de PIFs no sólo nos alimenta, viste y cobija, sino que además nos enseña un valor de solidaridad o ayuda desinteresada. Tiene mérito. Mucho además en estos tiempos de crisis. Y los becarios a los que están ayudando a vivir lo agradecemos y creo que pensamos que si en el futuro nos lo podemos permitir, también intentaremos ayudar

de esta manera. Muchas gracias. Estos anónimos favorecen que en estos tiempos de crisis la Universidad de Navarra pueda seguir investigando de manera exitosa. Y es a esta institución, nuestra Universidad, a la que también quiero agradecer haberme formado como profesional (casi once años entre carrera, máster y tesis!) y como persona.

Abreviaturas

18S	18S rRNA	<i>18s rRNA</i>
Acaca	Acetil-CoA carboxilasa	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>
Acp1	Fosfatasa ácida 1	<i>Acid phosphatase 1</i>
ADN	Ácido desoxiribonucleico	<i>Desoxiribonucleic acid</i>
Agpat3	1-acilglicerol 3-fosfato O-aciltransferasa	<i>1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3</i>
ALT	Alanino aminotransferasa	<i>Alanine aminotransferase</i>
Ampk	Quinasa activada por AMP	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ANOVA	Análisis de la Varianza	<i>Analysis of variance</i>
ARN	Ácido ribonucleico	<i>Ribonucleic acid</i>
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
AST	Aspartato aminotransferasa	<i>Aspartate aminotransferase</i>
Btc	Betacelulina	<i>Betacellulin</i>
Cbs	Cistationina beta sintasa	<i>Cystathionine beta-synthase</i>
Ccl2	Proteína quimioatrayente de monocitos 2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CD36	Cluster de diferenciación 36	<i>Differentiation cluster 36</i>
Cgs	Cistationina gamma sintasa	<i>Cystathionine gamma-synthase</i>
CIFA	Centro de investigación Farmacológica Aplicada	<i>Centre of applied Pharmacobiology</i>
Cox2	Citocromo C oxidasa, subunidad 2	<i>Cytochrome c oxidase subunit II</i>
Cxcl2	Ligando 2 de chemoquina (motivo C-X-C)	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i>
Dat	Neurotransportador de dopamina	<i>Dopamine transporter</i>
Dnmt	ADN metiltransferasa	<i>DNA methyltransferase</i>
DOHaD	Desarrollo evolutivo de la salud y de la enfermedad	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>
Esr1	Receptor de estrógenos 1	<i>Estrogen receptor 1</i>
Fabp	Proteína de unión a ácidos grasos	<i>Fatty acid binding protein</i>
Fasn	Ácido graso sintasa	<i>Fatty acid synthase</i>
Fat1	Homólogo del supresor FAT de tumor 1	<i>FAT tumor suppressor homolog 1</i>
Fbxo21	Proteína 21 de caja F	<i>F-box protein 21</i>

Fto	Asociado a masa grasa y obesidad	<i>Fat mass and obesity associated</i>
Gapdh	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Ghsr	Receptor del secretagogo de hormona de Crecimiento	<i>Growth hormone secretagogue receptor</i>
Gr	Receptor de glucocorticoides	<i>Glucocorticoid receptor</i>
Gsr	Glutación reductasa	<i>Glutathione reductase</i>
Hdac3	Deacetilasa de histona 3	<i>Histone deacetylase 3</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidad	<i>High density lipoprotein</i>
HF	Rica en grasa	<i>High fat</i>
HFS	Rica en grasa y sacarosa	<i>High fat sucrose</i>
HMG-CoA	3-hidroxi 3-metil glutaril-CoA reductasa	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase</i>
HS	Rica en azúcares	<i>High sugar</i>
Igf	Factor de crecimiento similar a la insulina	<i>Insulin-like growth factor</i>
Igfbp3	Proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 3	<i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i>
IL-1b	Interleuquina 1 beta	<i>Interleukin beta 1</i>
IMC	Índice de Masa Corporal	<i>Body Mass Index</i>
Lepr	Receptor de leptina	<i>Leptin receptor</i>
Lxra	Receptor X alfa hepática	<i>Liver X receptor alpha</i>
Mc4r	Receptor de la melanocortina 4	<i>Melanocortin receptor 4</i>
Mcp1	Proteína quimiotáctica monocítica	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MglI	Monoacilglicerol lipasa	<i>Monoacylglycerol lipase</i>
Mif	Factor de inhibición de la migración de Macrófago	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
Mme	Metallo-endopeptidasa de membrana	<i>Membrane metallo-endopeptidase</i>
Mor	Receptor opioide, mu 1	<i>Opioid receptor, mu 1</i>
Mst1	Estimulador de macrófagos 1	<i>Macrophage stimulating 1</i>
NAFLD	Hígado graso no alcohólico	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>
Nos2	Óxido nítrico sintasa 2	<i>Nitric oxide synthase 2</i>
Npy	Neuropeptido Y	<i>Neuropeptide Y</i>
NZO	Ratón obeso de Nueva Zelanda	<i>New Zealand Obese mice</i>

OLEFT	Rata obesa Otsuka Long-Evans Tokushima	<i>Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat</i>
OMC	Ciclo metabólico de un carbono	<i>One carbon metabolic cycle</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud	<i>World Health Organization</i>
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Penck	Fosfoenol piruvato carboxilasa	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
Pomc	Proopiomelanocortina	<i>Proopiomelanocortin</i>
Ppar	Receptor activador de la proliferación de Peroxisomas	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PUFA	Ácidos grasos poli insaturados	<i>Poli unsaturated fatty acids</i>
Rxra	Receptor X retinoide alfa	<i>Retinoid X receptor alpha</i>
Scd	Estearil CoA desaturasa	<i>Stearoyl-CoA desaturase</i>
SEEDO	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad	<i>Spanish Society to Study of Obesity</i>
SFA	Ácidos grasos saturados	<i>Saturated fatty acids</i>
Srebf	Unión de elementos de respuesta a Esteroles	<i>Sterol regulatory element binding protein</i>
TG	Triglicéridos	<i>Triglycerides</i>
Tnfa	Factor de necrosis tumoral alfa	<i>Tumor necrosis factor alfa</i>
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad	<i>Very low density lipoprotein</i>
WAT	Tejido adiposo blanco	<i>White adipose tissue</i>

Índice

I Introducción

1. Obesidad	1
1.1. Definición y prevalencia	1
1.2. Etiología de la obesidad	4
1.3. Modelos animales de obesidad	9
1.3.1. Características de los modelos animales de obesidad	9
1.3.2. Tipos de modelos animales de obesidad	10
1.3.2.1. Modelos animales de obesidad de origen genético	11
1.3.2.2. Modelos animales de obesidad inducida por la dieta	12
1.4. Comorbilidades de la obesidad	14
2. Hígado graso no alcohólico	16
2.1. Definición y prevalencia	16
2.2. Acumulación de grasa en el hígado y obesidad	18
2.3. Modelos animales de hígado graso y su evolución	20
2.3.1. Características de los modelos	20
2.3.2. Tipos de modelos	21
2.3.2.1. Modelos animales de NAFLD inducida por una dieta obesogénica	21
2.3.2.2. Modelos animales de NAFLD caracterizada por una dieta deficitaria	23
3. Orígenes del desarrollo de la salud y enfermedad	24
3.1 Definición	24

3.2 Estudios epidemiológicos de DOHaD y obesidad	26
3.3 Modelos animales de DOHaD y obesidad	27
II. Hipótesis y objetivos	53
1. Hipótesis	55
2. Objetivo general	55
3. Objetivos específicos	56
III. Diseño experimental	59
1- Diseño general	61
2- Diseño experimental: capítulo 1	62
3- Diseño experimental: capítulo 2	63
4- Diseño experimental: capítulo 3	64
5- Diseño experimental: capítulo 4	65
IV. Resultados	67
<i>Capítulo 1. Dietary supplementation with methyl donor groups could prevent nonalcoholic fatty liver</i>	69
<i>Capítulo 2. Dietary supplementation with methyl donors reduces fatty liver and modifies the Fatty Acid Synthase DNA methylation profile in rats fed an obesogenic diet</i>	77
<i>Capítulo 3. Transcriptomic and epigenetic changes in early liver steatosis and the preventive effect of dietary methyl donor supplementation</i>	103
<i>Capítulo 4. Maternal methyl donor supplementation and high-fat sucrose diet during lactation modifies adult offspring response to an obesogenic diet</i>	137
V. Discusión general	165
1. Efectos de la dieta HFS	168

1.1. Ingesta de la dieta HFS en edad adulta_____	168
1.2. Ingesta de la dieta HFS en la lactancia materna. Efectos sobre la descendencia en la edad adulta y sobre su respuesta a la dieta HFS_____	181
2. Efectos de la suplementación prometilante_____	184
2.1. Efectos de la suplementación prometilante de la dieta control__	186
2.1.1. Efectos de la suplementación prometilante de una dieta control en edad adulta_____	186
2.1.2 Efectos de la suplementación prometilante de una dieta control en la lactancia materna. Efectos sobre la descendencia en edad adulta y sobre su respuesta a la dieta HFS_____	189
2.2. Efectos de la suplementación prometilante de la dieta HFS_____	192
2.2.1. Efectos de la suplementación prometilante de una dieta HFS en edad adulta_____	192
2.2.2. Efectos de la suplementación prometilante de una dieta HFS en la lactancia materna. Efectos sobre la descendencia en la edad adulta y sobre su respuesta a la dieta HFS_____	195
3. Corolario_____	197
VI. Conclusiones_____	201
VII. Bibliografía_____	211
VIII. Anexos_____	239
Anexo 1. Interplay of early-life nutritional programming on obesity, inflammation and epigenetic outcomes_____	241

Anexo 2. Maternal weight gain induced by an obesogenic diet affects adipose accumulation, liver weight and insulin homeostasis in the rat offspring depending on the sex	251
Anexo 3. Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet	273
Anexo 4. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss	283
Anexo 5. Epigenética nutricional: una pieza clave en el rompecabezas de la obesidad	297
Anexo 6. Nutrigenética y epigenética: técnicas de SNP y MSP	311
Anexo 7. Contribuciones a congresos	321

I. Introducción

1. Obesidad

1.1. Definición y prevalencia

La obesidad se define como una enfermedad crónica multifactorial caracterizada por un aumento de peso en forma de masa grasa. El excesivo depósito de tejido adiposo se origina por un balance energético positivo entre la ingesta energética y el gasto calórico mantenido en el tiempo [Marti 2008, Martinez 2008]. Estos factores están influenciados tanto por características genéticas como por el estilo de vida [McAllister 2009].

Evolutivamente, para la adaptación de la especie humana al medio, este acúmulo del exceso energético en forma de masa grasa presentaba una posibilidad de supervivencia ante épocas de hambruna. Así, durante miles de años, la adaptación del ser humano propició una optimización de los nutrientes para ser aprovechados ante épocas de hambruna [Hales 2001, Vaag 2012]. En este sentido, la amplia disponibilidad de alimentos, así como la gran palatabilidad de aquéllos más calóricos y menos adecuados para una alimentación saludable [Garber 2011], ha superado la capacidad de adaptación del ser humano ante este nuevo ambiente, y el inicialmente positivo incremento de las reservas energéticas se ha transformado en una grave enfermedad pandémica con repercusión tanto directa como indirecta, por medio de sus comorbilidades asociadas (diabetes, hipertensión, dislipemias), en todo el mundo [Haslam 2005]. Además, en lo relativo al gasto energético, cambios en el estilo de vida actual han propiciado una reducción de la actividad física tanto en el trabajo como en el tiempo libre, con especial relevancia en la población infantil [Hills 2011, Steeves 2011].

El criterio internacional más aceptado para definir la obesidad es el Índice de Masa Corporal (IMC) por la sencillez en su aplicación y su fácil reproducibilidad, que relaciona el peso de un individuo expresado en kilogramos con su altura, expresada en metros y elevada al cuadrado, clasificando el estado nutricional en distintos grados [Rubio 2007](tabla 1). Este índice es el empleado por la mayor parte de las sociedades

médicas y organizaciones de salud internacionales, pero tiene el inconveniente de no permitir diferenciar los compartimentos del organismo [Rubio 2007]. Así, por ejemplo, un deportista de élite muy musculado podría ser catalogado como obeso por su alto peso de masa muscular y, una persona de constitución fina pero con un gran acúmulo de grasa abdominal podría ser catalogada como normopeso. Las clasificaciones de este índice tampoco resultan válidas para niños, cuyos valores se comparan con los normales para esa edad, ni para embarazadas o ancianos. Así, además de conocer las limitaciones que existen con el índice IMC, otros tipos de índices y determinaciones pueden ser empleados para determinar un diagnóstico de obesidad, así como de riesgo cardiovascular [Barreira 2012]; la circunferencia de la cintura puede aproximar si existe un exceso de grasa intra-abdominal, la toma de pliegues cutáneos es un indicador de masa grasa corporal así como la bioimpedancia eléctrica, que determina la cantidad de masa grasa corporal basándose en la conductancia eléctrica del agua.

Tabla 1. Clasificación del IMC según Salas-Salvado y col. (SEEDO, 2007)

Categoría	Valores de IMC (Kg/m²)
Peso Insuficiente	< 18,5
Normopeso	18,5 - 19,5
Sobrepeso	
<i>Grado I</i>	25,0 - 26,9
<i>Grado II (preobesidad)</i>	27,0 - 29,9
Obesidad	
<i>Tipo I</i>	30,0 - 34,9
<i>Tipo II</i>	35,0 - 39,9
<i>Tipo III (mórbida)</i>	40,0 - 44,9
<i>Tipo IV (extrema)</i>	≥ 50

Algunas estimaciones de la Organización Mundial de la Salud [WHO 2011] cifran en 500 millones las personas que padecían obesidad en 2008 en todo el mundo (figura 1). Además, la velocidad a la que incrementan las tasas de prevalencia de esta enfermedad resulta alarmante, dado que se ha duplicado desde 1980 hasta 2008 (del 5 al 10% en hombres y del 8 al 14% en mujeres) y se calcula que en 2015 las personas con obesidad alcanzarán los 700 millones, lo que supondría un incremento del 40% en

la prevalencia de esta enfermedad en 7 años [WHO 2010]. En España, datos de la OMS cifraron la prevalencia de obesidad en 2008 en el 27%, mientras que la tasa de sobrepeso alcanzó valores muy superiores, con un 62% [WHO 2011]. Datos del informe-consenso de la FESNAD y la SEEDO de 2011 [Gargallo 2011] corroboran esta elevada tasa de obesidad en población adulta española, de en torno al 25%, siendo una de las más elevadas de Europa y encontrándose incrementada en los últimos 10 años respecto a los niveles de prevalencia del 15,5% del informe DORICA de población española [Aranceta 2007]. Por otra parte, resulta también alarmante la tasa de obesidad infantil, cifrada por la IASO (Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad) en 50 millones de niños obesos en edad escolar en todo el mundo. Estos datos resultan preocupantes teniendo en cuenta que se trata de una enfermedad crónica que disminuye tanto la esperanza como la calidad de vida de los niños con obesidad [Franks 2010].

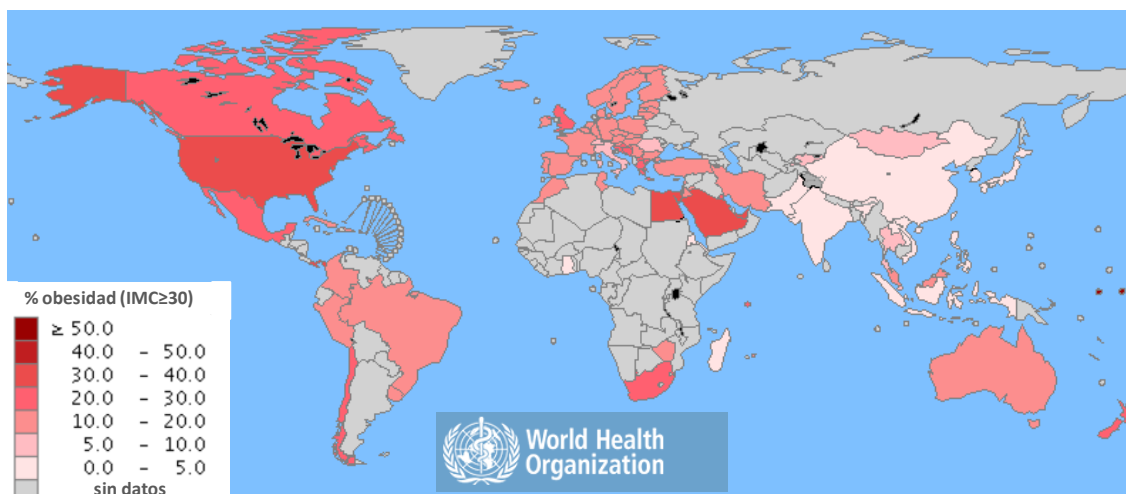


Figura 1. Tasa de obesidad por países según el IMC. Organización Mundial de la Salud (OMS 2011).

Además de la importancia fisiopatológica de la obesidad, respecto a su vertiente socio-económica, estudios realizados a finales de los 90 intentaron relacionar los gastos del sistema de salud originados por la inactividad física, sobrepeso y obesidad. Así, en Inglaterra [England 2001] se concluyó en un estudio de 2001 que anualmente la obesidad es causa de 30.000 muertes, 18 millones de días de baja laboral, siendo además la causa de una disminución de nueve años en la esperanza de vida. Estudios

previos en Estados Unidos [Colditz 1999], estimaban que el 7% del gasto sanitario era invertido en esta enfermedad, y en 2005, la Unión Europea estimó un gasto anual relacionado con la obesidad de 33.000 millones de euros [Fry 2005]. Otro estudio realizado en 2005 en Estados Unidos estimó, incluyendo las comorbilidades asociadas, [Anderson 2005] que el gasto asociado a la inactividad física, sobrepeso y obesidad rondaba el 27% de la carga económica del sistema sanitario.

Estos datos sobre una enfermedad crónica, como es la obesidad, con múltiples comorbilidades asociadas y con un importante descenso de la calidad y esperanza de vida permiten afirmar que la obesidad se ha convertido en la epidemia del siglo XXI [Popkin 2012].

1.2 Etiología de la obesidad

La obesidad es una enfermedad metabólica resultante de la interacción entre factores relacionados con el estilo de vida, factores neuroendocrinos, factores genéticos y factores epigenéticos [Campion 2010, Marti 2008, Wareham 2008]. Estos elementos afectan al balance energético superando la ingesta calórica al gasto metabólico y acumulando de esta forma el excedente como tejido adiposo (figura 2).

Factores relacionados con el estilo de vida

La nutrición es un aspecto crucial en el desarrollo de obesidad [Aller 2011, Fruhbeck 1997]. Los principales cambios en la distribución de nutrientes del modelo dietético de los países desarrollados se han caracterizado por un incremento en el consumo de grasas y azúcares simples en detrimento de los hidratos de carbono complejos y de la fibra alimentaria [Law 2007], incrementando la densidad energética de los alimentos. Por otra parte, también resulta importante la cantidad ingerida, que debe ser proporcional a la actividad física de cada individuo, y puede tener un importante efecto sobre el metabolismo y la regulación del apetito [Wadden 2012].

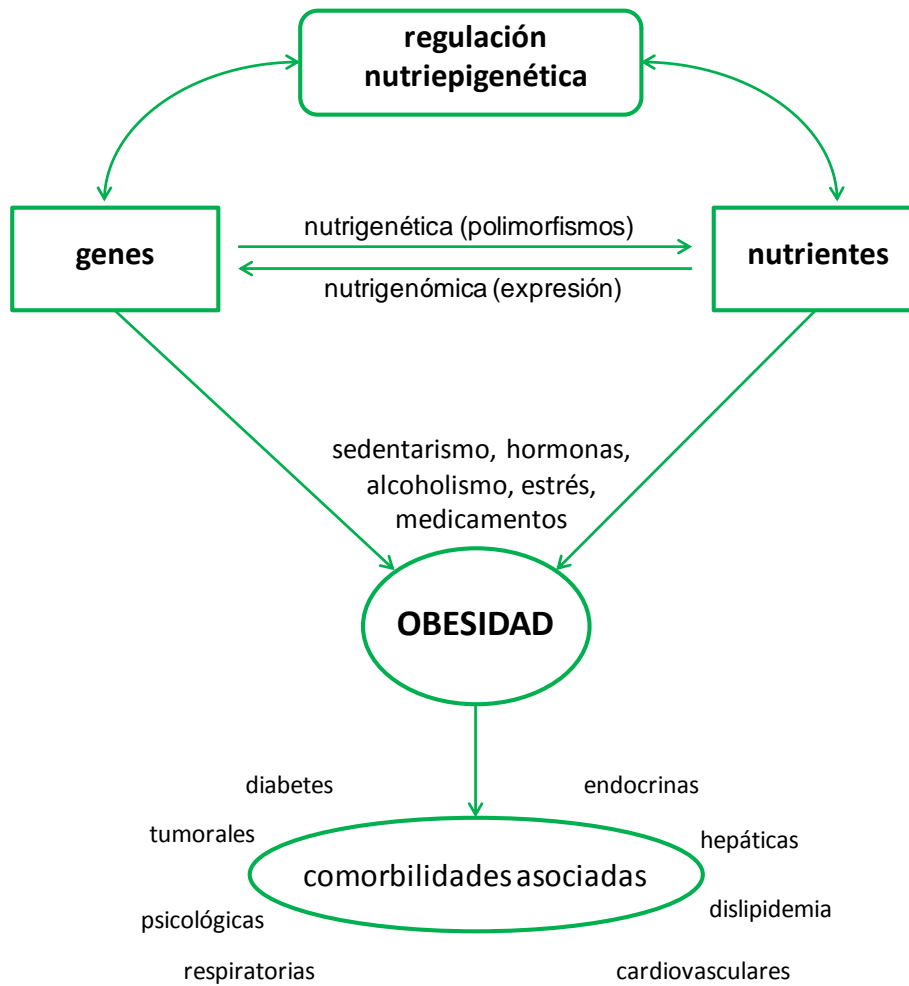


Figura 2. Origen y consecuencias de la obesidad

También hábitos de vida sedentarios como el incremento de inactividad en la sociedad occidental [Steeves 2011], el consumo excesivo de alcohol [Lourenco 2011] o efectos asociados a la administración de determinados medicamentos [Tadger 2008] pueden afectar al aumento del peso corporal y la manifestación de obesidad.

La alimentación, así como la mayor parte de los factores relacionados con el estilo de vida, son los elementos aparentemente más fácilmente abordables en el inicio del tratamiento contra la obesidad a nivel de la población [Dubnov-Raz 2011, Martinez 2000, Villagran Perez 2010].

Factores neuroendocrinos

Las alteraciones endocrinas son frecuentes en cuadros de obesidad [Bjorntorp 1997, Cioffi 2010]. La hiperinsulinemia es el desequilibrio asociado más común, favoreciendo la acumulación de lípidos en el organismo. También participan otras hormonas mediante la regulación de la movilización de estos lípidos como la hormona de crecimiento, hormonas tiroideas u hormonas esteroideas.

La principal hormona asociada a la regulación del peso corporal y obesidad es la leptina [Zhang 1994], fundamentalmente secretada por los adipocitos e involucrada en la regulación del apetito [Marti 1999, Oswal 2010]. Pese a que inicialmente se consideraba que los adipocitos eran células cuya única misión era la acumulación de energía en forma de lípidos, su caracterización como importante órgano secretor ha cobrado relevancia los últimos años. Así este tejido produce sustancias implicadas en la regulación del peso corporal (leptina y adiponectina), en procesos inflamatorios o de respuesta del sistema inmune (factor de necrosis tumoral alfa, interleuquina 1, interleuquina 6), en funciones vasculares (angiotensina e inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1), en el desarrollo de la resistencia insulínica (resistina) y en la función reproductora (estrógenos) [Moreno 2002].

Factores genéticos

Entre el 40 y el 70% de la variabilidad del peso corporal se ha atribuido a la herencia genética [Walley 2006], habiéndose descrito más de 600 regiones cromosómicas que pueden afectar a la regulación del peso corporal [Rankinen 2006]. Entre ellas, unos 20-30 genes han sido implicados de forma directa en la homeostasis energética, aunque este número está en aumento debido a la mejora de técnicas genómicas como los estudios de asociación de genoma completo o GWAS (Genome Wide Association Studies) [Lindgren 2009]. Estos estudios se basan en la relación de polimorfismos en determinados genes que pueden alterar la susceptibilidad al desarrollo de obesidad afectando la metabolización de los distintos nutrientes así como a la respuesta a la dieta, lo que es estudiado por la nutrigenética [Larsen 2012, Razquin 2011]. Así, el polimorfismo rs9939609 del gen de la proteína asociada a masa grasa y obesidad (FTO)

está asociado al apetito y la saciedad postprandial [den Hoed 2009], el rs2151916 del gen transportador de ácidos grasos CD36 se asocia a los niveles plasmáticos de HDL colesterol [Goyenechea 2008]. El rs17300539 del gen adiponectina se asocia a la respuesta a una dieta hipocalórica [Goyenechea 2009] y variaciones en el gen del receptor de la melanocortina 4 (MC4R) alteran la susceptibilidad al desarrollo de obesidad [Ochoa 2007], entre otros ejemplos. Por otra parte, la ingesta de nutrientes también puede condicionar el perfil de expresión génica del organismo, campo que estudia la nutrigenómica [Bouchard 2012].

Factores epigenéticos

En este contexto, recientemente ha emergido la epigenética como una nueva herramienta en el estudio de los mecanismos implicados en el desarrollo de obesidad [Campion 2009, Milagro 2012]. Esta nueva área de la ciencia se centra en el papel de las modificaciones covalentes sobre el ADN y las histonas, que sin variar la disposición de los nucleótidos, afectan a la expresión de los genes [Junien 2007]. Así, una misma

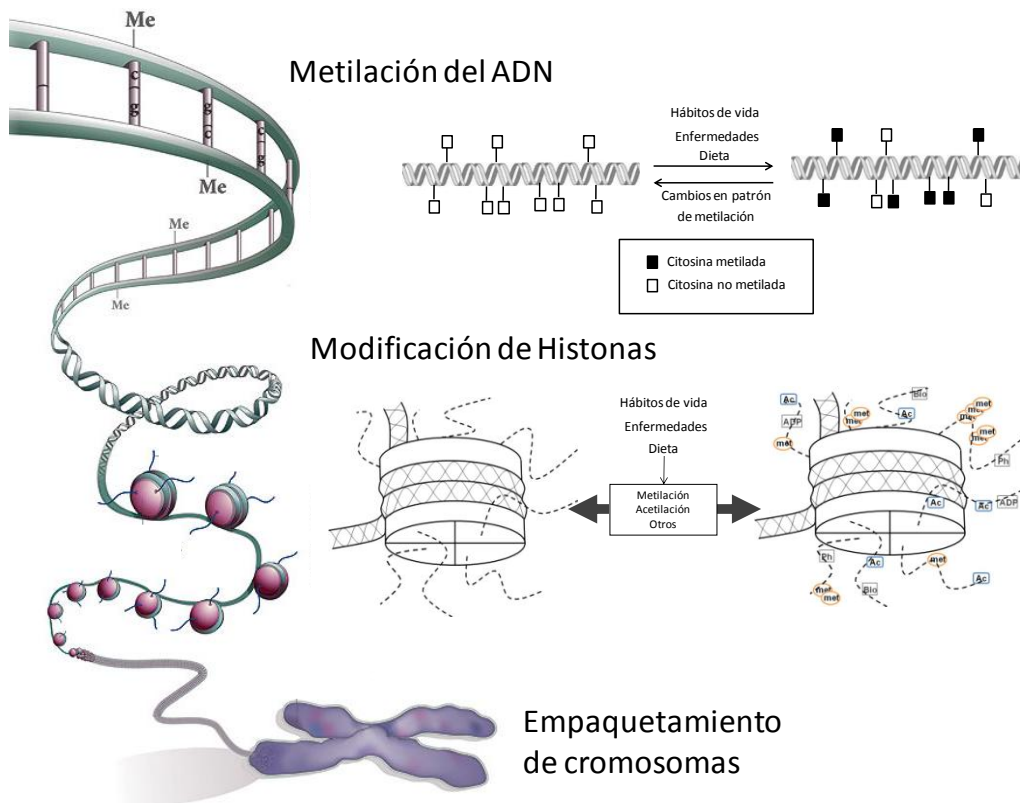


Figura 3. Principales modificaciones epigenéticas (modificada de Cordero P 2010 y Yoo 2006).

secuencia de nucleótidos en dos individuos puede expresarse o no dependiendo de marcas epigenéticas específicas [Fraga 2005]. De esta forma, la epigenética contribuye a explicar parte de lo que no ha sido aclarado por el Proyecto Genoma Humano y que pretende ser explicado por el Proyecto Epigenoma Humano [Jones 2005].

Las principales modificaciones de control epigenético son la metilación de la cadena de ADN y los cambios en las colas terminales de las histonas, principalmente metilaciones y acetilaciones [Campion 2010, Dolinoy 2008](figura 3). Estas marcas epigenéticas no son permanentes a lo largo del tiempo. Así, diversos factores como la nutrición [Cordero 2010, Thaler 2009], el estrés oxidativo [Franco 2008], la hipoxia [Shahrzad 2007], la inflamación [Stenvinkel 2007] o la edad [Jiang 2008], entre otros, afectan a las modificaciones en el epigenoma, contribuyendo a su plasticidad a lo largo de la vida. Por otra parte, la susceptibilidad a cambios en el epigenoma varía en las distintas etapas del ciclo vital, ya que existen ventanas epigenéticas en las que la predisposición a los cambios es específicamente influenciable (figura 4). Así, durante el embarazo se produce un borrado de las marcas epigenéticas y una posterior reestructuración en el

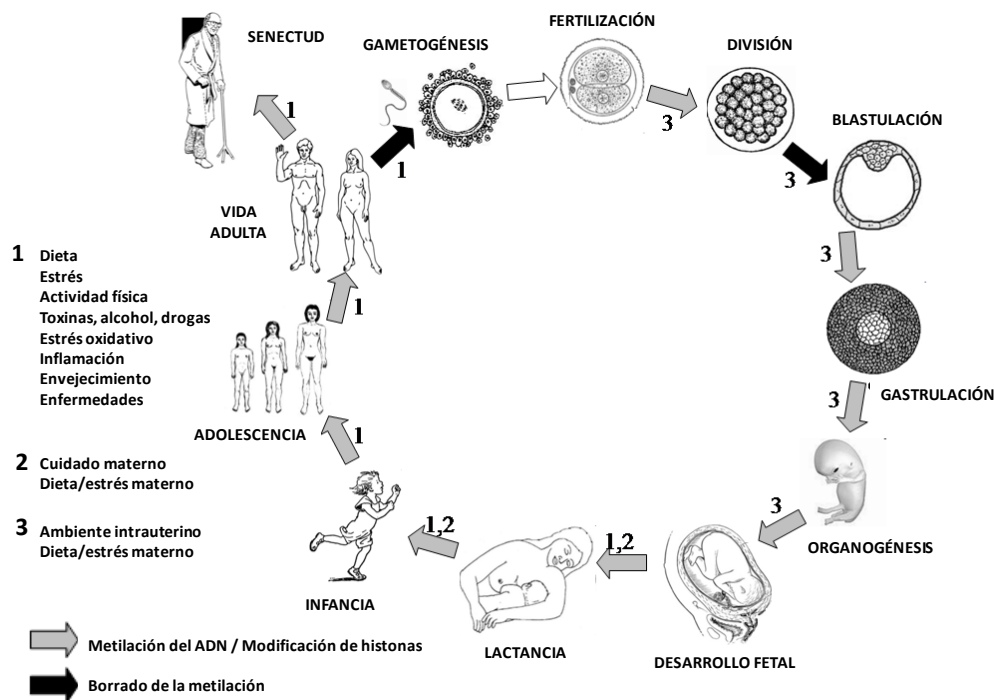


Figura 4. Períodos de la vida en los que tienen lugar cambios epigenéticos y principales factores ambientales que influyen en ellos (modificado de Campion J 2009).

código de metilación del ADN [Morgan 2005, Nafee 2008]. Otras etapas susceptibles a cambios son la lactancia [Waterland 2003], la pubertad [Burdge 2009] y determinados estadios de la diferenciación celular de los distintos tejidos [Weber 2005].

Estudios en roedores han descrito alteraciones del patrón de metilación del tejido adiposo inducidos por la ingesta de una dieta hipercalórica en genes vinculados con obesidad como la leptina [Milagro 2009] o la ácido graso sintasa [Lomba 2010]. En humanos, se ha observado una relación entre los hábitos nutricionales y el patrón de metilación de genes relacionados con la regulación del peso corporal [Thaler 2009]. Además, recientes estudio han concluido que el perfil epigenético puede emplearse como una herramienta predictora de la respuesta a dietas para la pérdida de peso [Campion 2009, Cordero 2011, Milagro 2011], lo cuál podría facilitar el establecimiento de tratamientos dietéticos personalizados.

Además de los factores aquí descritos, existen otros determinantes que pueden relacionarse con la presencia de obesidad como, por ejemplo, el efecto de algunos microorganismos, el incremento de la edad de las madres, situaciones de déficit de sueño, la temperatura ambiental, el consumo de algunos fármacos o factores de origen psicosocial, entre otros [McAllister 2009].

1.3 Modelos animales de obesidad

1.3.1 Características de los modelos animales de obesidad

Aunque el parámetro IMC adaptado puede también emplearse en modelos animales de roedores [Sahin 2011], su uso es minoritario y son otras las variables empleadas para la caracterización de la obesidad animal. Las principales medidas que definen a un animal como obeso son el exceso de peso y la cantidad de tejido adiposo [Hariri 2010, Speakman 2007]. La masa grasa puede cuantificarse durante la vida del animal mediante técnicas de resonancia magnética [Nixon 2010], aunque, debido al elevado coste de los equipos empleados para este fin, suelen ser cuantificados mediante la

extracción de los distintos depósitos grasos una vez sacrificado el animal; grasa subcutánea, grasa mesentérica, grasa perigonadal (periovárica o epirodinal para hembras o machos, respectivamente) y grasa retroperitoneal [DiGirolamo 1998]. Estos acúmulos suelen estar aumentados en modelos de obesidad, así como la cantidad de grasa infiltrada en los órganos abdominales, destacando la importancia fisiopatológica de que esta infiltración se produzca en el hígado [Tordjman 2008].

Las variaciones bioquímicas plasmáticas vinculadas a obesidad en modelos animales se caracterizan, sobre todo por alteraciones en la homeostasis glucídica y lipídica [Boque 2009, [Hariri 2010, Speakman 2007]. Así, los animales obesos incrementan sus niveles de insulina plasmática con una subsecuente resistencia insulínica que conlleva un incremento de la glucemia basal [Gomez-Ruiz 2011]. Respecto al perfil lipídico, se produce habitualmente un incremento de los valores de triglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol total y LDL colesterol además de un descenso en los valores de HDL colesterol. Por otra parte, estas variables pueden alterarse si los animales se encuentran en ayunas produciendo, por ejemplo, elevación de ácidos grasos libres en ratas alimentadas con una dieta control o disminución de triglicéridos plasmáticos en ratas obesas cuando están en ayunas [Palou 2010]. Debido a la complejidad de este metabolismo en animales de experimentación, las variables somatométricas suelen definir el modelo de obesidad de una forma más clara que las bioquímicas [Boque 2009, Lomba 2009].

1.3.2 Tipos de modelos animales de obesidad

El estudio de la obesidad requiere del desarrollo de modelos animales en los que reproducir las características de esta enfermedad [Panchal 2011, [Speakman 2007, 2008, Warden 2010]. Las principales ventajas del uso de animales de experimentación son el control de posibles factores de confusión ambientales, la homogeneidad de las poblaciones, la reducción temporal de los sistemas experimentales o los posibles dilemas éticos de algunos experimentos, entre otros [Baumans 2004, Speakman 2008, Thibault 2004]. Así, los modelos animales empleados en obesidad pueden clasificarse

como modelos genéticos y modelos inducidos por la dieta [Arias-Díaz 2007, Hariri 2010, Panchal 2011, Speakman 2007, West 1992].

1.3.2.1 Modelos animales de obesidad genética

El estudio de la obesidad dispone de una serie de modelos experimentales en los que se ha producido alguna alteración genética. Estos defectos genéticos pueden afectar a un único gen o pueden tener un origen poligénico. El origen monogénico de los modelos permite estudiar la implicación directa de alteraciones de ese gen, mientras que un modelo poligénico resulta muy útil para el estudio de la interacción de varios factores en la producción de obesidad [Martínez 1997]. Algunos ejemplos de estos modelos son:

- ✓ Ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO): cepa de ratones de Nueva Zelanda con obesidad poligénica caracterizada por un incremento temprano de adiposidad que promueve una posterior resistencia insulínica.
- ✓ Ratón KK: modelo murino con obesidad y diabetes de tipo 2 de origen poligénico pero reversibles mediante la restricción de la ingesta dietética.
- ✓ Ratón *db/db*: ratón diabético debido a una mutación puntual en el gen del receptor de la leptina que origina un fallo en la señalización de dicha adiposquina, lo que conlleva un incremento de peso, hiperinsulinemia y trigliceridemia, entre otras complicaciones.
- ✓ Ratón *ob/ob*: ratón obeso cuyo genotipo está caracterizado por una mutación en el gen de la leptina, que conduce a un fenotipo obeso aunque con menores complicaciones asociadas que los ratones *db/db*.
- ✓ Ratón Agouti: ratones con el trasposón *agouti* incluido en su genoma, cuyo nivel de expresión es proporcional a la coloración amarillenta de su pelaje debido a la activación de la hormona estimulante de melanocitos, así como a su grado de obesidad.

- ✓ Rata OLEFT (Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat): animal caracterizado por elevados niveles de glucemia, sobre todo en machos, así como por una hiperfagia crónica debida a una mutación en el gen de la colecistoquinina A, involucrado en la integración de las señales gastrointestinales de saciedad.
- ✓ Rata Zucker: modelo caracterizado por una mutación en el gen del receptor de la leptina y un fenotipo muy temprano de obesidad.

Por otra parte, la aplicación de técnicas de biología molecular ha favorecido un incremento de animales manipulados genéticamente para la reproducción de modelos de obesidad [Campion 2004]. Las modificaciones realizadas sobre el genoma pueden basarse en un incremento de la expresión génica, en la eliminación de un gen (*Knock-out*) o en su reemplazo por una forma alterada del mismo (*knock-in*). La técnica más empleada es la del diseño de ratones knock-out de genes claves en el desarrollo de obesidad como el receptor de la melanocortina 4 (Mc4r) [Srisai 2011], deacetilasas de histonas (HDAC3) [Sun 2011], lipocalina 2 [Law 2010] o el receptor de estrógenos (Esr1) [Ribas 2010].

1.3.2.2 Modelos animales de obesidad inducida por la dieta

Una de las variables básicas en la ecuación de la ganancia de peso es la ingesta energética [Marti 2004, Martinez 2000]. En este sentido, en la sociedad actual se impone un incremento en el consumo de dietas de alta palatabilidad y densidad energética caracterizadas por un incremento de la proporción de grasas y azúcares simples a costa de la disminución de hidratos de carbono complejos. Este tipo de dietas son las empleadas con animales de experimentación, normalmente ratas y ratones, ya que son animales omnívoros, de fácil manejo y con una fisiopatología de la obesidad similar a la del ser humano [Hariri 2010, Thibault 2004]. Por otra parte, no todos los roedores responden de la misma manera a un tratamiento dietético obesogénico [West 1992], por lo que se emplean aquéllos que previamente han demostrado una predisposición a la respuesta a la dieta con el desarrollo de un

fenotipo de obesidad; en ratas normalmente tipo Wistar y Spragey-Dawley, mientras que entre los ratones suelen emplearse C57BL/6J.

- Dietas ricas en grasa (HF, high-fat diets): este tipo de patrón alimentario puede variar su porcentaje de grasa desde un 30%, cuando puede considerarse una alimentación rica en grasas para experimentación animal, hasta el 85% para acelerar la ganancia de peso y potenciar un marcado fenotipo de obesidad [Hariri 2010]. Además, no sólo la cantidad, sino el tipo de grasas es importante para el desarrollo del fenotipo de obesidad, que se encuentra más acentuado con un elevado porcentaje de ácidos grasos saturados (SFA) que con altas proporciones de ácidos grasos poli insaturados (PUFA). Los animales sometidos a este tipo de tratamiento dietético presentan un modelo de obesidad caracterizado por un incremento de peso, principalmente debido al incremento de la masa grasa con alteraciones en el perfil lipídico, insulino resistencia, intolerancia a la glucosa e hiperleptinemia [Boque 2009, Buettner 2007, Lomba 2010, Prieto-Hontoria 2009].
- Dietas ricas en azúcares simples (HS, high-sugar diets): estos regímenes dietéticos están compuestos por un 40-70% de azúcares simples, principalmente sacarosa, disacárido hidrolizado en glucosa y fructosa. Este modelo está caracterizado por un incremento del tejido adiposo, una alteración del perfil lipídico y una elevación de los niveles de glucosa plasmática debido al desarrollo de hiperinsulinemia así como de un incremento de la presión arterial [Boque 2009, Conde 2012, Pagliassotti 1996].
- Dietas ricas en grasas y azúcares simples (HFS, high-fat-sugar diets): esta pauta alimentaria se basa en la ingesta de aproximadamente un 45% de lípidos como fuente energética y un 20% de azúcares simples. Este modelo dietético se caracteriza por un incremento de peso en forma principalmente de grasa, así como por un desequilibrio en la homeostasis de lípidos y glucosa y unos niveles elevados de insulina y leptina [Boque 2009, Hoane 2011, Kuo 2008, la Fleur 2011].

1.4 Comorbilidades de la obesidad

La obesidad está relacionada con un gran número de enfermedades cuyo origen se encuentra en el incremento de masa grasa, ya sea debido a un incremento en el tamaño adipocitario (diabetes *mellitus* tipo 2, hígado graso no alcohólico, enfermedades cardiovasculares, coleditiasis o cáncer) o a un incremento de la masa del tejido graso (estigma social, osteoartritis, apnea del sueño) [Bray 2004]. Por otra parte, la localización de la grasa corporal juega también un papel relevante en la manifestación de patologías asociadas, ya que una acumulación en la región abdominal favorece su infiltración en los tejidos adyacentes comprometiendo su funcionalidad e incrementando el riesgo cardiovascular.

Teniendo en cuenta que la obesidad desequilibra la homeostasis corporal, tanto en su compartimentación como en su metabolismo, las patologías asociadas son múltiples y afectan a la mayor parte de las funciones encargadas de mantener el adecuado funcionamiento de los distintos órganos y tejidos. Algunas de las patologías asociadas más frecuentes asociadas son:

- Alteraciones cardiovasculares y cerebrovasculares: hipertensión arterial e intracraneal, isquemias por infarto o ictus e insuficiencia cardíaca. En una situación de obesidad la masa corporal a la que irrigar está incrementada; existe una mayor vascularización y consecuentemente el volumen sanguíneo necesario será mayor, forzando una situación de elevación del gasto cardíaco y sobrecarga de trabajo al corazón. Además, la presión sanguínea necesaria está incrementada ejerciendo un mayor desgaste sobre el endotelio vascular [Forga 2002, Haslam 2005, Howard 2003, Lawrence 2004].
- Alteraciones respiratorias: síndrome de apnea obstructiva del sueño y síndrome de Pickwick. En individuos muy obesos se produce una disminución del calibre de las vías respiratorias y un descenso del volumen pulmonar debido a la presión que el exceso de grasa produce sobre el diafragma [Forga 2002, Haslam 2005, Lawrence 2004].

- Alteraciones articulares: el exceso de peso produce una sobrecarga sobre las articulaciones incrementando la incidencia de hernias y artrosis. Además, debido a la acumulación de cristales de ácido úrico en las articulaciones puede producirse gota [Forga L 2002, Haslam 2005].
- Alteraciones dermatológicas: acantosis nigricans, hiperqueratosis plantar y proliferación de hongos y parásitos colonizadores de pliegues cutáneos [Forga 2002, Lawrence 2004].
- Alteraciones renales: sobrecarga de la función renal por el incremento de la presión y volumen arterial [Forga 2002].
- Alteraciones de la homeostasis de la glucosa: las principales son la resistencia a la insulina y diabetes *mellitus* tipo II. El incremento de peso y grasa corporal produce de forma gradual un descenso en la sensibilidad insulínica tisular. Esta insulino-resistencia impide el mantenimiento de una concentración estable y adecuada de glucosa plasmática y su progresión está íntimamente ligada a la aparición de retinopatía, nefropatía y ulceraciones de las extremidades [Forga 2002, Haslam 2005, Lawrence 2004].
- Alteraciones de la homeostasis lipídica: hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia asociada a un incremento de las LDL y VLDL, así como a un descenso en los niveles de HDL colesterol. Estas alteraciones incrementan la probabilidad de formación de placas ateromatosas que, aumentan la rigidez de los vasos sanguíneos y pueden desprenderse originando un infarto o accidentes cerebrovasculares [Forga 2002, Haslam 2005, Howard 2003, Lawrence 2004].
- Alteraciones endocrinológicas: en mujeres se originan situaciones de ovario poliquístico, alteraciones menstruales e hirsutismo. En varones hay hipogonadismo por descenso de los niveles de testosterona e incremento de estrógenos [Forga 2002, Haslam 2005, Lawrence 2004].
- Alteraciones tumorales: la obesidad está asociada al incremento de la incidencia de algunos tipos de cáncer como el de hígado, mama, ovario, útero, colon, recto, próstata, etc. Por otra parte, además de por el incremento de la masa grasa también podrían estar asociados a los hábitos de vida que

conducen a una situación de obesidad [Forga 2002, Haslam 2005, Lawrence 2004].

- Alteraciones psicológicas: descenso de la autoestima acompañado de depresión y ansiedad debido al rechazo y marginación social suscitado por los individuos con alta tasa de obesidad [Forga 2002, Haslam 2005].
- Alteraciones hepáticas: la principal complicación asociada a obesidad es la esteatosis hepática no alcohólica por acumulación de triglicéridos en los hepatocitos. Puede evolucionar a fibrosis e incluso causar cirrosis hepática, estrechamente relacionada con hepatocarcinoma. Además, debido a la saturación biliar de colesterol por su elevada concentración, éste puede precipitar produciendo colelitiasis por formación de cálculos biliares [Forga 2002, Haslam 2005, Lawrence 2004].
- Otras alteraciones: inflamatorias, hematológicas, tiroideas, alimentarias, hernias, reflujo gastroesofágico... [Forga 2002, Haslam 2005, Lawrence 2004]

2. Hígado graso no alcohólico

2.1 Definición y prevalencia

El hígado graso no alcohólico (NAFLD) es un síndrome caracterizado por un incremento de la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos que afecta a su normal funcionalidad [Angulo 2002]. Esta enfermedad, si no es tratada adecuadamente, puede progresar a un estadio de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y, posteriormente, a cirrosis, una situación fisiopatológica de daño hepático irreversible que puede evolucionar hacia hepatocarcinoma o hacia muerte originada por fallo hepático [Ekstedt 2006, Valdecantos 2012](figura 5). Por otra parte, el NAFLD es un estadio reversible de daño en el hígado. Las estrategias actuales para su tratamiento se circunscriben a la eliminación de los factores de riesgo; reducción del peso corporal y control de la insulino resistencia asociada a NAFLD. Así, una pérdida de peso

controlada normalmente lo mejora, acompañándolo también de una normalización de los marcadores de síndrome metabólico [Elias 2010].

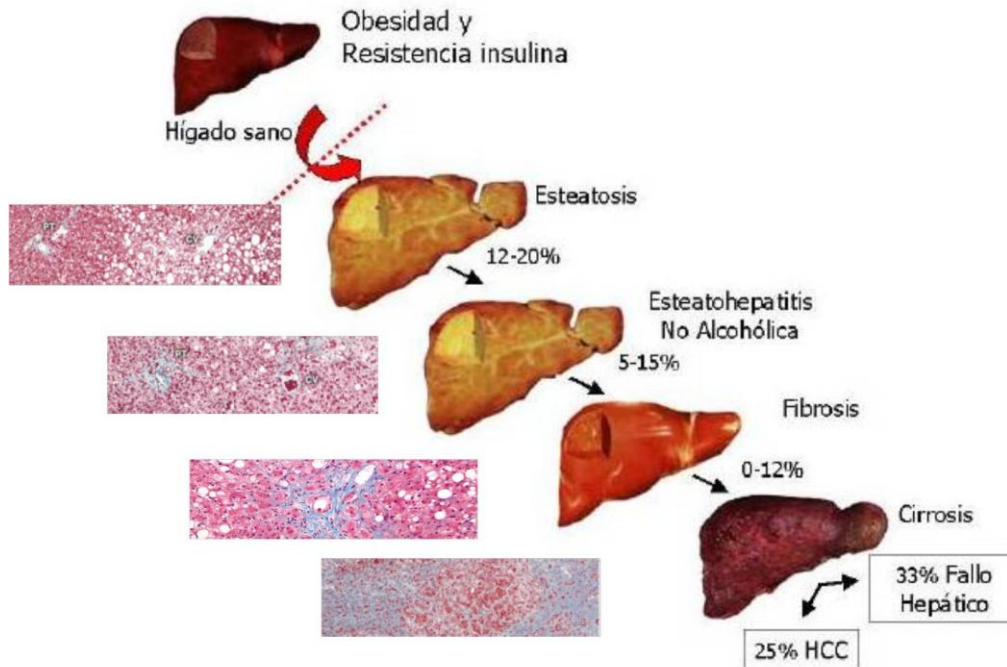


Figura 5. Progresión de NAFLD y daño hepático (tomada de Valdecantos 2012).

El NAFLD, primera manifestación hepática del síndrome metabólico, afecta al 30% de la población adulta en los países desarrollados y al 9% de niños y adolescentes [Musso 2011, Smith 2011]. La prevalencia de NAFLD es del 33% de los pacientes con síndrome metabólico y, de entre los pacientes con NAFLD, el 88% tienen también alguna otra manifestación de síndrome metabólico [Pacífico 2011]. Además, su incidencia en diabetes acompañada de obesidad es del 60-70% [Musso 2011]. Por otra parte, niveles plasmáticos de triglicéridos superiores a 200 mg/dL triplican el riesgo de padecer NAFLD y aquellos con HDL colesterol menor a 35 mg/dL lo duplican [Clark 2002]. Un estudio de Fabbrini y col. [Fabbrini 2009] comparó la influencia de la grasa infiltrada en el hígado con la grasa localizada en forma de tejido adiposo en las alteraciones relacionadas con obesidad, concluyendo que la grasa intrahepática está más asociada a estas complicaciones de la grasa visceral. Asimismo, además de un posible incremento anormal endógeno de la síntesis de lípidos asociada a alguna patología del

organismo, la principal fuente de lípidos potencialmente acumulables a nivel hepático es la dieta. Este es el principal motivo por el que tanto el fenotipo como las alteraciones bioquímicas características de la obesidad se encuentran también ampliamente descritas en pacientes con NAFLD [Bechmann 2012, Musso 2011].

2.2 Acumulación de grasa en el hígado y obesidad

La prevalencia de NAFLD está incrementando en paralelo a la pandemia de obesidad relacionándose con riesgo cardiovascular [Chen 2010, Edens 2009] y resistencia a la insulina [Koot 2011].

El hígado es el principal órgano regulador del metabolismo lipídico y de la glucosa, incluyendo entre sus rutas metabólicas principales procesos de lipogénesis, oxidación de ácidos grasos, glicogénesis y glicogenolisis [Bechmann 2012]. Situaciones de daño hepático producen alteraciones del estado transcripcional normal en este órgano que puede comprometer la subsiguiente conformación y funcionalidad de las proteínas encargadas del mantenimiento de su homeostasis favoreciendo la progresión de enfermedades crónicas, incluyendo aterosclerosis, diabetes y obesidad [Bechmann 2012, Lomba 2010, Milagro 2006].

Los ácidos grasos libres circulantes que llegan al hígado lo hacen, bien tras ser absorbidos a nivel intestinal o, bien como productos de lipólisis producida en el tejido adiposo [Nielsen 2004]. El incremento en la acumulación de estos ácidos grasos en el hepatocito puede tener por tanto un origen dietético o metabólico (figura 6). En este sentido, se ha estudiado en modelos animales que el incremento de la expresión de esteaoril CoA desaturasa (Scd), enzima transformadora de ácidos grasos libres saturados a monoinsaturados, promueve la aparición de esteatosis hepática e incremento de tejido adiposo [Bradbury 2004].

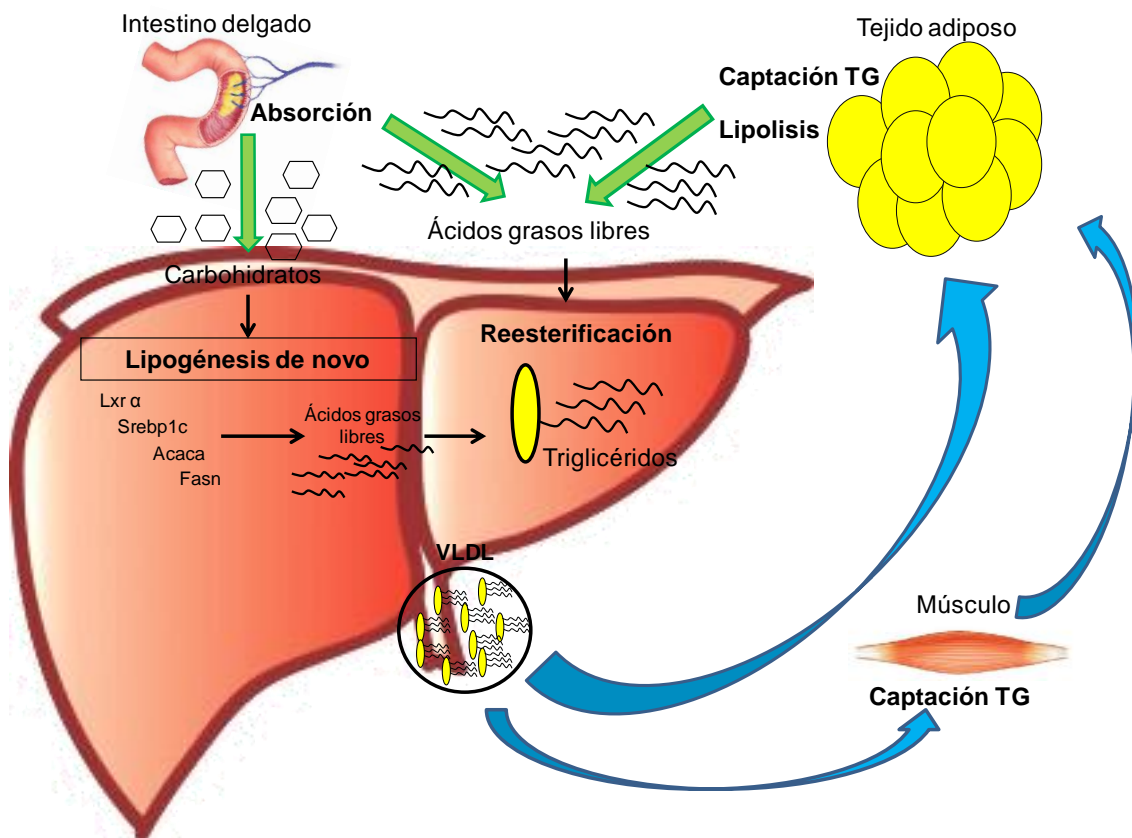


Figura 6. Movilización y síntesis de ácidos grasos y triglicéridos.

Por otra parte, la lipogénesis *de novo* se ha visto incrementada hasta cinco veces en pacientes con NAFLD [Donnelly 2005]. Este proceso bioquímico es el encargado de transformar en el hígado los carbohidratos provenientes de la dieta en ácidos grasos. Algunas de las enzimas implicadas en la cadena, como el receptor X alpha del hígado ($Lxr\alpha$), distintas enzimas de la familia de las proteínas reguladoras de unión a esteroides (Srebf), acetil-CoA carboxilasa (Acaca) o la ácido graso sintasa (Fasn) son estudiadas para el análisis de la regulación de la lipogénesis *de novo*. Los productos finales, ácidos grasos, son esterificados con una molécula de glicerol para formar triglicéridos, principal forma de acumulación de energía en mamíferos. Los triglicéridos no son almacenados en el hígado como fuente energética de forma natural, sino que se secretan como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para su distribución a los distintos tejidos; principalmente a los músculos y a tejido adiposo para su almacenamiento. En este sentido, una disminución de la síntesis de VLDL también

podría provocar la acumulación de triglicéridos hepáticos con la subsecuente manifestación de hígado graso no alcohólico, así como un descenso en la β -oxidación, principal proceso de catálisis lipídica para el consumo energético [Bechmann 2012, Kohjima 2007, Musso 2009].

Finalmente, se ha comprobado que la resistencia a la insulina es un factor asociado a la acumulación de lípidos en el hígado, incrementando la lipólisis en el tejido adiposo y por tanto el flujo de ácidos grasos libres que llega al hígado [Nielsen 2004].

2.3. Modelos animales de hígado graso y su evolución

2.3.1 Características de los modelos

Además de la herencia genética, hábitos de vida no saludables, la inactividad física, así como las dietas obesogénicas están relacionados con la acumulación de grasa en el hígado [Carmiel-Haggai 2005, Gaemers 2011, Moore 2010]. La utilización de modelos dietéticos animales de NAFLD y sus estadios de daño más avanzados incluyen alteraciones dietéticas basadas tanto en la administración de una dieta obesogénica [Deng 2005, Milagro 2006] como en el déficit nutricional de moléculas relacionadas con el ciclo metabólico de un carbono (OMC, del inglés *one carbon metabolic cycle*), asociado a la metilación del ADN [Corrales 2002]; tratamientos deficitarios de colina y metionina [Rinella 2008, Vetelainen 2007], o de vitamina B₁₂ y ácido fólico [Brunaud 2003] (figura 7). La carencia de estos sustratos pueden producir alteraciones en el patrón de metilación del ADN afectando con ello a la unión de factores de transcripción y subsecuentemente al perfil transcriptómico celular [Davis 2004, Waterland 2008].

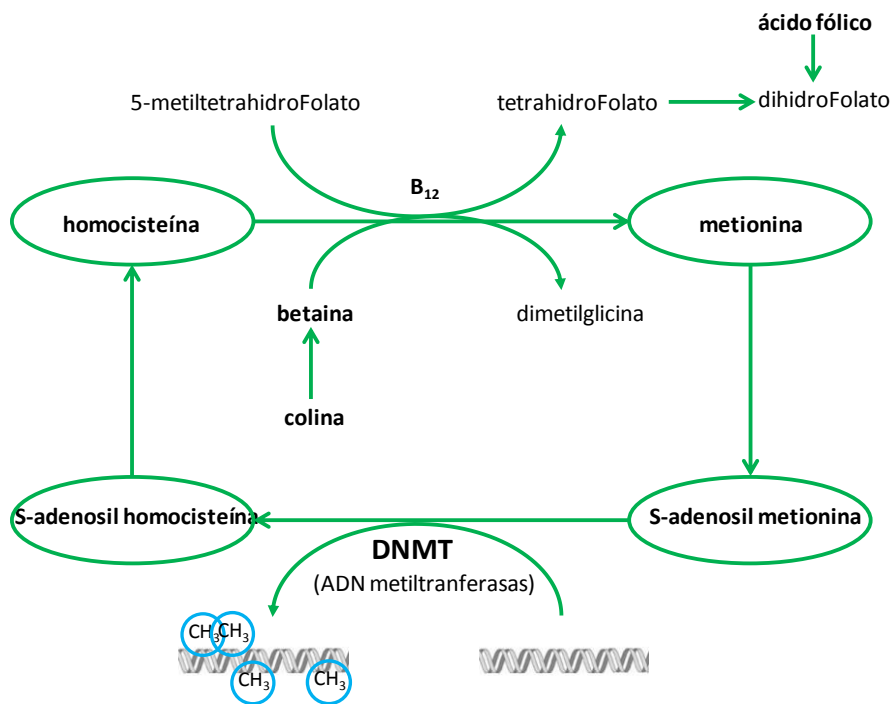


Figura 7. Esquema simplificado del papel de los agentes prometilantes en el ciclo de la metilación del ADN (modificado de Kotsopoulos J 2008).

2.3.2 Tipos de modelos

La evolución de la enfermedad hepática NAFLD puede variar desde un inicial estado de esteatosis por acumulación de pequeñas vacuolas lipídicas intrahepatocitarias, sin inflamación ni muerte celular hasta situaciones con grandes vacuolas lipídicas que desplazan el núcleo del hepatocito hacia su periferia, así como infiltración de macrófagos, inflamación, muerte hepatocitaria, fibrosis, cirrosis y fallo hepático o hepatocarcinoma. Por consiguiente, los modelos animales empleados para el estudio de esta amplia gama de gravedad de daño hepático dependerán del estadio de esta enfermedad que se desee estudiar [Henao-Mejia 2012, Moore 2010, Musso 2009].

2.3.2.1. Modelos animales de NAFLD inducida por una dieta obesogénica

El consumo de dietas con un alto contenido calórico es empleado para el establecimiento de ambas patologías debido al estrecho vínculo existente entre obesidad y acumulación de grasa en el hígado [Hebbard 2011, Nanji 2004]. Estas dietas

presentan un incremento del porcentaje de energía proveniente de las grasas frecuentemente acompañado de un elevado contenido en fructosa, ácidos grasos *trans* y colesterol, induciendo un estado de obesidad, resistencia a la insulina y daño hepático. Este tipo de modelos, según la especie animal y la duración del tratamiento, no suele acompañarse de un daño hepático demasiado grave, por lo que pueden estudiarse los primeros estadios de la acumulación de grasa en el hígado, más fácilmente reversibles que estadios más avanzados de daño hepático.

Algunos modelos, para facilitar y acelerar la progresión de esta enfermedad causada por la dieta, realizan una nutrición artificial mediante sondaje empleando emulsiones ricas en grasa y dextrosa que originan en ratones un estado fisiopatológico caracterizado por un aumento de grasa visceral, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, intolerancia a la glucosa, resistencia insulínica y desarrollo de esteatohepatitis [Deng 2005].

Debido a que una situación pro-aterogénica está más vinculada al desarrollo de hígado graso y su evolución, algunos modelos dietéticos animales emplean también una suplementación de colesterol y colatos a la dieta [Matsuzawa 2007] o un incremento de la proporción de ácidos grasos *trans* [Dhibi 2011].

Por otra parte, el empleo de una dieta rica en fructosa puede promover un incremento hepático de la lipogénesis *de novo*, además de aumentar la concentración de especies reactivas de oxígeno o la resistencia insulínica [Abdelmalek 2010, Lim 2010]. La suplementación del agua de bebida con fructosa produce en ratones un incremento de los triglicéridos hepáticos con un aumento de esteatosis, así como de peso, tras ocho semanas de tratamiento. Además, un incremento en la ingesta de fructosa produce una sobreproducción de la flora bacteriana intestinal, que sintetiza toxinas, que pasan a la sangre por la vena porta, que va al hígado produciendo una activación de los macrófagos hepáticos o células de Kupffer con inflamación hepática [Spruss 2009].

2.3.2.2 Modelos animales de NAFLD caracterizada por una dieta deficitaria

Una dieta deficitaria en metionina y colina, sustancias estimulantes de procesos de metilación en la célula, promueve la instauración y evolución de hígado graso no alcohólico [Hussein 2012, Pogribny 2009]. Por otra parte, además de su implicación en los procesos epigenéticos de metilación del ADN, ambos sustratos son esenciales en la beta-oxidación lipídica y en la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) [Rinella 2008], por lo que un déficit de estas sustancias disminuiría la oxidación favoreciendo la acumulación hepática de lípidos y originando un descenso plasmático de las VLDL.

Ciertos modelos animales de ratas y ratones deficitarios en metionina y colina presentan una pérdida de peso corporal acompañada de una disminución en la cantidad de grasa corporal y una proporcional disminución del tamaño del hígado acompañado de esteatosis y, a largo plazo, con el mantenimiento de este tratamiento, de necroinflamación [George 2003, Ip 2003, Rinella 2004 y 2008]. La severidad de estas manifestaciones dependerá de la predisposición de las distintas estirpes de roedores a padecer NAFLD.

Los ratones alimentados con dietas deficitarias en metionina y colina presentan un estado de inflamación hepática con un incremento de la infiltración de macrófagos en el hígado, así como una mayor expresión de genes proinflamatorios como interleuquinas y TNF alfa [Dela Pena 2005]. Por otra parte, aunque estos modelos se caracterizan por un estado de daño hepático, se produce un descenso en los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol que no es característico de una situación de obesidad [George 2003, Ip 2003, Rinella 2008]. Además, se puede producir un descenso de los niveles de insulina, glucosa y leptina, un mantenimiento de los niveles de adiponectina mientras que los tejidos periféricos mantienen una sensibilidad a la insulina normal [Larter 2008, Leclercq 2007]. La progresión en el tiempo de dietas deficitarias en grupos metilo (metionina y colina, entre otros) conduce a un estado de hepatocarcinogénesis [Kutay 2006, Rogers 1995]. En este sentido, cabe señalar que el cáncer es una enfermedad caracterizada por cambios en la metilación del ADN que

conlleven alteraciones transcriptómicas y de la funcionalidad celular y tisular global [Esteller 2008]. Así, se han descrito cambios en la metilación global del ADN con este tipo de dietas [Ghoshal 2006, Pogribny 2004, 2006 y 2009].

Por otra parte, también puede originarse este modelo de daño hepático mediante el déficit único de colina y la variación del contenido de la dieta de amino ácidos [Nakae 1995]. Este tipo de modelo dietético suele requerir de un tratamiento más prolongado y se caracteriza por una disminución de la betaoxidación lipídica manteniendo estable la sensibilidad periférica a la insulina y el peso corporal [Kodama 2009].

En conclusión, el déficit de metionina y/o colina pueden generar un modelo de daño hepático, pero con diferencias en los parámetros bioquímicos plasmáticos, así como en los niveles de hormonas cruciales en la regulación del apetito y de la obesidad, que dificulta su asimilación con el modelo humano de hígado graso no alcohólico, íntimamente ligado a obesidad, adiposidad abdominal, diabetes o resistencia a la insulina, hiperglucemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia... En este sentido, para favorecer la caracterización de un fenotipo de obesidad en modelos animales de esteatosis hepática, se ha planteado el uso combinado de dietas hipercalóricas con déficits en colina, metionina y ácido fólico [Pogribny 2009].

3. Orígenes del desarrollo de la salud y enfermedad

3.1 Definición

La hipótesis del Desarrollo Evolutivo de la Salud y las Enfermedades (DOHaD) plantea que la nutrición durante los primeros estadios de la vida afecta a la respuesta futura a estímulos ambientales (figura 8) determinando la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades en la vida adulta [Barker 2004, Martinez 2012, Tamashiro 2010]. Durante estas primeras etapas de la vida los diferentes tipos celulares que conforman los tejidos corporales están en continua división y por ello, su ADN se encuentra más

susceptible de sufrir cambios, estableciendo así una posible causa epigenética en las bases de esta teoría [Waterland 2004].

El crecimiento y desarrollo de la descendencia está principalmente influenciado por la carga genética heredada del padre y de la madre, aunque existen mecanismos regulatorios por los que el crecimiento determinado genéticamente puede alterarse por efectos ambientales maternos durante las primeras etapas de la vida [Barker 2004]. Este hecho adaptativo es también conocido como programación perinatal, mediante la cual se originan cambios sobre la fisiología o el metabolismo de la descendencia tanto en el momento como en etapas futuras [Langley-Evans 2010].

La teoría DOHaD se basó inicialmente en estudios epidemiológicos para, posteriormente, profundizar en el análisis de los mecanismos implicados mediante el uso de modelos animales experimentales [Gluckman 2008].

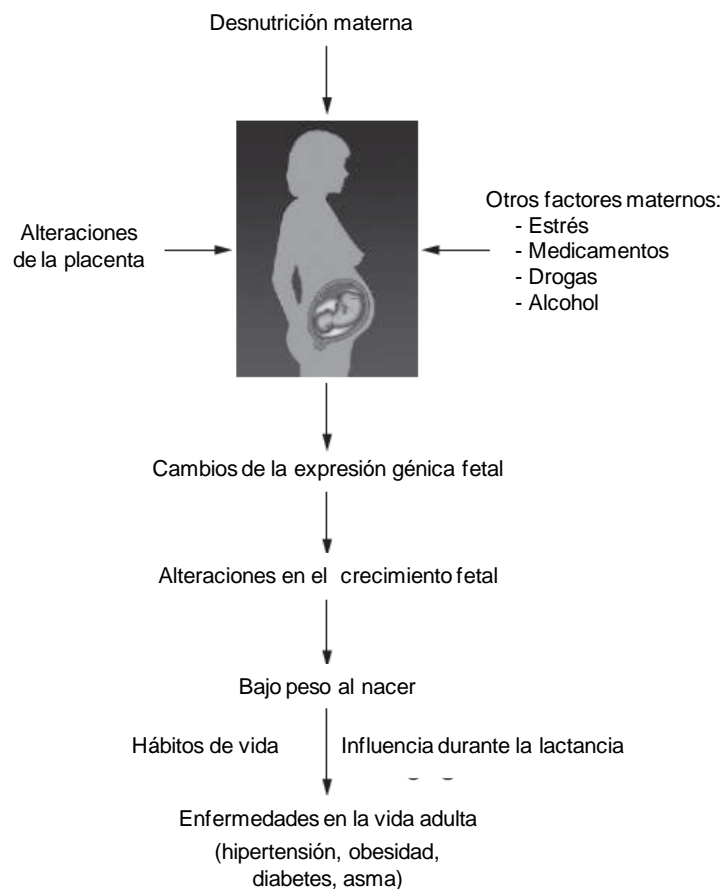


Figura 8. Influencia perinatal en el desarrollo de enfermedad en la vida adulta (modificado de Ozanne 2007).

3.2 Estudios epidemiológicos de DOHaD y obesidad

Durante el invierno de 1945, a finales de la Segunda Guerra Mundial, la zona norte de Holanda sufrió una fuerte hambruna. La descendencia de aquellas mujeres embarazadas durante aquel invierno presentó, en su edad adulta, una mayor prevalencia de obesidad, enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 [Painter 2005, Ravelli 1999, [Roseboom 2000 y 2006]. Este estudio epidemiológico fue uno de los primeros impulsores del estudio de la relación entre el ambiente materno y sus efectos sobre la descendencia en su vida adulta; DOHaD [Barker 2004].

Otros estudios epidemiológicos han descrito una relación entre los niveles de adiposidad y hemoglobina plasmática materna durante el embarazo con la presión sanguínea en la infancia [Campbell 1996] o que mujeres con dietas calóricamente restrictivas y deficitarias dan a luz a niños de menor peso [Wojtyla 2011] con mayores posibilidades de sufrir en edad adulta obesidad, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Además, la adiposidad materna y el incremento de peso durante el embarazo están relacionados con la adiposidad de la descendencia en su vida adulta [Reynolds 2011].

Por otra parte, una ingesta elevada de ácidos grasos libres durante el embarazo o durante la lactancia está asociada a un incremento de la prevalencia de asma en la descendencia [Lumia 2011 y 2012], mientras que la suplementación periconceptual de ácido fólico ayuda a la regulación del crecimiento y está asociada con los niveles de metilación del gen del factor de crecimiento similar a la insulina (Igf2) [Stegers-Theunissen 2009]. El establecimiento de esta unión entre ambiente perinatal y cambios epigenéticos en la descendencia podría ser empleado como un biomarcador temprano de enfermedad o de la predisposición a padecerla. Así, un reciente estudio de Godfrey y col. [Godfrey 2011] relacionó los niveles de metilación de los genes *Rxra* y *eNos* de recién nacidos con su riesgo a padecer obesidad. Otras investigaciones han establecido la relación entre los niveles de metilación del gen *LINE-1* en cordón umbilical con el peso al nacer y la neonatalidad, dos factores relacionados con el riesgo de padecer enfermedades en la edad adulta [Michels 2011]. De hecho, ha sido

previamente descrita una mayor incidencia de fallo cardíaco y alteraciones cardiovasculares en individuos con baja metilación de este gen [Baccarelli 2010].

Además de los factores nutricionales, también se han descrito factores ambientales de la madre que afectan a la progenie. Así, la descendencia de mujeres fumadoras durante el embarazo presenta una mayor tasa de obesidad, hipertensión y diabetes gestacional [Cupul-Uicab 2012, Power 2002] o que el estrés sufrido por los ataques terroristas en Nueva York del 11 de Septiembre provocó un menor peso de los niños al nacer [Ohlsson 2011].

Desde el punto de vista mecanístico, el efecto del ambiente de la madre sobre la descendencia podría ser debido a cambios epigenéticos provocados sobre el ADN en los primeros estadios de la vida [Cooper 2012, Khulan 2012], aunque su estudio en modelos humanos resulta complicado y por ello ha sido necesario el desarrollo de modelos experimentales animales.

3.3. Modelos animales de DOHaD y obesidad

Tras los primeros estudios epidemiológicos de la teoría DOHaD, la mayor parte de las investigaciones realizadas para profundizar en los mecanismos implicados se realizan hoy en día en modelos animales (tabla 2). La principal ventaja de estos modelos experimentales reside en la corta duración del ciclo biológico de ratas y ratones, que hace posible el estudio de los efectos sobre la descendencia en edad adulta e incluso a lo largo de varias generaciones [Giraudó 2010]. Además, los dilemas éticos sobre las implicaciones en la salud del feto no permiten la realización este tipo de estudios en humanos.

Pese a que estímulos maternos distintos a los alimentarios como el estrés [Paternain 2012a y 2012b] o el tabaquismo [Oliveira 2009, Somm 2008] pueden afectar al desarrollo de obesidad en la descendencia, en este apartado nos centraremos en la descripción de aquéllos vinculados a la alimentación materna perinatal (tabla 2). En

este sentido, se ha descrito que una dieta con un elevado porcentaje de lípidos administrada a ratones durante la gestación produce un incremento en la descendencia de la longitud corporal, así como un descenso de la sensibilidad a la insulina, mediados por un incremento de la expresión de *Igfbp3* y *Ghsr*, que presentaron cambios en la metilación de su promotor transmitidos a la siguiente generación [Dunn 2009].

Tabla 2. Algunos ejemplos de modelos nutricionales de dietas perinatales que pueden afectar al desarrollo de obesidad en la descendencia.

Modelo	Estadio	Intervención nutricional	Efecto/Mecanismo en la descendencia	Referencia
Ratón	Gestación	Hiperlipídica	↑ longitud e insulinoresistencia ↑ mRNA <i>Igfbp3</i> , <i>Ghsr</i> Cambios de metilación de <i>Ghsr</i>	Dunn 2009
Ratón	Gestación y lactancia	Hiperlipídica	Hipertensión, hiperlipidemia y esteatosis	Elahi 2009
Rata	Gestación y lactancia	Hiperlipídica	Síndrome metabólico	Khan 2005
Rata	Gestación	Hiperlipídica	↑ metilación total ↑ metilación específica <i>Dat</i> , <i>Mor</i> y <i>Penk</i>	Vucetic 2010
Rata	Lactancia	Hiperlipídica + Azúcares simples	Programación del apetito, ↑ dopamina	Wright 2011
Rata	Lactancia	Suplementación de leptina	Protección a obesidad Cambios expresión en <i>Lepr</i> , <i>Pomc</i> y <i>Npy</i>	Pico 2007
Rata	Lactancia	Sobrealimentación	↑ metilación <i>Pomc</i>	Plagemann 2009
Rata	Lactancia	Hipoproteica	↓ metilación ↑ mRNA de <i>PPARα</i> y <i>GR</i>	Burdge 2007
Rata	Gestación	Hipoproteica	↓ metilación <i>Gr</i> , ↑ expresión <i>Dnmt1</i>	Lillycrop 2007
Ratón	Gestación	Hipoproteica	↑ metilación ↓ mRNA <i>Lxra</i>	Van Straten 2009
Ratón <i>agouti</i>	Gestación	Suplementación con colina, metionina, vitamina B12 y ácido fólico	Obesidad inducida por inhibición epigenética del gen <i>agouti</i>	Waterland 2006, 2008
Rata	Gestación	Variación de colina	Cambios de metilación de <i>Igf2</i> asociados a cambios de expresión de <i>Dnmt1</i>	Kovacheva 2009
Rata	Gestación	Variación de ácido fólico y proteínas	Cambios de expresión <i>Ppar</i> y <i>Lxra</i>	Chmurzynska 2011
Rata	Gestación	Hipoproteica y déficit de ácido fólico	↓ metilación ↑ mRNA de <i>PPARα</i>	Lillycrop 2005
Rata	Gestación	Déficit de colina, metionina y ácido fólico	↑ oxidación lipídica	McNeil 2009

Cuando la “ventana” de administración de la dieta hiperlipídica en ratones se amplia a la gestación y la lactancia, la descendencia incrementa su predisposición a padecer síndrome metabólico [Elahi 2009, Khan 2005]. Además se produce una hipometilación del ADN hipotalámico, así como de la metilación específica de promotores de genes

relacionados con el control de la dopamina y sustancias opioides [Vucetic 2010]. Esta programación perinatal del comportamiento alimentario ha sido estudiada en ratas sometidas a una dieta obesogénica durante la lactancia, cuyos niveles de dopamina se incrementaron [Wright 2011]. También se ha descrito que la suplementación con leptina durante la lactancia estimula la expresión hipotalámica de *Lepr*, *Pomc* y *Npy* en la descendencia [Pico 2007] y que una sobrealimentación en la lactancia se asocia a hipermetilación del promotor de *Pomc* en la prole [Plagemann 2009].

Otro tipo de modelos nutricionales de DOHaD basados en la composición de macronutrientes de la dieta materna son aquéllos que disminuyen el aporte proteico. Su administración en ratas durante la gestación y la lactancia disminuye la metilación hepática de los promotores de los genes *Ppar α* y *Gr*, mientras que tiende a incrementar su expresión, lo cual se asocia a un descenso de mRNA de *Dnmt1* y se mantiene en la siguiente generación [Burdge 2007, Lillycrop 2007]. En ratones se ha descrito también que la ingesta hipoproteica en la gestación produce un incremento de la metilación hepática del promotor del gen *Lxr α* asociado a su menor expresión génica [van Straten 2009].

Waterland y col. [Waterland 2006 y 2008] emplearon un modelo con ratones *Agouti*, genéticamente obesos por la inserción del trasposón para el gen *agouti*, al que se suplementó durante la gestación con un cóctel de sustancias prometilantes (metionina, colina, ácido fólico y vitamina B₁₂). La administración de estas sustancias inhibió la transcripción del gen *agouti* mediante su hipermetilación, alterando el color de su pelaje y la manifestación de un fenotipo obeso en su descendencia. Algunas de estas moléculas con capacidad de activar la metilación del ADN han sido estudiadas en ratas gestantes describiendo cambios de la metilación del promotor del gen *Igf2* asociados a un incremento de la expresión de *Dnmt1* [Kovacheva 2007].

Finalmente, la combinación de dietas perinatales hipoproteicas con un déficit o una suplementación de sustancias prometilantes produce alteraciones relacionadas con obesidad en la descendencia en relación a genes asociados a la homeostasis lipídica y de la glucosa [Chmurzynska 2011, Lillycrop 2005, McNeil 2009].

Bibliografía

- [1] Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;51:1961-1971.
- [2] Aller EE, Abete I, Astrup A, Martinez JA, van Baak MA. Starches, sugars and obesity. *Nutrients* 2011;3:341-369.
- [3] Anderson LH, Martinson BC, Crain AL, Pronk NP, Whitebird RR, O'Connor PJ et al. Health care charges associated with physical inactivity, overweight, and obesity. *Prev Chronic Dis* 2005;2:A09.
- [4] Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-1231.
- [5] Aranceta J, Perez-Rodrigo C, Serra-Majem L, Bellido D, de la Torre ML, Formiguera X et al. Prevention of overweight and obesity: a Spanish approach. *Public Health Nutr* 2007;10:1187-1193.
- [6] Arias-Diaz J, Balibrea J. [Animal models in glucose intolerance and type-2 diabetes]. *Nutr Hosp* 2007;22:160-168.
- [7] Baccarelli A, Rienstra M, Benjamin EJ. Cardiovascular epigenetics: basic concepts and results from animal and human studies. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3:567-573.
- [8] Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* 2004;23:588S-595S.
- [9] Barreira TV, Staiano AE, Harrington DM, Heymsfield SB, Smith SR, Bouchard C et al. Anthropometric correlates of total body fat, abdominal adiposity, and cardiovascular disease risk factors in a biracial sample of men and women. *Mayo Clin Proc* 2012;87:452-460.
- [10] Baumans V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Ther* 2004;11 Suppl 1:S64-66.

- [11] Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol* 2012;56:952-964.
- [12] Bjorntorp P. Neuroendocrine factors in obesity. *J Endocrinol* 1997;155:193-195.
- [13] Boque N, Campion J, Paternain L, Garcia-Diaz DF, Galarraga M, Portillo MP et al. Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. *J Physiol Biochem* 2009;65:387-395.
- [14] Bouchard C, Ordovas JM. Fundamentals of nutrigenetics and nutrigenomics. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012;108:1-15.
- [15] Bradbury MW, Berk PD. Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clin Liver Dis* 2004;8:639-671, xi.
- [16] Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2583-2589.
- [17] Brunaud L, Alberto JM, Ayav A, Gerard P, Namour F, Antunes L et al. Effects of vitamin B₁₂ and folate deficiencies on DNA methylation and carcinogenesis in rat liver. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1012-1019.
- [18] Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15:798-808.
- [19] Burdge GC, Lillycrop KA, Phillips ES, Slater-Jefferies JL, Jackson AA, Hanson MA. Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition. *J Nutr* 2009;139:1054-1060.
- [20] Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2007;97:435-439.

- [21] Campbell DM, Hall MH, Barker DJ, Cross J, Shiell AW, Godfrey KM. Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:273-280.
- [22] Campi3n J, Milagro FI, Goyenechea E, Mart3nez JA. TNF-alpha promoter methylation as a predictive biomarker for weight-loss response. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:1293-7.
- [23] Campion J, Milagro F, Martinez JA. Epigenetics and obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010;94:291-347.
- [24] Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Genetic manipulation in nutrition, metabolism, and obesity research. *Nutr Rev* 2004;62:321-330.
- [25] Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 2009;10:383-392.
- [26] Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *Faseb J* 2005;19:136-138.
- [27] Chen CH, Nien CK, Yang CC, Yeh YH. Association between nonalcoholic fatty liver disease and coronary artery calcification. *Dig Dis Sci* 2010;55:1752-1760.
- [28] Chmurzynska A, Stachowiak M, Gawecki J, Pruszyńska-Oszmalek E, Tubacka M. Protein and folic acid content in the maternal diet determine lipid metabolism and response to high-fat feeding in rat progeny in an age-dependent manner. *Genes Nutr* 2011;doi: 10.1007/s12263-12011-10253-12267.
- [29] Cioffi F, Lanni A, Goglia F. Thyroid hormones, mitochondrial bioenergetics and lipid handling. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17:402-407.
- [30] Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;122:1649-1657.
- [31] Colditz GA. Economic costs of obesity and inactivity. *Med Sci Sports Exerc* 1999;31:S663-667.

[32] Conde SV, Nunes da Silva T, Gonzalez C, Mota Carmo M, Monteiro EC, Guarino MP. Chronic caffeine intake decreases circulating catecholamines and prevents diet-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Br J Nutr* 2012;107:86-95.

[33] Cooper WN, Khulan B, Owens S, Elks CE, Seidel V, Prentice AM et al. DNA methylation profiling at imprinted loci after periconceptual micronutrient supplementation in humans: results of a pilot randomized controlled trial. *Faseb J* 2012;26:1782-1790.

[34] Cordero P, Campion J, Milagro FI, Goyenechea E, Steemburgo T, Javierre BM, Martinez JA. Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem* 2011;67:463-70.

[35] Cordero P, Milagro F, Campion J, Martinez JA. [Nutritional epigenetic: a key piece in the puzzle of obesity]. *Rev Esp Obes* 2010;8:10-20.

[36] Corrales FJ, Perez-Mato I, Sanchez Del Pino MM, Ruiz F, Castro C, Garcia-Trevijano ER et al. Regulation of mammalian liver methionine adenosyltransferase. *J Nutr* 2002;132:2377S-2381S.

[37] Cupul-Uicab LA, Skjaerven R, Haug K, Melve KK, Engel SM, Longnecker MP. In utero exposure to maternal tobacco smoke and subsequent obesity, hypertension, and gestational diabetes among women in the MoBa cohort. *Environ Health Perspect* 2012;120:355-360.

[38] Davis CD, Uthus EO. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;229:988-995.

[39] Dela Pena A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology* 2005;129:1663-1674.

[40] den Hoed M, Westerterp-Plantenga MS, Bouwman FG, Mariman EC, Westerterp KR. Postprandial responses in hunger and satiety are associated with the rs9939609 single nucleotide polymorphism in FTO. *Am J Clin Nutr* 2009;90:1426-1432.

- [41] Deng QG, She H, Cheng JH, French SW, Koop DR, Xiong S et al. Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology* 2005;42:905-914.
- [42] Dhibi M, Brahmi F, Mnari A, Houas Z, Chargui I, Bchir L et al. The intake of high fat diet with different trans fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *Nutr Metab (Lond)* 2011;8:65.
- [43] DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R. Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed *ad libitum*. *Am J Physiol* 1998;274:R1460-1467.
- [44] Dolinoy DC, Jirtle RL. Environmental epigenomics in human health and disease. *Environ Mol Mutagen* 2008;49:4-8.
- [45] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343-1351.
- [46] Dubnov-Raz G, Berry EM. The dietary treatment of obesity. *Med Clin North Am* 2011;95:939-952.
- [47] Dunn GA, Bale TL. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. *Endocrinology* 2009;150:4999-5009.
- [48] Edens MA, Kuipers F, Stolk RP. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with cardiovascular disease risk markers. *Obes Rev* 2009;10:412-419.
- [49] Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865-873.
- [50] Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK, Hanson MA. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *Br J Nutr* 2009;102:514-519.

- [51] Elias MC, Parise ER, de Carvalho L, Szejnfeld D, Netto JP. Effect of 6-month nutritional intervention on non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition* 2010;26:1094-1099.
- [52] England Toi. *Health Educ Res* 2001;6:399-400.
- [53] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148-1159.
- [54] Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15430-15435.
- [55] Forga L, Petrina E, Barberia J. Complicaciones de la obesidad. *An Sist Sanit Navar* 2002;25:117-126.
- [56] Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10604-10609.
- [57] Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008;266:6-11.
- [58] Franks PW, Hanson RL, Knowler WC, Sievers ML, Bennett PH, Looker HC. Childhood obesity, other cardiovascular risk factors, and premature death. *N Engl J Med* 2010;362:485-493.
- [59] Fruhbeck G, Sopena M, Martinez JA, Salvador J. [Nutrition, energy balance, and obesity]. *Rev Med Univ Navarra* 1997;41:185-192.
- [60] Fry J, Finley W. The prevalence and costs of obesity in the EU. *Proc Nutr Soc* 2005;64:359-362.
- [61] Gaemers IC, Stallen JM, Kunne C, Wallner C, van Werven J, Nederveen A et al. Lipotoxicity and steatohepatitis in an overfed mouse model for non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:447-458.
- [62] Garber AK, Lustig RH. Is fast food addictive? *Curr Drug Abuse Rev* 2011;4:146-162.

- [63] Gargallo M, Basulto J, Breton I, Quiles J, Formiguera X, Salas-Salvadó J. Recomendaciones nutricionales basadas en la evidencia para la prevención y el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en adultos (Consenso FESNAD-SEEDO). *Rev Esp Obes* 2011;9:1-78.
- [64] George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun Hou J, Farrell G. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J Hepatol* 2003;39:756-764.
- [65] Ghoshal K, Li X, Datta J, Bai S, Pogribny I, Pogribny M et al. A folate- and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. *J Nutr* 2006;136:1522-1527.
- [66] Giraud SQ, Della-Fera MA, Proctor L, Wickwire K, Ambati S, Baile CA. Maternal high fat feeding and gestational dietary restriction: effects on offspring body weight, food intake and hypothalamic gene expression over three generations in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2010;97:121-129.
- [67] Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* 2008;359:61-73.
- [68] Godfrey KM, Sheppard A, Gluckman PD, Lillycrop KA, Burdge GC, McLean C et al. Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. *Diabetes* 2011;60:1528-1534.
- [69] Gomez-Ruiz A, Milagro FI, Campion J, Martinez JA, de Miguel C. High-fat diet feeding alters metabolic response to fasting/non fasting conditions. Effect on caveolin expression and insulin signalling. *Lipids Health Dis* 2011;10:55.
- [70] Goyenechea E, Collins LJ, Parra D, Abete I, Crujeiras AB, O'Dell SD et al. The -11391 G/A polymorphism of the adiponectin gene promoter is associated with metabolic syndrome traits and the outcome of an energy-restricted diet in obese subjects. *Horm Metab Res* 2009;41:55-61.

- [71] Goyenechea E, Collins LJ, Parra D, Liu G, Snieder H, Swaminathan R et al. CD36 gene promoter polymorphisms are associated with low density lipoprotein-cholesterol in normal twins and after a low-calorie diet in obese subjects. *Twin Res Hum Genet* 2008;11:621-628.
- [72] Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001;60:5-20.
- [73] Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 2010;23:270-299.
- [74] Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005;366:1197-1209.
- [75] Hebbard L, George J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:35-44.
- [76] Heno-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 2012;482:179-185.
- [77] Hills AP, Andersen LB, Byrne NM. Physical activity and obesity in children. *Br J Sports Med* 2011;45:866-870.
- [78] Hoane MR, Swan AA, Heck SE. The effects of a high-fat sucrose diet on functional outcome following cortical contusion injury in the rat. *Behav Brain Res* 2011;223:119-124.
- [79] Howard BV, Ruotolo G, Robbins DC. Obesity and dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003;32:855-867.
- [80] Hussein O, Zidan J, Abu Jabal K, Shams I, Szvalb S, Grozovski M et al. Paraoxonase activity and expression is modulated by therapeutics in experimental rat nonalcoholic Fatty liver disease. *Int J Hepatol* 2012;2012:265305.
- [81] Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003;38:123-132.

[82] Jiang MH, Fei J, Lan MS, Lu ZP, Liu M, Fan WW et al. Hypermethylation of hepatic Gck promoter in ageing rats contributes to diabetogenic potential. *Diabetologia* 2008;51:1525-1533.

[83] Jones PA, Martienssen R. A blueprint for a Human Epigenome Project: the AACR Human Epigenome Workshop. *Cancer Res* 2005;65:11241-11246.

[84] Junien C, Nathanielsz P. Report on the IASO Stock Conference 2006: early and lifelong environmental epigenomic programming of metabolic syndrome, obesity and type II diabetes. *Obes Rev* 2007;8:487-502.

[85] Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R127-133.

[86] Khulan B, Cooper WN, Skinner BM, Bauer J, Owens S, Prentice AM et al. Periconceptual maternal micronutrient supplementation is associated with widespread gender related changes in the epigenome: a study of a unique resource in the Gambia. *Hum Mol Genet* 2012;21:2086-2101.

[87] Kodama Y, Kisseleva T, Iwaisako K, Miura K, Taura K, De Minicis S et al. c-Jun N-terminal kinase-1 from hematopoietic cells mediates progression from hepatic steatosis to steatohepatitis and fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2009;137:1467-1477 e1465.

[88] Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2007;20:351-358.

[89] Koot BG, van der Baan-Slootweg OH, Tamminga-Smeulders CL, Rijcken TH, Korevaar JC, van Aalderen WM et al. Lifestyle intervention for non-alcoholic fatty liver disease: prospective cohort study of its efficacy and factors related to improvement. *Arch Dis Child* 2011;96:669-674.

[90] Kovacheva VP, Mellott TJ, Davison JM, Wagner N, Lopez-Coviella I, Schnitzler AC et al. Gestational choline deficiency causes global and Igf2 gene DNA hypermethylation by up-regulation of Dnmt1 expression. *J Biol Chem* 2007;282:31777-31788.

[91] Kuo LE, Czarnecka M, Kitlinska JB, Tilan JU, Kvetnansky R, Zukowska Z. Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1148:232-237.

[92] Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem* 2006;99:671-678.

[93] la Fleur SE, Luijendijk MC, van Rozen AJ, Kalsbeek A, Adan RA. A free-choice high-fat high-sugar diet induces glucose intolerance and insulin unresponsiveness to a glucose load not explained by obesity. *Int J Obes (Lond)* 2011;35:595-604.

[94] Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract* 2010;19:87-98.

[95] Larsen LH, Angquist L, Vimalaswaran KS, Hager J, Viguerie N, Loos RJ et al. Analyses of single nucleotide polymorphisms in selected nutrient-sensitive genes in weight-regain prevention: the DIOGENES study. *Am J Clin Nutr* 2012;95:1254-1260.

[96] Larter CZ, Yeh MM, Williams J, Bell-Anderson KS, Farrell GC. MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. *J Hepatol* 2008;49:407-416.

[97] Law C, Power C, Graham H, Merrick D. Obesity and health inequalities. *Obes Rev* 2007;8 Suppl 1:19-22.

[98] Law IK, Xu A, Lam KS, Berger T, Mak TW, Vanhoutte PM et al. Lipocalin-2 deficiency attenuates insulin resistance associated with aging and obesity. *Diabetes* 2010;59:872-882.

[99] Lawrence VJ, Kopelman PG. Medical consequences of obesity. *Clin Dermatol* 2004;22:296-302.

[100] Leclercq IA, Lebrun VA, Starkel P, Horsmans YJ. Intrahepatic insulin resistance in a murine model of steatohepatitis: effect of PPARgamma agonist pioglitazone. *Lab Invest* 2007;87:56-65.

[101] Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 2005;135:1382-1386.

[102] Lillycrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, Godfrey KM, Jackson AA, Burdge GC. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *Br J Nutr* 2007;97:1064-1073.

[103] Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:251-264.

[104] Lindgren CM, Heid IM, Randall JC, Lamina C, Steinthorsdottir V, Qi L et al. Genome-wide association scan meta-analysis identifies three Loci influencing adiposity and fat distribution. *PLoS Genet* 2009;5:e1000508.

[105] Lomba A, Martinez JA, Garcia-Diaz DF, Paternain L, Marti A, Campion J et al. Weight gain induced by an isocaloric pair-fed high fat diet: a nutriepigenetic study on FASN and NDUF6 gene promoters. *Mol Genet Metab* 2010;101:273-278.

[106] Lomba A, Milagro FI, Garcia-Diaz DF, Campion J, Marzo F, Martinez JA. A high-sucrose isocaloric pair-fed model induces obesity and impairs NDUF6 gene function in rat adipose tissue. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2009;2:267-272.

- [107] Lomba A, Milagro FI, Garcia-Diaz DF, Marti A, Campion J, Martinez JA. Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis. *Lipids Health Dis* 2010;9:60.
- [108] Lourenco S, Oliveira A, Lopes C. The effect of current and lifetime alcohol consumption on overall and central obesity. *Eur J Clin Nutr* 2011.
- [109] Lumia M, Luukkainen P, Kaila M, Tapanainen H, Takkinen HM, Prasad M et al. Maternal dietary fat and fatty acid intake during lactation and the risk of asthma in the offspring. *Acta Paediatr* 2012.
- [110] Lumia M, Luukkainen P, Tapanainen H, Kaila M, Erkkola M, Uusitalo L et al. Dietary fatty acid composition during pregnancy and the risk of asthma in the offspring. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22:827-835.
- [111] Marti A, Berraondo B, Martinez JA. Leptin: physiological actions. *J Physiol Biochem* 1999;55:43-49.
- [112] Marti A, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA. Interaction between genes and lifestyle factors on obesity. *Proc Nutr Soc* 2008;67:1-8.
- [113] Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Hebebrand J, Martinez JA. Genes, lifestyles and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28 Suppl 3:S29-36.
- [114] Martinez JA. Body-weight regulation: causes of obesity. *Proc Nutr Soc* 2000;59:337-345.
- [115] Martinez JA, Bjorntorp P, Blackburn GL, Fruhbeck G, Martinez MA, Salas-Salvadó J et al. *Nutrición, metabolismo y obesidad: avances y nuevas perspectivas*; 1997.
- [116] Martinez JA, Cordero P, Campion J, Milagro FI. Interplay of early-life nutritional programming on obesity, inflammation and epigenetic outcomes. *Proc Nutr Soc* 2012;1-8.

[117] Martinez JA, Parra MD, Santos JL, Moreno-Aliaga MJ, Marti A, Martinez-Gonzalez MA. Genotype-dependent response to energy-restricted diets in obese subjects: towards personalized nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17 Suppl 1:119-122.

[118] Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H et al. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 2007;46:1392-1403.

[119] McAllister EJ, Dhurandhar NV, Keith SW, Aronne LJ, Barger J, Baskin M et al. Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009;49:868-913.

[120] McNeil CJ, Hay SM, Rucklidge GJ, Reid MD, Duncan GJ, Rees WD. Maternal diets deficient in folic acid and related methyl donors modify mechanisms associated with lipid metabolism in the fetal liver of the rat. *Br J Nutr* 2009;102:1445-1452.

[121] Michels KB, Harris HR, Barault L. Birthweight, maternal weight trajectories and global DNA methylation of LINE-1 repetitive elements. *PLoS One* 2011;6:e25254.

[122] Milagro FI, Campi3n J, Cordero P, Goyenechea E, G3mez-Uriz AM, Abete I, Zulet MA, Mart3nez JA. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *FASEB J* 2011;25:1378-89.

[123] Milagro FI, Campi3n J, Garc3a-D3az DF, Goyenechea E, Paternain L, Mart3nez JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 2009;65:1-9.

[124] Milagro FI, Campion J, Martinez JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:1118-1123.

[125] Milagro FI, Mansego ML, De Miguel C, Martinez JA. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: Progresses and perspectives. *Mol Aspects Med* 2012.

[126] Moore JB. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc* 2010;69:211-220.

[127] Moreno MJ, Martinez JA. [Adipose tissue: a storage and secretory organ]. *An Sist Sanit Navar* 2002;25 Suppl 1:29-39.

[128] Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005;14 Spec No 1:R47-58.

[129] Musso G, Cassader M, Gambino R. Cholesterol-lowering therapy for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: an update. *Curr Opin Lipidol* 2011;22:489-496.

[130] Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 2009;48:1-26.

[131] Nafee TM, Farrell WE, Carroll WD, Fryer AA, Ismail KM. Epigenetic control of fetal gene expression. *Bjog* 2008;115:158-168.

[132] Nakae D, Mizumoto Y, Andoh N, Tamura K, Horiguchi K, Endoh T et al. Comparative changes in the liver of female Fischer-344 rats after short-term feeding of a semipurified or a semisynthetic L-amino acid-defined choline-deficient diet. *Toxicol Pathol* 1995;23:583-590.

[133] Nanji AA. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2004;8:559-574, ix.

[134] Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 2004;113:1582-1588.

[135] Nixon JP, Zhang M, Wang C, Kuskowski MA, Novak CM, Levine JA et al. Evaluation of a quantitative magnetic resonance imaging system for whole body composition analysis in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:1652-1659.

[136] Ochoa MC, Azcona C, Biebermann H, Brumm H, Razquin C, Wermter AK et al. A novel mutation Thr162Arg of the melanocortin 4 receptor gene in a Spanish children and adolescent population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:652-658.

[137] Ohlsson A, Shah PS. Effects of the September 11, 2001 disaster on pregnancy outcomes: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2011;90:6-18.

[138] Oliveira E, Moura EG, Santos-Silva AP, Fagundes AT, Rios AS, Abreu-Villaca Y et al. Short- and long-term effects of maternal nicotine exposure during lactation on body adiposity, lipid profile, and thyroid function of rat offspring. *J Endocrinol* 2009;202:397-405.

[139] Oswal A, Yeo G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:221-229.

[140] Ozanne SE, Constancia M. Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3:539-546.

[141] Pacifico L, Nobili V, Anania C, Verdecchia P, Chiesa C. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome and cardiovascular risk. *World J Gastroenterol* 2011;17:3082-3091.

[142] Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA, Pan DA. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am J Physiol* 1996;271:R1319-1326.

[143] Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol* 2005;20:345-352.

[144] Palou M, Priego T, Sanchez J, Torrens JM, Palou A, Pico C. Moderate caloric restriction in lactating rats protects offspring against obesity and insulin resistance in later life. *Endocrinology* 2010;151:1030-1041.

[145] Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:351982.

[146] Paternain L, De la Garza A, Batlle M, Milagro F, Martinez J, Campion J. Prenatal stress increases the obesogenic effects of a high-fat-sucrose diet in adult rats in a sex-specific manner. *Stress* 2012.

[147] Paternain L, Martisova E, Milagro FI, Ramirez MJ, Martinez JA, Campion J. Postnatal maternal separation modifies the response to an obesogenic diet in adulthood in rats. *Dis Model Mech* 2012.

[148] Pico C, Oliver P, Sanchez J, Miralles O, Caimari A, Priego T et al. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int J Obes (Lond)* 2007;31:1199-1209.

[149] Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol* 2009;587:4963-4976.

[150] Pogribny IP, James SJ, Jernigan S, Pogribna M. Genomic hypomethylation is specific for preneoplastic liver in folate/methyl deficient rats and does not occur in non-target tissues. *Mutat Res* 2004;548:53-59.

[151] Pogribny IP, Ross SA, Wise C, Pogribna M, Jones EA, Tryndyak VP et al. Irreversible global DNA hypomethylation as a key step in hepatocarcinogenesis induced by dietary methyl deficiency. *Mutat Res* 2006;593:80-87.

[152] Pogribny IP, Shpyleva SI, Muskhelishvili L, Bagnyukova TV, James SJ, Beland FA. Role of DNA damage and alterations in cytosine DNA methylation in rat liver carcinogenesis induced by a methyl-deficient diet. *Mutat Res* 2009;669:56-62.

[153] Pogribny IP, Tryndyak VP, Bagnyukova TV, Melnyk S, Montgomery B, Ross SA et al. Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet. *J Hepatol* 2009;51:176-186.

[154] Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev* 2012;70:3-21.

- [155] Power C, Jefferis BJ. Fetal environment and subsequent obesity: a study of maternal smoking. *Int J Epidemiol* 2002;31:413-419.
- [156] Prieto-Hontoria PL, Perez-Matute P, Fernandez-Galilea M, Barber A, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ. Lipoic acid prevents body weight gain induced by a high fat diet in rats: effects on intestinal sugar transport. *J Physiol Biochem* 2009;65:43-50.
- [157] Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:529-644.
- [158] Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 1999;70:811-816.
- [159] Razquin C, Marti A, Martinez JA. Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO and PPARgamma. Approaches for personalized nutrition. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:136-149.
- [160] Reynolds RM, Osmond C, Phillips DI, Godfrey KM. Maternal BMI, parity, and pregnancy weight gain: influences on offspring adiposity in young adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;95:5365-5369.
- [161] Ribas V, Nguyen MT, Henstridge DC, Nguyen AK, Beaven SW, Watt MJ et al. Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ERalpha-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E304-319.
- [162] Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* 2008;49:1068-1076.
- [163] Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol* 2004;40:47-51.
- [164] Rogers AE. Methyl donors in the diet and responses to chemical carcinogens. *Am J Clin Nutr* 1995;61:659S-665S.

- [165] Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev* 2006;82:485-491.
- [166] Roseboom TJ, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Ravelli AC, Schroeder-Tanka JM et al. Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45. *Heart* 2000;84:595-598.
- [167] Rubio MA, Salas-Salvadó J, Barbany M, Moreno B, Aranceta J, Bellido D et al. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Rev Esp Obes* 2007;5:135-175.
- [168] Sahin I, Aydin S, Ozkan Y, Dagli AF, Akin KO, Guzel SP et al. Diet-induced obesity suppresses ghrelin in rat gastrointestinal tract and serum. *Mol Cell Biochem* 2011;355:299-308.
- [169] Shahrzad S, Bertrand K, Minhas K, Coomber BL. Induction of DNA hypomethylation by tumor hypoxia. *Epigenetics* 2007;2:119-125.
- [170] Smith BW, Adams LA. Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011;48:97-113.
- [171] Somm E, Schwitzgebel VM, Vauthay DM, Camm EJ, Chen CY, Giacobino JP et al. Prenatal nicotine exposure alters early pancreatic islet and adipose tissue development with consequences on the control of body weight and glucose metabolism later in life. *Endocrinology* 2008;149:6289-6299.
- [172] Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. Animal models of obesity. *Obes Rev* 2007;8 Suppl 1:55-61.
- [173] Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Krol E. The contribution of animal models to the study of obesity. *Lab Anim* 2008;42:413-432.
- [174] Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 2009;50:1094-1104.

[175] Srisai D, Gillum MP, Panaro BL, Zhang XM, Kotchabhakdi N, Shulman GI et al. Characterization of the hyperphagic response to dietary fat in the MC4R knockout mouse. *Endocrinology* 2011;152:890-902.

[176] Steegers-Theunissen RP, Obermann-Borst SA, Kremer D, Lindemans J, Siebel C, Steegers EA et al. Periconceptual maternal folic acid use of 400 microg per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child. *PLoS One* 2009;4:e7845.

[177] Steeves JA, Bassett DR, Jr., Thompson DL, Fitzhugh EC. Relationships of occupational and non-occupational physical activity to abdominal obesity. *Int J Obes (Lond)* 2011;36:100-106.

[178] Stenvinkel P, Karimi M, Johansson S, Axelsson J, Suliman M, Lindholm B et al. Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease? *J Intern Med* 2007;261:488-499.

[179] Sun Z, Feng D, Everett LJ, Bugge A, Lazar MA. Circadian Epigenomic Remodeling and Hepatic Lipogenesis: Lessons from HDAC3. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011.

[180] Tadger S, Melamed Y. Weight gain due to long term antipsychotic treatment of persistent mental disorders. *Psychiatr Danub* 2008;20:37-41.

[181] Tamashiro KL, Moran TH. Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. *Physiol Behav* 2010;100:560-566.

[182] Thaler R, Karlic H, Rust P, Haslberger AG. Epigenetic regulation of human buccal mucosa mitochondrial superoxide dismutase gene expression by diet. *Br J Nutr* 2009;101:743-749.

[183] Thibault L, Woods SC, Westerterp-Plantenga MS. The utility of animal models of human energy homeostasis. *Br J Nutr* 2004;92 Suppl 1:S41-45.

[184] Tordjman J, Guerre-Millo M, Clement K. Adipose tissue inflammation and liver pathology in human obesity. *Diabetes Metab* 2008;34:658-663.

[185] Vaag AA, Grunnet LG, Arora GP, Brons C. The thrifty phenotype hypothesis revisited. *Diabetologia* 2012.

[186] Valdecantos MP, Perez-Matute P, Martinez JA. Effects of Lipoic Acid in the development of Non-alcoholic fatty liver disease: modulation of mitochondrial function and oxidative stress. 2012.

[187] van Straten EM, Bloks VW, Huijkman NC, Baller JF, van Meer H, Lutjohann D et al. The Liver X-Receptor (LXR) gene promoter is hypermethylated in a mouse model of prenatal protein restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009.

[188] Vetelainen R, van Vliet A, van Gulik TM. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1526-1533.

[189] Villagran Perez S, Rodriguez-Martin A, Novalbos Ruiz JP, Martinez Nieto JM, Lechuga Campoy JL. [Habits and lifestyles modifiable in children with overweight and obesity]. *Nutr Hosp* 2010;25:823-831.

[190] Vucetic Z, Kimmel J, Totoki K, Hollenbeck E, Reyes TM. Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology* 2010;151:4756-4764.

[191] Wadden TA, Webb VL, Moran CH, Bailer BA. Lifestyle modification for obesity: new developments in diet, physical activity, and behavior therapy. *Circulation* 2012;125:1157-1170.

[192] Walley AJ, Blakemore AI, Froguel P. Genetics of obesity and the prediction of risk for health. *Hum Mol Genet* 2006;15 Spec No 2:R124-130.

[193] Warden CH, Fislser JS. Obesity: from animal models to human genetics to practical applications. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010;94:373-389.

[194] Wareham NJ, Young EH, Loos RJ. Epidemiological study designs to investigate gene-behavior interactions in the context of human obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16 Suppl 3:S66-71.

- [195] Waterland RA, Dolinoy DC, Lin JR, Smith CA, Shi X, Tahiliani KG. Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused. *Genesis* 2006;44:401-406.
- [196] Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23:5293-5300.
- [197] Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 2004;20:63-68.
- [198] Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, Rached MT, Mirza S. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:1373-1379.
- [199] Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 2005;37:853-862.
- [200] West DB, Boozer CN, Moody DL, Atkinson RL. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am J Physiol* 1992;262:R1025-1032.
- [201] WHO. Global status report on noncommunicable diseases, World Health Organization. 2010.
- [202] WHO. NCD Country Profiles. ISBN:9789241502283. 2011.
- [203] WHO. Obesity and Overweight. Fact Sheet Number 311. 2011.
- [204] Wojtyla A. Application of the hypothesis of Developmental Origin of Health and Diseases (DOHAD) in epidemiological studies of women at reproductive age and pregnant women in Poland. *Ann Agric Environ Med* 2011;18:355-364.
- [205] Wright TM, Fone KC, Langley-Evans SC, Voigt JP. Exposure to maternal consumption of cafeteria diet during the lactation period programmes feeding behaviour in the rat. *Int J Dev Neurosci* 2011;29:785-793.

[206] Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:37-50.

[207] Zhang Y, Proenca R, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-432.

II. Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis

El hígado graso no alcohólico es la principal manifestación hepática del síndrome metabólico. Este cuadro fisiopatológico se caracteriza por un incremento de la acumulación hepática de lípidos y su incidencia es elevada en países desarrollados debido a unos hábitos dietéticos basados en un elevado aporte calórico procedente de grasas y azúcares simples. La deficiencia dietética de sustancias implicadas en la metilación del ADN produce esteatosis hepática en modelos animales.

La hipótesis de partida del presente trabajo es que la suplementación dietética con sustancias prometilantes (betaína, colina, ácido fólico y vitamina B₁₂) protege de la acumulación de grasa en el hígado provocada por la ingesta de una dieta obesogénica. Esta protección puede darse tanto en la vida adulta como a través de la dieta materna durante la lactancia, y tiene una base reguladora mediada por mecanismos epigenéticos que controlan el metabolismo hepático.

2. Objetivo general

El propósito de esta investigación se basa en el estudio del posible efecto preventivo de la suplementación dietética con sustancias prometilantes en distintos estadios de la vida sobre la acumulación de grasa hepática inducida por una dieta obesogénica rica en grasa y sacarosa en ratas adultas, así como en la valoración de los mecanismos nutrigenómicos y epigenómicos implicados en este proceso.

3. Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de la suplementación dietética con sustancias prometilantes sobre la acumulación intrahepática de lípidos debida a la ingesta de una dieta rica en grasa y sacarosa en ratas Wistar macho adultas.
2. Estudiar la influencia del dimorfismo sexual sobre el posible efecto en el hígado de la suplementación con sustancias prometilantes de una dieta obesogénica en la edad adulta, así como sobre los niveles de expresión hepática de genes relacionados con el metabolismo lipídico y sobre la metilación específica del ADN en el promotor del gen de la ácido graso sintasa (Fasn).
3. Profundizar en los mecanismos implicados en la acumulación de lípidos intrahepática debida a la ingesta de una dieta rica en grasa y sacarosa en ratas Wistar macho adultas y su prevención mediante la suplementación de sustancias prometilantes con un enfoque transcricional y una aproximación epigenética basada en el análisis de los niveles de metilación global del ADN y de la metilación específica de promotores de genes implicados en los cambios hepáticos observados.
4. Determinar el efecto de la ingesta materna de una dieta obesogénica y la suplementación con sustancias prometilantes durante la lactancia sobre la descendencia en edad adulta, así como sobre la respuesta de la descendencia a la misma dieta obesogénica.

1. Hypothesis

Non-alcoholic fatty liver disease is the main hepatic manifestation of metabolic syndrome. This physiopathology is characterized by an increase in hepatic lipid accumulation and its prevalence is increasing in developed countries due to dietary habits based on high caloric intake from fats and simple sugars. Dietary DNA methylation-related substrates deficiency induces animal models of hepatic steatosis.

The hypothesis of this work is that the dietetic supplementation with methyl donor substrates (betaine, choline, folic acid and vitamin B₁₂) protects against liver fat accumulation induced by obesogenic dietary intake. This protection can occur on adult life and induced by maternal perinatal nutrition at suckling, being regulated by epigenetic mechanisms which affect hepatic metabolism.

2. General aim

The aim of this research is to study in adult rats the effect of dietary supplementation with promethylant substrates, during different periods of life, on liver fat accumulation induced by a high-fat-sucrose obesogenic dietary intake during adulthood, as well as the nutrigenomic and epigenomic mechanisms implicated in these processes.

3. Specific aims

1. To analyze the effect of dietary supplementation with promethylating substrates on liver fat accumulation induced by a high-fat-sucrose dietary intake in adult male Wistar rats.
2. To study the sexual dimorphism influence on the liver of both obesogenic diet and methyl donor supplementation during adulthood, as well as on hepatic lipid metabolism-related gene expression levels and on fatty acid synthase (FASN) DNA promoter specific methylation.
3. To deepen into the mechanisms implicated in liver fat accumulation due to high-fat-sucrose diet intake in adult male Wistar rats and its prevention by methyl donor supplementation, using a transcriptomic approach and epigenetic tools based on global DNA methylation analysis and specific promoter methylation of genes related with the changes observed in liver.
4. To determine the effect on adult offspring of maternal intake of an obesogenic diet and promethylating supplementation during lactation, as well as the response of the offspring to the same obesogenic diet.

III. Diseño experimental

1. Diseño general

Los objetivos propuestos para el presente trabajo se abordaron a través de la realización de cuatro modelos experimentales en los que se estudió en ratas Wistar el efecto de la suplementación dietética con sustancias prometilantes sobre la acumulación de grasa hepática inducida por una dieta obesogénica rica en grasa y sacarosa (HFS).

En el primer modelo experimental (ME) (Capítulo 1), se realizó un estudio en ratas adultas macho del efecto en la acumulación de grasa hepática ejercido por una suplementación con sustancias prometilantes en un modelo de obesidad inducida por la dieta de ocho semanas de duración.

En el segundo ME (Capítulo 2) se analizó el efecto de la suplementación de una dieta HFS con sustancias prometilantes durante ocho semanas en ratas Wistar macho y hembras adultas sobre diversas variables corporales y bioquímicas, así como sobre los niveles hepáticos de expresión y de metilación específica de genes relacionados con el metabolismo lipídico.

En el tercer ME (Capítulo 3) se profundizó en los posibles mecanismos implicados en las alteraciones producidas en el hígado por la dieta HFS, así como en el efecto de su suplementación prometilante en ratas Wistar macho adultas durante ocho semanas. Además de la caracterización fenotípica y bioquímica plasmática de los principales marcadores de obesidad y riesgo cardiovascular, se analizó el transcriptoma hepático mediante un microarray de expresión y se determinaron los niveles de metilación del ADN, tanto global como de los promotores de genes específicos implicados en las alteraciones de este modelo.

Finalmente, en el cuarto ME (Capítulo 4) se estudió el efecto de la dieta materna HFS y su suplementación con sustancias prometilantes durante la lactancia (tres semanas) en las características corporales de la descendencia, así como en el condicionamiento de la respuesta al mismo tipo de dieta obesogénica durante ocho semanas en la edad adulta. En este modelo se analizaron en la descendencia adulta los cambios corporales

y bioquímicos y la expresión de genes relacionados con obesidad, metabolismo lipídico y los procesos de metilación del ADN.

2. Diseño experimental: capítulo 1.

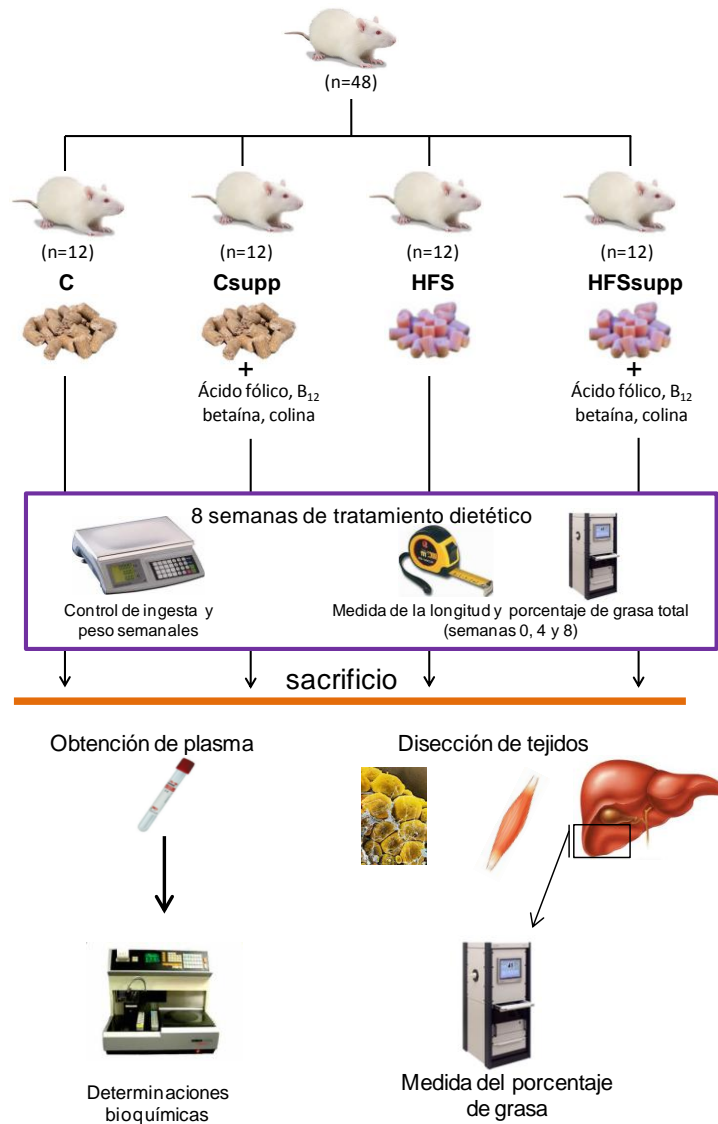


Figura 9. Diseño experimental del capítulo 1. El fin de este trabajo fue estudiar el efecto de la suplementación de una dieta rica en grasa y azúcares (HFS) con sustancias prometilantes sobre la acumulación de grasa en el hígado. El estudio consistió en la administración a ratas Wistar macho adultas de una dieta HFS y un cóctel de sustancias con capacidad prometilante durante ocho semanas. Al finalizar este periodo se analizaron las distintas variables de composición corporal para confirmar la implantación del modelo de obesidad inducida por la dieta, así como la cantidad de grasa infiltrada en el hígado (C, control; HFS, high-fat-sucrose; supp, suplementado con sustancias prometilantes).

3. Diseño experimental: capítulo 2.

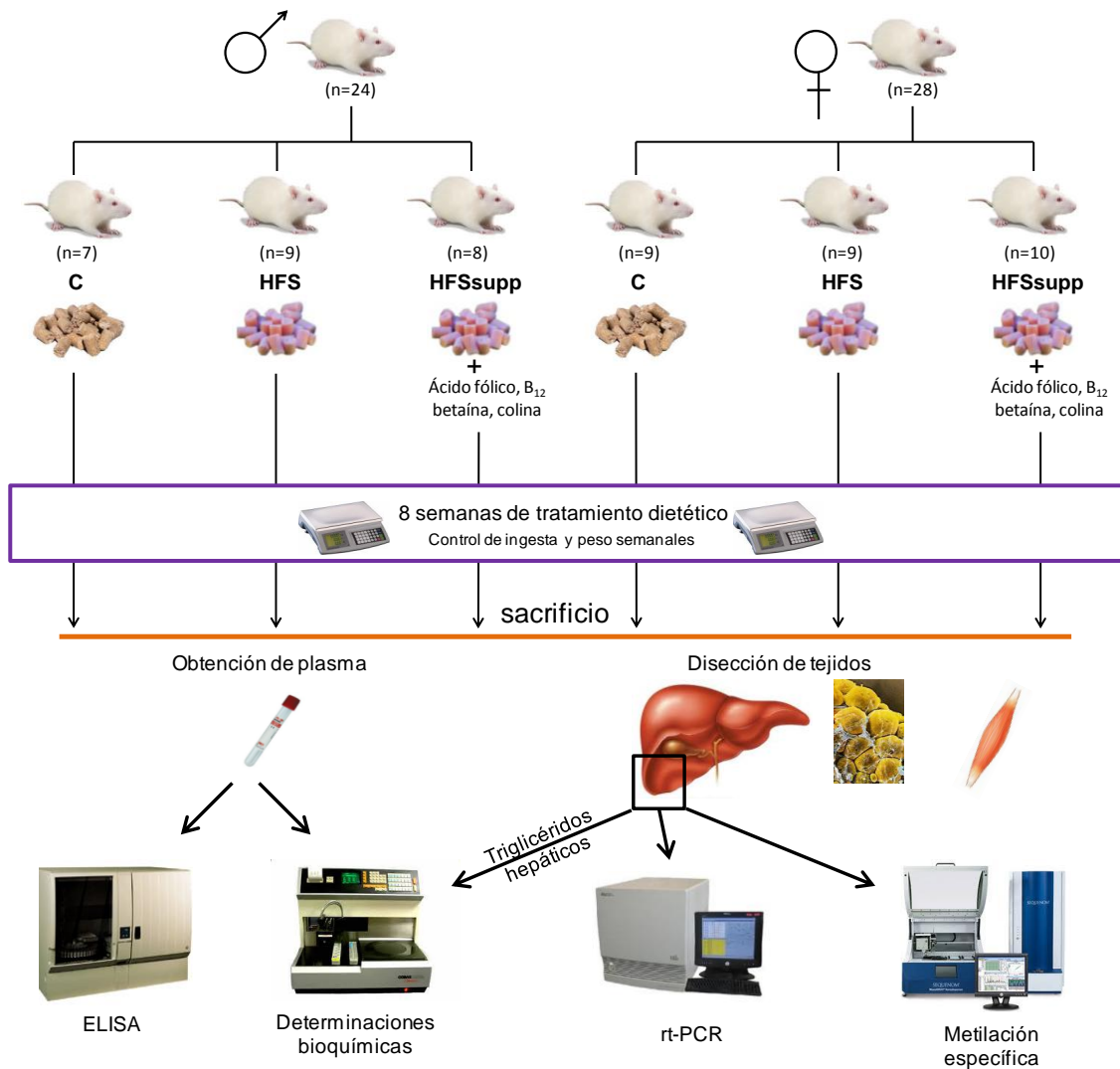


Figura 10. Diseño experimental del capítulo 2. El fin de este trabajo fue estudiar la posible dependencia del sexo en el efecto hepático de la suplementación de una dieta HFS con sustancias prometilantes, así como su regulación epigenética y transcripcional sobre genes del metabolismo lipídico hepático. Para ello se generó un modelo de obesidad inducido por la dieta que fue suplementado con sustancias prometilantes durante ocho semanas. Tras este periodo se analizaron las variables morfológicas de los animales así como su perfil bioquímico plasmático y análisis de la insulina mediante un ELISA. Se realizó un estudio de metilación específica del ADN y, en machos, del patrón de expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico (C, control; HFS, high-fat-sucrose; supp, suplementado con sustancias prometilantes; ELISA, ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas; rt-PCR, reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real).

4. Diseño experimental: capítulo 3.

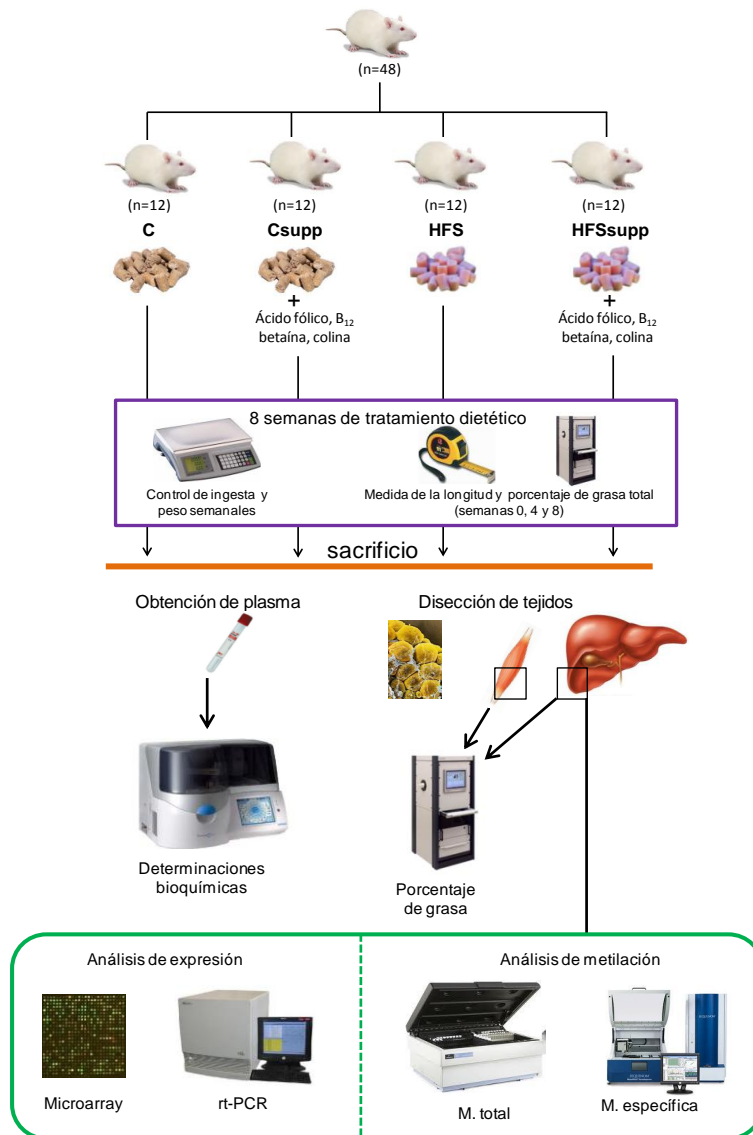


Figura 11. Diseño experimental del capítulo 3. El fin de este estudio fue profundizar en los mecanismos transcriptómicos y epigenéticos hepáticos de la acumulación de grasa en el hígado por una dieta HFS y su prevención debida a la suplementación dietética con agentes prometilantes. Para la consecución de este objetivo se planteó el modelo de dieta HFS y de suplementación con un cóctel prometilante en ratas Wistar macho adultas durante ocho semanas. Además del análisis corporal y bioquímico de los animales, se realizó un enfoque transcriptómico basado en la realización de un Microarray de expresión, con la subsiguiente validación por rt-PCR, y otro epigenético basado en el análisis de los niveles de metilación global del ADN y de la metilación específica de promotores de genes implicados en obesidad, metabolismo lipídico y proliferación celular (C, control; HFS, high-fat-sucrose; supp, suplementado con sustancias prometilantes; rt-PCR, reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real).

5. Diseño experimental: capítulo 4.

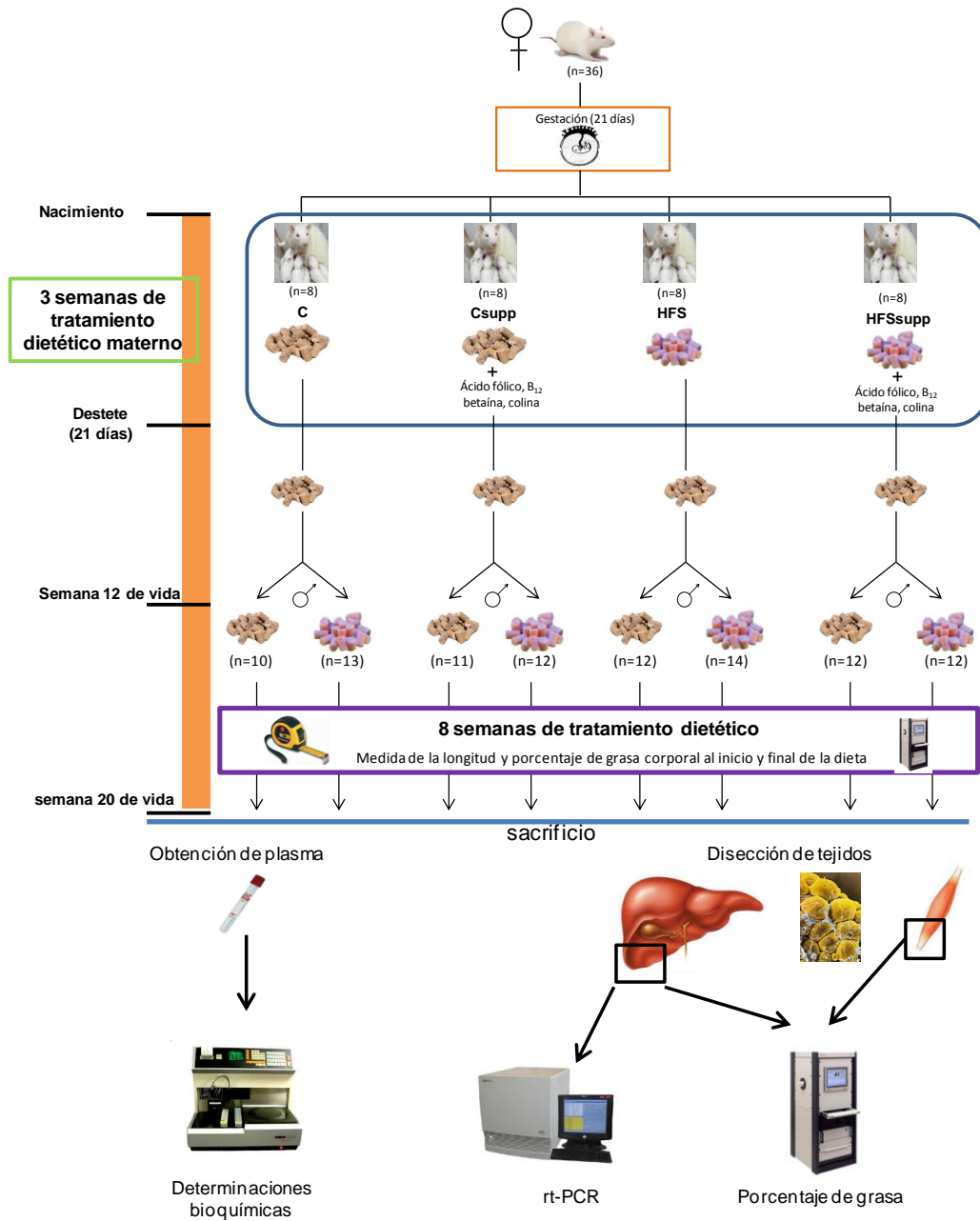


Figura 12. Diseño experimental del capítulo 4. El fin de este modelo fue el estudio de la influencia de la dieta materna obesogénica y su suplementación con sustancias prometilantes durante la lactancia sobre la descendencia en edad adulta, así como sobre su respuesta a la dieta obesogénica. Además de la caracterización fenotípica y bioquímica plasmática de la descendencia, se analizó el patrón de expresión de genes relacionados con obesidad, metabolismo lipídico y procesos de regulación de la metilación del ADN (C, control; HFS, high-fat-sucrose; supp, suplementado con sustancias prometilantes; rt-PCR, reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real).

Las técnicas de laboratorio empleadas durante la realización de este trabajo se encuentran descritas en las secciones de material y métodos de los artículos. Enumerando brevemente, se realizaron:

- Mediciones de peso mediante el empleo de una báscula, de la longitud corporal ano-hocico previa anestesia inhalatoria con Isoflurano y del porcentaje de grasa tanto corporal total como tisular mediante resonancia magnética con un analizador EchoMRI.

- El perfil de la bioquímica plasmática (glucosa, HDL colesterol, colesterol total, triglicéridos, lactato, homocisteína, ácidos grasos libres, AST y ALT) se realizó mediante el empleo de Kits comerciales (ABX Diagnostics, WAKO Chemicals GMBH, Randox Laboratories) para su medición empleando los autoanalizadores ABX Pentra C200 y COBAS MIRA. La concentración de insulina fue medida mediante un kit ELISA (Mercodia) adaptado a un equipo automatizado (TRITURUS).

- Para los análisis transcriptómicos se empleó un microarray de expresión génica con la plataforma GeneTitan de Affymetrix. También se realizaron análisis de expresión génica a tiempo real empleando sondas Taqman prediseñadas en el equipo ABI PRISM 7900 HT para los siguientes genes: Srebf1, Acaca, Fasn, Mgl1, Ccl2, Fabp4, Lepr, Btc, Srebf2, Mme, Fbxo21, Agpat3, Esr1, Mst1, Fat1, Gsr, Acp1, Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, Lxra y Mif.

- El análisis epigenético de los niveles de metilación total se realizó mediante digestión enzimática con HpaII y MspI y posterior elongación con sustrato marcado radioactivamente. La metilación específica de los genes Fasn, Agpat3, Esr1, Mif, Srebf2, Mme y Btc se realizó por espectrometría de masas MALDI-TOF (Sequenom).

IV. Resultados

Capítulo 1/Chapter 1. Dietary supplementation with methyl donor groups could prevent nonalcoholic fatty liver

Dietary supplementation with methyl donor groups could prevent nonalcoholic fatty liver

Cordero P, Campion J, Milagro FI, Martinez JA

Published in Hepatology (Impact Factor: 11.665; 2/74). 2011; 53(6):2151-2.

Resumen

Hemos leído con gran interés el trabajo recientemente publicado por Kohly y col. en la revista *Hepatology* describiendo un modelo de enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) generado por una dieta rica en grasas y carbohidratos. Otra forma de generar este modelo de daño hepático resulta del déficit dietético de grupos donantes de metilo, como la colina o la betaína, lo que puede provocar esteatohepatitis (NASH). Otros estudios han descrito que la suplementación con este tipo de moléculas puede inducir cambios epigenéticos y la regulación del patrón de expresión génica. En este sentido, nosotros planteamos la hipótesis de que la suplementación dietética con sustancias donadoras de grupos metilo podría revertir los efectos negativos de un modelo nutricional de hígado graso no alcohólico en ratas.

Para confirmar nuestra hipótesis, diseñamos un estudio con 48 ratas Wistar macho que dividimos en cuatro grupos dietéticos de 12 ratas cada uno; dieta control (C), dieta control suplementada con sustancias prometilantes (C supl), dieta rica en grasas y azúcares simples (HFS) y dieta HFS suplementada con sustancias prometilantes incluyendo betaína, colina, vitamina B₁₂ y ácido fólico (HFS supl). Las dietas control (2014 Harlan Teklad Global Diets) y obesogénica (D12451, Research Diets), se suministraron *ad libitum*, sin resultar afectada la ingesta dietética por el tratamiento. La masa grasa total inicial y final, así como el contenido de grasa final en el hígado, fueron analizados mediante resonancia magnética con un analizador EchoMRI. Tras

ocho semanas de tratamiento dietético, los animales fueron sacrificados y los tejidos y el plasma congelados para análisis posteriores.

El modelo obesogénico fue manifestado con éxito, mostrando diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las ratas alimentadas con dieta C y HFS en distintas variables fenotípicas como el peso corporal y los de los distintos reservorios de tejido adiposo. El análisis de las determinaciones plasmáticas reveló un incremento del índice aterogénico. Además, la dieta obesogénica indujo un incremento de las reservas de grasa en el hígado al compararla con el grupo C y, como habíamos hipotetizado, este daño fue parcialmente revertido con la suplementación de sustancias donadoras de grupos metilo.

En resumen, la dieta HFS lleva a padecer un fenotipo de obesidad y NAFLD caracterizado por un incremento de la acumulación de lípidos en el hígado. La suplementación nutricional con sustancias donadoras de grupos metilo previnieron parcialmente esta acumulación extra de lípidos. Estos datos sugieren que la suplementación de sustancias donadoras de grupos metilo podría prevenir la aparición de NAFLD, paso previo de la NASH y cirrosis, así como que podría estar relacionada una regulación epigenética que alterase la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico hepático.

**Dietary supplementation with methyl donor groups could
prevent nonalcoholic fatty liver**

Paúl Cordero, Javier Campión, Fermín I. Milagro, J. Alfredo Martínez

Department of Nutrition and Food Sciences, Physiology and Toxicology

University of Navarra, c/ Irunlarrea 1, 31008. Pamplona, Spain

CORRESPONDING AUTHOR

Prof. J. Alfredo Martínez

Department of Nutrition, Food Science, Physiology and Toxicology

University of Navarra

C/Irunlarrea s/n

31008 Pamplona, SPAIN

Phone: 0034 948 425600

Fax: 0034 948 425649

E-mail address: jalfmtz@unav.es

We have read with great interest the work by Kohly et al. recently published in *Hepatology* (1) describing a model of obesity and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) generated by a diet with high amounts of fat and carbohydrates. Another way to implement a model of hepatic damage is the dietary depletion of methyl donor groups, such as choline or betaine (2, 3), which leads to nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Other studies have reported that the supplementation with this kind of molecules can induce epigenetic changes and regulate the gene expression profile (4). In this sense, we hypothesized that dietary methyl donor supplementation could be able to reverse the negative effects of a nutritional model of nonalcoholic fatty liver in rats.

To confirm this concept, we performed a study with 48 male Wistar rats that were divided into four dietary groups with 12 rats each; control diet (C), methyl donor supplemented control (Csupl), high fat-sugar diet (HFS) and HFS diet supplemented with methyl donor groups, including betaine, choline, vitamin B₁₂ and folic acid (HFS supl). Chow (2014, Harlan Teklad Global Diets) and obesogenic diets (D12451, Research Diets) were provided *ad libitum* and food intake was not affected by dietary treatment. The initial and final total fat mass, as well as the final fat content in the liver, were measured by EchoMRI analyzer (5). After eight weeks of dietary treatment, the animals were sacrificed and tissues and plasma were frozen for later analysis.

The obesogenic model was successfully achieved, showing statistical differences ($p < 0.01$) between C and HFS fed rats in different phenotypical variables such as body and fat depot weights and total fat. The analyses of plasma parameters revealed an increase in the atherogenic index. Moreover, the obesogenic diet induced an increase in liver fat stores when compared to the C group and, and as hypothesized, this damage was partially reversed with the methyl donor supplementation (Figure 1).

Summing up, the HFS diet led to an obese and NAFLD phenotype characterized by an increase in liver lipid accumulation. A nutritional supplementation with a cocktail of methyl donors partially reversed this extra-adipose lipid accumulation. These data suggest that a methyl donor supplementation might prevent the establishment of

NAFLD, a previous phase of NASH and cirrhosis, and that different epigenetic changes altering the expression of genes related with liver fat metabolism could be involved.

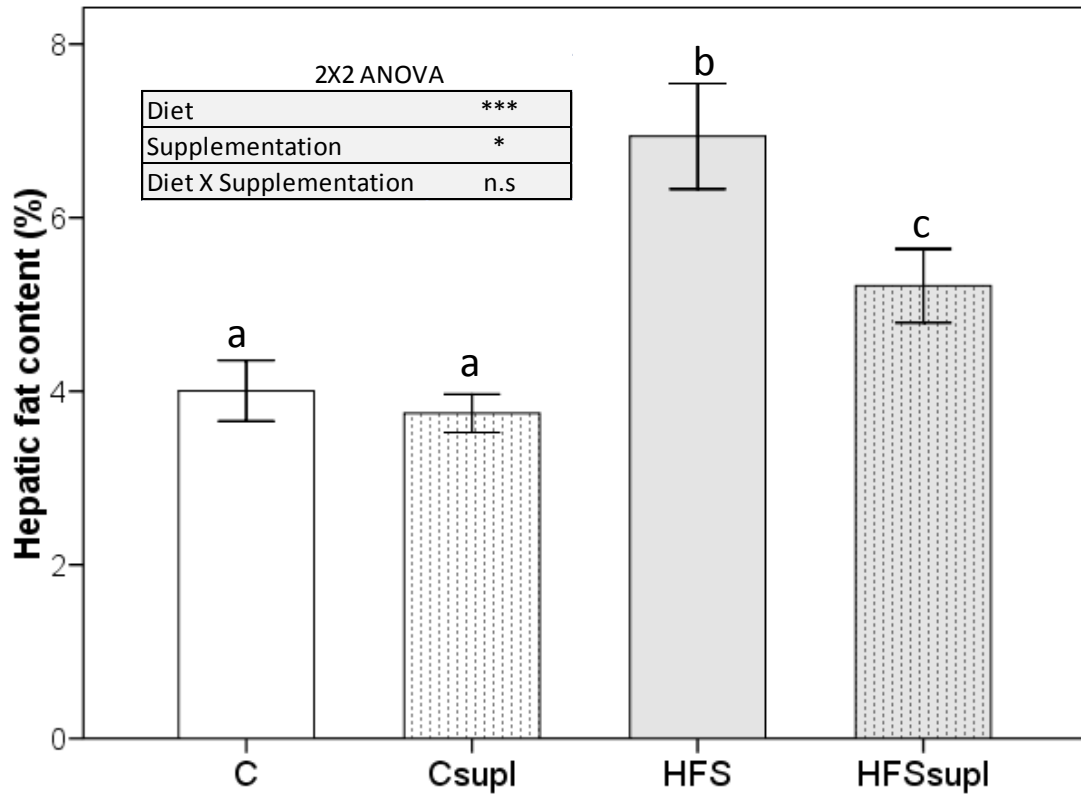


Figure 1. Hepatic fat content measured by EchoMRI analyzer. Data are presented as means \pm SD. Differences were analyzed by two-way ANOVA (Diet X Supplementation). (C; control diet, C supl; methyl donor supplemented control diet, HFS; high fat-sugar diet, HFS supl; methyl donor supplemented high fat-sugar diet). Different letter means significant differences between groups. n.s., non statistical significance; *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$

BIBLIOGRAPHY

1. Kohli R, Kirby M, Xanthakos SA, Softic S, Feldstein AE, Saxena V, Tang PH, et al. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;52:934-944.
2. Pogribny IP, Tryndyak VP, Bagnyukova TV, Melnyk S, Montgomery B, Ross SA, Latendresse JR, et al. Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet. *J Hepatol* 2009;51:176-186.
3. Vetelainen R, van Vliet A, van Gulik TM. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1526-1533.
4. Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, Rached MT, Mirza S. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obes* 2008;32:1373-1379.
5. Tinsley FC, Taicher GZ, Heiman ML. Evaluation of a quantitative magnetic resonance method for mouse whole body composition analysis. *Obes Res* 2004;12:150-160.

Capítulo 2/Chapter 2. Dietary supplementation with methyl donors reduces fatty liver and modifies the Fatty Acid Synthase DNA methylation profile in rats fed an obesogenic diet

Dietary supplementation with methyl donors reduces fatty liver and modifies the Fatty Acid Synthase DNA methylation profile in rats fed an obesogenic diet

Cordero P, Gomez-Uriz AM, Campion J, Milagro FI, Martinez JA

Published in Genes & Nutrition (Impact Factor: 2.507; 27/74). 2012;in press. DOI: 10.1007/s12263-012-0300-z.

Resumen

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) es una de las primeras manifestaciones hepáticas del síndrome metabólico, cuya progresión puede provocar cirrosis o hepatocarcinoma. Interesantemente, la suplementación dietética con sustancias donadoras de grupos metilo podrían evitar la acumulación hepática de triglicéridos inducida por la dieta.

Un total de 24 machos y 28 hembras ratas Wistar fueron asignadas aleatoriamente a tres diferentes grupos dietéticos durante 8 semanas: dieta control, dieta rica en grasa y sacarosa y dieta rica en grasa y sacarosa suplementada con un cóctel basado en sustratos donantes de grupos metilo (colina, betaína, vitamina B₁₂ y ácido fólico). Después del tratamiento dietético se realizaron medidas somáticas, bioquímicas, transcriptómicas y epigenéticas.

Las ratas alimentadas con la dieta HFS presentaron un fenotipo de obesidad y alteraciones en las medidas bioquímicas relacionadas con la homeostasis lipídica y de la glucosa. La suplementación con grupos metilo revirtió de forma significativa el incremento de triglicéridos hepáticos originado por la ingesta de la dieta obesogénica. El análisis epigenético del promotor de la ácido graso sintasa (FASN) mediante espectrometría de masas por MALDI-TOF mostró cambios debidos a la dieta

obesogénica en los sitios CpG localizados en -1096, -780, -778 y -774 respecto al inicio de la transcripción en ambos sexos. La suplementación con donantes de grupos metilo modificó los niveles de metilación en los CpGs -852, -833, -829, -743 y -733 de forma dependiente del sexo. El análisis de la expresión de FASN en machos describió una tendencia a su modificación.

Nuestros resultados confirmaron la hipótesis de que la suplementación con sustancias prometilantes podría prevenir la acumulación hepática de triglicéridos inducida por la ingesta de la dieta obesogénica tanto en machos como en hembras. Cambios en el patrón de expresión hepático, así como mecanismos epigenéticos relacionados con la hipermetilación del promotor de FASN podrían estar involucrados en la mejora del NAFLD inducida por los grupos metilo.

Dietary supplementation with methyl donors reduces fatty liver and modifies the Fatty Acid Synthase DNA methylation profile in rats fed an obesogenic diet

Paúl Cordero, Ana M. Gómez-Úriz, Javier Campi3n, Ferm3n I. Milagro, J. Alfredo Mart3nez

Department of Nutrition and Food Sciences, Physiology and Toxicology

University of Navarra, c/ Irunlarrea 1, 31008. Pamplona, Spain

CORRESPONDING AUTHOR

Prof. J. Alfredo Mart3nez

Department of Nutrition, Food Science, Physiology and Toxicology

University of Navarra

C/Irunlarrea s/n

31008 Pamplona, SPAIN

Phone: 0034 948 425600

Fax: 0034 948 425649

E-mail address: jalfmtz@unav.es

ABSTRACT

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is one of the first hepatic manifestations of metabolic syndrome, whose progression can lead to cirrhosis and hepatic carcinoma. Interestingly, methyl donor supplementation could improve obesogenic diet-induced hepatic triglyceride accumulation.

The aim of this research is to describe methyl donor effects on a high-fat-sucrose (HFS) diet in both sexes and epigenetic changes induced on Fatty Acid Synthase (FASN) promoter methylation pattern as well as gene expression of NAFLD key metabolic genes.

24 male and 28 female Wistar rats were assigned to three dietary groups: control, HFS and HFS supplemented with methyl donors (choline, betaine, vitamin B₁₂ and folic acid). After eight weeks of treatment, somatic, biochemical, mRNA and epigenetic measurements were performed.

Rats fed the HFS diet presented an overweight phenotype and alterations in plasma biochemical measurements. Methyl donor supplementation reverted the HFS-diet-induced hepatic triglyceride accumulation. Analysis of FASN promoter cytosine methylation showed changes in both sexes due to the obesogenic diet at -1096, -780, -778 and -774 CpG sites with respect to the transcriptional start site. Methyl donor supplementation modified DNA methylation at -852, -833, -829, -743 and -733 CpGs depending on the sex. RT-PCR analysis confirmed that FASN expression tended to be altered in males.

Our findings reinforce the hypothesis that methyl donor supplementation can prevent hepatic triglyceride accumulation induced by obesogenic diets in both sexes. Changes in liver gene expression profile and epigenetic-mediated mechanisms related with FASN DNA hypermethylation could be involved in methyl donor-induced NAFLD improvement.

KEY WORDS: Obesity, NAFLD, DNA methylation, high fat sucrose diet

INTRODUCTION

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is characterized by a triglyceride accumulation in hepatocytes that can affect their normal function (Angulo 2002). NAFLD prevalence is rising in parallel with the obesity pandemic being related to cardiovascular risk (Chen et al. 2010; Edens et al. 2009) and insulin resistance (Koot et al. 2011). This disease (NAFLD) is considered the primary hepatic manifestation of metabolic syndrome, being the cause of several metabolic disorders (Fu et al. 2011). Furthermore, the increase of liver triglyceride depots can progress to Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) and later, to cirrhosis, that represents an irreversible stage that may end in hepatic carcinoma, liver transplantation or a hepatic-related complication death (Ekstedt et al. 2006).

Besides genetic make-up, unhealthy lifestyles including physical inactivity and obesogenic diets are involved in early onset of fat accumulation in the liver (Carmiel-Haggai et al. 2005; Gaemers et al. 2011; Moore et al. 2010). At this stage, adipokines such as visfatin or proinflammatory cytokines like TNF alpha, IL-6 or IL-10 (Dinant et al. 2007; Jarrar et al. 2008) as well as enzymes such as Fatty Acid Synthase (FASN), one of the key metabolic genes for *de novo* lipogenesis, may play a role in the pathogenesis of NAFLD. In this pathway acetyl CoA carboxylase alpha (ACACA) catalyzes the conversion of acetyl CoA to malonyl CoA and FASN catalyzes the conversion of this molecule into long chain saturated fatty acids (Strable et al. 2010). Both enzymes are directly regulated by sterol regulatory elements binding protein (SREBP), which is a regulatory transcription factor (Eberle et al. 2004; Kohjima et al. 2007). Other possible mediators in liver steatosis evolution are fatty acid binding proteins (FABP), which have roles including fatty acid uptake, transport and metabolism, lipases, such as monoglyceride lipase (MGLL) that hydrolyzes triglycerides to fatty acids and glycerol, or chemokine ligand 2 (CCL2), a cytokine involved in the inflammatory response and atherosclerosis (Bastarrachea RA et al. 2007).

The research of dietary models of NAFLD and development stages in animal models include the assessment of changes by methyl donor group administration on the diet,

with depletion of choline and methionine (Rinella et al. 2008; Vetelainen et al. 2007), or of vitamin B₁₂ and folic acid (Brunaud et al. 2003). These impairments alter the hepatic epigenetic profile and accelerate the progression from slight liver injury to cancer (Pogribny et al. 2009; Starlard-Davenport et al. 2010). On the contrary, a promethylation cocktail including choline, betaine, folic acid and vitamin B₁₂ in a transgenerational model of obesity in agouti mice produced phenotypical and epigenetic alterations, where the agouti transposon was blocked and heritable obesity minimized (Waterland et al. 2008).

Previous published studies have tested methyl donor dietary supplementation in a model of obesity and NAFLD in male adults Wistar rats and have demonstrated an improvement in liver fat accumulation (Cordero et al. 2011b). The objective of this research is to describe the effects of methyl donor supplementation following an obesogenic diet in both sexes with special focus on the possible epigenetic changes induced in the methylation pattern of FASN promoter as well as gene expression of key metabolic genes in *de novo* lipogenesis and related to lipid metabolism in the liver.

MATERIAL AND METHODS

Animals, diets and experimental design

A total of 24 male and 28 female twelve-week-old Wistar rats (initial body weight 238 ± 5 and 177 ± 2 g respectively) supplied by the Applied Pharmacobiology Center (CIFA, Pamplona, Spain), were housed at 21–23 °C with a 12 h light cycle (8 am – 8 pm) and assigned to three different dietary groups; control (C, n= 7 males and 9 females), high-fat-sucrose (HFS, n= 9 males and 9 females) and high-fat-sucrose supplemented group (HFSsupp, n= 8 males and 10 females) as previously described (Cordero et al. 2011b). The Control group was fed a standard chow diet (2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Iberica, Barcelona, Spain) containing 20% of the energy as protein, 67% as carbohydrate and 13% as lipid in dry weight, whereas HFS groups were fed an obesogenic diet (D12451, Research Diets, New Brunswick, NJ, USA)

containing 20% of the energy as protein, 35% as total carbohydrates (17% sucrose) and 45% as fats in dry weight. Finally, a methyl donor supplementation cocktail that contained betaine (5 g/kg diet, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), choline (5.37 g/kg diet, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), folic acid (5.5 mg/kg diet, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) and vitamin B₁₂ (0.5 mg/kg diet, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) was mixed with HFS powderized pellets to obtain the HFS methyl supplemented diet. In order to maintain the same diet consistency, chow and HFS pellets were also powderized for the other two dietary groups. After 8 weeks of *ad libitum* dietary treatment, the animals were euthanized, blood was collected and plasma stored at -20 °C, while samples of liver, adipose depots (subcutaneous, retroperitoneal, perigonadal and mesenteric) and gastrocnemius muscle were carefully dissected, weighed and stored immediately at -80 °C. All the procedures performed agreed with the National and Institutional Guidelines of the Animal Care and Use Committee at the University of Navarra.

Serum measurements

Plasma glucose (HK-CP kit; ABX diagnostic, Montpellier, France), HDL-cholesterol (HDL direct CP; ABX diagnostic, Montpellier, France), lactate (L-Lactate; Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK), triglycerides (Triglycerides; Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK) and homocysteine (Homocysteine Enzymatic Assay; Demeditec Diagnostics, Kiel, Germany) levels were measured using automated COBAS MIRA equipment (Roche, Basel, Switzerland). Plasma insulin levels were determined by ELISA (Mercodia AB, Uppsala, Sweden) in automated TRITURUS equipment (Grifols International S.A., Barcelona, Spain).

Hepatic triglyceride content

Liver samples were homogenized with a Branson Sonifier 250 (Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, USA) and triglyceride content was measured with a commercial reagent kit (ABX Pentra, Montpellier, France) adapted for the COBAS MIRA equipment (Roche, Basel, Switzerland).

Determination of FASN promoter methylation status

The quantitative analysis of DNA methylation in the promoter region of FASN was performed using an Sequenom EpiTyper approach (Sequenom, CA, USA), which relies on base-specific cleavage followed by MALDI-TOF mass spectrometry (Milagro et al. 2011). Briefly, genomic DNA was extracted from liver samples by using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and 500 ng were modified by using EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Primers designed for quantitative analysis of the degree of FASN promoter methylation levels were aggaagagagAAGTAAGGTTTTGAGGTTTTGGTTT for forward (5'→3') and cagtaatacgaactcactatagggagaaggctCTCAACACCCACCTTTCTATAAC for reverse primers (5'→3'), amplifying from -1,177 to -688 with respect to the transcriptional start site. PCR products were excised from agarose gels, purified, treated with shrimp alkaline phosphatase to dephosphorylate unincorporated dNTPs and later processed by MassArray Matrix Liquid Handler. Samples were heat-inactivated and subsequently incubated with Transcleave mix for concurrent in vitro transcription and base-specific cleavage. After deionization with Sequenom resin, samples were transferred to the spectroCHIP array by nanodispensation. Analysis with the Sequenom MALDI-TOF MS Compact Unit was performed following a 4-point calibration with oligonucleotides of different mass provided in the Sequenom kit. Matched peak data was exported using EpiTyper software and analyzed (CpGs shown in figure 2).

Real time PCR

Total RNA was isolated from the liver according to Trizol manufacturer's instructions (Invitrogen, CA, USA) and purified with the RNeasy kit (Qiagen, MD, USA). cDNA was synthesized using RT2 Standard Kit as described by suppliers (Qiagen, MD, USA). Next, quantitative real-time PCR was performed using ABI PRISM 7900 HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, TX, USA) with RT2 qPCR commercial primers (Qiagen, MD, USA): SREBPF1 (XM_213329), ACACA (NM_022193), FASN (NM_017332), MGLL (NM_138502), CCL2 (NM_031530) and FABP4 (NM_053365). Fold change between groups was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The gene expression levels were

normalized with β -actin (ACTB, NM_031144), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, NM_017008) and cyclophilin A (PPIA, NM_017101) as internal controls and using Genorm Software.

Statistical analysis

All results are expressed as means \pm standard error (SE). Data was evaluated separately by sex using one-way ANOVA followed by a DMS post-hoc test for multiple comparisons (C, HFS, HFSsupp). The level of probability was set at $p < 0.05$ as statistically significant. All analyses were performed using SPSS 15.0 package for Windows (Chicago, IL, USA).

RESULTS

As expected, HFS induced an obese phenotype in both sexes (tables 1 and 2), although no relevant differences were found between the rats fed the HFS and HFSsupp diets regarding body weight gain, adiposity or muscle and liver weights. However, there was an increase in liver fat accumulation due to HFS diet in both sexes (96%, $p < 0.01$ in males and 29%, $p < 0.05$ in females) (Figure 1). Interestingly, the methyl donor supplementation improved this adverse dietary effect and decreased the liver triglyceride content in both males (30%, $p < 0.05$) and in females (39%, $p < 0.01$).

In this trial, the HFS diet induced a disruption of glucose homeostasis in male (Table 1) rats but not in females (Table 2). Plasma glucose (17%, $p < 0.05$) and insulin levels (112%, $p < 0.001$) were increased in males by the obesogenic diet but not in females, whereas plasma lactate levels were also higher in males fed a HFS diet (28%, $p < 0.05$) with a reversion due to the methyl supplementation (-33%, $p < 0.05$). In females a HFS-diet decreased cHDL levels (-29%, $p < 0.05$), which was reverted by the methyl donor supplementation (34%, $p < 0.05$).

The analysis of the DNA methylation patterns of the FASN promoter in males (Figure 2A) showed a significant hypomethylated status ($p < 0.001$) at CpG1 in the HFS and

Resultados

HFSsupp groups when compared to the control group. Interestingly, CpG10-11 was hypermethylated (164%, $p < 0.01$) in the HFSsupp as compared to control group, while the HFS group showed an intermediate value with no statistical differences with either of the other two groups. The obesogenic diet also decreased the methylation levels of

Table 1. Weight-related and plasma measurements of male Wistar rats after eight weeks of dietary treatments.

	Male Dietary Groups			ANOVA
	C (n=7)	HFS (n=9)	HFSsupp (n=8)	
Weight-related measurements				
Weight gain (g)	152.6 ± 7.3 ^a	191.8 ± 13.0 ^b	198.8 ± 14.0 ^b	*
Subcutaneous WAT (%)	1.89 ± 0.09 ^a	3.14 ± 0.19 ^b	3.10 ± 0.13 ^b	***
Retroperitoneal WAT (%)	2.83 ± 0.25 ^a	3.65 ± 0.16 ^b	3.72 ± 0.21 ^b	*
Epididymal WAT (%)	2.32 ± 0.20 ^a	3.10 ± 0.11 ^b	3.32 ± 0.20 ^b	**
Mesenteric WAT (%)	1.06 ± 0.11 ^a	1.45 ± 0.09 ^b	1.45 ± 0.13 ^b	*
Liver (%)	2.32 ± 0.03 ^a	2.37 ± 0.06 ^a	2.25 ± 0.05 ^a	ns
Gastrocnemius muscle (%)	0.54 ± 0.02 ^a	0.51 ± 0.01 ^a	0.51 ± 0.01 ^a	ns
Plasma values				
Glucose (mg/dL)	114.5 ± 5.3 ^a	134.0 ± 4.7 ^b	122.9 ± 5.4 ^{a,b}	*
HDL cholesterol (mg/dL)	69.2 ± 3.8 ^a	72.0 ± 2.8 ^a	79.6 ± 3.0 ^a	n.s.
Triglycerides (mg/dL)	108.4 ± 8.8 ^a	100.0 ± 11.3 ^a	103.1 ± 9.6 ^a	n.s.
Lactate (mg/dL)	25.6 ± 3.2 ^{a,b}	32.8 ± 3.2 ^a	22.1 ± 1.1 ^b	*
Homocysteine (μmol/L)	17.9 ± 1.0 ^a	18.7 ± 3.1 ^a	14.3 ± 1.0 ^a	n.s.
Insulin (μU/mL)	20.3 ± 2.4 ^a	43.1 ± 5.0 ^b	46.7 ± 3.6 ^b	***

All the results are expressed as the mean ± SE. Statistical analyses were performed using one way Anova and Tukey post-hoc test. Different letters (a, b) indicate significant differences between groups of at least $p < 0.05$. (WAT; white adipose tissue, C; control group, HFS; high-fat-sucrose group, HFSsupp; high-fat-sucrose supplemented with methyl donors group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Table 2. Weight-related and plasma measurements of female Wistar rats after eight weeks of dietary treatments.

	Female Dietary Groups			ANOVA
	C (n=9)	HFS (n=9)	HFSsupp (n=10)	
Weight-related measurements				
Weight gain (g)	68.7 ± 5.9 ^a	102.8 ± 8.9 ^b	109.4 ± 11.4 ^b	*
Subcutaneous WAT (%)	1.40 ± 0.14 ^a	2.02 ± 0.26 ^{a,b}	2.27 ± 0.28 ^b	*
Retroperitoneal WAT (%)	1.87 ± 0.19 ^a	2.70 ± 0.29 ^b	3.09 ± 0.24 ^b	**
Periovaric WAT (%)	2.42 ± 0.30 ^a	3.53 ± 0.49 ^a	3.84 ± 0.41 ^a	ns
Mesenteric WAT (%)	1.28 ± 0.18 ^a	1.63 ± 0.19 ^a	1.62 ± 0.21 ^a	ns
Liver (%)	2.18 ± 0.03 ^a	2.14 ± 0.06 ^a	2.24 ± 0.07 ^a	ns
Gastrocnemius muscle (%)	0.59 ± 0.02 ^a	0.55 ± 0.03 ^a	0.51 ± 0.04 ^a	ns
Plasma values				
Glucose (mg/dL)	103.4 ± 6.1 ^a	108.9 ± 3.7 ^a	119.3 ± 6.7 ^a	n.s.
HDL cholesterol (mg/dL)	56.8 ± 4.3 ^a	40.4 ± 4.6 ^b	54.2 ± 4.5 ^a	*
Triglycerides (mg/dL)	86.5 ± 6.9 ^a	57.7 ± 5.3 ^a	74.1 ± 13.2 ^a	n.s.
Lactate (mg/dL)	27.8 ± 4.3 ^a	26.1 ± 3.4 ^a	34.3 ± 4.7 ^a	n.s.
Homocysteine (μmol/L)	15.6 ± 1.1 ^a	15.2 ± 0.8 ^a	14.1 ± 0.9 ^a	n.s.
Insulin (μU/mL)	15.5 ± 4.7 ^a	16.4 ± 3.3 ^a	21.2 ± 4.5 ^a	n.s.

All the results are expressed as the mean ± SE. Statistical analyses were performed using one way Anova and Tukey post-hoc test. Different letters (a, b) indicate significant differences between groups of at least $p < 0.05$. (WAT; white adipose tissue, C; control group, HFS; high-fat-sucrose group, HFSsupp; high-fat-sucrose supplemented with methyl donors group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

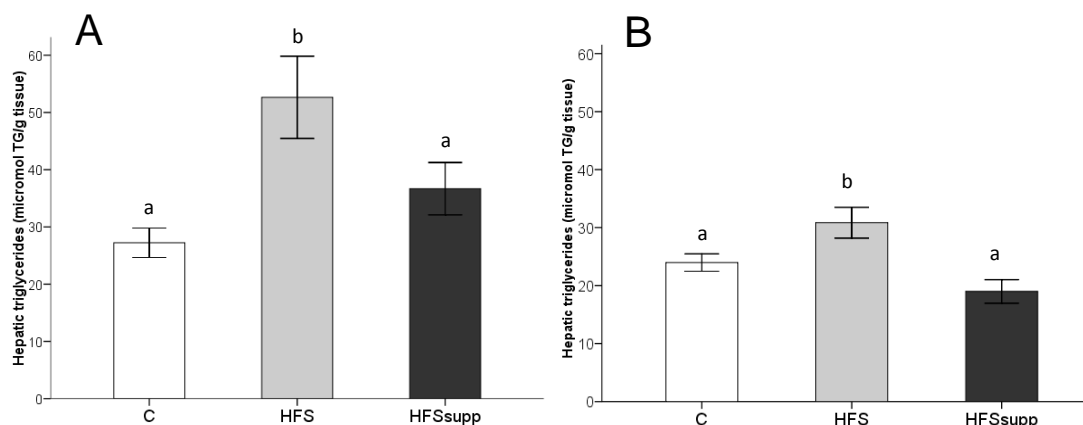


Figure 1. Hepatic triglyceride content (in μmol of triglycerides per gram of tissue) in (A) male and (B) female Wistar rats. Different letters indicate significant differences between groups of at least $p < 0.05$ (C; control group - white, HFS; high-fat-sucrose group - grey, HFSsupp; high-fat-sucrose supplemented with methyl donors group - black).

CpG17-18-19 (-50%, $p < 0.001$ HFS and -47%, $p < 0.001$ HFSsupp) in males. In females (Figure 2B), CpG1 was hypomethylated by the obesogenic diet ($p < 0.001$), as opposed to the area covered by CpG9 and CpG10-11 which showed significant changes due to the HFS diet (133%, $p < 0.05$ and 104%, $p < 0.001$) and the methyl donor supplementation increased this dietary effect (71%, $p < 0.05$ and 34%, $p < 0.001$), showing an additional effect between diet and methyl donor supplementation. CpG17-18-19 methylation profile was also similar to that presented in males, with a hypomethylation due to the obesogenic diet (-40%, $p < 0.01$ HFS and -44%, $p < 0.01$ HFSsupp). There was also a hypermethylation of CpG20-21 induced by the methyl donor supplementation when compared to both C and HFS diets (767%, $p < 0.001$), which showed a lower methylation percentage than the control group (-72%, $p < 0.01$). Finally, in females, promoter methylation mean values did not change due to diet, but presented a significant increase (40%, $p < 0.05$) when comparing HFS with HFS supplemented diet.

Additionally, the hepatic expression of some key genes involved in lipid metabolism-related genes was analyzed by RT-PCR in male Wistar rats (figure 3). Regarding *de novo*

Resultados

lipogenesis pathway, significant changes were found in ACACA expression ($p < 0.01$), which was 66% higher due to methyl donor supplementation. Whereas, SREBPF1 and

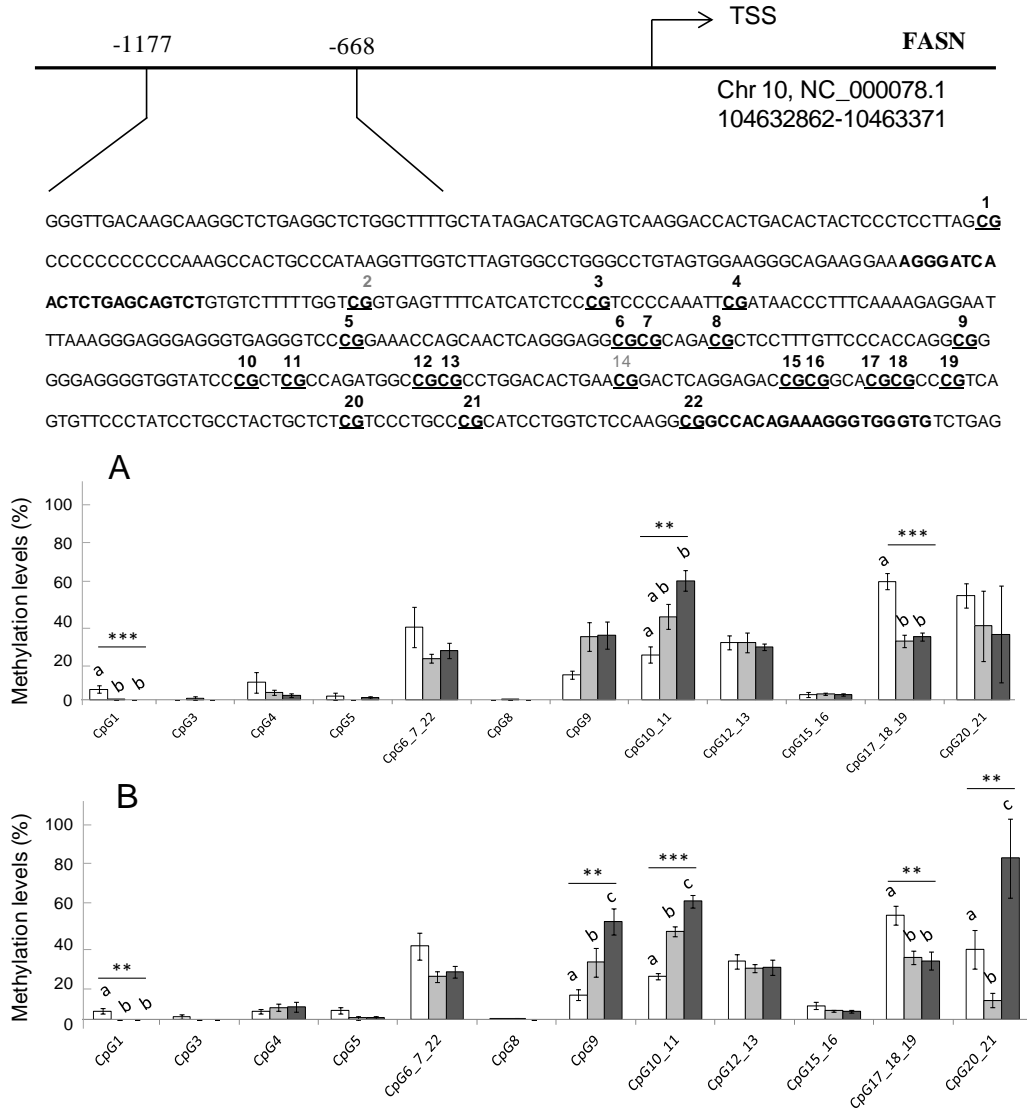


Figure 2. Quantitative DNA methylation analysis using MassARRAY system for FASN promoter in liver tissue from (A) male and (B) female Wistar rats (TSS; transcriptional start site). The results are shown as percentages of methylation. All results are expressed as mean \pm SD. Different letters indicate significant differences between groups of at least $p < 0.05$ (Control group, white; high-fat-sucrose group, grey; high-fat-sucrose supplemented with methyl donors group; black; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

FASN only showed a trend to increase ($p=0.095$ and $p=0.082$). The cytokine CCL2 was markedly downregulated (-76%, $p < 0.05$) by methyl supplementation when compared to controls, with no significant changes induced by HFS diet. The lipolytic enzyme MGLL showed a decrease in the mRNA expression levels in rats fed the obesogenic diet

(-30%, $p < 0.05$). Finally, FABP4 did not show significant differences ($p = 0.093$) between the experimental dietary groups.

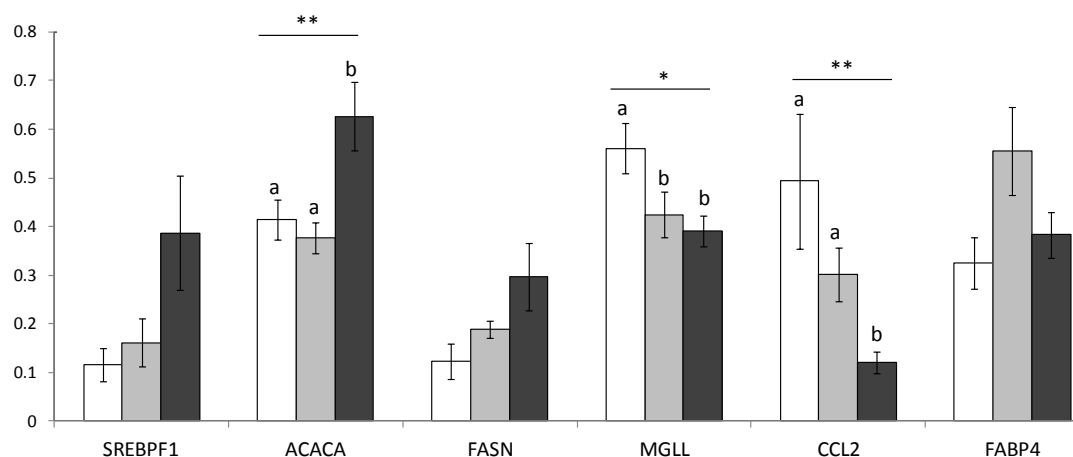


Figure 3. Expression levels (mRNA) of SREBPF1, CACA, FASN, MGLL, CCL2 and FABP4 measured by RT-PCR in liver from C, HFS and HFSsupp groups in male Wistar rats. Data are presented as mean \pm SE measured in arbitrary units after normalization with ACTB, GAPDH and PPIA. Different letters in the same gene indicate statistically significant differences between groups of at least $p < 0.05$. (control group, white; high-fat-sucrose group, grey; high-fat-sucrose supplemented with methyl donors group, black; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

DISCUSSION

NAFLD is the main early liver manifestation of the metabolic syndrome, and has a close association with obesity (Moore et al. 2010). The increased fat depots tend to expand to the visceral organs affecting their functionality (Guri et al. 2011). In this way, this research has been designed to be focused on the initial stage of liver damage, NAFLD, since it could potentially be easier to treat or revert than more advanced stages such as NASH or cirrhosis. For that reason, it was decided to supplement HFS diet for a period of eight weeks, when obese phenotype was at the beginning (Cordero et al. 2011b; Milagro et al. 2006). We analyzed all variables according to the sex, as gender is a factor that appears to confer differential vulnerability to obesogenic diets (Clark et al. 2011), since many of the relevant studies in this field have been conducted only in males. In this way, previous investigations have described that obesity-linked disorders

such as insulin and glucose homeostasis or fat depot distributions differ between sexes (Priego et al. 2008). It is also known that steroid hormones can play a role in metabolism, accumulation and distribution of the different adipose depots (Mayes et al. 2004). Thus, we decided to analyze in a separate way males and females and also, to avoid possible disturbances and errors derived from hormonal status, we determined gene expression only in male rats.

Biochemical variables were affected by an obesogenic diet and methyl donor supplementation. In males, the increase in insulin levels due to HFS diet (Boque et al. 2009) was not enough to control glucose circulating levels. Methyl donor supplemented groups presented an intermediate value that suggests a partial protection of these methyl substrates on glucose homeostasis. In this sense, previous studies during the perinatal nutrition period have shown that maternal folic acid supplementation decreases glucose levels in the offspring (Chmurzynska et al. 2011), while its depletion, together with low choline levels, leads to increased plasma glucose levels (Maloney et al. 2009). However, other studies have reported that hepatic steatosis could be associated to increased lactate levels (Kalhan et al. 2011). Lactate can be used as a substrate activating liver gluconeogenesis, which may contribute to increase glucose levels. However, HDL cholesterol, an atherogenic protective factor, is decreased in animals fed obesogenic and sucrose enriched diets (Kamgang et al. 2005) being known that this molecule removes cholesterol from the peripheral tissues transporting it to the liver to be metabolized (Tall 2008). Interestingly, in this study a methyl donor cocktail can present a beneficial cardiovascular effect in female Wistar rats by increasing cHDL plasma levels during an obesogenic-proatherogenic dietary treatment.

The dietary depletion of some micronutrients such as choline or betaine has been repeatedly used to generate models of hepatic cirrhosis (Pogribny et al. 2009; Tryndyak et al. 2011; Vetelainen et al. 2007) and betaine supplementation has been studied as a potential hepatoprotective substrate (Kathirvel 2010). Folic acid and vitamin B₁₂ have mainly been studied in periconceptual periods to prevent neural tube defects and future congenital diseases (Ba et al. 2011; Chmurzynska et al. 2011;

Dhobale et al. 2011; Wilson et al. 2007). The effects of these two promethylating vitamins are related with epigenetic changes in the offspring due to the accessibility of the DNA during early development (Ozanne et al. 2007). The supplementation cocktail we used, was tested in agouti mice and it was found that the agouti transposon was blocked by epigenetic silencing, whereas transgenerational heredability of obesity and skin colour was interrupted (Waterland et al. 2008). A previous investigation of our group (Cordero et al. 2011b) reported that the diet supplementation of promethylating agents during adulthood had a positive impact effect on hepatic triglyceride accumulation. According to the biochemical onset of this disease, different studies have reported that changes in epigenetic marks could be related to liver damage. For example, insulin resistance levels in patient with NAFLD showed a relation with PPARgamma hepatic methylation levels (Sookoian et al. 2010) and maternal hypoproteic diet is related to changes in Igf2 methylation levels in the offspring (Gong et al. 2010). On the other hand, obesogenic diets also have the potential to modify the epigenome (Campion et al. 2009), mainly during perinatal periods (Martinez et al. 2012; Vucetic et al. 2010), but also in adulthood (Lomba et al. 2010). On the contrary, the epigenetic pattern may also act as a response element for dietary treatments (Cordero et al. 2011a; Milagro et al. 2011). In this context, changes in FASN methylation in epididimal adipose tissue induced by the intake of an obesogenic diet have been reported in Wistar rats (Lomba et al. 2010). Our results concerning this key enzyme of *de novo* lipogenesis evidenced changes in its methylation pattern induced by an obesogenic diet, but also by the methyl donor supplementation.

On the other hand, in NAFLD stage the liver increases the uptake and synthesis of fat (Angulo P 2002). Thus, obese rats overexpress genes involved in *de novo* lipogenesis, including SREBPF1, ACACA and FASN. SREBPF1 is an activator of many enzymes from this pathway and also for ACACA and FASN (Kohjima et al. 2007). In this research we found a correlation (Electronic Supplementary Material, figure 4) between SREBPF1 expression and ACACA ($p < 0.05$, $r = 0.477$) and also with FASN ($p < 0.05$, $r = 0.463$). These outcomes concluded that lipid synthesis in the liver is increased by the obesogenic diet and also by methyl donor supplementation. On the other hand, MGLL lipase is involved

in the activation of intracellular triglyceride hydrolysis to fatty acids and glycerol. In our study, MGLL expression profile showed a decrease attributable to HFS effect. The impact on lipogenic and lipolytic pathways suggests that methyl donor supplementation of a HFS diet increases the total amount of triglycerides produced by the liver decreasing their accumulation, so the explanation could be described in a lipid storage-mobilization and lipolysis more than on synthesis. However, liver FFA uptake is also increased in metabolic syndrome and obesity, in such a way that this situation affects their accumulation in the liver. The analysis of FABP4 expression levels, a protein implicated in fatty acid uptake and upregulated in metabolic syndrome and obesity (Terra et al. 2011), revealed no statistical differences. This FABP isoform is highly expressed in adipose tissue but it has been also associated in liver with fat accumulation in this organ (Westerbacka et al. 2007). Curiously in our study the obesogenic diet induced a trend to increase FABP4 gene expression ($p=0.093$) that was reverted by methyl donor supplementation. Finally, although we described differences in NAFLD gene expression profile, the pathways that unravel the decrease showed in hepatic triglycerides content are still uncertain being necessary other studies to deepen into these mechanisms.

Contrary as expected, methylation levels in FASN promoter did not correlate with its gene expression levels. It should be kept in mind that the expression of this gene is not only regulated by DNA methylation; there are other epigenetic mechanisms such as histone modifications or microRNA regulation that could affect mRNA levels (Campion et al. 2009).

It appears that methyl donors do not influence fat accumulation in adipose tissue but it seems that methyl donors affect only the fat accumulation in liver (Perseghin 2011). The treatment with methyl donors may not be effective against obesity itself, but this dietary supplementation could decrease the prevalence of NAFLD as the main hepatic manifestation of metabolic syndrome, with all the comorbidities associated to this disease including insulin resistance. In this way, even if this work could be an useful tool in the treatment of NAFLD there are some limitations that researchers have to evaluate in a cautious and appropriate manner, such as the number of individuals, the

measurement of gene expression only in males or the possibility to include other technique in order to validate Sequenom results.

Summing up, supplementation with methyl donor groups in obesogenic diets reverted NAFLD development and associated features in both sexes. One possible mechanism involved in this alteration is by affecting the epigenetic machinery and by inducing DNA hypermethylation or hypomethylation. Indeed, changes in DNA methylation patterns on the FASN gene promoter were associated with the obesogenic diet intake and also with the dietary supplementation with methyl donors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The technical assistance of V. Fernandez is gratefully acknowledged as well as Alexandra Claire Simpson for checking the manuscript spelling and grammar for English. “Linea Especial (LE/97)” from University of Navarra for financial support. P. Cordero and A.M. Gomez-Uriz were recipients of predoctoral fellowships from “Asociacion de Amigos de la Universidad de Navarra”. Also RETICS and CIBERobn schemes from Carlos III Institute are gratefully acknowledged.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

ETHICAL STANDARDS

All animal manipulations were made in accordance with European Community Guidelines and University of Navarra Ethical Committee for the use of laboratory animals.

BIBLIOGRAPHY

1. Angulo P (2002) Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 346, 1221-1231.
2. Ba Y, Yu H, Liu F et al (2011) Relationship of folate, vitamin B₁₂ and methylation of insulin-like growth factor-II in maternal and cord blood. *Eur J Clin Nutr.* 65, 480-485. doi: 410.1038/ejcn.2010.1294.
3. Bastarrachea RA, López-Alvarenga JC, Bolado-García VE, Téllez-Mendoza J, Laviada-Molina H & AG C (2007) [Macrophages, inflammation, adipose tissue, obesity and insulin resistance]. *Gac Med Mex.* 143, 505-512.
4. Boque N, Campion J, Paternain L et al (2009) Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. *J Physiol Biochem.* 65, 387-395.
5. Brunaud L, Alberto JM, Ayav A et al (2003) Effects of vitamin B₁₂ and folate deficiencies on DNA methylation and carcinogenesis in rat liver. *Clin Chem Lab Med.* 41, 1012-1019. doi: 1010.1515/CCLM.2003.1155.
6. Campion J, Milagro FI & Martinez JA (2009) Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev.* 10, 383-392. doi: 310.1111/j.1467-1789X.2009.00595.x.
7. Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI & Nieto N (2005) A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *Faseb J.* 19, 136-138. doi: 110.1096/fj.1004-2291fje.
8. Chen CH, Nien CK, Yang CC & Yeh YH (2010) Association between nonalcoholic fatty liver disease and coronary artery calcification. *Dig Dis Sci.* 55, 1752-1760. doi: 1710.1007/s10620-10009-10935-10629.
9. Chmurzynska A, Stachowiak M, Gawecki J, Pruszyńska-Oszmialek E & Tubacka M (2011) Protein and folic acid content in the maternal diet determine lipid metabolism and response to high-fat feeding in rat progeny in an age-dependent manner. *Genes Nutr.* doi: 10.1007/s12263-12011-10253-12267.

10. Clark C, Smith W, Lochner A & du Toit EF (2011) The effects of gender and obesity on myocardial tolerance to ischemia. *Physiol Res.* 60, 291-301.
11. Cordero P, Campion J, Milagro FI et al (2011) Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem.* 67, 463-470. doi: 410.1007/s13105-13011-10084-13104.
12. Cordero P, Campion J, Milagro FI & Martinez JA (2011) Dietary supplementation with methyl donor groups could prevent nonalcoholic fatty liver. *Hepatology.* 53, 2151-2152. doi: 2110.1002/hep.24164.
13. Dhobale M & Joshi S (2011) Altered maternal micronutrients (folic acid, vitamin B₁₂) and omega 3 fatty acids through oxidative stress may reduce neurotrophic factors in preterm pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* doi:10.3109/14767058.14762011.14579209.
14. Dinant S, Vetelainen RL, Florquin S, van Vliet AK & van Gulik TM (2007) IL-10 attenuates hepatic I/R injury and promotes hepatocyte proliferation. *J Surg Res.* 141, 176-182. doi:110.1016/j.jss.2006.1009.1018.
15. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P & Foufelle F (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 86, 839-848. doi:810.1016/j.biochi.2004.1009.1018.
16. Edens MA, Kuipers F & Stolk RP (2009) Non-alcoholic fatty liver disease is associated with cardiovascular disease risk markers. *Obes Rev.* 10, 412-419. doi: 410.1111/j.1467-1789X.2009.00594.x.
17. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL et al (2006) Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology.* 44, 865-873. doi 810.1002/hep.21327.
18. Fu JF, Shi HB, Liu LR et al (2011) Non-alcoholic fatty liver disease: An early mediator predicting metabolic syndrome in obese children? *World J Gastroenterol.* 17, 735-742. doi: 710.3748/wjg.v3717.i3746.3735.

19. Gaemers IC, Stallen JM, Kunne C et al (2011) Lipotoxicity and steatohepatitis in an overfed mouse model for non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta.* 1812, 447-458. doi:410.1016/j.bbadis.2011.1001.1003.
20. Gong L, Pan YX & Chen H (2010) Gestational low protein diet in the rat mediates Igf2 gene expression in male offspring via altered hepatic DNA methylation. *Epigenetics.* 5, 619-626. doi: 610.4161/epi.4165.4167.12882.
21. Guri AJ & Bassaganya-Riera J (2011) Systemic effects of white adipose tissue dysregulation and obesity-related inflammation. *Obesity (Silver Spring).* 19, 689-700. doi:610.1038/oby.2010.1230.
22. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R et al (2008) Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 27, 412-421. doi: 410.1111/j.1365-2036.2007.03586.x.
23. Kalhan SC, Guo L, Edmison J et al (2011) Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 60, 404-413. doi:410.1016/j.metabol.2010.1003.1006.
24. Kamgang R, Mboumi RY, N'Dille G P & Yonkeu JN (2005) Cameroon local diet-induced glucose intolerance and dyslipidemia in adult Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract.* 69, 224-230. doi:210.1016/j.diabres.2005.1002.1005.
25. Kathirvel E, Morgan K, Nandgiri G et al (2010) Betaine improves nonalcoholic fatty liver and associated hepatic insulin resistance: a potential mechanism for hepatoprotection by betaine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 299, G1068-1077. doi:1010.1016/j.diabres.2005.1002.1005.
26. Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N et al (2007) Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med.* 20, 351-358.
27. Koot BG, van der Baan-Slootweg OH, Tamminga-Smeulders CL et al (2011) Lifestyle intervention for non-alcoholic fatty liver disease: prospective cohort study of its efficacy and factors related to improvement. *Arch Dis Child.* 96, 669-674.

28. Lomba A, Martinez JA, Garcia-Diaz DF et al (2010) Weight gain induced by an isocaloric pair-fed high fat diet: a nutriepigenetic study on FASN and NDUF6 gene promoters. *Mol Genet Metab.* 101, 273-278. doi:210.1016/j.ymgme.2010.1007.1017.
29. Maloney CA, Hay SM & Rees WD (2009) The effects of feeding rats diets deficient in folic acid and related methyl donors on the blood pressure and glucose tolerance of the offspring. *Br J Nutr.* 101, 1333-1340. doi:1310.1017/S0007114508066798.
30. Martinez JA, Cordero P, Campion J & Milagro FI (2012) Interplay of early-life nutritional programming on obesity, inflammation and epigenetic outcomes. *Proc Nutr Soc.* (in press).
31. Mayes JS & Watson GH (2004) Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev.* 5, 197-216. doi: 110.1111/j.1467-1789X.2004.00152.x.
32. Milagro FI, Campion J, Cordero P et al (2011) A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *Faseb J.* 25, 1378-1389. doi: 1310.1096/fj.1310-170365.
33. Milagro FI, Campion J & Martinez JA (2006) Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring).* 14, 1118-1123. doi: 1110.1038/oby.2006.1128.
34. Moore JB (2010) Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc.* 69, 211-220. doi: 210.1017/S0029665110000030.
35. Ozanne SE & Constancia M (2007) Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 3, 539-546. doi:510.1038/ncpendmet0531.
36. Perseghin G (2011) Lipids in the wrong place: visceral fat and nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care.* 34 Suppl 2, S367-370. doi: 310.2337/dc2311-s2249

37. Pogribny IP, Tryndyak VP, Bagnyukova TV et al (2009) Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet. *J Hepatol.* 51, 176-186. doi: 110.1016/j.jhep.2009.1003.1021.
38. Priego T, Sanchez J, Pico C & Palou A (2008) Sex-differential expression of metabolism-related genes in response to a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring).* 16, 819-826. doi:810.1038/oby.2007.1117.
39. Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J & Green RM (2008) Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res.* 49, 1068-1076. doi: 1010.1194/jlr.M800042-JLR800200.
40. Sookoian S, Gianotti TF, Rosselli MS, Burgueno AL, Castano GO & Pirola CJ (2010) Liver transcriptional profile of atherosclerosis-related genes in human nonalcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis.* 218, 378-385. doi:310.1016/j.atherosclerosis.2011.1005.1014.
41. Starlard-Davenport A, Tryndyak V, Kosyk O et al (2010) Dietary methyl deficiency, microRNA expression and susceptibility to liver carcinogenesis. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 3, 259-266. doi:210.1159/000324362.
42. Strable MS & Ntambi JM (2010) Genetic control of *de novo* lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 45, 199-214. doi: 110.3109/10409231003667500.
43. Tall AR (2008) Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med.* 263, 256-273. doi: 210.1111/j.1365-2796.2007.01898.x.
44. Terra X, Quintero Y, Auguet T et al (2011) FABP 4 is associated with inflammatory markers and metabolic syndrome in morbidly obese women. *Eur J Endocrinol.* 164, 539-547. doi: 510.1530/EJE-1510-1195

45. Tryndyak VP, Han T, Muskhelishvili L et al (2011) Coupling global methylation and gene expression profiles reveal key pathophysiological events in liver injury induced by a methyl-deficient diet. *Mol Nutr Food Res.* 55, 411-418. doi: 410.1002/mnfr.201000300.
46. Vetelainen R, van Vliet A & van Gulik TM (2007) Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *J Gastroenterol Hepatol.* 22, 1526-1533. doi: 1510.1111/j.1440-1746.2006.04701.x.
47. Vucetic Z, Kimmel J, Totoki K, Hollenbeck E & Reyes TM (2010) Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology.* 151, 4756-4764. doi: 4710.1210/en.2010-0505.
48. Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, Rached MT & Mirza S (2008) Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obes (Lond).* 32, 1373-1379. doi: 1310.1038/ijo.2008.1100.
49. Westerbacka J, Kolak M, Kiviluoto T et al (2007). Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes.* 56, 2759-2765.
50. Wilson RD, Johnson JA, Wyatt P et al (2007) Pre-conceptional vitamin/folic acid supplementation 2007: the use of folic acid in combination with a multivitamin supplement for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. *J Obstet Gynaecol Can.* 29, 1003-1026.

Capítulo 3/Chapter 3. Transcriptomic and epigenetic changes in early liver steatosis and the preventive effect of dietary methyl donor supplementation

Transcriptomic and epigenetic changes in early liver steatosis and the preventive effect of dietary methyl donor supplementation

Cordero P, Campion J, Milagro FI, Martinez JA

Sent to International Journal of obesity (Impact Factor: 4.641; 6/74)

Resumen

Antecedentes & objetivos: La enfermedad de hígado graso no alcohólico es una de las principales manifestaciones del síndrome metabólico. La suplementación con sustancias donantes de grupos metilo podrían proteger de esta enfermedad en un origen temprano de su evolución. Nuestro objetivo fue investigar los mecanismos transcriptómicos y epigenéticos implicados en la acumulación de grasa en el hígado como resultado de una dieta obesogénica y el papel de la suplementación de las sustancias donadoras de grupos metilo.

Métodos: 48 ratas Wistar machos fueron asignadas a cuatro diferentes grupos dietéticos durante 8 semanas; control, control suplementado con sustancias prometilantes, rico en grasa y sacarosa y rico en grasa y sacarosa suplementado con un cóctel de betaína, colina, vitamina B₁₂ y ácido fólico.

Resultados: La acumulación de grasa en el hígado inducida por una dieta rica en grasa y azúcares simples (HFS) fue prevenida en los animales alimentados con la dieta HFS y suplementados con sustancias donadoras de grupos metilo. Respecto a los resultados del microarray, fueron seleccionados doce genes (*Lepr*, *Btc*, *Srebf2*, *Mme*, *Fbxo21*, *Agpat3*, *Esr1*, *Mif*, *Mst1*, *Fat1*, *Gsr*, *Acp1*) y positivamente validados mediante RT-PCR.

La metilación global del ADN en el hígado disminuyó con la suplementación con grupos metilo, pero sólo en los animales alimentados con una dieta control. Los niveles de metilación de varios sitios CpG de los promotores de *Btc*, *Srebf2*, *Mme* y *Mif* presentaron cambios debidos tanto a la dieta obesogénica como a su suplementación con sustancias pormetilantes, aunque se encontró una asociación con los niveles de ARNm cuantificado. Interesantemente, los niveles de metilación en el sitio CpG 23_24 de *Srebf2* (correspondiente a -167pb y -156pb respecto del inicio de la transcripción) se correlacionaron con el HDL colesterol plasmático, mientras que el nivel de metilación de *Esr1* en su CpG 14 (-2623pb) fue asociado al peso y a la cantidad de grasa corporal y hepática.

Conclusiones: El incremento de grasa hepática inducido por una dieta HFS fue prevenido por la suplementación con sustancias donadoras de grupos metilo. Tanto la dieta como la suplementación modificaron el perfil hepático de ARNm y la metilación del ADN de los promotores de genes específicos.

Transcriptomic and epigenetic changes in early liver steatosis and the preventive effect of dietary methyl donor supplementation

Paúl Cordero, Javier Campión, Fermín I. Milagro, J. Alfredo Martínez

Department of Nutrition and Food Sciences, Physiology and Toxicology

University of Navarra, c/ Irunlarrea 1, 31008. Pamplona, Spain

CORRESPONDING AUTHOR

Prof. J. Alfredo Martínez

Department of Nutrition, Food Science, Physiology and Toxicology

University of Navarra

C/Irunlarrea s/n

31008 Pamplona, SPAIN

Phone: 0034 948 425600

Fax: 0034 948 425649

E-mail address: jalfmtz@unav.es

ABSTRACT

Background & aims: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease is an important metabolic syndrome feature. Dietary methyl donor-supplementation may protect this disorder during early developmental stages. The aim was to investigate the transcriptomic and epigenetic mechanisms implicated in liver fat accumulation as a result of an obesogenic diet and the role of dietary methyl donors.

Methods: Forty-eight male Wistar rats were assigned into four dietary groups for 8 weeks; control, control methyl-donor-supplemented, high-fat-sucrose and high-fat-sucrose supplemented with a cocktail containing betaine, choline, vitamin B₁₂ and folic acid.

Results: Liver fat accumulation induced by a high-fat-sucrose (HFS) diet was prevented by methyl donor supplementation in HFS-fed animals. According to microarray results twelve genes (Lepr, Btc, Srebf2, Mme, Fbxo21, Agpat3, Esr1, Mif, Mst1, Fat1, Gsr, Acp1) were selected and positively validated by RT-PCR. Liver global DNA methylation was decreased by methyl donor supplementation, but only in control-fed animals. Methylation levels of several CpG sites from Btc, Srebf2, Mme and Mif promoter region showed changes due to the obesogenic diet and the supplementation with methyl donors, although no associations with mRNA levels were found. Interestingly Srebf2 CpG23_24 methylation levels (corresponding to -167bp and -156bp respect to the transcriptional start site) correlated with HDLc plasma levels, whereas Esr1 CpG14 (-2623bp) methylation levels were associated with body and liver weights and fat content.

Conclusions: HFS diet-induced liver fat accumulation was prevented by methyl donor supplementation. Both obesogenic diet and methyl donor supplementation modified the mRNA hepatic profile as well as global and specific gene promoters DNA methylation.

Key words: Liver steatosis; methyl donor supplementation; obesity; high-fat-sucrose diet; epigenetic; DNA methylation; microarray; NAFLD; promoter; Srebf2; Esr1

INTRODUCTION

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), a highly prevalent liver disease, is defined as a pathological accumulation of the triglycerides on the hepatocyte in absence of alcohol consumption [1]. NAFLD is considered the first hepatic manifestation of the metabolic syndrome affecting up to 60-70% of diabetic and obese patient [2], whose progression leads to Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) and cirrhosis, that may end in hepatocellular carcinoma or hepatic-related complication death [3]. However, NAFLD is a reversible stage of the hepatic injury and weight loss usually improves it, which is accompanied by an improvement of metabolic syndrome markers [4].

Liver is the primary organ responsible for regulating lipid and glucose metabolism, including lipogenesis, fatty acid oxidation, glycogenesis and glycogenolysis [5]. Because the liver plays a central role in whole body lipid metabolism, NAFLD leads to changes on transcriptional status that may compromise final protein/enzyme conformations and functionalities and contribute to the onset and progression of many chronic diseases, including atherosclerosis, diabetes and obesity [5-7].

The epigenetic marks are particularly prone to change during embryogenesis [8], gestation and lactation [9], although it has been demonstrated that some environmental changes could induce variations in DNA methylation profile during adult life. In the last years, several examples of dynamical changes in DNA methylation due to nutritional intervention have been reported in humans including caloric deprivation [10, 11], obesity [12], vegetarian [13] and protein-restricted diets [14], and after micronutrient supplementation [15, 16]. In this sense, the effects of methyl donor supplementation has been studied in both human and animal models during pregnancy [17, 18] and adulthood [19, 20].

The aim of this study was to analyze/investigate the transcriptomic and epigenetic mechanisms implicated in liver fat accumulation after consuming an obesogenic diet and the protective effect by methyl donor supplementation. With this purpose, we performed a gene expression microarray subsequently validated by RT-PCR, as a transcriptomic tool, and, as an epigenetic approach we measured liver global DNA

methylation and the specific promoter methylation status on some key metabolic genes.

MATERIAL AND METHODS

Animal, diets and experimental design

A total of 48 male twelve-week-old Wistar rats (initial body weight 346 ± 3 g) supplied by the Applied Pharmacobiology Center (CIFA, Pamplona, Spain) were housed at 22°C with 12h-light cycle (8 a.m. – 8 p.m.) and assigned to four different dietary groups; control diet (C, n=12), control supplemented with methyl donors (C supp, n=12), high-fat-sucrose diet (HFS, n=12) and high-fat-sucrose supplemented with methyl donors (HFS supp, n=12). Control diet groups were fed a standard chow diet (2014 Teckland Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Iberica, Barcelona, Spain) containing 20% of energy as protein, 67% as carbohydrate and 13% as lipid, whereas HFS groups were fed an obesogenic diet (D12451, Research Diets, New Brunswick, New Jersey, USA) containing 20% of energy as protein, 35% as carbohydrates (17% as sucrose) and 45% as lipid. A methyl donor supplementation cocktail was added to C supp and HFS supp groups containing betaine (5g/kg diet, Sigma Aldrich, Missouri, USA), choline (5.37 g/Kg diet, Sigma Aldrich, Missouri, USA), folic acid (5.5 mg/Kg diet, Sigma Aldrich, Missouri, USA) and vitamin B₁₂ (0.5 mg/Kg diet, Sigma Aldrich, Missouri, USA) as described by Waterland et al [18]. Animals were fed *ad libitum* for eight weeks. At initial, intermediate and final points of intervention body length was measured after anesthetized and total fat mass by magnetic resonance was also quantified using an EcoMRI analyzer. After the dietary treatment, the animals were euthanized, blood was collected and plasma stored at -20°C, while samples of liver, gastrocnemius and extensor digitorum longus (EDL) muscles and adipose tissue (mesenteric, retroperitoneal, epididymal and subcutaneous depots) were dissected, weighted and stored at -80°C for later analysis. All the procedures were performed in agreement with the National and Institutional guidelines of the Animal Care and Use Committee at the University of Navarra.

Total body, liver and muscle fat content

The initial, intermediate and final fat mass was measured by using EcoMRI analyzer (Echo Medical Systems, Houston, Texas, USA), a quantitative magnetic resonance technique as described elsewhere [21]. Scans were performed by placing animals into a thin-walled cylinder with a plastic insert added to limit movement. Liver and gastrocnemius and EDL muscle fat content were measured with an especial adaptor for tissue samples scanning.

Plasma analysis

Plasma glucose (HK-CP kit; ABX diagnostics, Montpellier, France), triglycerides (Triglycerides; Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK), free fatty acids (FFA) (NEFA-HR-2 kit; WAKO Chemicals GmbH, Neuss, Germany), total cholesterol (Cholesterol-CP; ABX diagnostics, Montpellier, France), HDL cholesterol (HDL direct-CP; ABX diagnostics, Montpellier, France), homocysteine (Homocysteine Enzymatic Assays; Demeditec Diagnosis, Kiel, Germany), alanine transaminase (ALT CP; ABX diagnostics, Montpellier, France) and aspartate transaminase (AST CP; ABX diagnostics, Montpellier, France) were measured using automated ABX Pentra c200 equipment (Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, France).

RNA isolation and reverse transcription

Total RNA (n=12 for each experimental dietary group) was extracted from frozen hepatic tissue according to Trizol manufacturer's instructions (Invitrogen, California, USA). RNA quantity and quality were checked by Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Delaware, USA) and Experion Bioanalyzer automated electrophoresis station (Bio-Rad Laboratories, California, USA). RNA was treated with DNase using RNeasy Micro Kit as described by the suppliers (Qiagen, Maryland, USA) and retrotranscribed with Ambion WT Expression Kit (Ambion, California, USA).

Gene expression microarray

cDNA samples (n=6 for each experimental dietary group) were fragmented and labeled with transferase applying WT Terminal Labeling kit (Affymetrix, California, USA). Gene Titan Hybridation, Wash and Stain Kits (Affymetrix, California, USA) were used for analyzing the Rat Gene 1.1 ST 24-Array Plate (Affymetrix, California, USA). Data were normalized by Robust Multichip Average algorithm (RMA) and p-values adjusted by Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR-BH). Array Studio statistical software (OmicSoft Corporation, North Carolina, USA) was applied for processing the results.

Real-time PCR

Quantitative real-time PCR (n=12 for each experimental dietary group) was performed by triplicate using ABI PRISM 7900 HT Fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Texas, USA) and Taqman primers (Applied Biosystems, Texas, USA) for leptin receptor, (Lepr; Rn00561465_m1), betacellulin (Btc; Rn00673281_m1*), sterol regulatory element binding transcription factor 2 (Srebf2; Rn01502638_m1*), membrane metallo-endopeptidase (Mme; Rn00561572_m1*), F-box protein 21 (Fbxo21; Rn1481517_m1*), 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3 (Agpat3; Rn01428230_m1*), estrogen receptor 1 (Esr1; Rn01640372_m1*), macrophage migration inhibitory factor (Mif; Rn00821234_g1*), macrophage stimulating 1 (Mst1; Rn005777395_m1*), FAT tumor suppressor homolog 1 (Fat1; Rn00676791_m1*), glutathione reductase (Gsr; Rn00588153_m1*), and acid phosphatase 1 (Acp1; Rn00824605_g1). Fold change between groups was calculated using 2- $\Delta\Delta C_t$ method. cDNA integrity was checked with 18S (Hs99999901_s1) probe and gene expression levels were normalized with beta-actin (Actb; Rn00667869_m1*) as internal control.

DNA isolation

DNA from liver samples (n=12 for each experimental dietary group) was isolated using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and was quantified with PicoGreen DNA Quantification Reagent (Invitrogen, California, USA) as previously described [11].

Global DNA methylation

Global DNA methylation was measured using [3H] dCTP extension assay [22]. Thus, 300 µg of genomic DNA (n=7 for each experimental dietary group) were digested by triplicate overnight with HpaII or MspI endonuclease enzymes according to manufacturer's protocols (New England Biolabs, Maryland, USA). Another DNA aliquot was incubated without enzymes as background control. The single nucleotide extension reaction was performed in a 28 µL reaction mix containing 280 ng of DNA, 1 X PCR Gold Buffer, 1.0 mM MgCl₂, 0.28 U. of Ampitaq Gold polymerase (Applied Biosystems, Texas, USA), 0.38 µL dCTP[5-3H] (American Radiolabeled Chemicals, Missouri, USA) and incubated at 56°C for 1 hour. 25 µL from each reaction were applied on Whatman DE-81 ion-exchange filters (Whatman, Kent, UK) and air-dried for 1.5 hours. Then, filters were washed three times with Sodium-Phosphate buffer (0.5 M, pH 7.0) and radioactivity measured by liquid scintillation counting (Wallmac 1409, Pharmacia, Uppsala, Sweden). Background results were substrated from enzyme-treated samples and global DNA methylation calculated as described previously described [22].

Methylation profile by MALDI-TOF mass spectrometry

Amplicons covering Btc, Srebf2, Mme, Agpat3, Esr1 and Mif promoter regions were designed (Table 1) and tested for EpiTyper approach (Sequenom, California, USA). Thus, 500 ng of gDNA from each sample (n=4-6 for each experimental dietary group) were bisulfite-converted by using EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, California, USA). PCR products were run in an agarose gel to check their integrity and specificity. Samples were treated with Shrim alkaline phosphatase and incubated with T-Cleave Mix for later deionization with Clean Resin. Samples were dispensed onto SpectroCHIP array (Sequenom, California, USA) by nanodispensation and measured by Sequenom MALDI-TOFF MS Compact Unit. EpiTyper Software was used for data analysis [20]. The CpG sites that presented statistical changes in their methylation levels were scanned for the search of binding consensus motifs using Alibaba 2.1 TF Binding Prediction Software [23].

Resultados

Table 1. Primer characteristics for Sequenom analysis.

GENE	Strand	Size (bp)	Primers	Genomic region	Amplificated CpGs	Analyzed CpGs
Btc	Right	400	L: aggaagagagGAAGGATTTAGTTGTGGGGTAGTTT R: cagtaatac.gactcactataggagaaggctAAAAAAAAACCTCATATATCACCA	chr14: 18194097-18194496	9	9
Sreb12	Forward	467	L: aggaagagagTTTTTTTAAATTAGAGGAAGGTTG R: cagtaatac.gactcactataggagaaggctTAAAAATCTCCATAATCTCCAAACC	chr7: 120522233-120522699	44	35
Mme	Right	425	L: aggaagagagGGAATGGTTAAATTTTGTATTTTAAATGA R: cagtaatac.gactcactataggagaaggctCTCCCAAATCACACTAAATAATCAC	chr2: 153031382-153031806	38	14
Agpat3	Forward	458	L: aggaagagagGTTTTGTTGTTTGGAAATTTATA R: cagtaatac.gactcactataggagaaggctCCTCAATATAAAATCCCTCCCTTA	chr20: 10719378-10719835	14	13
Esr1	Forward	441	L: aggaagagagGGTTGGAGTTTTTTTTAGGAATGTT R: cagtaatac.gactcactataggagaaggctCCTCCTTCTCCAATAAAATACAAA	chr1: 35523480-35523920	17	17
Mif	Forward	500	L: aggaagagagTAAGGTAAGGAAGGATTGTTTTT R: cagtaatac.gactcactataggagaaggctATAACCCAAATCTAAAACCTAAACTAC	chr20: 13191520-13192019	24	21

Chr., chromosome; bp, base pair

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm standard error (SE). Data were evaluated using two ways ANOVA test (Diet X Supplementation) followed by DMS post-hoc test for multiple comparisons when applicable. One way ANOVA was used for the analysis of the microarray results. The level of probability was set at $p < 0.05$ as statistically significant. Pearson's rank correlation coefficient was used for comparing the two gene expression measurement techniques, microarray and RT-PCR, in order to confirm the microarray data and calculate expression levels with larger number of samples. Pearson's rank correlation was also used to link methylation status of relevant CpGs with the main phenotype and biochemical variables. All the statistical analyses were performed using SPSS 15.0 program for Windows (SPSS, Illinois, USA).

RESULTS

Animals fed *ad libitum* a HFS diet during eight weeks developed the usual obesity phenotype of this experimental model (Table 2), showing an increase in body weight clearly associated with higher body fat content and growth when compared with control fed animals. Higher levels of liver fat depots and the weight of liver as well as gastrocnemius and EDL muscle fat content were also induced by the obesogenic diet with respect to control diet. On the other hand, methyl donor supplementation in rats

fed the obesogenic diet induced some protection against liver fat accumulation mainly found in with obesogenic diet fed groups.

Regarding biochemical variables/markers (Table 3), FFA levels were decreased in the HFS fed rats. Furthermore, HFS feeding also augmented total and HDL cholesterol plasma levels leading to affect atherogenic index value. The methyl donor supplementation cocktail intake increased total plasma cholesterol by elevating both LDLc and HDLc without altering the atherogenic index. Finally, transaminases (AST/ALT) ratio, a biochemical marker for liver damage, decreased by the administration of methyl donor substrates in control-fed rats (-22%).

Table 2. Phenotypic characteristics and fat depots distribution of different experimental groups.

	C	C supp	HFS	HFS supp	ANOVA 2x2		
					DIET	SUPP	DIET x SUPP
Body weight (g)	402.6 ± 10.0	404.6 ± 8.1	479.6 ± 13.5	472.8 ± 9.3	***	ns	ns
Body fat mas (g)	64.5 ± 3.8	62.5 ± 5.1	113.4 ± 10.7	123.7 ± 9.2	***	ns	ns
Body growth (cm)	1.84 ± 0.21	1.63 ± 0.21	2.13 ± 0.21	2.50 ± 0.18	**	ns	ns
Liver							
weight (g)	9.62 ± 0.32	9.80 ± 0.26	11.26 ± 0.45	10.64 ± 0.33	**	ns	ns
fat content (mg)	392.1 ± 40.3	370.8 ± 28.8	788.7 ± 81.0	560.6 ± 57.2	***	*	ns
Gastrocnemius muscle							
weight (g)	2.06 ± 0.08	2.07 ± 0.07	2.29 ± 0.06	2.12 ± 0.05	-	-	-
fat content (mg)	94.9 ± 2.7	99.9 ± 2.7	114.8 ± 5.2	112.8 ± 3.8	***	ns	ns
EDL muscle							
weight (g)	0.70 ± 0.02	0.68 ± 0.02	0.72 ± 0.02	0.70 ± 0.03	-	-	-
fat content (mg)	23.6 ± 1.4	22.0 ± 1.5	26.4 ± 1.6	30.8 ± 3.1	**	ns	ns

Two way ANOVA test to analyze the interaction between diet and methyl donor supplementation. DMS post-hoc test was applied when possible. Values are means ± SE (n=12 for each experimental group). EDL, extensor digitorum longus; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

Resultados

Table 3. Biochemical characteristics of different experimental groups.

	C	C supp	HFS	HFS supp	ANOVA 2x2		
					DIET	SUPP	DIET x SUPP
Glucose (mg/dL)	127.1 ± 5.4	134.3 ± 4.1	139.4 ± 6.1	141.6 ± 5.6	ns	ns	ns
Triglycerides (mg/dl)	118.0 ± 7.9	119.8 ± 14.1	98.4 ± 7.0	95.9 ± 6.7	ns	ns	ns
Free fatty acids (mg/dL)	0.96 ± 0.10	0.99 ± 0.08	0.74 ± 0.07	0.74 ± 0.02	**	ns	ns
Total cholesterol (mg/dL)	74.5 ± 4.6	89.3 ± 5.8	87.2 ± 5.1	102.0 ± 7.1	*	*	ns
HDL cholesterol (mg/dL)	22.3 ± 0.8	25.3 ± 1.0	20.5 ± 1.1	23.9 ± 1.3	ns	**	ns
LDL cholesterol (mg/dL)	28.6 ± 4.1	40.0 ± 6.7	44.1 ± 3.0	58.9 ± 6.1	**	*	ns
Atherogenic index	3.32 ± 0.11	3.51 ± 0.12	4.06 ± 0.09	4.26 ± 0.17	***	ns	ns
Homocysteine (µg/dL)	20.3 ± 2.6	21.6 ± 1.4	19.1 ± 1.6	18.5 ± 2.1	ns	ns	ns
AST/ALT	2.62 ± 0.13 ^a	2.04 ± 0.08 ^b	2.92 ± 0.14 ^{bc}	3.27 ± 0.2 ^c	***	ns	**

Two way ANOVA test to analyze the interaction between diet and methyl donor supplementation. DMS post-hoc test was applied when possible. Values are means ± SE (n=10-12 for each experimental group). Different letters indicate significant differences between groups of at least $p < 0.05$. HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine transaminase; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

A nutrigenomic approach using a gene expression microarray was used for screening novel candidate genes for NAFLD and its prevention by the methyl donor supplementation. By one way ANOVA, a statistical significance was observed in 35 candidate genes when applying FDR-BH $p < 0.05$ (standard p value < 0.00005) and in 76 genes when applying FDR-BH $p < 0.10$ (standard p value < 0.00005) (gene list attached as supplementary material). In order to validate these results by RT-PCR, 12 genes were chosen according to their fold change and biological relevance. Six of them were upregulated (Lepr, Btc, Agpat3, Esr1, Mst1, Fat1) and four downregulated (Srebf2, Mme, Mif, Gsr) by HFS feeding. Moreover, seven of them were partially affected by methyl donor dietary supplementation (Lepr, Btc, Mme, Fbxo21, Mif, Gsr, Acp1). Figure 1 shows the close correlation between the results of both techniques (microarray and RT-PCR); including p values from 1.2×10^{-10} to 0.044 and r values between 0.951 and 0.433. Obesity-related genes Lepr and Esr1 increased their mRNA levels in the HFS groups when comparing with C groups, probably trying to counteract the obese phenotype. Btc, cellular proliferation-related gene, Agpat3, involved in triacylglycerol synthesis and Mst1, a liver size controller, augmented also their expression in the HFS-fed animals with respect to the control groups. Contraryously, HFS diet induced a decrease in liver mRNA levels of Srebf2, Mme, Mif and Gsr. Lepr expression increased (+104%) in rats fed the HFS supplemented diet with respect to the HFS diet, while a relative increase of Lepr mRNA levels (19%) was observed in C supp group when compared to C.

Resultados

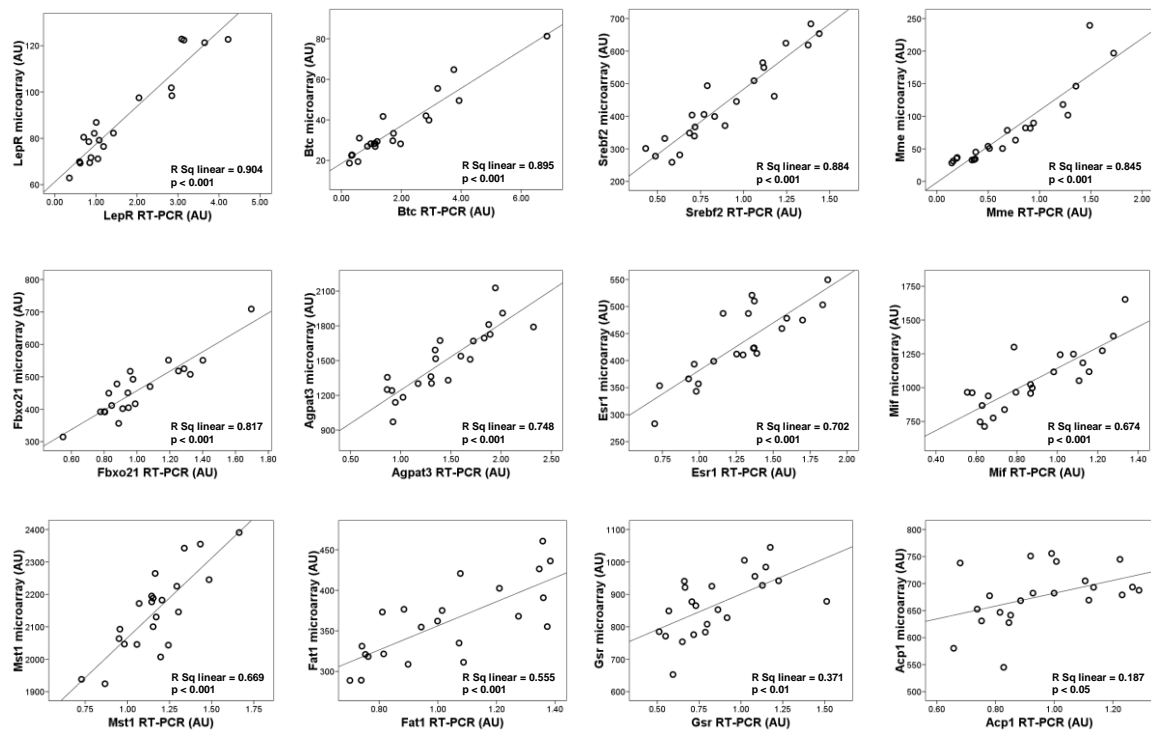


Figure 1. Illumina microarray data (X axis) validation by RT-PCR (Y axis). Pearson's correlation test with the results of both analysis (n=22) including p value and R Sq linear value (AU; arbitrary units).

No effects were found in global DNA methylation by HFS feeding (Figure 3). However, methyl donor supplementation decreased global genomic DNA methylation in control fed animals (-6%). We also analyzed the methylation levels on *Btc*, *Srebf2*, *Mme*, *Agpat3*, *Esr1* and *Mif* promoter regions (Figure 4 and Supplementary figures S5 and S6). Promoter methylation level is usually associated with gene expression levels. High mean methylation levels were found in the promoters of *Agpat3* and *Btc* (from 72% to 83%), low levels in *Mif*, *Mme* and *Srebf2* (from 2% to 6%) and intermediate levels in *Esr1* (from 21% to 32%). High-fat-sucrose feeding induced an elevation of +17.4% on *Agpat3* CpG10 methylation levels when compared to control-fed animals. The obesogenic diet also decreased *Esr1* CpG14 (-2623bp with respect to transcriptional start site) methylation (-13.4%), which was strongly associated with obesity-related parameters such as final body weight ($p < 0.05$, $r = -0.526$), total fat mass ($p < 0.05$, $r = -0.509$), liver weight ($p < 0.05$, $r = -0.536$) and total liver fat content ($p < 0.05$, $r = -0.531$).

Resultados

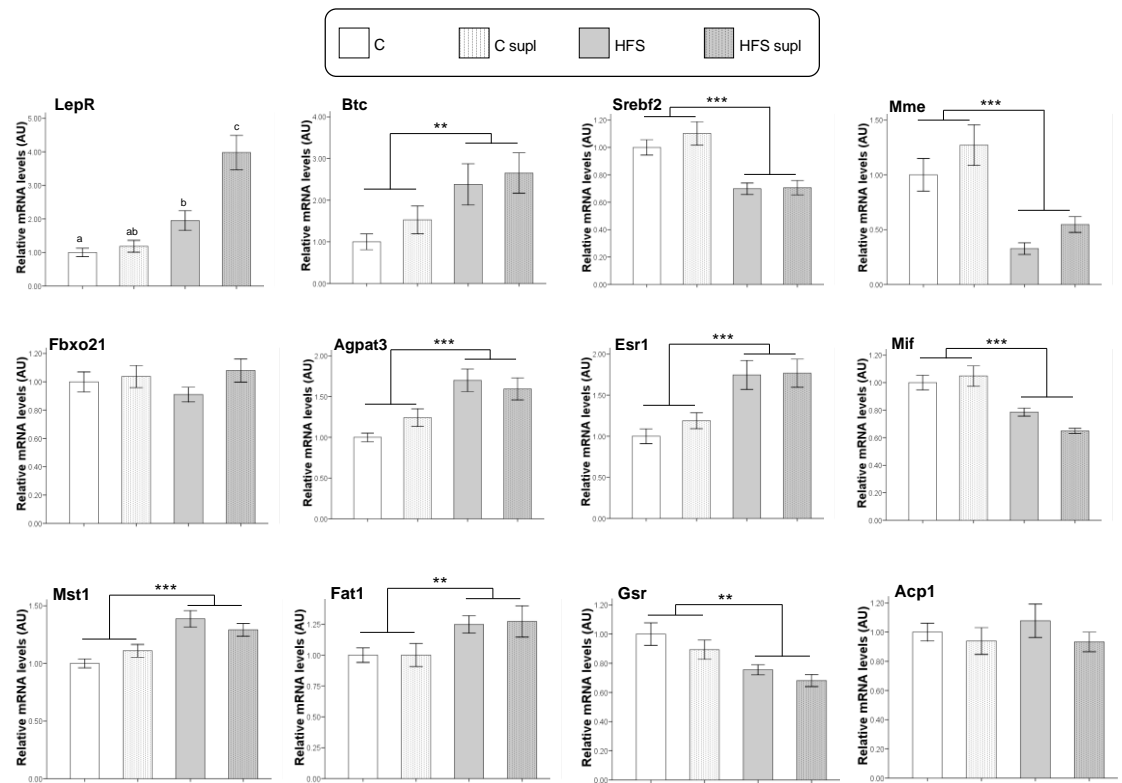


Figure 2. Liver mRNA expression levels measured by RT-PCR. All results are expressed as fold change as compared to control group. Data are reported as means \pm SE (n=12 for each experimental group). Different letters indicate significant differences between groups of at least $p < 0.05$.

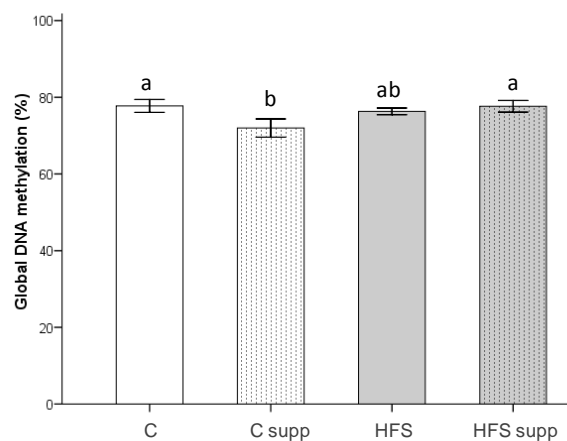


Figure 3. Global methylation percentage analyzed by [3H] dCTP extension assay. Data are reported as means \pm SE (n=7 for each experimental group). Different letters indicate significant differences between groups of at least $p < 0.05$.

Resultados

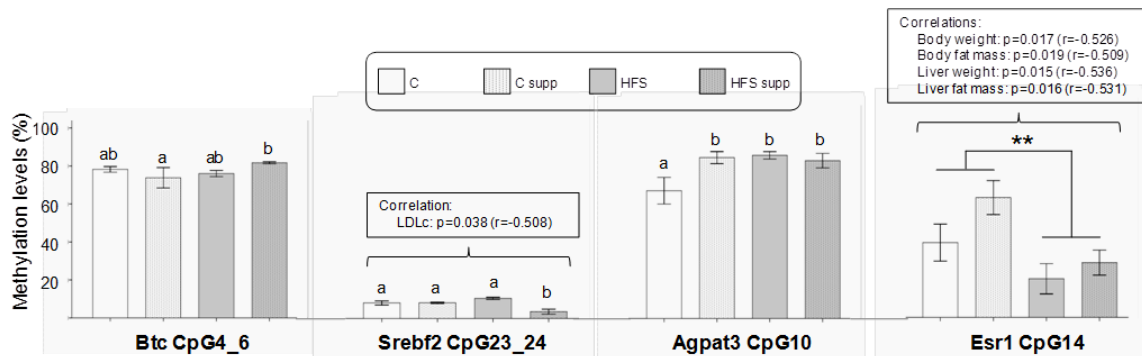


Figure 4. Percentage of methylation of specific CpG dinucleotides in Btc, Srebf2, Agpat3 and Esr1 promoter regions. Data are reported as means \pm SE (n=4-6). Different letters indicate significant differences between groups of at least $p < 0.05$. Pearson's correlation test results with p value and r value.

As a result of methyl donor supplementation, Srebf2 showed a significant decrease in CpG23_24 (-167bp and -156bp) methylation levels (-6.5%) when compared to HFS supp and HFS groups, which correlated with plasma LDL cholesterol levels ($p < 0.05$, $r = -0.508$). Agpat3 CpG10 (-11592bp) site increased by +16.1% on methylation percentage comparing C with C supp groups. Esr1 CpG14 (-2623bp) also presented a relative increase of +17.5% in rats fed the control diet due to methyl donor administration. Finally, there was relevant effect of methyl donor supplementation depending on the diet, showing an increase of +7.6% in Btc CpG4_6 (-267bp and -219bp) methylation between C supp and HFS supp group.

DISCUSSION

NAFLD is the main hepatic comorbidity associated with obesity [2]. In this way, animal models of obesity contribute a good approach to this disease [24]. Our research model was based on an *ad libitum* high-fat-sucrose diet, as both high-fat and high-sucrose diets have been associated with obesity-related deviations [25]. Thus, animals fed on HFS diet during eight weeks generated an obese phenotype with increased weight and fat accumulation and an initial stage of steatosis characterized by an elevation of liver fat depots. However, variables such as muscle weights, plasma glucose levels or

AST/ALT ratio were not significantly affected by the diet, which probably means that eight weeks of HFS treatment were enough to begin an illness stage but not for an advanced disease situation [26].

Animal models of NAFLD and its progression to NASH, cirrhosis or hepatocarcinoma are commonly induced by a choline and methionine-deficient diet [27]. These substrates are methyl donor molecules implicated in gene expression by their metabolic involvement in genomic DNA methylation [16, 18]. In this way, other methylating molecules such as betaine or folic acid have been associated with an improvement of oxidative stress and hepatic inflammation [28, 29]. Waterland et al [18] prevented the transgenerational amplification of obesity by epigenetically silencing agouti transposon using a methylating cocktail including choline, betaine, folic acid and vitamin B₁₂.

Global DNA methylation has been recently linked to diseases such as cancer [30], obesity [31], diabetes [32] or schizophrenia [33]. Molecular mechanisms underlying global DNA methylation are still uncertain, as gene methylation and demethylation are balanced and contemporary processes [11]. Decreased levels in global DNA methylation by methyl donor supplementation has been previously described by folate and selenium supplementation in mice, which showed lower levels of hepatic global DNA methylation as measured by high performance liquid chromatography (HPLC) [34]. Furthermore, women supplemented with folic acid also showed lower methylation levels by spectrometry analysis in a time-, dose- and genotype manner [19]. As opposite, Li et al [35] did not found changes in hepatic global DNA methylation as measured by HPLC in rats fed during six generations with a methyl donor supplementation cocktail including choline, betaine, metionine, zinc, folic acid and vitamin B₁₂.

Db/db mouse is an animal model of obesity caused by an autosomal recessive mutation in leptin [24]. This model is also characterized by hepatic steatosis and inflammation. The HFS-increased levels of Lepr observed in our rats could be associated with a response to normal obesity-related increase in leptin plasma levels [6], while the

increase due to the methyl donor supplementation could be an attempt for delaying leptin resistance. In this sense, it has been reported that db/db mice fibrosis and steatohepatitis evolution is accelerated by methionine-choline deficient diets [36].

Mst1 gene effects are usually studied together with Mst2 in rodent models with the deletion of both genes, where liver size is increased and hepatocarcinoma is developed [37]. Our results showed that eight-weeks of obesogenic dietary treatment increased liver Mst1 expression levels. As weight gain increased liver weight, we expected lower expression levels. Possibly longer dietary treatment could lead to higher liver injury and associated decrease in Mst1 expression levels.

We found lower liver expression of Gsr due to HFS diet intake, which could be related with the high amount of sucrose content in the diet, a disaccharide composed by glucose and fructose. In this way, it has been described that high-fructose-fed animals present damages in antioxidant defence system accompanied by an improvement of mitochondrial efficiency, which would be associated with weight gain [38].

Alagille syndrome is a human genetic disorder affecting normal liver functionality by cholestasis that is associated with decreased Mme mRNA levels [39]. Thus, obesity-related liver complications could cause similar decrease as observed in our HFS-fed rats. Mme methylation levels measured by EpiTyper were not correlated with mRNA levels, although they showed the same trend that those reported by Byrne et al [39] in humans. Mme supplementation is being studied nowadays as a promising therapeutic tool for cancer [40], a disease tightly related with DNA methylation [30].

Rat liver fibrosis has been associated with increased Mif expression, a cytokine widely expressed in many inflammatory disorders [41]. Developed stages of liver injury are characterized by an increase on hepatic Mif expression. However, in an initial steatosis, it is considered more a consequence of liver damage than a cause [42]. On the other hand, a reduction of Mif expression has been associated with a protective effect on insulin resistance and glucose intolerance [43]. This beneficial outcome could explain the coincidence between decreased Mif mRNA levels in the HFS-fed groups and the absence of changes in glucose plasma levels that we found. Mif promoter methylation

levels have been studied in PBMC human cells and different in vitro models although, as in our research, no correlations have been found with gene expression. Indeed, the methylation of CpG sites within the proximal Mif promoter is considered a rare event [44].

Btc is a member of the epidermal growth factor gene family. This molecule is implicated in cellular growth and proliferation and linked with hyperplasia and cancer development [45]. Btc promoter methylation did not correlate with gene expression. However, methylation levels at CpG4_6 (-267bp and -219bp) were affected by the HFS diet in concomitance with the methyl donor supplementation (figure 4), which seems to be due to opposite responses by methyl donor supplementation according to the diet. Obesity-related epigenetic studies demonstrate that small changes at specific CpG methylation percentages could be metabolically crucial [46]. On the other hand, Btc amplicon was scanned for consensus response elements using Alibaba 2.1 TF Binding Prediction Software [23]. We found both in CpG4 (-267bp) and CpG6 (-219bp) a core binding consensus motif for the upstream stimulatory factor (USF), which has been previously described as a methylation-dependent transcription factor [47].

On the other hand, it has been described that cholesterol plasma levels inhibit Srebf2 gene expression [41]. Our results were not correlated with the methylation of its promoter, but an association was observed between Srebf2 CpG23_24 (-167 and -156) methylation and cHDL plasma levels, suggesting that cHDL could act as a regulatory component of Srebf2 promoter methylation stimulated by the obesogenic diet supplemented with methyl donor groups. Srebf1, a member of the same protein family, has been related with fatty liver and one carbon cycle metabolism [48]. After analysing Srebf2 amplicon by Alibaba 2.1 software, a putative transcription factor consensus site in CpG23 (-167bp) for Krox20 and other for Gli3 were found, both regulators involved in lipid biosynthesis Srebf-induced [49] and with severity of fatty liver damage in mice [50]. Our research adds a novel link between plasma cholesterol levels and epigenetic regulation of Srebf2 in liver steatosis.

The obesogenic diet also induced an increase of *Agpat3* mRNA hepatic levels. This ubiquitously expressed gene is crucial in triglyceride synthesis [51]. On the other hand, genes involved in this pathway show a decreased expression when rats are fed a diet deficient in methyl donors, such as folic acid, betaine and choline [52]. However, when the methylation cocktail was supplied to the control-fed rats, there was an increase in *Agpat3* CpG10 (-11592bp) methylation levels that were not correlated with gene expression. This effect was not found in the rats fed a HFS diet. In this context, it could be hypothesized that there are two different epigenetic controllers, diet and methyl donor supplementation, affecting *Agpat3* methylation in the same direction, but they do not have synergistic effects.

Esr1 gene expression has been considered a candidate marker of hepatic carcinoma [53]. In this way, HFS diet-induced *Esr1* overexpression could be associated with liver fat accumulation as a first step in NAFLD development and its possible evolution to NASH, cirrhosis and cancer [3]. This gene has been recently defined as a promising epibiosogene whose promoter is susceptible to epigenetic regulation [54-56]. Although, we did not find an association between *Esr1* gene expression and the methylation of its promoter, we observed lower methylation levels in *Esr1* CpG14 (-2623bp) due to the HFS diet, which showed correlations with different obesity-related parameters, such as total body weight and fat mass and liver weight and fat content. Methyl donor supplementation induced a slight increase of *Esr1* promoter methylation, which could be linked to a protection from hepatocarcinoma. In fact, a decrease in the methylation levels of three regions around *Esr1* promoter has been observed when liver injury progresses from cirrhosis to hepatocarcinoma [57].

In conclusion, rats fed a high-fat-sucrose diet developed liver steatosis, while methyl donor supplementation exerted a protective effect in liver fat accumulation. Both diet and supplementation cocktail altered liver transcriptional profile when analyzed by microarray and subsequently RT-PCR validation. Furthermore, novel and useful information concerning the epigenetic control of NAFLD was described by a double epigenetic approach by quantifying global DNA methylation and methylation changes in specific gene promoters. As a promising result, *Esr1* and *Srebf2* promoter

methylation profiles seem to play a role in the pathogenesis of obesity-related liver steatosis.

ACKNOWLEDGEMENT

The technical assistance of Verónica Ciáurriz, José Antonio Ayala and Ana María Gómez Úriz (University of Navarra, Pamplona, Spain) is gratefully acknowledged. The authors thank the Linea Especial (University of Navarra; LE/97) for financial support and to the Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra for Paúl Cordero's fellowship. The authors also thank Miguel Constancia and Wendy N. Cooper (Addembrooke's Hospital, University of Cambridge, UK) for their expert support at Sequenom MassArray EpiTyper usage. Also RETICS and CIBERobn schemes from Carlos III Institute are gratefully acknowledged.

BIBLIOGRAPHY

- [1] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-1321.
- [2] Musso G, Cassader M, Gambino R. Cholesterol-lowering therapy for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: an update. *Curr Opin Lipidol* 2011;22:489-496.
- [3] Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865-873.
- [4] Elias MC, Parise ER, de Carvalho L, Szejnfeld D, Netto JP. Effect of 6-month nutritional intervention on non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition* 2010;26:1094-1099.
- [5] Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol* 2012;56:952-964.
- [6] Milagro FI, Campion J, Martinez JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:1118-1123.
- [7] Lomba A, Martinez JA, Garcia-Diaz DF, Paternain L, Marti A, Campion J et al. Weight gain induced by an isocaloric pair-fed high fat diet: a nutriepigenetic study on FASN and NDUF6 gene promoters. *Mol Genet Metab* 2010;101:273-278.
- [8] Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005;14 Spec No 1:R47-58.
- [9] Martinez JA, Cordero P, Campion J, Milagro FI. Interplay of early-life nutritional programming on obesity, inflammation and epigenetic outcomes. *Proc Nutr Soc* 2012;1-8.

- [10] Cordero P, Campion J, Milagro FI, Goyenechea E, Steemburgo T, Javierre BM et al. Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem* 2011;67:463-470.
- [11] Milagro FI, Campion J, Cordero P, Goyenechea E, Gomez-Uriz AM, Abete I et al. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *Faseb J* 2011;25:1378-1389.
- [12] Wang X, Zhu H, Snieder H, Su S, Munn D, Harshfield G et al. Obesity related methylation changes in DNA of peripheral blood leukocytes. *BMC Med* 2010;8:87.
- [13] Thaler R, Karlic H, Rust P, Haslberger AG. Epigenetic regulation of human buccal mucosa mitochondrial superoxide dismutase gene expression by diet. *Br J Nutr* 2009;101:743-749.
- [14] Kalhan SC. Metabolism of methionine in vivo: impact of pregnancy, protein restriction, and fatty liver disease. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2009;63:121-131; discussion 131-123, 259-168.
- [15] Khulan B, Cooper WN, Skinner BM, Bauer J, Owens S, Prentice AM et al. Periconceptional maternal micronutrient supplementation is associated with widespread gender related changes in the epigenome: a study of a unique resource in the Gambia. *Hum Mol Genet* 2012;21:2086-2101.
- [16] Cooper WN, Khulan B, Owens S, Elks CE, Seidel V, Prentice AM et al. DNA methylation profiling at imprinted loci after periconceptional micronutrient supplementation in humans: results of a pilot randomized controlled trial. *Faseb J* 2012;26:1782-1790.
- [17] Boeke CE, Baccarelli A, Kleinman KP, Burris HH, Litonjua AA, Rifas-Shiman SL et al. Gestational intake of methyl donors and global LINE-1 DNA methylation in maternal and cord blood: prospective results from a folate-replete population. *Epigenetics* 2012;7:253-260.

- [18] Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, Rached MT, Mirza S. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:1373-1379.
- [19] Crider KS, Quinlivan EP, Berry RJ, Hao L, Li Z, Maneval D et al. Genomic DNA methylation changes in response to folic acid supplementation in a population-based intervention study among women of reproductive age. *PLoS One* 2011;6:e28144.
- [20] Cordero P, Gomez-Uriz AM, Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Dietary supplementation with methyl donors reduces fatty liver and modifies the Fatty Acid Synthase DNA methylation profile in rats fed an obesogenic diet. *Genes Nutr* 2012;in press. DOI: 10.1007/s12263-012-0300-z.
- [21] Nixon JP, Zhang M, Wang C, Kuskowski MA, Novak CM, Levine JA et al. Evaluation of a quantitative magnetic resonance imaging system for whole body composition analysis in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:1652-1659.
- [22] Pogribny IP, James SJ, Jernigan S, Pogribna M. Genomic hypomethylation is specific for preneoplastic liver in folate/methyl deficient rats and does not occur in non-target tissues. *Mutat Res* 2004;548:53-59.
- [23] Grabe N. AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. *In Silico Biol* 2002;2:S1-15.
- [24] Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:351982.
- [25] Boque N, Campion J, Paternain L, Garcia-Diaz DF, Galarraga M, Portillo MP et al. Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. *J Physiol Biochem* 2009;65:387-395.
- [26] Roberts CK, Berger JJ, Barnard RJ. Long-term effects of diet on leptin, energy intake, and activity in a model of diet-induced obesity. *J Appl Physiol* 2002;93:887-893.

- [27] Kajikawa S, Imada K, Takeuchi T, Shimizu Y, Kawashima A, Harada T et al. Eicosapentaenoic acid attenuates progression of hepatic fibrosis with inhibition of reactive oxygen species production in rats fed methionine- and choline-deficient diet. *Dig Dis Sci* 2011;56:1065-1074.
- [28] Kwon do Y, Jung YS, Kim SJ, Park HK, Park JH, Kim YC. Impaired sulfur-amino acid metabolism and oxidative stress in nonalcoholic fatty liver are alleviated by betaine supplementation in rats. *J Nutr* 2009;139:63-68.
- [29] Buettner R, Bettermann I, Hechtel C, Gabele E, Hellerbrand C, Scholmerich J et al. Dietary folic acid activates AMPK and improves insulin resistance and hepatic inflammation in dietary rodent models of the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 2010;42:769-774.
- [30] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148-1159.
- [31] Kim M, Long TI, Arakawa K, Wang R, Yu MC, Laird PW. DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk. *PLoS One* 2010;5:e9692.
- [32] Zhao J, Goldberg J, Bremner JD, Vaccarino V. Global DNA methylation is associated with insulin resistance: a monozygotic twin study. *Diabetes* 2012;61:542-546.
- [33] Melas PA, Rogdaki M, Osby U, Schalling M, Lavebratt C, Ekstrom TJ. Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia: association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease onset. *Faseb J* 2012;doi:10.1096/fj.11-202069.
- [34] Armstrong KM, Bermingham EN, Bassett SA, Treloar BP, Roy NC, Barnett MP. Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA. *Biotechnol J* 2011;6:113-117.
- [35] Li CC, Cropley JE, Cowley MJ, Preiss T, Martin DI, Suter CM. A sustained dietary change increases epigenetic variation in isogenic mice. *PLoS Genet* 2011;7:e1001380.

- [36] Sahai A, Malladi P, Pan X, Paul R, Melin-Aldana H, Green RM et al. Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G1035-1043.
- [37] Song H, Mak KK, Topol L, Yun K, Hu J, Garrett L et al. Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:1431-1436.
- [38] Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Liverini G, Iossa S. Increased hepatic *de novo* lipogenesis and mitochondrial efficiency in a model of obesity induced by diets rich in fructose. *Eur J Nutr* 2012;doi:10.1007/S00394-012-0356-y.
- [39] Byrne JA, Meara NJ, Rayner AC, Thompson RJ, Knisely AS. Lack of hepatocellular CD10 along bile canaliculi is physiologic in early childhood and persistent in Alagille syndrome. *Lab Invest* 2007;87:1138-1148.
- [40] Lavilla-Alonso S, Bauer MM, Abo-Ramadan U, Ristimaki A, Halavaara J, Desmond RA et al. Macrophage metalloelastase (MME) as adjuvant for intra-tumoral injection of oncolytic adenovirus and its influence on metastases development. *Cancer Gene Ther* 2012;19:126-134.
- [41] Hori Y, Sato S, Yamate J, Kurasaki M, Nishihira J, Hosokawa T et al. Immunohistochemical study of macrophage migration inhibitory factor in rat liver fibrosis induced by thioacetamide. *Eur J Histochem* 2003;47:317-324.
- [42] Akyildiz M, Gunsar F, Nart D, Sahin O, Yilmaz F, Akay S et al. Macrophage migration inhibitory factor expression and MIF gene -173 G/C polymorphism in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22:192-198.
- [43] Verschuren L, Kooistra T, Bernhagen J, Voshol PJ, Ouwens DM, van Erk M et al. MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circ Res* 2009;105:99-107.

- [44] Roger T, Ding X, Chanson AL, Renner P, Calandra T. Regulation of constitutive and microbial pathogen-induced human macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene expression. *Eur J Immunol* 2007;37:3509-3521.
- [45] Saridaki Z, Georgoulas V, Souglakos J. Mechanisms of resistance to anti-EGFR monoclonal antibody treatment in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2010;16:1177-1187.
- [46] Toperoff G, Aran D, Kark JD, Rosenberg M, Dubnikov T, Nissan B et al. Genome-wide survey reveals predisposing diabetes type 2-related DNA methylation variations in human peripheral blood. *Hum Mol Genet* 2012;21:371-383.
- [47] Paquette J, Bessette B, Ledru E, Deal C. Identification of upstream stimulatory factor binding sites in the human IGFBP3 promoter and potential implication of adjacent single-nucleotide polymorphisms and responsiveness to insulin. *Endocrinology* 2007;148:6007-6018.
- [48] Walker AK, Jacobs RL, Watts JL, Rottiers V, Jiang K, Finnegan DM et al. A conserved SREBP-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans. *Cell* 2011;147:840-852.
- [49] Leblanc SE, Srinivasan R, Ferri C, Mager GM, Gillian-Daniel AL, Wrabetz L et al. Regulation of cholesterol/lipid biosynthetic genes by Egr2/Krox20 during peripheral nerve myelination. *J Neurochem* 2005;93:737-748.
- [50] Fleig SV, Choi SS, Yang L, Jung Y, Omenetti A, VanDongen HM et al. Hepatic accumulation of Hedgehog-reactive progenitors increases with severity of fatty liver damage in mice. *Lab Invest* 2007;87:1227-1239.
- [51] Takeuchi K, Reue K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E1195-1209.

[52] McNeil CJ, Hay SM, Rucklidge GJ, Reid MD, Duncan GJ, Rees WD. Maternal diets deficient in folic acid and related methyl donors modify mechanisms associated with lipid metabolism in the fetal liver of the rat. *Br J Nutr* 2009;102:1445-1452.

[53] Tsiambas E, Georgiannos SN, Salemis N, Alexopoulou D, Lambropoulou S, Dimo B et al. Significance of estrogen receptor 1 (ESR-1) gene imbalances in colon and hepatocellular carcinomas based on tissue microarrays analysis. *Med Oncol* 2011;28:934-940.

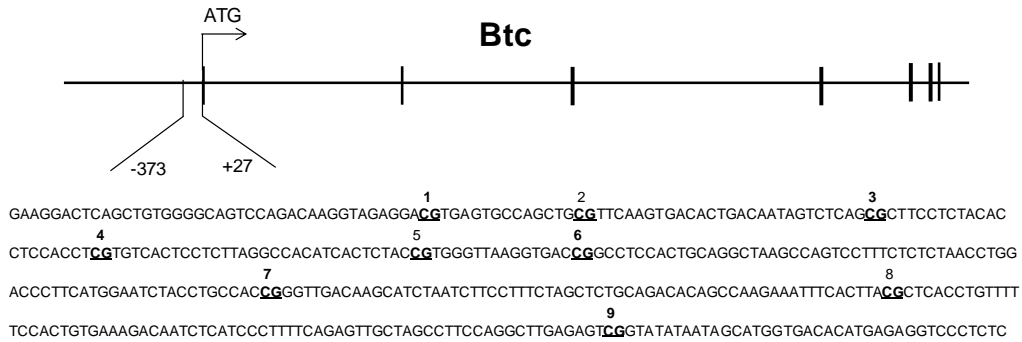
[54] Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 2009;10:383-392.

[55] Mori H, Matsuda KI, Tsukahara S, Kawata M. Intrauterine position affects estrogen receptor alpha expression in the ventromedial nucleus of the hypothalamus via promoter DNA methylation. *Endocrinology* 2010;151:5775-5781.

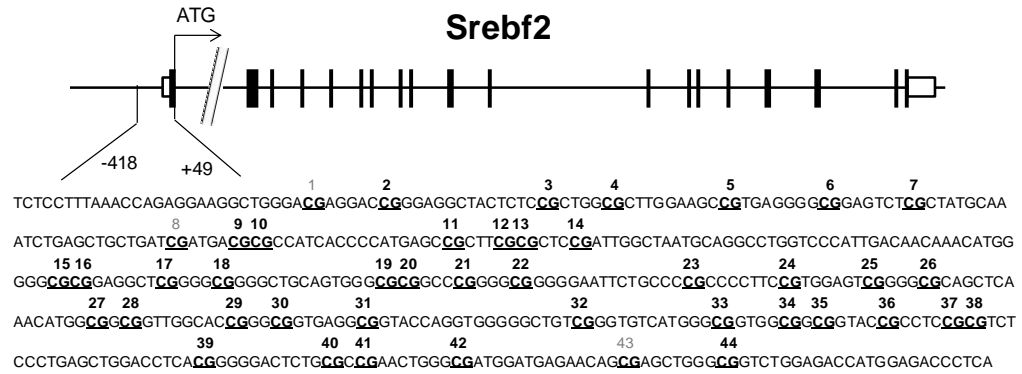
[56] Sertic J, Juricic L, Ljubic H, Bozina T, Lovric J, Markeljevic J et al. Variants of ESR1, APOE, LPL and IL-6 loci in young healthy subjects: association with lipid status and obesity. *BMC Res Notes* 2009;2:203.

[57] Archer KJ, Mas VR, Maluf DG, Fisher RA. High-throughput assessment of CpG site methylation for distinguishing between HCV-cirrhosis and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Mol Genet Genomics* 2010;283:341-349.

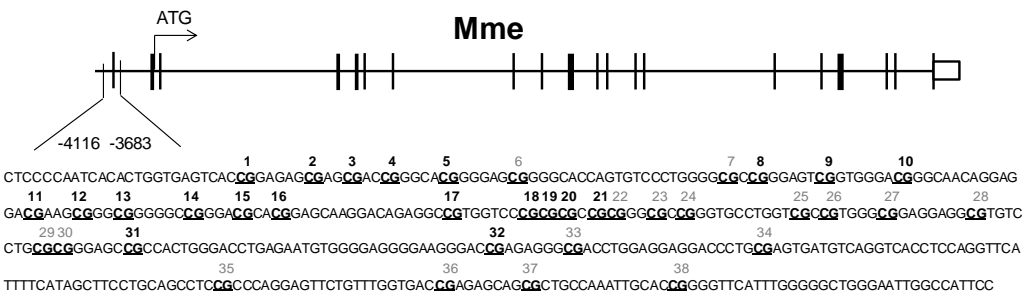
SUPPLEMENTARY DATA



%Meth	c1	c2	c3	c4,6	c5	c7	c8	c9	mean
C	78	89	37	78	77	93	96	88	80
C supp	84	89	53	74	80	90	95	87	81
HFS	73	89	41	76	76	91	96	92	79
HFS supp	78	92	61	81	79	90	96	92	83



%Meth	c2	c3-4	c5	c6	c7	c9-10	c11-14	c15-16	c17-18	c19-22	c23-24	c25-26	c27-28	c29-30	c31	c32	c33-35	c36-38	c39	c40-41	c42	c44	mean
C	5	1	0	0	12	10	2	0	4	6	8	1	4	1	2	4	7	15	0	2	0	0	4
C supp	2	3	0	0	7	4	1	0	4	5	8	0	6	0	1	4	8	15	0	2	0	0	3
HFS	2	1	0	0	11	6	4	0	4	6	10	1	3	1	1	4	6	15	0	2	0	0	4
HFS supp	1	4	3	0	19	3	2	0	7	5	3	0	2	0	2	4	10	16	0	10	0	0	4



%Meth	c1	c2-3	c4	c5	c8-10	c11-12	c13-14	c15-21	c31-32	mean
C	1	2	2	0	1	1	0	5	2	2
C supp	1	2	3	0	2	0	0	4	2	2
HFS	1	2	3	1	1	1	0	4	1	2
HFS supp	1	1	3	0	2	1	0	4	2	2

Figure 5 Methylation analysis of the promoter regions of Btc, Srebf2 and Mme. Nucleotide sequences showing individual CpG dinucleotides and their percentage of methylation measured by MALDI-TOF mass spectrometry. Data are reported as means \pm SE (n=4-6). ATG site represents the first codon in the translation from mRNA to an aminoacidic sequence. *, p<0.05.

Resultados

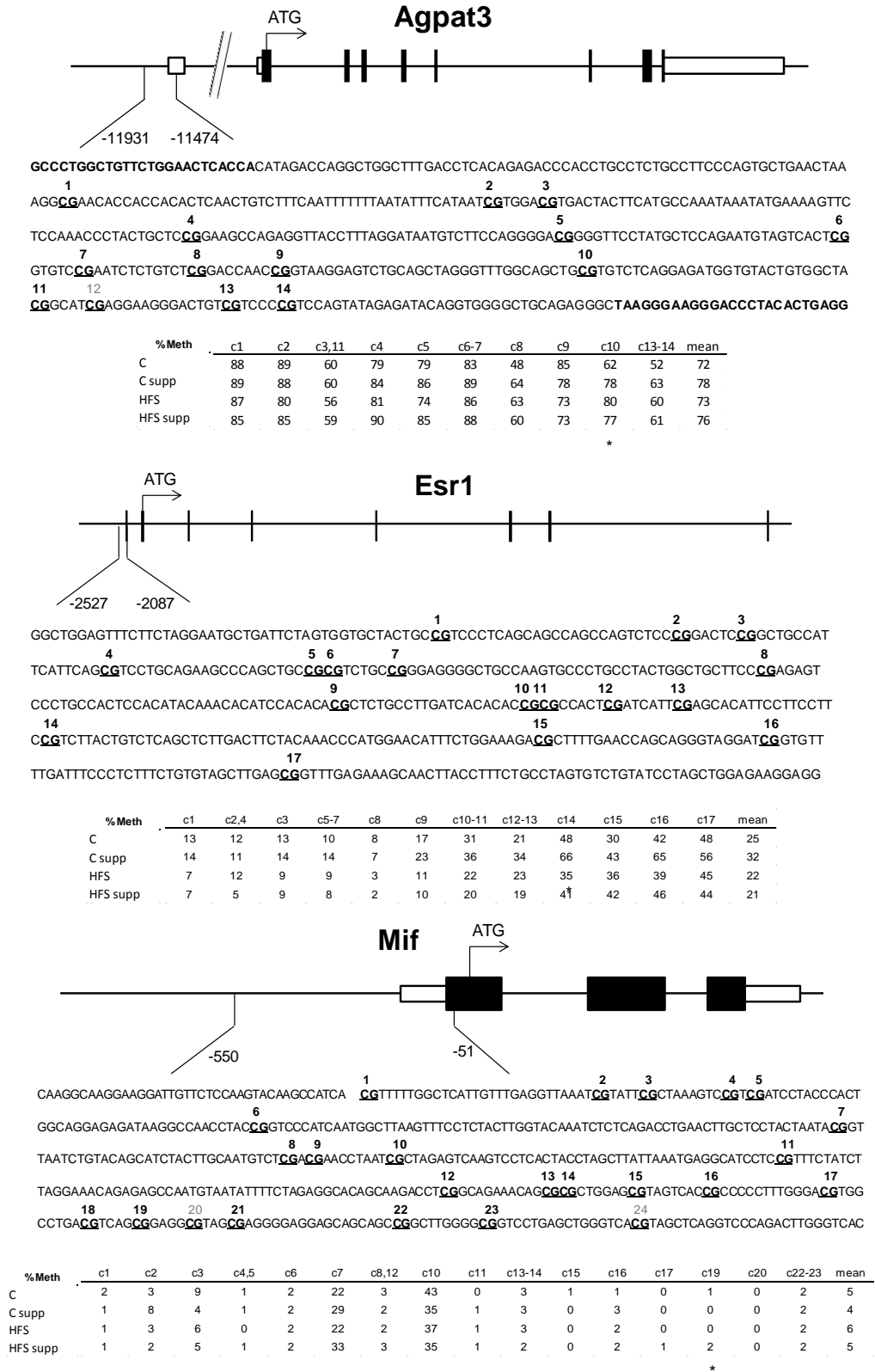


Figure 6. Methylation analysis of the promoter regions of Agpat3, Esr1 and Mif. Nucleotide sequences showing individual CpG dinucleotides and their percentage of methylation measured by MALDI-TOF mass spectrometry. Data are reported as means \pm SE (n=4-6). ATG site represents the first codon in the translation from mRNA to an aminoacidic sequence. *, p<0.05.

Resultados

Transcript ID	Gene Symbol	Raw p Value	p value corrected by FDR-BH
10903053	Inhbc	1.34 x 10 ⁻⁷	0.0039
10824268	Rhbg	2.89 x 10 ⁻⁶	0.0156
10794050	F12	3.20 x 10 ⁻⁶	0.0156
10922151	Yc2	1.78 x 10 ⁻⁶	0.0156
10896772	Sqlc	3.19 x 10 ⁻⁶	0.0156
10707790	Pcsk6	2.59 x 10 ⁻⁶	0.0156
10799241	Idi1	4.43 x 10 ⁻⁶	0.0185
10940520		5.99 x 10 ⁻⁶	0.0219
10714709	RGD1310016	6.91 x 10 ⁻⁶	0.0224
10810743	Slc12a4	7.69 x 10 ⁻⁶	0.0225
10829209	Agpat3	9.69 x 10 ⁻⁶	0.0257
10769680	Hsd17b7	1.21 x 10 ⁻⁵	0.0294
10723866	Dgat2	1.58 x 10 ⁻⁵	0.0355
10864439	RGD1560513	1.72 x 10 ⁻⁵	0.0358
10913155	Mst1	1.98 x 10 ⁻⁵	0.0386
10879215	RGD1308616	2.12 x 10 ⁻⁵	0.0388
10917905	Cd276	2.64 x 10 ⁻⁵	0.0453
10708053	Abhd2	2.84 x 10 ⁻⁵	0.0460
10811531	Slc7a5	3.13 x 10 ⁻⁵	0.0462
10891104	Entpd5	3.16 x 10 ⁻⁵	0.0462
10865092		3.52 x 10 ⁻⁵	0.0488
10755094	St6gal1	3.67 x 10 ⁻⁵	0.0488
10903816	Sntb1	3.10 x 10 ⁻⁵	0.0494
10821605		5.92 x 10 ⁻⁵	0.0494
10850459	RGD1308023	4.56 x 10 ⁻⁵	0.0494
10940594		5.62 x 10 ⁻⁵	0.0494
10829649	Mif	5.79 x 10 ⁻⁵	0.0494
10898091	Srebf2	5.82 x 10 ⁻⁵	0.0494
10764626	Ivns1abp	5.46 x 10 ⁻⁵	0.0494
10858854	Mrpl51	5.16 x 10 ⁻⁵	0.0494
10900511	Reep6	4.86 x 10 ⁻⁵	0.0494
10706117	Pepd	4.52 x 10 ⁻⁵	0.0494
10715990	Gsto1	4.18 x 10 ⁻⁵	0.0494
10940683		4.65 x 10 ⁻⁵	0.0494
10701262		5.34 x 10 ⁻⁵	0.0494
10813467	Gdnf	6.71 x 10 ⁻⁵	0.0536
10787841	Sc4mol	6.83 x 10 ⁻⁵	0.0536
10725976	Sept1	6.98 x 10 ⁻⁵	0.0536
10810536	Pgrmc1	7.39 x 10 ⁻⁵	0.0553
10713844	Fads3	9.84 x 10 ⁻⁵	0.0719
10853471	Cyp51	0.0001	0.0722
10885251	Hif1a	0.0001	0.0722
10907784	Xrcc6bp1	0.0001	0.0722
10895705	Gns	0.0001	0.0722
10780187	Oxa1l	0.0001	0.0722
10928761	Fn1	0.0001	0.0735
10794812	Slc22a23	0.0001	0.0735
10771760	Btc	0.0001	0.0758
10880756	Zbtb40	0.0001	0.0830
10850478	RGD1308023	0.0001	0.0831
10811476	RGD1311054	0.0002	0.0849
10924177	Xrcc5	0.0002	0.0849
10852106	Bmp7	0.0002	0.0849
10711234	Bckdk	0.0002	0.0868
10803003	Zadh2	0.0002	0.0868
10892884	Mtm1	0.0002	0.0874
10877540		0.0002	0.0874
10894897	Hal	0.0002	0.0878
10764388		0.0002	0.0878
10861268	Cadps2	0.0002	0.0878
10889513	Acp1	0.0002	0.0878
10777639	Grk4	0.0002	0.0878
10940564		0.0002	0.0878
10932236	Acp1	0.0002	0.0878
10855356	Atp6v0e2	0.0002	0.0908
10824305	Sema4a	0.0002	0.0908
10939480	Morn4	0.0002	0.0908
10806806	Cd97	0.0002	0.0908
10714636	Cdc37l1	0.0002	0.0908
10767931	Rnpep	0.0002	0.0921
10709951	Mikal2	0.0002	0.0921
10851861	Prexs1	0.0002	0.0921
10701084		0.0002	0.0921
10887338	Mark3	0.0002	0.0921
10890338	Acp1	0.0002	0.0942
10927055	Fam135a	0.0003	0.1030

Table including genes with FDR-BH p<0.10 by one way ANOVA

Resultados

Transcript ID	Gene Symbol	p value	Fold change
10782450	Nkiras1	0.0002	1.24
10760813	Gjc3	0.0002	1.33
10921217	Sult1c3	0.0004	0.96
10727734	Rab1b	0.0004	1.10
10830456	Cdc2l6	0.0004	1.22
10824827	Snx27	0.0004	1.12
10789680	Arglu1	0.0005	0.90
10721649	Aldh16a1	0.0005	0.87
10739525	Cdr2l	0.0008	0.86
10937769	Ap1s2	0.0010	1.37
10791786	Fat1	0.0012	0.79
10894017	Rnf126	0.0013	1.14
10747617	Ccdc56	0.0013	0.86
10750513	Bace2	0.0014	1.22
10724578	Egln1	0.0014	1.24
10840942	Ttll9	0.0014	0.68
10870289	Lepr	0.0015	1.54
10711961	Inpp5a	0.0015	1.13
10827438	Rabggtb	0.0017	1.19
10762442	Fbxo21	0.0017	1.39
10727740	Klc2	0.0019	1.20
10808680	Tcf25	0.0019	0.93
10794229	Auh	0.0019	1.12
10866926	LOC690728	0.0019	0.91
10881925	Thap3	0.0020	1.16
10826784	Sec24b	0.0020	1.15
10922553	Cnm4	0.0020	1.19
10784517	Msra	0.0022	0.85
10777639	Grk4	0.0022	1.20
10712359	Ap2a2	0.0022	1.11
10878170	Cyp2j3	0.0023	1.13
10765460	Uhmk1	0.0024	0.78
10821029	Slc30a5	0.0024	0.90
10826914	Cisd2	0.0024	1.17
10816160	Dear	0.0024	0.87
10832122	Dnah8	0.0025	1.15
10715808	Fbxl15	0.0026	1.14
10864569	Oxtr	0.0028	0.81
10815679	Mme	0.0029	1.68
10808931	Pard3	0.0030	0.88

Table including genes with $p \leq 0.003$ comparing HFS with HFS suppl groups

Capítulo 4/Chapter 4. Maternal methyl donor supplementation and high-fat sucrose diet during lactation modifies adult offspring response to an obesogenic diet

Maternal methyl donor supplementation and high-fat sucrose diet during lactation modifies adult offspring response to an obesogenic diet

Cordero P, Milagro FI, Campion J, Martinez JA

(Draft for Molecular Nutrition and Food Science. Impact Factor: 4.301; 2/128)

Resumen

Antecedentes: La alimentación en estadios tempranos de la vida afecta a la posibilidad de padecer enfermedades durante la etapa adulta. Recientes estudios han descrito el efecto preventivo sobre la acumulación de grasa en el hígado debida a una dieta obesogénica en ratas adultas mediante la suplementación dietética de sustancias donadoras de grupos metilo.

Objetivo: El objetivo consistió en analizar la respuesta a una dieta obesogénica en la edad adulta dependiendo de la alimentación materna durante la lactancia con una dieta rica en grasa y sacarosa (HFS) y con una suplementación de sustancias prometilantes.

Material y métodos: Treinta y seis ratas Wistar hembras fueron alimentadas con una dieta control durante la gestación. Tras el parto, fueron distribuidas en cuatro grupos; Control, Control suplementado con un cóctel de sustancias prometilantes, HFS y HFS suplementado con un cóctel de sustancias prometilantes. El cóctel de suplementación contenía colina, betaina, ácido fólico y vitamina B₁₂. Tras la lactancia, los machos de la descendencia fueron alimentados con una dieta control hasta la semana 12 de vida, cuando fueron sometidos a una dieta Control o HFS durante ocho semanas. El peso corporal y el porcentaje de grasa, el peso de los tejidos y su contenido de grasa, los

parámetros bioquímicos plasmáticos y el perfil de expresión génica hepática fueron analizados.

Resultados: Los animales adultos cuyas madres se alimentaron con una dieta obesogénica eran más pesados y de mayor longitud y adiposidad. La suplementación materna de una dieta HFS con sustancias prometilantes incrementó los depósitos adiposos de la descendencia alimentada con la dieta HFS y descendió la acumulación de grasa en el hígado. La dieta obesogénica en edad adulta incrementó la expresión de los genes *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Srebf1* y *Mif* mientras que la dieta HFS y la suplementación materna afectaron a los niveles de ARNm hepáticos de *Lepr*, *Mif* y *Dnmt1*.

Conclusión: La dieta obesogénica en madres lactantes afecta al desarrollo de la descendencia y a su respuesta a la dieta en la edad adulta. La suplementación materna con sustancias donadoras de grupos metilo podría redistribuir los depósitos adiposos previniendo de la acumulación de grasa hepática.

**Maternal methyl donor supplementation and high-fat sucrose diet during lactation
modifies adult offspring response to an obesogenic diet**

Paúl Cordero, Fermín I. Milagro, Javier Campión, J. Alfredo Martínez

Department of Nutrition and Food Sciences, Physiology and Toxicology

University of Navarra, c/ Irunlarrea 1, 31008. Pamplona, Spain

CORRESPONDING AUTHOR

Prof. J. Alfredo Martínez

Department of Nutrition, Food Science, Physiology and Toxicology

University of Navarra

C/Irunlarrea s/n

31008 Pamplona, SPAIN

Phone: 0034 948 425600

Fax: 0034 948 425649

E-mail address: jalfmtz@unav.es

ABSTRACT:

Background: Perinatal maternal nutrition affects the offspring to develop future diseases on adult life. Novel studies have described the preventive effects on obesity-induced fat accumulation by methyl donor supplementation in adult rats.

Aims: The aim was to analyze the response to an obesogenic diet during adulthood depending on maternal nutrition during lactation, by feeding mothers with a high-fat-sucrose (HFS) diet and a methyl donor supplementation.

Material and methods: Thirty-six female Wistar rats were fed a control diet during pregnancy. After weaning, mothers were assigned to four dietary groups; Control, Control Supplemented with a methyl donor cocktail, HFS and HFS supplemented with a methyl donor cocktail. Supplementation cocktail includes choline, betaine, folic acid and vitamin B₁₂. After lactation, male offspring were transferred to chow diet and at week 12th they were fed a Control or HFS diet during eight weeks. Body weight and fat percentage, tissue weights and fat content, plasma biochemical parameters and the liver gene expression profile were analyzed.

Results: Adult animals whose mothers were fed an obesogenic diet were heavier and with higher length and adiposity. Maternal supplementation with methyl donor in HFS dams increased offspring's fat depots when fed the HFS diet in adulthood and showed a decrease on liver fat accumulation. Dnmt1, Dnmt3a, Srebf1 and Mif expression levels were altered by the adult diet and Lepr, Mif and Dnmt1 mRNA levels showed changes depending on maternal diet and methyl supplementation.

Conclusions: Obesogenic diet by lactating mothers influences offspring development and their dietary response on adulthood. Maternal supplementation with methyl donors could redistribute fat storages preventing fat accumulation on liver.

INTRODUCTION

Obesity is arising as one of the most common causes of health problems and mortality in most countries [Misra 2008], being associated to diseases such as type 2 diabetes, cardiovascular problems or non-alcoholic fatty liver disease [Guh 2009]. The origin of excessive body weight and fat accumulation is based in the interaction of inappropriate lifestyles, including physical inactivity and unhealthy dietary habits, with the genetic background [Marti 2008]. The onset of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) theory deep into critical periods of perinatal environment, in whose maternal nutrition [Szeto 2009] and other environmental factors as stress [Paternain 2012] induced changes in offspring metabolism and the susceptibility to suffer future diseases in adulthood. Initial findings in this area were obtained through epidemiological approaches as high rates of obesity and chronic diseases in adult life were associated with children born after the Second World War Dutch famine [Roseboom 2006] or in smoker pregnant women [Power 2002]. Blood pressure during childhood has also presented a relation with maternal dietary composition during pregnancy [Campbell 1996], while lower birth weight was related with the stress caused by 9/11 New York terrorist attack on pregnant women [Ohlsson 2011].

The use of animal models on DOHaD research has enabled higher control of possible confounding factors as well as an advantage on time-taken and ethic dilemma providing proofs and clarify of this theory [McMullen 2009]. Thus, maternal dietary influence during pregnancy and lactation showed that obesogenic feeding at this stages altered offspring DNA epigenetic profile, consequently affecting gene expression patterns [Vucetic 2010]. These changes over genomic DNA, mainly cytosine methylation, are regulated by DNA methyltransferase enzymes (Dnmt) according to the availability of methyl donor substrates [Ding 2012]. Methyl donors are molecules (including choline, betaine, folic acid or vitamin B₁₂) implicated in the one carbon metabolism pathway by stimulating the DNA methylation process [Waterland 2008]. In this way, it has been reported that maternal protein restriction together with folic acid alters liver gene expression profile in adult rats [Hoile 2011] or that a multivitamin

supplementation during pregnancy predispose to an obesity phenotype when adult rats were fed on obesogenic diet [Szeto 2009]. Furthermore, a methylation cocktail including choline, betaine, folic acid and vitamin B₁₂ prevented the transgenerational amplification of obesity by epigenetically silencing agouti transposon [Waterland 2008]. Other studies have reported the protective effect of this promethylating supplementation on obesity-related liver fat accumulation [Cordero 2011, 2012].

Thus, the aim of this research was to describe the different response to an obesogenic diet in adulthood depending on maternal high-fat-sucrose feeding with or without methyl donor supplementation during lactation. We hypothesized that maternal feeding and methyl donor alter liver transcriptomic profile as well as hepatic fat accumulation by redistributing different adipose tissue depots with potential epigenetic modifications.

MATERIALS AND METHODS

Animal, diets and experimental design

A total of 32 female twelve-week-old Wistar rats (initial body weight 255±5g) supplied by the Applied Pharmacobiology Center (CIFA, Pamplona, Spain) were housed at 22°C with 12h-light cycle (8 a.m. – 8 p.m.) and were mated with male Wistar rats (CIFA, Pamplona, Spain). After 21 days of pregnancy, excess pups in each litter were removed to keep 8 pups per dam (four males and four females, when possible) as described elsewhere [Faust 1980] and mothers were re-assigned to four different dietary groups as follows (figure 1); control diet (C, n=8), control supplemented with methyl donors (Csupp, n=8), high-fat-sucrose diet (HFS, n=8) and high fat sucrose supplemented with methyl donors (HFS supp, n=8). Control diet groups were fed a standard chow diet (2014 Teckland Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Iberica, Barcelona, Spain) containing 20% of energy as protein, 67% as carbohydrate and 13% as lipid, whereas HFS groups were fed an obesogenic diet (D12451, Research Diets, New Brunswick, New Jersey, USA) containing 20% of energy as protein, 35% as

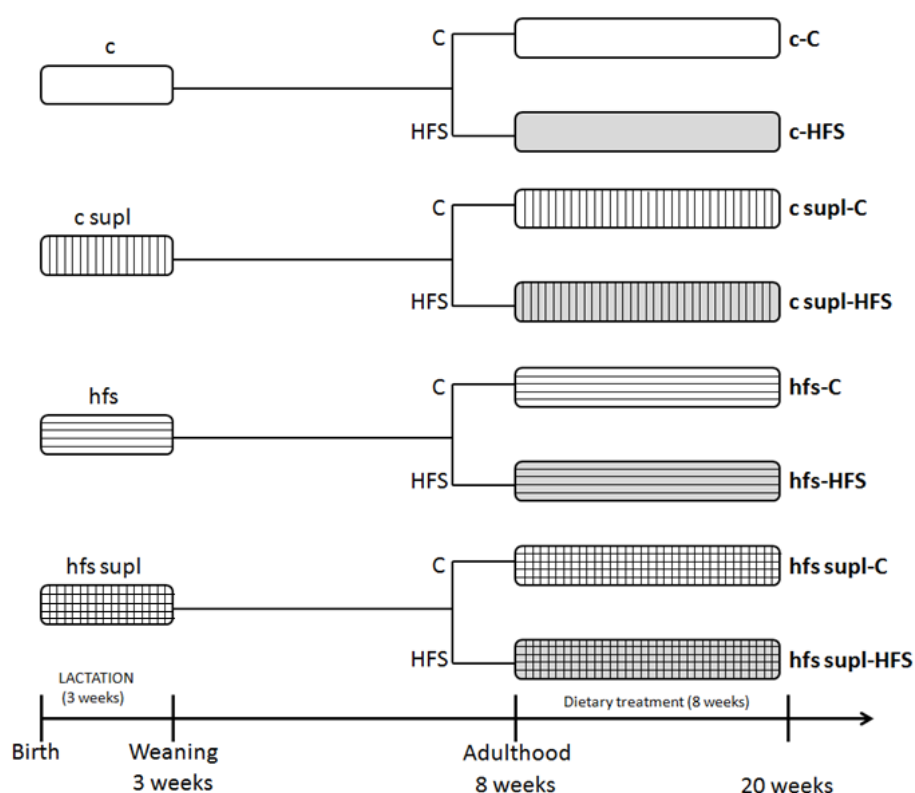


Figure 1. Experimental model design. Vertical lines mean maternal methyl donor supplementation, horizontal lines mean maternal high-fat-sucrose dietary intake and grey colour mean adult high-fat-sucrose diet intake.(c; control, c supl; control supplemented, hfs; high-fat-sucrose, hfs supl; high-fat-sucrose supplemented).

carbohydrates (17% as sucrose) and 45% as lipid. A methyl donor supplementation cocktail was added to Csupp and HFSsupp groups containing betaine (5g/Kg diet, Sigma Aldrich, Missouri, USA), choline (5.37g/Kg diet, Sigma Aldrich, Missouri, USA), folic acid (5.5 mg/Kg diet, Sigma Aldrich, Missouri, USA) and vitamine B₁₂ (0.5mg/Kg diet, Sigma Aldrich, Missouri, USA) as described previously [Cordero 2012]. Animals were fed *ad libitum* for 21 days of lactation. After weaning, male offsprings were fed on control diet until adulthood, at twelve weeks old. At this time, animal length after anesthesia, body weight and total fat mass by magnetic resonance using an EchoMRI analyzer were measured [Nixon 2010]. Afterwards twelve-weeks old rats were assigned to Control or high-fat-sucrose diets generating eight new different dietary groups as follows (figure 1): maternal control diet with adulthood control diet (c-C, n=10), maternal control supplemented diet with adulthood control diet (c sup-C, n=13), maternal high-fat-sucrose diet with adulthood control diet (hfs-C, n=11), maternal high-fat-sucrose

supplemented diet with adulthood control diet (hfs sup-C, n=12), maternal control diet with adulthood high-fat-sucrose diet (c-HFS, n=12), maternal control supplemented diet with adulthood high-fat-sucrose diet (c sup-HFS, n=14), maternal high-fat-sucrose diet with adulthood high-fat-sucrose diet (hfs-HFS, n=12), maternal high-fat-sucrose supplemented diet with adulthood high-fat-sucrose diet (hfs sup-HFS, n=12). Animals were fed *ad libitum* for eight weeks and at final point length and fat mass percentage were measured as previous described. After dietary treatment, the animals were euthanized, blood collected and plasma stored at -20oC and samples of liver, gastrocnemious muscle and adipose depots (mesenteric, retroperitoneal, epididymal and subcutaneous) were dissected, weighted and stored at -80oC for later analysis. All the procedures were performed in agreement with the National and Institutional guidelines of the animal care and Use Committee at the University of Navarra.

Total body, liver and muscle fat content

Initial and final body fat mass as well as liver and gastrocnemious muscle lipid content at the end of the dietary adulthood treatment were measured by using EchoMRI analyzer (Echo Medical Systems, Houston, Texas, USA), a quantitative magnetic resonance technique as described elsewhere [Nixon 2010]. Briefly, scans for whole body fat measurement were performed by placing animals into a thin-walled cylindrical with a plastic insert tube added to restrict movement. Liver and gastrocnemious muscle fat content were measured with a specific adaptor for tissue samples scanning as described by the manufacturer.

Plasma analyses

Plasma total cholesterol (Cholesterol-CP; ABX diagnostics, Montpellier, France), HDL cholesterol (HDL direct-CP; ABX diagnostics, Montpellier, France), triglycerides (Triglycerides; Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK), free fatty acids (FFA) (NEFA-HR-2 kit; WAKO Chemicals GmbH, Neuss, Germany), glucose (HK-CP kit; ABX diagnostics, Montpellier, France), homocysteine (Homocysteine Enzymatic Assays; Demeditec Diagnosis, Kiel, Germany), alanine transaminase (ALT CP; ABX diagnostics, Montpellier, France) and aspartate transaminase (AST CP; ABX diagnostics, Montpellier, France)

were measured using an automated ABX Pentra c200 equipment (Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, France).

RNA isolation and real-time PCR

Total RNA (n=8 for each experimental dietary group) was extracted using the QIAamp DNA and RNA mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), which was quantified by Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo & Scientific, Delaware, USA). Each sample was treated with DNase using RNeasy Micro Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and retrotranscribed with Ambion WT Expression Kit (Ambion, California, USA).

Quantitative real-time PCR was performed by triplicate using ABI PRISM 7900 HT Fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Texas, USA) and Taqman primers (Applied Biosystems, Texas, USA) for Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, Srebf2, Lxra, Srebf1, Acaca, Fasn, Agpat3, Lepr, Esr1, Mif, Btc, Mme (table 2). Fold change between groups was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. cDNA integrity was checked with a 18S probe and gene expression levels were normalized with Gapdh (table 2).

RefSeq	Gene Symbol	Gene name
NM_053354.3	Dnmt1	DNA methyltransferase 1
NM_001003958.1	Dnmt3a	DNA methyltransferase 3a
NM_001003959.1	Dnmt3b	DNA methyltransferase 3b
NM_001033694.1	Srebf2	Sterol regulatory element binding transcription factor 2
NM_031627.2	Lxra	Liver X nuclear receptor alpha variant 1
XM_213329.5	Srebf1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
NM_022193.1	Acaca	Acetyl-CoA carboxylase alpha
NM_017332.1	Fasn	Fatty acid synthase
NM_001106378.1	Agpat3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3
NM_012596.1	Lepr	Leptin receptor
NM_012689.1	Esr1	Estrogen receptor 1
NM_031051.1	Mif	Macrophage migration inhibitory factor
NM_022256.1	Btc	Betacellulin
NM_012608.2	Mme	Membrane metallo-endopeptidase
NM_017008	Gapdh	Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

Table 1. Genes selected for microarray validation and primer references for quantitative real-time PCR.

Statistical analysis

Results were expressed as means \pm standard error (SE). Data were analyzed using one way ANOVA test followed by DMS post-hoc test when applicable to compare: adult diet effect (€; c-C Vs c-HFS, c supp-C Vs c supp-HFS, hfs-C Vs hfs-HFS, hfs supp-C Vs hfs supp-HFS), maternal diet effect (§; c-C Vs hfs-C, c supp-C Vs hfs supp-C, c-HFS Vs hfs-HFS, c supp-HFS Vs hfs supp-HFS) and maternal methyl donor supplementation effect (£; c-C Vs c supp-C, hfs-C Vs hfs supp-C, c-HFS Vs c supp-HFS, hfs-HFS Vs hfs supp-HFS). The level of probability was set at $p < 0.05$ as statistically significant. Pearsons rank correlation test was also used. All the statistical analyses were performed with SPSS 15.0 program for Windows (SPSS, Illinois, USA).

RESULTS

Before the adulthood dietary intervention (figure 2), at 12-week old, there was an increase on body weight (9% and 12% without or with methyl donor supplementation cocktail, $p < 0.001$) and fat mass percentage (19% and 19% without or with methyl donor supplementation cocktail, $p < 0.001$) with no methyl donor supplementation influence. Furthermore, maternal HFS supp feeding presented a slight, but highly significant, increase on body weight respect to maternal C supp fed rats (3%, $p < 0.001$).

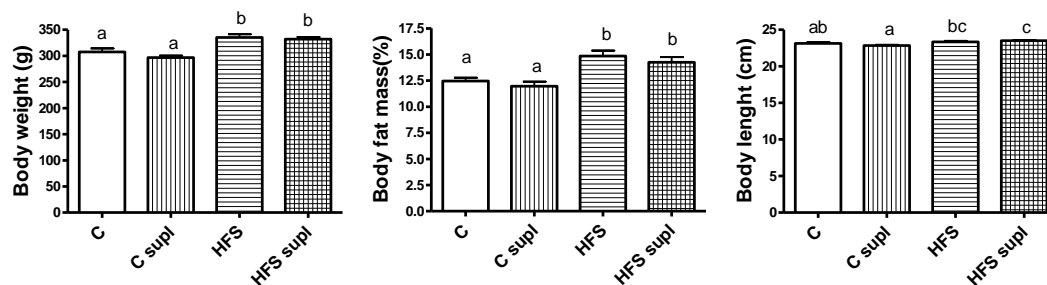


Figure 2. Weight, fat and length at 12 weeks old; before dietary treatment. Values are means \pm SE. Different letters indicate significant differences between groups of at least $p < 0.05$. Vertical lines mean maternal methyl donor supplementation and horizontal lines mean maternal high-fat-sucrose dietary intake.

As expected, all animals fed on HFS diet in adulthood developed the usual obesity-related phenotype (table 2), characterized by increased weight (from 27% to 80%, $p < 0.01$ to $p < 0.001$) and fat mass gain percentages (from 118% to 204%, $p < 0.001$) when compared with each own control groups (with the same maternal diet). According to lipid accumulation outside adipose tissues, the obesogenic diet in adult rats promoted increases on liver fat content (from 98% to 122%, $p < 0.001$) with no changes on gastrocnemius muscle fat accumulation.

	c-C (n=10)	c spl-C (n=13)	hfs-C (n=11)	hfs spl-C (n=12)	c-HFS (n=12)	c spl-HFS (n=14)	hfs-HFS (n=12)	hfs spl-HFS (n=12)	ANOVA
Weight gain (%)	46.89 ± 1.98	47.39 ± 2.70	39.28 ± 1.58	39.61 ± 1.65 [§]	59.55 ± 2.26 [€]	67.20 ± 3.09 ^{€€€}	65.11 ± 2.64 ^{€€€}	71.22 ± 3.01 ^{€€€}	***
Fat mass gain (%)	6.14 ± 0.76	5.28 ± 0.84	6.93 ± 1.41	5.84 ± 0.52	14.42 ± 0.88 ^{€€€}	15.57 ± 0.95 ^{€€€}	15.13 ± 0.98 ^{€€€}	17.75 ± 0.81 ^{€€€€€}	***
Epididymal adipose tissue (%)	2.26 ± 0.13	2.15 ± 0.19	2.87 ± 0.25 [§]	2.69 ± 0.13 [§]	3.37 ± 0.18 ^{€€€}	3.44 ± 0.17 ^{€€€}	3.27 ± 0.19	4.40 ± 0.23 ^{€€€€€€€€}	***
Retroperitoneal adipose tissue (%)	2.44 ± 0.15	2.34 ± 0.22	3.24 ± 0.22 ^{§§}	3.09 ± 0.18 ^{§§}	3.73 ± 0.16 ^{€€€}	3.48 ± 0.15 ^{€€€}	4.13 ± 0.22 ^{€€}	4.99 ± 0.16 ^{€€€€€€€€}	***
Mesenteric adipose tissue (%)	1.42 ± 0.08	1.33 ± 0.12	1.58 ± 0.10	1.43 ± 0.06	1.86 ± 0.06 ^{€€€}	1.77 ± 0.09 ^{€€€}	2.01 ± 0.12 ^{€€}	2.17 ± 0.08 ^{€€€€€}	***
Subcutaneous adipose tissue (%)	2.06 ± 0.10	2.05 ± 0.17	2.61 ± 0.27	2.17 ± 0.16	3.26 ± 0.18 ^{€€€}	3.48 ± 0.23 ^{€€€}	3.60 ± 0.29 ^{€€}	3.62 ± 0.17 ^{€€€}	***
Liver (%)	2.30 ± 0.04	2.30 ± 0.03	2.27 ± 0.04	2.31 ± 0.04	2.17 ± 0.05	2.25 ± 0.06	2.18 ± 0.08	2.07 ± 0.03 ^{€€€€€}	**
Liver fat content (%)	4.43 ± 0.32	4.63 ± 0.25	5.10 ± 0.31	4.71 ± 0.12	9.81 ± 0.70 ^{€€€}	10.23 ± 0.92 ^{€€€}	11.36 ± 0.49 ^{€€€€}	9.34 ± 0.42 ^{€€€€}	***
Gastrocnemius muscle (%)	0.53 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.53 ± 0.02	0.47 ± 0.01 ^{€€}	0.46 ± 0.01 ^{€€€}	0.44 ± 0.02 ^{€€€}	0.45 ± 0.01 ^{€€€€}	***
Gastrocnemius fat content (%)	5.03 ± 0.12	4.87 ± 0.14	5.07 ± 0.16	4.85 ± 0.10	5.28 ± 0.16	5.22 ± 0.20	5.48 ± 0.19	5.15 ± 0.11	ns

Table 2. Phenotypic characteristics and fat depot distribution of different experimental groups. Values are means ± SE. (€, adult diet effect; §, maternal HFS dietary intake effect; £, maternal methyl donor supplementation effect) (one, two or three symbols represent p values of <0.05, <0.01 and <0.001 respectively).

Regarding to maternal diet, HFS intake during lactation, together with methyl donor supplementation, promoted lower weight gain percentage (-19%, $p < 0.05$) in adult control fed rats, while mesenteric and epididymal adipose tissue as well as liver weight were increased in adult high-fat-sucrose fed rats (22%, 28%, 8% respectively, $p < 0.05$ to $p < 0.01$). There were also increased epididymal adipose depots in control fed adult rats with obesogenic fed mothers, with no influence of supplementation cocktail (27% and 25%, $p < 0.05$). Finally, higher liver fat accumulation was promoted by the adult obesogenic diet with maternal HFS diet respect to maternal C fed rats (16%, $p < 0.05$).

Interestingly, maternal obesogenic diet supplemented with methyl donors increased adult offspring fat mass gain (17%, $p < 0.05$) when fed on HFS diet respect to those whose mothers fed HFS without supplementation. This effect was due mainly to an increase on epididymal (35%, $p < 0.001$) and retroperitoneal (21%, $p < 0.01$) fat depots. In addition, liver fat content was decreased in these animals by the methyl donor supplementation cocktail (-18%, $p < 0.05$).

Resultados

	c-C (n=10)	c spl-C (n=13)	hfs-C (n=11)	hfs spl-C (n=12)	c-HFS (n=12)	c spl-HFS (n=14)	hfs-HFS (n=12)	hfs spl-HFS (n=12)	ANOVA
Total cholesterol (mg/dL)	65.20 ± 3.26	64.31 ± 2.90	68.64 ± 3.36	68.17 ± 3.10	78.58 ± 4.32 ^{€€}	66.57 ± 3.31 ^{€€}	81.83 ± 3.62 ^{€€}	80.42 ± 1.93 ^{€€§§}	***
HDL cholesterol (mg/dL)	18.93 ± 0.71	20.87 ± 0.82	20.72 ± 0.99	19.64 ± 0.68	19.55 ± 0.67	21.48 ± 1.22	23.23 ± 1.21 ^{§§}	18.38 ± 0.44 ^{€€€€}	**
LDL cholesterol (mg/dL)	18.58 ± 3.24	15.62 ± 3.03	17.51 ± 3.56	13.00 ± 3.59	35.38 ± 4.89 ^{€€€}	21.65 ± 2.14 ^{€€}	35.74 ± 1.78 ^{€€€}	31.95 ± 1.92 ^{€€€§}	***
Triglycerides (mg/dL)	140.30 ± 13.53	140.38 ± 10.07	163.64 ± 18.20	181.17 ± 14.44 [§]	118.25 ± 12.02	117.21 ± 7.45	114.33 ± 11.08 ^{€€}	150.42 ± 10.32 ^{€€}	***
Atherogenic Index	3.44 ± 0.10	3.11 ± 0.13	3.34 ± 0.14	3.46 ± 0.07 [§]	4.00 ± 0.12 ^{€€}	3.18 ± 0.17 ^{€€€}	3.57 ± 0.13 [§]	4.38 ± 0.09 ^{€€€§§§§§}	***
Free Fatty Acids (mg/dL)	0.69 ± 0.07	0.69 ± 0.04	0.64 ± 0.03	0.74 ± 0.04	0.55 ± 0.02 ^{€€}	0.59 ± 0.03	0.49 ± 0.03 ^{€€}	0.51 ± 0.03 ^{€€€}	***
Glucose (mg/dL)	124.56 ± 7.06	124.44 ± 5.52	113.99 ± 3.18	118.75 ± 4.57	121.01 ± 4.18	125.80 ± 4.09	123.10 ± 3.03	126.48 ± 3.13	ns
Homocysteine (µg/dL)	13.92 ± 1.23	12.87 ± 1.06	10.44 ± 0.68 [§]	13.44 ± 1.26 [€]	12.68 ± 0.68	11.76 ± 0.80	11.14 ± 0.81	15.10 ± 1.11 ^{€€€}	*
AST/ALT ratio	2.71 ± 0.16	2.71 ± 0.20	2.59 ± 0.13	2.43 ± 0.11	3.11 ± 0.16	3.13 ± 0.10	3.11 ± 0.16	3.22 ± 0.20 ^{€€}	**

Table 3. Biochemical characteristics of different experimental groups. Values are means ± SE. (€, adult diet effect; §, maternal HFS dietary intake effect; £, maternal methyl donor supplementation effect) (one, two or three symbols represent p values of <0.05, <0.01 and <0.001 respectively).

Regarding plasma biochemical parameters (table 3), the composition of the obesogenic diet during adulthood augmented total (from 18% to 21%, $p < 0.01$) and LDL cholesterol (from 90% to 146%, $p < 0.001$) when mothers fed C, HFS and HFS supp diet, increasing also transaminases ratio (AST/ALT; from 15% to 33%, $p < 0.05$ to $p < 0.01$) with maternal C supp, HFS and HFS supp diet intake. Triglyceride plasma levels, free fatty acids and atherogenic index (Total cholesterol/HDL cholesterol ratio) were also affected by the adult obesogenic intake in some groups. Adult control fed rats showed decreased homocysteine levels (-34%, $p < 0.05$) comparing C with HFS maternal dietary intake. There were also increased triglyceride plasma levels (29%, $p < 0.05$) and atherogenic index values (11%, $p < 0.05$) when maternal C supp and HFS supp groups were examined. On the other hand, maternal HFS diet on rats fed the obesogenic diet on adulthood was associated with higher HDL cholesterol levels (19%, $p < 0.01$) and lower atherogenic index (-11%, $p < 0.05$) respect to C maternal diet. Also, there was an increase on total (21%, $p < 0.01$) and LDL cholesterol (48%, $p < 0.05$), atherogenic index (35%, $p < 0.05$) and homocysteine (28%, $p < 0.05$) and a decrease on HDL cholesterol (-14%, $p < 0.05$) between C supp and HFS supp maternal feeding. Maternal control supplementation influence HFS offspring response on total cholesterol (-15%, $p < 0.01$) and atherogenic index (-14%, $p < 0.001$) when compared C with C supp maternal feeding. Comparing maternal HFS and HFS supp feeding, it was increased plasma triglycerides (36%, $p < 0.05$), atherogenic index (23%, $p < 0.001$) and homocysteine (36%, $p < 0.001$) levels, decreasing HDL cholesterol (-21%, $p < 0.001$).

Resultados

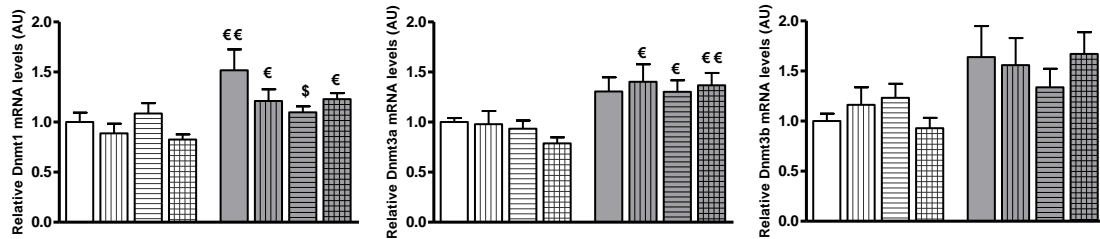


Figure 3. Liver mRNA expression levels of DNA methylation-related genes measured by real-time PCR. All results are expressed as fold changes as compared to control group (cC). Data are reported as means \pm SE. ($n=8$ for each experimental group) (€, adult diet effect; \$, maternal HFS dietary intake effect; £, maternal methyl donor supplementation effect) (one, two or three symbols represent p values of <0.05 , <0.01 and <0.001 respectively). Vertical lines mean maternal methyl donor supplementation, horizontal lines mean maternal high-fat-sucrose dietary intake and grey colour mean adult high-fat-sucrose diet intake.

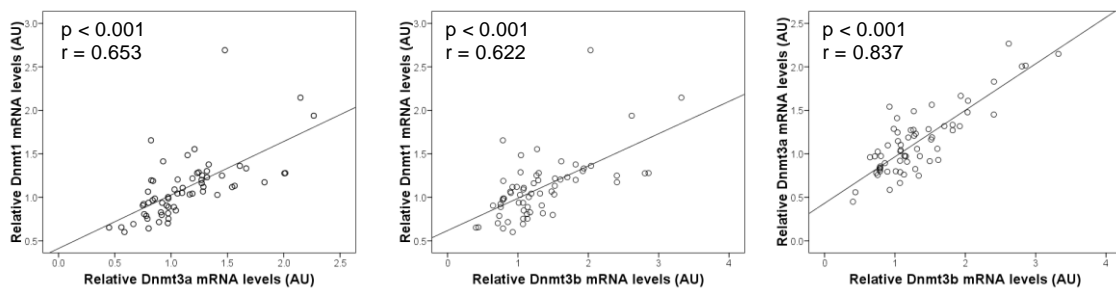


Figure 4. Correlation analysis involving Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b gene expression levels.

Additionally, hepatic expression of some key genes involved in DNA methylation homeostasis (Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b) (figure 3), lipid metabolism (Srebf2, Lxra, Srebf1, Acaca, Fasn and Agpat3) (figure 5) and other obesity-related genes (Lepr, Esr1, Mif, Btc and Mme) (figure 6) were measured. In this sense, adulthood obesogenic dietary intake increased, in most of cases, mRNA levels of Dnmt1 (from 39% to 52%, $p<0.05$ to $p<0.01$) and Dnmt3a (from 40% to 73%, $p<0.05$ to $p<0.01$), enzymes for *de novo* and maintenance DNA methylation, respectively. Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b showed a close correlation between them (figure 4) with a R^2 linear value between 0.386 and 0.701 (p value <0.001).

Resultados

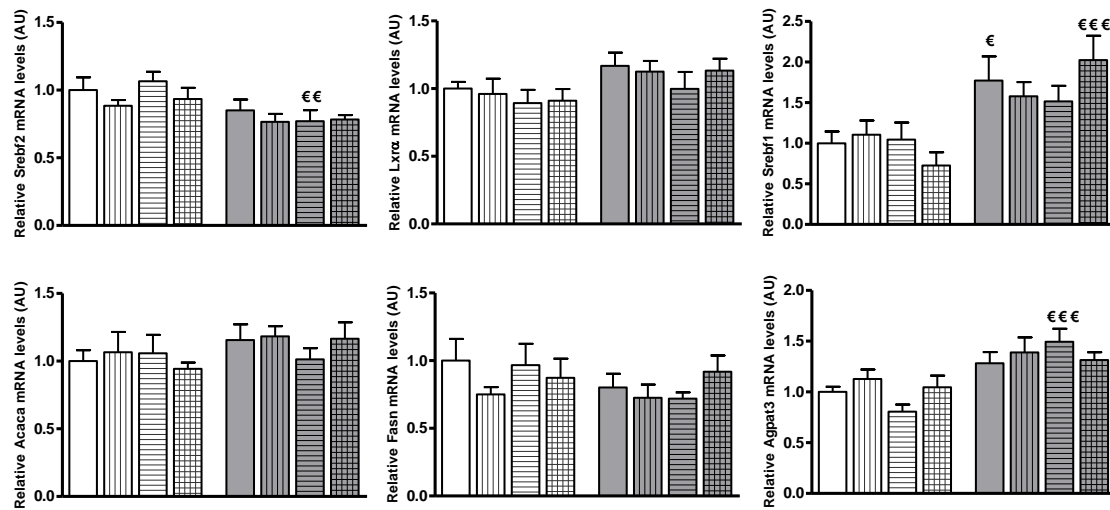


Figure 5. Liver mRNA expression levels of lipid metabolism related genes measured by real-time PCR. All results are expressed as fold changes as compared to control group (c). Data are reported as means \pm SE. (n=8 for each experimental group) (€, adult diet effect; \$, maternal HFS dietary intake effect; £, maternal methyl donor supplementation effect) (one, two or three symbols represent p values of <0.05, <0.01 and < 0.001 respectively). Vertical lines mean maternal methyl donor supplementation, horizontal lines mean maternal high-fat-sucrose dietary intake and grey colour mean adult high-fat-sucrose diet intake.

Lipid metabolism related genes showed changes due to adulthood diet (figure 5). Thus, there was a decrease due to adulthood HFS intake on Srebf2 gene expression (-28%, $p < 0.01$) from maternal HFS fed group and increases on Srebf1 gene expression (77% and 177%, $p < 0.05$ and $p < 0.001$) when mothers were fed C and HFS sup diets. Agpat3 also showed elevated expression levels (25%, $p < 0.001$) when analyze hfs-C effect respect to hfs-HFS, presenting also a negative correlation with triglyceride plasma levels (figure 7) with a R^2 linear=0.263 (p value <0.001). Finally, there were no important effects on Lepr hepatic expression levels depending maternal nutrition on rats fed control diet during adulthood. On the other hand, Lepr expression levels increased due to adult HFS intake on C and C sup maternal feeding groups (456% and 106%, $p < 0.05$ and $p < 0.001$ respectively), whereas Mif expression levels were reduced on C, HFS and HFS sup maternal groups (-24%, -27% and -36% respectively, $p < 0.05$ to $p < 0.01$) (figure 6). Analyzing maternal obesogenic diet effect, lepr expression was decreased (-56%, $p < 0.001$) as compare c-HFS and hfs-HFS groups, while Mif mRNA

levels increased (25%, $p < 0.05$) between c supp-C and hfs supp-C groups. Additionally, maternal dietary supplementation in chow fed mothers decreased Lepr gene expression (-52%, $p < 0.001$), while in mothers fed the obesogenic diet, Lepr transcription levels were increased (61%, $p < 0.05$) when rats fed adulthood HFS diet. Lepr showed also a correlation with atherogenic index (figure 7) with a R^2 linear=0.256 (p value < 0.001).

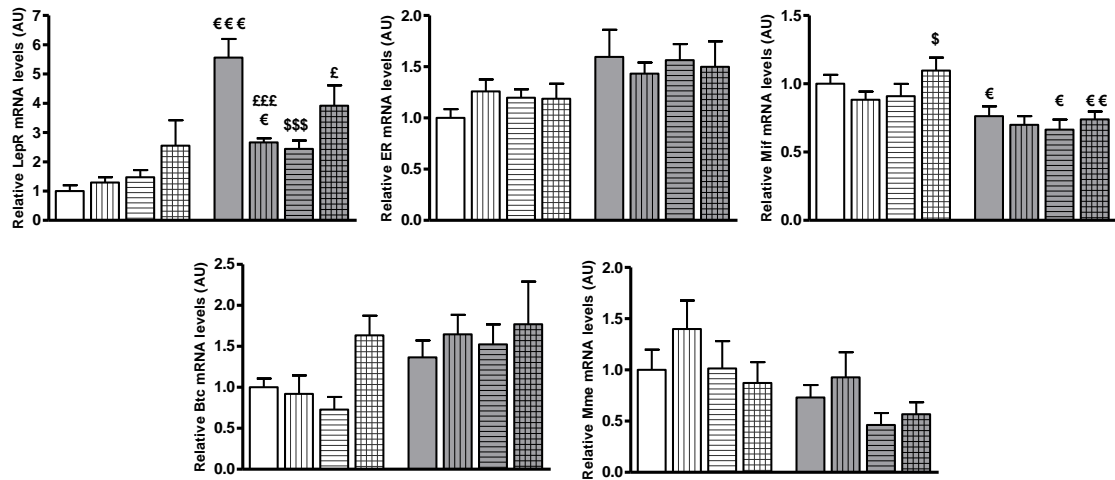


Figure 6. Liver mRNA expression levels of other obesity related genes measured by real-time PCR. All results are expressed as fold changes as compared to control group (cC). Data are reported as means \pm SE. ($n=8$ for each experimental group) (€, adult diet effect; \$, maternal HFS dietary intake effect; £, maternal methyl donor supplementation effect) (one, two or three symbols represent p values of < 0.05 , < 0.01 and < 0.001 respectively). Vertical lines mean maternal methyl donor supplementation, horizontal lines mean maternal high-fat-sucrose dietary intake and grey colour mean adult high-fat-sucrose diet intake.

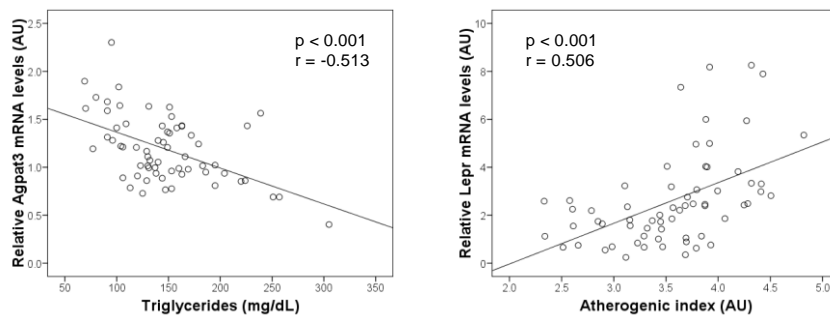


Figure 7. Correlation analysis involving Agpat3 and Lepr gene expression levels with plasma triglyceride concentration and atherogenic index respectively.

DISCUSSION

Body weight gain is not only related with the own dietary intake; perinatal growth may be also influenced by maternal dietary intake [Alzamendi 2010, Palou 2010, Vucetic 2010]. Thus, animal models with different maternal nutrition during perinatal periods have been developed to investigate the susceptibility to the obesity and related comorbidities [Martinez 2012]. In the current study, we analyzed the influence of HFS and methyl donor supplementation to dams during lactation on adult offspring and their differential response to the same kind of obesogenic diet.

The experimental obesity model was based on a commercial high-fat-sucrose diet [Cordero 2012, Lomba 2010]. On the other hand, methyl donor supplementation cocktail including betaine, choline, folic acid and vitamin B₁₂ was previously described by Waterland et col [Waterland 2008] as an epigenetic regulator of agouti transposon expression by DNA methylation. Furthermore, dietary depletion of some of this molecules, mainly choline and betaine, has been used to produce animal models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and advanced states of steatohepatitis, cirrhosis or including hepatic carcinoma [Sahai 2004, [Starlard-Davenport 2010]. Interestingly, novel studies have described the protective effect of this supplementation cocktail in adults on hepatic obesogenic-diet induced fat accumulation [Cordero 2011, 2012]. All these findings could be of interest on NAFLD prevention, main hepatic manifestation of the metabolic syndrome.

In this context, maternal obesogenic diet during lactation increased weight and fat mass in adulthood [Khan 2005]. Regarding body length, previous studies in mice showed a decrease due to methyl donor supplementation with chow diet feeding [Schaible 2011]. A methyl-donor-dependent growth restriction on maternal control fed animals compared with HFS feeding was detected, which could probably parallel the body weight increase.

The most promising result according to obesity phenotype after adulthood obesogenic diet feeding is the increase on adipose depots when maternal HFS feeding was supplemented with promethylant substrates as well as the parallel decrease on liver

fat content. This effect induced by methyl donors on liver has been previously described in adult Wistar rats [Cordero 2011, 2012]. The current research seems to confirm this fact depending on maternal nutrition during lactation. It could be hypothesized that the excess of fat that is not storage on liver have migrated to its body natural stored place, adipose tissue, mainly epididymal and retroperitoneal [Perseghin 2011]. In this way, Fabbrini et col [Fabbrini 2009] demonstrated that intrahepatic triglyceride content, not visceral adipose tissue, is involved in the metabolic features associated with obesity. Thus, prevention of liver fat accumulation could increase adiposity and obese phenotype but avoiding some other associated complications.

Biochemical features induced by the adult diet were mainly characterized by decreasing on FFA and TG levels, as it has been previously described that fasting conditions increases free fatty acid levels in control fed rats and plasma triglycerides decreased on fasted high-fat-fed rats [Palou 2010]. Furthermore, an increased AST/ALT ratio, an enzymatic marker of liver damage [Yang 2012], evidenced a liver injury induced by obesogenic diet probably due to an increase on hepatic mitochondrial oxidative stress. Total cholesterol levels increased with HFS dietary treatment, probably as a result of the higher LDL cholesterol levels. Both maternal obesogenic diet and methyl donor supplementation did not present a clear pattern of change probably because biochemical plasma parameters are continuously regulated by the nutrient supply in that moment and the maternal regulation of these parameters by suckling is complicated. In this way other studies have described absence of changes on glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol or free fatty acids plasma levels on adulthood with maternal obesogenic diet during lactation [Alzamendi 2010, Khan 2005].

Liver DNA methyltransferases promotes DNA methylation processes and its gene expression is commonly augmented on hepatocarcinoma situation [Majumder 2002]. Dnmt3a and Dnmt3b are the main enzymes implicated in *de novo* DNA methylation, while Dnmt1 maintain the cellular methylation pattern. Nutritional models using depletion of methyl donor substrates also increased Dnmt1 and Dnmt3a mRNA levels,

maintaining the same values for Dnmt3b [Gong 2010]. Thus, the effect due to adulthood HFS diet intake could be linked to an increase of hepatic fat accumulation as first step on the pathogenesis of NAFLD and evolution to NASH, cirrhosis and hepatocarcinoma [Starley 2010]. However, obesity related inflammation in adipose tissue is usually accompanied by increased expression of Dnmt3a [Kamei 2010]. It was also interesting to note that these three main epigenetic-related enzymes were correlated, which it can conclude that epigenetic DNA methylation processes could be stimulated by high-fat-sucrose feeding. Finally, it seemed that maternal HFS dietary intake could influence an adaptation of the response when offspring was fed HFS diet on adulthood.

In this context, Srebf2 expression levels are inversely regulated by cholesterol levels [Horie 2010]. Thus, hfs-HFS group presented the highest HDL, LDH and total cholesterol plasma levels. Perhaps, increased levels of these parameters on the rest of the groups fed obesogenic diet at adulthood were not enough to activate Srebf2 gene expression. On the other hand, Srebf1 is a regulatory enzyme involved in lipid synthesis on liver of rats fed high-fat-sucrose diet [Aragno 2009]. There was a partial dietary effect according to this gene, as only increased mRNA levels by adult HFS diet intake on mothers fed C or HFS supp diets. It has been described previously a trend to increase Srebf1 expression when combining methyl donor supplementation and high-fat-sucrose diet feeding on adult rats [Cordero 2012]. According lipid metabolism-related genes, Agpat3 is a key enzyme involved in triacylglycerol synthesis [Cao 2006], that should be stimulated, although it was only augmented in hfs-HFS group probably by the additive effect of receiving twice the obesogenic diet; during lactation and adulthood. The negative correlation presented between Agpat3 and plasma triglyceride levels could due a response activated by the decrease on triglycerides due to fasting status described on obesogenic animal models [Palou 2010].

Leptin receptor is the key intracellular transporter for the obesity-linked leptin adipokine [Marti 1999]. Indeed, animal models of obesity in mice are based on punctual mutations on Lepr [Panchal 2011]. In this way, increased levels of this gene measured on adulthood feed animals could be related with increased values of leptin

plasma levels [Garcia 2010]. As leptin hormone is synthesized by adipose tissue, the increase on *Lepr* expression by maternal HFS sup diet on adult obesogenic feeding rats, could be related with the higher amount of adipose depots this group presents [Gomez-Ruiz 2011]. As opposite, to explain the decrease on leptin expression on c sup-HFS group comparing with c-HFS should be necessary to analyze leptin expression on different adipose depots. Finally, decreased *Lepr* expression by HFS intake has been previously described with a lactating fructose-enriched maternal diet, showing hypothalamic reduced expression on adult offspring [Alzamendi 2010].

Although increased *Mif* expression is usually related to inflammation and hepatic fibrosis stages [Hori 2003], a reduction of its mRNA levels has been associated with an improvement on glucose tolerance [Verschuren 2009]. These data could explain our model results, as showed no changes in glucose plasma levels by adulthood diet and eight-weeks of dietary treatment is no time-enough to develop an advantage status of liver injury as fibrosis.

As conclusion, in this study we demonstrate that perinatal nutrition at suckling period could affect the dietary response on adult offspring. Thus, maternal supplementation with methyl donor combined with high-fat-sucrose feeding affected adiposity on adults fed HFS diet by increasing adipose tissue storages and preventing against liver fat accumulation. Interestingly, complex interactions between maternal diet and supplementation, as well as adult diet were found on *Lepr* gene expression, a key gene of many obesity-related animal models. Furthermore, epigenetic DNA methylation processes could be activated by increasing *Dnmt1* and *Dnmt3a* gene expression levels by obesogenic adult feeding. *Mif* and *Sreb1* gene expression showed also changes due to HFS adult feeding and related with maternal diet.

ACKNOWLEDGEMENTS

Technical assistance of V. Ciaurriz, J.A. Ayala and A.M. Gomez-Uriz is gratefully acknowledged. The authors thank Asociacion de Amigos de la Universidad de Navarra

of P. Cordero's fellowship and Linea Especial (University of Navarra; LE/97) for experimental financial support. Also RETICS and CIBERobn schemes from Carlos III Institute are gratefully acknowledged.

Bibliography

- [1] Alzamendi A, Castrogiovanni D, Gaillard RC, Spinedi E, Giovambattista A. Increased male offspring's risk of metabolic-neuroendocrine dysfunction and overweight after fructose-rich diet intake by the lactating mother. *Endocrinology* 2010;151:4214-4223.
- [2] Aragno M, Tomasinelli CE, Vercellinatto I, Catalano MG, Collino M, Fantozzi R et al. SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver disease induced by Western-type high-fat diet plus fructose in rats. *Free Radic Biol Med* 2009;47:1067-1074.
- [3] Campbell DM, Hall MH, Barker DJ, Cross J, Shiell AW, Godfrey KM. Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:273-280.
- [4] Cao J, Li JL, Li D, Tobin JF, Gimeno RE. Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in *de novo* triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:19695-19700.
- [5] Cordero P, Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Dietary supplementation with methyl donor groups could prevent nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 2011;53:2151-2152.
- [6] Cordero P, Gomez-Uriz AM, Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Dietary supplementation with methyl donors reduces fatty liver and modifies the Fatty Acid Synthase DNA methylation profile in rats fed an obesogenic diet. *Genes Nutr* 2012;in press. DOI: 10.1007/s12263-012-0300-z.
- [7] Ding Y, He J, Liu X, Chen X, Long C, Wang Y. Expression of DNA methyltransferases in the mouse uterus during early pregnancy and susceptibility to dietary folate deficiency. *Reproduction* 2012.
- [8] Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15430-15435.

- [9] Faust IM, Johnson PR, Hirsch J. Long-term effects of early nutritional experience on the development of obesity in the rat. *J Nutr* 1980;110:2027-2034.
- [10] Garcia AP, Palou M, Priego T, Sanchez J, Palou A, Pico C. Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus NPY- and alphaMSH-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats. *Diabetes Obes Metab* 2010;12:403-413.
- [11] Gomez-Ruiz A, Milagro FI, Campion J, Martinez JA, de Miguel C. High-fat diet feeding alters metabolic response to fasting/non fasting conditions. Effect on caveolin expression and insulin signalling. *Lipids Health Dis* 2011;10:55.
- [12] Gong L, Pan YX, Chen H. Gestational low protein diet in the rat mediates Igf2 gene expression in male offspring via altered hepatic DNA methylation. *Epigenetics* 2010;5:619-626.
- [13] Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 2009;9:88.
- [14] Hoile SP, Lillycrop KA, Grenfell LR, Hanson MA, Burdge GC. Increasing the folic acid content of maternal or post-weaning diets induces differential changes in phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA expression and promoter methylation in rats. *Br J Nutr* 2011;1-6.
- [15] Hori Y, Sato S, Yamate J, Kurasaki M, Nishihira J, Hosokawa T et al. Immunohistochemical study of macrophage migration inhibitory factor in rat liver fibrosis induced by thioacetamide. *Eur J Histochem* 2003;47:317-324.
- [16] Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K et al. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:17321-17326.

- [17] Kamei Y, Suganami T, Ehara T, Kanai S, Hayashi K, Yamamoto Y et al. Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:314-321.
- [18] Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R127-133.
- [19] Lomba A, Milagro FI, Garcia-Diaz DF, Marti A, Campion J, Martinez JA. Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis. *Lipids Health Dis* 2010;9:60.
- [20] Majumder S, Ghoshal K, Datta J, Bai S, Dong X, Quan N et al. Role of *de novo* DNA methyltransferases and methyl CpG-binding proteins in gene silencing in a rat hepatoma. *J Biol Chem* 2002;277:16048-16058.
- [21] Marti A, Berraondo B, Martinez JA. Leptin: physiological actions. *J Physiol Biochem* 1999;55:43-49.
- [22] Marti A, Martinez-Gonzalez MA, Martinez JA. Interaction between genes and lifestyle factors on obesity. *Proc Nutr Soc* 2008;67:1-8.
- [23] Martinez JA, Cordero P, Campion J, Milagro FI. Interplay of early-life nutritional programming on obesity, inflammation and epigenetic outcomes. *Proc Nutr Soc* 2012;1-8.
- [24] McMullen S, Mostyn A. Animal models for the study of the developmental origins of health and disease. *Proc Nutr Soc* 2009;68:306-320.
- [25] Misra A, Khurana L. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:S9-30.
- [26] Nixon JP, Zhang M, Wang C, Kuskowski MA, Novak CM, Levine JA et al. Evaluation of a quantitative magnetic resonance imaging system for whole body composition analysis in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:1652-1659.

- [27] Ohlsson A, Shah PS. Effects of the September 11, 2001 disaster on pregnancy outcomes: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2011;90:6-18.
- [28] Palou M, Priego T, Sanchez J, Torrens JM, Palou A, Pico C. Moderate caloric restriction in lactating rats protects offspring against obesity and insulin resistance in later life. *Endocrinology* 2010;151:1030-1041.
- [29] Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:351982.
- [30] Paternain L, De la Garza A, Batlle M, Milagro F, Martinez J, Campion J. Prenatal stress increases the obesogenic effects of a high-fat-sucrose diet in adult rats in a sex-specific manner. *Stress* 2012.
- [31] Perseghin G. Lipids in the wrong place: visceral fat and nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care* 2011;34 Suppl 2:S367-370.
- [32] Power C, Jefferis BJ. Fetal environment and subsequent obesity: a study of maternal smoking. *Int J Epidemiol* 2002;31:413-419.
- [33] Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev* 2006;82:485-491.
- [34] Sahai A, Malladi P, Pan X, Paul R, Melin-Aldana H, Green RM et al. Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G1035-1043.
- [35] Schaible TD, Harris RA, Dowd SE, Smith CW, Kellermayer R. Maternal methyl-donor supplementation induces prolonged murine offspring colitis susceptibility in association with mucosal epigenetic and microbiomic changes. *Hum Mol Genet* 2011;20:1687-1696.

- [36] Starlard-Davenport A, Tryndyak V, Kosyk O, Ross SR, Rusyn I, Beland FA et al. Dietary methyl deficiency, microRNA expression and susceptibility to liver carcinogenesis. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2010;3:259-266.
- [37] Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 2010;51:1820-1832.
- [38] Szeto IM, Das PJ, Aziz A, Anderson GH. Multivitamin supplementation of Wistar rats during pregnancy accelerates the development of obesity in offspring fed an obesogenic diet. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:364-372.
- [39] Verschuren L, Kooistra T, Bernhagen J, Voshol PJ, Ouwens DM, van Erk M et al. MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circ Res* 2009;105:99-107.
- [40] Vucetic Z, Kimmel J, Totoki K, Hollenbeck E, Reyes TM. Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology* 2010;151:4756-4764.
- [41] Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, Rached MT, Mirza S. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:1373-1379.
- [42] Yang HR, Kim HR, Kim MJ, Ko JS, Seo JK. Noninvasive Parameters and hepatic fibrosis scores in children with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012;18:1525-1530.

V. Discusión general

El hígado graso no alcohólico o NAFLD es una enfermedad caracterizada por una excesiva acumulación de lípidos en los hepatocitos, que puede alterar la funcionalidad hepática normal y cuya aparición está favorecida por un incremento de los depósitos de grasa intraabdominal [Angulo 2002]. Este estado fisiopatológico provoca que el tejido adiposo tienda a expandirse, infiltrándose en los órganos cercanos y afectando a su funcionalidad [Guri 2011]. Por tanto, el NAFLD se encuentra íntimamente asociado a la obesidad, siendo la principal manifestación hepática del síndrome metabólico, acompañado de resistencia a la insulina [Moore 2010, Musso 2011]. El establecimiento y caracterización de modelos animales de obesidad permiten un adecuado acercamiento a la etiopatogenia de esta enfermedad [Panchal 2011]. En nuestro caso, el modelo obesogénico empleado se basó en la administración de una dieta rica en grasa y sacarosa, ya que tratamientos dietéticos ricos en ambos tipos de macronutrientes se han asociado al fenotipo y comorbilidades propias de la obesidad y características propias del síndrome metabólico [Bondia-Pons 2011, Boque 2009, Lomba 2010, Milagro 2006, Paternain 2011].

Otra aproximación experimental para el establecimiento de daño hepático con acumulación de lípidos consiste en el déficit dietético de sustratos relacionados con los procesos de metilación del ADN, o donantes de grupos metilo [Starlard-Davenport 2010, Tryndyak 2011]. Estas sustancias incluyen moléculas como la colina, la metionina, el ácido fólico o la vitamina B₁₂ y su deficiencia puede ocasionar desde situaciones de NAFLD hasta hepatocarcinoma, pasando por NASH, fibrosis y cirrosis, dependiendo del tipo y duración del tratamiento [Garcia-Tevijano 2001, Kajikawa 2011, Mato 2011, Pogribny 2009, Sahai 2004, Vetelainen 2007]. Además de los cambios fenotípicos y bioquímicos asociados, estos modelos carenciales pueden acompañarse de alteraciones en el patrón transcriptómico y epigenético del hígado [Pogribny 2009, Starlard-Davenport 2010, Tryndyak 2011].

Hasta la fecha, la suplementación dietética con sustancias prometilantes para prevenir el establecimiento de NAFLD en roedores se ha centrado principalmente en la administración de forma aislada de betaína, describiéndose un efecto protector

hepático contra la infiltración lipídica patológica en este órgano asociado a una inhibición de la citoquina TNF alfa [Kwon do 2009], así como contra la resistencia insulínica de origen hepático promoviendo la activación del receptor de insulina [Kathirvel 2010]. El empleo de un cóctel de sustancias prometilantes más completo ha sido estudiado en relación a obesidad [Waterland 2008], aunque sin un análisis exhaustivo de sus efectos sobre el NAFLD.

Por otra parte, las sustancias prometilantes pueden provocar alteraciones epigenéticas asociadas a cambios fenotípicos en los individuos [Milagro 2012]. Estas alteraciones pueden originarse a lo largo de la vida adulta [Milagro 2011] aunque existe una mayor predisposición a manifestarse durante etapas perinatales [Morgan 2005, Waterland 2006]. Por consiguiente, resulta interesante abarcar distintos estadios de la vida para el análisis de los efectos sobre el organismo de una suplementación con sustancias que pueden afectar potencialmente al fenotipo y a marcadores del epigenoma.

En este contexto, la finalidad del presente trabajo se ha orientado al estudio de la suplementación dietética con un cóctel de sustancias prometilantes para la atenuación de la aparición de NAFLD originada por un modelo dietético obesogénico. Además de las posibles alteraciones fenotípicas, bioquímicas, transcriptómicas y epigenéticas, se ha investigado tanto el efecto de este tratamiento en la vida adulta en ambos sexos como su influencia en la descendencia cuando es suministrado a la madre durante la lactancia.

1. Efectos de la dieta HFS

1.1 Ingesta de la dieta HFS en la edad adulta

El desarrollo de un modelo de obesidad inducido por la dieta en ratas Wistar machos adultas se alcanzó con una dieta rica en grasas y sacarosa, comparable con la dieta proobesogénica de los países occidentales [Cordain 2005]. Tras 8 semanas de

administración dietética durante la edad adulta, los animales presentaron un fenotipo obeso caracterizado por un incremento tanto en el peso como en la cantidad de grasa corporal total, cuantificada mediante resonancia magnética [Nixon 2010], así como de cada uno de los depósitos grasos obtenidos tras el sacrificio de los animales; grasa retroperitoneal, grasa mesentérica, grasa perigonadal y grasa subcutánea. Estos resultados son coincidentes con estudios previos tanto de nuestro laboratorio [Lomba 2010, Paternain 2012a, 2012b] como de otros grupos de investigación [El-Haschimi 2000, Farley 2003, Rahmouni 2005] en los que se ha empleado este tipo de dieta experimental.

El incremento de peso debido a la ingesta de la dieta HFS en hembras se acompañó de un aumento parcial de los diferentes depósitos adiposos, con un claro incremento de la grasa retroperitoneal, aunque menos concluyente que en machos. En este sentido, los datos disponibles en la literatura científica muestran evidencias de que una dieta rica en grasa no siempre está acompañada de un fenotipo de obesidad en ratas hembras [Taraschenko 2011], o que existe en hembras un efecto protector de resistencia a presentar alteraciones metabólicas patológicas originadas por una dieta con alto aporte de hidratos de carbono simples, lo que podría ser debido a la acción de las hormonas sexuales femeninas, a la diferente susceptibilidad al desarrollo de resistencia insulínica entre machos y hembras o al distinto patrón de expresión dependiente del sexo de genes vinculados a inflamación y aterosclerosis como el PPAR alpha [Galipeau 2002, Horton 1997, Priego 2008]. Otros estudios han descrito que las hormonas esteroideas pueden jugar un papel importante en el metabolismo, acumulación y distribución de los depósitos grasos [Campion 2008, Mayes 2004, Paternain 2011], que la expresión en el tejido adiposo del receptor de estrógenos ejerce un papel crucial en la lipólisis y oxidación lipídica de una manera sexo-dependiente [Benz 2012], y estudios a nivel cerebral han establecido una relación entre este gen y la leptina vinculada con el control hipotalámico del metabolismo [He 2012]. Por otro lado, se ha descrito que la expresión de ER α está regulada mediante cambios epigenéticos en su región promotora vinculados al cuidado materno durante

etapas perinatales [Matsuda 2012]. Debido a estas diferencias en la respuesta a la dieta dependiendo del sexo, se analizaron los resultados de forma separada para machos y hembras.

La dieta rica en grasas y azúcares simples provocó un estado inicial de esteatosis hepática, caracterizado por un incremento fisiopatológico de la infiltración de grasa en el hígado, probablemente mediado por un aumento de la captación de ácidos grasos del torrente sanguíneo y de la síntesis hepática de triglicéridos [Bechmann 2012, Malaguarnera 2009]. Además la influencia del aumento de la ingesta de lípidos, se ha descrito que la fructosa, monosacárido obtenido en la disociación de la sacarosa, puede estimular la superproducción intestinal bacteriana, con el consecuente incremento de metabolitos tóxicos absorbidos a nivel intestinal y que llegan directamente al hígado [Armutcu 2005, Frazier 2011, Koteish 2001]. En este trabajo, se combinó en la misma dieta un elevado porcentaje de grasa (dieta hiperlipídica e hipercalórica) con un alto contenido de fructosa para establecer una primera fase de NAFLD, normalmente sin una grave disfunción del metabolismo hepático, ya que resulta más fácilmente tratable y reversible que otros estadios más avanzados como el NASH o la cirrosis [Ekstedt 2006].

En machos adultos alimentados con la dieta HFS, se produjo un incremento en los niveles de insulina (capítulo 2) como respuesta a la dieta [Boque 2009]. Pese a ello, la hiperinsulinemia no fue aparentemente suficiente para controlar los niveles plasmáticos de glucosa, presentando un estado de insulinoresistencia que está asociado a síndrome metabólico y evolución de NAFLD [Garcia-Monzon 2011, [Pagano 2002]. Por otra parte, el incremento parcial de los niveles de lactato plasmático podría llegar a estimular la gluconeogénesis hepática, influyendo en el aumento de los niveles plasmáticos de glucosa [Roden 2008]. Por el contrario, los niveles plasmáticos de glucosa en hembras adultas alimentadas con una dieta HFS se mantuvieron estables. Esta menor propensión a padecer alteraciones relacionadas con el metabolismo de la glucosa y control de la insulina en hembras podría ser debida a la acción de las

hormonas sexuales [Galipeau 2002, Horton 1997, Lu 2009, Priego 2008, Taraschenko 2011].

El perfil lipídico plasmático también se alteró con la ingesta de la dieta obesogénica ya que los niveles de colesterol plasmático total se incrementaron, aumentando también el LDL colesterol y disminuyendo del HDL colesterol. En este sentido, una dieta rica en hidratos de carbono tiende a favorecer la síntesis hepática de triglicéridos y su secreción al torrente sanguíneo mediante las VLDL, precursoras de las LDL, para ser repartido por los distintos tejidos del organismo [Boivin 1995]. El incremento plasmático de las LDL está asociado a aterosclerosis y alteraciones cardiovasculares debido a su acumulación en el endotelio vascular y a sus características proinflamatorias, prooxidantes y protrombóticas [Badimon 2012]. Por otra parte, el HDL colesterol es un factor antiaterogénico, cuya función es la retirada y eliminación del colesterol de los tejidos periféricos transportándolo al hígado para su metabolismo [Tall 2008]. La disminución de los niveles de HDL colesterol plasmático en animales alimentados con dietas obesogénicas y enriquecidas en sacarosa ha sido descrito previamente [Kamgang 2005] y concuerda con nuestros hallazgos. Finalmente, el colesterol total, incrementado en este experimento, no resulta tan informativo como el índice aterogénico, calculado como la relación entre los niveles de colesterol total y de HDL colesterol, que es un marcador de riesgo cardiovascular [Li 2009, Park 2009, Sugiura 2011]. En este sentido, resulta controntrovertida la ausencia de un estado plasmático de hiperhomocisteinemia, ya que es otro factor diagnóstico de riesgo cardiovascular asociado a obesidad que ha sido descrito en modelos animales de dietas hipercalóricas, también asociado a la evolución de NAFLD mediante la inactivación de las enzimas hepáticas Cbs y Cgs encargadas de su metabolismo [Bravo 2011]. Por otra parte, el efecto más común de la ingesta de una dieta obesogénica en ratas es el incremento de los triglicéridos y ácidos grasos libres plasmáticos [Buettner 2007, Hariri 2010]. En nuestro trabajo se produjo un descenso de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres y una ausencia de cambios en la concentración de triglicéridos. En este sentido, estudios previos han descrito que en condiciones de

ayuno se incrementan los niveles de ácidos grasos libres en ratas con una alimentación control, mientras que en ratas alimentadas con una dieta obesogénica sus valores de ácidos grasos libres se mantienen estables, produciéndose una disminución en sus niveles de triglicéridos [Palou 2010]. Además ambas sustancias podrían haber disminuido su concentración plasmática al distribuirse y almacenarse en el hígado y tejido adiposo durante el periodo de ayudo previo al sacrificio de los animales. Finalmente, las diferencias bioquímicas del metabolismo lipídico asociadas al dimorfismo sexual anteriormente descrito, podrían relacionarse con el distinto control de la distribución de lípidos en los tejidos y su metabolismo [Estrany 2011].

Como biomarcador enzimático de daño hepático se suele emplear la relación de las enzimas hepáticas AST y ALT secretadas en sangre [Yang 2012]. Este ratio resulta un método no invasivo para la evaluación de NAFLD, más informativo que la valoración aislada de cada una de las enzimas, siendo el daño hepático asociado directamente proporcional al valor de esta relación [Iacobellis 2006, Yang 2012]. Debido a que el objetivo de la administración dietética de HFS no era causar una alteración grave de la homeostasis hepática irreversible/fibrótica, sino una situación de acumulación de lípidos inicial, la elevación significativa de este marcador debido a la ingesta dietética no fue una constante en todos los modelos presentados en este trabajo.

Para el estudio del patrón de expresión génica a nivel hepático se realizó tanto un análisis bibliográfico previo a la cuantificación de los niveles de ARNm de algunos de los genes (capítulo 2), como un enfoque prospectivo basado en el análisis mediante un microarray de expresión del transcriptoma hepático (capítulo 3). El empleo de técnicas basadas en microarrays permite ahondar en los mecanismos implicados en el desarrollo de enfermedades e identificar nuevos genes implicados en ellas [Campion 2006, Gu 2002]. Los resultados más relevantes obtenidos mediante el empleo de esta técnica fueron posteriormente validados mediante PCR a tiempo real, que es una técnica aceptada y más fácilmente aplicable como rutina para el análisis de una mayor batería de muestras [Morey 2006].

En un primer estudio de los niveles de expresión génica hepáticos basado en la literatura científica previa (capítulo 2) se halló una estrecha correlación positiva entre los niveles de expresión de *Srebf1*, *Acaca* y *Fasn*. Estos tres genes se encuentran implicados en la ruta metabólica de la lipogénesis *de novo*, lo cual sugiere un nivel de actividad similar entre ellos y por tanto de toda esta ruta metabólica [Strable 2010]. En esta vía *AcacA* cataliza la conversión de acetilCoA a malonilCoA, mientras que *Fasn* cataliza la conversión de esta molécula en ácidos grasos saturados de cadena larga. Ambas enzimas se encuentran reguladas por el factor de transcripción *Srebf1* [Eberle 2004, Kohjima 2007], cuya expresión en ratas adultas resultó aumentada por la dieta HFS (capítulo 4). Estos resultados, de forma conjunta, podrían indicar que la lipogénesis *de novo* está incrementada, lo cual ha sido recientemente descrito en la aparición de NAFLD debida a la ingesta de dieta ricas en grasa y en azúcares simples [Abu-Elheiga 2012]. Otros estudios en humanos también han descrito que una sobrecarga oral de sacarosa incrementa en sujetos obesos la síntesis de grasa hepática manteniendo estable su oxidación [Marques-Lopes 2001].

Los niveles de expresión hepática de la lipasa *Mgll*, relacionada con la activación intracelular de la hidrólisis de triglicéridos en ácidos grasos y glicerol [Bastarrachea RA 2007], disminuyeron debido a la dieta HFS (capítulo 2). Estudios previos han descrito que las variaciones genómicas de esta enzima de características lipolíticas podrían estar asociadas con la presencia de obesidad extrema [Daye 2012, Harismendy 2010].

Por otra parte, el análisis de la expresión hepática de *Fabp4*, proteína implicada en la captación y transporte de ácidos grasos libres y sobreexpresada en obesidad y síndrome metabólico [Terra 2011] no presentó cambios significativos. Esta isoforma de la familia de transportadores *Fabp* presenta elevados niveles de expresión en tejido adiposo [Chmurzynska 2006], en el que está regulada su expresión por PPAR gamma [Rosen 2001], aunque ha sido también descrita su expresión hepática asociada a la cantidad de grasa acumulada en este tejido e independientemente del fenotipo de obesidad [Westerbacka 2007]. Otras investigaciones también han descrito que ratones knock-out para *Fabp4* y *Fabp5* desarrollan resistencia a obesidad inducida por la dieta,

menor susceptibilidad a padecer diabetes tipo 2 y menor propensión a la acumulación de grasa en el hígado [Maeda 2005, Newberry 2006]. En nuestro trabajo, la dieta obesogénica produjo, sin llegar a ser significativa, cierta tendencia al aumento de la expresión de *Fabp4*, lo que significaría que la entrada a los hepatocitos de ácidos grasos libres está siendo promovida por esta vía.

Tras un primer acercamiento al estudio de los niveles de expresión hepática alterados por la ingesta de la dieta HFS en ratas adultas, se realizó un microarray de expresión (capítulo 3). Respecto a los genes estudiados previamente es notorio que en un preliminar análisis estadístico presentó diferencias significativas en el mismo sentido debidas a la ingesta de la dieta obesogénica de *Mgl1* (descenso) y *Fabp4* (aumento). Tras aplicar la corrección de FDR-BH estos resultados perdieron su significación, razón por la que se decidió continuar con el estudio de otros genes de interés metabólico y con cambios en los valores de expresión para la validación de los resultados transcriptómicos hepáticos del microarray. El estudio y validación mediante PCR a tiempo real de los resultados permitió caracterizar un incremento de la expresión de los genes *LepR*, *Btc*, *Agpat3*, *Esr1*, *Mst1* y *Fat1*, así como un descenso en el ARNm de *Sreb2*, *Mme*, *Mif* y *Gsr*.

Niveles elevados de expresión génica de *Btc*, *Esr1*, *Mst1* y *Fat1* se encuentran asociados con procesos de proliferación celular y desarrollo de hepatocarcinoma, cáncer de colon y de mama [Kwaepila 2006, Saridaki 2010, Song 2010, Tsiambas 2011]. El aumento descrito de sus niveles de ARNm hepático inducido por la dieta HFS podría estar asociada con la acumulación de grasa en el hígado como el primer paso en el desarrollo de NAFLD y su posterior evolución a NASH, cirrosis y cáncer [Ekstedt 2006]. Como ya se ha descrito anteriormente, el *Esr1* está vinculado al dimorfismo sexual a nivel hormonal [Benz 2012, He 2012], y se ha observado que el patrón de expresión génica hepática relacionada con el metabolismo de los andrógenos y estrógenos también es dependiente del sexo [Hirao 2011].

La ingesta de una dieta HFS en la edad adulta produjo un incremento de la expresión hepática del receptor de la leptina. Los estudios previos en ratas sobre el efecto de una dieta obesogénica se han centrado en el análisis de su expresión en el tejido adiposo, describiendo una regulación de ésta depósito y sexo dependiente [Priego 2010]. Por otra parte, un incremento del tejido adiposo aumenta la secreción de leptina [Gomez-Ruiz 2011, Marti 1999], cuya administración directa produce un incremento hepático de la expresión de *Lepr* en ratones [Cohen 2005]. Además se ha descrito que en un modelo de roedores con hiperinsulinemia, alteración del metabolismo de la glucosa y progresiva disfunción hepática, la expresión de *Lepr* se encuentra elevada [Cohen 2007]. En este sentido, ratas con NAFLD causado por un déficit de colina y metionina, presentaron un incremento de la expresión de este gen [Yang 2012]. La dieta obesogénica también incrementó la expresión del gen *Agpat3*, involucrado en la síntesis hepática de triglicéridos, favoreciendo de esta manera la acumulación celular de lípidos [Takeuchi 2009].

El descenso de la expresión hepática de *Gsr* y *Sreb2* por a la ingesta de la dieta HFS en edad adulta podría debido a su alto contenido en sacarosa y lípidos. El glutatión es un potente antioxidante celular cuya forma reducida reacciona con las especies reactivas de oxígeno neutralizándolas y oxidándose [Mari 2009]. La enzima *Gsr* reduce este glutatión recuperando así su capacidad antioxidante [Lu 2009, Pompella 2003]. En este sentido, se ha descrito que dietas con un alto contenido en fructosa (monosacárido de la sacarosa) pueden disminuir las defensas antioxidantes celulares además de generar alteraciones en la eficiencia mitocondrial, que podrían estar asociadas a la ganancia de peso corporal [Crescenzo 2012]. Para la confirmación de este efecto podría realizarse la cuantificación de los niveles de glutatión oxidado y glutatión reducido. Por otra parte, una dieta hiperlipídica está vinculada a un incremento del nivel de colesterol plasmático [Siri-Tarino 2010] y se ha publicado que elevados niveles de este metabolito están asociados a la inhibición de la expresión de *Sreb2* regulada por mecanismos epigenéticos mediados por microRNAs [Najafi-Shoushtari 2010, Rayner 2010, Wang 2009].

El gen *Mme*, también conocido como neprilisina o CD10, está implicado en la degradación de péptidos que a nivel de sistema nervioso central pueden afectar a la formación de las vainas de mielina, por lo que un incremento de su expresión podría favorecer la aparición de Alzheimer [Blomqvist 2010]. En el hígado está asociado al síndrome de Alagille, que es una enfermedad genética humana caracterizada por alteraciones de la funcionalidad hepática normal (normalmente colestasis) asociada a un descenso de los niveles de ARNm del gen *Mme* [Byrne 2007]. Así, las complicaciones hepáticas relacionadas con obesidad parecen alterar la expresión de *Mme* en el mismo sentido.

En relación a la expresión hepática del gen *Mif*, citoquina ampliamente expresada en enfermedades de tipo inflamatorio [Hori 2003], se ha considerado que estados avanzados de daño hepático se caracterizan por un incremento de su expresión [Liu 2010]. Pese a ello, en una primera etapa de esteatosis, este aumento se considera más una consecuencia del daño hepático que su causa [Akyildiz 2010]. Por otra parte, una disminución de la expresión de *Mif* se asocia a un efecto protector sobre la resistencia insulínica y la intolerancia a la glucosa [Verschuren 2009]. Esta observación coincide con la ausencia de efecto de la dieta sobre los niveles plasmáticos de glucosa (capítulo 3), y podría ser debido a un descenso del estado inflamatorio, principalmente del tejido adiposo, que favorecería la captación de glucosa sin afectar a la gluconeogénesis hepática [Verschuren 2009].

Finalmente, las enzimas ADN metiltransferasas son promotoras del proceso de metilación del ADN, siempre de acuerdo con la disponibilidad de sustratos prometilantes [Ding 2012]. En situaciones de hepatocarcinoma en ratas se ha documentado un incremento tanto en la expresión como en los niveles de las proteínas hepáticas *Dnmt3a* y *Dnmt3b*, encargadas de la metilación *de novo* del ADN, y de la *Dnmt1*, implicada en el mantenimiento de los niveles/patrón de metilación del ADN celular [Majumder 2002]. Además, modelos dietéticos de daño hepático originado mediante el déficit de sustancias donantes de grupos metilo también inducen un aumento de la expresión de *Dnmt1* y *Dnmt3a*, asociados a alteraciones en

el OMC, que podrían ejercer un efecto supresor de la expresión de genes específicos mediante la hipermetilación de sus promotores confiriendo a los hepatocitos una programación celular pre-neoplásica [Ghoshal 2006]. Así, el incremento de la expresión hepática de Dnmt1 debido a la ingesta de la dieta HFS en la vida adulta que se describe en este trabajo (capítulo 4) podría estar ligado al aumento de la acumulación de grasa hepática como primer paso en la patogénesis de NAFLD y su futura evolución hacia NASH, cirrosis o hepatocarcinoma [Starley 2010]. Además, la inflamación relacionada con obesidad en tejido adiposo ha sido relacionada con el aumento de la expresión de Dnmt3a [Kamei 2010]. También se ha estudiado su implicación en procesos inflamatorios de la mucosa gástrica asociados a la metilación de Cxcl2, IL-1b, Nos2 o Tnf α [Niwa 2010], a nivel cutáneo con la activación de Cox-2 [Yue 2011], en respuesta a alérgenos mediante el incremento de la expresión de Hdac3 [Kim 2012] o en inflamación de mucosa en cáncer de colon [Foran 2010]. Debido a la estrecha correlación positiva descrita en este trabajo entre las enzimas Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b (capítulo 4) se podría concluir que los procesos de metilación del ADN hepático podrían alterarse como consecuencia de la ingesta de una dieta HFS en la edad adulta.

Una creciente evidencia científica confirma que dietas obesogénicas tienen una potencial capacidad para provocar alteraciones en el epigenoma [Campion 2009], principalmente durante las etapas perinatales [Martinez 2012, Vucetic 2010], aunque también en la edad adulta [Lomba 2010]. Las alteraciones más comúnmente estudiadas son las referentes a la metilación del ADN en sitios CpG [El-Maarri 2003]. Estas uniones de grupos metilo dificultarían la unión de los factores de transcripción, impidiendo el inicio de ésta, por lo que frecuentemente un incremento en los niveles de metilación del promotor de un gen está asociado a un descenso en sus niveles de expresión [Campion 2009]. Otros autores proponen que la hipermetilación de secuencias susceptibles a unirse con factores de represión transcripcional también podrían incrementar los niveles de expresión génica [Ngo 1996]. En este estudio no se encontró una relación clara entre los niveles de expresión y de metilación, aunque

cambios en algunos de los sitios CpG analizados fueron relacionados con el efecto de la dieta o con alteraciones fenotípicas o bioquímicas de los animales. En este sentido, habría que considerar que la regulación epigenética de la expresión génica no es sólo debida a la metilación del ADN, sino que existen otros factores reguladores como modificaciones en las colas aminoacídicas terminales de las histonas o efectos de los microRNAs que podrían afectar a los niveles de ARNm [Campion 2010, Huang 2011]. Por otra parte, aunque algunos de los cambios de metilación estudiados pudieran no ser demasiado elevados, sobre todo en comparación con los descritos en enfermedades tumorales [Delgado-Cruzata 2012, Feng 2012], estudios epigenéticos relacionados con la obesidad han demostrado que pequeños cambios en el porcentaje de metilación de algunos sitios CpG pueden ser metabólicamente determinantes [Milagro 2009, Toperoff 2012].

El incremento de la metilación de secuencias repetitivas del ADN en leucocitos sanguíneos se ha asociado a obesidad y riesgo cardiovascular [Kim 2010]. En nuestro modelo se cuantificó el nivel de metilación global del ADN hepático [Pogribny 1999, Pogribny 2004] sin apreciar cambios debidos a la ingesta de la dieta HFS. Sin embargo, este dato no significa que no hubiera alteraciones de metilación en sitios CpG específicos, ya que el carácter cambiante del epigenoma puede admitir simultáneamente hipermetilaciones e hipometilaciones [Milagro 2011], con lo que podría obtenerse un balance global neutro con ausencia de cambios en la metilación global del ADN.

Estudios previos de nuestro grupo han hallado cambios en los niveles de metilación del promotor del gen *Fasn* en tejido adiposo epididimal de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta obesogénica durante la edad adulta [Lomba 2010]. Dando continuidad a esta línea de investigación, el análisis de la metilación hepática del promotor de *Fasn*, implicado en la lipogénesis *de novo*, permitió encontrar cambios en los niveles de metilación de varios de los CpGs incluidos en el amplicón analizado (desde -1177pb hasta -668pb respecto del inicio de la transcripción). Así, la ingesta de HFS provocó tanto hipermetilaciones de sitios CpG como hipometilaciones. Estos

efectos fueron independientes del sexo aunque se observaron menores alteraciones en las ratas macho. El amplicón de *Fasn* fue analizado para la búsqueda de elementos de respuesta mediante el programa Alibaba 2.1 [Grabe 2002]. Con esta herramienta se evidenció que varios de los CpGs con modificaciones en la metilación debidas a la ingesta de la dieta HFS presentaron secuencias consenso para la unión del factor de transcripción CTCF (factor de unión CCCTC). CTCF ha sido previamente descrito como un factor de transcripción dependiente de metilación [Rodriguez 2010] e implicado en la regulación de los genes “imprintados” *Igf2* y *H19*, vinculados a obesidad [Braunschweig 2011, Coolen 2011, Fu 2004]. La presencia de esta secuencia consenso sugiere que la expresión del gen *Fasn* podría estar regulada por mecanismos epigenéticos mediados por CTCF, aunque no se encontraron cambios significativos de expresión hepática debidos a la ingesta de la dieta HFS. En este sentido, otros estudios sugieren que los cambios de expresión en este gen son más susceptibles en tejido adiposo que en el hígado y una dieta rica en grasa favorece estas alteraciones en mayor medida que una dieta combinada de alto contenido de azúcares simples y grasas [Lomba 2010a, 2010b].

El gen *Esr1* ha sido definido como un posible epiobesogen, es decir, un gen relacionado con la obesidad cuyo promotor es susceptible de ser regulado epigenéticamente [Campion 2009, Mori 2010, Sertic 2009, Tian 2012]. Además, este gen se encuentra estrechamente vinculado a las diferencias hormonales a nivel sexual [Benz 2012, He 2012, Hirao 2011]. En el análisis de la metilación de su región promotora se halló un descenso debido a la ingesta de la dieta obesogénica en el sitio CpG 14 (-2623 pb), correlacionándose estos niveles con parámetros vinculados a la manifestación de obesidad como la ganancia de peso y grasa, así como con el peso del hígado y su porcentaje de grasa acumulada. Este dato podría unirse a estudios previos, que aprecian un descenso en los niveles de metilación del promotor de este gen, cuando el daño hepático evoluciona de cirrosis hacia hepatocarcinoma [Archer 2010].

Por otra parte, también se incrementaron los niveles de metilación del promotor del gen *Agpat3* en el sitio CpG10 (-11592pb) debido a la ingesta de la dieta HFS. Estos

cambios no se correlacionaron con el incremento de la expresión de este gen por la dieta HFS y que carece de estudios previos que relacionen la metilación específica de su promotor y cambios de patrón epigenético debidos a la dieta.

La metilación del promotor el gen Mme, aunque sin presentar cambios y con unos porcentajes de metilación muy bajos, mostró el mismo perfil que el descrito por Byrne y col [Byrne 2007] en humanos. La administración de la proteína Mme está siendo actualmente estudiada como una vía prometedoras en la lucha contra el cáncer, enfermedad estrechamente ligada a la metilación del ADN [Esteller 2008], debido a su actividad proteolítica de sustancias de la matriz extracelular secretadas en procesos tumorales como la elastasa, fibronectina, laminina, colágeno tipo I y IV, fibrinógeno y plasminógeno [Lavilla-Alonso 2012, Zucker 2004]. Por otra parte, los niveles de metilación del promotor de Mif han sido estudiados previamente en células polimorfonucleares sanguíneas humanas y en líneas celulares relacionadas con cáncer aunque, como en nuestro modelo, no se encontraron correlaciones con los niveles de expresión génica. Asimismo, la metilación de sitios CpG en la región proximal del promotor de Mif se considera un evento poco común y se ha sugerido que su regulación podría estar mediada por otros mecanismos epigenéticos o por la metilación de otras regiones del ADN [Bernstein 2007, Roger 2007].

Como conclusión, la ingesta de una dieta HFS en edad adulta provoca cambios fenotípicos definidos por un incremento de tejido adiposo e infiltración de grasa hepática, así como alteraciones bioquímicas plasmáticas características relacionadas con la homeostasis lipídica y de la glucosa y con biomarcadores de daño hepático y riesgo cardiovascular. El análisis transcriptómico del hígado mostró alteraciones de genes relacionados con rutas del metabolismo lipídico, de la proliferación celular y cáncer, de la defensa antioxidante y de la metilación del ADN. Finalmente, pese a no encontrar cambios en los niveles de metilación global del ADN, la ingesta de la dieta HFS produjo cambios en los niveles de metilación específicos en sitios CpG de algunos genes de interés, estando relacionadas estas alteraciones con la posible unión de factores de transcripción, alguno de los cuales es dependiente de la metilación del ADN.

1.2. Ingesta de la dieta HFS en la lactancia materna. Efectos sobre la descendencia en la edad adulta y sobre su respuesta a la dieta HFS.

En edad adulta con dieta control

La alimentación durante los periodos perinatales está asociada con la susceptibilidad al desarrollo de obesidad en la vida adulta, así como con sus comorbilidades asociadas [Gluckman 2008, Hanson 2011, Hochberg 2011, Martinez 2012, Ozanne 2007]. En este contexto, uno de los objetivos de este trabajo fue el análisis de los efectos de la ingesta materna de la dieta HFS durante la lactancia sobre las características de la descendencia, así como sobre su respuesta a la ingesta de esta dieta HFS en edad adulta (capítulo 4).

Las ratas cuyas madres fueron alimentadas con dieta HFS durante la lactancia presentaron un fenotipo de obesidad al inicio de la edad adulta (semana 12 de vida) caracterizado por un aumento de su peso y en el porcentaje de grasa total. Estos resultados concuerdan con otros estudios que han descrito un incremento en la adiposidad de la descendencia con una dieta materna obesogénica durante la gestación [Khan 2005]. Por el contrario, un estudio de Wright y col. [Wright 2011] describió que la ingesta de una dieta rica en grasa durante la lactancia podía alterar la conducta alimentaria en la descendencia, aunque no hallaron cambios significativos de peso en su edad adulta. En nuestro estudio, no se encontraron diferencias de la ingesta en la vida adulta, mientras que las diferencias fenotípicas tendieron a desaparecer con el paso del tiempo, ya que en la semana 20 de vida no se apreciaron variaciones en peso ni grasa total debidas a la ingesta materna de HFS durante la lactancia, aunque sí se observó un aumento depósito-específico en la grasa epididimal y en la subcutánea de las ratas cuyas madres se alimentaron la dieta HFS respecto a las que lo hacían con una dieta control. Estos resultados podrían significar que cuanto más cercano se encuentra tratamiento dietético materno, las alteraciones de la descendencia relativas al “recuerdo metabólico” de la dieta materna son más

evidentes [Beck 2012]. El traslado de esta hipótesis a seres humanos, además de las posibles implicaciones éticas, puede presentar dificultades debido a que los hábitos dietéticos, principal causa de obesidad, también son heredados de los padres [Spruijt-Metz 2002]. Además, la obesidad es una enfermedad crónica, por lo que su manifestación en edades tempranas suele mantenerse en la edad adulta, complicándose además con la aparición de enfermedades relacionadas como diabetes o alteraciones cardiovasculares [Barton 2012, Must 2003, Raghuvver 2012].

La dieta obesogénica materna no provocó cambios bioquímicos plasmáticos relevantes en la descendencia, probablemente porque la regulación de estos parámetros está también controlada por otros factores incluyendo la ingesta de nutrientes en cada momento y, por tanto, una regulación de origen materno durante la lactancia resulta complicada. En este sentido, otros estudios han descrito una ausencia de cambios en los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total, HDL colesterol o ácidos grasos libres durante la edad adulta tras una dieta materna obesogénica durante la lactancia [Alzamendi 2010, Khan 2005].

Respuesta a la dieta HFS en edad adulta

El efecto de la respuesta a la dieta HFS en la edad adulta dependiendo de la ingesta dietética materna durante la lactancia (cHFS Vs hfsHFS) fue también investigado (capítulo 4), observándose un incremento de la grasa acumulada en el hígado que podría ser debido a un efecto sumatorio de la dieta obesogénica primero a nivel materno y después en la edad adulta. Este efecto fue previamente descrito por Rajia y col. [Rajia 2010] empleando una dieta rica en grasa y realizando un estudio fisiopatológico hepático mediante pruebas histológicas. Adicionalmente, estudios previos en ratones han asociado el consumo de una dieta hiperlipídica durante la vida de la madre, incluyendo la gestación y la lactancia con alteraciones en el metabolismo lipídico de la descendencia, favoreciendo un estado de hipertensión e incrementando la acumulación hepática de lípidos [Elahi 2009]. Nuestro estudio pone de manifiesto la

importancia de la etapa materna escogida para realizar una intervención nutricional sobre la futura descendencia, ya que probablemente, ampliando nuestra intervención al periodo de gestación o vida adulta de la madre los cambios sobre la descendencia y su respuesta dietética serían posiblemente mayores, aunque su origen más difícil de determinar.

El incremento observado en los niveles de HDL colesterol, junto con el descenso del índice aterogénico, puede resultar controvertido debido a que estaría sugiriendo un efecto protector cardiovascular originado por la ingesta materna de dieta HFS [Li 2009, Park 2009, Sugiura 2011]. En este sentido, podría plantearse la especulación de un efecto adaptativo o de acomodación frente a una situación adversa en una etapa temprana de la vida que intenta compensarse en el futuro [Casey 2012, Wells 2007]. Algunos estudios previos parecen indicar que podría existir un incremento del colesterol total en la descendencia como respuesta a una ingesta dietética obesogénica en la edad adulta, más estrechamente relacionado con la elevada ingesta materna de grasa que con la de sacarosa [Coates 1983]. Este trabajo empleó un tratamiento de corta duración en la vida adulta (3 días), por lo que los resultados mostraron una respuesta inicial frente a una dieta obesogénica de forma aguda y, por tanto, no resulta comparable con nuestra pauta dietética, más prolongada. Por el contrario, Brown y col. [Brown 1990] estudiaron los cambios en el perfil lipídico relacionados con una dieta materna rica en grasas durante el gestación y la lactancia sobre la respuesta a la dieta de la descendencia, sin encontrar alteraciones notables en el HDL colesterol.

Respecto a los cambios observados sobre la expresión génica, se produjo un descenso en los niveles de ARNm hepáticos de la enzima Dnmt1, implicada en los procesos de metilación del ADN [Jeltsch 2002] y cuyos niveles de expresión en modelos animales de obesidad no han sido anteriormente descritos. Esta disminución ha sido también descrita en ratones ante una situación de esteatohepatitis no alcohólica inducida por una dieta deficitaria en grupos metilo [Pogribny 2009] o en una situación de hepatotoxicidad debida a la inhalación de altas dosis de 1-3 butadieno [Koturbash

2011]. Por tanto, existe un posible vínculo entre situaciones de daño hepático de distinto origen y un descenso en la expresión de Dnmt1 que podría ser el precursor en muchos casos de un desequilibrio epigenético en el hígado [Chang 2010, Dudley 2011, Sookoian 2010, Tryndyak 2011].

Respecto al descenso de la expresión hepática de Lepr, un análisis del efecto global de la dieta HFS en edad adulta (capítulo 4) informa de un incremento de la expresión de Lepr en la vida adulta independientemente de la dieta materna. Posiblemente, el gran incremento del grupo cHFS podría ser la causa del “relativo descenso” en la expresión de Lepr debida a la ingesta de una dieta HFS en la lactancia. Estos datos también podrían sugerir que la dieta materna obesogénica hubiera originado un mecanismo de recuerdo o memoria [Barker 2004, Ozanne 2007] para el control de la expresión de Lepr como respuesta por segunda vez a la misma dieta. En este sentido, un estudio de Picó y col. [Pico 2007] estudió el efecto en ratas de una dieta rica en grasa sobre la expresión hipotalámica en edad adulta de Lepr, observando menores niveles de ARNm hepáticos. Por otra parte, un estudio en ratas con un déficit de metionina y colina describieron un incremento de la expresión hepática de Lepr en un modelo de NAFLD inducido por la dieta [Cohen 2007].

Como conclusión, la ingesta materna de una dieta HFS durante la lactancia provoca el incremento del peso y del tejido adiposo. La respuesta a la dieta HFS en la vida adulta de los animales cuyas madres se habían alimentado durante la lactancia con una dieta HFS se caracterizó por un incremento de la acumulación hepática de grasa con una disminución de su riesgo cardiovascular y con una menor expresión hepática de genes relacionados con el desarrollo con obesidad y con los procesos de metilación del ADN.

2. Efecto de la suplementación prometilante

El déficit dietético de algunos elementos nutritivos como la colina y la betaína es ampliamente empleado para el establecimiento de modelos animales de NAFLD y su

posterior evolución a NASH, cirrosis y hepatocarcinoma [Kajikawa 2011, Pogribny 2009, Sahai 2004, Starlard-Davenport 2010, Tryndyak 2011, Vetelainen 2007]. Algunos estudios en ratones se han centrado en el efecto protector de la suplementación con betaína sobre la acumulación de grasa hepática, proponiendo una activación del gen del receptor de insulina [Kathirvel 2010]. Estas sustancias son moléculas activadoras de la metilación del ADN, denominadas prometilantes, necesarias para el equilibrio del metabolismo celular y con efectos beneficiosos sobre la homeostasis del organismo a una dosis adecuada [Carmel 2008, Krueger 2004, Taruscio 2011, Woodbury 1993]. Algunas moléculas prometilantes como la propia betaína o el ácido fólico se han asociado con una mejora del estrés oxidativo, mediada por un descenso sérico de TNF α , así como de la inflamación hepática, ligada a la activación de AMPK [Buettner 2010, Kwon do 2009]. El ácido fólico y la vitamina B₁₂ han sido estudiados y son actualmente prescritos en mujeres en etapas periconceptuales para la prevención de defectos en el tubo neural y del desarrollo de otras enfermedades de la descendencia [Ba 2011, Chmurzynska 2011, Dhobale 2011, Wilson 2007]. Los efectos de estas sustancias prometilantes en periodos perinatales están relacionados con cambios epigenéticos en la descendencia debido a la accesibilidad al ADN durante las primera etapas del desarrollo en las que, como ya hemos comentado en la introducción, los distintos tipos celulares se encuentran en continua división quedando el ADN más accesible para reaccionar con agentes externos [Ozanne 2007, Waterland 2004]. Estos sustratos son moléculas donantes de grupos metilo implicadas en la regulación de la expresión génica por su efecto sobre el metabolismo de la metilación del ADN [Cooper 2012, Waterland 2008]. El cóctel de suplementación prometilante administrado en nuestros estudios fue previamente empleado en ratones Agouti, en los que se observó que la expresión de su trasposón agouti quedaba epigenéticamente silenciada mediante su hipermetilación interrumpiendo la transmisión a la descendencia de su característico fenotipo de obesidad, así como de la coloración parda de su pelaje [Waterland 2003, 2006, 2008]. Estos estudios con sustancias prometilantes desafortunadamente no incluyeron el análisis de los cambios en la metilación global

del ADN ni en los niveles de metilación específica de promotores de otros genes relacionados con obesidad.

2.1. Efecto de la suplementación prometilante de la dieta control

2.1.1. Efecto de la suplementación prometilante de una dieta control en edad adulta.

La suplementación de una dieta control con sustancias prometilantes en edad adulta provocó un descenso en el ratio de transaminasas hepáticas (ALT/AST), el marcador bioquímico plasmático de daño en el hígado descrito con anterioridad [Iacobellis 2006, Yang 2012]. Esta alteración puede resultar inesperada, ya que el hígado de las ratas sometidas a una dieta control equilibrada como la empleada en nuestros estudios es un hígado sano. De hecho, algunos estudios con roedores emplean una dieta deficitaria de grupos metilo para establecer un modelo experimental de NAFLD con el subsecuente incremento de las transaminasas [Koca 2008, Zhang 2009]. Por el contrario, otros estudios se centran en su suplementación para regenerar un hígado en una situación patológica [Buchman 2001, Medici 2011]. Por tanto, los efectos descritos en este trabajo sobre un hígado sano con una dieta equilibrada son difíciles de explicar en base a la bibliografía previa. Debido al posible efecto de algunas sustancias prometilantes sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial [Eskandari 2012, Yu 2010] una posible hipótesis de trabajo podría ser que este efecto favoreciera la salida de AST de este orgánulo, por lo que su presencia en plasma incrementaría afectando al ratio ALT/AST, pero sin un incremento hepático real de ninguna de las dos transaminasas. Por otra parte, al contrario que la ALT, de síntesis exclusiva hepática, la enzima AST es sintetizada por otros tejidos, por lo que una alteración de su concentración plasmática podría estar ligada a un fallo en la normal funcionalidad de órganos distintos al hígado.

Los metabolitos relacionados con el colesterol se incrementaron, mostrando mayores niveles plasmáticos de colesterol total debido al aumento tanto de los niveles de LDL colesterol como de HDL colesterol. Estudios previos han descrito una elevación en las concentraciones de colesterol HDL debido a la suplementación de sustancias donantes de grupos metilo como la betaína [Schwahn 2007] y el ácido fólico [Villa 2005] en ratones y humanos, respectivamente. Al mantener el equilibrio entre HDL y LDL el efecto metabólico no debe ser aparentemente perjudicial, ya que no se producen cambios en el valor del índice aterogénico, marcador de riesgo cardiovascular [Ansari 2012, Seiva 2010]. Este incremento en los valores normales de ambas moléculas podría significar que la movilización de triglicéridos hacia los tejidos y el retorno al hígado de ácidos grasos se encuentra aumentado, por lo que el metabolismo lipídico se encontraría probablemente acelerado.

Recientemente se ha establecido el vínculo entre los niveles de metilación global del ADN y el desarrollo de distintas enfermedades como el cáncer [Esteller 2008], la obesidad [Kim 2010], la diabetes [Zhao 2012] o la esquizofrenia [Melas 2012]. En nuestro modelo, se aprecia un descenso en los niveles de metilación hepática total del ADN debido a la suplementación de sustancias prometilantes, lo cual ha sido descrito con anterioridad en ratones sometidos a una suplementación dietética de folato y selenio [Armstrong 2011]. Así, la suplementación realizada afecta al equilibrio epigenético basado en la metilación del ADN, que es un proceso plástico constante de continuos cambios favoreciendo la metilación/desmetilación y repercutiendo así en el control de su expresión génica. En nuestro caso, este equilibrio está desplazado hacia un mayor número de genes hipometilados, aunque posiblemente también hayan ocurrido hipermetilaciones en algunos genes. Las mujeres suplementadas con ácido fólico también presentan unos menores niveles de metilación de manera tiempo-, dosis- y genotipo- dependiente [Crider 2011]. Por el contrario, Li y col. [Li 2011] no encontraron cambios en la metilación hepática global en ratas alimentadas durante seis generaciones con un cóctel prometilante basado en la suplementación de colina, betaína, metionina, zinc, ácido fólico y vitamina B₁₂. La importancia de estos cambios

en el epigenoma radica en que pueden controlar la expresión génica afectando al control hepático de las principales rutas metabólicas así como a su respuesta sobre posteriores estímulos ambientales [Milagro 2012, Zimmer 2011]. Por otra parte, hay que destacar que los sustratos prometilantes suplementados no son los donantes directos de los grupos metilo del ADN (ver figura 7 de la introducción), sino que favorecen la formación de S-adenosilmetionina, que cede el grupo metilo convirtiéndose en S-adenosilhomocisteína. La cuantificación de ambos parámetros y su relación es un dato importante para conocer la metilación del ADN y será adecuada su medición para futuros estudios con este tipo de modelos experimentales.

Respecto a la metilación específica de los promotores de los genes estudiados sólo se encontraron cambios en el patrón de metilación de *Agpat3* en estos grupos, lo que podría parecer confuso debido a que los niveles de metilación global variaron más que por la dieta obesogénica o por la suplementación prometilante de ésta, mientras que la metilación específica parece variar en menor grado en los promotores de los genes específicos estudiados. Aun así, como hemos explicado con anterioridad, esto no significa necesariamente que hubiera más cambios de metilación sobre el ADN, ya que podría significar que los ocurridos seguían un patrón de cambio similar. En este caso, el promotor de *Agpat3*, crucial para la síntesis de triglicéridos [Takeuchi and Reue 2009], incrementó su metilación en el sitio CpG10 del amplicón analizado (-11592pb) debido a la suplementación del cóctel prometilante en ratas con una dieta control. Otros estudios previos han observado que los genes involucrados en la síntesis hepática de triglicéridos, presentan menor expresión con dietas deficitarias en sustancias donadoras de grupos metilo, aunque no realizó ningún estudio de tipo epigenético [McNeil 2009]. En nuestro caso, la hipermetilación descrita no estuvo acompañada de cambios en la expresión génica, por lo que serían necesarios más estudios conjuntos de expresión y metilación de genes involucrados en la biosíntesis de triglicéridos hepática [Takeuchi 2009].

2.1.2. Efectos de la suplementación prometilante de una dieta control en la lactancia materna. Efectos sobre la descendencia en la edad adulta y sobre su respuesta a la dieta HFS.

En edad adulta con dieta control

La dieta control está diseñada para que el fenotipo de los animales sea el característico de una salud óptima. Así, alterar su composición podría acarrear alteraciones, que podrían ser negativas. En este estudio, se suplementó durante la lactancia una mixtura de moléculas activadoras de la metilación del ADN, que generalmente presentan un efecto beneficioso sobre el organismo [Carmel 2008, Krueger 2004, Taruscio 2011, Woodbury 1993]. El análisis de los cambios inducidos por la suplementación con sustancias prometilantes se dificulta aún más cuando se realizan sobre la ingesta materna durante la lactancia y se estudian los efectos del tratamiento en la descendencia en su edad adulta. En este sentido, los efectos debidos a la dieta materna durante la lactancia resultan más obvios y medibles cuanto más jóvenes sean los animales [Beck 2012]. Otro posible motivo para la ausencia de cambios sobre la descendencia podría ser que el efecto positivo de los estudios previos de estos sustratos en el hígado se ha realizado en condiciones fisiopatológicas de daño hepático previo y no, como en nuestro estudio, con un hígado sano de ratas alimentadas con una dieta control [Buchman 2001, Buettner 2010, Kwon do 2009, Medici 2011].

Respuesta a dieta HFS en edad adulta

Por otra parte, se estudió la predisposición a cambios en la respuesta a una dieta HFS en edad adulta debidos a la suplementación materna de una dieta equilibrada control con sustancias prometilantes durante la lactancia (cHFS Vs csupIHFS). Así, el efecto de la ingesta de las sustancias prometilantes durante la lactancia condicionó a la descendencia para su futura respuesta al tratamiento obesogénico provocando un incremento en la ganancia de peso condicionado por la ingesta de una dieta HFS.

Algunas investigaciones previas con ratas Wistar suplementadas durante la gestación con un cóctel multivitamínico que incluía ácido fólico, vitamina B₁₂ y colina también mostraron que la respuesta a un tratamiento dietético obesogénico de la descendencia durante la edad adulta estaba acompañado de un mayor peso final de los animales, con un posible origen en alteraciones de la conducta alimentaria durante el desarrollo fetal a nivel del sistema nervioso central [Szeto 2009].

Los animales de nuestro estudio alimentados con dieta control en su edad adulta no presentaron diferencias debidas a la ingesta materna del cóctel prometilante, lo que significa que existe una programación perinatal que preparó a los individuos para la respuesta a un estímulo adverso en la edad adulta, caracterizando a este modelo como un ejemplo de DOHaD [Barker 2004, Gluckman 2008, Martinez 2012, Ozanne 2007]. Esta teoría plantea que la nutrición en los primeros estadios de la vida puede condicionar la susceptibilidad a padecer enfermedades en la edad adulta [Barker 2004, Martinez 2012]. La propuesta inicial se basó en modelos epidemiológicos circunstanciales como el efecto de la desnutrición materna durante el embarazo en épocas de hambruna y la susceptibilidad de la descendencia a padecer obesidad, enfermedades cardiovasculares y diabetes Painter 2005, Ravelli 1999, Roseboom 2000, 2006]. La adaptación a modelos de experimentación animal permite la manipulación en estadios tempranos de la vida, profundizando en los mecanismos implicados de origen genético y epigenético [Davidson 2009, Kim 2009, Lillycrop 2007, Steegers-Theunissen 2009, Waterland 2008].

Respecto a los niveles plasmáticos de los indicadores bioquímicos, se apreció un efecto protector ante daño cardiovascular asociado una disminución del colesterol total, debido principalmente a un descenso del LDL colesterol, lo cual acarrió consecuentemente una mejora del índice aterogénico [Ansari 2012, Seiva 2010]. La suplementación con ácido fólico podría ejercer un efecto beneficioso sobre el perfil lipídico mediante su efecto colerético, por el que favorece la secreción de colesterol a nivel biliar, así como mediante la disminución de la actividad de la HMG-CoA reductasa, enzima implicada en la síntesis de colesterol y cuyos inhibidores

farmacológicos, las estatinas, son empleados en pacientes con hipercolesterolemia [Ojeda 2008]. El descenso del riesgo cardiovascular asociado a la ingesta de sustancias prometilantes ha sido descrito en humanos tanto mediante el análisis epidemiológico de los niveles dietéticos de ingesta de ácido fólico y vitamina B₁₂ [Misra 2008] como mediante la suplementación directa de ácido fólico a mujeres postmenopáusicas [Villa 2005].

Por otra parte, el descenso del índice aterogénico se correlacionó negativamente con los niveles de ARNm hepáticos de LepR, que presentaron una disminución significativa promovida por la ingesta materna del cóctel prometilante. Los niveles del receptor soluble de leptina plasmática se incrementan en estados de obesidad, fibrosis y diabetes [Cohen 2007, Yang 2012], por lo que este descenso podría describirse como un efecto beneficioso debido a la suplementación dietética con sustancias prometilantes durante la lactancia. Por otra parte, como ya hemos comentado los niveles de expresión cuantificados en las ratas cHFS capítulo 4 son muy elevados, ya que en el capítulo 2 también se describe un claro incremento de la expresión de este gen debida a la dieta aunque cuantitativamente bastante menor. Por tanto, la menor expresión hepática de LepR descrita en este punto dependiente de la suplementación materna, debería interpretarse con cautela.

Como conclusión, la ingesta durante la vida adulta de una dieta control suplementada con sustancias prometilantes provocó un descenso de los marcadores bioquímicos de hepatopatía, así como cambios en los niveles de metilación global del ADN y de metilación específica en sitios CpG concretos. Cuando esta suplementación dietética se administró a las madres durante la lactancia, la respuesta de su descendencia a la dieta HFS en edad adulta se caracterizó principalmente por un incremento de peso, pero asociado a un descenso del riesgo cardiovascular.

2.2. Efecto de la suplementación prometilante de la dieta HFS

2.2.1. Efectos de la suplementación prometilante de una dieta HFS en edad adulta.

En ratas adultas, las sustancias donadoras de grupos metilo no influyeron en la acumulación de grasa en el tejido adiposo, aunque sí lo hicieron sobre la acumulación de grasa hepática [Perseghin 2011]. De esta manera, este cóctel prometilante presentó un efecto protector frente a la manifestación de NAFLD debida a una dieta HFS, que es la principal característica hepática del síndrome metabólico y origen de alteraciones fisiopatológicas relacionadas con la obesidad [Fabbrini 2009]. Como se ha comentado anteriormente, para el diseño de estudios con modelos animales dietéticos de NAFLD se emplea de forma rutinaria una dieta deficitaria en sustancias donantes de grupos metilo [Kajikawa 2011, Pogribny 2009, Sahai 2004, Starlard-Davenport 2010, Tryndyak 2011, Vetelainen 2007], por lo que resultaría plausible nuestro planteamiento del empleo de esta suplementación para prevenir el daño hepático inducido por una dieta obesogénica.

Al igual que con los animales sometidos a una dieta control, la suplementación con sustancias prometilantes produjo un incremento en los niveles de colesterol total, HDL y LDL. El equilibrio entre ambas fracciones evita un aumento del riesgo cardiovascular asociado al índice aterogénico [Ansari 2012, Seiva 2010]. Estudios previos han descrito un efecto protector ante patologías de origen cardiovascular de la suplementación dietética con betaína y ácido fólico ante una situación fisiopatológica caracterizada por el incremento del riesgo aterogénico [Schwahn 2007, Villa 2005]. Además, la esteatosis hepática podría estar asociada a un incremento de los niveles de lactato, potencial activador de la gluconeogénesis, lo que también explicaría el aumento plasmático de glucosa descrito por la ingesta de la dieta HFS [Kalhan 2011, Nunes 2011]. La suplementación empleada en nuestro estudio revirtió el incremento de estos niveles de lactado inducido por la dieta HFS, posiblemente desplazando el metabolismo hepático hacia otras rutas metabólicas favoreciendo así la síntesis de otros sustratos,

como por ejemplo los de origen lipídico, lo que a su vez podría relacionarse con el aumento de los niveles de colesterol total, HDL y LDL. En este sentido, la ruta de la lipogénesis *de novo* parece estimulada debido a la suplementación de la dieta HFS con sustratos prometilantes, ya que incrementó el nivel de expresión hepática de AcacA, implicada en la lipogénesis *de novo* y correlacionada positivamente con la expresión de Fasn y Srebf1 [Kohjima 2007, Strable 2010].

El gen Ccl2, también conocido como Mcp1, codifica para una citoquina relacionada con la respuesta inflamatoria y aterosclerosis, cuya síntesis se encuentra incrementada en obesidad, mientras que a nivel hepático estimula el reclutamiento de monocitos y macrófagos para hacer frente a una situación de daño tisular [Baeck 2012, Bastarrachea RA 2007]. Por tanto, y pese a que el estadio de NAFLD de nuestro estudio se encuentra en una fase aparentemente temprana, un incipiente efecto hepatoprotector de la suplementación dietética con sustancias prometilantes se evidenció en la disminución de la expresión de esta citoquina. Por otra parte, el receptor de la leptina incrementó su expresión. Este resultado, podría asociarse al incremento sugerido del metabolismo lipídico, debido a los elevados niveles de colesterol y la activación de la lipogénesis plasmática, y estimulación subsiguiente del metabolismo del tejido adiposo. Así, podrían encontrarse incrementados los niveles de leptina plasmática, que estimularían el incremento de la expresión hepática de Lepr [Cohen 2005].

Respecto a los cambios epigenéticos estudiados, el análisis de la metilación global del ADN no mostró cambios debidos a la suplementación dietética prometilante como podría haberse esperado, ya que sí los hubo al suplementar con estas sustancias la dieta control. Esta ausencia de cambios globales no es determinante de ausencia de cambios de metilación, ya que la metilación global del ADN resulta de la media del sumatorio de todos sus cambios específicos, normalmente con hipermetilaciones e hipometilaciones de sitios CpGs de los promotores de múltiples genes simultáneamente y no de de la metilación un sólo sitio CpG o un promotor de un gen de manera específica [Bunce 2012, Fang 2012].

Las alteraciones de la metilación del promotor de *Fasn* debidas a la suplementación de la dieta HFS con sustancias prometilantes fueron dependientes del sexo. Así, mientras que en machos no se observaron alteraciones, en hembras se produjo una hipermetilación en los CpGs 9, 10-11 y 20-21 del amplicón analizado (-800, -816, -818, -965 y -986 pb). Estos sitios CpG forman parte de secuencias de nucleótidos putativas para la unión del factor de transcripción CTCF, el cual ha sido caracterizado como un factor de transcripción dependiente de metilación [Rodríguez 2010]. La falta de valores de expresión génica hepática en hembras no permitió el análisis de los resultados de metilación del promotor de *Fasn* junto con sus valores de expresión en este sexo. En este contexto, estudios previos en tejido adiposo han descrito cambios en el patrón de metilación de esta misma región debidos a una dieta obesogénica [Lomba 2010], aunque éste es el primer estudio en el que se analizó empleando una suplementación de sustancias prometilantes.

El porcentaje de metilación del amplicón analizado de *Srebf2* en el sitio CpG 23_24 (-167 y -156 pb) disminuyó debido a la suplementación de sustancias prometilantes en una situación de ingesta dietética HFS en ratas adultas. El amplicón de *Srebf2* fue analizado para la pesquisa de elementos de respuesta mediante el programa Alibaba 2.1 [Grabe 2002]. El empleo de esta herramienta informática describió al sitio CpG23 como parte de una secuencia consenso de ADN para la unión los factores reguladores de la transcripción Krox20 y Gli3, implicados en la biosíntesis de lípidos inducida por *Srebf* [Leblanc 2005] y con la severidad del daño relacionado con el hígado graso en ratones [Fleig 2007]. Así, estos resultados sugieren un nuevo nexo entre los niveles de colesterol plasmático y la regulación epigenética de *Srebf2* en situación de NAFLD.

2.2.2. Efectos de la suplementación prometilante de una dieta HFS en la lactancia materna. Efectos sobre la descendencia en la edad adulta y sobre su respuesta a la dieta HFS.

En edad adulta con dieta control

El único efecto detectado en la descendencia debido a la suplementación prometilante de una dieta materna HFS durante la lactancia fue el incremento de la concentración plasmática de la homocisteína. Esta molécula está estrechamente vinculado a la metilación del ADN celular [Kotsopoulos 2008]. Además, elevados niveles plasmáticos de homocisteína pueden ser biomarcadores de riesgo cardiovasculares, por lo que el efecto de la suplementación materna podría parecer negativo en este aspecto [Kotsopoulos 2008]. Además, resulta sorprendente que estas mayores concentraciones se asocien a estados carenciales de vitamina B₁₂ y ácido fólico, ya que en nuestro caso se presentan con su suplementación materna [Karatela 2009, [Scorsatto 2011]. En este sentido, no se apreciaron cambios en otros marcadores asociados a riesgo cardiovascular como peso, tejido adiposo, colesterol o triglicéridos, por lo que el incremento debido a la suplementación materna de sustancias prometilantes con una dieta HFS resulta controvertido. Por otra parte, un elevado contenido de ácido fólico y vitamina B₁₂ de la dieta en edad adulta se asocia inversamente a la concentración plasmática de homocisteína [Ray 2000].

Respuesta a la dieta HFS en edad adulta

Además, se analizó el efecto de la suplementación prometilante durante la lactancia materna cuando iba acompañada de una dieta HFS con una dieta obesogénica HFS sobre la respuesta de la descendencia a esta misma dieta en su edad adulta (hfs-HFS Vs hfs suplHFS). Así, la suplementación materna de la dieta HFS predispuso a un fenotipo adulto de respuesta a la ingesta de HFS caracterizado por un incremento de tejido adiposo, paralelo a una disminución en el contenido de grasa hepática. Como

hemos descrito previamente, este efecto a nivel hepático había sido previamente observado en ratas suplementadas con este cóctel promotor de procesos de metilación del ADN durante la vida adulta (capítulos 1, 2 y 3), por lo que se confirmó este efecto, esta vez basado en una programación previa de la descendencia vía nutrición materna [Barker 2004]. Los mecanismos implicados en este condicionamiento de la futura respuesta de la descendencia a la dieta parecen estar asociados con cambios epigenéticos en la prole que se mantienen en el tiempo [Martinez 2012]. Ejemplos de estos procesos sería la ingesta en la gestación de una dieta hipoproteica en roedores asociada a cambios en la descendencia sobre la metilación del promotor del gen Lxr alpha, implicado en la regulación de la lipogénesis *de novo* [van Straten 2009] o la suplementación de esta dieta con ácido fólico provocando cambios en la expresión y metilación del receptor de glucocorticoides y del PPAR gamma [Lillycrop 2005]. La alteración en la distribución de los depósitos grasos, sugiere que el exceso de grasa no almacenada en el hígado ha migrado hacia el tejido adiposo, su principal lugar natural de almacenamiento [Bjorntorp 1996]. Este hecho resulta altamente positivo, ya que Fabbrini y col [Fabbrini 2009] demostraron que es el contenido de triglicéridos en el hígado, y no la cantidad de tejido adiposo visceral, quien participa en las alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad. Por consiguiente, la prevención de la acumulación de grasa hepática podría alterar la reorganización lipídica incrementando el tejido adiposo y el fenotipo de obesidad pero sin sus complicaciones asociadas.

Por otra parte, el incremento de la acumulación de lípidos en el tejido adiposo está relacionado con alteraciones del perfil bioquímico plasmático relacionadas frecuentemente con un incremento de riesgo cardiovascular [Karatela 2009, Sugiura 2011]. Otra consecuencia debida al incremento del tejido adiposo, sería la mayor secreción de la hormona leptina y paralelamente de su receptor a nivel celular [Cohen 2005, Marti 1999, Medici 2010, Tall 2008]. Este aumento de expresión se ha asociado en estudios previos con la presencia de citoquinas proinflamatorias, que podrían estar

incrementadas en nuestro estudio debido al aumento del tejido adiposo [Ockenga 2007].

Como conclusión, el efecto de la suplementación de una dieta HFS con sustancias prometilantes en la vida adulta previno a acumulación de grasa hepática además de promover un incremento del metabolismo lipídico a nivel plasmático y afectar a la expresión y metilación específica de genes relacionados con el metabolismo lipídico a nivel hepático. Cuando las sustancias prometilantes se administraron a la dieta HFS materna durante la lactancia, se produjo una prevención de la acumulación hepática de lípidos de forma paralela a su acumulación en el tejido adiposo, asociado a riesgo cardiovascular y al incremento de la expresión de genes relacionados con obesidad.

3. Corolario

Este conjunto de investigaciones se ha centrado en el posible efecto hepatoprotector de la suplementación dietética de sustancias prometilantes sobre la infiltración de grasa en el hígado originada por la ingesta de una dieta obesogénica. En este sentido, nuestra hipótesis ha sido probada en tres modelos experimentales distintos de ratas Wistar durante su vida adulta tanto en machos como en hembras, así como por el efecto de la alimentación materna durante la lactancia en la futura respuesta a la dieta obesogénica. Los efectos de las sustancias donantes de grupos metilo sobre la acumulación hepática de lípidos han sido por tanto reproducibles en distintas condiciones, aportando validez y consistencia a las conclusiones finales de este trabajo. Por otra parte, también han sido estudiados otros rasgos fenotípicos de estos modelos, además del perfil bioquímico plasmático y diversas características transcriptómicas y epigenéticas hepáticas.

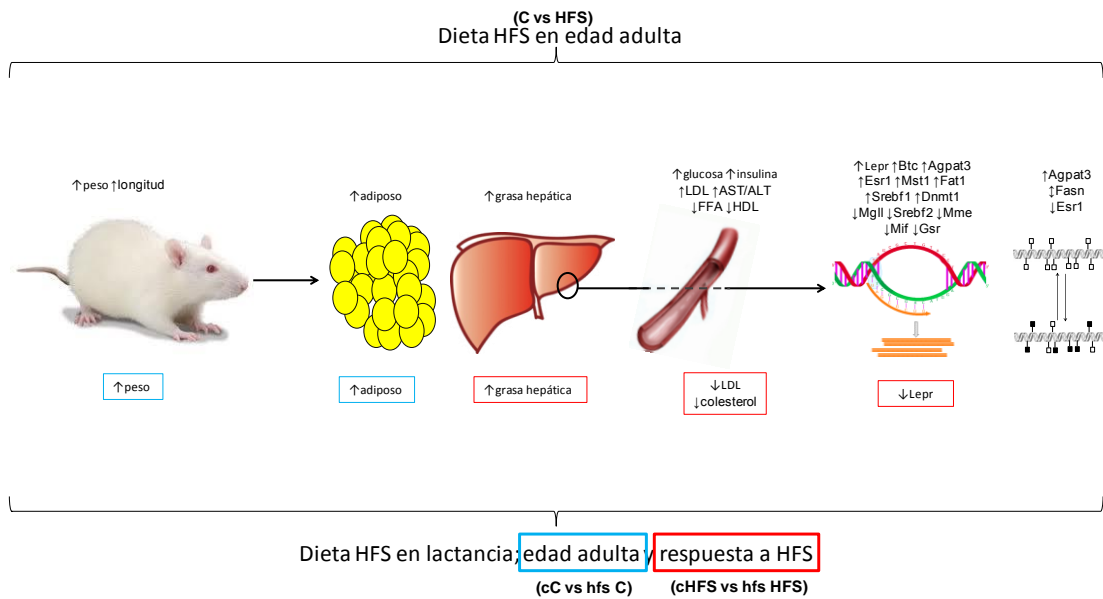
La dieta HFS en ratas adultas produjo un modelo de obesidad caracterizado por un aumento de los depósitos grasos así como por una infiltración lipídica en el hígado que fue prevenida mediante la suplementación dietética de sustancias prometilantes. A

nivel plasmático la ingesta de la dieta obesogénica se caracterizó por un desequilibrio de las variables relacionadas con la homeostasis de la glucosa, con riesgo cardiovascular y con daño de la estructura hepática, mientras que el efecto principal de su suplementación con sustancias prometilantes fue el incremento de los metabolitos relacionados con el transporte de ácidos grasos libres y triglicéridos. Además, tanto la ingesta de la dieta HFS como de éste patrón suplementado con agentes prometilantes promovieron cambios tanto de expresión como de metilación específica en genes relacionados con el metabolismo lipídico, situaciones de daño hepático, de proliferación celular y cáncer, defensa antioxidante o metilación del ADN. En este sentido no se apreciaron variaciones de la metilación global en estos grupos, aunque sí en animales adultos alimentados con una dieta control suplementada con agentes prometilantes.

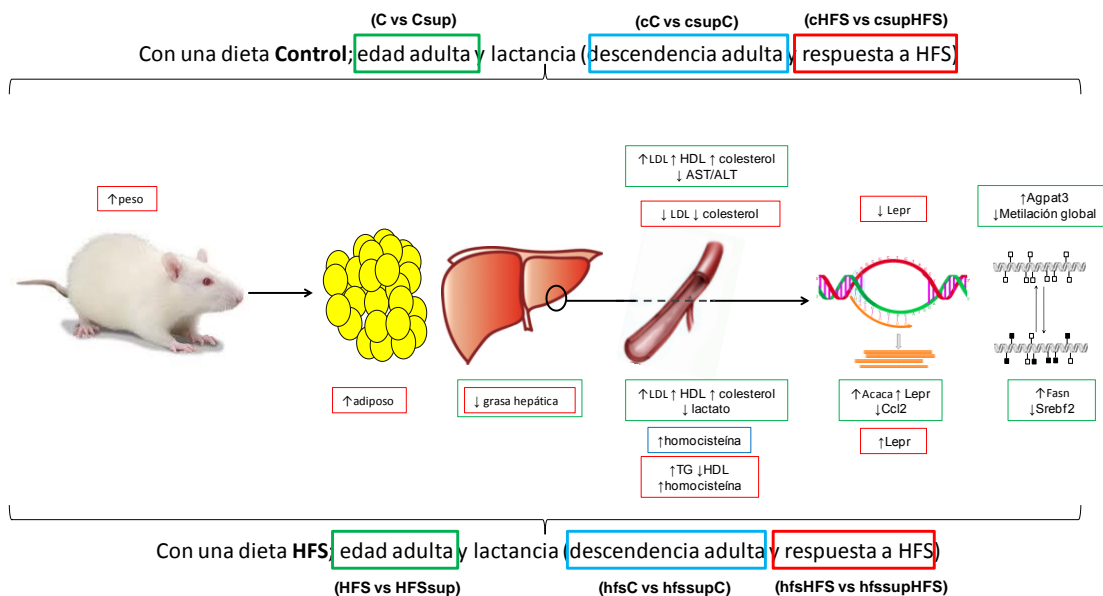
La obesidad y sus comorbilidades están relacionadas con la ingesta dietética materna; la ingesta de una dieta HFS en la lactancia provocó un incremento de peso y grasa corporal en la descendencia. Cuando ésta fue alimentada en su edad adulta con una dieta HFS respondió con una mayor acumulación de grasa en el hígado además de presentar cierta disminución del riesgo cardiovascular y cambios en la expresión de genes relacionados con obesidad y con la metilación del ADN.

La suplementación prometilante de una dieta control durante el periodo de la lactancia materna no presentó alteraciones en las ratas adultas, aunque su respuesta a una dieta HFS en edad adulta estimuló un incremento del peso, la mejora de parámetros bioquímicos relacionados con riesgo cardiovascular y alteraciones de la expresión génica. Por otra parte, cuando se realizó esta suplementación a ratas lactantes con una dieta HFS se produjo en la descendencia un incremento de la homocisteína plasmática, marcador de riesgo cardiovascular, que volvió a apreciarse como respuesta a una dieta HFS en la edad adulta, en donde se observó como efecto más importante una disminución de la acumulación de grasa en el hígado y su derivación hacia el tejido adiposo.

A continuación se adjuntan dos figuras que sintetizan las alteraciones principales sobre las características corporales, plasmáticas y de expresión y metilación génica debidas tanto a la ingesta de una dieta HFS como a la suplementación de la dieta con sustancias prometilantes tanto en la vida adulta como por efecto de la dieta materna durante la lactancia.



Efecto de la ingesta de una dieta HFS.



Efecto de la suplementación dietética con sustancias prometilantes.

VI. Conclusiones

1. La ingesta de una dieta rica en grasa y sacarosa (HFS) durante la vida adulta favorece, independientemente del sexo, un modelo de obesidad inducida por la dieta caracterizado por un incremento de peso y grasa corporal y a nivel hepático por un incremento de la acumulación lipídica. La suplementación de una dieta obesogénica con sustancias prometilantes durante la vida adulta previene la acumulación de grasa hepática en ambos sexos.

2. La ingesta materna durante la lactancia de una dieta HFS produce en la descendencia, en la edad adulta, un incremento de peso y grasa corporal. Esta ingesta materna elevada de grasas y azúcares durante la lactancia predispone a la descendencia a incrementar también la acumulación de grasa hepática como respuesta a esa misma dieta obesogénica en la edad adulta. Este efecto es prevenido por la suplementación materna de la dieta obesogénica con sustancias prometilantes durante la lactancia, que sin embargo se ve acompañada por un incremento en la acumulación de tejido adiposo.

3. La ingesta de la dieta HFS en edad adulta produce un incremento del índice aterogénico (colesterol total/colesterol HDL), así como resistencia a la insulina. La suplementación dietética prometilante en edad adulta estimula el metabolismo del colesterol independientemente de la composición de la dieta.

4. La ingesta materna de una dieta HFS durante la lactancia se asocia a un descenso en el índice aterogénico en la respuesta a la dieta obesogénica en la descendencia. La suplementación prometilante materna de una dieta control durante la lactancia ejerce en la respuesta a la dieta HFS de la descendencia un descenso del índice aterogénico, mientras que la suplementación materna de la dieta obesogénica durante la lactancia promueve un incremento del índice aterogénico de la descendencia en la vida adulta.

5. El estudio nutrigenómico hepático de las alteraciones producidas por la ingesta de una dieta obesogénica en edad adulta presenta modificaciones en la expresión hepática de genes relacionados con el metabolismo lipídico (Mgll, Agpat3, Srebf1, Srebf2 y Lepr), proliferación celular y cáncer (Btc, Esr1, Mst1, Fat, Mme, Mif y Dnmt1) y

defensas antioxidantes (Gsr). Las ratas alimentadas en edad adulta con dieta HFS y cuyas madres reciben la misma dieta durante la lactancia presentan una menor expresión hepática de *Lepr* y *Dnmt1* en comparación con aquéllas cuyas madres se alimentan con una dieta control durante la lactancia.

6. La suplementación de una dieta HFS con sustancias prometilantes en la edad adulta produce un incremento de la expresión hepática del gen lipogénico *Acaca*, así como una disminución de la expresión de la citoquina *Ccl2*, implicada en procesos inflamatorios y aterogénicos. El efecto de la suplementación dietética de sustancias prometilantes sobre la expresión hepática de *Lepr* es dependiente de la ingesta dietética; la suplementación de la dieta HFS, tanto en edad adulta como durante la lactancia, se asocia a un incremento de su expresión hepática, mientras que la suplementación en edad adulta de la dieta control produce un descenso en sus niveles de ARNm.

7. La ingesta de una dieta obesogénica en edad adulta no produce alteraciones de la metilación global del ADN aunque sí una hipermetilación del gen *Agpat3* (-11592pb respecto del inicio de la transcripción) así como una hipometilación de *Esr1* (-2623pb) correlacionada con grasa corporal e intrahepática. Esta dieta produce sobre el promotor de *Fasn* alteraciones en su patrón de metilación tanto por hipermetilación (-800, -816 y -818pb) como hipometilación (-714, -888, -904, -953, -968, -986pb) de sitios CpG específicos.

8. La suplementación de una dieta control con sustancias prometilantes en la edad adulta modifica el patrón epigenético disminuyendo la metilación global del ADN y produciendo un incremento en la metilación específica del promotor del gen *Agpat3* (-11592pb), implicado en la síntesis de triglicéridos.

9. La suplementación de una dieta HFS con sustancias prometilantes en la edad adulta induce una hipermetilación del promotor del gen *Fasn* en ambos sexos (-800, -816, -818, -965 y -986pb). Por otra parte, en machos adultos se observa una hipometilación

del promotor del gen Srebf2 (-157 y -167pb) correlacionada positivamente con los niveles plasmáticos de colesterol LDL.

Conclusión general

La suplementación dietética con un cóctel de sustancias prometilantes (betaína, colina, ácido fólico y vitamina B₁₂) previene la acumulación de grasa hepática debida a la ingesta de una dieta con un alto porcentaje de grasa y sacarosa en ratas. Este efecto protector es independiente del sexo y puede alcanzarse mediante su ingesta en edad adulta o debido a su ingesta por la madre durante la lactancia. El transcriptoma y el epigenoma hepático se encuentran alterados tanto por la ingesta de una dieta obesogénica como por la suplementación con sustancias prometilantes, afectando a genes implicados en obesidad, metabolismo lipídico, daño hepático o metilación del ADN.

1. A high-fat-sucrose (HFS) dietary intake during adulthood promotes, in a sex-independent manner, a diet-induced obesity model characterized by a rise on body weight and fat mass and by an increase of hepatic fat accumulation. Obesogenic diet supplementation with methyl donor substrates prevents liver fat accumulation in both sexes.
2. Maternal HFS diet intake during lactation induces an increase in offspring body weight and fat mass. This elevated intake of fat and sucrose during sucking predispose to higher liver fat accumulation when offspring are fed the same obesogenic diet during adulthood. This effect is prevented by maternal methyl donor supplementation during lactation. Parallel to this decrease in offspring liver fat accumulation there is an increase in adipose tissue depots.
3. HFS intake during adulthood induces an increase in the value of atherogenic index (total cholesterol/HDL cholesterol), as well as insulin resistance. Dietary promethylating supplementation during adulthood alters cholesterol related variables regardless dietary composition.
4. Maternal HFS intake during lactation is associated with a decrease in the atherogenic index value on the offspring fed the obesogenic diet during adulthood. Maternal control diet supplemented with promethylating agents during lactation presented decreased atherogenic index values when offspring were fed a HFS diet, while the supplementation of HFS diet lactating mothers promotes an increase in atherogenic index values in the adult offspring.
5. The nutrigenomic study of obesogenic dietary intake effects on hepatic mRNA expression profile showed changes on lipid metabolism (Mgl1, Agpat3, Srebf1, Srebf2 and Lepr), cellular proliferation and cancer (Btc, Esr1, Mst1, Fat, Mme, Mif y Dnmt1) and antioxidant defense (Gsr) related genes. Animals fed on HFS during adult life whose mothers were fed the same diet during lactation, present lower Lepr and Dnmt1 liver gene expression than those whose mothers were fed control diet during lactation.

6. Consumption of a methyl donor supplemented HFS diet in adult life promotes increased hepatic gene expression levels of the lipogenic *Acaca* gene, as well as a decrease on cytokine *Ccl2* gene expression, which is related to inflammatory and atherogenic processes. Dietary methyl donor supplementation affects liver *Lepr* gene expression when HFS is supplemented, in both adult or during lactation, where expression levels are increased, while supplementation of control diet during adulthood decreases *Lepr* mRNA hepatic levels.

7. Obesogenic dietary intake during adulthood does not change global DNA methylation levels, although a hypermethylation of *Agpat3* gene promoter (-11592bp respect to the transcriptional start site) was found, as well as a hypomethylation of *Esr1* promoter (-2623bp) that correlated with intrahepatic and total body fat mass. The intake of the HFS diet induces changes in *Fasn* specific CpGs methylation status by hypermethylation (-800, -816 y -818bp) and by hypomethylation (-714, -888, -904, -953, -968, -986bp).

8. Methyl donor supplementation of a reference diet during adulthood modifies the epigenetic pattern by decreasing global DNA methylation levels and by increasing specific DNA methylation on *Agpat3* gene promoter (-11592bp), a tryglyceride synthesis related gene.

9. Methyl donor supplementation of the HFS diet during adulthood induces *Fasn* promoter specific hypermethylation in both sexes (-800, -816, -818, -965 y -986pb). Moreover, adult male rats show a hypomethylation of *Srebf2* promoter gene (-157 y -167bp) that is positively correlated with plasma LDL cholesterol levels when fed on HFS supplemented diet.

General conclusion

Dietary supplementation with a promethylating cocktail (containing betaine, choline, folic acid and vitamin B₁₂) prevents against high-fat-sucrose diet induced liver fat accumulation in rats. This protective effect is sex-independent and occurs by supplementing during adult life or by maternal intake during lactation. Hepatic transcriptome and epigenome are altered by obesogenic diet intake and by methyl donor dietary supplementation, affecting obesity, lipid metabolism, liver damage or DNA methylation related genes.

VII. Bibliografía

- [1] Abu-Elheiga L, Wu H, Gu Z, Bressler R, Wakil SJ. Acetyl-CoA carboxylase 2-/- mutant mice are protected against fatty liver under high-fat, high-carbohydrate dietary and *de novo* lipogenic conditions. *J Biol Chem* 2012;287:12578-12588.
- [2] Akyildiz M, Gunsar F, Nart D, Sahin O, Yilmaz F, Akay S et al. Macrophage migration inhibitory factor expression and MIF gene -173 G/C polymorphism in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22:192-198.
- [3] Alzamendi A, Castrogiovanni D, Gaillard RC, Spinedi E, Giovambattista A. Increased male offspring's risk of metabolic-neuroendocrine dysfunction and overweight after fructose-rich diet intake by the lactating mother. *Endocrinology* 2010;151:4214-4223.
- [4] Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-1231.
- [5] Ansari JA, Bhandari U, Pillai KK, Haque SE. Effect of rosuvastatin on obesity-induced cardiac oxidative stress in Wistar rats--a preliminary study. *Indian J Exp Biol* 2012;50:216-222.
- [6] Archer KJ, Mas VR, Maluf DG, Fisher RA. High-throughput assessment of CpG site methylation for distinguishing between HCV-cirrhosis and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Mol Genet Genomics* 2010;283:341-349.
- [7] Armstrong KM, Bermingham EN, Bassett SA, Treloar BP, Roy NC, Barnett MP. Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA. *Biotechnol J* 2011;6:113-117.
- [8] Armutcu F, Coskun O, Gurel A, Kanter M, Can M, Ucar F et al. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin Biochem* 2005;38:540-547.
- [9] Ba Y, Yu H, Liu F, Geng X, Zhu C, Zhu Q et al. Relationship of folate, vitamin B₁₂ and methylation of insulin-like growth factor-II in maternal and cord blood. *Eur J Clin Nutr* 2011;65:480-485.

- [10] Badimon L, Vilahur G. LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1254:18-32.
- [11] Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 2012;61:416-426.
- [12] Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* 2004;23:588S-595S.
- [13] Barton M. Childhood obesity: a life-long health risk. *Acta Pharmacol Sin* 2012;33:189-193.
- [14] Bastarrachea RA, López-Alvarenga JC, Bolado-García VE, Téllez-Mendoza J, Laviada-Molina H, AG C. [Macrophages, inflammation, adipose tissue, obesity and insulin resistance]. *Gac Med Mex* 2007;143:505-512.
- [15] Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol* 2012;56:952-964.
- [16] Beck B, Richy S, Archer ZA, Mercer JG. Ingestion of Carbohydrate-Rich Supplements during Gestation Programs Insulin and Leptin Resistance but not Body Weight Gain in Adult Rat Offspring. *Front Physiol* 2012;3:224.
- [17] Benz V, Bloch M, Wardat S, Bohm C, Maurer L, Mahmoodzadeh S et al. Sexual dimorphic regulation of body weight dynamics and adipose tissue lipolysis. *PLoS One* 2012;7:e37794.
- [18] Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007;128:669-681.

- [19] Bjorntorp P. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996;20:291-302.
- [20] Blomqvist ME, McCarthy S, Blennow K, Andersson B, Prince JA. Evaluation of neprilysin sequence variation in relation to CSF beta-Amyloid levels and Alzheimer disease risk. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2010;1:47-52.
- [21] Boivin A, Deshaies Y. Dietary rat models in which the development of hypertriglyceridemia and that of insulin resistance are dissociated. *Metabolism* 1995;44:1540-1547.
- [22] Bondia-Pons I, Boque N, Paternain L, Santamaria E, Fernandez J, Campion J et al. Liver proteome changes induced by a short-term high-fat sucrose diet in Wistar rats. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2011;4:344-353.
- [23] Boque N, Campion J, Paternain L, Garcia-Diaz DF, Galarraga M, Portillo MP et al. Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. *J Physiol Biochem* 2009;65:387-395.
- [24] Braunschweig MH, Owczarek-Lipska M, Stahlberger-Saitbekova N. Relationship of porcine IGF2 imprinting status to DNA methylation at the H19 DMD and the IGF2 DMRs 1 and 2. *BMC Genet* 2011;12:47.
- [25] Bravo E, Palleschi S, Aspichueta P, Buque X, Rossi B, Cano A et al. High fat diet-induced non alcoholic fatty liver disease in rats is associated with hyperhomocysteinemia caused by down regulation of the transsulphuration pathway. *Lipids Health Dis* 2011;10:60.
- [26] Brown SA, Rogers LK, Dunn JK, Gotto AM, Jr., Patsch W. Development of cholesterol homeostatic memory in the rat is influenced by maternal diets. *Metabolism* 1990;39:468-473.
- [27] Buchman AL, Ament ME, Sohel M, Dubin M, Jenden DJ, Roch M et al. Choline deficiency causes reversible hepatic abnormalities in patients receiving parenteral

nutrition: proof of a human choline requirement: a placebo-controlled trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2001;25:260-268.

[28] Buettner R, Bettermann I, Hechtel C, Gabele E, Hellerbrand C, Scholmerich J et al. Dietary folic acid activates AMPK and improves insulin resistance and hepatic inflammation in dietary rodent models of the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 2010;42:769-774.

[29] Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15:798-808.

[30] Bunce K, Chu T, Surti U, Hogge WA, Peters DG. Discovery of epigenetic biomarkers for the noninvasive diagnosis of fetal disease. *Prenat Diagn* 2012;32:542-549.

[31] Byrne JA, Meara NJ, Rayner AC, Thompson RJ, Knisely AS. Lack of hepatocellular CD10 along bile canaliculi is physiologic in early childhood and persistent in Alagille syndrome. *Lab Invest* 2007;87:1138-1148.

[32] Campion J, Milagro F, Martinez JA. Epigenetics and obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010;94:291-347.

[33] Campion J, Milagro FI, Fernandez D, Martinez JA. Differential gene expression and adiposity reduction induced by ascorbic acid supplementation in a cafeteria model of obesity. *J Physiol Biochem* 2006;62:71-80.

[34] Campion J, Milagro FI, Fernandez D, Martinez JA. Vitamin C supplementation influences body fat mass and steroidogenesis-related genes when fed a high-fat diet. *Int J Vitam Nutr Res* 2008;78:87-95.

[35] Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 2009;10:383-392.

[36] Carmel R. Efficacy and safety of fortification and supplementation with vitamin B₁₂: biochemical and physiological effects. *Food Nutr Bull* 2008;29:S177-187.

- [37] Casey PH, Bradley RH, Whiteside-Mansell L, Barrett K, Gossett JM, Simpson PM. Evolution of obesity in a low birth weight cohort. *J Perinatol* 2012;32:91-96.
- [38] Chang X, Yan H, Fei J, Jiang M, Zhu H, Lu D et al. Berberine reduces methylation of the MTP promoter and alleviates fatty liver induced by a high-fat diet in rats. *J Lipid Res* 2010;51:2504-2515.
- [39] Chmurzynska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet* 2006;47:39-48.
- [40] Chmurzynska A, Stachowiak M, Gawecki J, Pruszyńska-Oszmalek E, Tubacka M. Protein and folic acid content in the maternal diet determine lipid metabolism and response to high-fat feeding in rat progeny in an age-dependent manner. *Genes Nutr* 2011;doi: 10.1007/s12263-12011-10253-12267.
- [41] Coates PM, Brown SA, Sonawane BR, Koldovsky O. Effect of early nutrition on serum cholesterol levels in adult rats challenged with high fat diet. *J Nutr* 1983;113:1046-1050.
- [42] Cohen P, Yang G, Yu X, Soukas AA, Wolfish CS, Friedman JM et al. Induction of leptin receptor expression in the liver by leptin and food deprivation. *J Biol Chem* 2005;280:10034-10039.
- [43] Cohen SE, Kokkotou E, Biddinger SB, Kondo T, Gebhardt R, Kratzsch J et al. High circulating leptin receptors with normal leptin sensitivity in liver-specific insulin receptor knock-out (LIRKO) mice. *J Biol Chem* 2007;282:23672-23678.
- [44] Coolen MW, Statham AL, Qu W, Campbell MJ, Henders AK, Montgomery GW et al. Impact of the genome on the epigenome is manifested in DNA methylation patterns of imprinted regions in monozygotic and dizygotic twins. *PLoS One* 2011;6:e25590.
- [45] Cooper WN, Khulan B, Owens S, Elks CE, Seidel V, Prentice AM et al. DNA methylation profiling at imprinted loci after periconceptional micronutrient supplementation in humans: results of a pilot randomized controlled trial. *Faseb J* 2012;26:1782-1790.

- [46] Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 2005;81:341-354.
- [47] Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Coppola P, Liverini G, Iossa S. Increased hepatic *de novo* lipogenesis and mitochondrial efficiency in a model of obesity induced by diets rich in fructose. *Eur J Nutr* 2012;doi:10.1007/S00394-012-0356-y.
- [48] Crider KS, Quinlivan EP, Berry RJ, Hao L, Li Z, Maneval D et al. Genomic DNA methylation changes in response to folic acid supplementation in a population-based intervention study among women of reproductive age. *PLoS One* 2011;6:e28144.
- [49] Davidson JM MT, Kovacheva VP, Blusztajn JK. Gestational choline supply regulates methylation of histone H3, expression of histone methyltransferases G9a (Kmt1c) and Suv39h1 (Kmt1a), and DNA methylation of their genes in rat liver and brain. *J Biol Chem* 2009;284:1982-1989.
- [50] Daye ZJ, Li H, Wei Z. A powerful test for multiple rare variants association studies that incorporates sequencing qualities. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e60.
- [51] Delgado-Cruzata L, Hruby GW, Gonzalez K, McKiernan J, Benson MC, Santella RM et al. DNA methylation changes correlate with Gleason score and tumor stage in prostate cancer. *DNA Cell Biol* 2012;31:187-192.
- [52] Dhobale M, Joshi S. Altered maternal micronutrients (folic acid, vitamin B(12)) and omega 3 fatty acids through oxidative stress may reduce neurotrophic factors in preterm pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011; doi:10.3109/14767058.14762011.14579209.
- [53] Ding Y, He J, Liu X, Chen X, Long C, Wang Y. Expression of DNA methyltransferases in the mouse uterus during early pregnancy and susceptibility to dietary folate deficiency. *Reproduction* 2012.

- [54] Dudley KJ, Sloboda DM, Connor KL, Beltrand J, Vickers MH. Offspring of mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition and associated changes in gene expression and DNA methylation. *PLoS One* 2011;6:e21662.
- [55] Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Fouchère F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004;86:839-848.
- [56] Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865-873.
- [57] El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2000;105:1827-1832.
- [58] El-Maarri O. DNA methylation and human diseases. *Adv Exp Med Biol* 2003;544:135-144.
- [59] Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK, Hanson MA. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *Br J Nutr* 2009;102:514-519.
- [60] Eskandari MR, Fard JK, Hosseini MJ, Pourahmad J. Glutathione mediated reductive activation and mitochondrial dysfunction play key roles in lithium induced oxidative stress and cytotoxicity in liver. *Biometals* 2012.
- [61] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148-1159.
- [62] Estrany ME, Proenza AM, Llado I, Gianotti M. Isocaloric intake of a high-fat diet modifies adiposity and lipid handling in a sex dependent manner in rats. *Lipids Health Dis* 2011;10:52.

- [63] Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15430-15435.
- [64] Fang WJ, Zheng Y, Wu LM, Ke QH, Shen H, Yuan Y et al. Genome-wide Analysis of Aberrant DNA Methylation for Identification of Potential Biomarkers in Colorectal Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:1917-1921.
- [65] Farley C, Cook JA, Spar BD, Austin TM, Kowalski TJ. Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats. *Obes Res* 2003;11:845-851.
- [66] Feng S, Xiong L, Ji Z, Cheng W, Yang H. Correlation between increased ND2 expression and demethylated displacement loop of mtDNA in colorectal cancer. *Mol Med Report* 2012;6:125-130.
- [67] Fleig SV, Choi SS, Yang L, Jung Y, Omenetti A, VanDongen HM et al. Hepatic accumulation of Hedgehog-reactive progenitors increases with severity of fatty liver damage in mice. *Lab Invest* 2007;87:1227-1239.
- [68] Foran E, Garrity-Park MM, Mureau C, Newell J, Smyrk TC, Limburg PJ et al. Upregulation of DNA methyltransferase-mediated gene silencing, anchorage-independent growth, and migration of colon cancer cells by interleukin-6. *Mol Cancer Res* 2010;8:471-481.
- [69] Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2011;35:14S-20S.
- [70] Fu VX, Schwarze SR, Kenowski ML, Leblanc S, Svaren J, Jarrard DF. A loss of insulin-like growth factor-2 imprinting is modulated by CCCTC-binding factor down-regulation at senescence in human epithelial cells. *J Biol Chem* 2004;279:52218-52226.
- [71] Galipeau DM, Yao L, McNeill JH. Relationship among hyperinsulinemia, insulin resistance, and hypertension is dependent on sex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H562-567.

- [72] Garcia-Monzon C, Lo Iacono O, Mayoral R, Gonzalez-Rodriguez A, Miquilena-Colina ME, Lozano-Rodriguez T et al. Hepatic insulin resistance is associated with increased apoptosis and fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011;54:142-152.
- [73] Garcia-Tevijano ER, Berasain C, Rodriguez JA, Corrales FJ, Arias R, Martin-Duce A et al. Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. *Hypertension* 2001;38:1217-1221.
- [74] Ghoshal K, Li X, Datta J, Bai S, Pogribny I, Pogribny M et al. A folate- and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. *J Nutr* 2006;136:1522-1527.
- [75] Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS, Raubenheimer D. Fetal and neonatal pathways to obesity. *Front Horm Res* 2008;36:61-72.
- [76] Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* 2008;359:61-73.
- [77] Gomez-Ruiz A, Milagro FI, Campion J, Martinez JA, de Miguel C. High-fat diet feeding alters metabolic response to fasting/non fasting conditions. Effect on caveolin expression and insulin signalling. *Lipids Health Dis* 2011;10:55.
- [78] Grabe N. AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. *In Silico Biol* 2002;2:S1-15.
- [79] Gu CC, Rao DC, Stormo G, Hicks C, Province MA. Role of gene expression microarray analysis in finding complex disease genes. *Genet Epidemiol* 2002;23:37-56.
- [80] Guri AJ, Bassaganya-Riera J. Systemic effects of white adipose tissue dysregulation and obesity-related inflammation. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19:689-700.

- [81] Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 2011;106:272-280.
- [82] Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 2010;23:270-299.
- [83] Harismendy O, Bansal V, Bhatia G, Nakano M, Scott M, Wang X et al. Population sequencing of two endocannabinoid metabolic genes identifies rare and common regulatory variants associated with extreme obesity and metabolite level. *Genome Biol* 2010;11:R118.
- [84] He Z, Zhang SS, Meng Q, Li S, Zhu HH, Raquil MA et al. Shp2 controls female body weight and energy balance by integrating leptin and estrogen signals. *Mol Cell Biol* 2012;32:1867-1878.
- [85] Hirao J, Nishimura M, Arakawa S, Niino N, Mori K, Furukawa T et al. Sex and circadian modulatory effects on rat liver as assessed by transcriptome analyses. *J Toxicol Sci* 2011;36:9-22.
- [86] Hochberg Z, Feil R, Constancia M, Fraga M, Junien C, Carel JC et al. Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. *Endocr Rev* 2011;32:159-224.
- [87] Hori Y, Sato S, Yamate J, Kurasaki M, Nishihira J, Hosokawa T et al. Immunohistochemical study of macrophage migration inhibitory factor in rat liver fibrosis induced by thioacetamide. *Eur J Histochem* 2003;47:317-324.
- [88] Horton TJ, Gayles EC, Prach PA, Koppenhafer TA, Pagliassotti MJ. Female rats do not develop sucrose-induced insulin resistance. *Am J Physiol* 1997;272:R1571-1576.
- [89] Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem* 2011;67:129-139.

- [90] Iacobellis A, Marcellini M, Andriulli A, Perri F, Leandro G, Devito R et al. Non invasive evaluation of liver fibrosis in paediatric patients with nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2006;12:7821-7825.
- [91] Jeltsch A. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem* 2002;3:274-293.
- [92] Kajikawa S, Imada K, Takeuchi T, Shimizu Y, Kawashima A, Harada T et al. Eicosapentaenoic acid attenuates progression of hepatic fibrosis with inhibition of reactive oxygen species production in rats fed methionine- and choline-deficient diet. *Dig Dis Sci* 2011;56:1065-1074.
- [93] Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2011;60:404-413.
- [94] Kamei Y, Suganami T, Ehara T, Kanai S, Hayashi K, Yamamoto Y et al. Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:314-321.
- [95] Kamgang R, Mboumi RY, N'Dille G P, Yonkeu JN. Cameroon local diet-induced glucose intolerance and dyslipidemia in adult Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;69:224-230.
- [96] Karatela RA, Sainani GS. Plasma homocysteine in obese, overweight and normal weight hypertensives and normotensives. *Indian Heart J* 2009;61:156-159.
- [97] Kathirvel E, Morgan K, Nandgiri G, Sandoval BC, Caudill MA, Bottiglieri T et al. Betaine improves nonalcoholic fatty liver and associated hepatic insulin resistance: a potential mechanism for hepatoprotection by betaine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G1068-1077.
- [98] Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R127-133.

- [99] Kim JM, Hong K, Lee JH, Lee S, Chang N. Effect of folate deficiency on placental DNA methylation in hyperhomocysteinemic rats. *J Nutr Biochem* 2009;20:172-176.
- [100] Kim M, Long TI, Arakawa K, Wang R, Yu MC, Laird PW. DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk. *PLoS One* 2010;5:e9692.
- [101] Kim Y, Kim K, Park D, Lee E, Lee H, Lee YS et al. Histone Deacetylase 3 Mediates Allergic Skin Inflammation by Regulating Expression of MCP1 Protein. *J Biol Chem* 2012;287:25844-25859.
- [102] Koca SS, Bahcecioglu IH, Poyrazoglu OK, Ozercan IH, Sahin K, Ustundag B. The treatment with antibody of TNF-alpha reduces the inflammation, necrosis and fibrosis in the non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine- and choline-deficient diet. *Inflammation* 2008;31:91-98.
- [103] Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2007;20:351-358.
- [104] Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 2001;21:89-104.
- [105] Kotsopoulos J, Sohn KJ, Kim YI. Postweaning dietary folate deficiency provided through childhood to puberty permanently increases genomic DNA methylation in adult rat liver. *J Nutr* 2008;138:703-709.
- [106] Koturbash I, Scherhag A, Sorrentino J, Sexton K, Bodnar W, Tryndyak V et al. Epigenetic alterations in liver of C57BL/6J mice after short-term inhalational exposure to 1,3-butadiene. *Environ Health Perspect* 2011;119:635-640.
- [107] Krueger KJ, McClain CJ, McClave SA, Dryden GW. Nutritional supplements and alternative medicine. *Curr Opin Gastroenterol* 2004;20:130-138.
- [108] Kwaepila N, Burns G, Leong AS. Immunohistological localisation of human FAT1 (hFAT) protein in 326 breast cancers. Does this adhesion molecule have a role in pathogenesis? *Pathology* 2006;38:125-131.

- [109] Kwon do Y, Jung YS, Kim SJ, Park HK, Park JH, Kim YC. Impaired sulfur-amino acid metabolism and oxidative stress in nonalcoholic fatty liver are alleviated by betaine supplementation in rats. *J Nutr* 2009;139:63-68.
- [110] Lavilla-Alonso S, Bauer MM, Abo-Ramadan U, Ristimaki A, Halavaara J, Desmond RA et al. Macrophage metalloelastase (MME) as adjuvant for intra-tumoral injection of oncolytic adenovirus and its influence on metastases development. *Cancer Gene Ther* 2012;19:126-134.
- [111] Leblanc SE, Srinivasan R, Ferri C, Mager GM, Gillian-Daniel AL, Wrabetz L et al. Regulation of cholesterol/lipid biosynthetic genes by Egr2/Krox20 during peripheral nerve myelination. *J Neurochem* 2005;93:737-748.
- [112] Li CC, Cropley JE, Cowley MJ, Preiss T, Martin DI, Suter CM. A sustained dietary change increases epigenetic variation in isogenic mice. *PLoS Genet* 2011;7:e1001380.
- [113] Li Q, Wu JH, Guo DJ, Cheng HL, Chen SL, Chan SW. Suppression of diet-induced hypercholesterolemia by scutellarin in rats. *Planta Med* 2009;75:1203-1208.
- [114] Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 2005;135:1382-1386.
- [115] Lillycrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, Godfrey KM, Jackson AA, Burdge GC. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *Br J Nutr* 2007;97:1064-1073.
- [116] Liu A, Jin H, Dirsch O, Deng M, Huang H, Brocker-Preuss M et al. Release of danger signals during ischemic storage of the liver: a potential marker of organ damage? *Mediators Inflamm* 2010;2010:436145.

- [117] Lomba A, Martinez JA, Garcia-Diaz DF, Paternain L, Marti A, Campion J et al. Weight gain induced by an isocaloric pair-fed high fat diet: a nutriepigenetic study on FASN and NDUFB6 gene promoters. *Mol Genet Metab* 2010;101:273-278.
- [118] Lomba A, Milagro FI, Garcia-Diaz DF, Marti A, Campion J, Martinez JA. Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis. *Lipids Health Dis* 2010;9:60.
- [119] Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009;30:42-59.
- [120] Lu Z, Wang Z, Wang X, Diao B, Feng X, He F et al. Protection from high-fat-diet-induced impaired glucose tolerance in female Sprague-Dawley rats. *Gynecol Endocrinol* 2009;25:464-471.
- [121] Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT et al. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metab* 2005;1:107-119.
- [122] Majumder S, Ghoshal K, Datta J, Bai S, Dong X, Quan N et al. Role of *de novo* DNA methyltransferases and methyl CpG-binding proteins in gene silencing in a rat hepatoma. *J Biol Chem* 2002;277:16048-16058.
- [123] Malaguarnera M, Di Rosa M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med (Berl)* 2009;87:679-695.
- [124] Mari M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:2685-2700.
- [125] Marques-Lopes I, Ansorena D, Astiasaran I, Forga L, Martinez JA. Postprandial *de novo* lipogenesis and metabolic changes induced by a high-carbohydrate, low-fat meal in lean and overweight men. *Am J Clin Nutr* 2001;73:253-261.
- [126] Marti A, Berraondo B, Martinez JA. Leptin: physiological actions. *J Physiol Biochem* 1999;55:43-49.

- [127] Martinez JA, Cordero P, Campion J, Milagro FI. Interplay of early-life nutritional programming on obesity, inflammation and epigenetic outcomes. *Proc Nutr Soc* 2012;1-8.
- [128] Mato JM, Lu SC. The hepatocarcinogenic effect of methionine and choline deficient diets: an adaptation to the Warburg effect? *Alcohol Clin Exp Res* 2011;35:811-814.
- [129] Matsuda KI, Mori H, Kawata M. Epigenetic mechanisms are involved in sexual differentiation of the brain. *Rev Endocr Metab Disord* 2012;13:163-171.
- [130] Mayes JS, Watson GH. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 2004;5:197-216.
- [131] McNeil CJ, Hay SM, Rucklidge GJ, Reid MD, Duncan GJ, Rees WD. Maternal diets deficient in folic acid and related methyl donors modify mechanisms associated with lipid metabolism in the fetal liver of the rat. *Br J Nutr* 2009;102:1445-1452.
- [132] Medici V, Ali MR, Seo S, Aoki CA, Rossaro L, Kim K et al. Increased soluble leptin receptor levels in morbidly obese patients with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:2268-2273.
- [133] Medici V, Virata MC, Peerson JM, Stabler SP, French SW, Gregory JF, 3rd et al. S-adenosyl-L-methionine treatment for alcoholic liver disease: a double-blinded, randomized, placebo-controlled trial. *Alcohol Clin Exp Res* 2011;35:1960-1965.
- [134] Melas PA, Rogdaki M, Osby U, Schalling M, Lavebratt C, Ekstrom TJ. Epigenetic aberrations in leukocytes of patients with schizophrenia: association of global DNA methylation with antipsychotic drug treatment and disease onset. *Faseb J* 2012;doi:10.1096/fj.11-202069.
- [135] Milagro FI, Campion J, Cordero P, Goyenechea E, Gomez-Uriz AM, Abete I et al. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *Faseb J* 2011;25:1378-1389.

- [136] Milagro FI, Campion J, Garcia-Diaz DF, Goyenechea E, Paternain L, Martinez JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 2009;65:1-9.
- [137] Milagro FI, Campion J, Martinez JA. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:1118-1123.
- [138] Milagro FI, Mansego ML, De Miguel C, Martinez JA. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: Progresses and perspectives. *Mol Aspects Med* 2012.
- [139] Misra A, Khurana L. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:S9-30.
- [140] Moore JB. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc* 2010;69:211-220.
- [141] Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online* 2006;8:175-193.
- [142] Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005;14 Spec No 1:R47-58.
- [143] Mori H, Matsuda KI, Tsukahara S, Kawata M. Intrauterine position affects estrogen receptor alpha expression in the ventromedial nucleus of the hypothalamus via promoter DNA methylation. *Endocrinology* 2010;151:5775-5781.
- [144] Musso G, Cassader M, Gambino R. Cholesterol-lowering therapy for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: an update. *Curr Opin Lipidol* 2011;22:489-496.
- [145] Must A. Does overweight in childhood have an impact on adult health? *Nutr Rev* 2003;61:139-142.

- [146] Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 2010;328:1566-1569.
- [147] Newberry EP, Xie Y, Kennedy SM, Luo J, Davidson NO. Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. *Hepatology* 2006;44:1191-1205.
- [148] Ngo V, Gourdjji D, Laverriere JN. Site-specific methylation of the rat prolactin and growth hormone promoters correlates with gene expression. *Mol Cell Biol* 1996;16:3245-3254.
- [149] Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T et al. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 2010;70:1430-1440.
- [150] Nixon JP, Zhang M, Wang C, Kuskowski MA, Novak CM, Levine JA et al. Evaluation of a quantitative magnetic resonance imaging system for whole body composition analysis in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:1652-1659.
- [151] Nunes PM, Jones JG, Rolo AP, Palmeira CM, Carvalho RA. Ursodeoxycholic acid treatment of hepatic steatosis: a ¹³C NMR metabolic study. *NMR Biomed* 2011;24:1145-1158.
- [152] Ockenga J, Tietge UJ, Boker KH, Manns MP, Brabant G, Bahr MJ. Distinct roles of free leptin, bound leptin and soluble leptin receptor during the metabolic-inflammatory response in patients with liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:1301-1309.
- [153] Ojeda ML, Delgado-Villa MJ, Llopis R, Murillo ML, Carreras O. Lipid metabolism in ethanol-treated rat pups and adults: effects of folic Acid. *Alcohol Alcohol* 2008;43:544-550.

- [154] Ozanne SE, Constancia M. Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3:539-546.
- [155] Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 2002;35:367-372.
- [156] Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol* 2005;20:345-352.
- [157] Palou M, Priego T, Sanchez J, Torrens JM, Palou A, Pico C. Moderate caloric restriction in lactating rats protects offspring against obesity and insulin resistance in later life. *Endocrinology* 2010;151:1030-1041.
- [158] Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:351982.
- [159] Park CH, Cho EJ, Yokozawa T. Protection against hypercholesterolemia by Corni fructus extract and its related protective mechanism. *J Med Food* 2009;12:973-981.
- [160] Paternain L, De la Garza A, Batlle M, Milagro F, Martinez J, Campion J. Prenatal stress increases the obesogenic effects of a high-fat-sucrose diet in adult rats in a sex-specific manner. *Stress* 2012.
- [161] Paternain L, Garcia-Diaz DF, Milagro FI, Gonzalez-Muniesa P, Martinez JA, Campion J. Regulation by chronic-mild stress of glucocorticoids, monocyte chemoattractant protein-1 and adiposity in rats fed on a high-fat diet. *Physiol Behav* 2011;103:173-180.
- [162] Paternain L, Martisova E, Milagro FI, Ramirez MJ, Martinez JA, Campion J. Postnatal maternal separation modifies the response to an obesogenic diet in adulthood in rats. *Dis Model Mech* 2012.

- [163] Perseghin G. Lipids in the wrong place: visceral fat and nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care* 2011;34 Suppl 2:S367-370.
- [164] Pico C, Oliver P, Sanchez J, Miralles O, Caimari A, Priego T et al. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int J Obes (Lond)* 2007;31:1199-1209.
- [165] Pogribny I, Yi P, James SJ. A sensitive new method for rapid detection of abnormal methylation patterns in global DNA and within CpG islands. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:624-628.
- [166] Pogribny IP, James SJ, Jernigan S, Pogribna M. Genomic hypomethylation is specific for preneoplastic liver in folate/methyl deficient rats and does not occur in non-target tissues. *Mutat Res* 2004;548:53-59.
- [167] Pogribny IP, Shpyleva SI, Muskhelishvili L, Bagnyukova TV, James SJ, Beland FA. Role of DNA damage and alterations in cytosine DNA methylation in rat liver carcinogenesis induced by a methyl-deficient diet. *Mutat Res* 2009;669:56-62.
- [168] Pogribny IP, Tryndyak VP, Bagnyukova TV, Melnyk S, Montgomery B, Ross SA et al. Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet. *J Hepatol* 2009;51:176-186.
- [169] Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1499-1503.
- [170] Priego T, Sanchez J, Palou A, Pico C. Leptin intake during the suckling period improves the metabolic response of adipose tissue to a high-fat diet. *Int J Obes (Lond)* 2010;34:809-819.
- [171] Priego T, Sanchez J, Pico C, Palou A. Sex-differential expression of metabolism-related genes in response to a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:819-826.
- [172] Raghuveer G. Lifetime cardiovascular risk of childhood obesity. *Am J Clin Nutr* 2012;91:1514S-1519S.

- [173] Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Mark AL, Haynes WG. Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes* 2005;54:2012-2018.
- [174] Rajia S, Chen H, Morris MJ. Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers-modulation by postweaning diet. *J Neuroendocrinol* 2010;22:905-914.
- [175] Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 1999;70:811-816.
- [176] Ray JG, Cole DE, Boss SC. An Ontario-wide study of vitamin B₁₂, serum folate, and red cell folate levels in relation to plasma homocysteine: is a preventable public health issue on the rise? *Clin Biochem* 2000;33:337-343.
- [177] Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 2010;328:1570-1573.
- [178] Roden M. Hepatic glucose production and insulin resistance. *Wien Med Wochenschr* 2008;158:558-561.
- [179] Rodriguez C, Borgel J, Court F, Cathala G, Forne T, Piette J. CTCF is a DNA methylation-sensitive positive regulator of the INK/ARF locus. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;392:129-134.
- [180] Roger T, Ding X, Chanson AL, Renner P, Calandra T. Regulation of constitutive and microbial pathogen-induced human macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene expression. *Eur J Immunol* 2007;37:3509-3521.
- [181] Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev* 2006;82:485-491.

- [182] Roseboom TJ, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Ravelli AC, Schroeder-Tanka JM et al. Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45. *Heart* 2000;84:595-598.
- [183] Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 2001;276:37731-37734.
- [184] Sahai A, Malladi P, Pan X, Paul R, Melin-Aldana H, Green RM et al. Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G1035-1043.
- [185] Saridaki Z, Georgoulas V, Souglakos J. Mechanisms of resistance to anti-EGFR monoclonal antibody treatment in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2010;16:1177-1187.
- [186] Schwahn BC, Wang XL, Mikael LG, Wu Q, Cohn J, Jiang H et al. Betaine supplementation improves the atherogenic risk factor profile in a transgenic mouse model of hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis* 2007;195:e100-107.
- [187] Scorsatto M, Uehara SK, Luiz RR, de Oliveira GM, Rosa G. Fortification of flours with folic acid reduces homocysteine levels in Brazilian women. *Nutr Res* 2011;31:889-895.
- [188] Seiva FR, Berbert CM, Souza GA, Rocha KK, Ebaid GM, Burneiko RC et al. Energy expenditure, lipid profile, oxidative stress, and cardiac energy metabolism after growth hormone treatment in obese young rats. *Horm Metab Res* 2010;42:496-501.
- [189] Sertic J, Juricic L, Ljubic H, Bozina T, Lovric J, Markeljevic J et al. Variants of ESR1, APOE, LPL and IL-6 loci in young healthy subjects: association with lipid status and obesity. *BMC Res Notes* 2009;2:203.
- [190] Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM. Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2010;91:502-509.

- [191] Song H, Mak KK, Topol L, Yun K, Hu J, Garrett L et al. Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:1431-1436.
- [192] Sookoian S, Rosselli MS, Gemma C, Burgueno AL, Fernandez Gianotti T, Castano GO et al. Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha promoter. *Hepatology* 2010;52:1992-2000.
- [193] Spruijt-Metz D, Lindquist CH, Birch LL, Fisher JO, Goran MI. Relation between mothers' child-feeding practices and children's adiposity. *Am J Clin Nutr* 2002;75:581-586.
- [194] Starlard-Davenport A, Tryndyak V, Kosyk O, Ross SR, Rusyn I, Beland FA et al. Dietary methyl deficiency, microRNA expression and susceptibility to liver carcinogenesis. *World Rev Nutr Diet* 2010;101:123-130.
- [195] Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 2010;51:1820-1832.
- [196] Steegers-Theunissen RP, Obermann-Borst SA, Kremer D, Lindemans J, Siebel C, Steegers EA et al. Periconceptional maternal folic acid use of 400 microg per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child. *PLoS One* 2009;4:e7845.
- [197] Strable MS, Ntambi JM. Genetic control of *de novo* lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010;45:199-214.
- [198] Sugiura T, Dohi Y, Yamashita S, Yamamoto K, Wakamatsu Y, Tanaka S et al. Impact of lipid profile and high blood pressure on endothelial damage. *J Clin Lipidol* 2011;5:460-466.
- [199] Szeto IM, Das PJ, Aziz A, Anderson GH. Multivitamin supplementation of Wistar rats during pregnancy accelerates the development of obesity in offspring fed an obesogenic diet. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:364-372.

- [200] Takeuchi K, Reue K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E1195-1209.
- [201] Tall AR. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med* 2008;263:256-273.
- [202] Taraschenko OD, Maisonneuve IM, Glick SD. Sex differences in high fat-induced obesity in rats: Effects of 18-methoxycoronaridine. *Physiol Behav* 2011;103:308-314.
- [203] Taruscio D, Carbone P, Granata O, Baldi F, Mantovani A. Folic acid and primary prevention of birth defects. *Biofactors* 2011;37:280-284.
- [204] Terra X, Quintero Y, Auguet T, Porrás JA, Hernández M, Sabench F et al. FABP 4 is associated with inflammatory markers and metabolic syndrome in morbidly obese women. *Eur J Endocrinol* 2011;164:539-547.
- [205] Tian M, Peng S, Martin FL, Zhang J, Liu L, Wang Z et al. Perfluorooctanoic acid induces gene promoter hypermethylation of glutathione-S-transferase Pi in human liver L02 cells. *Toxicology* 2012;296:48-55.
- [206] Toperoff G, Aran D, Kark JD, Rosenberg M, Dubnikov T, Nissan B et al. Genome-wide survey reveals predisposing diabetes type 2-related DNA methylation variations in human peripheral blood. *Hum Mol Genet* 2012;21:371-383.
- [207] Tryndyak VP, Han T, Muskhelishvili L, Fuscoe JC, Ross SA, Beland FA et al. Coupling global methylation and gene expression profiles reveal key pathophysiological events in liver injury induced by a methyl-deficient diet. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:411-418.
- [208] Tsiambas E, Georgiannos SN, Salemis N, Alexopoulou D, Lambropoulou S, Dimo B et al. Significance of estrogen receptor 1 (ESR-1) gene imbalances in colon and hepatocellular carcinomas based on tissue microarrays analysis. *Med Oncol* 2011;28:934-940.

- [209] van Straten EM, Bloks VW, Huijkman NC, Baller JF, van Meer H, Lutjohann D et al. The Liver X-Receptor (LXR) gene promoter is hypermethylated in a mouse model of prenatal protein restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009.
- [210] Verschuren L, Kooistra T, Bernhagen J, Voshol PJ, Ouwens DM, van Erk M et al. MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circ Res* 2009;105:99-107.
- [211] Vetelainen R, van Vliet A, van Gulik TM. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1526-1533.
- [212] Villa P, Perri C, Suriano R, Cucinelli F, Panunzi S, Ranieri M et al. L-folic acid supplementation in healthy postmenopausal women: effect on homocysteine and glycolipid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4622-4629.
- [213] Vucetic Z, Kimmel J, Totoki K, Hollenbeck E, Reyes TM. Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology* 2010;151:4756-4764.
- [214] Wang JH, Keisala T, Solakivi T, Minasyan A, Kalueff AV, Tuohimaa P. Serum cholesterol and expression of ApoAI, LXRbeta and SREBP2 in vitamin D receptor knock-out mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;113:222-226.
- [215] Waterland RA, Dolinoy DC, Lin JR, Smith CA, Shi X, Tahiliani KG. Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused. *Genesis* 2006;44:401-406.
- [216] Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23:5293-5300.
- [217] Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* 2004;20:63-68.

- [218] Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, Rached MT, Mirza S. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:1373-1379.
- [219] Wells JC. The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2007;82:143-172.
- [220] Westerbacka J, Kolak M, Kiviluoto T, Arkkila P, Siren J, Hamsten A et al. Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes* 2007;56:2759-2765.
- [221] Wilson RD, Johnson JA, Wyatt P, Allen V, Gagnon A, Langlois S et al. Pre-conceptional vitamin/folic acid supplementation 2007: the use of folic acid in combination with a multivitamin supplement for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. *J Obstet Gynaecol Can* 2007;29:1003-1026.
- [222] Woodbury MM, Woodbury MA. Neuropsychiatric development: two case reports about the use of dietary fish oils and/or choline supplementation in children. *J Am Coll Nutr* 1993;12:239-245.
- [223] Wright TM, Fone KC, Langley-Evans SC, Voigt JP. Exposure to maternal consumption of cafeteria diet during the lactation period programmes feeding behaviour in the rat. *Int J Dev Neurosci* 2011;29:785-793.
- [224] Yang HR, Kim HR, Kim MJ, Ko JS, Seo JK. Noninvasive Parameters and hepatic fibrosis scores in children with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012;18:1525-1530.
- [225] Yang YY, Tsai TH, Huang YT, Lee TY, Chan CC, Lee KC et al. Hepatic endothelin-1 and endocannabinoids-dependent effects of hyperleptinemia in nonalcoholic steatohepatitis-cirrhotic rats. *Hepatology* 2012;55:1540-1550.

- [226] Yu HL, Zhang XH, Xiao R, Li L, Xiang L, Feng JF et al. [Effects of genistein and folic acid on neuronal membrane and mitochondrial membrane damaged by beta-amyloid peptides 31-35]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2010;44:607-611.
- [227] Yue X, Yang F, Yang Y, Mu Y, Sun W, Li W et al. Induction of cyclooxygenase-2 expression by hepatitis B virus depends on demethylation-associated recruitment of transcription factors to the promoter. *Virology* 2011;8:118.
- [228] Zhang S, Wang J, Liu Q, Harnish DC. Farnesoid X receptor agonist WAY-362450 attenuates liver inflammation and fibrosis in murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009;51:380-388.
- [229] Zhao J, Goldberg J, Bremner JD, Vaccarino V. Global DNA methylation is associated with insulin resistance: a monozygotic twin study. *Diabetes* 2012;61:542-546.
- [230] Zimmer V, Lammert F. Genetics and epigenetics in the fibrogenic evolution of chronic liver diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:269-280.
- [231] Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:101-117.

VIII. Anexos

