PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
Programa de Doctorado en Ciencias Médicas
Dirección de Investigación y Doctorado
Escuela de Medicina

La Comisión Examinadora, constituida por los Profesores abajo firmantes, aprueba la Defensa Pública de la Tesis Doctoral titulada:

"CONTRIBUCIÓN DE LA PROVISIÓN MATERNA DE VITAMINA E A LA REGULACIÓN DEL BALANCE RÉDOX Y LA PREVENCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO DURANTE EL CIERRE DEL TUBO NEURAL EN RATÓN"

Aprobación Defensa Pública:

SR. ALONSO QUIROZ VALLVERDÚ

Calificándose el trabajo realizado, el manuscrito sometido y la defensa oral, con nota (6,8...) Seis como ocho

Dra. Elvira Balcells
Directora de Investigación
Escuela de Medicina, PUC

Dr. Felipe Heusser
Decano
Facultad de Medicina, PUC

Dra. Dolores Busso
Directora de Tesis
Escuela de Medicina, U. de Los Andes

Dra. Claudia Sáez
Subdirectora de Investigación y Doctorados
Escuela de Medicina, PUC

Dr. Maximiliano Rovegno
Profesor Evaluador Interno
Escuela de Medicina, PUC

Dr. Alejandro Tapia
Profesor Evaluador Externo
Escuela de Medicina, U. de Chile

Dra. Carolina Bizama
Sub-Jefa
Programa Doctorado en Ciencias Médicas
Escuela de Medicina, PUC

Dr. Jorge Carvajal
Jefe
Programa Doctorado en Ciencias Médicas
Escuela de Medicina, PUC

Santiago, 30 de septiembre del 2022

CONTRIBUCIÓN DE LA PROVISIÓN MATERNA DE VITAMINA E A LA REGULACIÓN DEL BALANCE RÉDOX Y LA PREVENCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO DURANTE EL CIERRE DEL TUBO NEURAL EN RATÓN

POR:

ALONSO INGMAR QUIROZ VALLVERDÚ

Realizada en el laboratorio de la Dra. Dolores Busso del Centro de Investigación Biomédica, Escuela de Medicina, Universidad de los Andes.

Tesis presentada a la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Médicas.

Director de Tesis:

Dra. Dolores Busso
2022

Santiago, Chile

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mi tutora la Dra. Dolores Busso, por observar un potencial en mí y motivarme a desarrollarlo. Por transmitirme gran rigurosidad científica, pero no exenta de humildad, empatía y amor hacia el trabajo. Por enseñarme a vivir con optimismo, entender que el humor es esencial en la vida y por su naturaleza profundamente humana.

A mis padres, que me han entregado los valores más importantes que poseo, además de los medios económicos, el apoyo y el cariño sin los cuales enfrentar la adultez habría sido una ardua tarea. Por enseñarme que perseguir los proyectos con pasión y disciplina es lo que los mantiene vivos.

A mis amigos, con quienes he compartido muchas experiencias y quienes me han enseñado otras perspectivas de ver la vida, amenizando el transcurso de esta etapa. Por desviar la productividad de esta tesis y entender la importancia de nunca preguntarme por el estado de avance de ésta.

A mis compañeros de laboratorio, quienes me proporcionaron un ambiente grato de trabajo durante estos años, por participar de la discusión intelectual de esta tesis y por entregarme diariamente la mejor energía. En especial agradezco a Fujiko Saavedra, por su gran sentido de la responsabilidad en el cuidado de la colonia y el mantenimiento del laboratorio, por prestar incansablemente ayuda con paciencia frente a mis olvidos y descuidos.

A los directores del programa del doctorado y al comité evaluador que integró esta tesis, por hacer el esfuerzo de revisar y evaluar este proyecto con dedicación, por sus críticas y comentarios desde un espacio siempre constructivo.

Al Dr. Attilio Rigotti, que nos facilitó el acceso al modelo de ratón deficiente de SR-B1; al Dr. Monty Krieger, por cedernos la colonia de éstos animales; al laboratorio

clínico Barnafi-Krause, por permitirnos el análisis de vitamina E, C y lípidos en muestras animales.

A las fuentes de financiamiento: a ANID, por su apoyo mediante la beca de Doctorado Nacional #21170306, a la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Católica de Chile, por la entrega de la beca de manutención; a la Dirección de Investigación de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile, por su aporte mediante el proyecto de apoyo al desarrollo de tesis de post-grado.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS 6

RESUMEN 8

I. INTRODUCCIÓN.....11

1. Desarrollo en mamíferos.....11

2. Neurulación y defectos en el cierre del tubo neural.....12

3. Relación entre estrés oxidativo y malformaciones congénitas 16

4. Interfases materno-embrionarias durante el desarrollo temprano.....18

5. Lipoproteínas y mecanismos de transporte materno/fetal de lípidos.....21

6. La deficiencia del receptor de HDL SR-B1 como modelo murino de NTD 22

7. Funciones antioxidantes de la vitamina E como mecanismo preventivo de NTD 24

8. Sistema antioxidante endógeno y posible desbalance por deficiencia de vitamina E ...27

9. Producción de ROS en la interfaz materno-embrionaria y posible modulación de la vitamina E sobre este proceso.....29

10. Evidencias en humano y otros animales sugieren una función protectora de la vitamina E sobre ácidos grasos poliinsaturados durante el desarrollo temprano 32

11. NTD, metabolismo y nutrición en humanos.....34

12. Modulación del NTD por la dieta materna en modelos animales.....34

13. Estrés oxidativo materno, biodisponibilidad de vitamina E y NTD 36

14. Preguntas de investigación.....36

CAPÍTULO I – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 38

CAPÍTULO II – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....40

II. METODOLOGÍA.....42

i) Obtención de muestras biológicas e intervenciones dietarias 42

ii) Caracterización de la expresión de GULO y transportadores de vitamina C en embriones y membranas extraembrionarias. 44

iii) Marcadores antioxidantes y de daño oxidativo.....45

iv) Determinaciones de lípidos 49

v) Análisis de genes de metabolismo lipídico y vías de señalización modulados por vitamina E en pYS: 53

vi) Estudio de marcadores del metabolismo de la glucosa 54

vii) Análisis estadístico.....56

III. RESULTADOS.....58

CAPÍTULO I – OBJETIVO 1 58

CAPÍTULO I – OBJETIVO 2 68

CAPÍTULO II – OBJETIVO 1 80

CAPÍTULO II – OBJETIVO 2 98

IV. DISCUSIÓN.....101

CAPÍTULO I.....101

1. La suplementación materna con vitamina E no previene el fenotipo embrionario a través de un efecto directo en el embrión. 101

2. El embrión y las membranas extraembrionarias expresan transportadores de vitamina C 101

3. ¿Es la vitamina E necesaria durante el cierre del tubo neural debido a sus propiedades antioxidantes? 103

4. Posible rol antioxidante de la vitamina E en las membranas extraembrionarias.....107

5. La deficiencia de vitamina E en embriones SR-B1 KO se asocia a cambios en el contenido de PUFAs en el embrión 108

6. La deficiencia embrionaria de vitamina E promovería la formación de gotas lipídicas para proteger a los PUFAs de la oxidación y/o la inflamación 112

7. Las alteraciones lipídicas en embriones SR-B1 KO no se explicarían por cambios en la expresión génica 114

8. La vitamina E sería importante para la neurulación manteniendo la homoeostasis de lípidos 114

CAPÍTULO II 117

1. La vitamina E protege contra las alteraciones del metabolismo materno inducidas por la dieta HFHS 117

2. Biodisponibilidad de la vitamina E en hembras SR-B1 heterocigotas alimentadas con dieta HFHS 119

3. Retardo en el desarrollo y NTD: fenotipos interconectados.....120

4. El saco vitelino: un tejido susceptible a los insultos metabólicos 123

5. La vitamina E protege contra las malformaciones embrionarias inducidas por la dieta HFHS 126

6. Los NTD en embriones SR-B1 KO no se previenen con una dieta con propiedades antioxidantes 128

V. CONCLUSIONES 128

VI. BIBLIOGRAFÍA 133

VII. ANEXO 153

ABREVIATURAS

ALA: "α-linonelic acid", ácido α-linolénico

ARA: "Arachidonic acid", ácido araquidónico

CE: Colesterol éster.

DAG: Diacilglicerol.

DHA: "Docosahexaenoic acid", ácido docosahexaenoico.

EPA: "Eicosapentaenoic acid", ácido eicosapentaenoico.

HFHS: "High Fat/High Sugar", alta en grasas y azúcares.

LA: "Linoleic acid", ácido linoleico

LC-PUFAs: "Long chain polyunsaturated fatty acids", ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

LPC: "Lysophosphatidylcholine", lisofosfatidilcolina.

LPE: "Lysophosphatidylethanolamine", lisofosfatidiletanolamina,

LysoP: "Lysophospholipid", lisofosfolípido.

MUFAs: "Monounsaturated fatty acids", ácidos grasos monoinsaturados.

NAFLD: "Non-alcoholic fatty liver disease", enfermedad del hígado graso no alcohólico.

NASH: "Non-Alcoholic SteatoHepatitis", esteatohepatitis no alcohólica.

NOX: NADPH oxidasa.

NTD: "Neural Tube Defects", defectos en el cierre del tubo neural.

OA: "Oleic acid", ácido oleico.

PA: "Palmitic acid", ácido palmítico.

PC: "Phosphatidylcholine", fosfatidilcolina.

PE: “Phosphatidylethanolamine”, fosfatidiletanolamina,

PEMT: “Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase”, PE N-metiltransferasa.

PL: “Phospholipid”, fosfolípido.

POA: “Palmitoleic acid”, ácido palmitoleico.

PUFAs: “Polyunsaturated fatty acids”, ácidos grasos poliinsaturados.

pYS: “Parietal Yolk Sac”, saco vitelino parietal.

ROS: “Reactive Oxygen Species”, especies reactivas de oxígeno

SA: “Stearic acid”, ácido esteárico.

SAM: S-adenosil metionina.

SC-PUFAs: “Short chain polyunsaturated fatty acids”, ácidos grasos poliinsaturados de cadena corta.

SR-B1: “Scavenger Receptor Class B Type 1”.

TAG: Triacilglicerol.

TS: “Theiler Stage”, estadío de Theiler.

TBARS: “Thiobarbituric Reactive Species”, especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.

TGCs: “Trofoblasts giant cells”, células de trofoblastos gigantes.

VE: Vitamina E.

vYS: “Parietal Yolk Sac”, saco vitelino visceral.

RESUMEN

Los defectos en el cierre del tubo neural (NTD) corresponden a un grupo de malformaciones congénitas del tubo neural, estructura formada durante el desarrollo embrionario temprano que da origen al cerebro y la médula espinal. Entre los factores no genéticos involucrados en la etiología del NTD se encuentran alteraciones metabólicas de la madre y el consumo inadecuado de algunos micronutrientes, como el folato o vitamina B9. En humanos, la obesidad materna y la diabetes han sido reconocidas como factores de riesgo de NTD y se ha propuesto que el estrés oxidativo asociado a estas condiciones interfiere con el cierre del tubo neural. En los últimos años, nuestro laboratorio reportó que cerca del 30-50% de los embriones deficientes para la proteína Scavenger Receptor Class B Type I (SR-B1 KO), el principal receptor de lipoproteínas de alta densidad (HDL), presentan NTD anterior que progresa a anencefalia. Durante el desarrollo temprano, SR-B1 es expresado en tejidos extraembrionarios, específicamente en los trofoblastos gigantes que componen el saco vitelino parietal (pYS). Los embriones SR-B1 KO presentan mayores niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y contienen menos vitamina E que los embriones SR-B1 silvestres o *wild type* (WT), sugiriendo que SR-B1 participa en la provisión materna de la vitamina E al embrión. La suplementación materna con α-tocoferol, principal isómero de la vitamina E, previene completamente la incidencia de NTD y normaliza los niveles de ROS en los embriones SR-B1 KO, sugiriendo que el daño oxidativo pudiera contribuir a la etiología de los NTD en este modelo. El α-tocoferol es un antioxidante liposoluble que, coordinadamente con el sistema antioxidante endógeno, detiene la reacción en cadena de la peroxidación lipídica, protegiendo a los lípidos del daño oxidativo. En especial, esta vitamina preservaría los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), lípidos esenciales para el desarrollo embrionario. En la primera parte de esta tesis, evaluamos el status oxidativo en embriones WT, SR-B1 KO normales y SR-B1 KO con NTD mediante la determinación de los niveles de algunas moléculas antioxidantes endógenas y de un marcador de lipoperoxidación. Adicionalmente, caracterizamos las abundancias relativas de PUFAs en fosfolípidos y

otros lípidos en los respectivos grupos embrionarios usando la tecnología de *shotgun lipidomics*. Los resultados obtenidos no mostraron una alteración del sistema antioxidante endogéno en los embriones SR-B1 KO, pero sí un aumento de la lipoperoxidación. Ni los niveles de vitamina E embrionaria ni la peroxidación lipídica se previnieron al suplementar a las madres con una dieta enriquecida con vitamina E. En conjunto, estos resultados sugieren que el mecanismo de acción de la vitamina E en la prevención de los NTD en embriones SR-B1 KO estaría mediado por un efecto no sobre el embrión mismo, sino indirecto y mediado por el pYS. Sin embargo, el análisis mediante WB de vías de señalización asociadas a la producción de ROS extracelular en el pYS no mostró diferencias entre tejidos de preñeces con o sin la intervención con vitamina E. Si bien el rol de dicho tejido embrionario en la prevención de NTD mediada por vitamina E no pudo ser demostrado, es posible que otras vías o procesos indirectos, no analizados en esta tesis, expliquen dicho efecto. A través del análisis de lipidómica observamos que la deficiencia de SR-B1 se asoció a niveles disminuidos de PUFAs de cadena larga (LC-PUFAs), así como de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) en determinados fosfolípidos y niveles aumentados de lisofosfatidilcolina (LPC), lo cual sugiere la hidrólisis aumentada de lípidos de membrana. Un resultado inesperado de este estudio fue que los embriones SR-B1 KO con NTD exhibieron acumulación de triglicéridos (TG), lo que indicaría movilización de ácidos grasos desde la membrana a gotas lipídicas. Este mecanismo adaptativo se ha observado previamente en células gliales y cancerígenas para proteger a los lípidos de la oxidación y/o la inflamación. Teniendo en cuenta que la obesidad generalmente cursa con un mayor estado oxidativo en humanos y animales, en la segunda parte de esta tesis hipotetizamos que el consumo de una dieta rica en grasas y azúcares ("high fat/high sugar", HFHS) en ratonas SR-B1 heterocigotas reduciría la provisión embrionaria de vitamina E y aumentaría la incidencia de NTD debido a un aumento en los requerimientos antioxidantes maternos. Tal como esperábamos, la dieta HFHS indujo una alteración en el metabolismo materno de la glucosa y los lípidos, y aumentó la incidencia de NTD en los embriones KO y heterocigotos, y también se asoció a la ocurrencia de NTD en embriones WT. Además, la alimentación de las ratonas con

esta dieta provocó retardo del desarrollo de los embriones, de manera independiente del genotipo de SR-B1. Los efectos teratogénicos de la dieta no fueron mediados por una reducción en los niveles de la vitamina E en plasma materno ni tampoco observamos un aumento en el daño oxidativo en madres o embriones de gestaciones del grupo HFHS. Interesantemente, mientras que las hembras alimentadas con la dieta HFHS presentaron intolerancia a la glucosa, mayores niveles de péptido C plasmático, hipercolesterolemia y acumulación de colesterol en hígado y pYS, la suplementación con vitamina E en ratonas del grupo HFHS previno la incidencia de NTD y el retardo del desarrollo, y corrigió todas las anormalidades metabólicas maternas mencionadas. Estos resultados sugieren que la vitamina E podría ejercer un efecto protector sobre el metabolismo materno, con potenciales ventajas sobre el embrión. En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la vitamina podría prevenir los NTD a través de los siguientes mecanismos: I) manteniendo los niveles adecuados de PUFAs en fosfolípidos en el embrión en desarrollo, posiblemente mediante mecanismos no-antioxidantes, y II) en hembras consumiendo una dieta obesogénica, previniendo las perturbaciones metabólicas maternas en glúcidos y lípidos. Estos resultados confirman que la vitamina E y los PUFAs son moléculas relevantes para el cierre del tubo neural. Por lo tanto, la adecuación de la ingesta de estos lípidos podría servir como estrategia para prevenir los NTD, especialmente en condiciones como la obesidad, diabetes o dislipidemias.

I. INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo en mamíferos

El desarrollo temprano comienza con el proceso de fecundación, en que los gametos se fusionan para formar un cigoto. A través de sucesivos clivajes, el cigoto forma una blástula, una capa esféricas de células (el blastodermo) que envuelve una cavidad llena de fluido (el blastocele). En mamíferos, la blástula sufre una serie de reordenamientos para originar el blastocisto: una estructura compuesta de una capa externa, denominada trofoectodermo, y una capa interna, denominada macizo celular interno. El macizo celular interno también se conoce como embrioblasto, estructura que dará origen al embrión y a determinados tejidos extraembrionarios mientras que el trofoectodermo formará el corion, la porción de origen embrionario de la placenta. Durante la implantación (E5,5 en humanos y E4,5 en ratón), los trofoblastos expresan receptores que interactúan con el endometrio, y secretan enzimas que digieren la matriz extracelular permitiendo al blastocisto implantarse [1].

La primera segregación celular dentro del macizo celular interno resulta en la formación del hipoblasto o endoderma primitivo. Las células del hipoblasto se separan del macizo celular interno y se disponen en contacto con el blastocele, dando origen al endoderma extraembrionario, que formará el saco vitelino. Las células restantes del macizo celular pasan a formar el epiblasto, del cual se deriva el embrión y la cavidad amniótica. En esta etapa, por plegamientos que ocurren en las células del epiblasto, surge la línea primitiva, una banda lineal de células cuya formación marca el inicio de la gastrulación (E17 en humanos y E6 en ratón). La línea primitiva se elonga y su punta distal forma un nodo (nodo primitivo) que constituye un organizador en humanos y roedores. Las células del epiblasto que migran a través del nodo se convierten más tarde en tejidos axiales mientras que las que migran del lado rostral de la línea primitiva (caudal al nodo primitivo) dan origen al mesodermo y al endodermo. De esta forma, la gastrulación reorganiza al embrión de dos capas en un embrión de tres capas, y además

establece el plano corporal de anterior a posterior y de ventral a dorsal por medio de la línea primitiva, estableciéndose así la simetría bilateral del organismo.

La organogénesis es la fase del desarrollo que comienza cuando termina la gastrulación, teniendo lugar entre los días E8,5 y E14 en el ratón, y durante el primer trimestre en humanos. Durante la organogénesis, las tres capas embrionarias formadas durante la gastrulación forman los órganos internos del organismo. La organogénesis involucra la coordinación de múltiples procesos tales como la inducción embrionaria, formación de patrones, morfogénesis, proliferación y diferenciación. Cuando la coordinación de estos procesos falla debido a factores genéticos o ambientales, ocurren malformaciones congénitas o incluso la muerte embrionaria. Las malformaciones más leves en los órganos pueden llevar a la reprogramación fetal y aumentar el riesgo de enfermedades en la descendencia en la etapa adulta.

Finalmente, la última etapa del desarrollo prenatal es la de crecimiento fetal. Esta etapa comienza en el ratón en el día E14,5 y en humanos al término del primer trimestre. Todos los primordios se encuentran formados en el feto, que continúan creciendo y desarrollándose. Durante esta etapa el feto humano crece linealmente hasta la semana 37 de la gestación[2]. Una tasa anormalmente lenta o rápida resultará en alteraciones del crecimiento fetal como la restricción del crecimiento o la macrosomía, respectivamente. Estas condiciones se asocian a mayor incidencia de muerte perinatal y de enfermedades en la etapa adulta [3–6]. Existe también evidencia que indicaría que el desarrollo cognitivo, incluyendo la adquisición del lenguaje, comenzaría en la etapa fetal [7].

2. Neurulación y defectos en el cierre del tubo neural

La formación del tubo neural, la estructura embrionaria que más tarde da origen al cerebro y la médula, es el primer evento de la organogénesis y es un proceso morfogenéticamente complejo que requiere la coordinación de distintos eventos celulares y moleculares, regulados por más de 300 genes en mamíferos [8].

El precursor embrionario del tubo neural es la placa neural o neuroepitelio, una región engrosada del ectodermo en la superficie dorsal del embrión temprano. En vertebrados superiores, la placa neural es convertida en un tubo a través de un proceso en dos etapas sucesivas. Durante la neurulación primaria, el ectodermo neural se pliega en dos puntos, el medial y el dorsolateral. Las elevaciones se producen gracias a la constricción del poco apical de las células del ectodermo no neural[9]. Finalmente, los extremos de las elevaciones se fusionan para formar el tubo neural (**Figura 1**). Este proceso es mediado por morfógenos secretados por la notocorda y el ectodermo no neural. El tubo neural en la región posterior -caudal a la región sacra media- se forma por el proceso de la neurulación secundaria. Este proceso sigue un mecanismo distinto que la neurulación primaria, ya que en lugar de una fusión de los pliegues neurales, lo que ocurre es una condensación de las células mesenquimales, formándose un cordón medular que luego se ahueca[9].

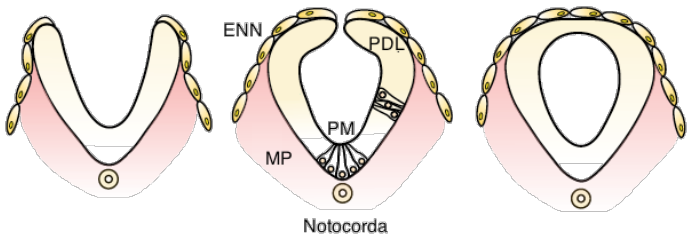


Figura 1. Esquema de la neurulación primaria. Representación esquemática de la neurulación primaria. Las elevaciones neurales (imagen izquierda) se pliegan (imagen intermedia) y se fusionan (imagen derecha). ENN: ectoderma no neural, MP: mesoderma paraxial, PM: pliegue medial, PDL: pliegue dorsolateral.

En mamíferos y aves, la neurulación primaria se inicia en puntos específicos a lo largo del eje rostro caudal, tratándose de un proceso discontinuo. En el ratón, existen tres puntos de cierre 1) en el límite del mesencéfalo con la región cervical, 2) en la región craneal, en el límite del prosencéfalo/mesencéfalo y 3) en el término rostral[9] (**Figura 2**).

En humanos, el punto de cierre 2 se encuentra ausente[10]. En ratones, la neurulación primaria se completa cerca del día E9,5, mientras que la secundaria termina el día E10,5. En humanos, el cierre del tubo neural se completa entre la tercera y cuarta semana desde la concepción.

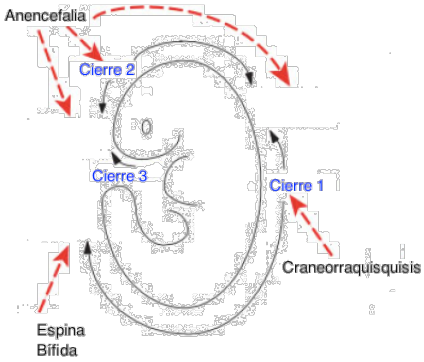


Figura 2. Diagrama indicando lugares de cierre del tubo neural en ratones y malformaciones cuando estos procesos no ocurren correctamente. El cierre del tubo neural en el ratón se inicia con el cierre 1 en el límite mesencéfalo/cervical y se extiende caudal y rostralmente (líneas negras). Una falla en el cierre desde el sitio 1 resulta en cranioraquisquisis. Un segundo sitio de cierre se produce en el límite prosencéfalo/mesencéfalo, el cual se encuentra ausente en humanos. El cierre también se inicia en un tercer punto, en el límite rostral del prosencéfalo. La progresión de la neurulación desde los sitios de inicio resulta en una fusión y acortamiento del tubo neural, indicado por las flechas negras. Una falla en la neurulación en los sitios de cierre 2 y 3 origina la anencefalia. La espina bífida resulta por una falla en la neurulación secundaria, en la región posterior del tubo neural (adaptado de Greene y Copp, 2010 [11]).

Los defectos en el cierre del tubo neural (o NTD, por las siglas del inglés "neural tube defects") constituyen un grupo de malformaciones congénitas producidas por un cierre incorrecto del tubo neural. En humanos, los NTD tienen una prevalencia que varía desde un 0,5 a más de 10 por cada 1.000 embarazos, encontrándose entre los defectos de nacimiento más frecuentes junto con las anomalías cardíacas congénitas[12]. Existen distintos tipos de NTD, dependiendo de la región del eje rostro-caudal en que se interrumpe la neurulación. En humanos, la interrupción del cierre del tubo en la región craneal resulta en una condición en que los pliegues neurales permanecen abiertos y el neuroepitelio forma una protrusión que crece expuesta al líquido amniótico y más tarde

degenera, un fenotipo conocido como anencefalia. La bóveda craneal no se forma sobre la región abierta y se produce un feto que carece de encéfalo, lo que resulta incompatible con la vida. Por otra parte, una falla en la neurulación a nivel espinal puede resultar en una condición conocida como espina bífida o meningocele, que puede ser intervenido quirúrgicamente. Adicionalmente a las lesiones aisladas del tubo a nivel craneal o espinal, los NTD también comprenden un defecto más severo denominado craneoraquisquisis, en que todo el tubo neural desde el mesencéfalo hasta la espina baja permanecen abiertas [9,12].

Las causas que subyacen a los NTD han sido extensamente abordadas por Green y Copp[12]. Dada la inaccesibilidad de analizar el embrión humano durante el estadío de la neurulación, el conocimiento adquirido proviene principalmente de estudiar modelos experimentales animales. En roedores, la inactivación de genes relacionados con distintos procesos biológicos en células neuroepiteliales o del tejido adyacente induce NTD. Entre las funciones en las que participan estos genes se encuentran la formación de microfilamentos de actina, el mantenimiento de la planaridad polar celular (PCP), un proceso que permite la extensión convergente del tubo neural, el balance entre la proliferación y la apoptosis, entre otros. En humanos, casi todos los estudios de NTD se han enfocado en la búsqueda de genes candidatos ortólogos de genes cuya mutación causan NTD en roedores, con resultados poco alentadores probablemente debido al patrón de herencia poligénico, con una heterogeneidad considerable [9, 13, 13].

Además de los factores genéticos, la exposición a agentes teratógenos como el ácido valproico[15] y la fumonisina[16] también inducen NTD en roedores y humanos. Finalmente, existen factores maternos que aumentan la susceptibilidad a desarrollar NTD, como la obesidad y la diabetes[17]. La relación entre el bajo nivel socioeconómico materno y una mayor incidencia de NTD llevó a los investigadores a evaluar posibles factores nutricionales que modularan el riesgo de estas malformaciones. La detección de niveles deficientes de folato (vitamina B9) en mujeres que cursaban embarazos con NTD[18] fueron la base de estudios randomizados posteriores que demostraron que la suplementación con ácido fólico, la forma sintética del folato, reducía significativamente

la incidencia de NTD[19]. Desde esos estudios a la fecha, el folato sigue siendo un nutriente clave para la prevención de los NTD. Además del folato, se ha reportado que bajos niveles de otros nutrientes como la vitamina B12, la riboflavina y la vitamina C también se asocian a mayor riesgo de NTD [20, 18] y que una mayor ingesta de distintas vitaminas o un patrón dietario saludable en mujeres se asocian a menor riesgo de NTD, lo que sugiere que otros nutrientes además del folato serían beneficiosos para la prevención de estos defectos [21,22].

Aunque la incidencia de NTD ha sido reducida por el consumo de ácido fólico, esta malformación todavía persiste, por lo que es necesario idear nuevas estrategias adicionales en la prevención de estas malformaciones. En esta tesis, como profundizaremos más adelante, estudiamos si la vitamina E es un nutriente que vale la pena considerar en el contexto de la prevención del NTD. Propusimos que I) su provisión al embrión es requerida para prevenir el daño oxidativo en lípidos y II) que condiciones de la madre que influencian negativamente los niveles de vitamina E, perjudicarían el cierre del tubo neural en el embrión.

3. Relación entre estrés oxidativo y malformaciones congénitas

Estudios experimentales en modelos animales han demostrado que alteraciones en el status oxidativo en la madre o el embrión pueden aumentar el riesgo de algunos defectos del desarrollo embrionario. Sin embargo, los mecanismos que explican la relación entre alteraciones en el status oxidativo materno y malformaciones congénitas, en especial aquellas del sistema nervioso, no están del todo claros y requieren de más investigación. En embriones murinos con deficiencias inducidas en genes que codifican para enzimas clave para la actividad antioxidante endógena celular, se observan malformaciones severas y letalidad embrionaria. Por ejemplo, los embriones de ratón deficientes en la enzima ácido lipoico sintasa, que no producen ácido lipoico, un poderoso antioxidante liposoluble, exhiben retardo del desarrollo y completa falta de organización en el estadío E7,5 y muerte en el estadío E9,5[23]. Otro ejemplo corresponde a los embriones *knock-out*

(KO) para la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD KO) que protege al embrión del estrés oxidativo endógeno o iniciado por xenobióticos, los cuales presentan estrés oxidativo elevado, y mayores tasas de defectos en el desarrollo y muerte in útero que los embriones *wild-type* (WT)[24]. El efecto adverso del estrés oxidativo también se he reportado en modelos no mamíferos. Por ejemplo, durante el desarrollo de pollos se observan efectos tóxicos de componentes bacterianos como los lipopolisacáridos (LPS) debidos a un mayor daño oxidativo, que se traducen en displasia pulmonar, la cual es prevenida al agregar vitamina C al medio de cultivo[25].

El cerebro, en particular en etapas tempranas de su diferenciación -embrionaria y fetal- es un tejido especialmente susceptible al daño oxidativo debido a que sus membranas se encuentran enriquecidas en ácidos grasos altamente oxidables dadas sus cadenas poliinsaturadas, como se discutirá más adelante[26]. En concordancia con esto, se han observado altos niveles de marcadores de oxidación en el líquido amniótico de mujeres embarazadas con malformaciones fetales congénitas del sistema nervioso central[27]. En el caso particular del NTD, su relación con las especies reactivas del oxígeno (ROS) se ha sugerido en distintos modelos murinos en que se observa una incidencia elevada de esta malformación asociada a aumentos de estrés oxidativo dados por condiciones como diabetes[28], consumo de alcohol[29] , deficiencia de tioredoxina 2[30] o exposición a benzopireno[31].

Creciente evidencia sugiere que el estrés oxidativo podría ser un agente causal de NTD al estimular la apoptosis, lo que podría llevar a un número insuficiente de células a participar en el pliegue neural y la fusión de las crestas en el tubo neural [31,32]. También se ha propuesta que las ROS pueden inducir cambios en la expresión génica, posiblemente a través del daño oxidativo provocado en el DNA y las proteínas, tal como ocurre con el gen Paired Box 3 (Pax3). Este gen juega un papel importante en el desarrollo del neuroepitelio, ya que su ausencia produce NTD con penetrancia completa en el modelo murino conocido como Splotch[33,34]. En ratones, se observa una inhibición en la expresión de Pax3 embrionario en condiciones de diabetes materna por exposición a agentes inductores de estrés oxidativo o deficiencia de vitamina E que se asocia a un aumento en

la incidencia de NTD; esta incidencia se reduce al administrar a las madres vitamina E u otro antioxidante (ej. GSH-etil éster) durante el desarrollo[35,36,37.]

Para entender cómo el embrión se provee de antioxidantes esenciales para el desarrollo o cómo agentes inductores de daño oxidativo llegan al embrión durante el inicio de la organogénesis, es necesario entender los mecanismos responsables de la nutrición embrionaria temprana que ocurren antes de que la placenta haya establecido una circulación funcional.

4. Interfases materno-embrionarias durante el desarrollo temprano

En mamíferos, el cierre del tubo neural ocurre antes de la formación de una placenta funcional. Los tejidos que componen la interfase materno-fetal en esta etapa del desarrollo están compuestos de trofoblastos derivados del trofoectodermo y membranas extraembrionarias que derivan del macizo celular interno. Estos tejidos son: I) el amnios, que rodea al embrión y contiene el líquido amniótico, un fluido protector, II) el saco vitelino, que en humanos sólo cumple una función de nutrición primaria durante el desarrollo temprano, III) el alantoides, que se asocia con la remoción de los deshechos embrionarios y IV) el mesodermo extraembrionario, involucrado en el desarrollo de la sangre fetal.

En contraste con aves y reptiles, el saco vitelino en mamíferos es pequeño y desprovisto de vitelo. En todas las especies de mamíferos, la nutrición del concepto en etapas tempranas, antes de la formación de la placenta, es histiotrófica. Durante este proceso, las células del trofectodermo fagocitan las secreciones oviductales y de las glándulas uterinas. Más tarde durante el desarrollo, el establecimiento de una placenta corioalantoidea marcará la transición a una nutrición hemotrófica, con intercambios de nutrientes entre la circulación maternal y fetal.

En humanos, el saco vitelino se forma en la segunda semana del embarazo como una semiesfera que permanece unida a la pared dorsal del intestino primitivo (**Figura 3**). La función del saco vitelino en la nutrición embrionaria humana es vestigial, aunque cumple

una función importante en la endocitosis de vitaminas liposolubles en etapas tempranas en esa especie[38]. Mientras que el embrión humano crece y se curva en el eje anteroposterior, el saco vitelino se estrecha paulatinamente y su conexión con el intestino se atenúa hasta que finalmente se incorpora al cordón umbilical, degenerando más tarde en el embarazo.

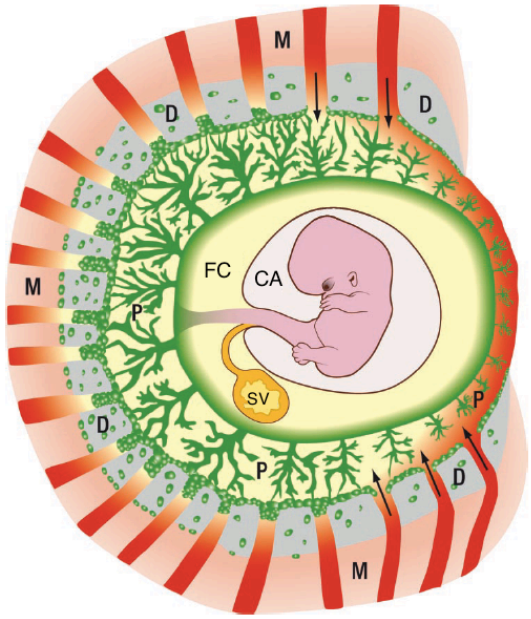


Figura 3. Sitio de implantación temprano humano. Diagrama de un sitio de implantación al término del segundo mes (semana 8-9) mostrando el miometro (M), la decidua (D), la placenta temprana en formación (P), el fluído celómico (FC), la cavidad amniótica (CA) y el saco vitelino (SV). Las flechas muestran la circulación utero-placental que comienzan a formarse en la periferia de la placenta (adaptado de Jauniaux et. al, 2004[38]).

En roedores, en cambio, el saco vitelino se forma en el día E6,5 y, debido a una rotación embrionaria que ocurre en el día E8 del desarrollo, el embrión queda completamente contenido dentro de esta membrana (**Figura 4**). Interesantemente, el saco vitelino en roedores presenta por tanto una orientación invertida respecto al humano y se mantiene activo durante toda la preñez. Está compuesto de dos membranas extraembrionarias, cada una de ellas conformada por dos capas celulares. En contacto con el ambiente materno se encuentran los trofoblastos gigantes (TGC, por sus siglas en inglés), las primeras células

en diferenciarse durante la embriogénesis y que son de vital importancia para la implantación y la placentación. Se derivan del trofoectodermo, tienen naturaleza endocrina y se caracterizan por un citoplasma extremadamente grande y núcleos poliploides que resultan de la endoreduplicación[39]. En contacto con los TGC se encuentra la membrana de Reichert, una membrana basal gruesa y densa que protege al embrión de las presiones intrauterinas[40]. Los componentes de la membrana de Reichert son sintetizados y secretados por las células del endodermo parietal[41]. En conjunto, los TGC y el endodermo parietal forman el saco vitelino parietal (pYS siglas del inglés "parietal yolk sac"). Del lado embrionario se encuentra el endodermo visceral, un epitelio simple cúbico encargado de endocitar distintos nutrientes. El lado basal del epitelio se encuentra en contacto con una capa de mesodermo extraembrionario, tejido en donde ocurre la primera hematopoyesis embrionaria. En conjunto, estas capas componen el saco vitelino visceral (vYS, siglas del inglés "visceral yolk sac").

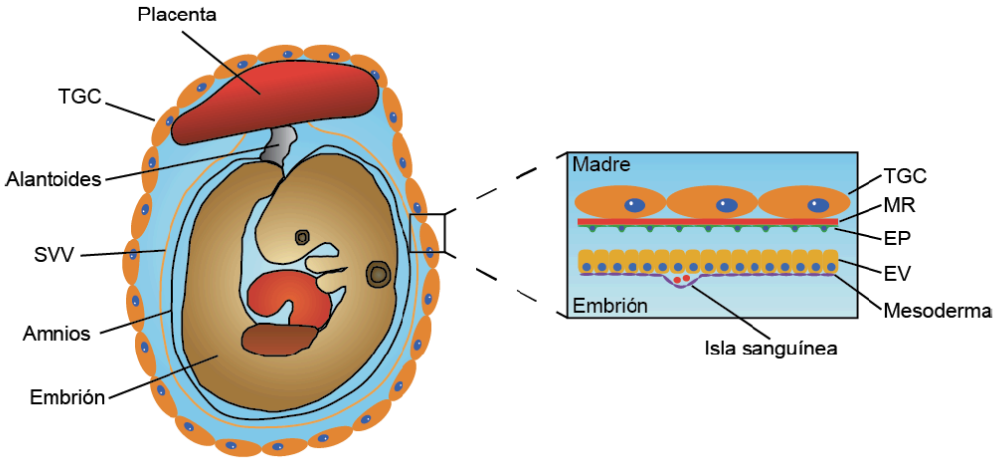


Figura 4. Membranas extraembrionarias del sitio de implantación murino temprano. Embrión en día E9,5 envuelto en el amnios, rodeado por el saco vitelino visceral y el saco vitelino parietal. El recuadro muestra en detalle las capas celulares que componen el saco vitelino. MR: membrana de Reichert. EP: endoderma parietal. EV: endoderma visceral. Agradecimientos a Nicolás Santander por el diseño de la figura (Santander et al, 2013[42]).

La nutrición histiotrófica es similar entre humanos y roedores, pero existen ciertas diferencias principalmente debido a las características estructurales del saco vitelino de

cada especie. En humanos, las células del sinciciotrofoblasto de la placenta en formación fagocitan las secreciones de las glándulas uterinas en el espacio intervelloso, efluyendo estos compuestos al fluido celómico, donde son captados por el saco vitelino que se encuentra conectado a la circulación fetal. En roedores, los trofoblastos gigantes fagocitan los nutrientes de las glándulas y los transfieren a la cavidad del saco vitelino, donde son endocitados por el endodermo visceral y luego transferidos a la circulación fetal. Entre los nutrientes captados de las glándulas se encuentran proteínas, carbohidratos y metabolitos sintetizados localmente por las células de las glándulas. Adicionalmente, muchas proteínas presentes en el fluido celómico tienen relación con el transporte y metabolismo de lípidos[43]. El saco vitelino facilita el transporte de los lípidos maternos a los compartimientos embrionarios antes de que la vascularización de las vellosidades placentarias se establezca y este proceso sería crítico para asegurar un correcto desarrollo embrionario, ya que distintas malformaciones en el sistema nervioso central han sido descritas en modelos murinos mutantes para receptores de lipoproteínas (CUBN, AMN y Megalina) y apolipoproteínas (apoB)[44–47].

5. Lipoproteínas y mecanismos de transporte materno/fetal de lípidos

Los lípidos son moléculas hidrofóbicas y por tanto deben ser transportados en la circulación asociados a complejos macromoleculares denominados lipoproteínas. La estructura de una lipoproteína consta de un centro hidrofóbico de triglicéridos y ésteres de colesterol, envuelto por una monocapa anfipática de colesterol no esterificado, fosfolípidos y apolipoproteínas. Estas proteínas les confieren a las lipoproteínas la capacidad de interactuar con receptores celulares específicos, y mediar la captación de la partícula o su contenido, según el caso. Las lipoproteínas plasmáticas pueden ser clasificadas según su densidad, composición lipídica y apolipoproteínas en cuatro categorías principales: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL)[48]. Además de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos, las lipoproteínas transportan diversas moléculas: enzimas antioxidantes

como la paraoxonasa 1, microRNAs, lípidos de señalización como esfingosina 1-fosfato y vitaminas como la E y la D [49–52].

Distintos estudios sugieren que durante el desarrollo postimplantacional temprano el embrión sería capaz de captar el contenido de las lipoproteínas debido a que las membranas extraembrionarias expresan distintos receptores para estas macromoléculas. En el ratón, distintos receptores endocíticos de HDL o LDL (AMN, CUBN, Megalina y LRP2), se localizan en la membrana apical del endoderma visceral[53–55]. Por otra parte, los trofoblastos humanos extravellosos de primer trimestre también expresan distintos receptores de lipoproteínas (LRP1, LRP2, ApoER2, LDLR, VLDLR)[56]. La expresión de estas proteínas ha sido menos explorada en el saco vitelino parietal murino. En una publicación anterior, nuestro grupo demostró a través de un análisis bioinformático de una base de datos de transcriptómica previamente generada de saco vitelino parietal murino que este tejido expresa distintas proteínas involucradas en la captación y metabolismo de las lipoproteínas[37]. A nivel de proteína, el receptor Scavenger Class B Type I (SR-B1), principal receptor de las HDL, es el único receptor cuya presencia ha sido descrita en los trofoblastos gigantes[42,57].

6. La deficiencia del receptor de HDL SR-B1 como modelo murino de NTD

En los últimos años, estudios de nuestro laboratorio han demostrado que el receptor SR-B1 en los trofoblastos gigantes participa en el intercambio materno-embrionario de lípidos durante el cierre del tubo neural murino[42,58,37]. Aproximadamente el 50% de los embriones deficientes en SR-B1 (SR-B1 KO) gestados a partir de cruzas de progenitores heterocigotos presentan NTD a nivel cefálico, mientras que solo un porcentaje bajo de embriones heterocigotos y ningún WT presentan esta malformación[42]. En ratones, la formación defectuosa del tubo neural cefálico provoca la formación del cerebro en ausencia de una calota craneana, una condición conocida excencefalia. El tejido nervioso expuesto es destruido al pasar por el canal vaginal durante el parto, lo que se traduce en

los ratones recién nacidos en un fenotipo similar al observado en la anencefalia en humanos[42].

Tradicionalmente, SR-B1 ha sido estudiado principalmente por su rol en la captación de colesterol en HDL en el hepatocito, durante la excreción hepática de este lípido, y en células esteroidogénicas, que usan el colesterol como sustrato para la síntesis de esteroides[59]. Teniendo en cuenta esta función conocida de SR-B1, la relevancia del colesterol para el desarrollo embrionario[60] y que las células del pYS participan en la captación de nutrientes desde el plasma materno[61], estudios previos de nuestro laboratorio evaluaron la posible participación de este receptor en el transporte materno-fetal del colesterol. Sin embargo, no se observó que los embriones SR-B1 KO tuviesen una deficiencia de colesterol evidente en el día E9,5[41], sugiriendo que la principal función de SR-B1 en los TGC no estaría asociada al transporte de este lípido.

Además de transportar colesterol, en diversos tejidos SR-B1 participa en la captación de vitamina E desde las HDL circulantes[62,63]. La vitamina E fue descubierta en 1922 por Evans y Bishop como un factor de la dieta necesario para la reproducción en ratas[64]. Estudios posteriores mostraron que la grasa rancia presente en las dietas experimentales dadas a ratas y pollos era la causante de distintas patologías –entre ellas el NTD- y que estas podían ser prevenidas por concentrados de aceite de germen de trigo que luego se demostró eran ricos en vitamina E[65]. Nuestro grupo reportó recientemente que, además de la incidencia elevada de NTD (1:2), los embriones SR-B1 KO tienen niveles muy bajos de vitamina E en comparación con embriones SR-B1 WT, sugiriendo que SR-B1 podría participar del transporte de vitamina E a través del pYS al embrión[37]. Interesantemente, al alimentar a ratonas SR-B1 heterocigotas preñadas con una dieta fortificada con vitamina E se previene completamente el NTD en los embriones SR-B1 KO, sugiriendo que frente a la ausencia de SR-B1, otros receptores lipoproteicos en la interfaz materno-embrionaria pudieran contribuir a la provisión embrionaria de vitamina E.

Este estudio de suplementación materna usando dieta enriquecida con vitamina E mostró un resultado inesperado: pese al efecto del 100% en la prevención de los NTD, no se observó un aumento en los niveles embrionarios de vitamina E en los embriones SR-

B1 KO (**Figura 5**)[37]. Por otra parte, la suplementación de la dieta materna con vitamina E provocó una acumulación de α-tocoferol en el pYS de los embriones SR-B1 KO. Una posible interpretación de estos resultados es que exista una diferencia en el contenido de α-tocoferol entre los embriones SR-B1 KO obtenidos de madres con dieta control vs. suplementada con vitamina E, pero que no pudo ser detectada ya que en ambos grupos el contenido de α-tocoferol se encontró bajo el límite de detección de la técnica analítica. Como segunda posibilidad, la vitamina E transportada por mecanismos independientes de SR-B1 podría ser oxidada o metabolizada rápidamente al llegar al embrión o antes/durante su transporte, siendo indetectable por la metodología empleada. Alternativamente, podría existir un efecto indirecto sobre el embrión causado por la acumulación de vitamina E en los TGC en madres alimentadas con la dieta rica en vitamina E.

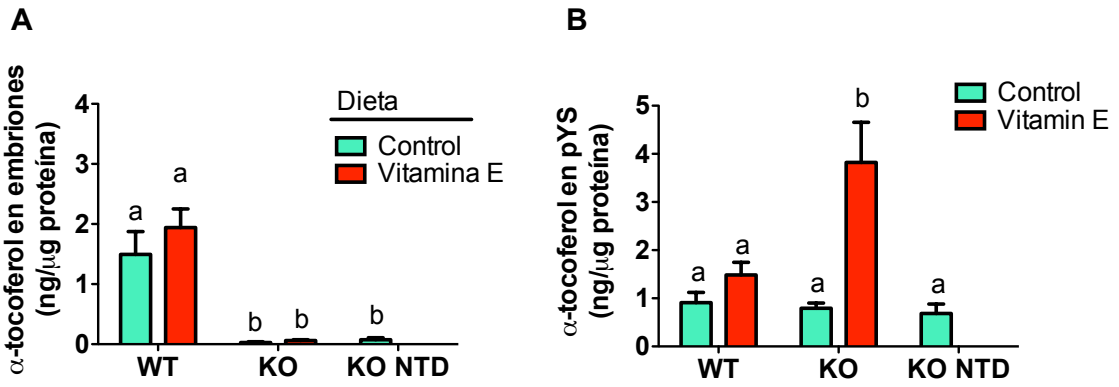


Figura 5. Contenido de α-tocoferol en embriones (a) y saco vitelino parietal (b) obtenidos de hembras SR-B1 heterocigotas alimentadas con dieta control o suplementada con vitamina E. Los niveles de vitamina E fueron medidos en embriones de genotipo wt, SR-B1 KO con morfología normal o SR-B1 KO con NTD y en sus respectivos pYS. Figura adaptada de Santander et. al 2017[40].

7. Funciones antioxidantes de la vitamina E como mecanismo preventivo de NTD

La vitamina E es sintetizada por las plantas y se compone de una mezcla de isómeros de tocoferoles y tocotrienoles (designados como α-, β-, γ-, y δ-)[66]. La vitamina E, como

toda vitamina liposoluble, es absorbida en micelas en el intestino, transportada hacia la linfa en quilomicrones, captada por el hígado y metabolizada para su excreción o empaquetada en diferentes clases de lipoproteínas hacia la circulación[67]. Las células captan vitamina E desde las lipoproteínas mediante receptores específicos. Una vez dentro de las células, la vitamina E celular se une específicamente a la proteína transportadora α-tocopherol transport protein (α-TTP). De todos los isómeros de la vitamina E, la α-TTP une preferentemente α-tocoferol[68], volviendo a este isómero en particular la principal molécula con actividad biológica de todas las formas de vitamina E en mamíferos. El α-tocoferol, por su naturaleza hidrofóbica, se intercala en las membranas biológicas, deteniendo la propagación de especies radicalarias y protegiendo a los lípidos de la degradación[69].

En sintonía con esta actividad antioxidante, los embriones SR-B1 KO presentan elevados niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas del inglés "reactive oxigen species"), que se restablecen al suplementar la dieta materna con vitamina E, sugiriendo que la función antioxidante de la vitamina E contribuiría al cierre del tubo neural. La elevada producción de ROS y el estrés oxidativo inducen una respuesta antioxidante caracterizada por la activación de la expresión de enzimas que metabolizan las ROS en productos inocuos. No obstante, los embriones SR-B1 KO mostraron expresión similar de 5 enzimas antioxidantes (*Gsr, Cat, Sod2, Txn2, Glrx*) en comparación a embriones WT y a embriones de madres suplementadas con vitamina E, sugiriendo que no existiría una respuesta compensatoria antioxidante a nivel transcripcional frente al aumento de ROS y que la prevención del fenotipo embrionario al suplementar a la madre con vitamina E tampoco estaría mediada por mecanismos celulares de respuesta antioxidante. Considerando que un elevado número de genes intervienen en esta respuesta celular, realizamos un análisis global de expresión de genes que participan en esa función usando una base de datos de secuenciación masiva de RNA en embriones WT, SR-B1 KO normales y SR-B1 KO NTD generada previamente en nuestro laboratorio[58]. Junto con cambios en la expresión de genes de la respuesta a stress oxidativo identificamos otras ontologías moleculares de procesos relacionados a cierre

del tubo neural y comparamos el número de genes diferencialmente expresados para cada proceso entre pares de los diferentes grupos embrionarios. De los nueve procesos analizados, seis se encontraron alterados en al menos una comparación (**Figura 6**). Uno de estos procesos correspondió a "actividad antioxidante", que se encontró alterada entre embriones WT y SR-B1 KO y entre embriones SR-B1 KO normales y SR-B1 KO NTD, sugiriendo que efectivamente la deficiencia embrionaria de vitamina E se asociaría a la sobreexpresión de genes antioxidantes. Distintos estudios indican que las enzimas antioxidantes exhiben actividades extremadamente bajas en tejidos embrionarios y fetales[70,71], sugiriendo que la principal defensa antioxidante embrionaria no dependería directamente de estas enzimas. Nuestros resultados, sin embargo, sugieren que en este caso podrían contribuir al fenotipo alterado en los embriones KO, posiblemente junto con otros componentes del sistema antioxidante.

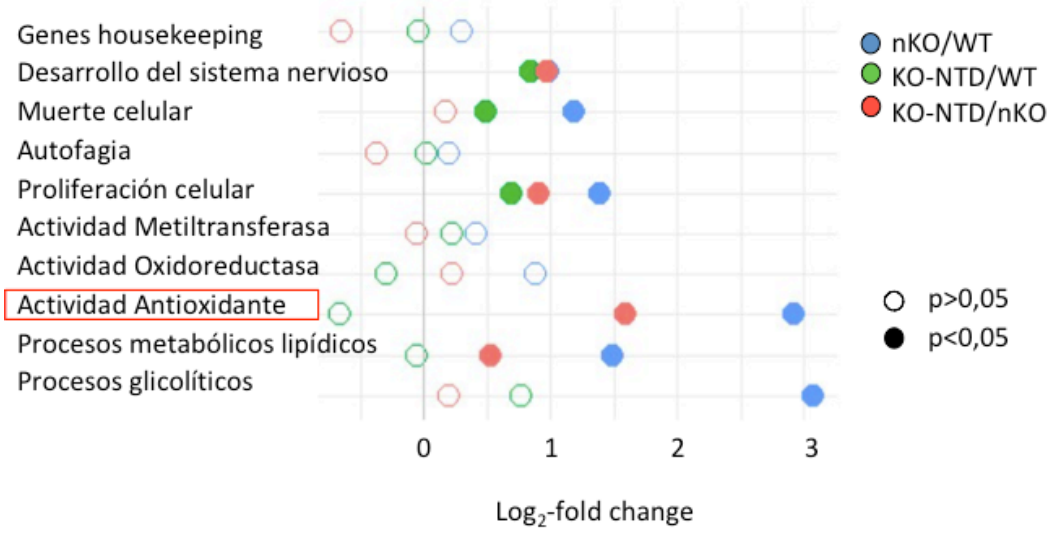


Figura 6. Divergencia transcripcional en genes de respuesta antioxidante por el genotipo de SR-B1 o la morfología de NTD. A) Gráfico de puntos que muestra la ontología molecular de los genes diferencialmente expresados entre embriones WT, nSR-B1 KO y SR-B1 KO NTD. Los círculos coloreados indican las comparaciones estadísticamente significativas (*p<0,05, Test Exacto de Fisher).

8. Sistema antioxidante endógeno y posible desbalance por deficiencia de vitamina E

Además de los genes reguladores de la respuesta antioxidante, el sistema antioxidante endógeno está compuesto principalmente por los siguientes elementos: vitamina E, vitamina C (ascorbato) y glutatión, que actúan coordinadamente formando una "red antioxidante" (**Figura 7**). La mantención de esta red antioxidante es crucial para proteger las membranas celulares de la degradación mediada por radicales[69].

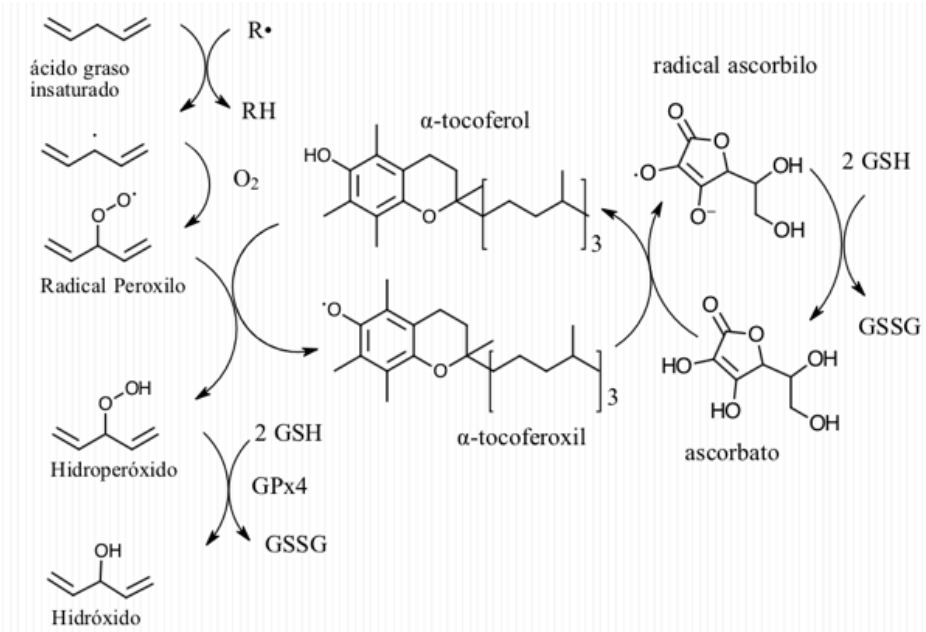


Figura 7. Peroxidación lipídica y red antioxidante. En presencia de radicales libres y oxígeno, los ácidos grasos insaturados se transforman en radicales peroxilo, altamente reactivos. Este radical es convertido en un hidroperóxido de ácido graso a expensas del α-tocoferol, que se convierte en un radical α-tocoferoxil. Los hidroperóxidos de ácidos grasos son convertidos a alcoholes por acción de la enzima fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (GPx4), usando dos glutationes (GSH) como agente reductor y creando un glutatión disulfuro (GSSG). Para repletar el α-tocoferol, el radical α-tocoferoxil es reducido por el ascorbato (vitamina C). El radical ascorbil oxidado es reducido a ascorbato a través del GSH.

El tripéptido γ-glutamil-cisteinil-glicina (GSH) es el antioxidante más importante sintetizado por las células[72] y participa en la remoción de distintas especies reactivas. Casi todo el GSH es utilizando en la defensa antioxidante por miembros de la familia glutatión peroxidasa (GPx). En particular, la fosfolípido hidroperóxido glutatión

peroxidasa (GPx4), reduce los peróxidos lipídicos a alcoholes convirtiendo el GSH en glutatión disulfuro (GSSG)[73]. Interesantemente, durante el cierre del tubo neural en el ratón (E9,5), la enzima GPx4 es expresada principalmente en el cerebro en desarrollo[74], sugiriendo la importancia del sistema antioxidante endógeno en esta estructura embrionaria. Además, el GSH es usado en la eliminación de los productos secundarios de la peroxidación lipídica[75]. Es posible que la deficiencia embrionaria de vitamina E provoque un aumento de los peróxidos lipídicos y de los productos secundarios de esta reacción, que son luego reducidos y detoxificados, respectivamente, a costa del GSH intracelular. Paralelamente, el ROS elevado en el embrión SR-B1 KO podría también oxidar no enzimáticamente el GSH intracelular[76], desbalanceando el sistema rédox en el embrión. El desbalance del sistema rédox implica un aumento del GSSG, la forma oxidada del GSH, el cual reacciona con los grupos tioles de las proteínas produciendo disulfuros mixtos en una reacción denominada glutationilación. Las proteínas glutationiladas pueden reaccionar entre ellas formando disulfuros de proteínas, los cuales alteran su función[77]. Finalmente, una disminución del GSH intracelular puede llevar a la apoptosis por una vía independiente de caspasas, mediada por el factor inductor de la apoptosis (AIF)[78]. Curiosamente, cuando se evaluó si los embriones SR-B1 KO con morfología de NTD presentaban mayores niveles de apoptosis en el neuroepitelio, se usó como marcador caspasa-3 activada, no encontrándose diferencias[42]. Sin embargo, un posible desbalance del sistema rédox podría producir un aumento de la apoptosis por una vía distinta de la que fue evaluada. En humanos y roedores, la suplementación con vitamina E protege las reservas de GSH en distintos tejidos o tipos celulares frente a agresores como la luz UV o el daño oxidativo[79,80,81] y dietas deficientes en vitamina E administradas en modelos animales reducen el GSH total y/o disminuyen la razón GSH:GSSG[82,83].

La vitamina C constituye otro componente relevante del sistema antioxidante endógeno, siendo un importante agente regenerador de la actividad antioxidante de la vitamina E. En humanos, durante el primer trimestre del embarazo, el ácido ascórbico es detectado en el líquido amniótico, sugiriendo que su rol antioxidante sería importante

durante el desarrollo temprano[84]. A diferencia del humano, el ratón posee una copia funcional del gen codificante para la enzima L-gulonolactona oxidasa (GULO), necesaria para catalizar el último paso de la biosíntesis de la vitamina C. La expresión de GULO ha sido estudiada en distintos tejidos del ratón adulto[85], pero su expresión durante el desarrollo temprano es desconocida. Es posible que el embrión de ratón (E9,5) no exprese niveles significativos de GULO y dependa del transporte activo de ascorbato mediado por los *transportadores de sodio ascorbato* (SVCT) a través de la membranas extraembrionarias para proveerse de este antioxidante. Apoyando esta hipótesis, los ratones knock-out para el transportador *SVTC2* mueren en la etapa fetal, sugiriendo la importancia del transporte activo de la vitamina C durante el desarrollo[86]. Es posible que los niveles de vitamina C embrionarios sean reducidos en comparación a los tejidos adultos y que sean insuficientes para compensar una situación de elevado estrés oxidativo en el embrión de etapas tempranas (E9,5). La reducida concentración de vitamina C en el embrión y la ineficiente regeneración de la vitamina E por este mecanismos pudiera explicar en parte por qué la suplementación materna con vitamina E no se traduce en un aumento de la vitamina E en los embriones SR-B1 KO. La consecuencia de la deficiencia de vitamina E sistémica sobre los niveles de vitamina C ha sido abordada en el modelo del pez cebra, observándose una depleción secundaria de vitamina C al alimentar a los peces con una dieta insuficiente en vitamina E[87].

Finalmente, múltiples sensores de H_2O_2 y vías de señalización son gatilladas por la presencia de ROS, convergiendo en la regulación de diversos factores de transcripción, tales como AP-1, Nrf2, CREB, y NF-κB[88]. Estos factores inducen la expresión de un gran número de genes requeridos para la detoxificación de las moléculas oxidadas y para la reparación y mantención de la homeostasis celular.

9. Producción de ROS en la interfaz materno-embrionaria y posible modulación de la vitamina E sobre este proceso

Las ROS participan de procesos fisiológicos y patológicos en la placenta en

desarrollo. Los trofoblastos están expuestos a niveles crecientes de oxígeno: a hipoxia al comienzo de la gestación y a concentraciones más elevadas cuando se establece la circulación placentaria. Entre las distintas vías involucradas en la producción de ROS, la enzima NADPH oxidasa (NOX) es la principal fuente catalítica de la generación de superóxido en distintos tejidos y modelos biológicos[89,90], incluyendo los trofoblastos de humano y ratón. La generación de ROS resultante de la activación de esta enzima es de crucial importancia para diversos procesos biológicos y ejerce una actividad bactericida en las células con actividad fagocítica, como macrófagos y neutrófilos. La enzima NOX es un complejo enzimático de membrana con un sitio catalítico que posee orientación hacia la cara externa de a membrana, por lo que las ROS producto de esta catálisis son liberadas hacia el compartimento extracelular. Interesantemente, las células del citotrofoblasto humano y las arterias vellosas exhiben altos niveles de actividad NOX, especialmente durante el desarrollo temprano (7-13 semanas)[91]. Además de su potencial rol bactericida durante la fagocitosis del endometrio, se ha propuesto que el complejo NOX actuaría como un mecanismo sensor de oxígeno importante para la transducción de señales[92], modulando canales iónicos que afectan la replicación y diferenciación[93].

En roedores, los sitios de formación de H_2O_2 como producto secundario del ROS han sido localizados mediante inmunohistoquímica en la superficie de los trofoblastos gigantes durante períodos en que los trofoblastos exhiben alta actividad fagocítica e invaden el estroma uterino[94,95] y el ROS producido por los trofoblastos aumenta considerablemente al ser éstos incubados con un activador de la fagocitosis[95], sugiriendo que la producción de ROS extracelular estaría principalmente asociada a procesos fagocíticos. Distintos estudios han hipotetizado que la activación farmacológica de la fagocitosis provocaría un desbalance en la interfaz materno-fetal, probablemente debido la alteración de procesos rédox[96,97,94].

En distintos modelos biológicos *ex vivo*–neutrófilos humanos y explantes de arterias mesentericas de rata[98,99]- el α-tocoferol inhibe la producción de ROS extracelulares al inhibir el ensamblaje de las subunidades que componen el complejo NOX. El mecanismo detrás de esta inhibición implica interacciones directas con enzimas

que modulan procesos de transducción de señal. El α-tocoferol activa la proteína fosfatasa 2A (PP2A), que defosforila a la proteína quinasa C (PKC), favoreciendo su estado inactivo[100,], impidiéndose la activación de las subunidades de la NOX[98,101]. Por otra parte, el α-tocoferol induce la defosforilación de RAC-α serina/treonina quinasa (AKT), reduciendo su actividad catalítica, posiblemente al modular la fosfatidil inositol 3-quinasa (PDK1/2), una quinasa que fosforila a AKT, o activando a una fosfofatasa que la defosforila[102,103]. La proteína AKT también induce la activación del complejo NOX, aunque los mecanismos no están totalmente claros[104].

Debido a que I) las células del trofoblasto gigante de ratón producen ROS extracelular catalizado por el complejo NOX en la interfaz materno-embrionario, II) la vitamina E inhibe la activación del complejo NOX en la membrana a través de un mecanismo mediado por la inhibición de las enzimas αPKC y AKT, III) la suplementación de la dieta materna con vitamina E provoca una acumulación de α-tocoferol en el saco vitelino parietal de los embriones SR-B1 KO (**Figura 5.B**), hipotetizamos que la acumulación de vitamina E en las células del trofoblasto reducen la producción de superóxido hacia el embrión modulando la fosforilación de ciertas enzimas. En condiciones normales, las ROS fisiológicas producidas por la actividad fagocítica de los trofoblastos no impondría riesgos para la organogénesis temprana ya que el sistema antioxidante embrionario contrarrestaría las especies las reactivas. Sin embargo, en una situación de deficiencia de vitamina E, como la que se observa en los embriones SR-B1 KO, la reserva antioxidante podría no ser suficiente para proteger a los tejidos embrionarios del daño o estrés oxidativo. En este contexto, la prevención del fenotipo de NTD por suplementación con vitamina E sería indirecta, mediada por una sobrecarga de vitamina E en los trofoblastos gigantes.

10. Evidencias en humano y otros animales sugieren una función protectora de la vitamina E sobre ácidos grasos poliinsaturados durante el desarrollo temprano

Además de los trabajos iniciales en que se descubrió que la vitamina E era necesaria para evitar reabsorciones y malformaciones embrionarias en ratas[64], la importancia de la vitamina E durante el desarrollo temprano ha sido evidenciada más recientemente en otros modelos animales. El pez cebra, al ser un vertebrado no placentario, ha demostrado ser un modelo útil para estudiar el efecto de la deficiencia de la vitamina E específicamente en el embrión durante el desarrollo. Los peces cebra hembras adultas alimentadas con una dieta deficiente en vitamina E producen huevos viables, pero sus embriones presentan malformaciones y alta mortandad en la etapa larvaria[105]. La deficiencia de vitamina E en embriones de pez cebra se asocia a niveles reducidos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs) del tipo ω-6, como el ácido araquidónico (ARA) y ω-3, como el ácido docosahexaenoico (DHA)[106], así como a mayores niveles de sus productos de oxidación, sugiriendo que la depleción de estos lípidos es el producto de un aumento de la peroxidación lipídica. Algo similar se observa en el cerebro del pez cebra en la etapa de adulto, en que la deficiencia de vitamina E provoca la depleción de una amplia variedad de fosfolípidos y lisofosfolípidos, en especial los unidos a DHA (DHA-PL)[107]. En modelos murinos, los cerebros de los ratones *knock-down* de la enzima glutatión peroxidasa 4 presentan elevada oxidación de los PUFAs, lo que puede ser prevenido a través de la administración de α-tocoferol[69]. En línea con esta evidencia, los metabolitos de la vitamina E son inhibidores alostéricos de enzimas que metabolizan a los PUFAs[70], sugiriendo que el α-tocoferol sería requerido para regular la oxidación enzimática de éstos.

Evidencia adicional sobre la relación entre PUFAs y malformaciones embrionarias ha sido proporcionada por estudios en ratas, que demuestran que la teratogénesis inducida por hiperglicemia tanto *ex vivo* como *in vivo* está mediada por deficiencia de ácido araquidónico[108]. La inyección subcutánea de ARA, la suplementación de la dieta materna

con aceite de cártamo rico en PUFAs o la suplementación del medio de cultivo con ARA reduce la incidencia de NTD y otras malformaciones en esos embriones[108,109].

En humanos, la síntesis de LC-PUFAs es baja y estos lípidos esenciales son mayoritariamente provistos desde la circulación materna a través de la placenta y desde la leche o los alimentos. Los LC-PUFA se concentran en el sistema nervioso central durante el desarrollo intrauterino y la infancia, potencialmente modulando el desarrollo del cerebro y la plasticidad[110]. La protección de los PUFAs por la vitamina E causa una interdependencia entre los niveles de ambos lípidos. En humanos, el requerimiento de vitamina E aumenta en paralelo con el consumo dietario de PUFAs y con el índice de insaturación de éstos[111] y la administración de una dieta enriquecida con aceite de pescado en ratas preñadas disminuye los niveles de vitamina E en la madre y el feto[112].

Los PUFAs son susceptibles a la oxidación por reacciones no enzimáticas o espontáneas debido a su estructura altamente insaturada[53]. Estas reacciones iniciadas por especies reactivas de oxígeno afectan el reservorio de lípidos disponibles para distintos procesos celulares y además forman compuestos tóxicos que perjudican la integridad de diversas biomoléculas. Los PUFAs no sólo son necesarios para la mantención de las propiedades físicas de las membranas biológicas, sino que además sus metabolitos de oxidación -como las prostaglandinas y los eicosanoides- son necesarios durante la embriogénesis. En el ratón, la oxidación enzimática de los PUFAs es necesaria para la implantación y el desarrollo óseo[56, 57, 58] y en el pez cebra ésta es necesaria para el correcto desarrollo del cerebro y ojo[59].

Finalmente, nuestros estudios han demostrado que la vitamina E debe ser suplementada a la madre a partir de la implantación para prevenir los NTD en los embriones SR-B1 KO[22]. Interesantemente, es durante ese período cuando se observa actividad lipooxigenasa[57] y cuando los embriones GPx4 KO son reabsorbidos[71], sugiriendo que existiría una oxidación fisiológica de los PUFAs y reducción de peróxidos lipídicos a compuestos menos tóxicos para permitir la correcta implantación y eventos posteriores como el cierre del tubo neural.

11. NTD, metabolismo y nutrición en humanos

Una fuerte indicación de que el metabolismo materno alterado contribuye a las malformaciones congénitas proviene de las embriopatías diabéticas[113, 114]. En el caso particular de los NTD, éstos ocurren 5,4 veces más frecuentemente en hijos nacidos de madres diabéticas[115]. Recientemente, la obesidad materna se ha establecido también como un factor de riesgo independiente de NTD. Un riesgo de NTD de hasta 4 veces mayor se observa en mujeres con obesidad mórbida (BMI>40) o sobrepeso (BMI>30)[116,117]. Diversos estudios clínicos en distintas poblaciones humanas respaldan estas observaciones para distintos tipos de NTD además de otras malformaciones congénitas[118–122].

Además de la asociación entre obesidad y NTD, otra línea de evidencia ha establecido una relación entre elevado riesgo de estas malformaciones con el consumo de dietas de pobre calidad, particularmente con alto porcentaje de calorías derivadas de las grasas y los azúcares[123,21]. Una alta carga glicémica ha sido asociada a 1,5 veces más de probabilidades de presentar un embarazo con NTD[124]. Tanto las anormalidades metabólicas, como la carga glicémica y la pobre calidad de la dieta (a pesar de una ingesta calórica adecuada) en mujeres se asocian a una mayor susceptibilidad de un desarrollo embrionario anormal. La evidencia sobre el efecto de la suplementación con vitaminas en la prevención de defectos del desarrollo en embarazos metabólicamente anormales hasta el momento es limitada, pero prometedora: el consumo periconcepcional de suplementos vitamínicos ha demostrado reducir la incidencia de NTD en mujeres diabéticas[125,126].

12. Modulación del NTD por la dieta materna en modelos animales

La asociación entre diabetes e hiperglicemia y defectos del desarrollo también ha sido establecida en modelos animales de experimentación, predominantemente ratas y ratones, lo que ha sido exhaustivamente revisado por ciertos autores, que proponen que el estrés oxidativo actuaría como mediador de estos defectos[127,128]. Además de elevar el

daño oxidativo, la glucosa inhibe la captación de otros nutrientes esenciales, como el inositol y el ácido araquidónico[129,108].

Si bien estos estudios ponen en evidencia la importancia de ciertos micronutrientes durante el cierre del tubo neural, el rol de los macronutrientes y la malnutrición por exceso ha sido menos investigado. Se ha sugerido que la hiperlipidemia en las preñeces diabéticas puede contribuir a enfermedades gestacionales[130]; sin embargo, esta alteración metabólica no ha sido estudiado durante el primer trimestre del embarazo en humanos o extensamente en modelos animales. Existe evidencia en modelos de ratas que indicaría que el aceite de cárcamo o de oliva serían beneficiosos reduciendo los NTD en preñeces diabéticas mejorando parámetros del metabolismo lipídico[131], pero los mecanismos exactos no se encuentran completamente descritos. En un modelo de preñez diabética en ratón, se observó que una dieta con alto contenido de grasa produjo un 21% de incidencia de NTD, mientras que una dieta alta en proteína produjo alrededor de un 6%. La dieta que indujo más NTD también produjo un efecto negativo mayor sobre el crecimiento fetal[132]. La misma dieta con una proporción elevada de grasas vs. proteína aumenta la incidencia de NTD en una cepa genéticamente susceptible a desarrollar excencefalia (SELH/Bc)[133]. Finalmente, en ratas, la alimentación durante 13 semanas con una dieta alta en grasas produce una incidencia de NTD cercana a un 25%, elevando el estrés oxidativo y reduciendo la capacidad antioxidante tanto en la madre como en el embrión[79].

En línea con la evidencia de que dietas de mejor calidad reducen el riesgo de malformaciones, la suplementación de la dieta con micronutrientes tales como el folato[134], el mio-inositol[108], las vitaminas C y E[135,134], el ácido araquidónico[108] y el ácido lipoico[136] ha sido efectiva en reducir la incidencia de NTD. Dietas enriquecidas en compuestos naturales con propiedades antioxidantes han demostrado un efecto similar: polifenoles como la quercetina, la curcumina o el resveratrol disminuyen la incidencia de NTD y de otras embriopatías en modelos animales de diabetes, principalmente al prevenir el daño oxidativo en la madre y/o en el embrión[137,138,139]. Aunque no todos los mecanismos celulares de la acción de estos compuestos naturales se encuentran esclarecidos, los flavonoides pueden actuar como “scavenger” de radicales libres e inhibir

la actividad de enzimas que producen estos radicales[140]. Los flavonoides son además seguros en mujeres embarazadas, pueden cruzar la placenta y se acumulan en el feto[141], volviéndolos un compuesto apto como tratamiento de embriopatías.

13. Estrés oxidativo materno, biodisponibilidad de vitamina E y NTD

La malnutrición por exceso puede alterar los requerimientos de micronutrientes, tal como describiremos a continuación para la vitamina E. La obesidad y el síndrome metabólico con condiciones que cursan con hiperlipidemia y oxidación de lipoproteínas[139,141], lo que puede llevar a la oxidación del α-tocoferol[86,142]. Apoyando esta observación, numerosos estudios muestran una correlación negativa entre niveles circulantes de α-tocoferol y obesidad o síndrome metabólico[143]. Además del posible consumo del α-tocoferol por oxidación sistémica, la menor biodisponibilidad de vitamina E podría deberse a otros mecanismos, aunque la mayoría de ellos aún son hipotéticos. Algunos ejemplos son: I) menor absorción intestinal, dado que los pacientes con síndrome metabólico absorben un 10% menos de α-tocoferol[106,144–150], II) deficiente distribución, debido a que el aumento de los lípidos circulantes reduce la eficiencia con que el α-tocoferol es captado por los tejidos[151] y III) retención hepática, considerando que el exceso de grasa hepática disminuiría la secreción lipoproteica[152]. Curiosamente, no se ha evaluado si el nivel deficiente de vitamina E circulante podría ser un factor causal del riesgo aumentado de NTD en mujeres con obesidad o malnutrición.

14. Preguntas de investigación

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos en las secciones anteriores, en esta tesis se plantean las siguientes interrogantes: ¿Es la vitamina E necesaria durante el cierre del tubo neural por su acción antioxidante en el embrión propiamente tal? ¿La vitamina E activa vías de señalización en el saco vitelino relevantes para reducir las ROS embrionarias y prevenir los NTD? ¿La deficiencia de vitamina E en embriones SR-B1

KO se asocia a menores niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) o de otros lípidos insaturados en membrana?

Para responder estas preguntas, en el **primer capítulo de esta tesis**, hipotetizamos que el déficit de vitamina E durante el cierre del tubo neural en embriones SR-B1 KO altera su homeostasis rédox, aumentando la oxidación de PUFAs. Planteamos además que la suplementación materna con vitamina E previene los NTD a través del restablecimiento de estos parámetros mediante la reducción de ROS en el saco vitelino parietal.

En el segundo capítulo de esta tesis nos enfocaremos en el stress oxidativo como potencial factor etiológico que vincula a la malnutrición y las alteraciones metabólicas con una mayor incidencia de NTD. Planteamos la siguiente interrogante adicional: ¿La malnutrición y las alteraciones metabólicas derivadas contribuyen a una menor biodisponibilidad materna de vitamina E y a una mayor incidencia de NTD en embriones SR-B1 KO? Para responder esta pregunta, en el **segundo capítulo de esta tesis**, nos proponemos estudiar la influencia de una dieta obesogénica prooxidante, sola o suplementada con vitamina E, sobre el metabolismo y el estado oxidativo materno en ratonas SR-B1 heterocigotas, y la incidencia de NTD en sus embriones de diferentes genotipos obtenidos mediante cruzas con machos heterocigotos.

CAPÍTULO I – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: La deficiencia de SR-B1 en los tejidos extraembrionarios altera la provisión materna de vitamina E al embrión murino durante el cierre del tubo neural, afectando su capacidad antioxidante y aumentando la oxidación de PUFAs embrionarios; la suplementación materna con vitamina E inhibe vías de señalización que promueven la producción de ROS en el saco vitelino parietal y restablece la homeostasis redox.

Objetivo General: Estudiar si la deficiencia de SR-B1 en los tejidos extraembrionarios murinos provoca un desbalance en el sistema antioxidante y mayor peroxidación lipídica asociados a la deficiencia de vitamina E en embriones, y si la suplementación materna con esta vitamina revierte la homeostasis redox inhibiendo vías de señalización que promueven la producción de ROS en el saco vitelino parietal.

Objetivo específico 1.1: Estudiar el sistema rédox endógeno y la lipoperoxidación en embriones SR-B1 KO y determinar el efecto de la suplementación materna con vitamina E sobre esos parámetros y sobre vías de señalización que modulan la producción de ROS en el pYS.

Actividades:

<u>En embriones en E9,5 WT y SR-B1 KO obtenidos de cruzas de SR-B1 heterocigotas:</u>

i) Analizar el estado antioxidante celular, a través de la determinación de los siguientes parámetros: proporción GSH/GSSG y vitamina C por reacción con sonda fluorimétrica y HPLC, respectivamente.

ii) Determinar los niveles proteicos de un gen maestro de respuesta antioxidante (Nrf2) mediante western blot (WB).

iii) Evaluar el daño oxidativo en lípidos midiendo las especies reactivas al ácido tiobarbúrico (TBARS).

En embriones en E9,5 WT y SR-B1 KO obtenidos de cruzas de SR-B1 heterocigotas cuyas madres fueron alimentadas con dieta chow o suplementada con vitamina E:

i) Determinar los niveles de α –tocoferol mediante HPLC.

ii) Cuantificar aquellos parámetros que se hayan visto alterados en el punto i) a iii).

En sacos vitelinos parietales de las mismas preñeces:

ii) Estudiar la activación de vías de señalización moduladas por vitamina E que gatillan la producción de superóxido extracelular (niveles y fosforilación de αPKC, AKT) mediante WB.

Objetivo específico 1.2: Identificar diferencias en niveles de PUFAs y otros lípidos entre embriones SR-B1 KO y WT.

Actividades:

En embriones WT, SR-B1 KO con morfología normal (KO-N) y SR-B1 KO con NTD (SR-B1-NTD) en E9,5, obtenidos de cruzas de SR-B1 heterocigotas alimentadas con dieta chow:

i) evaluar el contenido de lípidos mediante lipidómica global de alto rendimiento (*high throughput shotgun lipidomics*).

ii) Comparar entre los diferentes grupos de embriones los niveles de las principales especies de PUFAs (ω-6 y ω-3) en fosfolípidos: ácido α-linolénico (ALA), ácido linoleico (LA), ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido araquidónico (ARA), así como de MUFAs (ω-9); ácido palmitoleico (PA) y oleico (OA), así como de otros lípidos.

CAPÍTULO II – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: La alimentación de ratonas SR-B1 heterocigotas (HET) con una dieta alta en grasas y azúcares altera el metabolismo, incrementa el estrés oxidativo y reduce la biodisponibilidad de vitamina E en la madre, aumentando el daño oxidativo y la incidencia de NTD en embriones; la suplementación materna con vitamina E previene estas alteraciones, protegiendo a los lípidos maternos y embrionarios de la lipoperoxidación, y reduciendo la incidencia de NTD.

Objetivo General: Estudiar en ratonas SR-B1 HET el efecto de dietas que modifiquen la biodisponibilidad de vitamina E o el estado oxidante maternos, sobre el metabolismo, el daño oxidativo y los niveles de vitamina E maternos, así como sobre la lipoperoxidación y la incidencia de NTD en embriones obtenidos de cruzas con machos SR-B1 HET.

Objetivo Específico 2.1. Estudiar en ratonas SR-B1 HET el efecto del consumo de una dieta alta en grasas y azúcares sola o suplementada con vitamina E sobre el metabolismo materno, el estado oxidativo y los niveles de vitamina E en la madre, así como la incidencia de NTD, la lipoperoxidación y los niveles de vitamina E en embriones y tejidos extraembrionarios de cruzas con machos SR-B1 HET.

Actividades:

<u>En ratonas SR-B1 HET alimentadas preconcepcionalmente con dieta chow, con dieta alta en grasas y azúcares (HFHS) ó con dieta alta en grasas y azúcares fortificada con vitamina E (HFHS+VE) y sus embriones en E9,5 WT, SR-B1 HET y SR-B1 KO:</u>

i) Caracterizar el metabolismo materno determinando tolerancia a la glucosa, niveles de pIRS-1 como marcador de inactivación de la señalización de insulina en tejidos materno/embrionarios mediante WB, niveles de insulina en ayuno mediante ensayo de ELISA, y niveles de lípidos circulantes y hepáticos (colesterol y triglicéridos) mediante ensayo enzimático y HPLC.

ii) Evaluar marcadores del estado antioxidante materno: GSH/GSSG en hígado y glóbulos rojos y actividad antioxidante total del plasma, mediante ensayos fluorimétricos, daño oxidativo en lípidos [especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)] y en proteínas [residuos de 4-hidroxinonenal (4-HNE)] por WB.

iii) Determinar los niveles de vitamina E en plasma e hígado materno, y en embriones y pYS mediante HPLC.

iv) Analizar la incidencia de NTD en embriones.

v) Estudiar lipoperoxidación en lípidos en embriones y pYS mediante ensayo de TBARs.

Objetivo Específico 2.2: Estudiar el efecto de una dieta fortificada con un compuesto natural con propiedades antioxidantes (harina de bagazo de uva) sobre el daño oxidativo y la incidencia de NTD en embriones SR-B1 KO.

Actividades:

2.2. En embriones WT, SR-B1 KO-N y SR-B1 NTD en E9,5, obtenidos de cruzas de SR-B1 HET, cuyas madres fueron alimentadas con una dieta antioxidante (fortificada con harina de bagazo de uva) desde la concepción:

i) Determinar la incidencia de NTD.

ii) Determinar daño oxidativo en lípidos mediante ensayo TBARs.

II. METODOLOGÍA

i) Obtención de muestras biológicas e intervenciones dietarias

Obtención de muestras biológicas maternas, embriones y tejidos extraembrionarios en E9,5: Hembras SR-B1 heterocigotas de 2-3 meses fueron colocadas en cajas con machos del mismo genotipo en una proporción de 1:1. El día del apareamiento fue identificado por la presencia de un tapón vaginal y registrado como E0,5. En el día E9,5 de desarrollo intrauterino, las ratonas fueron anestesiadas y el plasma, hígado, embriones, saco vitelino visceral y parietal fueron extraídos y congelados en nitrógeno líquido y preservados a -80ºC. Al momento de la obtención, cada embrión fue clasificado según morfología del tubo neural (abierto o cerrado) y estado de desarrollo (número de somitos por embrión). Parte del pYS fue separado para la genotipificación de los embriones mediante PCR. Para todos los experimentos en que se analizó el impacto de la suplementación de la vitamina E en la dieta, las hembras preñadas fueron alimentadas con dieta chow enriquecida en α-tocoferol (dieta Prolab 5P00 con 2.000 U.I de α-tocoferol/kg, PMI Nutrition International, Richmond IN) después del apareamiento, desde los días E0,5 a E9,5. Alternativamente, las hembras preñadas fueron alimentadas post-concepcionalmente durante este mismo periodo con dieta chow enriquecida con harina de bagazo de uva (20% p/p).

Genotipificación de SR-B1 en embriones: El saco vitelino visceral o las colas fueron lisadas toda la noche a 55°C en 100 µl de solución tampón A (0,2 M NaCl, 0,1 M Tris pH 8,5, 5 mM EDTA pH 8, 0,2% SDS, 100 ug/ml Proteinasa K). Para la identificación de los alelos silvestres y mutantes de SR-B1 mediante PCR, 2 µl de lisado fueron usados para 10 µl de solución de PCR (GoTaq master mix 1X, Thermofisher, USA), a una concentración de 250 nM para cada partidor. Los partidores usados se encuentran en la Tabla 1. La amplificación se realizó en un termociclador usando 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 59°C por 1 minuto y 68°C por 1 minuto. Los productos de PCR fueron

separados electroforéticamente en un gel de agarosa (1% Agarosa, 0,01% SybrSafe) y visualizados en un transiluminador.

Alimentación de ratonas con una dieta alta en grasas y azúcares y suplementación con vitamina E: Se alimentó a las ratonas SR-BI +/- con una dieta con alto contenido de grasas [60% kcal/grasa; 58Y1 Rodent Purified Diet (TestDiet)] ó con la misma dieta alta en grasas pero enriquecida en α-tocoferol [2.000 U.I de α-tocoferol/kg; LT541 Rodent Purified Diet (TestDiet)] por 60 días previo al apareamiento. A ambos grupos se les administró azúcar a través del agua (entregada ad libitum) a una concentración de 42g/L (45% fructosa/55% glucosa). El consumo de agua y dieta fue monitoreado semanalmente. Luego del apareamiento, las hembras de ambos grupos fueron alimentadas con dieta chow durante el periodo postconcepcional, manteniendo en ambos casos el contenido de vitamina E de la dieta preconcepcional.

Tabla 1. Partidores usados en la genotipificación embrionaria.

Id	Partidor
1	ATCTCAGCCTTAGGCCCTGT
2	TCAAACCCTGTGACAACAGC
3	ATAGATTCGCCCTTGTGTCC

Determinación de concentración de proteínas: El contenido de proteínas de los lisados fue determinado usando el Protein Assay Kit (Biorad, USA). Para ello, 0,5-5 µl de lisado fueron incubados en una dilución 1:5 del kit durante 5 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente, la absorbancia se midió a una longitud de onda de 595 nm. Los valores de las muestras fueron interpolados en una curva de calibrado construida con BSA en concentraciones de 0, 2, 5, 10, 15 y 20 µg/ml.

ii) Caracterización de la expresión de GULO y transportadores de vitamina C en embriones y membranas extraembrionarias.

Extracción de RNA: Se purificó el RNA de embriones, vYS y pYS individuales usando el kit de purificación PureLink RNA Micro (Thermofisher, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del RNA obtenido fue evaluada usando un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

RT-PCR: Se generó cDNA a partir de 500 ng de RNA purificado, con el kit iScript RT Supermix (Biorad, CA). El cDNA fue amplificado en un termociclador StepOne (Applied Biosystems, USA) usando el kit PowerUp SYBR Green (Thermo Scientific, USA). Luego, la amplificación se realizó usando cada partidor a una concentración de 2,5 μM, en un termociclador usando 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto y 68°C por 1 minuto. Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa (1% Agarosa, 0,01% SybrSafe) y visualizados en un transiluminador. La secuencia de los partidores se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Partidores usados en el PCR cualitativo.

Id	Partidor Forward	Partidor Reverse
GULO	ATAACACCGGGATCAAGCAC	TGAGGGTCGAAGGAAAGGAT
SVCT1	TGCCATCAACAGGGGAATTT	TTGGTAATCCCTAGGACCCC
SVCT2	GTTGCTCAGCCTTCCTTGAT	GATCACCACCGGGAGAGTAA
SVCT3	ATATCTGGTACACGGGCTGA	GGAAGCCCATACTCTTGAGC
GAPDH	GTGTTTCCTCGTCCCGTAGA	CTGTGGTCATGAGCCCTTCC

iii) Marcadores antioxidantes y de daño oxidativo

Determinación de niveles de vitamina E: Pools de 2 embriones, sacos vitelinos parietales individuales o muestras de hígado materno fueron homogenizados en solución de lisis conteniendo 1% N-acetilcisteína y centrifugados (12.000 g, 10 min). Las muestras de tejido o plasma (100 µl) fueron mezcladas con un mix comercial de solventes orgánicos (Chromsystems, Alemania) y centrifugadas por 10 min a 9,000 g. La fracción sobrenadante fue inyectada (50 µl) en una columna isocrática de HPLC (Chromsystems, Alemania) a un flujo constante de 1,5 ml/min con fase móvil comercial (Chromsystems, Alemania) y la señal fue registrada usando un detector UV programable (Shimadzu, Japón), a una longitud de onda inicial de λ=325 nm y luego a los 3,5 min a una longitud de onda final λ=295 nm. Cada muestra fue analizada en duplicado y se interpoló la señal en una curva estándar de α-tocoferol.

Determinación de niveles de vitamina C:

HPLC: Pools de 3 embriones, fueron homogenizados en solución de lisis conteniendo 1% N-acetilcisteína y centrifugados (12.000 g, 10 min). La fracción sobrenadante fue inyectada (20 µl) en una columna isocrática de HPLC (Chromsystems, Alemania) a un flujo constante de 1,5 ml/min con fase móvil comercial (Chromsystems, Alemania) y la señal fue registrada usando un detector UV programable (Shimadzu, Japón), a una longitud de onda de λ=245 nm.

Ensayo enzimático: En este ensayo, el ácido ascórbico es oxidado a ácido dehidroascórbico usando Tempol para luego reaccionar con o-fenilenediamina, formando así el producto de condensación 3-(dihidroxietil)furo[3,4-b]quinoxalina-1-ona (OPDA, Merck, Alemania), cuya aparición puede ser monitoreada fluorimétricamente[153]. Debido a que el ascorbato se oxida fácilmente en presencia de metales adventicios, todas las

soluciones utilizadas en este ensayo fueron tratadas previamente con una resina quelante, Chelex (Sigma, Alemania) por el método batch[154]. Una solución de acetato de sodio (2M, Sigma, Alemania) fue tratada con la resina quelante y el pH ajustado a 5,5. Para el ensayo, muestras de hígados (~100 mg) fueron homogenizados en 700 µl de metanol:agua (60:40 v/v) y muestras de plasmas fueron mezcladas con metanol:agua (90:10 v/v) en proporción 4:1 en presencia del quelante de metales ácido dietilenotriaminopentaacético (DETAPAC, 250 µM, Sigma, Alemania) a 4°C. Las muestras fueron incubadas en hielo durante 10 min y centrifugadas a 12.000 g por 10 min a 4ºC. El sobrenadante (50 µL) fue transferido a una placa de ELISA oscura (SPL Life, Corea). A cada pocillo se agregó un volumen equivalente de TEMPOL (Sigma, Alemania) 23,2 mM diluido en acetato de sodio 2M para posterior incubación a temperatura ambiente por 10 minutos. En oscuridad, a cada pocillo se agregó un volumen de 21 µL de OPDA (5,5 mM) diluido en buffer acetato de sodio. La cinética de la fluorescencia fue registrada (λ = 345/425 nm) a 22 escaneos cada 26s por 9,5 minutos usando un fluorímetro TECAN SPECTRAFLUOR PLUS (Tecan, USA).

Concentración de GSH/GSSG: La concentración de glutatión en su forma total o reducida fue detectada en embriones individuales *in vitro* usando un kit fluorimétrico (ab65322, Abcam, USA). El ensayo consistió en el uso del colorante monoclorobimane (MCB), que forma un aducto con el glutatión en una reacción catalizada por la glutatión-S-Transferasa (GST). La unión del MCB al glutatión gatilla la emisión de luz azul (Ex/Em = 380nm/461nm), que fue leída por fluorimetría en un equipo Tecan infinite M1000 PRO (Thermofisher, USA).

Concentración de 8-isoprostanos: La concentración de 8-isoprostanos fue detectada en embriones individuales *in vitro* a través de un ensayo de ELISA competitivo (Abcam ab175819, UK). Una placa de 96 pocillos pre-revestida con un anticuerpo de captura anti-8-isoporstanos fue utilizada para el ensayo. La densidad óptica fue registrada a 450 nm usando en un equipo Tecan infinite M1000 PRO (Thermofisher, USA).

Ensayo de la capacidad antioxidante del plasma: Este ensayo permite evaluar la capacidad de una muestra de plasma de inhibir la oxidación natural de la sonda Dihidrorodamina-123, que se considera total (100%) en ausencia de un componente antioxidante[155]. Un volumen de 10 µL de plasma fue incubado con 25 µL de una solución de DHR (D23806 Thermofisher, USA) 50 µM. La fluorescencia emitida por la oxidación espontánea de la sonda en ausencia o presencia de muestras de plasma fue medida en un fluorímetro a intervalos de 2 minutos durante una hora a 37ºC (λ = 485/538 nm). La tasa de oxidación de la DHR se calcula como la pendiente de la recta de intensidad de fluorescencia entre los 10 y 50 min (RFU/min) de iniciada la reacción. El porcentaje de oxidación de la DHR en ausencia de muestra es considerado como 100%.

Determinación de TBARs: La detección del MDA se ha usado tradicionalmente como el indicador primario de la peroxidación lipídica, a través del ensayo de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). Este ensayo involucra la reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en condiciones acídicas (pH=4) y de calor (95ºC), lo que lleva a la formación de aductos MDA-TBA. El color rosado emitido por los aductos puede ser medido espectrofotométricamente y cuantificado extrapolando los valores con una curva estándar de MDA. Hígados o pares de embriones fueron lisados usando un buffer comercial (T-PER, Invitrogen). El homogenizado se mezcló con TBA (Merck, Alemania) y agua en proporción 1:3,75:1,25 (muestra:TBA:H_2O). El TBA fue previamente preparado al 0.8% en agua, mezclado con ácido acético 20% pH 3,5 (1:1). Los tubos fueron luego calentados a 95ºC durante dos horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, se agregó una mezcla de n-butanol y piridina (15:1 v/v) a cada muestra, en proporción 1:1,25. Las muestras fueron vortexeadas, centrifugadas a 1.000 g durante 10 minutos y la fase superior recuperada. Paralelamente, los plasmas fueron mezclados con ácido tricloroaético (TCA, Merck, Alemania) y TBA (1:1,5:5). El TCA fue previamente preparado al 50% p/v en agua destilada y el TBA al 0.67% p/v en NaOH (0.01M). Las muestras de plasma fueron calentadas a 90ºC durante 1 hora, enfriadas en hielo y centrifugadas a 4ºC a 3,500 g por 12 minuto. Finalmente, la fluorescencia de las

muestras (530/550 nm) fue registrada en un equipo Tecan infinite M1000 PRO (Thermofisher, USA).

Análisis de los niveles de Nrf2 y 4-HNE: Hígados ó pares de embriones fueron homogenizados en solución T-PER (Thermofisher, USA) a 4°C en presencia de inhibidores de proteasa Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermofisher, USA). Los hígados fueron lisados usando un homogenizador ultra-turrax Pro200, mientras que los embriones fueron lisados directamente por resuspensión. Los homogenizados fueron centrifugados a 12000 g por 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Los plasmas fueron utilizados directamente (2µl). Las muestras fueron hervidas con solución tampón de carga para proteínas (60 mM tris pH 6,8, 25% glicerol, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 5% 2-mercaptoetanol), cargadas en un gel de poliacrilamida al 10% y sometidas a una diferencia de voltaje de 100 V por aproximadamente 2,5 horas en solución tampón de corrida (20 mM tris pH 8,3, 0,1 M glicina, 0,1% SDS). Luego, las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de PVDF aplicando una corriente de 350 mA por 2 horas en solución tampón de transferencia (20 mM tris pH 8,3, 0,1 M glicina, 20% metanol). La membrana fue bloqueada toda la noche en solución de bloqueo (0,1% Tween 20, 5% leche en TBS) a 4°C, luego incubada con IgG contra Nrf2 (ab62352, 0,715 mg/ml, Abcam, UK) rabbit anti-mouse ó 4-HNE (ab46545, 0,65mg/ml, Abcam, UK) rabbit anti-mouse, diluidos en solución de bloqueo (1:1000) y después incubadas con un anticuerpo contra IgG de conejo unido a peroxidasa (1,8 µg/ml; Sigma, Alemania) diluido en solución de bloqueo. Como control de carga se usó un anticuerpo contra GAPDH (ab37168, 1 mg/ml, Abcam UK), ó albúmina (A50-103A, 1mg/ml, Thermofisher, USA) diluidos ambos en solución de bloqueo (1:5000). Finalmente, las bandas fueron reveladas mediante quimioluminiscencia y fotografiadas en un fotodocumentador G:Box Chemi XRQ (Syngene, UK).

Identificación de genes de respuesta antioxidante por análisis bioinformático: Usando una base de datos RNA-seq previamente generada para comparar el perfil

transcriptómico entre embriones E9,5 WT, SR-B1 KO y SR-B1 KO NTD[11], realizamos Gene Ontology Enrichment Analysis para las ontologías de respuesta antioxidante contenidas en el GO Slim "actividad antioxidante", con el fin de establecer comparaciones de a par entre los grupos embrionarios e identificar genes antioxidantes diferencialmente expresados entre embriones WT y SR-B1 KO. Los genes que presentaron una magnitud de cambio menor al 50% de su expresión fueron excluidos del análisis.

iv) Determinaciones de lípidos

Determinación de la concentración de colesterol: La determinación de colesterol en plasma y en hígado se realizó usando el método enzimático que combina el uso de colesterol esterasa y colesterol oxidasa[156]. Las muestras fueron incubadas en la solución tampón de reacción (0,5 M tris pH 7,6, 50 mM fenol, 50 mM 4-clorofenol, 1% Tritón X-100, 0,37% colato de sodio, 0,04% 4-aminoantipirina, 0,35 U/ml colesterol esterasa, 0,1 U/ml colesterol oxidasa, 1,1 U/ml peroxidasa) por 30 minutos a 37°C y la absorbancia fue medida a 490 nm en un espectrofotómetro. Todos los reactivos de este ensayo fueron adquiridos de Sigma, Alemania.

Determinación de la concentración de triglicéridos: La medición de triglicéridos en plasma e hígado maternos fue realizada usando el sistema VITROS TRIG Slides XT 3400 (Ortho Clinical Diagnostics, UK), elemento analítico multicapa incorporada a un soporte de poliéster. El análisis se basa en un método enzimático descrito por Spayd y colaboradores[157]. En el slide se deposita un volumen de plasma (5,5 µl), que se distribuye uniformemente desde la capa difusora a las capas subyacentes. El tensioactivo Tritón X-100 en la capa difusora ayuda a disociar los triglicéridos de los complejos de lipoproteínas presentes en la muestra. A continuación, las moléculas de triglicéridos son hidrolizadas por la lipasa para producir glicerol y ácidos grasos. El glicerol difunde a la capa reactiva donde es fosforilado por la glicerol quinasa en presencia de trifosfato de adenosina (ATP). Después, en presencia de L-α-glicerol-fosfato oxidasa, el L-α-

glicerofosfato es oxidado a fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno. La última reacción implica la oxidación de un leucoderivado por el peróxido de hidrógeno catalizado por la peroxidasa para producir un pigmento. La incubación total del proceso es de 5 minutos. La densidad del colorante formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra y se mide mediante espectrofotometría de reflectancia a una longitud λ=540 nm. El diagrama de la reacción y el diagrama del slide se muestran en la **Figura 8**. Los ingredientes reactivos por cm^2 son: Lipasa (Pseudomonas sp.) 0,08 U; peroxidasa (raíz de rábano picante) 0,52 U; glicerol cinasa (Cellulomonas sp.) 0,35 U; L-α- glicerofosfato oxidasa (Pediococcus sp.) 0,19 U; Triton X-100 0,62 mg; 2-(3,5-dimetoxi-4-hidroxifenil)-4,5-bis(4- dimetilaminofenil) imidazol (leucoderivado) 0,04 mg; y trifosfato de adenosina 0,14 mg.

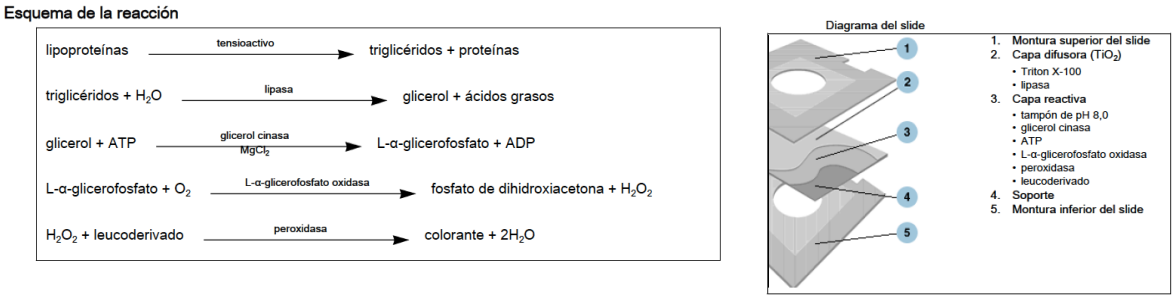


Figura 8. Esquema de la reacción y diagrama del slide del sistema de la medición de triglicéridos del sistema VITROS XT 3400.

Extracción de lípidos para análisis de lipidómica shotgun: Los homogenizados de embriones (50 µl) fueron mezclados con bicarbonato de amonio (130 µl) y metil tert-butil éter (810 mL)/metanol (7:2 v/v) y una mezcla de estándares internos previamente preparada en la misma mezcla de solventes orgánicos (21 µl). La mezcla de estándares internos contuvo: 50 pmol de lisofosfatidilglicerol (LPG) 17:1, 50 pmol de ácido lisofosfatídico (LPA) 17:0, 500 pmol de fosfatidilcolina (PC) 17:0/17:0, 30 pmol de hexosilceramida (HexCer) 18:1;2/12:0, 50 pmol de fosfatidilserina (PS) 17:0/17:0, 50 pmol de fosfatidilglicerol (PG) 17:0/17:0, 50 pmol de ácidos fosfatídico (PA) 17:0/17:0, 50 pmol de lisofosfatidilinositol (LPI 17:1), 50 pmol de lisofosfatidilserina (LPS) 17:1,

100 pmol de diacilglicerol (DAG) 17:0/17:0, 50 pmol de triacilglicerol (TAG) 17:0/17:0/17:0, 50 pmol de ceramida (Cer) 18:1;2/17:0, 200 pmol de esfingomielina (SM) 18:1;2/12:0, 50 pmol de lisofosfatidilcolina (LPC) 12:0, 30 pmol de lisofosfatidiletanolamina (LPE) 17:1, 50 pmol de fosfatidiletanolamina (PE) 17:0/17:0, 100 pmol de colesterol éster (CE) 20:0, 50 pmol de fosfatidilinositol (PI) 16:0/16:0. La placa fue luego sellada con una tapa cubierta de teflón, agitada a 4ºC por 15 min y girada hacia abajo (3000 g, 5 min) para facilitar la separación de las fases líquidas y limpiar la fase superior orgánica. Cien microlitros fueron transferidos a la placa de infusión y secadas por centrifugación a vacío. Los lípidos secados fueron re-suspendidos en 40 mL de acetato de amonio 7.5 mM en cloroformo/metanol/propanol (1:2:4 v/v/v) y los pocillos fueron sellados con papel aluminio para evitar la evaporación y la contaminación durante la infusión. Todos los pasos de manejo de líquidos fueron realizados usando una plataforma robótica Hamilton STARlet con función de control anti-goteo para el pipeteo de solventes orgánicos.

Adquisición de data MS: Las muestras fueron analizadas por un servicio externo, el laboratorio Lypotype, en Alemania (www.lipotype.cl). Se realizó infusión directa en un espectrómetro de masas QExactive (Thermo Fisher Scientific) equipado con una fuente iónica TriVersa NanoMate (Advion Bioscences). Cinco microlitros fueron infundidos con la presión de gas y el voltaje ajustados en 1,25 psi y 0,95 kV, respectivamente. El tiempo de entrega fue fijado en 4 min y 55 s con un retraso de cierre de contacto de 20 s para evitar inestabilidad por aerosolización. El interruptor de polaridad de positivo a negativo fue configurado en 135 s después del contacto de cierre. Las muestras fueron analizadas con ambas polaridades en una única adquisición. El método de adquisición de la MS comienza en modo de ión positivo adquiriendo el m/z 402-412 en modo MS+ a $R_{m/z=200}$=140,000 para monitorear el ión $[Col + NH_4^+]^+$ por 12 s. Todos los escaneos individuales en cada segmento fueron el promedio de 2 micro-escaneos. El control de ganancia automática (AGC) fue ajustado en $5x10^5$ y el tiempo máximo de inyección iónica fue fijado en 200 ms. Luego escaneamos el m/z 550-1000 en MS+

($R_{m/z}$=200=1400) con el bloqueo de masa activado con un background en común (m/z= 680,48022) por 18 s. El AGC fue ajustado en 10^6 y el IT en 50 ms. Esto es seguido por análisis de MSMS+ ($R_{m/z=200}$ = 17500) de data independiente desencadenado por una lista de inclusión por 105s. La lista de inclusión contiene todas las masas desde 500,5 a 999,75 con intervalos de 1 Da. El AGC fue configurado en 10^5 y el IT en 64 ms. La banda de aislamiento fue fijada en 1.0 Da, la primera masa de adquisición del MSMS en 250Da y la energía de colisión normalizada al 20%. Tanto la data MS como MSMS fueron combinadas para monitorear los iones CE, DAG y TAG como aductos de amonio. Luego del switch de polaridad al modo de ión negativo, un retraso de 15s antes de la adquisición fue insertado para permitir la estabilización del spray. Luego, escaneamos el *m/z* 400-650 en FTMS- ($R_{m/z=200}$=140 000) por 15 s con el bloqueo de masa activado en background común (*m/z*=529,46262) para monitorear las especies LPG, LPA, LPI, LPS y LPE como aniones deprotonados y LPC como aducto de acetato. El AGC fue configurado en 10^6 y el IT en 50 ms. Luego escaneamos el *m/z* 520-940 en FTMS- ($R_{m/z=200}$=140 000) por 15 s con el bloqueo de masa activado en background común (*m/z*=529,46262). El AGC fue configurado en 10^6 y el IT en 50 ms. Finalmente, escaneamos el MSMS-($R_{m/z=200}$=17 500) por un análisis de data independiente desencadenado por una lista de inclusión por 90s. Esta lista de inclusión contuvo todas las masas desde 590,5 hasta 939,5 con intervalos de 1Da. El AGC fue seteado en 10^5 y el IT en 64 ms. La banda de aislamiento fue configurada en 1,0 Da, la primera masa de adquisición de la MSMS fue 150 Da y la energía de colisión normalizada fue configurada al 35%. Tanto la data de la MS como de la MSMS fue combinada para monitorear las especies PC, HexCer, Cer, y SM como aductos de acetato y las especies PS, PG, PA, PE, y PI como aniones deprotonados. Para el análisis de los resultados, toda la data fue analizada usando un software de identificación de lípidos desarrollada internamente por la misma empresa basado en LipidXplorer[158,159].

v) Análisis de genes de metabolismo lipídico y vías de señalización modulados por vitamina E en pYS:

Determinación de los niveles de SR-B1, p-AKT/AKT, p-αPKC en sacos vitelinos parietales: Muestras de pYS fueron homogenizados en 120 µl de solución T-PER (Thermofisher, USA) a 4°C en presencia de inhibidores de proteasa Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermofisher, USA) e inhibidores de fosfatasa PhosSTOP Easypack (Roche, Suiza). Los homogenizados fueron sometidos a electroforesis y Western Blot por la metodología ya descrita. Las membranas fueron bloqueadas toda la noche en solución de bloqueo (0,1% Tween 20, 5% leche en TBS) a 4°C, luego incubadas con IgG contra: SR-B1 (ab52629, 0,35 mg/ml, Abcam, UK) rabbit anti-mouse; p-AKT (S473, CellSignaling, USA) rabbit anti-mouse ó p-αPKC (ab23513, Abcam, UK) rabbit anti-mouse, diluidos en solución de bloqueo (1:1000) y después incubadas con un anticuerpo contra IgG de conejo unido a peroxidasa (1,8 µg/ml; Sigma, Alemania) diluido en solución de bloqueo. Como control de carga se usó un anticuerpo contra GAPDH (ab37168, 1 mg/ml, Abcam UK) diluido en solución de bloqueo. Finalmente, las bandas fueron reveladas mediante quimioluminiscencia y fotografiadas en un fotodocumentador G:Box Chemi XRQ (Syngene, Inglaterra). Los anticuerpos fueron luego extraídos de las membranas usando la solución comercial Restore Plus Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, USA), lavadas en solución de bloqueo e incubadas con los anticuerpos primarios apropiados; AKT (C67E7, Cell Signaling, USA) rabbit anti-mouse ó PKC (D38C6, Cell Signaling, USA) rabbit anti-mouse, ambos diluidos en solución de bloqueo (1:1000). Finalmente, las bandas fueron reveladas por el sistema ya descrito. El anticuerpo contra p-αPKC utilizado en este experimento reconoce los residuos fosforilados de la serina 657 y la tirosina 658 de la enzima, sitios activadores que le confieren a la enzima resistencia a las defosforilaciones de fosfatasas inhibidoras[160]. Por otra parte, el anticuerpo utilizado contra p-AKT reconoce la serina-473, un sitio de fosforilación crítico para su actividad[161].

PCR cuantitativo: Los partidores usados se encuentran en la **Tabla 3**. Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: 50ºC por 2 min, 95ºC por 2 min, 40 ciclos de 95ºC por 15s, 60ºC por 1 min. Luego de la reacción, se realizó una curva de disociación para asegurar la amplificación de un producto único: 95ºC por 15s, 60ºC por 1 min, 95ºC por 15s. La eficiencia de la amplificación se estimó para cada partidor usando una curva de diluciones de una mezcla de los cDNA y se calculó la expresión relativa con la ecuación de Pfaffl[162] usando el gen GAPDH como referencia.

Tabla 3. Partidores usados en el PCR cuantitativo.

Id	Partidor Forward	Partidor Reverse
PPAR-γ	GTGCAGCTACTGCATGTGAT	TGGGACTTTCCTGCTAATACA
Elovl2	GTTTCCCCAAAGCCCACTTA	ACCACCTCAGTTTGTGTTCC
Elovl6	GCTCAGGGTCATCACGAAAA	GCCTGCTCATACGGATGTTT
Fads1	TTGCCTTCTGGGTACCAAAC	TCCCCTGCCAAAGTAGAAGA
Acly	GACAGTGCTTGCTGAGACTT	ACCAAGCCAATACCTGTGAC
Scd1	TTATAGACGGCAGTTGGCAC	TGCTAACCTTTCACACCACC
Scd2	TTATAGACGGCAGTTGGCAC	TGCTAACCTTTCACACCACC
Slc27a3	TCTTCACCTCTGGCACTACT	AGATGGTAGAATCCCTGGCA
Gapdh	ACTGAGCAAGAGAGGCCCTA	TATGGGGGTCTGGGATGGAA
TBP	CAGATGTGCGTCAGGCGTTC	AGAAACCTAGCCAAACCGCC

vi) Estudio de marcadores del metabolismo de la glucosa

Test de tolerancia a la glucosa: Hembras SR-B1 heterocigotas de los distintos grupos experimentales fueron puestas en ayuno durante 6 horas al término de su ciclo de oscuridad (alimentación). Al término del ayuno, los niveles de glucosa basal fueron obtenidos de la sangre venosa de la punta de la cola. Luego, un volumen de glucosa fue inyectado intraperitonealmente (1mg/g peso corporal). Los valores de glucosa fueron registrados a los 15, 30, 60 y 120 minutos luego de la inyección del bolo usando un glucómetro.

Medición de los niveles de hormonas: Al término de las intervenciones dietarias, las hembras SR-B1 heterocigotas de los distintos grupos experimentales fueron puestas en ayuno durante 6 horas, luego eutanasiadas y la sangre obtenida de la vena cava fue centrifugada a 4,000 rpm durante 20 min. La insulina, GLP-1, péptido C y adiponectina en plasma fueron medidos usando kits comerciales específicos de ratón, siguiendo las instrucciones del fabricante (EZRMI-13K, Merck, Alemania; MBS2567399, Mybiosource, USA; MBS2700131, Mybiosource, USA; ab226900, Abcam, UK). El índice de resistencia a insulina fue calculado considerando los niveles basales de glucosa e insulina en ayuno, computando así el modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR), en el que un número más alto representa una resistencia más alta a la insulina.

Determinación de los niveles de p-AKT/AKT, p-MAPK/MAPK, p-GS/GS y p-IRS1/IRS1 en hígados: Muestras de hígados (~100 mg) fueron homogenizados en 700 µl de solución T-PER (Thermofisher, USA) a 4°C en presencia de inhibidores de proteasa Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermofisher, USA) e inhibidores de fosfatasa PhosSTOP Easypack (Roche, Suiza). Los homogenizados (50 µg) fueron sometidos a electroforesis y Western Blot por la metodología ya descrita. Las membranas fueron bloqueadas toda la noche en solución de bloqueo (0,1% Tween 20, 5% leche en TBS) a

4°C, luego incubada con IgG contra: p-AKT (S473, CellSignaling, USA), p-MAPK (9101S, Cell Signaling, USA), p-GS (3891S, Cell Signaling, USA) y p-IRS1 (2381S, Cell Signaling, USA) rabbit anti-mouse, diluidos en solución de bloqueo (1:1000) y después incubadas con un anticuerpo contra IgG de conejo unido a peroxidasa (1,8 μg/ml; Sigma, Alemania) diluido en solución de bloqueo. Como control de carga se usó un anticuerpo contra α/β tubulina (2148S, Cell Signaling, USA) diluido en solución de bloqueo. Finalmente, las bandas fueron reveladas mediante quimioluminiscencia y fotografiadas en un fotodocumentador G:Box Chemi XRQ (Syngene, Inglaterra). Los anticuerpos fueron luego extraídos de las membranas usando la solución comercial Restore Plus Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, USA), lavadas en solución de bloqueo e incubadas con los anticuerpos primarios apropiados; AKT (C67E7, Cell Signaling, USA) MAPK (9102S Cell Signaling, USA), GS (3886S, Cell Signaling, USA) e IRS1 (3407S, Cell Signaling, USA) rabbit anti-mouse, diluidos en solución de bloqueo (1:1000). Finalmente, las bandas fueron reveladas por el sistema ya descrito.

vii) Análisis estadístico

Las asociaciones de variables categóricas y numéricas continuas se muestran representadas en gráficos de barra o tablas que indican la media y en una línea vertical o con un símbolo (±) la desviación estándar. Las asociaciones de variables categóricas y numéricas discretas se muestran representadas en gráficos de puntos o en gráficos de barras, en el caso particular de las proporciones. En estos casos, no se muestra la media ni la desviación estándar al no ser relevantes para los análisis estadísticos. Las asociaciones de variables numérica-numérica (discreta-continua) se muestran en gráficos de dispersión que indican la media y en una línea vertical la desviación estándar.

Para comparar dos promedios, se usó el test de T-student. Para comparar más de dos promedios, se usó el test de ANOVA, de una o dos vías dependiendo del número de categorías que presentó la variable explicatoria. Para estos análisis, se aseguró previamente que se cumplieran los supuestos de independencia, normalidad y

homocedasticidad. Estos dos últimos fueron evaluados usando el test de Kolmogorov-Smirnov o de homogeneidad de varianzas. En el caso de que estos supuestos no se cumplieran, se usaron tests alternativos no parámetricos para los tests de T-Student (Mann-Whitney) y ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis). Como tests a posteriori, se usó el test de Tukey para ANOVA de una vía y de Bonferroni para ANOVA de dos vías. Como alternativa no paramétrica, se usó el test de Dunn. La significancia estadística de las diferencias entre proporciones fue evaluada con la prueba exacta de Fisher.

Todas las pruebas fueron realizadas utilizando una distribución con dos colas y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si $p<0,05$.

III. RESULTADOS

CAPÍTULO I – OBJETIVO 1

Si bien la suplementación materna con la dieta enriquecida con vitamina E previene completamente los NTD, nuestros ensayos anteriores detectaron un aumento en los niveles de vitamina E en los embriones SR-B1 KO concomitantes al efecto preventivo[37] (**Figura 9.A**). En las mediciones de esos estudios se usaron pooles de dos embriones SR-B1 KO por muestra, obteniéndose valores muy cercanos al límite de detección de α-tocoferol (método de cromatografía líquida y detección amperométrica), de ~ 0,6 mg/L[163]. Teniendo en cuenta que, en ese ensayo anterior, la posible diferencia en el contenido de α-tocoferol entre los embriones SR-B1 KO obtenidos de madres con dieta control vs. suplementada con vitamina E pudiera no haber sido detectada por encontrarse ambos valores bajo el punto de corte, repetimos el ensayo de medición de vitamina E en embriones SR-B1 KO usando pools de 4 embriones, es decir el doble de muestra. En este nuevo ensayo observamos que, tal como se había reportado previamente, la suplementación con vitamina E aumentó casi al triple los niveles de vitamina E en plasma materno (**Figura 9.B**), sin embargo, no provocó cambios en los niveles de vitamina E en los embriones SR-B1 KO (**Figura 9.C**). Estos datos confirman que los niveles indetectables de vitamina E en embriones SR-B1 KO de madres alimentadas con esta vitamina no se deben a una cantidad insuficiente de muestra. Por lo tanto, el efecto de la vitamina E sobre la prevención de los NTD en embriones SR-B1 KO no estaría mediada por un restablecimiento de los niveles de vitamina E en el embrión propiamente tal, sino probablemente por un efecto indirecto mediado por los tejidos extraembrionarios.

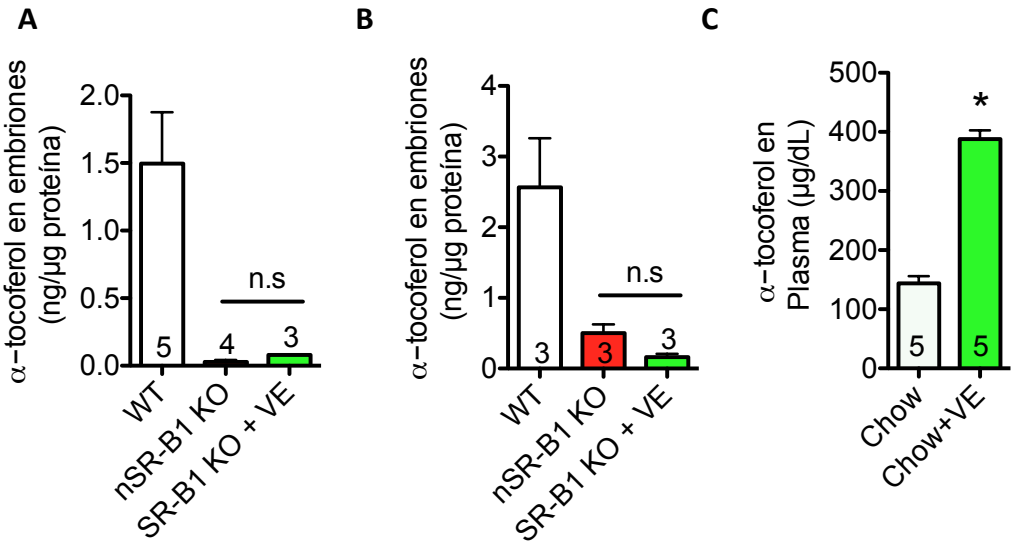


Figura 9. Efecto de una dieta control o suplementada con vitamina E sobre los niveles de vitamina E en embriones. Concentración de α-tocoferol en embriones; A) Anterior (pools de n=2 embriones por medición, adaptado de Santander y Cols., 2017[37]) y B) realizada en esta tesis, usando el doble de muestra respecto al análisis anterior (pools de n=4 embriones por medición). C) Concentración de α-tocoferol en plasma materno (C: test t de Student, *p=0,019. Número de embriones o hembras se indican dentro de cada barra).

Para dilucidar si durante la organogénesis temprana el embrión sería un sistema autosuficiente en la producción de vitamina C o en la captación de ésta desde el ambiente materno, aislamos cDNA de embriones y membranas extraembrionarias de estadío E9,5 de genotipo WT y caracterizamos por RT-PCR la expresión de GULO y de los tres transportadores principales involucrados en la captación de vitamina C[164] (**Figura 10**). Este análisis mostró expresión negativa de GULO en embriones, pYS y vYS. Por el contrario, el transportador SVCT2 se encontró expresado en todos los tejidos analizados. Los transportadores SVCT1 y SVCT3, en cambio, mostraron una expresión específica en el saco vitelino visceral. Los resultados de este análisis indicarían que la síntesis de vitamina C no estaría operativa durante esta etapa embrionaria temprana y que la provisión de vitamina C dependería por tanto exclusivamente del transporte activo desde la madre, principalmente a través del vYS. Probablemente debido a problemas

metodológicos, una de las muestras analizadas (en los carriles 1, 4 y 7) no presentó transcripción para ningún gen analizado, incluyendo GAPDH, el control positivo.

A continuación, analizamos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) los niveles de vitamina C en embriones WT y SR-B1 KO (**Figura 11.A**). Los embriones WT presentaron niveles detectables de vitamina C, de manera consistente con la expresión de los transportadores SVCT en el concepto embrionario. Aunque la deficiencia de vitamina E puede asociarse a una depleción secundaria de vitamina C en otros modelos animales[87], no observamos menores niveles de vitamina C en embriones SR-B1 KO.

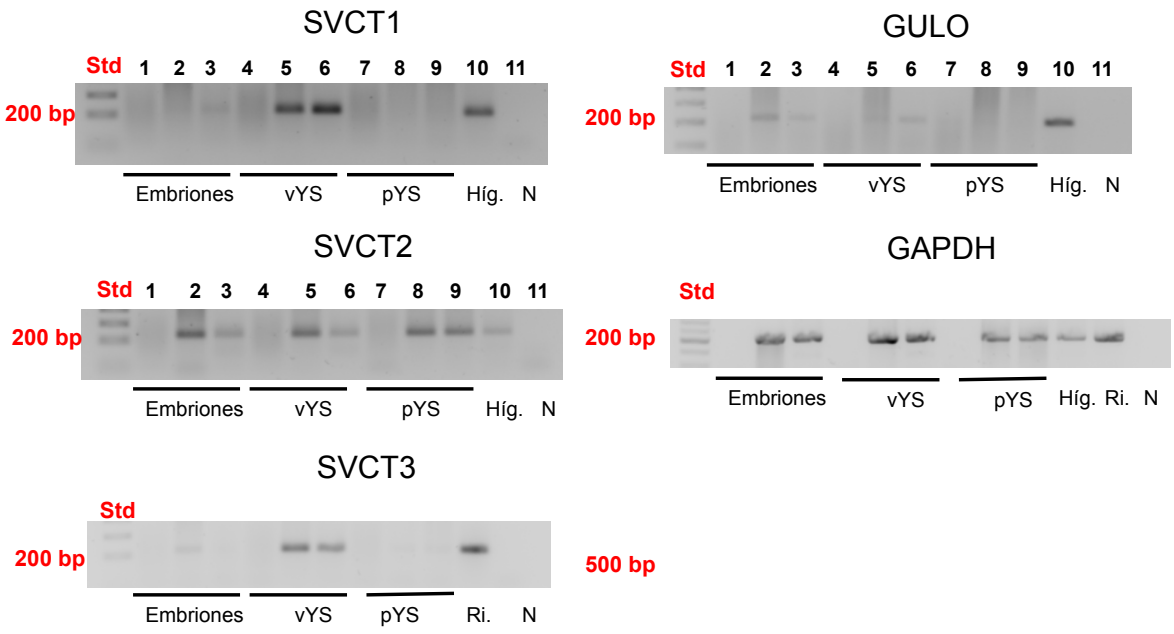


Figura 10. Expresión de GULO, SVCT1, SVCT2 y SVCT3 en embriones, saco vitelino visceral y saco vitelino parietal de estadío E9,5. Análisis por RT-PCR de la enzima L-gulonolactona oxidasa (GULO), los co-transportadores de sodio-ascorbato 1, 2 y 3 (SVCT1, SVCT2 y SVCT3) en pools de embriones, sacos vitelino visceral (vYS) y sacos vitelino parietal (pYS) obtenidos de hembras WT de la cepa mixta C57BL/6J:129 preñadas en E9,5. Cada gen fue analizado en triplicado (3 pools distintos). Híg: hígado, Ri: riñón, N: negativo.

Para entender si las reservas de GSH estarían comprometidas en embriones SR-B1 KO debido a la deficiencia de vitamina E, medimos la concentración de GSH en embriones WT y SR-B1 KO usando uno de los sensores más sensibles para medir tioles, la sonda "tiol verde", que forma un aducto en presencia de tioles aumentando así su señal fluorescente en más de 200 veces[165]. Debido a que la sonda reacciona también con los residuos tiólicos de los aminoácidos (como la cisteína), realizamos previamente una deproteinización con ácido tricloroacético. Como parte de este ensayo, realizamos también una segunda medición en presencia de un mix enzimático que reduce el glutatión disulfuro (GSSG) a GSH, pudiendo así calcular la concentración de GSSG como la diferencia de fluorescencia entre ambas reacciones. La proporción GSH:GSSG es un indicador del estado rédox celular y una disminución de esta proporción es un marcador de diversos procesos celulares alterados. Como resultado de este ensayo, no detectamos diferencias en la concentración de GSH ni en el ratio GSH:GSSG como consecuencia de la deficiencia de vitamina E embrionaria (**Figura 11. B-C**).

El factor nuclear (derivado de eritroide 2) "similar al 2", (NRF2) es un gen maestro regulador de la respuesta antioxidante activado en respuesta a ROS por mecanismos post-traduccionales. En este trabajo, evaluamos los niveles de la proteína Nrf2 por WB en embriones WT y SR-B1 KO (**Figura 11.D**). Como control positivo, usamos lisados de cerebelos de animales adultos *knock-out* para la proteína Niemann Pick tipo C1 (NPC1 KO), tejidos con reportado elevado estrés oxidativo[166]. Como resultado, no detectamos niveles de la proteína Nrf2 en embriones, indistintamente del genotipo. Para corroborar este resultado, extrajimos los valores de expresión del gen NFE2L2 de una base de datos previamente generada para comparar el perfil transcriptómico entre embriones E9,5 WT, SR-B1 KO y SR-B1 KO NTD[58] (**Tabla 4**). A diferencia de la proteína, observamos expresión del mRNA de NFE2L2 en embriones, aunque no encontramos diferencias en la expresión de éste debido al genotipo. Aunque existen discrepancias entre ambos análisis, el análisis de la proteína por WB tiene mayor validez como resultado debido a que la regulación post-traduccional de Nrf2 es principalmente por ubiquitinación[167].

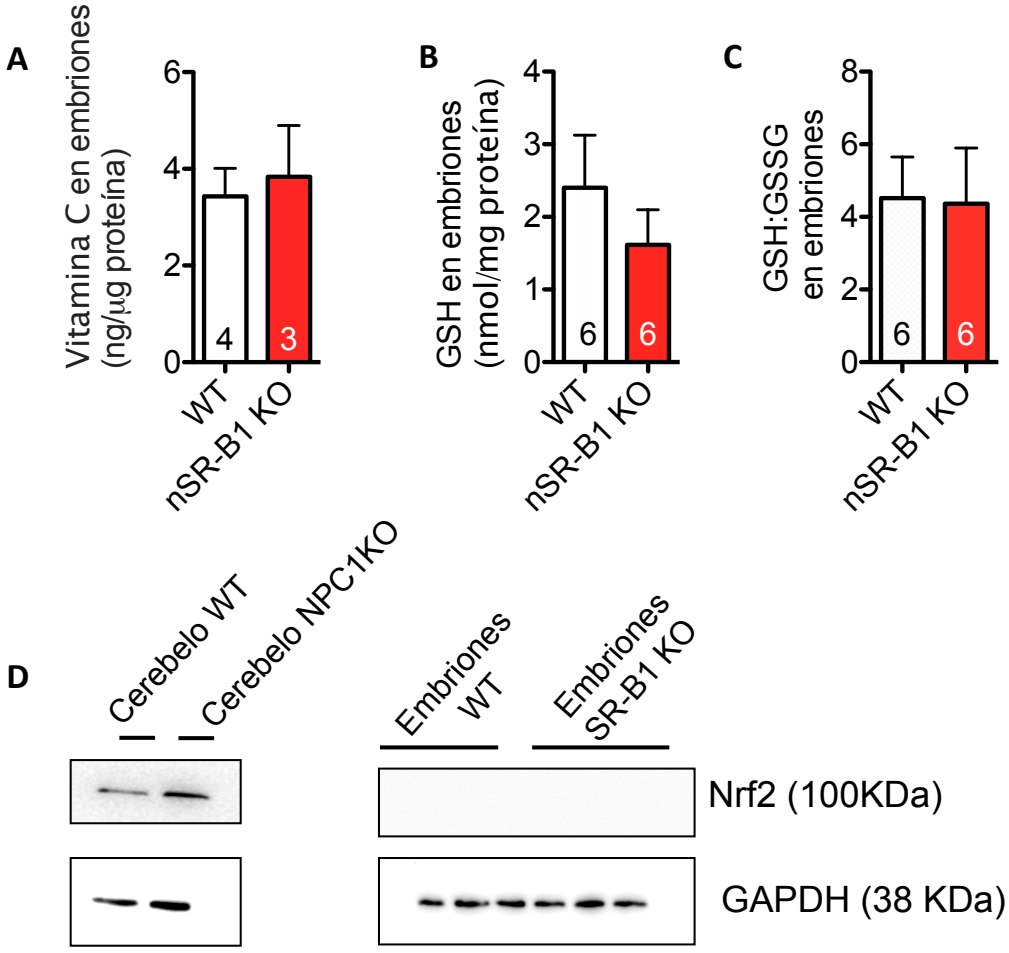


Figura 11. Análisis de marcadores de estado antioxidante y respuesta antioxidante celular en embriones SR-B1 KO. A) Niveles de Vitamina C en embriones WT y SR-B1 KO. B) Niveles de glutatión total (GSH) y C) proporción de glutatión reducido vs. oxidado (GSH:GSSG) como marcadores del estado antioxidante celular en embriones WT y nR-B1 KO (n.s, test t de Student). Número de hembras, embriones o tejidos extraembrionarios se indican dentro de cada barra. D) Niveles proteicos de Nrf2 como marcador de la respuesta celular antioxidante en embriones WT y SR-B1 KO (izquierda: lisados de cerebelos WT y NPC1 KO).

Tabla 4. Niveles de expresión de NFE2L2 en embriones .

	WT	SR-B1 KO
NFE2L2	7026± 389,6	7240± 294,8
GAPDH	159,7±27,32	200±30,2

Los valores se muestran como cuentas normalizadas, obtenidas de una base de datos de transcriptómica.

Para estudiar si otros genes con actividad antioxidante distintos de NFE2L2 se encontraban alterados en embriones SR-B1 KO producto de la deficiencia de vitamina E, usamos la base de datos de RNA-seq previamente generada en el laboratorio[58]. Filtramos los genes por la ontología molecular "actividad antioxidante" y luego identificamos la contribución individual de cada gen a la alteración del proceso, comparando la razón de cambio para cada gen (**Figura 12**). Este análisis filtró solamente dos genes antioxidantes diferencialmente expresados entre embriones SR-B1 KO y WT: la deficiencia de SR-B1 provocó una disminución de casi cuatro veces en la expresión de ApoA4 y un aumento de un tercio en la expresión de Trp53in1. Ningún gen clásico de respuesta antioxidante fue identificado como diferencialmente expresado por este análisis.

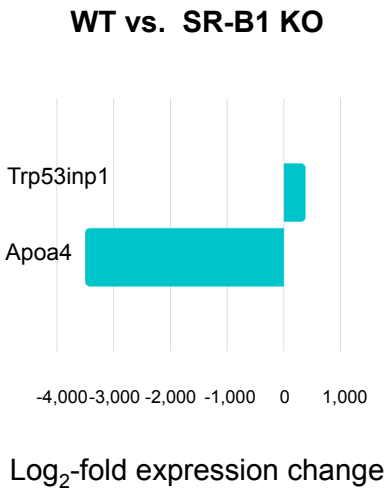
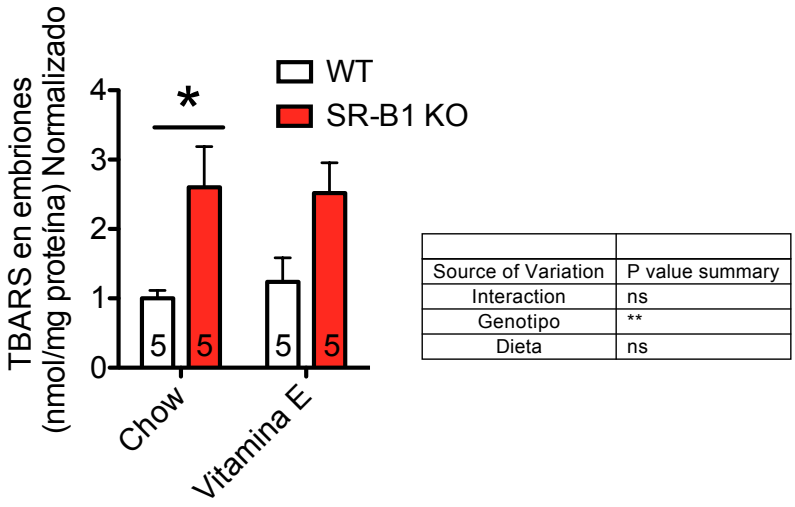


Figura 12. Divergencia transcripcional en genes de respuesta antioxidante entre WT y y SR-B1 KO. Genes diferencialmente expresados entre embriones WT y SR-B1 KO filtrados por el término GO SLIM "actividad antioxidante". Los genes fueron considerados diferencialmente cuando la magnitud de cambio fue al menos de un 50%, expresada en log2 (log2≥0.5).

Para medir el TBARS embrionarios, como marcador de lipoperoxidación, recolectamos pools de 3 embriones de genotipo WT o SR-B1 KO y utilizamos el homogenizado de cada pool para la reacción, conservando el debris celular debido a su alto contenido de lípidos. Observamos que los embriones SR-B1 KO contienen aproximadamente el triple de TBARS en relación a embriones WT (**Figura 13**). Para entender si la prevención del NTD por suplementación materna con vitamina E estaría mediada por una protección de la peroxidación, repetimos el ensayo TBARS usando esta vez embriones WT y SR-B1 KO recolectados de madres alimentadas post concepcionalmente con una dieta suplementada con vitamina E. El análisis combinado de ambos grupos mediante ANOVA de 2 vías reveló una diferencia significativa debido al genotipo (**Figura 13**), pero ningún efecto producto de la dieta. Este resultado, si bien es contradictorio con la hipótesis inicial que plantea a la vitamina E como necesaria durante el cierre del tubo neural para prevenir el daño oxidativo en lípidos, es concordante con el resultado de la medición embrionaria de vitamina E: la prevención del fenotipo de NTD no sería el resultado de un restablecimiento de los niveles de vitamina E en el embrión. Por lo tanto, si bien no se puede descartar que la peroxidación contribuya a la generación de NTD en embriones SR-B1 KO, la vitamina E prevendría el fenotipo embrionario a través de otros mecanismos no relacionados con la protección de lípidos en el embrión.



Source of Variation	P value summary
Interaction	ns
Genotipo	**
Dieta	ns

Figura 13. Análisis de daño oxidativo en lípidos en embriones SR-B1 KO de madres alimentadas con dieta control o suplementada con vitamina E. Concentración de TBARs como marcador de daño oxidativo en lípidos en embriones WT y SR-B1 KO obtenidos de madres alimentadas con dieta control o con dieta enriquecida en α-tocoferol (*p=0,0234 para el efecto del genotipo, ANOVA de 2 vías, post-test de Bonferroni). El número de embriones se indica dentro las barras.

Los resultados descritos hasta el momento sugieren que la ausencia de SR-B1 no afectaría la disponibilidad de otros antioxidantes endógenos ni activaría mecanismos clásicos de respuesta rédox en el embrión. Sin embargo, los embriones SR-B1 KO presentan elevado estrés oxidativo[37], que se normaliza al suplementar a la madre con vitamina E. Frente a este escenario, surge la pregunta ¿Cómo puede la vitamina E normalizar el estrés oxidativo embrionario sin ser transportada al embrión? Con el fin de explorar el estado de vías de señalización que gatillan la producción de ROS en el ambiente extraembrionario y que se inhiban por acción de la vitamina E (y que puedan indirectamente reducir el estrés oxidativo embrionario) evaluamos los niveles de fosforilación de las enzimas AKT y α-PKC en muestras de pYS SR-B1 KO de madres alimentadas con dieta chow o suplementada con vitamina E. La exclusión de los otros genotipos en este análisis tuvo como fin comparar de manera aislada la condición en la que se produce el defecto embrionario (ausencia de SR-B1) con la condición de prevención del fenotipo (suplementación con vitamina E). Además, a diferencia de los

embriones, el nivel de vitamina E en pYS no difiere entre los diferentes genotipos[37]. Como resultado de este análisis, observamos que la suplementación materna con vitamina E no genera cambios en la activación por fosforilación de las enzimas αPKC ni AKT en pYS (**Figura 14**). La vitamina E, pese a acumularse en este tejido extraembrionario producto de la suplementación, no estaría modulando la producción de ROS embrionario a través de estas enzimas.

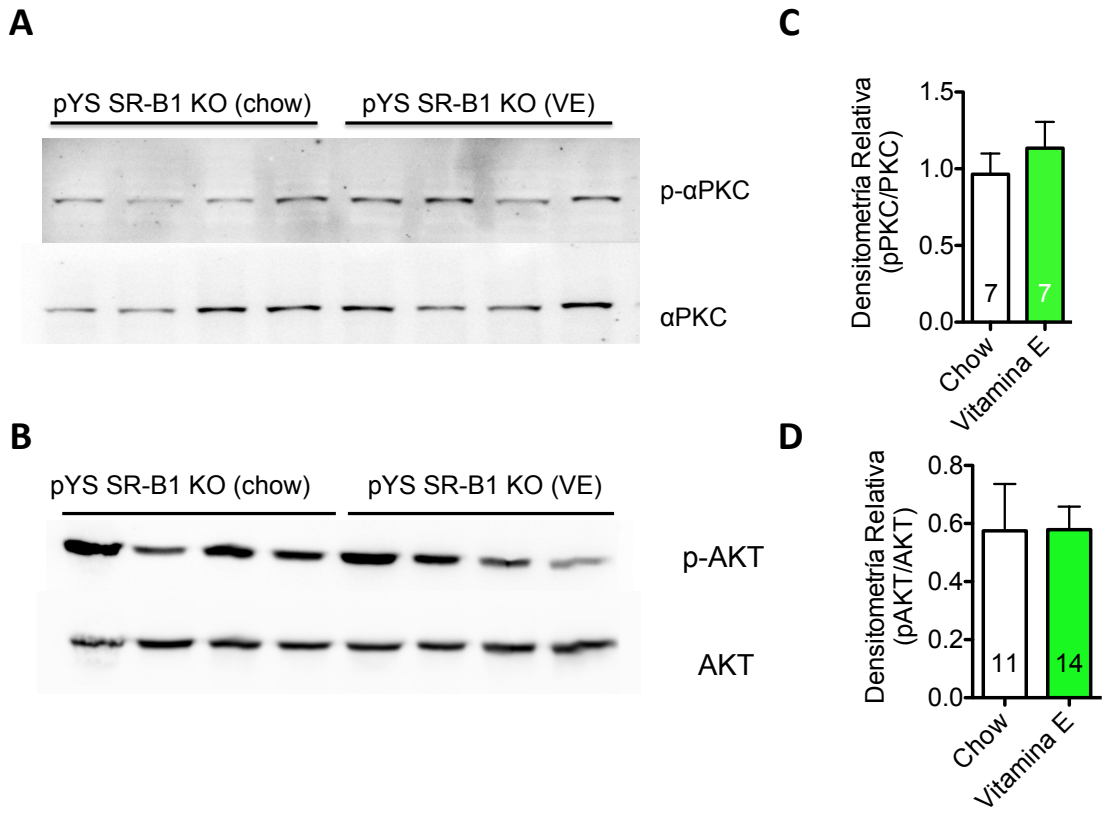


Figura 14.- Rol de la vitamina E sobre los niveles de fosforilación de PKC y AKT en pYS de genotipo SR-B1 KO. A, B) Detección por Western blot de A) PKC fosforilada y PKC total y B) AKT fosforilada y AKT total. C, D) Densitometría de los niveles de la proteína C) PKC fosforilada y D) AKT fosforilada relativizada por la densitometría de la proteína total. El número de muestras analizadas se indica dentro de cada barra (n.s, test de T-Student).

Como resumen del primer objetivo, en primer lugar, comprobamos que la suplementación materna con vitamina E no restablece los niveles de esta vitamina en el embrión, por lo que el mecanismo de prevención de NTD no sería directo sobre el embrión propiamente tal. Por otra parte, los resultados de este objetivo muestran que la deficiencia embrionaria de vitamina E no se asocia a un desbalance del sistema antioxidante, ni a nivel de disponibilidad de antioxidantes celulares ni de cambios en la expresión génica. Aunque la deficiencia de este micronutriente sí aumenta la peroxidación lipídica en embriones, sugiriendo que procesos oxidativos podrían perjudicar el cierre del tubo neural, los niveles de esta lipoperoxidación se mantienen elevados aun cuando a la madre se suplementa con vitamina E, lo que indicaría que la prevención del fenotipo de NTD no tendría relación con la protección de la lipoperoxidación. Exploramos por este motivo el efecto de la suplementación de la vitamina E sobre la inhibición postraduccional de dos enzimas que gatillan la producción de ROS extracelular en el pYS, no encontrando diferencias por el tratamiento materno. Sin embargo, no podemos descartar que la vitamina E en el pYS module la producción de ROS a través de otros mecanismos, o influencie otros procesos relevantes para el cierre del tubo neural.

CAPÍTULO I – OBJETIVO 2

Estudios en animales de experimentación han demostrado la importancia del α-tocoferol en la protección de los PUFAs. En tesis, nos propusimos dilucidar las consecuencias moleculares de la deficiencia de la vitamina E en los niveles PUFAs y otros lípidos en embriones SR-B1 KO durante el cierre del tubo neural. Debido a que el tubo neural del roedor es demasiado pequeño para cuantificar distintas clases de lípidos, usamos embriones completos para estos análisis. El tamaño de los embriones tampoco permite igualar por masa de manera precisa la cantidad de muestra inyectada en el espectrómetro de masas –debido a las dificultades técnicas para pesarlos- por lo que usamos la cantidad de proteína como parámetro para relativizar. Finalmente, para minimizar la variabilidad entre las muestras, usamos pools de 2 embriones hembras para la extracción de lípidos. La decisión de usar embriones de sexo femenino tuvo como fin evitar detectar abundancias diferenciales de lípidos debido a la expresión de genes ligados al sexo o a la presencia de dos cromosomas X.

Tradicionalmente, la medición de PUFAs se realiza por cromatografía gaseosa, un proceso que requiere que la muestra sea "derivatizada", lo que resulta en largos tiempos de retención y picos anchos en el cromatograma[168,169]. Alternativamente, la cromatografía líquida ha sido usada por distintos autores por presentar esta técnica diversas ventajas: tiempos cortos de retención, la muestra no debe ser derivatizada y la técnica permite una cuantificación absoluta por el uso de estándares internos que co-eluyen con los ácidos grasos de interés[170]. Sin embargo, debido a la extrema complejidad de la fracción lipídica, un solo método de cromatografía líquida no proporciona la separación necesaria para resolver eficientemente todos los compuestos lipídicos y lograr una cuantificación precisa. Varios métodos deben ser empleados o técnicas de fraccionamiento deben ser incluidas para resolver todas las especies lipídicas y así lograr una adquisición de data precisa en términos cualitativos y cuantitativos de las especies[171]. Por estos motivos, en este trabajo escogimos una metodología de análisis "shotgun" o no dirigida, para lograr así una comprensión más extensa del perfil de lípidos en los embriones.

Como primer resultado de este análisis, comparamos las cantidades relativas totales de ácido araquidónico (ARA, 20:4, ω6), ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6, ω3) y de sus precursores de cadena corta, el ácido linoleico (LA, 18:2, ω6) y el α-linolénico (ALA, 18:3, ω3) en fosfolípidos. Escogimos este conjunto de PUFAs debido a su gran variedad de funciones celulares, incluyendo la regulación génica, fluidez y función de la membrana y como precursores de distintas clases de moléculas de señalización[172]. Fue de nuestro interés incluir en este análisis también los niveles de ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5, ω3) en fosfolípidos, pero este lípido en particular resultó indetectable o su abundancia extremadamente baja (datos no mostrados). Cada clase de fosfolípido unido a PUFA fue calculado como la sumatoria de las subespecies individuales que contuvieran el PUFA en particular entre sus cadenas de ácido graso. A través de este primer análisis, no detectamos cambios en la proporción de ARA ni DHA producto de la deficiencia SR-B1, **Figura 15. B-D**), sin embargo, observamos un aumento en los niveles de LA en fosfolípidos totales en los embriones de ese genotipo (**Figura 15.A**). Los niveles de ALA mostraron una tendencia a la baja en embriones SR-B1 KO de morfología normal y esta disminución fue significativa en embriones SR-B1 KO NTD (**Figura 15.C**). Finalmente, los niveles de DHA presentaron una divergencia producto del fenotipo en embriones SR-B1 KO, siendo más alta en el grupo NTD (**Figura 15.D**). A continuación, comparamos los niveles de estos PUFAs en las distintas clases de fosfolípidos, para entender si los cambios observados se concentraban en determinados fosfolípidos en particular (**Figura 16**). Los embriones SR-B1 KO exhibieron mayores niveles de LA en fosfatidilcolina (PC) y menores niveles de ARA en fosfatidiletanolamina (PE) (**Figura 16.A,C**). Los niveles de DHA presentaron una divergencia según la morfología embrionaria: los embriones SR-B1 KO normales exhibieron menores niveles de DHA en PC y los embriones con NTD niveles normales de esta especie (**Figura 16.D**) No observamos cambios en los niveles de ALA en PC (**Figura 16.B**). En el caso de este último, sólo se muestra la abundancia en PC, ya que ésta resultó extremadamente baja en las otras clases de fosfolípidos.

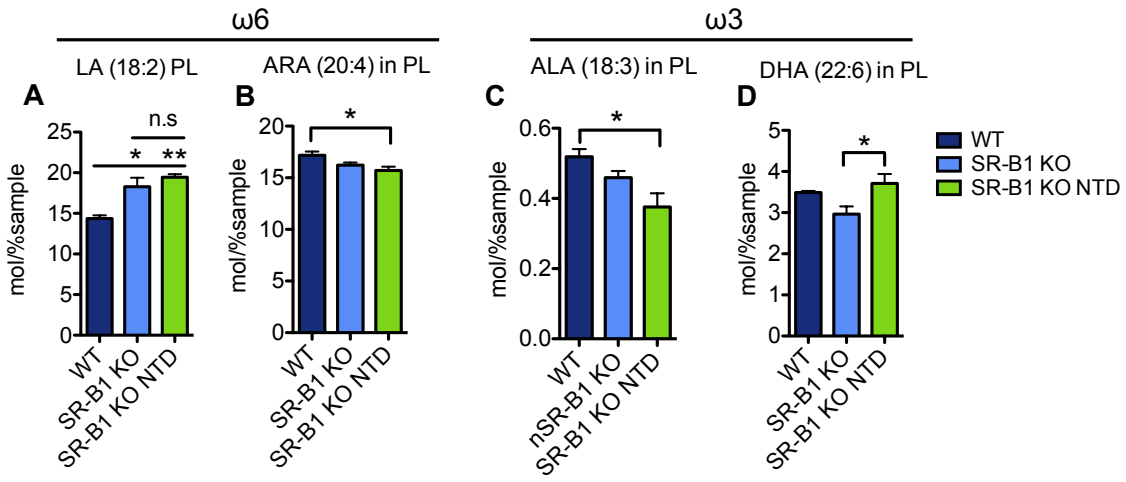


Figura 15. Contenido de PUFAs ω3 y ω6 en fosfolípidos totales en embriones WT, SR-B1 KO y SR-B1 KO NTD. Contenido de ácido A) linoleico (18:2), B) araquidónico (20:4), C) α-linolénico (18:3) y docosahexaenoico (22:6) en fosfolípidos totales en embriones WT, nSR-B1 KO y SR-B1 KO NTD (:*p<0,05, **p=0,005, ANOVA de 1 vía, post test de Tukey, n= 3 embriones por grupo).

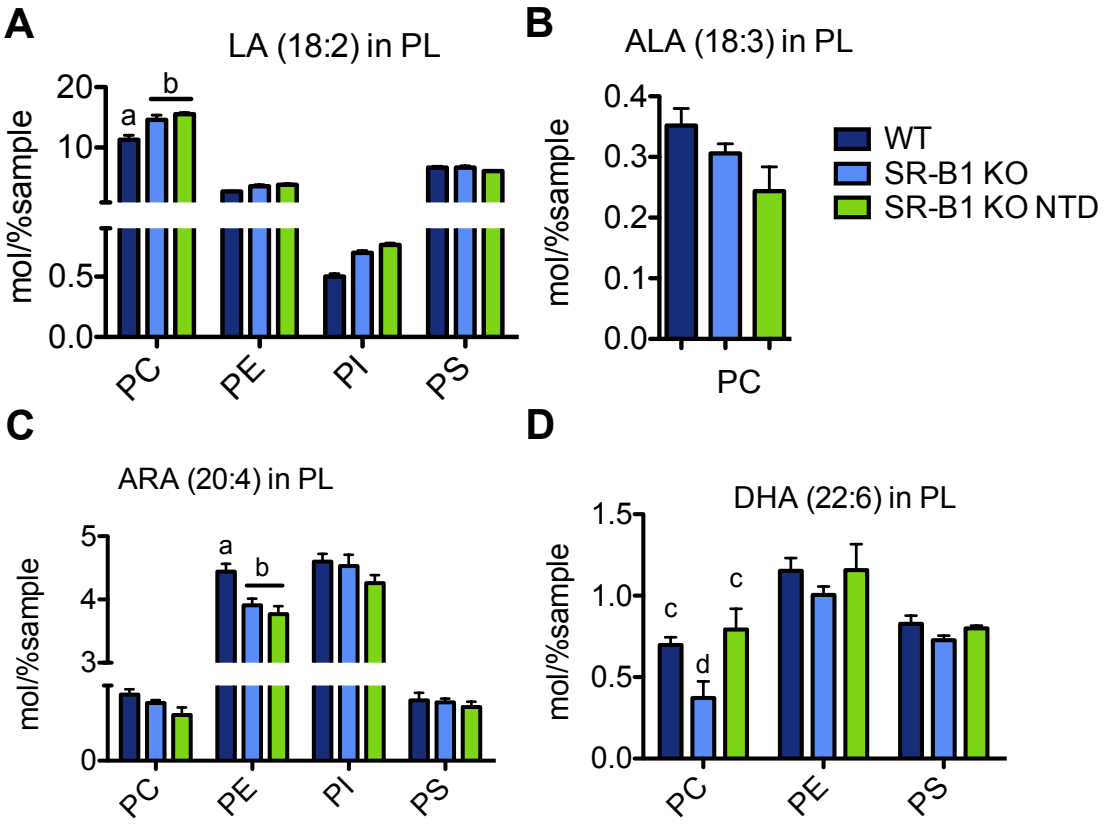


Figura 16. Contenido de PUFAs ω3 y ω6 en fosfolípidos en embriones WT, SR-B1 KO y SR-B1 KO NTD. Contenido de A) ácido linoleico (18:2,ω6), B, C) ácido α-linolénico (18:3,ω3), D) ácido araquidónico (20:4, ω6), y E) ácido docosahexaenoico (22:6, ω3) en embriones WT, nSR-B1 KO y SR-B1 KO NTD (a≠b, ***p<0,001, c≠d *p<0,05, ANOVA de 2 vías, post test de Bonferroni, n= 3 embriones por grupo). PC: fosfatidilcolina, PE: fosfatidiletanolamina, PI: fosfatidil inositol, PS: fosfatidilserina.

Para comprender si la disminución de ARA en PE en embriones SR-B1 KO sería consecuencia de procesos oxidativos, medimos los niveles de 8-isoprostanos, un producto de la oxidación radicalaria de este PUFA en particular, no encontrando diferencias entre los grupos embrionarios, aunque observamos una alta dispersión en los embriones con NTD (**Figura 17**).

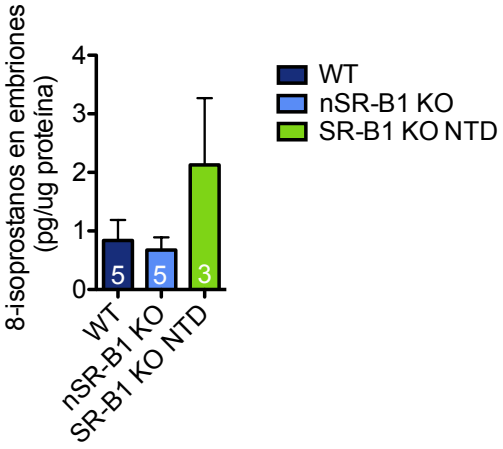


Figura 17. Análisis de 8-isoprostanos en embriones WT, SR-B1 KO KO y SR-B1 KO NTD. Concentración de 8-isoprostanos como marcador de oxidación del ácido araquidónico en embriones WT, SR-B1 KO de morfología normal y SR-B1 KO con NTD (n.s, ANOVA de 1 vía). El número de embriones se indica dentro las barras.

Para evaluar si además de cambios en las abundancias de PUFAs en fosfolípidos, existirían cambios en los niveles totales de fosfolípidos, no unidos necesariamente a PUFAs, comparamos los niveles de las distintas clases de fosfolípidos entre los embriones de los distintos grupos. Incluimos en este análisis también los niveles de lisofosfolípidos (LysoP), el producto de hidrólisis de los fosfolípidos catalizado por fosfolipasas (**Figura 18**). Los embriones SR-B1 KO con NTD mostraron menores niveles de PC total, mientras que los otros fosfolípidos permanecieron inalterados (**Figura 18.A**). Al comparar los niveles de lisofosfolípidos, observamos que la deficiencia embrionaria de SR-B1 KO se asoció a mayores niveles de lisofosfatidilcolina (LPC, **Figura 18.B**). En concordancia con este resultado, los embriones SR-B1 KO con NTD presentaron significativamente menor proporción de PC/LPC (**Figura 19**).

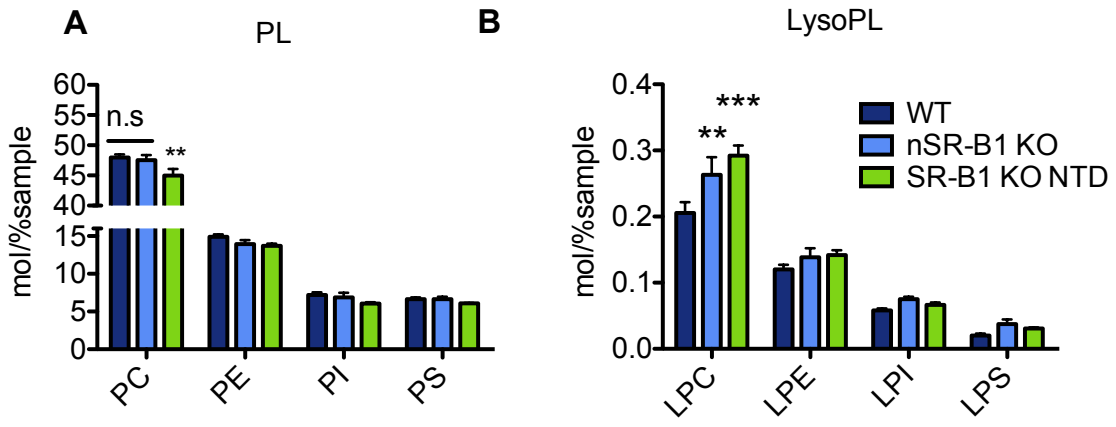


Figura 18. Contenido de lisofosfolípidos y fosfolípidos en embriones WT, SR-B1 KO y SR-B1 KO NTD. Contenido de A) lisofosfolípidos y B) fosfolípidos en embriones WT, nSR-B1 KO y SR-B1 KO NTD (***p<0,001, **p=0,05, Anova de 2 vías, post test de Bonferroni, n= 3 embriones por grupo). LPA: ácido lisofosfatídico, LPC: lisofosfatidilcolina, LPE: lisofosfatidiletanolamina, LPG: lisofosfatidilglicerol, LPI: lisofosfatidil inositol, LPS: lisofosfatidilserina,

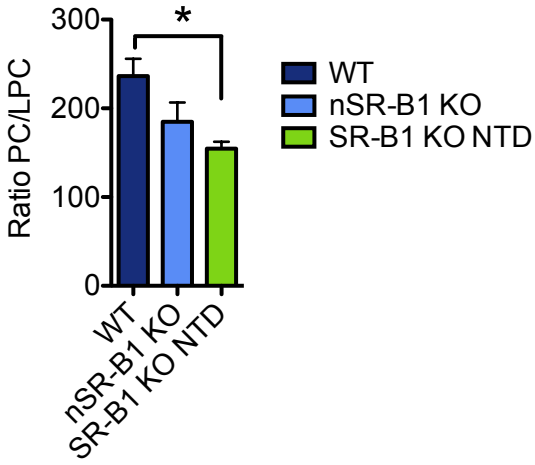


Figura 19. Proporción de PC/LPC en embriones WT, SR-B1 KO y SR-B1 KO NTD. Proporción de PC/LPC en embriones WT, nSR-B1 KO y SR-B1 KO NTD (*p<0,05, ANOVA de 1 vía, post test de Tukey, n= 3 embriones por grupo).

Debido a que i) el grado de insaturación aumenta la susceptibilidad de los lípidos a la oxidación y ii) los embriones SR-B1 KO presentaron menores niveles de PC (Figura 25.A), comparamos los niveles de PC según grado de insaturación entre los distintos grupos de genotipo/fenotipo (**Anexo, Figura 1**), no observando diferencias en los niveles de PC para grados de insaturación mayores a 2. Los embriones SR-B1 KO NTD presentaron menores niveles de PC con 1 grado de insaturación y tanto los embriones SR-

B1 KO normales como NTD presentaron mayores niveles de PC con 2 grados de insaturación, sugiriendo que la peroxidación no sería el mecanismo principal que explicaría la reducción de PC en embriones SR-B1 KO NTD. Si los lípidos altamente insaturados, como los PUFAs de cadena larga, no serían los principales ácidos grasos que contribuirían a la disminución de la PC en embriones SR-B1 KO NTD, nos propusimos identificar qué subespecies contribuirían a explicar las diferencias observadas para este fosfolípido entre los distintos grupos embrionarios. Para esto, analizamos todas las subespecies de la PC e incluimos también su respectivo lisofosfolípido (**Figura 20**). Los embriones SR-B1 KO NTD presentaron significativamente mayores niveles de PC unida a ácido linoleico (PC 16:0_18:2, 18:0_18:2, 18:1_18:2 y 18:2_18:2) y menores niveles de PC unida a ácido palmítico, palmitoleico y oleico (PC 16:0_16:0, 16:0_16:1, 16:0_18:1) (**Figura 20.A**). En comparación con embriones WT, los embriones SR-B1 KO también presentaron menores niveles de una subespecie unida a ácido palmítico y oleico (PC 16:0_18:1) y mayores niveles de una subespecie unida a ácido linoleico (16:0_18:2) (**Figura 20.A**). En cuanto a los lisofosfolípidos, los embriones SR-B1 KO NTD presentaron significativamente mayores niveles de LPC unida a ácido esteárico (LPC 18:0, **Figura 20.B**).

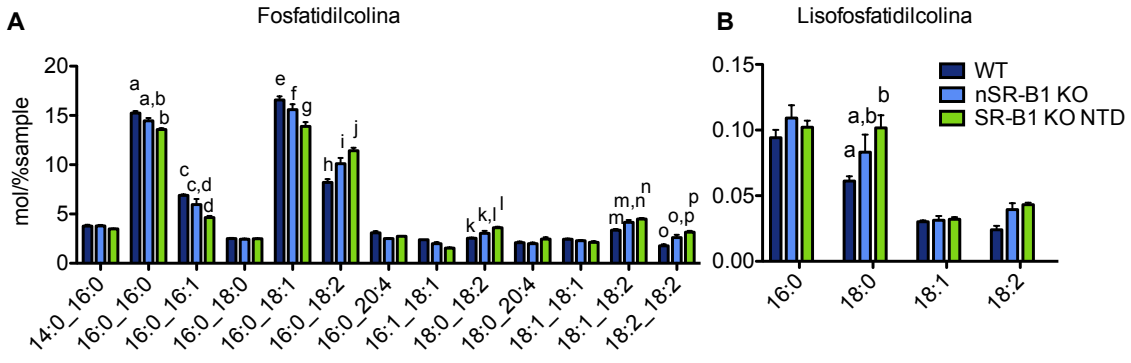


Figura 20. Subespecies de lisofosfatidilcolina y fosfatidilcolina en embriones WT, SR-B1 KO y SR-B1 KO NTD. Contenido de **A**) subespecies de lisofosfatidilcolina y **B)** fosfatidilcolina en embriones WT, nSR-B1 KO y SR-B1 KO NTD (a≠b, c≠d: ***p<0,001; h≠i≠j, k≠l, o≠p: **p<0,01; e≠f≠g, *p<0,05, ANOVA de 2 vías, post test de Bonferroni, n= 3 embriones por grupo).

Este resultado, en conjunto con el análisis de los grados de insaturación de la PC (**Anexo, Figura 1**), sugerirían que los embriones con NTD exhibirían cambios en las abundancias de fosfolípidos unidos a especies monoinsaturadas (MUFAs), específicamente del tipo ω9 y de sus sustratos insaturados de síntesis. Al analizar las abundancias de estos ácidos grasos en las distintas clases de fosfolípidos, no separados por subespecies, observamos que los embriones con NTD presentan menores niveles de ácido palmítico en PC (**Figura 21.A**), sin cambios en los niveles de ácido esteárico (**Figura 21.B**). Respecto a sus productos de elongación, la morfología de NTD se asoció a menores niveles de ácido palmitoleico (POA) en PC y a menores niveles de ácido oleico (OA) en PC y PE (**Figura 21.C,D**). En conjunto, estos resultados indicarían niveles alterados de MUFAs ω9 en determinados fosfolípidos en asociación al fenotipo de NTD, posiblemente debido a una elongación y/o desaturación de ácido palmítico a PA y/u OA levemente alterada.

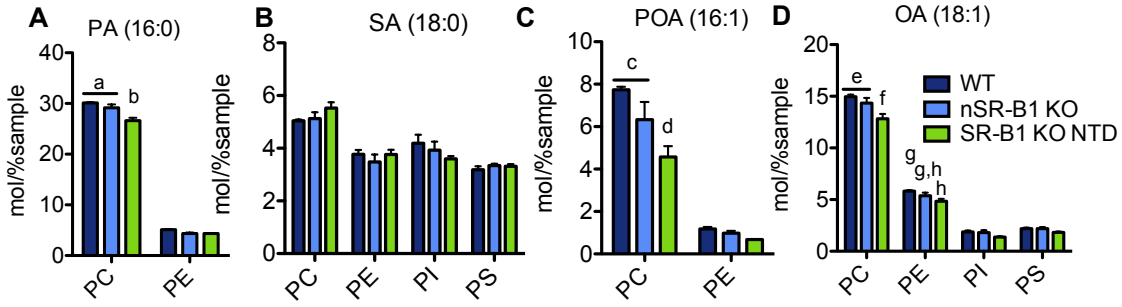


Figura 21. Contenido de ácido palmítico, esteárico y sus productos de desaturación en fosfolípidos en embriones WT, SR-B1 KO y SR-B1 KO NTD. Contenido de A) ácido palmítico (16:0), B) ácido esteárico (18:0), C) ácido palmitoleico (16:1, ω9), y D) ácido oleico (18:1, ω9) en embriones WT, nSR-B1 KO y SR-B1 KO NTD (a≠b: ***p<0,001; e≠f: **p<0,01; c≠d, g≠h *p<0,05, ANOVA de 2 vías, post test de Bonferroni, n= 3 embriones por grupo).

Aunque nuestra hipótesis inicial contempló estudiar principalmente cambios en los niveles de PUFAs en fosfolípidos asociados a la deficiencia embrionaria de SR-B1, la diversidad de lípidos analizados por la metodología empleada -alrededor de 20 clases- nos permitió una aproximación más global del estudio de los lípidos. Agrupando los lípidos según su categoría funcional, no observamos diferencias totales para las

categorías entre embriones WT y SR-B1 KO (**Figura 22**). Sin embargo, los embriones SR-B1 KO NTD presentaron levemente menor contenido de glicerofosfolípidos, posiblemente explicados por la reducción de PC e, inesperadamente, mayores niveles de lípidos de almacenamiento que embriones WT (**Figura 22**).

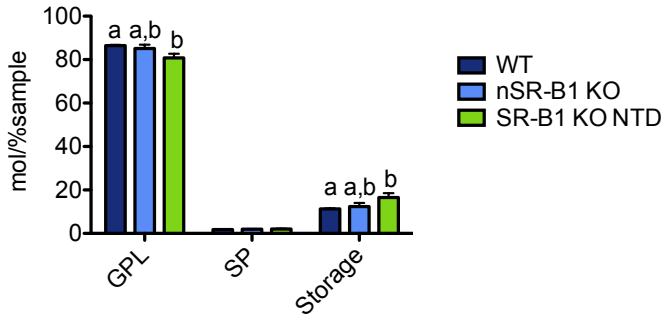


Figura 22. Contenido de lípidos según características funcionales en embriones WT, SR-B1 KO y SR-B1 KO NTD. Contenido de lípidos para cada categoría funcional; GPL: glicerofosfolípidos (cardiolipinas, lisofosfolípidos, fosfolípidos), SP: esfingolípidos (ceramidas, esfingomielina), STO: lípidos de almacenamiento (colesterol éster, triacilgliceroles) en embriones WT, nSR-B1 KO y SR-B1 KO NTD (a≠b: *p<0,05, Anova de 2 vías, post test de Bonferroni, n= 3 embriones por grupo).

Al aumento en los niveles de esta categoría de lípidos se observa una mayor contribución de triglicéridos (TAG) que de colesterol éster (**Figura 23.A**). La acumulación de triglicéridos en embriones SR-B1 KO NTD es aparentemente independiente del largo de la cadena de ácido grasos (**Figura 23.B**), aunque los niveles de triglicéridos con ácidos grasos que suman en total 52 y 54 átomos de carbono fueron significativamente más altos en relación a embriones WT. No se observa una acumulación diferencial de TAGs según el grado de insaturación (**Figura 23.C**).

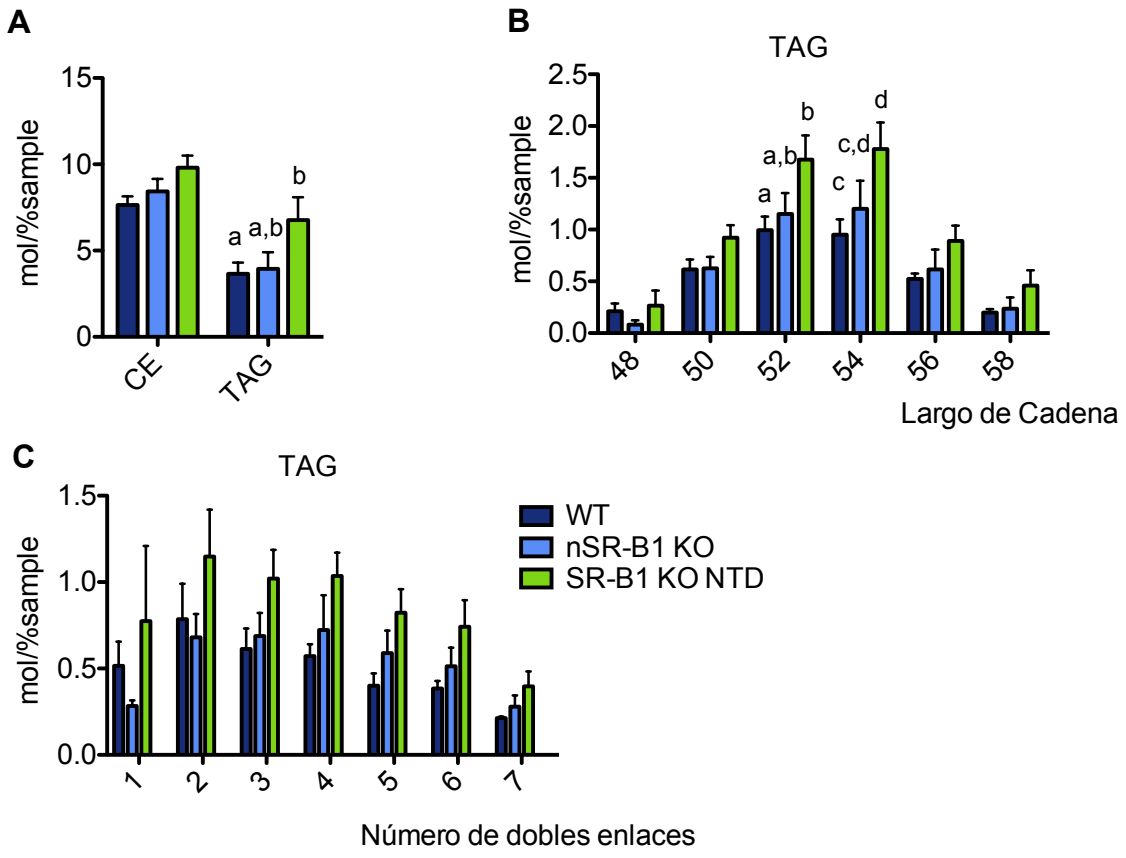


Figura 23. Contenido y características de lípidos de almacenamiento en embriones WT, SR-B1 KO y SR-B1 KO NTD. Contenido total de **A**) lípidos de almacenamiento (CE: colesterol éster, TAG: triacilgliceroles), **B)** largo de cadena y **C)** número de insaturaciones en triacilgliceroles en embriones WT, nSR-B1 KO y SR-B1 KO NTD (a≠b: *p<0,05; c≠d **p<0,01, ANOVA de 2 vías, post test de Bonferroni, n= 3 embriones por grupo).

A continuación, usando la base de datos de secuenciación masiva de RNA previamente generada para embriones WT, SR-B1 KO y SR-B1 KO NTD, identificamos distintos genes codificantes para enzimas involucradas en la síntesis, elongación, desaturación y transporte de ácidos grasos que presentaron cambios en su expresión debido a la falta de SR-B1 o al fenotipo de NTD, para explicar las alteraciones en lípidos previamente observadas (datos no mostrados). Luego validamos la expresión de estos genes por qPCR, incluyendo en este análisis embriones de madres suplementadas con vitamina E. Nuestra hipótesis consistió en que la deficiencia embrionaria de vitamina E

por falta de SR-B1 alteraría la expresión de genes involucrados en la captación y síntesis de ácidos grasos saturados e insaturados y que la suplementación con vitamina E normalizaría estas alteraciones. Como resultado, no observamos cambios en ninguno de los genes analizados (**Figura 24**). Los cambios en las especies lipídicas por deficiencia de SR-B1 no serían aparentemente explicados por mecanismos de expresión génica.

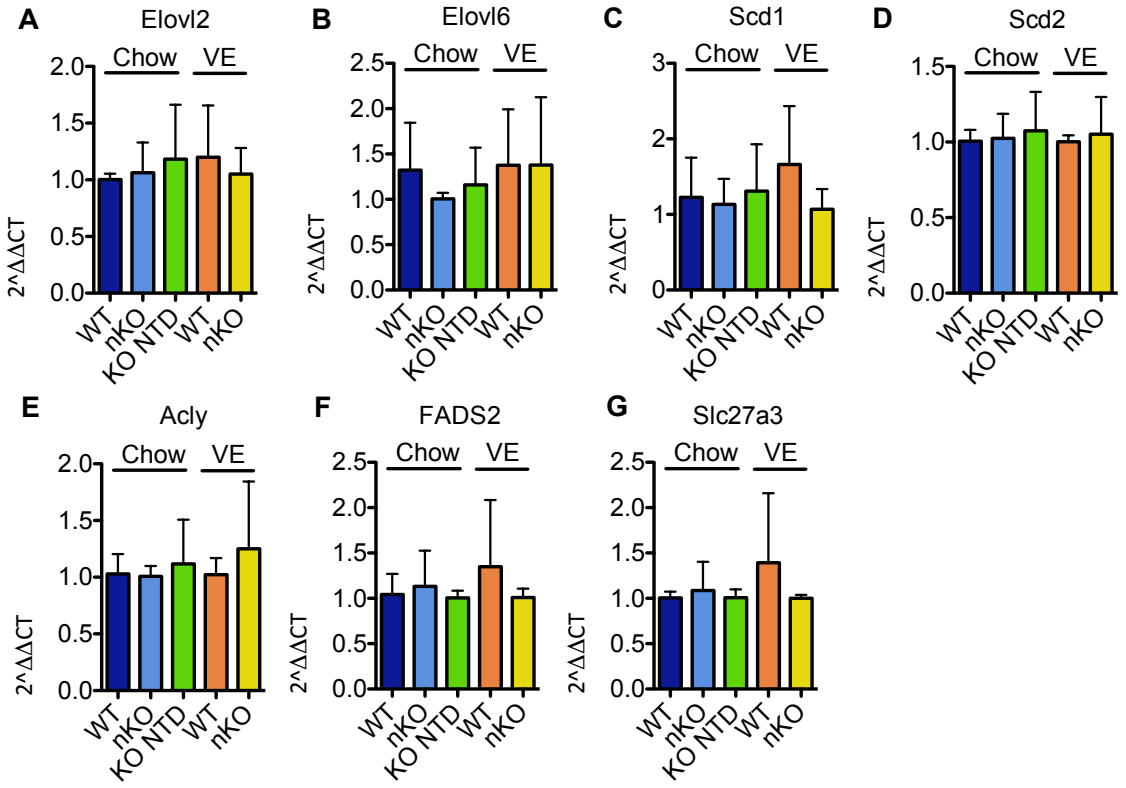


Figura 24.- Expresión de genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos en embriones SR-B1 WT y KO obtenidos de madres alimentadas con dieta control o suplementada con vitamina E. Niveles de expresión de A) Elovl2, B) Elovl6, C) Scd1, D) Scd2, E) Acly, F) FADS2, G) Slc27a3 en embriones de genotipo WT y SR-B1 KO obtenidos de hembras SR-B1 heterocigotas alimentadas postconcepcionalmente con dieta chow o suplementada con vitamina E (n=3 embriones por punto, n.s, ANOVA de 1 vía).

Finalmente, dado que: i) la vitamina E previene los NTD en embriones SR-B1 KO sin restaurar los niveles de vitamina E embrionarios pero acumulándose en el pYS, ii) existe acumulación de determinados lípidos (LA, TAG) en embriones SR-B1 KO NTD y iii) la vitamina E activa indirectamente la transcripción de PPARγ, un gen regulador de la captación de diversos lípidos, medimos los niveles de expresión de PPARγ en pYS de genotipo WT y SR-B1 KO obtenidos de madres alimentadas con dieta control o suplementada con vitamina E (**Anexo, Figura 2**). No observamos cambios en la expresión de PPARγ dependientes del genotipo ni de la dieta materna.

Como síntesis de este objetivo, tanto la falta de SR-B1 como el fenotipo de NTD se asocian a cambios en el contenido de lípidos. La ausencia de SR-B1 se asoció a una disminución de 2 PUFAs ω3 y ω6 de cadena larga: DHA y ARA, en PC y PE, respectivamente. A diferencia de los embriones SR-B1 KO con morfología normal, los embriones con NTD mostraron niveles normales de DHA-PC y disminución de MUFAs ω9 PC y/o PE. Adicionalmente, los embriones SR-B1 KO, independientemente del fenotipo, mostraron acumulación de LA en fosfolípidos totales, principalmente en PC. Los embriones con NTD presentaron disminución en la razón PC/LPC, sugiriendo hidrólisis de este fosfolípido, probablemente por la activación de mecanismos inflamatorios y un aumento en los niveles de TAG. Aunque estos hallazgos de momento constituyen una asociación y no podemos establecer una relación de causalidad, constituyen un resultado preliminar para estudiar a futuro si la suplementación con vitamina E prevendría el NTD al proteger al embrión de las alteraciones lipídicas observadas.

CAPÍTULO II – OBJETIVO 1

En este capítulo de la tesis nos propusimos establecer un modelo de elevado estrés oxidativo materno en ratonas heterocigotas para SR-B1 mediante la alimentación de una dieta hipercalórica, rica en grasas y azúcares ("High fat, high sugar"), y analizar la biodisponibilidad de vitamina E en la madre gestante así como la incidencia de NTD en los embriones SR-B1 KO en este grupo de ratonas, en comparación con un grupo I) control, de ratonas preñadas alimentadas con dieta chow y II) suplementado con vitamina E.

Como parte de este protocolo, las ratonas fueron pesadas semanalmente durante las 9 semanas de tratamiento, registrándose un aumento de peso moderado en el grupo HFHS respecto al grupo control (**Figura 25.A,B**). Las ratonas de los grupos HFHS consumieron en promedio la mitad de alimento (en peso) por día que las del grupo chow (datos no mostrados), explicando posiblemente por qué la administración de la dieta hipercalórica por 9 semanas solo provocó una ganancia moderada, aunque significativa, de peso.

Debido a que las dietas con alto contenido de grasas y la adiposidad son factores que han sido implicados en perturbaciones de la función reproductiva femenina, al inducir desordenes hormonales y causar lipotoxicidad en ovocitos y células de la granulosa[173,174,175] evaluamos el efecto de la dieta sobre la fertilidad de las hembras. No se observaron diferencias en la tasa de preñez, representada por el número de hembras preñadas respecto del total de las hembras que se aparearon, entre los grupos chow y HFHS (**Figura 25.C**). En todos los grupos de ratonas se registró un número promedio de embriones por hembra similar (**Figura 25.D**).

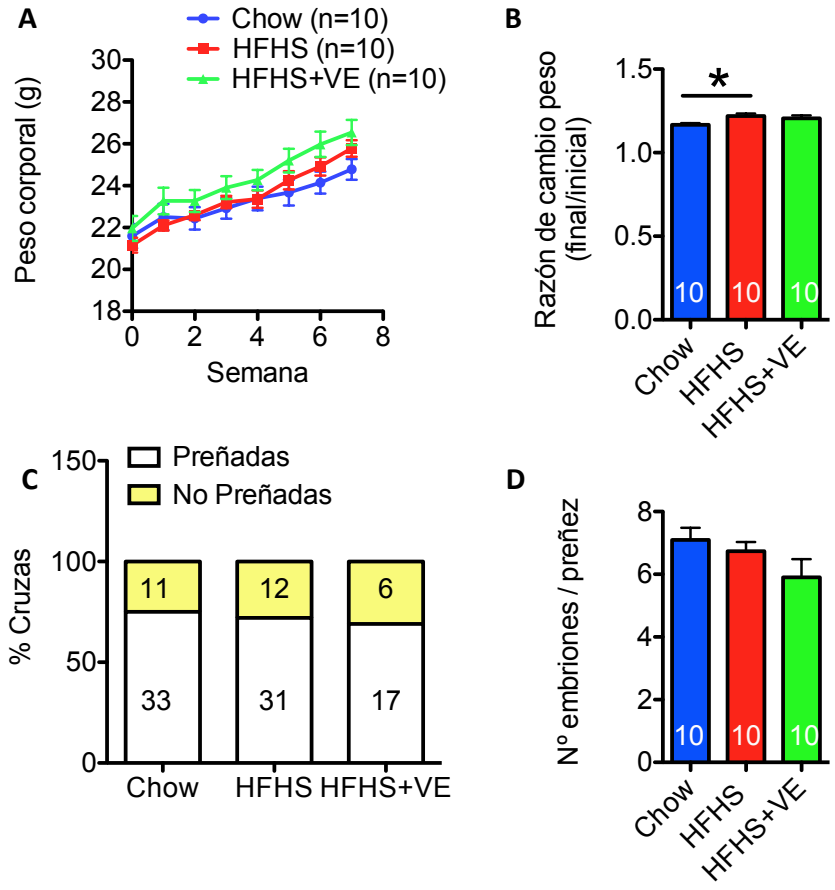


Figura 25.- Efecto de la dieta HFHS sola o suplementada con vitamina E sobre el peso corporal y la fertilidad. A) Peso corporal medio por animal (1-2 meses edad al comienzo de la dieta) durante 9 semanas de tratamiento con dieta chow, HFHS o HFHS+VE. B) Razón de cambio de peso expresado como el peso al finalizar la dieta respecto del peso al empezarla (*p=0,034, ANOVA de 1 vía, post Test de Tukey). C) Proporción de hembras preñadas vs. no preñadas del total de hembras que se cruzaron (con plugs o tampones vaginales). D) Nº de embriones por hembra para los distintos grupos experimentales. El número de hembras o embriones para cada grupo se indica dentro de las barras.

Dado que además de inducir obesidad, la administración de dietas altas en grasas en roedores constituye un modelo de estudio de diabetes tipo 2[176,177] y la diabetes es un factor de riesgo de NTD, caracterizamos el metabolismo de la glucosa al término de las intervenciones dietarias evaluando la tolerancia a la glucosa y computando el modelo homeostático de resistencia a la insulina (**Figura 26. A-D**). El test de tolerancia oral a la

glucosa muestra que en las hembras que consumieron la dieta chow, los niveles plasmáticos de glucosa alcanzaron un máximo a los 15 minutos, luego la glucosa comienza a disminuir (**Figura 26.A**). En contraste, las hembras de los grupos HFHS y HFHS+VE alcanzaron el máximo de glucosa plasmática a los 30 min. A los minutos 30 y 60, los niveles de glucosa fueron significativamente más altos en el grupo HFHS respecto al grupo control, mientras que la suplementación con vitamina E mantuvo la glicemia en valores intermedios. A las 2 h, las hembras de todos los grupos llegaron a niveles similares de glucosa. El área bajo la curva fue significativamente mayor para el grupo HFHS (**Figura 26.B**). El estado de intolerancia a la glucosa producto de la dieta HFHS no se vio acompañado de un fenotipo de resistencia a la insulina (**Figura 26.C-D**) ni a cambios en los niveles de GLP-1, una hormona intestinal que promueve la secreción de insulina (**Figura 26.E**). Sin embargo, la dieta HFHS aumentó significativamente los niveles de péptido-C, un subproducto del clivaje de la proinsulina (**Figura 26.F**). Debido a que la vida media del péptido C es más elevada que la de la insulina, sus niveles en sangre son más altos, siendo un marcador de la producción de insulina en el tiempo[178]. La suplementación con vitamina E llevó los niveles de péptido-C a un estado intermedio (**Figura 26.F**). Por otra parte, las intervenciones dietarias no modificaron significativamente los niveles de adiponectina, una hormona protectora de la resistencia a la insulina (**Figura 26.G**). Estos resultados muestran que la ingesta de la dieta HFHS por 9 semanas provoca en las ratonas SR-B1 HET aumento de peso, intolerancia a la glucosa y sobreproducción de insulina. Interesantemente, la suplementación con vitamina E previene todas estas condiciones.

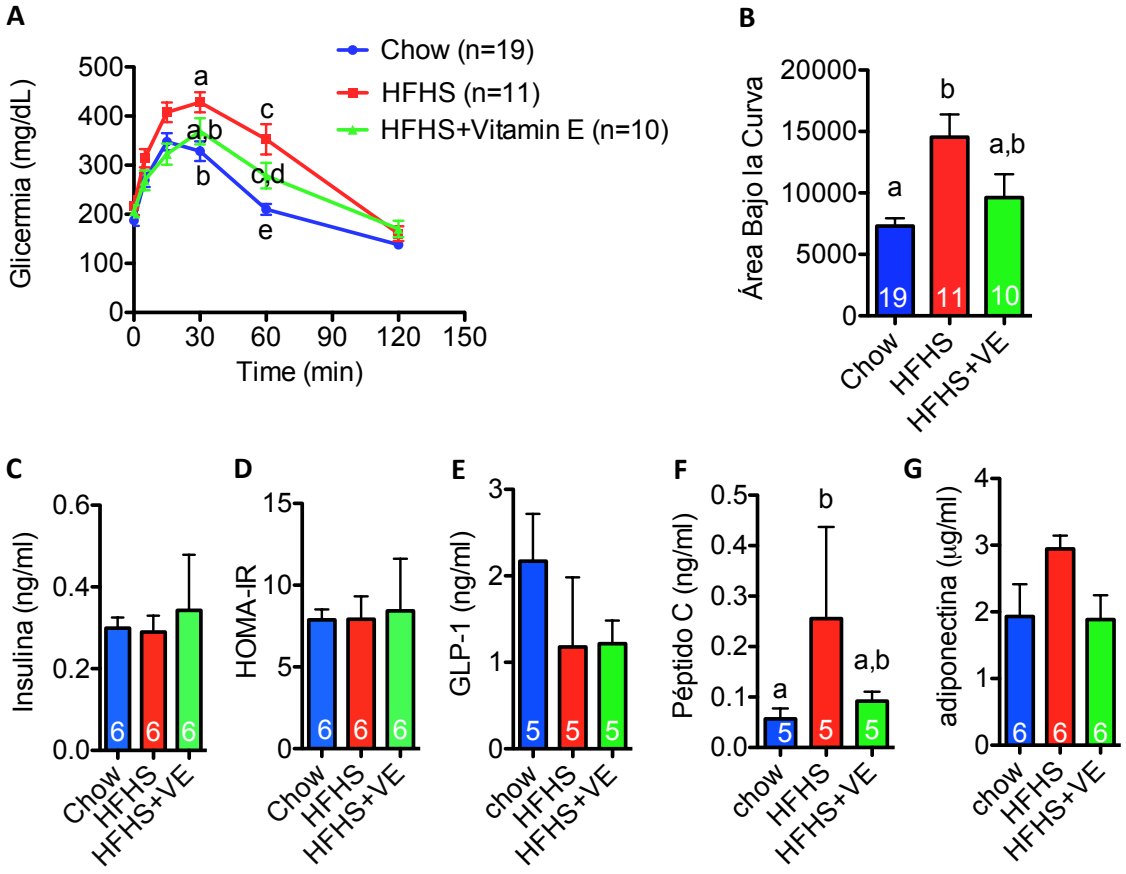


Figura 26.- Efecto de la dieta HFHS sola o suplementada con vitamina E sobre la tolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina y niveles de GLP-1, péptido C y adiponectina. Comparación entre A) curvas de tolerancia a la glucosa (a≠b, c≠e, ***p<0,001, d≠e, *p<0,05, ANOVA de 2 vías, post test de Bonferroni), B) sus respectivas áreas al finalizar la dieta (a≠b, **p=0,0078 ANOVA de una vía, post test Bartlett), C) los niveles de insulina en ayuno, D) el índice de resistencia a la insulina y los niveles de E) GLP-1, F) Péptido C (a≠b, **p=0,0049, ANOVA de una vía, post test Dunn) y G) adiponectina entre los distintos grupos experimentales. El número de ratonas analizado se muestra dentro de las barras.

La administración de dietas altas en grasas en roedores puede perturbar la función hepática -provocando esteatosis-, lo cual se asocia a un perfil lipídico pro-aterogénico y constituye un factor de riesgo para la diabetes[179,180]. Un ejemplo extremo de función hepática alterada lo constituye el hígado graso no alcohólico (NASH), para cuyo

tratamiento se ha planteado el uso de la vitamina E. En niños con NASH, la vitamina E mejora la función hepática, el daño oxidativo y corrige el perfil lipídico[181]. Considerando esta evidencia, medimos la concentración de lípidos circulantes y hepáticos (**Figura 27**). La dieta alta en grasas se asoció a un aumento del colesterol circulante (**Figura 27.A**) y a un aumento en la acumulación de colesterol y triglicéridos en el hígado (**Figura 27.B, D**), mientras que los niveles de triglicéridos séricos no presentaron cambios (**Figura 27.C**). Interesantemente, la vitamina E mantuvo los niveles de estos lípidos en un estado intermedio (**Figura 27.A, B, D**), sugiriendo un efecto protector de la vitamina E sobre las alteraciones en el metabolismo lipídico inducidas por la dieta.

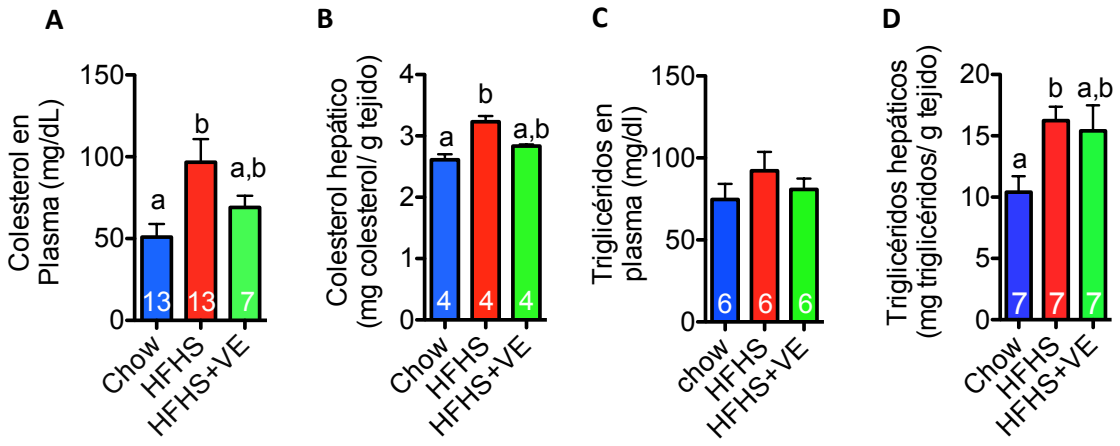


Figura 27. Efecto de la dieta preconcepcional HFHS sola o suplementada con vitamina E sobre los lípidos circulantes y hepáticos. Comparación entre niveles de colesterol en A) plasma (*p=0.0232, ANOVA de una vía, post test Tukey), e B) hígado (**p=0.0097, ANOVA de una vía, post test Dunn) y de triglicéridos en C) plasma (n.s, ANOVA de una vía) e D) hígado (*p=0.0342, ANOVA de una vía, post test de Tukey) en hembras preñadas (E9,5) de los distintos grupos experimentales. El número de hembras se indica dentro de las barras.

Para evaluar el estado de la vitamina E en las hembras preñadas de los distintos grupos, medimos los niveles de α-tocoferol en plasma y en hígado (**Figura 28**). Corregimos los valores de α-tocoferol en plasma por los niveles correspondientes de lípidos circulantes ya que en pacientes obesos esta corrección constituye un marcador más adecuado del estado de la vitamina E[182]. Condiciones como la edad o la obesidad

aumentan los niveles de lípidos circulantes, como observamos en el caso del colesterol en nuestro modelo. Las hembras preñadas del grupo HFHS presentaron una tendencia promedio de disminución cercana al ~40% en los niveles de α-tocoferol/lípidos en suero y de α-tocoferol hepático, aunque esta tendencia no fue estadísticamente significativa (**Figura 28. A, B**). La suplementación con vitamina E provocó un aumento significativo del contenido de vitamina E circulante y hepática respecto a los niveles en animales que consumieron la dieta HFHS no suplementada (**Figura 28. A, B**). Estos resultados indicarían que la administración de la dieta HFHS modificaría de forma moderada pero no significativa los niveles maternos de vitamina E circulantes o reservados en el hígado.

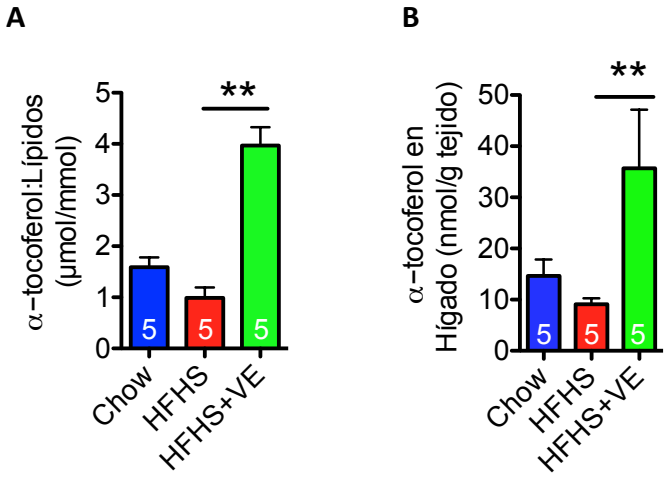


Figura 28. Efecto de la dieta preconcepcional HFHS sola o suplementada con vitamina E sobre los niveles de vitamina E circulante y hepática. Concentración de α-tocoferol en A) plasma corregida por lípidos circulantes (colesterol y triglicéridos) y en B) hígado de ratonas preñadas (E9,5) alimentadas con dieta chow, HFHS ó HFHS suplementada con vitamina E (**p=0.0037 y **p=0.0108 para A y B, respectivamente, ANOVA de una vía, post test de Dunn). El número de hembras se indica dentro de las barras.

Para explorar el impacto de la dieta HFHS sobre el estado oxidativo materno, cuantificamos distintos marcadores antioxidantes y de daño oxidativo en el plasma de las ratonas preñadas (**Figuras 29 y 30**). Debido a que la intervención con la dieta HFHS provocó acumulación de lípidos en el hígado (**Figura 27. B, D**), condición que se asocia comúnmente a estrés oxidativo hepático, incluimos también muestras de hígado en este análisis.

Como marcadores del estado antioxidante materno, evaluamos la capacidad antioxidante del plasma, mediante un ensayo basado en el tiempo de oxidación de la sonda fluorescente dihidrorodamina 123 (DHR) (**Figura 29.A**), los niveles de vitamina C en plasma (**Figura 29.B**) e hígado (**Figura 29.C**) a través de un ensayo enzimático y la razón de glutatión reducido vs. oxidado tanto en hígado (**Figura 29.D**) como en glóbulos rojos (**Figura 29.E**), no encontrándose diferencias en ninguno de estos parámetros analizados entre los grupos experimentales. Como parámetros de daño oxidativo en lípidos determinamos la concentración de TBARS en plasma (**Figura 30.A**) e hígado (**Figura 30.B**), no encontrándose diferencias tampoco en este marcador en ambos tipos de muestra. Finalmente, como marcador de daño oxidativo en proteínas producto de la peroxidación lipídica, detectamos por WB la presencia de residuos de 4-hidroxinonenal (4-HNE) -un producto de la peroxidación lipídica altamente reactivo- en muestras de plasma e hígado, no encontrándose tampoco diferencias entre los grupos (**Figura 30.C-F**). Los resultados obtenidos muestran que la administración de una dieta HFHS por 9 semanas no induce cambios significativos en el estado antioxidante ni daño oxidativo en las madres.

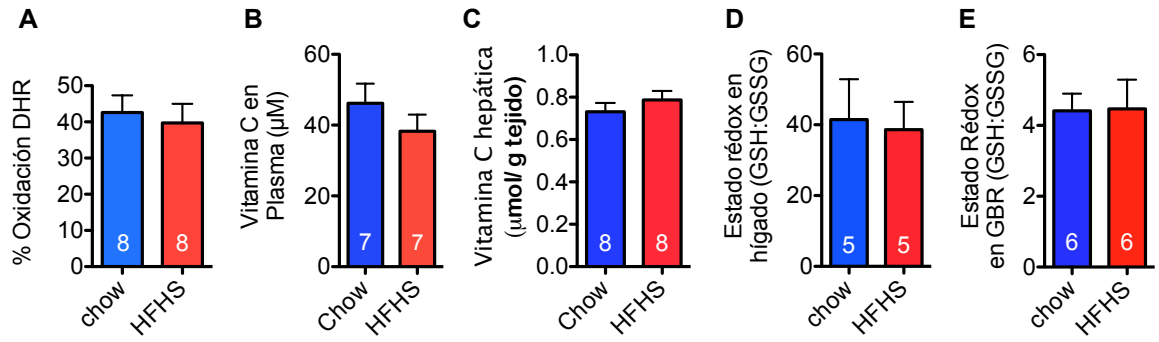


Figura 29.- Efecto de la dieta preconcepcional HFHS sobre marcadores del sistema antioxidante endógeno en plasma e hígado en ratonas preñadas (E9,5). A) Porcentaje de oxidación de la sonda dihidrorodamina 123 (DHR) en presencia de plasma extraído de ratonas preñadas de los grupos control y HFHS (n.s, test de T-Student). Niveles **B)** plasmáticos y **C)** hepáticos de vitamina C y proporción de glutatión reducido vs. oxidado (GSH:GSSG) en **D)** hígado y **E)** glóbulos rojos (GBR) de las ratonas de los distintos grupos experimentales. El número de animales se indica dentro de las barras (n.s, test de T-Student, para **A-E**).

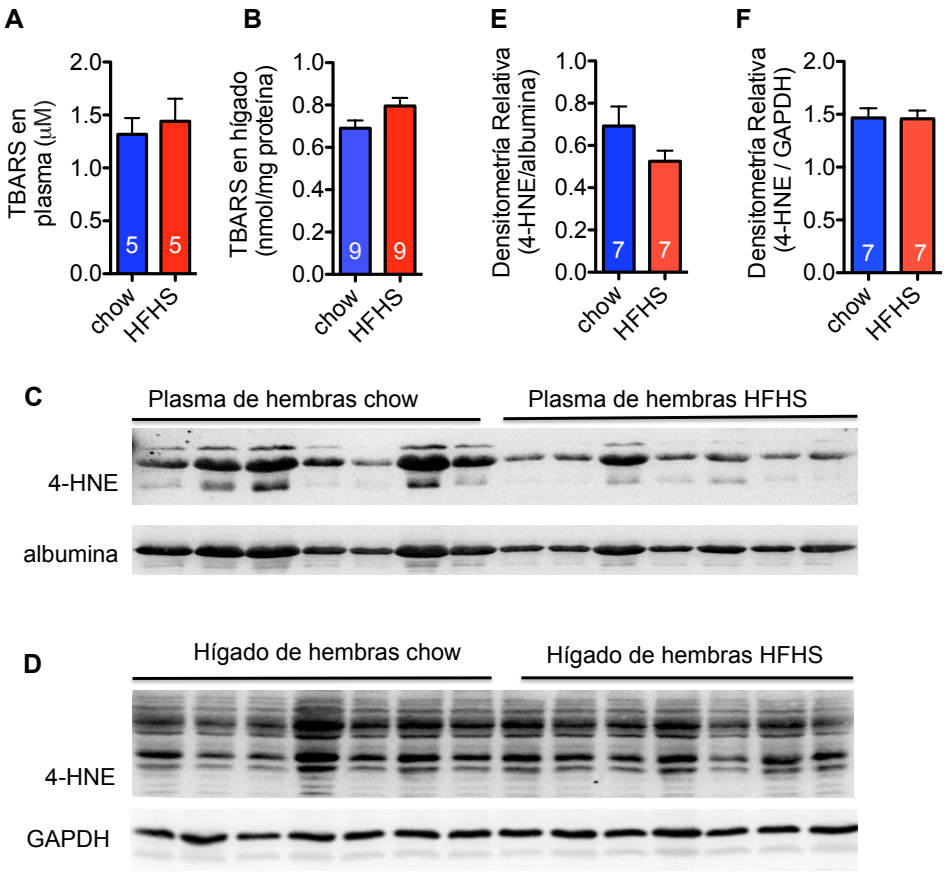


Figura 30.- Efecto de la dieta HFHS sobre el estado oxidativo en las ratonas preñadas (E9,5). A-B) Concentración de TBARS en A) plasma y B) lisados de hígados extraídos de ratonas preñadas bajo dieta control o HFHS. C-D) Detección por Western blot de aductos proteicos de 4-hidroxinonenal (4-HNE), como marcador de daño oxidativo en lípidos, en C) plasma y en D) lisados de hígados extraídos de ratonas preñadas bajo dieta control o HFHS y su E, F) cuantificación relativa por el respectivo control de carga (n.s, test de t-Student, para A-F). El número de hembras se indica dentro de las barras.

A continuación, realizamos el análisis morfológico de los embriones para determinar la proporción de aquellos con NTD. Los embriones SR-B1 KO del grupo chow presentaron una proporción de NTD de aproximadamente el 25% (**Figura 31.C**), similar a la reportada en estudios anteriores[42,37]. Por otra parte, los embriones SR-B1 KO del grupo HFHS presentaron una proporción de NTD cercana al 50%. Un resultado

interesante de este estudio fue que los embriones SR-B1 WT y HET, que en ratonas alimentadas con dieta chow presentan una incidencia casi nula o muy baja de NTD, respectivamente, presentaron una proporción de NTD de 19% (WT) y 25% (HET), aproximadamente (**Figura 31. A-B**). La diferencia entre las proporciones de NTD entre los grupos chow y HFHS no fue significativa para los embriones WT ni KO pero sí alcanzó significancia estadística para los embriones HET. Interesantemente, la suplementación materna con vitamina E redujo la incidencia de NTD en los embriones de todos los genotipos: 8% (WT), 7% (HET) y 0% (KO). Los embriones con NTD del grupo HFHS presentaron dimorfismo sexual, desarrollándose el fenotipo principalmente en hembras (75%), en proporción similar al dimorfismo observado en embriones SR-B1 KO con NTD de madres alimentadas con dieta control (**Figura 32**).

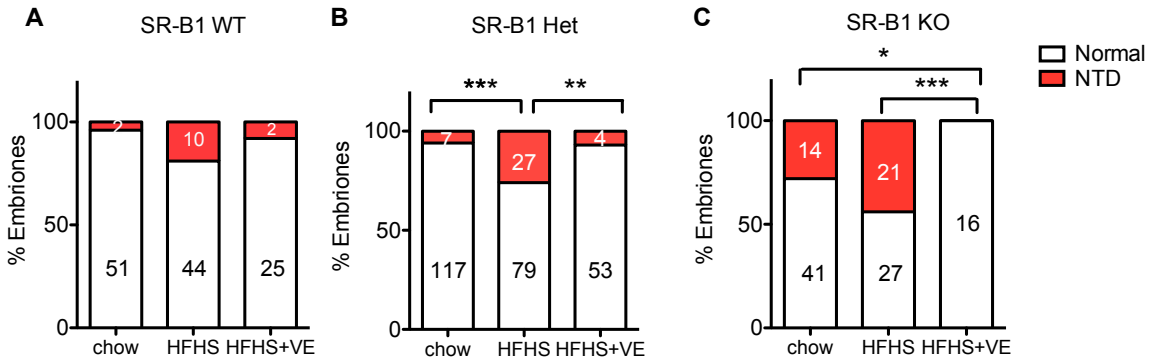


Figura 31.- Efecto de la dieta HFHS sola o suplementada con vitamina E y del genotipo de SR-B1 sobre la incidencia de NTD en embriones. A-C) Proporción de embriones con NTD vs. embriones normales para cada genotipo de SR-B1 y dieta materna (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, Test de Chi-Cuadrado). El número de embriones se indica dentro de las barras.

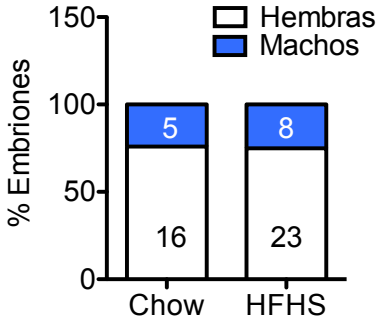


Figura 32.- Proporción del sexo en embriones con NTD obtenidos de madres alimentadas con dieta control o HFHS. Proporción de hembras/machos en embriones SR-B1 KO NTD de madres alimentadas con dieta chow o de madres alimentadas con dieta HFHS.

Adicionalmente a la presencia de NTD analizamos también el estado de desarrollo de los embriones en E9,5, dato que no se había analizado en el laboratorio previamente. Observamos que, mientras que la mayoría de los embriones presentaban el tamaño esperado para el estadío E9,5 (>12 somitos), y se encontraban en la etapa del desarrollo normal según la clasificación de Theiler (TS14 a TS15), algunos embriones presentaban retardo en el desarrollo para ese día de la preñez, con un número de somitos menor a 12, lo que corresponde al estadío de TS13 (**Figura 33 A-B**). Todos los embriones retardados presentaron el tubo neural abierto en la región anterior, aunque no todos los embriones con NTD presentaron retardo (puntos rojos, **Figura 33.A**). Al comparar la incidencia de embriones con retraso del desarrollo para cada genotipo de SR-B1, entre los distintos grupos de dieta materna (**Figura 33. C, D, E**), se observó que la dieta HFHS aumentó significativamente dicha incidencia en embriones SR-B1 HET y que la suplementación con vitamina E también previno completamente ese fenotipo embrionario (**Figura 33. D**). Finalmente, para evaluar si la aparición de embriones con retardo del desarrollo se concentró específicamente en ciertas camadas de preñeces susceptibles a la toxicidad de la dieta, ordenamos el número de embriones retardados según camada para 10 camadas representativas (**Figura 34.A**). El grupo suplementado con vitamina E fue excluido de este análisis ya que solo unos pocos embriones en algunas camadas presentaron este fenotipo en esas ratonas. Observamos que los embriones con retardo se distribuyeron de manera relativamente equitativa entre las camadas. El número promedio de embriones retardados por camada para el grupo HFHS fue aproximadamente el doble respecto al grupo control (**Figura 34.B**).

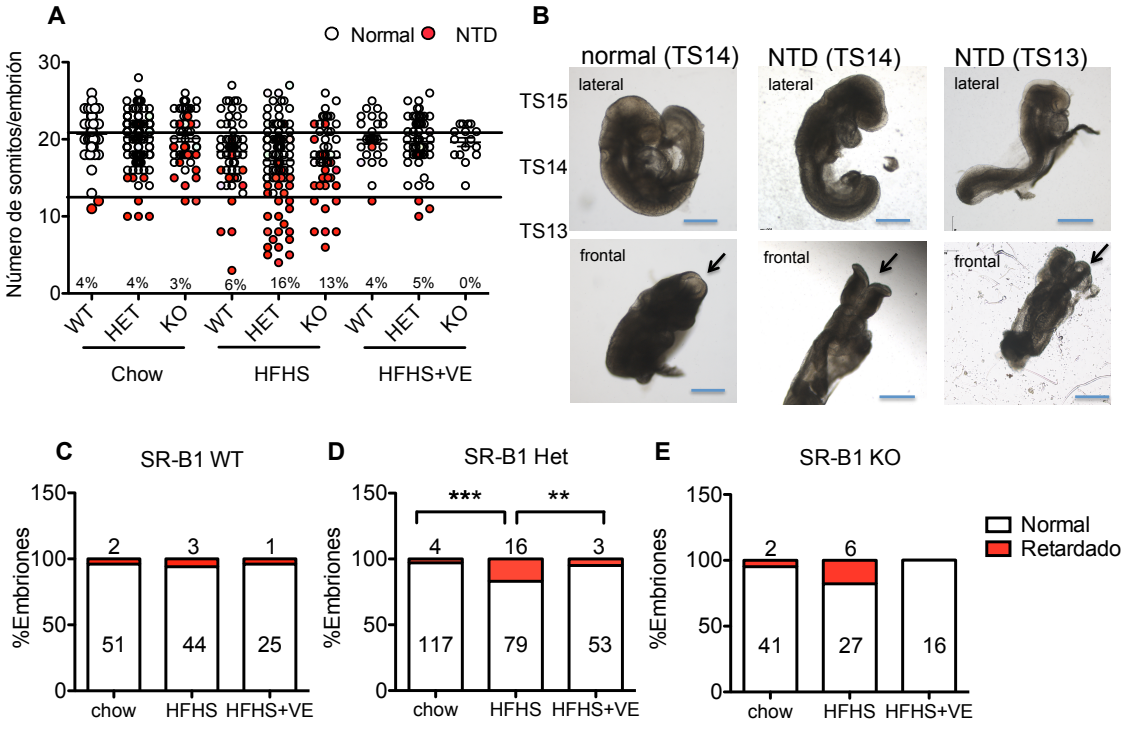


Figura 33.- Efecto de la dieta HFHS sola o suplementada con vitamina E y del genotipo de SR-B1 sobre el tamaño de los embriones. A) Número de somitos en cada embrión para los distintos grupos de dieta y genotipo de SR-B1. Las líneas marcan el estadío de Theiler: TS14 (13-20 somitos), TS13 (8-12 somitos). Puntos blancos: embriones con el tubo neural cerrado. Puntos rojos: embriones con el tubo neural abierto. Porcentajes: embriones con retraso (TS13) respecto del total de embriones en cada grupo. B) Vistas laterales y frontales de embriones E9,5 con i) morfología y tamaño normal, ii) NTD y tamaño normal y iii) NTD y retardo del desarrollo. Flechas: región anterior. Barra: 500 µm. C-E) Proporción de embriones retardados vs. normales para cada genotipo de SR-B1 y dieta materna (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001para E, Test de Chi-cuadrado).

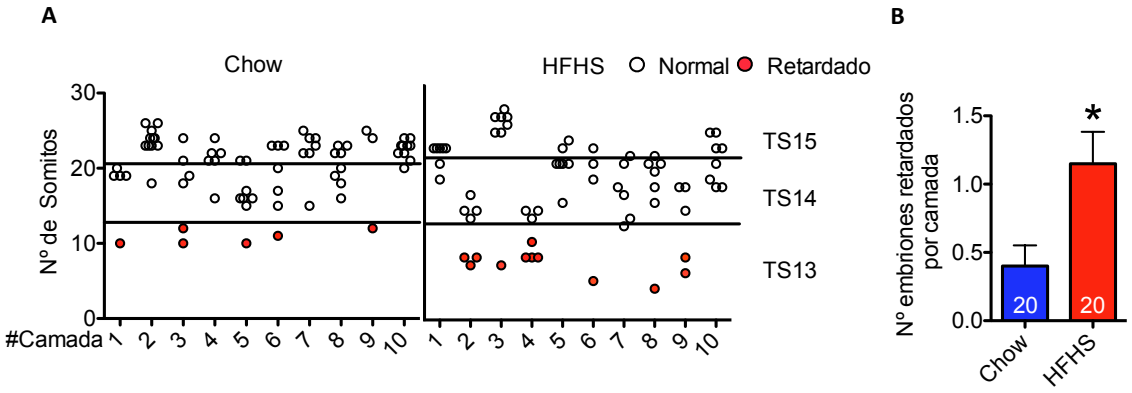


Figura 34.- Efecto de la dieta HFHS sobre el número de embriones con retardo del desarrollo por camada. A) Número de somitos en cada embrión distribuidos según camada para 10 camadas representativas, para los grupos control y HFHS. Puntos blancos: embriones de tamaño normal. Puntos rojos: embriones con retardo del desarrollo (TS13). **B)** Número de embriones retardados por camada para los grupos de dieta materna chow y HFHS. El número de camadas se encuentra dentro de las barras (**p<0,01, test de T-Student).

Una vez caracterizado el fenotipo embrionario, estudiamos el efecto de las intervenciones dietarias maternas sobre los niveles de vitamina E y la peroxidación embrionaria y extraembrionaria. El nivel de vitamina E en embriones no mostró diferencias significativas dependientes de la dieta, sólo del genotipo de SR-B1 (**Figura 35.A**), principalmente debido al factor de deficiencia de vitamina E de los embriones SR-B1 KO. En pYS, los resultados muestran que la dieta HFHS provocó globalmente una reducción en los niveles de vitamina E, independiente del genotipo de SR-B1, y que estos niveles no se restauraron al suplementar a la madre con vitamina E (**Figura 35.B**). Debido a que I) en el hígado, SR-B1 es regulado negativamente por niveles altos de glucosa[183] y a que II) la dieta HFHS induce intolerancia a la glucosa (**Figura 26.A-B**), evaluamos por WB los niveles de SR-B1 en las células del pYS para explorar si la reducción en los niveles de vitamina E en la membrana extraembrionaria estaría mediada por cambios en la expresión de SR-B1 (**Anexo, Figura 3**). Aunque no detectamos cambios significativos debido a la dispersión de los datos, observamos una tendencia de mayor cantidad de la proteína (~50%) en el grupo suplementado con vitamina E. Luego, para evaluar el efecto de la dieta sobre el daño oxidativo en los lípidos embrionarios y de los tejidos extraembrionarios, medimos la concentración de TBARS en esas muestras. La

dieta materna no tuvo un efecto sobre la peroxidación lipídica en general en embriones (**Figura 36.A**). Sólo se observó un aumento de este marcador en los embriones KO del grupo HFHS más vitamina E. Por otra parte, sí se observaron diferencias en los niveles de peroxidación en el tejido extraembrionario entre dietas, (**Figura 36.B**), posiblemente debido a que la suplementación con vitamina E redujo estos niveles a aproximadamente la mitad respecto al grupo HFHS sin suplementación, indistintamente del genotipo. Para complementar este análisis, medimos por ELISA los niveles de un segundo marcador de peroxidación lipídica, los niveles de 8-isoprostanos, un producto de la degradación oxidativa del ácido araquidónico (**Anexo, Figura 4**). Analizamos este marcador en embriones de genotipo SR-B1 heterocigoto, para evaluar el efecto de la dieta de forma aislada. Tampoco observamos diferencias en los niveles de este segundo marcador por la ingesta de la dieta HFHS y si bien el nivel de 8-isoprostanos fue menor en el grupo HFHF+VE, la diferencia con el grupo HFHS no fue significativa. Cabe aclarar que para todos los análisis de vitamina E y marcadores de daño oxidativo seleccionamos embriones de tamaño y tiempo de recolección similar, para evitar diferencias debido a la inestabilidad de los analitos.

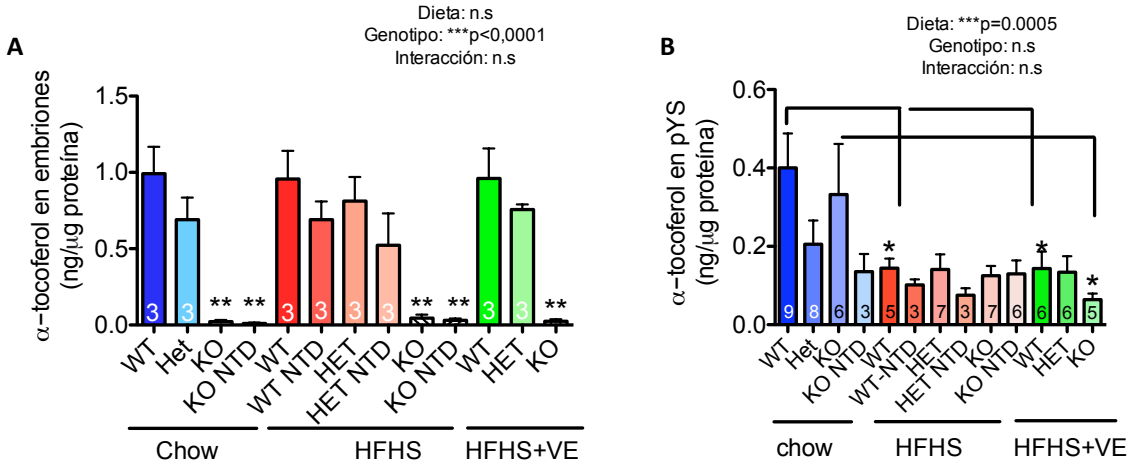


Figura 35.- Efecto de la dieta preconcepcional HFHS sola o suplementada con vitamina E y del genotipo de SR-B1 sobre los niveles de vitamina E en embriones y pYS. A-B) Concentración de α-tocoferol en A) embriones y B) pYS obtenidos de ratonas preñadas (E9,5) alimentadas con dieta chow, HFHS ó HFHS+VE (A: ***p<0,001 efecto del genotipo, **p<0,01 comparaciones a posteriori. B; ***p<0,001 efecto de la dieta, *p<0,05 comparaciones a

posteriori, ANOVA de 2 vías, post test Bonferroni). El número de embriones o pYS se muestra dentro de las barras.

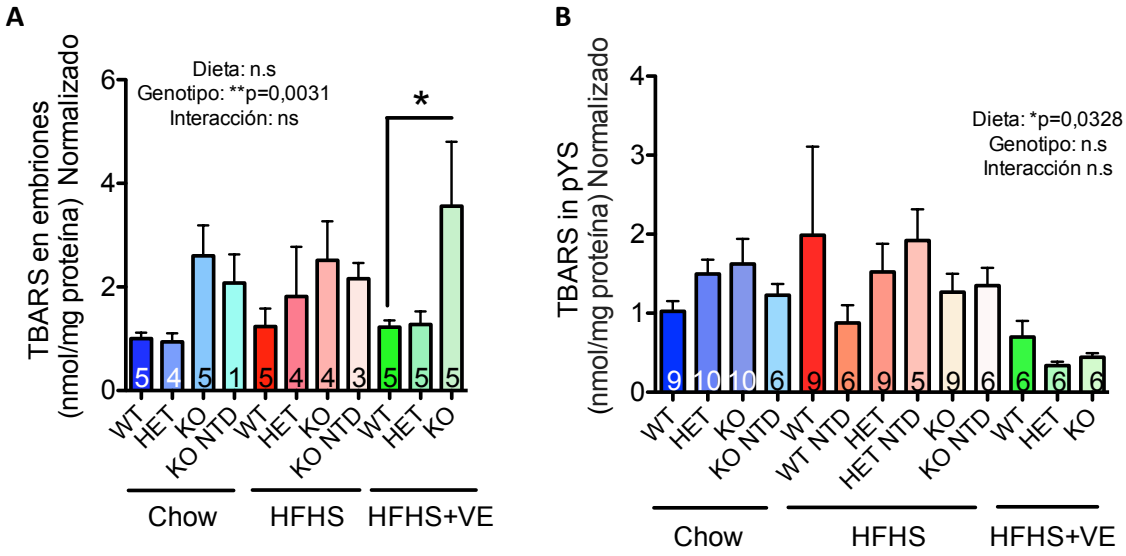


Figura 36.- Efecto de la dieta preconcepcional HFHS sola o suplementada con vitamina E y del genotipo de SR-B1 sobre el daño oxidativo en embriones y pYS. A-B) Concentración de TBARS como marcador de daño oxidativo en lípidos en A) embriones y b) pYS obtenidos de ratonas preñadas (E9,5) alimentadas con dieta chow, HFHS ó HFHS suplementada con vitamina E. (A: **p=0,0031 efecto del genotipo, *p<0,05 comparación a posteriori, B: *p=0,0328 efecto de la dieta, ANOVA de 2 vías seguido de post tests de Bonferroni).

Los resultados del capítulo II hasta el momento sugieren que ni cambios en el contenido de vitamina E ni en el daño oxidativo embrionarios serían mediadores de los NTD o del retardo del desarrollo inducido por la dieta HFHS. Al igual que lo observado en el objetivo I, no podemos descartar que la vitamina E ejerza un efecto antioxidante sobre los tejidos extraembrionarios, relevante para el cierre del tubo del neural, dado que la suplementación con vitamina E redujo la peroxidación en las células que componen el pYS.

Para entender el mecanismo detrás de la intolerancia a la glucosa inducida por la dieta HFHS (**Figura 26**), caracterizamos el estado de resistencia a la insulina a nivel celular analizando los niveles de fosforilación inhibitoria (Ser307) de IRS-1 en hígados

maternos al término de la intervenciones dietarias (**Figura 37**). No observamos cambios en la fosforilación de la proteína producto de la dieta HFHS ni de la suplementación con vitamina E. Concordantemente con este resultado, tampoco observamos cambios en el estado de fosforilación de distintas enzimas involucradas en la señalización de la insulina en hígados maternos (**Figura 38**).

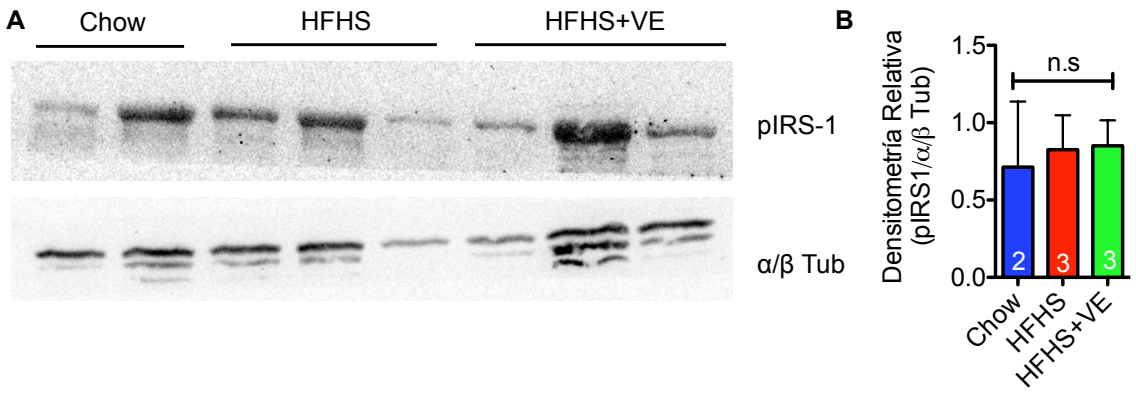


Figura 37.- Efecto de la dieta preconcepcional HFHS sola o suplementada con vitamina E sobre los niveles de fosforilación de IRS-1 en hígados maternos. **A)** Detección por Western blot de p-IRS-1 en lisados de hígados obtenidos de ratonas preñadas (E9,5) alimentadas con dieta chow, HFHS ó HFHS suplementada con vitamina E y **B)** su cuantificación relativa (n.s, ANOVA de una vía). El número de muestras se indica dentro de la barras.

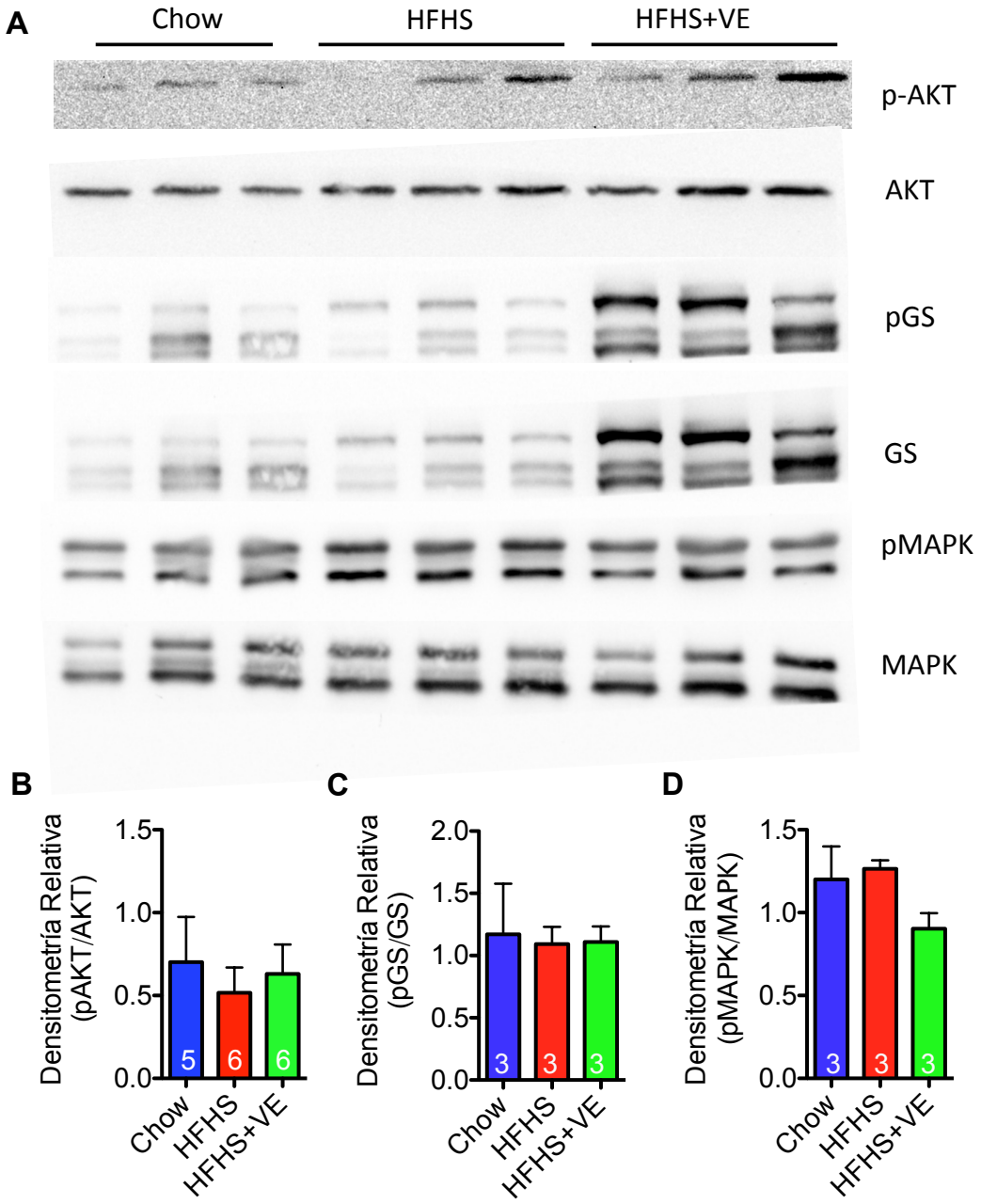


Figura 38.- Efecto de la dieta preconcepcional HFHS sola o suplementada con vitamina E sobre los niveles de fosforilación de enzimas involucradas en la señalización del receptor de insulina en el hígado materno. A) Detección por Western blot de p-AKT, p-GS, p-MAPK, AKT, GS y MAPK en lisados de hígados obtenidos de ratonas preñadas (E9,5) alimentadas con dieta chow, HFHS ó HFHS suplementada con vitamina y B-D) su respectiva cuantificación relativa. El número de muestras se indica dentro de la barras.

Para evaluar si la dieta HFHS estaría alterando la señalización de la insulina en las células del pYS en nuestro modelo, evaluamos la presencia de la proteína IRS-1 por WB, sin embargo la proteína resultó indetectable (**Anexo, Figura 5.A**). Además, estudiamos la expresión del receptor de insulina (InsR) en ese tejido, ya que no ha sido reportada, para determinar si posee la capacidad de transducir la vía de señalización. Usando un análisis bioinformático a partir de una base de datos de transcriptómica previamente generada de los TGC murinos[184], encontramos ausencia de expresión del InsR (**Anexo, Figura 5.B**) así como de otros genes involucrados en la señalización de la insulina (resultados no mostrados), indicando que el pYS de roedor durante esta etapa del desarrollo no expresaría la maquinaria necesaria para responder a la insulina y por lo tanto no sería susceptible a la desregulación de este proceso. Interesantemente, detectamos altos niveles de la proteína de IRS-1 y de la expresión del InsR en embriones (**Anexo, Figura 5.A-B**), por lo que evaluamos el estado de señalización de la insulina en embriones obtenidos de madres alimentadas con las distintas intervenciones dietarias (**Figura 39.A**). Para este análisis, usamos embriones de genotipo SR-B1 heterocigoto para aislar el efecto de la dieta del genotipo embrionario. Observamos una tendencia de mayor fosforilación inhibitoria de IRS-1 producto de la dieta HFHS (**Figura 39.B**). Sin embargo, este cambio se debe principalmente a una reducción en la señal de la proteína no fosforilada. No encontramos cambios en la fosforilación de otras enzimas de la vía (**Figura 39. C-D**), lo que sugiere que la señalización de insulina no estaría afectada significativamente en embriones por la dieta HFHS.

Además de las enzimas involucradas en la señalización de la insulina, evaluamos el estado de fosforilación de la enzima αPKC en embriones, debido a reportes que indican que la teratogenia de la diabetes materna está mediada por proteínas que inhiben la autofagia en el neuroepitelio[185] (**Anexo, Figura 6**). No detectamos cambios en la fosforilación de esta enzima producto de la dieta materna. En conjunto, los resultados de este análisis muestran que la dieta HFHS no produjo una alteración evidente en la señalización de la insulina en la madre.

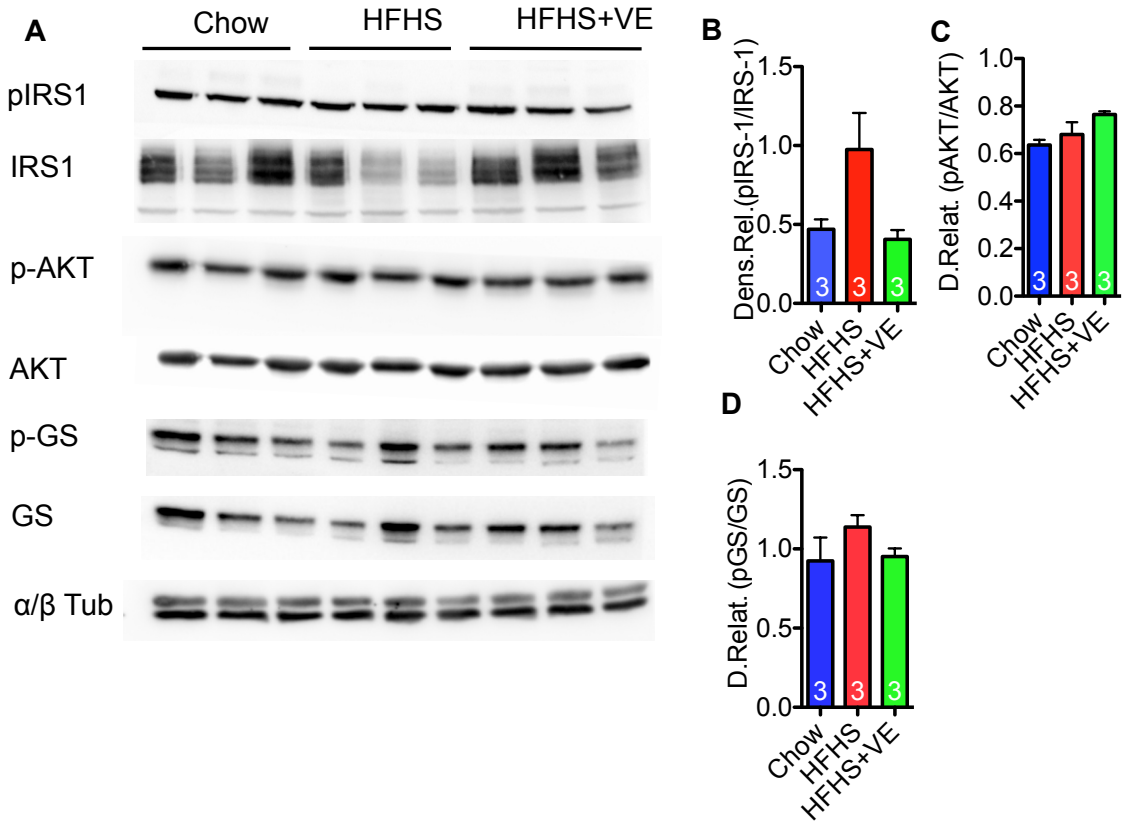


Figura 39.- Efecto de una dieta preconcepcional HFHS sola o suplementada con vitamina E sobre los niveles de fosforilación de enzimas involucradas en la señalización del receptor de insulina en embriones SR-B1 heterocigotos. A) Detección por Western blot de p-IRS1, IRS-1, p-AKT, AKT, p-GS y GS en lisados de embriones SR-B1 heterocigotos obtenidos de ratonas preñadas (E9,5) alimentadas con dieta chow, HFHS ó HFHS suplementada con vitamina y B-D) su respectiva cuantificación relativa. El número de muestras de embriones se indica dentro de la barras.

El colesterol es una de las moléculas lipotóxicas principales en el desarrollo del NASH, cristalizándose en el hepatocito activando respuestas inflamatorias[186]. Con el fin de dilucidar si la acumulación de colesterol hepática producto de la dieta HFHS (**Figura 27.B**) se asocia con acumulación de colesterol en otros tejidos, específicamente en tejidos extraembrionarios, medimos enzimáticamente los niveles de colesterol en el pYS de embriones obtenidos de madres alimentadas con las distintas dietas experimentales. La dieta HFHS provocó un aumento significativo del colesterol en este tejido (**Figura 39**).

Similarmente al efecto observado sobre el colesterol hepático, la suplementación con vitamina E previno la acumulación de colesterol en el pYS (**Figura 40**). Este resultado sugeriría un efecto protector sistémico de la vitamina E sobre el metabolismo del colesterol.

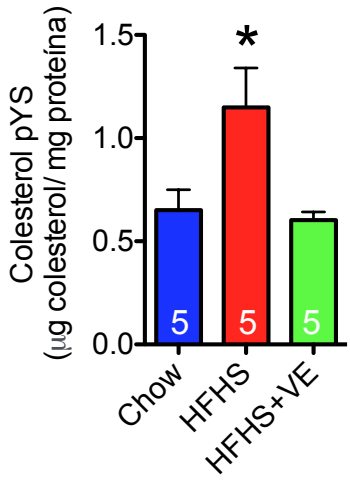


Figura 40.- Efecto de una dieta preconcepcional HFHS sola o suplementada con vitamina E sobre los niveles de colesterol en pYS SR-B1 heterocigotos. Concentración de colesterol en pools de pYS SR-B1 heterocigotos obtenidos de ratonas preñadas (E9,5) alimentadas con dieta chow, HFHS ó HFHS suplementada con vitamina E (*p=0,0162, ANOVA de 1 vía, post test de Bonferroni). El número de muestras de pYS se indica dentro de la barras.

CAPÍTULO II – OBJETIVO 2

Finalmente, para estudiar el rol del daño oxidativo sobre los NTD en embriones SR-B1 KO, utilizamos una aproximación inversa a la de intervención con la dieta pro-oxidante. Alimentamos a hembras SR-B1 heterocigotas postconcepcionalmente con una dieta enriquecida con harina de bagazo de uva (20%), ingrediente natural rico en polifenoles que demostró previamente tener actividad antioxidante[187,188]. La intervención con esta dieta no tuvo un efecto sobre la incidencia del NTD en embriones SR-B1 KO (**Figura 40.A**). Interesantemente, los embriones SR-B1 KO del grupo HBU presentaron menores niveles de TBARS que embriones SR-B1 KO del grupo chow. (**Figura 40.B**), sugiriendo que los polifenoles habrían aumentado las reservas antioxidantes embrionarias, protegiendo a los embriones de la lipoperoxidación.

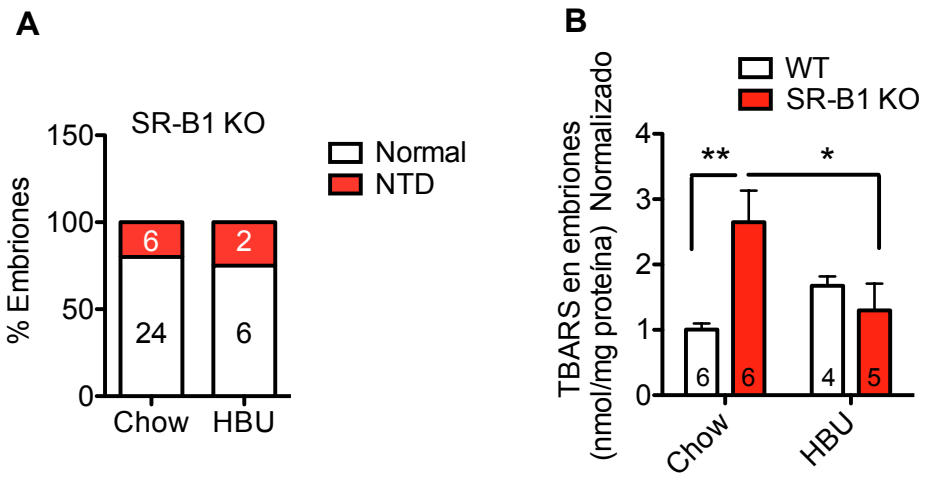


Figura 41.- Efecto de una dieta enriquecida con harina de bagazo de uva sobre la incidencia de NTD y el daño oxidativo en embriones SR-B1 KO. A) Incidencia de NTD en embriones SR-B1 KO obtenidos de madres SR-B1 HET alimentadas con dieta chow (n=17) o dieta enriquecida con HBU 20% (n=10) desde el día E0.5 hasta E9,5 (n.s, Test de Chi-cuadrado). B) Concentración de TBARS como marcador de daño oxidativo en lípidos en embriones obtenidos del grupo experimental alimentado con HBU (*p=0,0108 para efecto de la interacción, *p<0,05, *p<0,001 test a posteriori Bonferroni, ANOVA de 2 vías). El número de embriones se indica dentro de las barras.

En conjunto, los resultados de este capítulo muestran que el consumo materno de la dieta HFHS en hembras SR-B1 heterocigotas altera el metabolismo de la glucosa y los lípidos maternos, aumenta los NTD en embriones de todos los genotipos e induce retardo del desarrollo en embriones, y sugieren que el mecanismo etiológico sería independiente del daño oxidativo en la madre y/o en el embrión. La suplementación materna con vitamina E en la madre normaliza la intolerancia a la glucosa, la hipercolesterolemia y el contenido de lípidos hepáticos en las ratonas producto de la dieta HFHS. En los pYS, la vitamina E también previene la acumulación de colesterol producto de la exposición a la dieta HFHS. La vitamina E previene los NTD sin cambiar el estado oxidativo en los embriones. Estos hallazgos sugieren que la prevención por suplementación con vitamina E de las malformaciones inducidas por la dieta HFHS estaría mediada al menos en parte por una mejora en las anomalías metabólicas maternas relacionadas con la glucosa y el balance lipídico. Por otra parte, los resultados muestran que el tratamiento materno con

una dieta rica en polifenoles previene la peroxidación lipídica pero no el fenotipo de NTD en embriones SR-B1 KO, respaldando las evidencias anteriores en cuanto a que el daño oxidativo en lípidos no sería el principal mecanismo fisiopatológico que explica los NTD en embriones SR-B1 KO.

IV. DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

Aunque diversos lípidos han demostrado ser esenciales para el desarrollo temprano, el rol particular de cada uno de ellos y los mecanismos moleculares que explican su transporte entre la madre y el embrión no se entienden completamente. En este trabajo, usamos un modelo murino en que coexisten en el mismo útero materno embriones WT con embriones deficientes en SR-B1 (HET y KO). En los embriones en E9,5, se observa NTD y niveles indetectables de vitamina E, indicando que la presencia de SR-B1 en los tejidos extraembrionarios es necesaria para la provisión de esta vitamina al embrión durante esa etapa del desarrollo.

1. La suplementación materna con vitamina E no previene el fenotipo embrionario a través de un efecto directo en el embrión.

En esta tesis confirmamos que los niveles indetectables de vitamina E en embriones SR-B1 KO de madres alimentadas con vitamina E -previamente publicados- no son el resultado de errores metodológicos relacionados con una cantidad subóptima de muestra analizada. Este resultado es de gran impacto para postular mecanismos respecto a cómo la vitamina prevendría el NTD en embriones SR-B1 KO, puesto que evidencia que el efecto sería indirecto, probablemente mediado por las membranas extraembrionarias. Las implicancias de este resultado serán analizadas a lo largo de la discusión.

2. El embrión y las membranas extraembrionarias expresan transportadores de vitamina C

La vitamina C es importante durante la preñez al participar en la producción de colágeno para la formación de membranas extraembrionarias resistentes, ya que bajos

niveles de esta vitamina se asocian a la ruptura prematura de éstas y parto prematuro. La vitamina C también es importante para el cerebro en desarrollo, ya que los ratones deficientes para SVCT2, el transportador responsable de transferir la vitamina C desde la sangre al cerebro, mueren al nacer por falla respiratoria. Aunque los niveles de vitamina C son elevados durante el desarrollo fetal y postnatal en humanos y roedores[189,190,191], existe poca información respecto al estado de ésta durante el comienzo de la organogénesis. En humanos, durante el primer trimestre del embarazo, el ácido ascórbico es detectado en el líquido amniótico, sugiriendo que su rol antioxidante sería importante durante el desarrollo temprano[38].

En este trabajo, describimos por primera vez que tanto en el embrión como en las membranas extraembrionarias del roedor de E9,5 la expresión de GULO es nula, sugiriendo que el estado adecuado de vitamina C embrionario dependería de la provisión materna. Por otra parte, detectamos expresión de las tres proteínas descritas responsable del transporte de la vitamina C en saco vitelino visceral (vYS), SVCT 1, 2 y 3, y uno de ellos, SVCT2, en saco vitelino parietal (pYS), indicando que las membranas extraembrionarias serían tejidos activos en el transporte de la vitamina C al embrión. El transportador SVCT1 se expresa predominantemente en células epiteliales y se ha propuesto que su actividad sería responsable para la absorción intestinal de la vitamina C y su provisión al organismo[164]. El segundo transportador, SVCT2, es de expresión ubicua y media la captación de la vitamina C desde la circulación a la mayoría de los tejidos[164]. Finalmente, SVCT3, gen originalmente clonado del saco vitelino de roedor, posee una función desconocida, aunque dado el alto porcentaje de homología con los otros dos transportadores, se le han adjudicado teóricamente las mismas funciónes[164]. El hecho de que el saco vitelino exprese los tres transportadores da cuenta de la importancia que tendría la vitamina C y, con ello, la provisión de antioxidantes para el desarrollo embrionario temprano. Por otra parte, los embriones SR-B1 KO presentan niveles inalterados de esta vitamina, lo que demuestra que son capaces de captarla eficientemente a través de estos transportadores, por lo que tendrían una capacidad adecuada para regenerar la vitamina E oxidada. Estos resultados sugieren que los niveles bajos de

vitamina E en embriones SR-B1 KO, aún bajo condiciones de suplementación materna con esta vitamina, no se explicarían por una mayor oxidación de la vitamina.

3. ¿Es la vitamina E necesaria durante el cierre del tubo neural debido a sus propiedades antioxidantes?

La primera parte de esta tesis consistió en estudiar el daño oxidativo como componente en la etiología de los NTD y las potenciales propiedades antioxidantes de la vitamina E durante el cierre del tubo neural. Este objetivo tenía como fundamentos que: i) diversos reportes han asociado la producción de ROS con el riesgo de NTD, ii) los embriones SR-B1 KO presentan mayores niveles de ROS que embriones WT[37], iii) en otros tipos celulares, los ROS provocan la oxidación del glutatión y la vitamina C[192], iv) la deficiencia de vitamina E puede provocar una depleción secundaria de vitamina C [87,106] y v) existe una cercana relación entre GSH y vitamina E [193,192]. Pese a estos antecedentes, no detectamos reducción en los niveles de vitamina C ni de GSH en embriones SR-B1 KO, por lo que la evidencia presentada en este trabajo respaldaría que la vitamina no tendría relación con la mantención del sistema antioxidante embrionario durante el cierre del tubo neural en el roedor. Adicionalmente, tampoco detectamos aumento en los niveles de la proteína de Nrf2, un regulador transcripcional de la respuesta antioxidante.

¿Cómo podría explicarse que la deficiencia de vitamina E no se haya asociado a un desbalance antioxidante? Distintas interpretaciones pueden ser formuladas. La primera, relacionada con las limitaciones de este estudio, es que sólo un estadío embrionario fue analizado. Es posible que el sistema antioxidante sufriera desbalances en etapas previas y activara mecanismos metabólicos compensatorios. Un ejemplo de esto se observa en los embriones de pez cebra deficientes en vitamina E, en los que paulatinamente a medida que avanza el desarrollo el metabolismo energético es redirigido a la vía de las pentosas fosfato para la producción de poder reductor en forma de NADPH, que se consume gradualmente, para así contrarrestar el estrés oxidativo[106]. Esta teoría no se puede comprobar a través de este estudio ya que tampoco se midió la concentración de NADPH,

el reductor final de la cadena de la regeneración de la vitamina E, la vitamina C y el glutatión. Este switch metabólico dirigido a mejorar los efectos del estrés oxidativo ocurre a expensas de vías generadoras de energía, como la glicólisis y el flujo a través de la cadena respiratoria del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y se asemeja al efecto Warburg de las células cancerígenas[194]. Cambios metabólicos similares han sido observados en hígados de ratas deficientes en vitamina E[195].

Que la actividad antioxidante de la vitamina E sea importante durante el cierre del tubo neural no es incompatible con el resultado que muestra niveles indetectables de la proteína Nrf2: los embriones de E9,5 podrían no poseer la capacidad de responder efectivamente frente al ROS a nivel transcripcional, sobre lo cual existe poca literatura. En un estudio en que se administró una inyección de etanol a hembras preñadas (E8,0) y se extrajo los embriones a las 6h post inyección, se observó un aumento sustancial de la unión de Nrf2 a su promotor, pero esto tuvo como resultado sólo un cambio moderado en la expresión de distintas enzimas antioxidantes[196]. Nuestro análisis bioinformático de ontología molecular arrojó como resultado que los embriones WT y SR-B1 KO presentan una respuesta antioxidante diferencial a nivel de la expresión génica. Sin embargo, los únicos dos genes que contribuyeron con esta divergencia fueron Apoa4, una apolipoproteína con reportada actividad antioxidante[49] y la Proteína Nuclear 1 Inductora de TP p53 (Trp53inp1), una proteína activadora de p53 que gatilla la transcripción de genes antioxidantes[197]. Debido a que estos genes poseen muchas otras funciones además de la detoxificación de las ROS y no corresponden a genes clásicos antioxidantes, no es posible concluir que existan mecanismo transcripcionales adaptativos en embriones SR-B1 KO relacionados con la defensa antioxidante. Que la adaptación transcripcional frente al estrés oxidativo sea baja durante la organogénesis temprana se respalda por I) reportes que indican que la capacidad antioxidante medida como actividad enzimática aumenta gradualmente durante el desarrollo embrionario[198] y II) por la selección evolutiva de la nutrición histiotrófica para reducir la exposición del embrión a las ROS, al permitir una adecuada provisión de nutrientes en un ambiente de bajas concentraciones de oxígeno[84]. Alternativamente, las ROS generadas por la deficiencia embrionaria de vitamina E

podrían no ser suficiente para activar una respuesta antioxidante, apoyando la hipótesis de que las ROS no sería la causa principal que explicaría la alta incidencia de NTD en los embriones SR-B1 KO.

Aunque los mecanismos que conectan el aumento de las ROS con los defectos en el desarrollo no están completamente entendidos, estudios animales han demostrado que las ROS serían un mediador de NTD aumentando la apoptosis y disminuyendo la proliferación celular[199]. Experimentos anteriores realizados en el laboratorio no permitieron detectar diferencias en el número de células positivas para un marcador de proliferación (Ki67) ni en el número de células apoptóticas (con condensación nuclear o positivas para caspasa-3 activa). Dado que los antioxidantes lipofílicos como la coenzima Q_{10} o la vitamina E inhiben la ferroptosis, una forma de muerte celular dependiente de hierro asociada con un aumento de la lipoperoxidación e insuficiencia de eliminar los lipoperóxidos[200], propusimos en este trabajo que la activación de esta respuesta celular habría constituido un mecanismo para explicar el NTD en los embriones SR-B1 KO. Sin embargo, no detectamos niveles disminuidos de GSH, por lo que este tipo de muerte no parecería estar relacionada con el fenotipo embrionario.

La segunda interpretación posible es que la concentración de otros antioxidantes distintos del α-tocoferol en el concepto embrionario sería lo suficientemente alta para impedir un desbalance antioxidante frente a la deficiencia de la vitamina E. Aunque no existe evidencia suficiente sobre la concentración de antioxidantes en el fluido contenido en la cavidad del saco vitelino del roedor, distintas moléculas antioxidantes han sido detectadas en el fluido celómico de primer trimestre en el humano. Entre estas moléculas se encuentran –además del α-tocoferol- el GSH, la vitamina C, y el ácido úrico, encontrándose estos dos últimos en concentraciones similares a las del plasma materno[38]. Si el transporte de otras moléculas antioxidantes mediado por el saco vitelino es lo suficientemente eficiente para igualar las concentraciones plasmáticas maternas, el ambiente reductor protegería al embrión de un desbalance antioxidante frente a la deficiencia de vitamina E. En concordancia con esta teoría, detectamos altos niveles de GSH y vitamina C en embriones, en concentraciones similares a las reportadas en tejidos

adultos[201,202]. Por lo tanto, si la disponibilidad de estos u otros antioxidantes es alta, la función antioxidante de la vitamina E podría no ser relevante para el cierre del tubo neural. Sin embargo, es importante destacar que la protección antioxidante que la vitamina E cumple sobre los lípidos de membrana no puede ser fácilmente reemplazada por antioxidantes no lipofílicos, que se distribuyen principalmente en el medio hidrosoluble que proporciona el citoplasma.

El aumento de la lipoperoxidación en embriones SR-B1 KO que se observó como resultado del ensayo de TBARS es de difícil interpretación, pero proporciona información que puede ser relevante para delinear futuros experimentos que contribuyan a esclarecer el mecanismo por el cual la vitamina E protegería a los embriones SR-B1 KO del NTD. En primer lugar, el resultado sugiere que la vitamina E embrionaria protegería efectivamente a los lípidos de la lipoperoxidación, poniendo de manifiesto su rol antioxidante. Sin embargo, no es evidente que el aumento en la lipoperoxidación sea la causa del NTD en los embriones SR-B1 KO, ya que la suplementación con vitamina E previene el fenotipo de NTD sin normalizar el TBARS embrionario. Este resultado, puede entenderse, I) considerando que la vitamina E no llega al embrión aun cuando la madre es suplementada y II) contextualizando a la vitamina E en el metabolismo de otros micronutrientes, como se discutirá más adelante.

La relevancia de las funciones antioxidantes de la vitamina E es también puesta en duda por la bibliografía clínica. Si bien la vitamina E posee demostradas propiedades antioxidantes *in vitro*, la evidencia de sus propiedades antioxidantes *in vivo* es llamativamente escasa. La mayoría de los ensayos clínicos emprendidos para demostrar un efecto beneficio de la vitamina E en enfermedades relacionadas con el daño oxidativo han fallado[203,204,205].

La hipótesis de que mecanismos no antioxidantes de la vitamina E serían los responsables de la prevención del NTD en el modelo murino de estudio se ve también respaldada por un estudio reciente del laboratorio en que se analizaron vías transcripcionales diferencialmente expresadas entre embriones SR-B1 WT, SR-B1 KO normales y SR-B1 KO con NTD. Los embriones SR-B1 KO con NTD, en comparación

con los embriones morfológicamente normales del mismo genotipo presentaron expresión reducida de genes con funciones en neurodesarrollo en embriones. Particularmente, este estudio mostró menor expresión de cuatro genes cuya inactivación causa NTD en roedores: Alx3, Marcks, Neurog2 y Pax3. Interesantemente, se observó que los embriones KO recuperados de hembras suplementadas con vitamina E presentaban una mayor expresión de Alx3 y Neurog2 en comparación con embriones recuperados de hembras con dieta control, poniendo de manifiesto que mecanismos de expresión génica activados por la vitamina E contribuirían a la prevención del fenotipo.

4. Posible rol antioxidante de la vitamina E en las membranas extraembrionarias

En este trabajo propusimos que la prevención del fenotipo de NTD por suplementación con vitamina E sería indirecta, mediada por una acumulación de vitamina E en los trofoblastos gigantes. Postulamos que los efectos antioxidantes de la vitamina E tendrían lugar principalmente en el saco vitelino, modulando secundariamente las ROS embrionarias. Para comprobar esta posibilidad, evaluamos los niveles de fosforilación de las enzimas AKT y α-PKC, dos enzimas que activan indirectamente la producción de ROS extracelular, en muestras de pYS de genotipo SR-B1 KO obtenidos de madres alimentadas con dieta chow o suplementada con vitamina E, no encontrando diferencias en el estado de fosforilación de estas enzimas. Si bien esto demuestra que la acumulación de vitamina E en el trofoblasto no contribuye a la defosforilación de estas dos enzimas en particular, no es posible descartar su efecto sobre la activación de la enzima NADPH Oxidasa a través de otros intermediarios, como se discutirá a continuación.

Un factor de transcripción importante no evaluado en este estudio fue el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB). Un análisis de GeneChip usando ratones KO para la proteína α-TTP (deficientes en α-tocoferol) reveló más de 2000 genes modulados por el α-tocoferol en tejidos pulmonares: gran parte de los genes identificados en este estudio incluyeron genes inmuno-inflamatorios, regulados por NFκB[206], lo que ha sido luego confirmado por estudios

posteriores[207]. Aunque no existe una conexión directa entre procesos inflamatorios y NTD, los procesos inflamatorios pueden causar daño oxidativo. Ejemplos de fuentes enzimáticas de ROS involucradas en la respuesta inflamatoria incluyen las ciclooxigenasas (COX) y las lipooxigenasas (LOX), que también son inhibidas por la vitamina E[208,209]. Por otra parte, el factor NFκB puede inhibir la transcripción de la NADPH Oxidasa[210].

Finalmente, distintos estudios sugieren el rol de los tocoferoles como potenciales reguladores de la expresión génica a través de la activación transcripcional de PPARγ, factor de transcripción relacionado con transporte y metabolismo de lípidos, producción de enzimas antioxidantes y protección antiinflamatoria[211], debido a la similitud estructural de los tocoferoles con la triaglitazona, a un activador sintético de PPARγ[212,213]. En este trabajo, tampoco detectamos cambios en el transcrito de PPARγ en pYS SR-B1 KO obtenidos de madres alimentadas con dieta chow o suplementada con vitamina E.

Aunque los resultados de esta parte del estudio no permiten establecer conclusiones ni mecanismos claros sobe el papel de la vitamina E en el pYS, aún no podemos descartar que la vitamina E module la expresión génica y la actividad de enzimas que producen ROS en dicha membrana extraembrionaria. Futuros experimentos, por ejemplo determinación de liberación de ROS u otras especies reactivas al medio extracelular de trofoblastos cultivados con diferentes niveles de vitamina E, o la evaluación del efecto de vitamina E sobre vías inflamatorias que induzcan la secreción de ROS, permitirán responder esta posibilidad.

5. La deficiencia de vitamina E en embriones SR-B1 KO se asocia a cambios en el contenido de PUFAs en el embrión

Debido a que la vitamina E protege a los lípidos de membrana altamente insaturados de la oxidación, postulamos que los embriones SR-B1 KO presentarían bajos niveles de PUFAs unidos a fosfolípidos. A favor de esta hipótesis, observamos menores

niveles de ARA y DHA, dos de los LC-PUFAs más abundantes, en dos clases fosfolípidos PE y PC, respectivamente, en embriones SR-B1 KO. Sin embargo, es discutible que el mecanismo corresponda a una peroxidación generalizada de diversos lípidos, ya que el fosfolípido más abundante, la PC, no presentó cambios en otras especies de ácidos grasos con alto número de insaturaciones (>3 átomos de carbono). Adicionalmente, aunque el análisis de lipidómica escogido no permite la detección de especies oxidadas, la medición enzimática de 8-isoprostanos argumenta en contra de una oxidación espontánea del ARA.

Si bien la deficiencia embrionaria de vitamina E en embriones SR-B1 KO no se estaría asociando a una alteración drástica de lípidos altamente insaturados de la membrana, la disminución que observamos de estos dos PUFAs en PE y PC podría ser el resultado de la activación de mecanismos inflamatorios. El α-tocoferol se une a la fosfolipasa A2 (PLA2), enzima que libera los ácidos grasos insaturados de la posición sn-2 del fosfolípido, e inhibe su actividad[214]. Los ácidos grasos hidrolizados por esta vía, del tipo ω-6 (ARA), son utilizados para la síntesis de eicosanoides proinflamatorios, mientras que los del tipo ω-3 (DHA) son transformados en mediadores especializados de la pro-resolvina, agentes que limitan esta respuesta[215,216]. Interesantemente, el daño oxidativo y la inflamación debido a infecciones bacterianas son factores de riesgo para outcomes de preñez adversos, incluido el NTD[217]. Considerando que la vitamina E inhibe a distintas enzimas proinflamatorias[208,209,214], su acumulación en el trofoblasto al suplementar a la madre podría inhibir la producción de citoquinas o interleuquinas proinflamatorias activadoras de fosfolipasas[218,219], limitando así las señales inflamatorias al embrión. Adicionalmente, los embriones SR-B1 KO presentaron mayores niveles de LPC y los embriones con NTD una disminución significativa en la razón PC/LPC, sugiriendo –sea por mecanismos inflamatorios u oxidativos- un aumento en la hidrólisis de la PC. Bajo condiciones fisiológicas y patológicas, la hidrólisis espontánea o la degradación enzimática de la PC, con el aumento concomitante de la LPC, produce diversos efectos tanto en las propiedades físicas de la membrana como en vías de señalización apoptóticas[220]. La LPC produce efectos líticos a nivel celular[221] como resultado de sus

propiedades surfactantes y como segundo mensajero puede activar también la respuesta inflamatoria[222], posiblemente contribuyendo al secuestro de PUFAs desde la membrana.

Además de la hipótesis inflamatoria, un resultado muy interesante de este estudio fue que los embriones SR-B1 KO presentaron menos PC-DHA que embriones WT, mientras que los embriones SR-B1 KO con NTD presentaron niveles normales de este fosfolípido. Este fosfolípido se sintetiza por dos vías distintas: I) la vía de la CDP-colina[223], dando como producto PC unida a ácidos mono y di insaturados y II) por la metilación seriada de la fosfatidiletanolamina (PE) por la vía de la PE N-metiltransferasa (PEMT) usando 3 dadores de S-adenosil metionina (SAM) y generando PC unida a PUFAs, especialmente DHA[224,225]. Cuando los niveles de vitamina E son inadecuados, esto causa disminución de la PC unida a DHA[226], por lo que la vía PEMT, que es dependiente de SAM, es activada. La vía PEMT contribuye a reducir la disponibilidad celular de dadores de metilo (SAM), que se vuelve progresivamente más limitada conforme progresa el desarrollo en los embriones de pez cebra deficientes en vitamina E[227]. Considerando esta información, es posible establecer ciertas interpretaciones respecto de cómo la deficiencia de la vitamina E sería causal de NTD en embriones SR-B1 KO. Primero, la deficiencia de vitamina E aumentaría la hidrólisis de PUFAs de membrana, disminuyeron las reservas de PC-DHA. Segundo, en respuesta a esta disminución, más PC-DHA sería sintetizada a expensas de dadores de metilo SAM por la vía PEMT. Tercero, la deficiencia de dadores de metilo aumentaría la incidencia de NTD, ya que no habría una reserva suficiente para otras funciones relacionadas con la neurulación primaria, como la regulación de la expresión génica[228]. El hecho de que los embriones con NTD presenten niveles normales de DHA-PC sugiere que la deficiencia de vitamina E en algunos embriones activaría diferencialmente la vía PEMT, compensando la falta de PC-DHA y generando así el defecto embrionario agotando los grupos dadores de metilo. En concordancia con esta hipótesis, I) la inyección diaria postconcepcional de ácido fólico –que puede ser convertido celularmente a SAM- reduce la incidencia de NTD en embriones SR-B1 KO a la mitad y II) los embriones SR-B1 KO hembras presentan una incidencia de NTD del doble que embriones machos,

probablemente por el costo metabólico de dadores de metilo involucrado en la metilación de un cromosoma X[228]. La vitamina E protege también la función mitocondrial al preservar su integridad lipídica[229], organelo que ha demostrado tener un rol esencial en la prevención del NTD por su participación en el metabolismo de 1-carbono[230].

¿Cómo podría la vitamina E en este contexto prevenir el fenotipo sin normalizar la lipoperoxidación? La vitamina E, al acumularse en el pYS de embriones SR-B1 KO[37], podría modular el transporte de otros nutrientes al embrión, previniendo así el fenotipo, sin prevenir la acumulación de lipoperóxidos. Entre ejemplos de estos nutrientes se encontrarían lípidos, como PC-DHA o intermediarios del metabolismo de un carbono. Si bien los resultados de esta investigación no permiten concluir un mecanismo específico, apuntan a que futuras preguntas de investigación debiesen estar centradas en la disponibilidad de otros nutrientes en embriones SR-B1 KO y en cambios en la expresión génicas en el pYS producto de la acumulación de la vitamina E, considerando que el mecanismo de la prevención del NTD no involucraría un efecto directo antioxidante de la vitamina E sobre el embrión propiamente tal.

Paralelamente a la disminución de ciertos LC-PUFAs en fosfolípidos, los embriones SR-B1 KO mostraron aumento en los niveles de ácido linoleico (LA), un PUFA ω6 de cadena en corta en fosfolípidos, lisofosfolípidos, colesterol éster y diacilgliceroles (datos no mostrados para estas dos últimas clases de lípidos). Para las distintas subclases de fosfolípidos y lisofosfolípidos, esta acumulación resultó evidente para la PC y la LPC. El LA modula procesos proliferativos en células embrionarias[231,232] y el consumo materno de este lípido se asocia a un acortamiento en la longitud de los telómeros, indicador de inestabilidad cromosómica y pérdida de información genómica, en células sanguíneas del cordón umbilical y la placenta[233], por lo que su acumulación en diversos lípidos en embriones SR-B1 KO podría sugerir un desbalance de la proliferación, apoptosis o desregulación génica, procesos celulares que contribuyen a aumentar la incidencia de NTD cuando se encuentran alterados[8]. Contrariamente, cierta evidencia clínica postula que el consumo de LA sería protector contra el NTD[234], aunque este estudio evaluó el LA en multivitamínicos, por lo que es difícil aislar el efecto del LA

sobre la incidencia del defecto embrionario. Considerando un rol protector del LA sobre el NTD, la acumulación de este lípido en embriones deficientes en vitamina E podría corresponder a un mecanismo compensatorio.

¿Cómo se acumularía el LA en embriones SR-B1 KO? I) el transporte de este ácido graso podría encontrarse aumentado por mayor expresión de algún transportador de lípidos ó II) la elongación y desaturación a ARA u otros LC-PUFAs podría encontrarse disminuida. La primera explicación es concordante con la observación de que los embriones SR-B1 KO con NTD aumentan la expresión de moléculas especializadas en la captación de lípidos[58]. La segunda explicación se ve apoyada por la disminución de lípidos ω-9 en embriones con NTD, posiblemente por una menor desaturación de ácidos grasos saturados. Los análisis de expresión génica de enzimas desaturantes o elongadoras de ácidos grasos, sin embargo, no respaldan esta explicación.

Los niveles de PUFAs y MUFAs impactan en diversos procesos de la membrana que tienen como consecuencia el cambio en sus propiedades físicas. Entre ellas se encuentran su fluidez, grosor, defectos de empaquetamiento, rigidez de doblamiento, influencia en la conformación de proteínas de membrana y sus propiedades químicas y funcionales[235]. Interesantemente, la suplementación con ácido araquidónico reduce la incidencia de NTD en modelos de diabetes y en embriones cultivados en condiciones hiperglicémicas[108]. Futuros experimentos de suplementación de PUFAs ω-3 u ω-6 permitirán dilucidar la importancia de estos lípidos durante el cierre del tubo neural en nuestro modelo.

6. La deficiencia embrionaria de vitamina E promovería la formación de gotas lipídicas para proteger a los PUFAs de la oxidación y/o la inflamación

Un resultado inesperado de este estudio consistió en que los embriones SR-B1 KO con NTD presentaron menor contenido de glicerofosfolípidos y mayor contenido de lípidos de almacenamiento que embriones WT, principalmente triglicéridos (TAGs),

sugiriendo que existirían alteraciones en los niveles de lípidos de membrana y biogénesis de gotas lipídicas.

Además del sistema antioxidante, la biogénesis de gotas lipídicas corresponde a otro mecanismo adaptativo frente al estrés al oxidativo[236]. Consideradas durante mucho tiempo como un mero reservorio energético, las gotas lipídicas han emergido últimamente como estructuras capaces de realizar numerosas tareas cruciales para la protección de la integridad celular durante el estrés: secuestran lípidos y proteínas potencialmente tóxicas, mantienen el balance rédox y energético, preservan la homeostasis de membranas y organelos y proveen lípidos que actúan como mediadores de señalización[237–239].

Las gotas lipídicas protegen a las células y los tejidos al reducir la lipotoxicidad de los lípidos "libres", no esterificados, almacenándolos en sus formas esterificadas, menos reactivas, en el centro hidrofóbico[71,240–243]. De esta forma, los ácidos grasos, el DAG, el colesterol y las ceramidas se almacenan en TAGs, ésteres de colesterol (CEs) y acilceramidas, respectivamente. Este mecanismo de protección se activa en una variedad de condiciones estresantes como la sobrecarga de lípidos, exposición a ácidos grasos exógenos[240,242–245], alto flujo autofágico[26,246] y lipólisis disfuncional[247,248]. En consonancia con su rol antioxidante, las gotas lipídicas estimulan la oxidación de ácidos grasos y aumentan los niveles de poder reductor (NADPH), requeridos para la mantención del sistema antioxidante dependiente del glutatión[249,250,251].

El rol antioxidante de la gota lipídica no se encuentra limitado al tejido adiposo. Durante el desarrollo en Drosophila, las células gliales acumulan gotas lipídicas para proteger a los neuroblastos circundantes de la lipotoxicidad[252]. En este modelo, frente al aumento de las ROS, se induce la formación de gotas lipídicas, aumento de TAGs y la redistribución de los PUFAs y otros ácidos grasos (palmitato, estereato, oleato) desde los fosfolípidos de membrana a TAGs en la gota lipídica. Al alimentar a las larvas sometidas a hipoxia o estrés oxidativo con una dieta alta en un PUFA del tipo ω6 (ácido linoleico) pero no en un lípido saturado (ácido esteárico), aumenta el número de gotas lipídicas y la lipoperoxidación en membrana, produciéndose finalmente un desbalance de la

proliferación celular, sugiriendo que la biogénesis de gotas lipídicas sería activada preferencialmente para proteger a los PUFAs de la oxidación. Similarmente, en glioblastoma y células de cáncer de mama la hipoxia induce la formación de gotas lipídicas por la vía de HIF-α, sugiriendo la intervención de mecanismos que implican cambios en la expresión génica de enzimas del metabolismo lipídico[249].

En síntesis, los resultados descritos en esta sección sugieren que los embriones SR-B1 KO con NTD presentan una mayor movilización de ácidos grasos a triglicéridos, probablemente como mecanismo adaptativo para prevenir el daño oxidativo y/o inflamatorio en lípidos insaturados debido a la deficiencia de vitamina E.

7. Las alteraciones lipídicas en embriones SR-B1 KO no se explicarían por cambios en la expresión génica

Nuestro análisis de expresión génica por qPCR indica que la disminución de LC-PUFAs (DHA, ARA), MUFAs (OA y POA) y ácidos grasos saturados (PA) en fosfolípidos y la acumulación de LA en distintos lípidos en embriones SR-B1 KO normales o con NTD no se explicarían por cambios en la expresión de genes involucrados en la síntesis, elongación, desaturación ni transporte de ácidos grasos, reforzando la interpretación de que fenómenos inflamatorios y adaptativos –como la biogénesis de gotas lipídicas- serían los responsables de los cambios observados.

8. La vitamina E sería importante para la neurulación manteniendo la homoeostasis de lípidos

Como conclusión de este capítulo de la tesis, la deficiencia de vitamina E no genera un déficit antioxidante en el embrión ni activa una respuesta antioxidante a nivel transcripcional. Es posible que otros antioxidantes, como el GSH y la vitamina C, sean suficientes para defender al embrión del daño oxidativo general. Por otra parte, la deficiencia de SR-B1 se asocia a cambios en el contenido de lípidos. Como interpretación de estos cambios proponemos que la deficiencia de vitamina E embrionaria, secundaria a

la ausencia de SR-B1 en trofoblastos, podría - al activar mecanismos pro-inflamatorios- reducir la disponibilidad de PUFAs en la membrana, liberando estos ácidos grasos al citosol para la síntesis de eicosanoides o proresolvinas. En un subgrupo de embriones, la disminución de PC-DHA activaría la síntesis endógena por la vía PEMT. Durante esta reacción, la PE sería convertida a PC a expensas de grupos metilo, perjudicando la disponibilidad de estos metabolitos para la regulación de la expresión génica, proceso crítico para el cierre del tubo neural. Alternativamente, la disminución de la PC podría inducir su síntesis por la vía de la colina, provocando una disminución concomitante de la betaína, perjudicando por esta vía también la concentración de metilos celulares. Por otra parte, la deficiencia de vitamina E se asociaría a un aumento en la captación de lípidos o a una disminución en la elongación y desaturación de ácidos grasos, aumentando concomitantemente los niveles celulares de LA. La acumulación de LA y la hidrólisis de la PC podrían desbalancear procesos celulares relacionados con la proliferación y/o apoptosis, interfiriendo con el cierre del tubo neural. Los embriones perjudicados por estos desbalances activarían mecanismos de protección, como la biógenesis de gotas lipídicas, movilizando los ácidos grasos desde la membrana a TG o CE (**Figura 42**).

Entre las debilidades o carencias de este estudio se encuentran, en primer lugar, el uso de embriones en E9,5, que ya cerraron el tubo neural, como material para la realización de los experimentos. Por lo tanto, existe incertidumbre sobre si las diferencias observadas entre embriones SR-B1 KO con o sin NTD son consecuencia del fenotipo alterado, y no parte de un mecanismo causal. En segundo lugar, por limitaciones de tiempo y financiamiento, los embriones SR-B1 KO de madres suplementadas con vitamina E no fueron incluidos en el estudio de lipidómica, por lo que no sabemos aún si la vitamina E es capaz de prevenir las alteraciones observadas en las proporciones de lípidos. Sin embargo, consideramos que estos resultados constituyen una primera aproximación para responder las preguntas de la tesis, que permite generar nuevas interrogantes relacionadas con la deficiencia de vitamina E y alteraciones en el metabolismo de otros nutrientes o lípidos durante el cierre del tubo neural en el roedor.

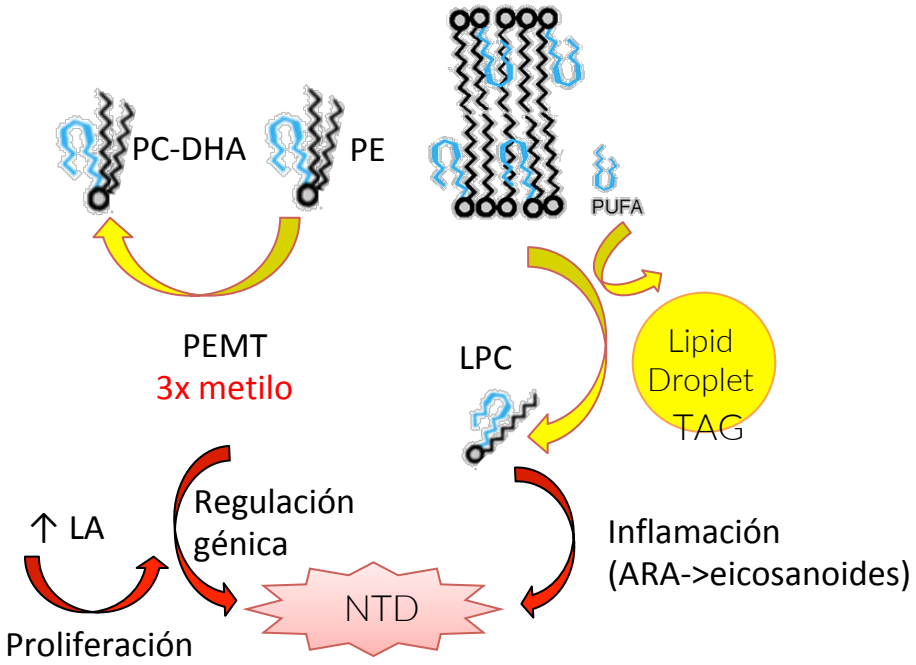


Figura 42. Mecanismo propuesto que relaciona la deficiencia de vitamina E en embriones SR-B1 KO con menores niveles de PUFAs de membrana, y alteraciones en procesos relevantes para la neurulación. La deficiencia de vitamina E en embriones activaría mecanismos pro-inflamatorios que hidrolizarían a la PC de la membrana, reduciendo la cantidad de DHA y ARA en fosfolípidos. Frente a la reducción de la DHA-PC, en un grupo de embriones se activaría la síntesis endógena de este fosfolípido, por la vía PEMT, reduciendo la disponibilidad de grupos dadores de metilo, con un impacto negativo sobre el cierre del tubo neural. Por otra parte, la acumulación de LA (por conversión ineficiente a ARA o por mayor captación) alteraría la proliferación celular. En este escenario, para proteger a las células de la pérdida de la homeostasis lipídica, un grupo de embriones activaría un mecanismo adaptativo en el que se promueve la esterificación de los ácidos grasos de la membrana a TAGs para su posterior almacenamiento en gotas lipídicas.

CAPÍTULO II

Las condiciones maternas que propagan un estado pro-oxidante, como la malnutrición y alteraciones metabólicas como la diabetes y la obesidad, se asocian con una mayor susceptibilidad de malformaciones embrionarias. Por otra parte, dietas con alto contenido antioxidante han sido reportadas como protectoras frente al NTD en modelos murinos de obesidad y/o diabetes. Sin embargo, los mecanismos que explican cómo el daño oxidativo materno aumenta el riesgo de NTD no se conocen. Tampoco existen evidencias que asocien una baja biodisponibilidad de vitamina E debido a la malnutrición y el estado prooxidante materno sobre la ocurrencia de NTD. En el segundo capítulo de esta tesis, nos propusimos estudiar si la ingesta de una dieta HFHS repercute negativamente sobre la biodisponibilidad de la vitamina E y el estado oxidativo materno, aumentando la incidencia de NTD en embriones SR-B1 KO. Adicionalmente, evaluamos si la suplementación de la dieta HFHS con vitamina E materna era capaz de prevenir los NTD en los embriones SR-B1 KO. Finalmente, analizamos el efecto de otra intervención antioxidante sobre la malformación en nuestro modelo, administrando a las ratonas SR-B1 HET preñadas una dieta enriquecida en polifenoles y con actividad antioxidante previamente demostrada in vivo, determinando la incidencia de NTD.

1. La vitamina E protege contra las alteraciones del metabolismo materno inducidas por la dieta HFHS

En nuestro estudio, las ratonas alimentadas con la dieta HFHS presentaron aumento de peso significativo, pero de poca magnitud. Este resultado es similar al reportado en otros estudios en que la administración de diferentes dietas HFHS (con 40% o 60% de kcal provenientes de grasa animal) no induce una ganancia de peso significativa a las 8-9 semanas, sino que esta se observa solo a partir de las 12 semanas[253,254]. Pese al moderado sobrepeso, la dieta produjo intolerancia a la glucosa y elevó los niveles de péptido C plasmáticos, indicando sobreproducción de insulina durante el período previo a la

determinación de este marcador. Interesantemente, estas alteraciones fueron normalizadas al suplementar a la madre con vitamina E.

La glucosa misma, a concentraciones suprafisiológicas, altera la sensibilidad a la insulina en el músculo y tejido adiposo y disminuye la secreción de insulina en las células β pancreáticas, posiblemente desensibilizando la liberación de insulina en respuesta a arginina[255,256]. Adicionalmente, la hiperglicemia aumenta los productos avanzados de glicosilación final (AGE) que inhiben la señalización de la insulina aumentando la fosforilación inhibitoria Ser-307 de IRS-1[257] y activa la biosíntesis de hexosaminas, provocando la O-GlcNAcilación de las proteínas IRS en diversos tejidos[258–261], así como también del receptor de insulina [62]. En nuestro estudio, no detectamos una mayor fosforilación inhibitoria de IRS-1 ni una señalización alterada de la insulina en el hígado en las ratonas alimentadas con la dieta HFHS, aunque estas mostraron mayores niveles de péptido C. Debido a que el péptido C permanece en la sangre más tiempo que la insulina por presentar un catabolismo renal en lugar de hepático, este resultado sugiere la ocurrencia de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia previa o transitoria. La resistencia a la insulina y los peaks hiperglicémicos producidos de manera transitoria durante el embarazo han sido observados tanto en roedores como en humanos[262,263,264]. Otra evidencia a favor de un estado anormal de sensibilidad a la insulina fue la detección de niveles anormales de lípidos plasmáticos y hepáticos. En estados metabólicos alterados, la insulina es incapaz de impedir de manera efectiva la liberación de ácidos grasos de tejido adiposo, los que se metabolizan en el hígado y traen aparejada una sobreproducción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lo que se traduce en un aumento de los lípidos en plasma[265,266].

¿Cómo puede la vitamina E proteger frente a estas alteraciones? Desde hace décadas se ha observado que el tratamiento con α-tocoferol mejora la resistencia a la insulina, el perfil lipídico, la dislipidemia y otros parámetros metabólicos[266–268], posiblemente al proteger contra el daño oxidativo y al activar vías de señalización capaces de modular el metabolismo lipídico, principalmente mediante receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPR)[269,270]. En concordancia con lo reportado, en nuestro estudio las

ratonas del grupo HFHS presentaron hipercolesterolemia y niveles más altos de colesterol y triglicéridos hepáticos que las del grupo control, y todas estas anomalías fueron prevenidas al suplementar la dieta HFHS con vitamina E. Efectos de la suplementación con vitamina E como el anteriormente descrito se observan en el tratamiento del hígado graso no alcohólico (NAFLD), en que la vitamina E normaliza la funcionalidad hepática[271].

2. Biodisponibilidad de la vitamina E en hembras SR-B1 heterocigotas alimentadas con dieta HFHS

Distintos estudios clínicos muestran que los niños con obesidad tienen concentraciones netas de α-tocoferol plasmático normales; sin embargo, cuando sus valores son corregidos por los lípidos circulantes, las razones α-tocoferol:lípidos son significativamente más bajas que en niños normopeso, ya que los niños con obesidad presentan elevadas concentraciones de colesterol y de TAG circulantes[144,272–274]. En esos niños, la administración de suplementos vitamínicos reduce los marcadores de daño oxidativo[275], sugiriendo que el estado antioxidante es efectivamente inadecuado en estos individuos, pese a presentar niveles absolutos "normales" de α-tocoferol. Por otra parte, en experimentos de biodisponibilidad de vitamina E a diferentes tiempos en individuos de diversas edades que consumieron α-tocoferol marcado con deuterio, se observa que el α-tocoferol permanece en circulación por más tiempo en los individuos con niveles elevados de lípidos plasmáticos[152], probablemente porque altas concentraciones de lípidos circulantes se asocian con bajo catabolismo de las lipoproteínas y baja captación de éstas por parte de los tejidos[276]. Teniendo en cuenta la relación entre lípidos circulantes y biodisponibilidad y capacidad antioxidante de vitamina E, analizamos los niveles de α-tocoferol plasmáticos en las ratonas alimentadas con la dieta HFHS en relación a las concentraciones de colesterol y TAG. Aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas, observamos tendencia a menores niveles de α-tocoferol plasmático corregido por lípidos en las hembras del grupo HFHS. En cuanto a la

medición hepática, no existe un consenso sobre cómo expresar el estado de adecuada biodisponibilidad, por lo que normalizamos los valores por la masa de tejido. Sin embargo, si el hígado de las ratonas que consumieron la dieta HFHS presenta acumulación de lípidos, probablemente el requerimiento hepático de la vitamina E sea más elevado respecto al grupo control, ya que los niveles de vitamina E para proteger a esos lípidos de la oxidación es también mayor. Apoyando esta idea, los estudios clínicos que observan mejoras en la funcionalidad hepática de pacientes con NASH luego de la suplementación con vitamina E, como reducción de los niveles de alanina aminotransferasa[277], sugieren un estado inadecuado de vitamina E en estos pacientes, probablemente por aumento del daño oxidativo, acumulación de lípidos, inflamación, etc. Por último, nuestros resultados indicaron que las ratonas alimentadas con la dieta HFHS presentaron menores niveles de vitamina E en el saco vitelino parietal, aunque el significado de esta disminución para efectos del NTD es poco claro.

La mejor manera de determinar el estado de adecuación de vitamina E por biomarcadores ha sido y sigue siendo controversial, en parte por la interrelación de la vitamina E con otros lípidos tanto en circulación como en diferentes tejidos[182]. Se ha propuesto como biomarcador al metabolito α-carboxi-etil-hidroxicromanol (α-CEHC), ya que en humanos su excreción urinaria por encima de 1,39 mmol/g creatina diaria refleja niveles adecuados de vitamina E[278]. En niños obesos y con sobrepeso, la excreción urinaria de α-CEHC es baja, pero aumenta drásticamente luego de la suplementación antioxidante[275]. Futuros estudios en nuestro modelo experimental contemplan analizar el nivel de este metabolito como biomarcador del estado de la vitamina E, aunque la extrapolación de estos marcadores en roedores no ha sido explorada adecuadamente aún.

3. Retardo en el desarrollo y NTD: fenotipos interconectados

En nuestro estudio, la administración de una dieta HFHS provocó retardo del desarrollo en embriones, un fenotipo no observado en los embriones SR-B1 KO del grupo de dieta control. Este nuevo fenotipo, en conjunto con el resultado de que los

embriones del grupo HFHS no tienen niveles insuficientes de vitamina E, sugiere que el NTD por la dieta HFHS sería distinto al NTD de embriones SR-B1 KO. Otros estudios también han observado que ciertas deficiencias genéticas o la modulación de la dieta materna provocan NTD con retardo del desarrollo en embriones.

Los embriones genéticamente deficientes para la inositol polifosfato multiquinasa (Ipk2 KO), enzima responsable de la producción de diversos tipos de fosfoinositol, presentan en el día E8,5 un tamaño reducido a lo largo del eje antero-posterior y en el día E9,5 menor número de somitos y ausencia de rotación embrionaria. Estos embriones, además de no cerrar el tubo neural, no se desarrollan después del día E10, ya que el alantoides no se fusiona con el corion, conexión esencial para el flujo de nutrientes entre la madre y el embrión[279]. Similarmente, los embriones deficientes en la síntesis de formato mitocondrial (Mthfdl1 KO), un intermediario del metabolismo de un carbono que es exportado al citoplasma para la síntesis de bases nitrogenadas o de metionina, presentan retardo en el desarrollo de aproximadamente un día, NTD y alta tasa de reabsorciones (30%)[279].

En cuanto a factores maternos, el fenotipo de retardo en el desarrollo puede ser consecuencia de un pobre control glicémico, como lo demuestran modelos murinos de diabetes. Los embriones de ratas diabéticas, además de exhibir tamaño reducido y morfología retrasada, son hipocelulares, por presentar menor concentración de DNA[280]. Interesantemente, la cantidad de proteína de estos embriones muestra sólo una reducción leve, por lo que la proporción proteína/DNA se encuentra aumentada, sugiriendo que el ambiente diabético perjudicó la replicación celular pero aumentó el catabolismo por la mayor disponibilidad energética (como la glucosa) para las células en desarrollo. En este estudio, la incidencia de NTD analizada en estadíos posteriores tuvo una proporción similar a la de los embriones retardados en estadíos inferiores, sugiriendo que los embriones que sufrieron retardo desarrollaron luego una morfología anormal del tejido nervioso. En un segundo estudio, en ratones, la hiperglicemia materna indujo un retardo en el desarrollo de aproximadamente un día –similarmente a lo observado en esta investigación- en alta proporción (53%) en el día E8,5, muerte en el día E9,5 –evaluado

como desintegración del DNA- y reabsorción en etapas posteriores[281]. Debido a que el análisis de nuestro trabajo fue principalmente morfológico y no se evaluaron estadíos posteriores del desarrollo embrionario, desconocemos si los embriones con retardo presentaban mayor apoptosis o si hubiesen sido reabsorbidos en estadíos posteriores. Dado que en nuestro estudio además administramos una dieta alta en grasas, cabe preguntarse si ¿Además de la hiperglicemia, pueden los lípidos contribuir con el fenotipo de retardo en el desarrollo? Un tercer estudio observó que en embarazos con diabetes tipo I, una dieta alta en grasa aumenta la incidencia de NTD y el retardo del desarrollo en relación a las preñeces diabéticas con dieta normal[132], sugiriendo que el efecto combinado de la sobrecarga de calorías provenientes de los lípidos y la diabetes perjudican el crecimiento embrionario al enlentecer el desarrollo, aunque no se proponen mecanismos concluyentes al respecto. Finalmente, es necesario mencionar que la mayoría de los estudios que analizan la incidencia de NTD por diabetes u otro insulto metabólico no evalúan el número de somitos ni el crecimiento adecuado para el estadío embrionario, por lo que el fenotipo de retardo en estos modelos podría ser más frecuente de lo reportado.

Pese a la evidencia presentada por los estudios mencionados, los mecanismos que conectan la hiperglicemia u otra perturbación metabólica materna con el retardo en el desarrollo y si éste último es un fenotipo previo al NTD son fenómenos poco comprendidos, discutidos extensamente en trabajos por el grupo de H. Lamers y colaboradores[281,282]. Estos estudios demuestran que la hiperglicemia altera la expresión génica durante la organogénesis temprana en el ratón de manera estadío-dependiente: en el día E8,5 los genes afectados por la hiperglicemia tienen relación principalmente con la proliferación celular, mientras que en el día E9,5 o E10 estos genes tienen mayor relación con la organización del citoesqueleto, la fosforilación oxidativa, la migración y la diferenciación celular[282]. Dado que los estadíos E7,5 y E8,5 son los más sensibles a la glucosa durante el desarrollo en el roedor[283], posibles peaks de glucosa en esta ventana de tiempo pudieron retrasar el desarrollo en los embriones de nuestro modelo, alterando genes relacionados con la proliferación celular. Interesantemente, los estudios descritos en este párrafo proponen que los embriones de madres diabéticas responden a la

hiperglicemia de dos formas: I) adaptan su expresión génica a la hiperglicemia, sobreexpresando genes compensatorios (como genes antioxidantes) y luego desarrollan NTD en estadíos posteriores ó II) no se adaptan a la hiperglicemia, suprimen la expresión génica de manera generalizada y retrasan su desarrollo, lo que no es compatible con su posterior sobrevivencia. Estos estudios sugieren un efecto metabólico temprano producto de la hiperglicemia, durante e inmediatamente después de la gastrulación que deja poca evidencia durante etapas tardías del desarrollo debido a la eliminación de los embriones más afectados -entre los estadíos E9,5 y E10,5- y un efecto teratológico que sí se evidencia más tardíamente, lo que ha recibido mayor atención por parte de diversos grupos de estudio. Es posible que los embriones SR-B1 KO en nuestro estudio respondan a la dieta HFHS de manera dicotómica, con retardo o con NTD posterior. En ese caso, es de esperar que los que manifiestan retardo mueran y sean reabsorbidos en etapas posteriores, aunque hasta al momento no podemos determinarlo ya que no analizamos etapas posteriores.

Finalmente, la vitamina E previene ambos fenotipo de NTD en nuestro modelo: el de embriones de tamaño normal y el asociado a retardo del desarrollo. Este hallazgo apoya la teoría de que un mismo insulto metabólico –que sería corregido por la vitamina E- afectaría el desarrollo embrionario, aunque de manera diferencial - posiblemente por divergencias en la expresión génica de los embriones- produciendo dos fenotipos letales distintos.

4. El saco vitelino: un tejido susceptible a los insultos metabólicos

En nuestro estudio, observamos que la suplementación de la dieta HFHS con vitamina E tiene efectos beneficiosos en el sitio de implantación: previene la acumulación de colesterol, reduce la lipoperoxidación y aumenta, aunque no significativamente, los niveles de SR-B1 en el pYS. Estos resultados sugieren que ciertos procesos celulares en el pYS podrían verse influenciados por el ambiente materno y que su desregulación podría impactar sobre el cierre del tubo neural en el embrión. En este escenario, la

vitamina E podría contribuir a la prevención de los NTD protegiendo al pYS de las alteraciones metabólicas.

Que el metabolismo alterado de la glucosa o el consumo elevado de calorías provenientes de las grasas saturadas perjudique el desarrollo embrionario temprano a través de un efecto indirecto sobre las membrana extraembrionarias es un concepto novedoso, ya que los estudios hasta la fecha se han centrado en el resultado de estas exposiciones sobre el funcionamiento de la placenta madura o a término, a nivel de señalización hormonal y aporte de nutrientes al feto[284–287], y sobre el crecimiento fetal, fenómenos posteriores al establecimiento de la circulación coriónica. Sin embargo, ciertos estudios sugieren que el desarrollo embrionario sí podría verse afectado tempranamente por alteraciones en el saco vitelino, en particular por acumulación de lípidos y/o cambios en la expresión génica.

Un estudio que evaluó el efecto de la diabetes y de una dieta con mayor contenido de grasa sobre la expresión temporal de diversos transportadores de glucosa y lípidos en el saco vitelino parietal (E8,5 – E12,5) y la placenta (E15,5 – E18,5)[132] demostró que tanto la diabetes como la dieta aumentan la expresión de GLUT1 en esa membrana extraembrionaria, posiblemente aumentando el flujo de glucosa hacia el embrión. La dieta con mayor contenido de grasa redujo además la expresión de Glut3, un transportador de glucosa que provoca retardo del desarrollo en embriones cuando su expresión se encuentra disminuida en heterocigosidad[288]. Por otra parte, la dieta con alta grasa también aumentó de manera temprana la expresión de distintos transportadores de lípidos en el pYS, tales como diversos transportadores de la familia Fatty Acid Transport Protein (Fatp) y CD36. Adicionalmente, en otro estudio se reportó que los sacos vitelinos de conceptos de rata cultivados en condiciones hiperglicémicas presentan un contenido elevado de ácidos grasos esterificados en triglicéridos y fosfolípidos, además de presentar una ultraestructura alterada: microvellosidades romas, aumento en el número de estructuras liposomales apicales, una reducción en la cantidad de retículo endoplásmico rugoso y una disminución del número y tamaño de gotas lipídicas[289,290]. Interesantemente, los NTD y el contenido anormal de lípidos en el saco vitelino por hiperglicemia se

previno por la inclusión de ácido araquidónico en el medio de cultivo, sugiriendo que la acumulación aberrante de lípidos neutros en esta membrana sería un mediador de malformaciones embrionarias. Durante el desarrollo del pollo, ocurre una extensa movilización de lípidos desde el saco vitelino al embrión para su posterior acumulación en el hígado, en el periodo de tiempo en que el saco vitelino comienza su regresión y el hígado comienza a asumir varias de sus funciones[291]. Es posible sugerir, por lo tanto, que antes de que el hígado o la placenta asuman un rol central en el metabolismo lipídico, estas funciones sean llevadas a cabo por las membranas extraembrionarias.

Considerando que en este estudio observamos un contenido anormal de lípidos en embriones SR-B1 KO normales y con NTD, como acumulación de LA y TG, poniendo de manifiesto el rol de estas biomoléculas durante el desarrollo embrionario, no resulta ilógico plantear que la hipercolesterolemia o la hiperglicemia sean mediadores de NTD al alterar la composición lipídica del embrión o de la membrana extraembrionaria. Si el mecanismo es indirecto, el colesterol y/o la glucosa podrían provocar cambios morfológicos y/o funcionales en la membrana extraembrionaria importantes para otros procesos potencialmente relevantes para el desarrollo embrionario, como el transporte de otros nutrientes o la activación de la respuesta inflamatoria. Finalmente, la acumulación de colesterol intracelular es tóxica, debido a su cristalización y a la formación de oxiesteroles, fenómenos que irrumpen la integridad de los organelos y pueden gatillar la muerte celular[292,293].

¿Cómo puede la vitamina E modular los niveles de colesterol en la madre y los tejidos extraembrionarios? Además de sus propiedades antioxidantes y mejorar potencialmente el metabolismo materno de la glucosa y lípidos al proteger del daño hepático, la vitamina E modifica la expresión de genes que codifican para enzimas claves en la biosíntesis endógena del colesterol al disminuir la transcripción del factor SREBP-2, provocando una inhibición general de este proceso[294,295]. Debido a que la vitamina E, como observamos, se acumula en el hígado al suplementar a la madre y disminuye el colesterol hepático, es probable que la inhibición de la síntesis endógena ocurra en la

madre y no en la membrana extraembrionaria, que no cambia su contenido de vitamina E luego de la suplementación.

5. La vitamina E protege contra las malformaciones embrionarias inducidas por la dieta HFHS

Además de las alteraciones metabólicas maternas previamente mencionadas, el genotipo de SR-B1 y la administración de la dieta HFHS actuaron de manera combinada elevando la incidencia de las malformaciones embrionarias, siendo éstas prevenidas por la suplementación materna con vitamina E. Ni el daño oxidativo ni los niveles embrionarios de vitamina E fueron mediadores de los defectos observados.

La evidencia presentada en este trabajo indica que la dieta HFHS, por una sobrecarga de azúcar y lípidos saturados, provocó hiperglicemia en las ratonas, posiblemente en una ventana de tiempo previa a la analizada (E9,5), ya que no detectamos HOMA-IR alterado pero sí altos niveles de péptido C. La intolerancia a la glucosa produce hiperglicemias transitorias estadío dependientes en otros modelos murinos de preñeces diabéticas, como el ratón deficiente para el receptor de insulina específico del hígado (LIRKO)[263]. En ese modelo, se propone que la hiperglicemia sensibiliza a los embriones al término de la gastrulación, apagando genes de proliferación celular y provocando retardo del desarrollo en algunos embriones. En nuestro modelo de exposición a la dieta HFHS, la intolerancia a la glucosa se asoció además a acumulación de lípidos hepáticos, posiblemente por mayor movilización de lípidos por parte del tejido adiposo o por un metabolismo hepático alterado. El estado hiperlipidémico provocó secundariamente acumulación de colesterol en los trofoblastos, alterando así posiblemente procesos importantes para el desarrollo embrionario, tales como intercambio de nutrientes esenciales, aunque los mecanismos exactos de esto último no fueron abordados en esta tesis. La suplementación de esta dieta con vitamina E protegió a los embriones de los defectos del desarrollo, probablemente de manera indirecta al prevenir las alteraciones maternas del metabolismo de la glucosa y lípidos. Teniendo en

cuenta que la vitamina E se acumuló en el hígado de las ratonas preñadas, es posible proponer que el mecanismo de protección sobre el metabolismo materno involucró la inhibición de la síntesis hepática de colesterol y/o la producción de lipoproteínas enriquecidas en colesterol, lo cual resultó en una menor acumulación de lípidos y normalización de los niveles de colesterol plasmático en la madre y secundariamente del contenido de colesterol en el pYS (**Figura 43**).

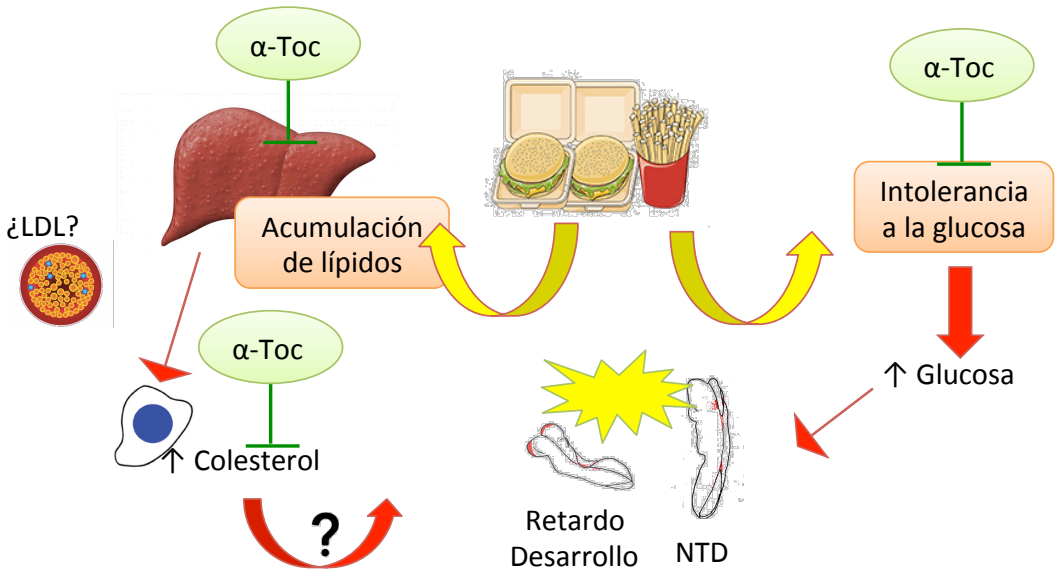


Figura 43. La vitamina E protege contra las malformaciones embrionarias inducidas por la dieta HFHS normalizando el metabolismo materno. Se esquematiza la secuencia de eventos que gatillarían las malformaciones embrionarias al alimentar a hembras SR-B1 heterocigotas con la dieta HFHS: 1) La alta ingesta de carbohidratos y grasas saturadas provocarían intolerancia a la glucosa en la madre y acumulación de lípidos hepáticos. 2) El pobre control glicémico ocasionaría hiperglicemias transitorias, perjudicando el desarrollo temprano y 4) la acumulación de lípidos hepáticos provocaría un aumento del colesterol liberado a la circulación, el cual se acumularía en tejidos maternos y en el pYS, alterando posiblemente distintos procesos. La vitamina E prevendría las malformaciones embrionarias normalizando la homeostasis de la glucosa y protegiendo al hígado de la acumulación excesiva de lípidos.

6. Los NTD en embriones SR-B1 KO no se previenen con una dieta con propiedades antioxidantes

Finalmente, la administración postconcepcional de una dieta enriquecida en harina de bagazo de uva, un nutracéutico con propiedades antioxidantes, normalizó los TBARs embrionarios, es decir previno la lipoperoxidación, sin embardo no fue capaz de reducir la incidencia de NTD en embriones SR-B1 KO. Este resultado evidencia nuevamente que la peroxidación lipídica no sería un mediador de NTD en embriones SR-B1 KO. Si bien otros estudios que demuestran que la quercetina, la curcumina, el resveratrol y los aceites vegetales son eficaces en la prevención del NTD y de otras embriopatías en modelos de diabetes, al prevenir el daño oxidativo[109,137,296], es necesario destacar que en estos modelos existe un daño oxidativo generalizado a nivel materno, por lo que la actividad antioxidante de estos compuestos podría tener un efecto en el desarrollo embrionario normalizando el metabolismo de la madre, como observamos en el modelo HFHS.

V. CONCLUSIONES

Los NTD son un problema de salud pública que requiere de nuevas estrategias para lograr seguir reduciendo su prevalencia. La fortificación de alimentos y los suplementos de ácido fólico son efectivos para la reducción de la incidencia de estas malformaciones, pero no resultan suficientes para su prevención completa. Los resultados de esta tesis proponen que la vitamina E materna podría ser relevante para proteger al embrión de NTD y/o del retardo del desarrollo, manteniendo la homeostasis lipídica en el embrión y normalizando alteraciones del metabolismo materno de la glucosa y lípidos.

En humanos, el tratamiento con altas dosis de vitamina E en mujeres embarazadas ha mostrado ser relativamente seguro durante todo el período comprendido por el segundo y tercer trimestre[297]. Hasta la fecha, no se han realizado estudios prospectivos de intervención diseñados para evaluar la capacidad de la suplementación materna con vitamina E para prevenir NTD en humanos. Estudios recientes de nuestro laboratorio

usando datos de la Encuesta Latinoamericana de Nutrición y Salud (ELANS) indican que la mayor parte de las mujeres latinoamericanas en edad fértil consumen niveles insuficientes de vitamina E y una proporción importante de ellas presenta déficit de ingesta tanto de vitamina E como de vitamina C[298]. Entender el rol de la vitamina E durante el desarrollo embrionario enfatizaría la importancia del consumo de alimentos ricos en vitamina E -aceites vegetales, nueces, granos enteros, y vegetales de hoja verde- en mujeres en edad fértil como estrategia primaria en la prevención de NTD. Dado que no detectamos un efecto antioxidante de la vitamina E relevante para el cierre del tubo neural, nuestro estudio sugiere que la vitamina E no puede ser reemplazada fácilmente por otros antioxidantes para prevenir estas malformaciones.

En el primer capítulo de esta tesis, nuestros resultados bioquímicos demostraron que la vitamina E no contribuye a la mantención del sistema antioxidante en el embrión a nivel de antioxidantes endógenos ni a través de cambios en la expresión génica. Sin embargo, su deficiencia provoca NTD en embriones y alteraciones lipídicas: acumulación de ácido linoleico en diversos lípidos, hidrólisis de la PC -el fosfolípido más abundante de la célula- y disminución de LC-PUFAs en determinados fosfolípidos, sugiriendo un aumento de la respuesta inflamatoria. Estas alteraciones se ven acompañadas de una respuesta adaptativa para proteger a los lípidos insaturados del estrés oxidativo y/o de la inflamación: la acumulación de ácidos grasos en TAG, probablemente por movilización desde los fosfolípidos de membrana. En este escenario, el efecto de suplementar a la madre con PUFAs todavía no es claro: una dieta materna con alto contenido de PUFAs en el embrión deficiente de vitamina E podría aumentar todavía más su hidrólisis desde la membrana, promoviendo la inflamación o la biogénesis de gotas lipídicas. Considerando que el requerimiento de la vitamina E guarda estrecha relación con los niveles de PUFAs, es posible que una dieta con elevado contenido de ambos sea protectora frente a las malformaciones embrionarias. En este sentido, evidencias recientes indican que el consumo de una dieta rica en aceites de oliva, frutos secos y pescados ricos en ácidos grasos omega-3, conocida como dieta mediterránea, es efectivo para alcanzar niveles adecuados de consumo de vitamina E[299] y la adherencia materna a un patrón dietario

estilo mediterráneo se ha asociado a una mejora en la condición metabólica de los niños en la infancia[300,301] y a un menor riesgo de NTD, tanto para espina bífida[302] como para anencefalia[303,304]. Proyectamos que la progresión de este estudio contribuirá a entender cómo determinados mecanismos moleculares alteran el metabolismo lipídico embrionario y puedan ser aplicados en intervenciones preventivas en mujeres en edad fértil.

Un elemento de esta tesis importante a considerar es que en el modelo de dieta materna pro-oxidante las malformaciones embrionarias suceden en embriones SR-B1 heterocigotos, que no son deficientes en vitamina E. En el caso de las madres, si bien la heterocigosidad de SR-B1 no se asocia a un metabolismo lipoproteico drásticamente alterado como el de los SR-B1 KO, sus HDL sí presentan ciertas diferencias con las de una ratón normal: mayor contenido de colesterol y distribución levemente anormal de apolipoproteínas en las fracciones de FPLC[305]. Esta información revela que la combinación de malos hábitos alimenticios con ciertos parámetros alterados de las HDL podrían ser un factor de riesgo al NTD u otras embriopatías, manifestando así la importancia de caracterizar el metabolismo lipoproteico en mujeres que han tenido embarazos con NTD para diseñar futuras estrategias preventivas.

Futuros experimentos de suplementación con PUFAs a hembras SR-B1 heterocigotas y de medición de metabolitos dadores de metilos en embriones SR-B1 KO permitirán entender mejor la relación entre PUFAs, vitamina E y el metabolismo de un carbono durante el cierre del tubo neural. Por el momento, los resultados de esta tesis proponen que los lípidos son biomoléculas relevantes durante el cierre del tubo neural que debiesen recibir mayor atención. Es importante destacar que debido a que estas relaciones son asociativas, no podemos concluir por el momento si son responsables del fenotipo embrionario.

¿Cómo la suplementación con la vitamina E prevendría el NTD en embriones SR-B1 KO? Considerando que no detectamos restablecimiento de los niveles de vitamina E embrionarios, postulamos que el mecanismo sería indirecto, a través de un efecto mediado por el saco vitelino. Si bien en este trabajo no logramos identificar los intermediarios de este mecanismo, sólo evaluamos los niveles activados de dos enzimas

relacionadas con el ensamblaje de una segunda enzima productora de ROS crucial para la invasión endometrial. Metodologías que logren identificar cambios de manera global son necesarias para identificar qué procesos se encuentran modulados por la vitamina E en este tejido. La vitamina E tiene distintos metabolitos bioactivos, algunos de ellos con propiedades antiinflamatorias[306]. Es posible que estos metabolitos sean procesados en el pYS y luego transferidos al embrión, protegiendo a los PUFAs de la hidrólisis desde la membrana.

En el segundo capítulo de esta tesis, demostramos que la combinación de heterocigosidad materna de SR-B1 con la administración de una dieta alta en grasas saturadas y carbohidratos provoca NTD y retardo del desarrollo en embriones, lo cual es prevenido por la suplementación con vitamina E. En este caso, la vitamina E previene las malformaciones mejorando el metabolismo de la glucosa y lípidos: reduce la hipercolesterolemia, la intolerancia a la glucosa y la acumulación de lípidos hepáticos. Si bien no detectamos hiperglicemia materna en el estadío E9,5 –uno de los insultos mediadores de NTD más descritos-, ni resistencia a la insulina, los elevados niveles de péptido C sugieren un estado previo de hiperglicemia, sensibilizando a los embriones y provocando el fenotipo de retardo. La vitamina E prevendría las malformaciones embrionarias posiblemente protegiendo las funciones de los tejidos maternos, protegiéndolos de la acumulación de lípidos. En el hígado, la vitamina E podría inhibir la síntesis de colesterol o modular el metabolismo de ácidos grasos. Finalmente, este estudio sugiere que los niveles altos de colesterol en el pYS –producto de la hipercolesterolemia materna- son perjudiciales para el desarrollo embrionario, pero los efectos de estos acumulación no fueron descritos. En otros modelos murinos, la diabetes materna y/o las dietas con alto contenido de grasas saturadas cambian la expresión de transportadores de nutrientes e inducen acumulación de lípidos en el saco vitelino, alterando su morfología y posiblemente su funcionalidad. Futuras mediciones de lípidos en las membranas extraembrionarias, análisis histológicos y de expresión de transportadores nutrientes ayudarán a comprender si la funcionalidad de estos tejidos se ve perjudicada por la dieta y los mecanismos por los que la vitamina E protege al embrión de las malformaciones.

Los resultados usando el modelo de dieta HFHS en hembras SR-B1 heterocigotas sugieren que la potencial intervención de suplementación con vitamina E –farmacológica o nutricional- sería todavía más importante en mujeres obesas que presenten intolerancia a la glucosa o dislipemias, ya que la vitamina E protegería al embrión de las malformaciones al actuar sobre el metabolismo materno. Considerando el fenotipo de retardo del desarrollo que observamos y la bibliografía actual que muestra que los embriones de estas características no progresan durante el embarazo y se reabsorben, si este resultado se proyecta al ser humano, este efecto de la hiperglicemia ocurriría durante la tercera semana de la gestación, por lo que la consecuencia -muerte embrionaria- no se evidenciaría tan fácilmente, excepto por una mayor dificultad percibida para embarazarse.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis apoyan I) el rol de la vitamina E en la protección de los niveles adecuados de los PUFAs en la membrana, aunque por mecanismos independientes de su actividad antioxidante y II) su rol protector de embriopatías inducidas por perturbaciones metabólicas, al proteger al embrión de las fluctuaciones en la glicemia y potencialmente al saco vitelino de la acumulación de lípidos, actuando sobre los tejidos maternos. Teniendo en cuenta la prevalencia actual de anencefalia en humanos y considerando que factores de riesgo al NTD como la obesidad o la diabetes son elevados en la población general, la adecuación de la ingesta o la suplementación preconcepcionales con vitamina E podrían ser estrategias atractivas para complementar las medidas actuales en la prevención de los defectos del cierre del tubo neural. A nivel poblacional, el consejo dietario podría ser una mejor estrategia para incrementar el consumo de vitamina E en mujeres en edad fértil, adecuándose por ejemplo a una dieta de estilo mediterráneo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Brenner, C. A., Adler, R. R., Rappolee, D. A., Pedersen, R. A. & Werb, Z. Genes for extracellular-matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev.* (1989). doi:10.1101/gad.3.6.848
2. Holland and Brews Manual of Obstetrics. *Postgrad. Med. J.* (1980). doi:10.1136/pgmj.56.662.885-d
3. Martyn, C. N. & Barker, D. J. Reduced fetal growth increases risk of cardiovascular disease. *Health Rep.* (1994).
4. Calkins, K. & Devaskar, S. U. Fetal origins of adult disease. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* (2011). doi:10.1016/j.cppeds.2011.01.001
5. Hermann, G. M., Dallas, L. M., Haskell, S. E. & Roghair, R. D. Neonatal macrosomia is an independent risk factor for adult metabolic syndrome. *Neonatology* (2010). doi:10.1159/000285629
6. Osmond, C., Barker, D. J. P., Winter, P. D., Fall, C. H. D. & Simmonds, S. J. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *Br. Med. J.* (1993). doi:10.1136/bmj.307.6918.1519
7. Minai, U., Gustafson, K., Fiorentino, R., Jongman, A. & Sereno, J. Fetal rhythm-based language discrimination: A biomagnetometry study. *Neuroreport* (2017). doi:10.1097/WNR.0000000000000794
8. Wilde, J. J., Petersen, J. R. & Niswander, L. Genetic, Epigenetic, and Environmental Contributions to Neural Tube Closure. *Annu. Rev. Genet.* (2014). doi:10.1146/annurev-genet-120213-092208
9. Greene, N. D. E. & Copp, A. J. Development of the vertebrate central nervous system: Formation of the neural tube. *Prenatal Diagnosis* (2009). doi:10.1002/pd.2206
10. Shepard, T. H. *et al.* The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo. *Teratology* (2002). doi:10.1002/tera.10007
11. Copp, A. J. & Greene, N. DE. Genetics and development of neural tube defects. *J. Pathol.* **220**, 217–230 (2010).
12. Greene, N. D. E. & Copp, A. J. Neural Tube Defects NTDs: Neural tube defects. *Annu. Rev. Neurosci.* (2014). doi:10.1146/annurev-neuro-062012-170354
13. Boyles, A. L., Hammock, P. & Speer, M. C. Candidate gene analysis in human neural tube defects. in *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics* (2005). doi:10.1002/ajmg.c.30048
14. Harris, M. J. & Juriloff, D. M. An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology* (2010). doi:10.1002/bdra.20676
15. Wlodarczyk, B. J., Palacios, A. M., George, T. M. & Finnell, R. H. Antiepileptic drugs and pregnancy outcomes. *American Journal of Medical Genetics, Part A* (2012). doi:10.1002/ajmg.a.35438

16. Missmer, S. A. *et al.* Exposure to fumonisins and the occurence of neutral tube defects along the Texas-Mexico border. *Environ. Health Perspect.* (2006). doi:10.1289/ehp.8221
17. Correa-Villaseñor, A. *et al.* The metropolitan atlanta congenital defects program: 35 Years of birth defects surveillance at the centers for disease control and prevention. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* (2003). doi:10.1002/bdra.10111
18. Smithells, R. W., Sheppard, S. & Schorah, C. J. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch. Dis. Child.* (1976). doi:10.1136/adc.51.12.944
19. Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* (1991). doi:10.1016/0140-6736(91)90133-A
20. Molloy, A. M. *et al.* Maternal vitamin B12 status and risk of neural tube defects in a population with high neural tube defect prevalence and no folic acid fortification. *Pediatrics* (2009). doi:10.1542/peds.2008-1173
21. Sotres-Alvarez, D. *et al.* Maternal dietary patterns are associated with risk of neural tube and congenital heart defects. *Am. J. Epidemiol.* (2013). doi:10.1093/aje/kws349
22. Chandler, A. L. *et al.* Neural tube defects and maternal intake of micronutrients related to one-carbon metabolism or antioxidant activity. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* (2012). doi:10.1002/bdra.23068
23. Yi, X. & Maeda, N. Endogenous Production of Lipoic Acid Is Essential for Mouse Development. *Mol. Cell. Biol.* (2005). doi:10.1128/mcb.25.18.8387-8392.2005
24. NICOL, C. J., ZIELENSKI, J., TSUI, L. & WELLS, P. G. An embryoprotective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. *FASEB J.* (2000). doi:10.1096/fasebj.14.1.111
25. Long, Y. *et al.* Oxidative stress and NF-κB signaling are involved in LPS induced pulmonary dysplasia in chick embryos. *Cell Cycle* (2018). doi:10.1080/15384101.2018.1496743
26. Fantel, A. G. Reactive oxygen species in developmental toxicity: Review and hypothesis. in *Teratology* (1996). doi:10.1002/(SICI)1096-9926(199603)53:3<196::AID-TERA7>3.0.CO;2-2
27. Cim, N. *et al.* Amniotic fluid oxidant–antioxidant status in foetal congenital nervous system anomalies. *J. Int. Med. Res.* (2018). doi:10.1177/0300060517734443
28. Dong, D. *et al.* Maternal diabetes triggers DNA damage and DNA damage response in neurulation stage embryos through oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2015). doi:10.1016/j.bbrc.2015.09.137
29. Kronick, J. B. Teratogenic effects of ethyl alcohol administered to pregnant mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* (1976). doi:10.1016/S0002-9378(16)33334-8
30. Nonn, L., Williams, R. R., Erickson, R. P. & Powis, G. The Absence of Mitochondrial Thioredoxin 2 Causes Massive Apoptosis, Exencephaly, and Early Embryonic Lethality in Homozygous Mice. *Mol. Cell. Biol.* (2003). doi:10.1128/mcb.23.3.916-922.2003

31. Lin, S. *et al.* Oxidative Stress and Apoptosis in Benzo[a]pyrene-Induced Neural Tube Defects. *Free Radic. Biol. Med.* (2018). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.004
32. Wang, L. *et al.* Apoptosis, Expression of PAX3 and P53, and Caspase Signal in Fetuses with Neural Tube Defects. *Birth Defects Res.* (2017). doi:10.1002/bdr2.1094
33. Auerbach, R. Analysis of the developmental effects of a lethal mutation in the house mouse. *J. Exp. Zool.* (1954). doi:10.1002/jez.1401270206
34. Goulding, M. *et al.* Analysis of the pax-3 gene in the mouse mutant splotch. *Genomics* (1993). doi:10.1006/geno.1993.1332
35. Chang, T. I. *et al.* Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: Insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia* (2003). doi:10.1007/s00125-003-1063-2
36. Phelan, S. A., Ito, M. & Loeken, M. R. Neural tube defects in embryos of diabetic mice: Role of the Pax-3 gene and apoptosis. *Diabetes* (1997). doi:10.2337/diab.46.7.1189
37. Santander, N. *et al.* Deficient Vitamin E Uptake during Development Impairs Neural Tube Closure in Mice Lacking Lipoprotein Receptor SR-BI. *Sci. Rep.* (2017). doi:10.1038/s41598-017-05422-w
38. Jauniaux, E. *et al.* Distribution and transfer pathways of antioxidant molecules inside the first trimester human gestational sac. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2004). doi:10.1210/jc.2003-031332
39. Zybina, T. G., Zybina, E. V., Stein, G. I., Severova, E. L. & Dyban, A. P. Dynamics of polyploidization and quantitative studies of Ag-NORs in the interphase nucleoli of cambial trophoblast cells in the developing rat placenta. *Caryologia* (1996). doi:10.1080/00087114.1996.10797358
40. Ueda, Y. *et al.* Intrauterine Pressures Adjusted by Reichert's Membrane Are Crucial for Early Mouse Morphogenesis. *Cell Rep.* (2020). doi:10.1016/j.celrep.2020.107637
41. Hogan, B. L. M., Cooper, A. R. & Kurkinen, M. Incorporation into Reichert's membrane of laminin-like extracellular proteins synthesized by parietal endoderm cells of the mouse embryo. *Dev. Biol.* (1980). doi:10.1016/0012-1606(80)90405-4
42. Santander, N. G. *et al.* Developmental abnormalities in mouse embryos lacking the HDL receptor SR-BI. *Hum. Mol. Genet.* (2013). doi:10.1093/hmg/dds510
43. Cindrova-Davies, T. *et al.* RNA-seq reveals Conservation of function among the yolk sacs of human, mouse, and chicken. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2017). doi:10.1073/pnas.1702560114
44. Fisher, C. E. & Howie, S. E. M. The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Developmental Biology* (2006). doi:10.1016/j.ydbio.2006.06.007
45. Kozyraki, R. & Gofflot, F. Multiligand Endocytosis and Congenital Defects: Roles of Cubilin, Megalin and Amnionless. *Curr. Pharm. Des.* (2007). doi:10.2174/138161207782110507
46. Huang, L. S. *et al.* apo B gene knockout in mice results in embryonic lethality in

homozygotes and neural tube defects, male infertility, and reduced HDL cholesterol ester and apo A-I transport rates in heterozygotes. *J. Clin. Invest.* (1995). doi:10.1172/JCI118269
47. Terasawa, Y. *et al.* Apolipoprotein B-related gene expression and ultrastructural characteristics of lipoprotein secretion in mouse yolk sac during embryonic development. *J. Lipid Res.* (1999).
48. Feingold, K. R. & Grunfeld, C. *Introduction to Lipids and Lipoproteins*. *Endotext* (2000).
49. Soran, H., Schofield, J. D. & Durrington, P. N. Antioxidant properties of HDL. *Front. Pharmacol.* (2015). doi:10.3389/fphar.2015.00222
50. Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. & Remaley, A. T. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.* (2011). doi:10.1038/ncb2210
51. Nofer, J. R. & Assmann, G. Atheroprotective effects of high-density lipoprotein-associated lysosphingolipids. *Trends in Cardiovascular Medicine* (2005). doi:10.1016/j.tcm.2005.08.005
52. Bernier-Latmani, J. & Petrova, T. V. Intestinal lymphatic vasculature: Structure, mechanisms and functions. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (2017). doi:10.1038/nrgastro.2017.79
53. Perea-Gomez, A. *et al.* Loss of Cubilin, the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, impairs visceral endoderm endocytosis and endodermal patterning in the mouse. *Sci. Rep.* (2019). doi:10.1038/s41598-019-46559-0
54. Strope, S., Rivi, R., Metzger, T. & Lacy, E. Mouse amnionless, which is required for primitive streak assembly, mediates cell-surface localization and endocytic function of cubilin on visceral endoderm and kidney proximal tubules. *Development* (2004). doi:10.1242/dev.01341
55. Assémat, E. *et al.* Expression and Role of Cubilin in the Internalization of Nutrients During the Peri-Implantation Development of the Rodent Embryo1. *Biol. Reprod.* (2005). doi:10.1095/biolreprod.104.036913
56. Viall, C. A., Chen, Q., Stone, P. R. & Chamley, L. W. Human extravillous trophoblasts bind but do not internalize antiphospholipid antibodies. *Placenta* (2016). doi:10.1016/j.placenta.2016.03.011
57. Hatzopoulos, A. K., Rigotti, A., Rosenberg, R. D. & Krieger, M. Temporal and spatial pattern of expression of the HDL receptor SR-BI during murine embryogenesis. *J. Lipid Res.* (1998).
58. Santander, N. *et al.* Transcriptional profiling of embryos lacking the lipoprotein receptor SR-B1 reveals a regulatory circuit governing a neurodevelopmental or metabolic decision during neural tube closure 06 Biological Sciences 0604 Genetics. *BMC Genomics* (2018). doi:10.1186/s12864-018-5110-2
59. Rigotti, A., Miettinen, H. E. & Krieger, M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocrine Reviews* (2003). doi:10.1210/er.2001-0037
60. Cortes, V. A. *et al.* Advances in the physiological and pathological implications of

cholesterol. *Biol. Rev.* (2013). doi:10.1111/brv.12025
61. Cross, J. C., Werb, Z. & Fisher, S. J. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science* (1994). doi:10.1126/science.7985020
62. Mardones, P. *et al.* α-Tocopherol Metabolism Is Abnormal in Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI)-Deficient Mice. *J. Nutr.* (2002). doi:10.1093/jn/132.3.443
63. Mardones, P. & Rigotti, A. Cellular mechanisms of vitamin e uptake: Relevance in α-tocopherol metabolism and potential implications for disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* (2004). doi:10.1016/j.jnutbio.2004.02.006
64. Evans, H. M. & Bishop, K. S. ON THE EXISTENCE OF A HITHERTO UNRECOGNIZED DIETARY FACTOR ESSENTIAL FOR REPRODUCTION. *Science (80-.).* (1922). doi:10.1126/science.56.1458.650
65. Wolf, G. The Discovery of the Antioxidant Function of Vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill. *J. Nutr.* (2005). doi:10.1093/jn/135.3.363
66. Mène-Saffrané, L. & DellaPenna, D. Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. *Plant Physiol. Biochem.* (2010). doi:10.1016/j.plaphy.2009.11.004
67. Rigotti, A. Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine* (2007). doi:10.1016/j.mam.2007.01.002
68. Hosomi, A. *et al.* Affinity for α-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett.* (1997). doi:10.1016/S0014-5793(97)00499-7
69. Traber, M. G. & Stevens, J. F. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine* (2011). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017
70. De Haan, J. B., Tymms, M. J., Cristiano, F. & Kola, I. Expression of Copper/Zinc superoxide dismutase and glutathione peroxidase in organs of developing mouse embryos, fetuses, and neonates. *Pediatr. Res.* (1994). doi:10.1203/00006450-199402000-00013
71. Fantel, A. G., Person, R. E., Tumbic, R. W., Nguyen, T. -D & Mackler, B. Studies of mitochondria in oxidative embryotoxicity. *Teratology* (1995). doi:10.1002/tera.1420520404
72. Forman, H. J., Zhang, H. & Rinna, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine* (2009). doi:10.1016/j.mam.2008.08.006
73. Imai, H. & Nakagawa, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* (2003). doi:10.1016/S0891-5849(02)01197-8
74. Ufer. The roles of glutathione peroxidases during embryo development. *Front. Mol. Neurosci.* (2011). doi:10.3389/fnmol.2011.00012
75. Alary, J., Guéraud, F. & Cravedi, J. P. Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: Disposition and metabolic pathways. in *Molecular Aspects of Medicine* (2003). doi:10.1016/S0098-2997(03)00012-8
76. Galano, A. & Alvarez-Idaboy, J. R. Glutathione: Mechanism and kinetics of its

non-enzymatic defense action against free radicals. *RSC Adv.* (2011). doi:10.1039/c1ra00474c
77. Huang, K. P. & Huang, F. L. Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide. *Biochem. Pharmacol.* (2002). doi:10.1016/S0006-2952(02)01175-9
78. Aquilano, K., Baldelli, S. & Ciriolo, M. R. Glutathione: New roles in redox signalling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology* (2014). doi:10.3389/fphar.2014.00196
79. Alcala, M. *et al.* Prevention of teratogenesis in pregnancies of obese rats by vitamin E supplementation. *Antioxidants* (2021). doi:10.3390/antiox10081173
80. WU, C.-M., CHENG, Y.-L., DAI, Y.-H., CHEN, M.-F. & WANG, C.-C. α-Tocopherol protects keratinocytes against ultraviolet A irradiation by suppressing glutathione depletion, lipid peroxidation and reactive oxygen species generation. *Biomed. Reports* (2014). doi:10.3892/br.2014.236
81. Jain, S. K., McVie, R. & Smith, T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. *Diabetes Care* (2000). doi:10.2337/diacare.23.9.1389
82. Shvedova, A. A. *et al.* Enhanced oxidative stress in the skin of vitamin E deficient mice exposed to semisynthetic metal working fluids. *Toxicology* (2002). doi:10.1016/S0300-483X(02)00093-8
83. Avanzo, J. L., De Mendonça, C. X., Pugine, S. M. P. & De Cerqueira Cesar, M. Effect of vitamin E and selenium on resistance to oxidative stress in chicken superficial pectoralis muscle. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* (2001). doi:10.1016/S1532-0456(01)00197-1
84. Burton, G. J., Hempstock, J. & Jauniaux, E. Nutrition of the human fetus during the first trimester - A review. *Placenta* (2001). doi:10.1053/plac.2001.0639
85. Mohan, S. *et al.* Spontaneous fractures in the mouse mutant sfx are caused by deletion of the gulonolactone oxidase gene, causing vitamin C deficiency. *J. Bone Miner. Res.* (2005). doi:10.1359/JBMR.050406
86. Harrison, F. E. *et al.* Low vitamin C and increased oxidative stress and cell death in mice that lack the sodium-dependent vitamin C transporter SVCT2. *Free Radic. Biol. Med.* (2010). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.008
87. Lebold, K. M. *et al.* Chronic vitamin e deficiency promotes vitamin C deficiency in zebrafish leading to degenerative myopathy and impaired swimming behavior. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* (2013). doi:10.1016/j.cbpc.2013.03.007
88. Espinosa-Diez, C. *et al.* Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology* (2015). doi:10.1016/j.redox.2015.07.008
89. Bedard, K. & Krause, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313 (2007).
90. Ushio-Fukai, M. Compartmentalization of Redox Signaling Through NADPH Oxidase–Derived ROS. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 1289–1299 (2009).
91. Poston, L. & Raijmakers, M. T. M. Trophoblast Oxidative Stress, Antioxidants and Pregnancy Outcome—A Review. *Placenta* **25**, S72–S78 (2004).

92. Wang, D. *et al.* NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K+ channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 13182–13187 (1996).
93. Burdon, C., Mann, C., Cindrova-Davies, T., Ferguson-Smith, A. C. & Burton, G. J. Oxidative Stress and the Induction of Cyclooxygenase Enzymes and Apoptosis in the Murine Placenta. *Placenta* **28**, 724–733 (2007).
94. Bevilacqua, E., Hoshida, M.-S., Amarante-Paffaro, A., Albieri-Borges, A. & Zago-Gomes, S. Trophoblast phagocytic program: roles in different placental systems. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 495–505 (2010).
95. Gagioti, S., Colepicolo, P. & Bevilacqua, E. Post-implantation mouse embryos have the capability to generate and release reactive oxygen species. *Reprod. Fertil. Dev.* **7**, 1111 (1995).
96. Albieri, A. & Bevilacqua, E. Induction of erythrophagocytic activity in cultured mouse trophoblast cells by phorbol myristate acetate and all-trans-retinal. *Placenta* **17**, 507–512 (1996).
97. Albieri, A. *et al.* Interferon-gamma alters the phagocytic activity of the mouse trophoblast. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **3**, 34 (2005).
98. Cachia, O. *et al.* α-Tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes: Attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* (1998). doi:10.1074/jbc.273.49.32801
99. Chen, X., Touyz, R. M., Park, J. B. & Schiffrin, E. L. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension* (2001). doi:10.1161/hy09t1.094005
100. RICCIARELLI, R. *et al.* α-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C α by changing its phosphorylation state. *Biochem. J.* **334**, 243–249 (1998).
101. Egger, T. *et al.* Modulation of microglial superoxide production by alpha-tocopherol in vitro: attenuation of p67(phox) translocation by a protein phosphatase-dependent pathway. *J. Neurochem.* **79**, 1169–82 (2001).
102. Huang, P.-H. *et al.* Vitamin E Facilitates the Inactivation of the Kinase Akt by the Phosphatase PHLPP1. *Sci. Signal.* **6**, (2013).
103. Kempná, P., Reiter, E., Arock, M., Azzi, A. & Zingg, J.-M. Inhibition of HMC-1 Mast Cell Proliferation by Vitamin E. *J. Biol. Chem.* **279**, 50700–50709 (2004).
104. Nakanishi, A. Link between PI3K/AKT/PTEN Pathway and NOX Proteinin Diseases. *Aging Dis.* (2014). doi:10.14336/ad.2014.0500203
105. Miller, G. W. *et al.* Zebrafish (Danio rerio) fed vitamin E-deficient diets produce embryos with increased morphologic abnormalities and mortality. *J. Nutr. Biochem.* (2012). doi:10.1016/j.jnutbio.2011.02.002
106. McDougall, M. *et al.* Lethal dysregulation of energy metabolism during embryonic vitamin E deficiency. *Free Radic. Biol. Med.* (2017). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.020
107. Choi, J. *et al.* Novel function of vitamin E in regulation of zebrafish (Danio rerio)

brain lysophospholipids discovered using lipidomics. *J. Lipid Res.* (2015). doi:10.1194/jlr.M058941
108. Goldman, A. S. *et al.* Hyperglycemia-induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1985). doi:10.1073/pnas.82.23.8227
109. Reece, E. A., Wu, Y. K., Spellacy, W. & Pitkin, R. M. Prevention of diabetic embryopathy in offspring of diabetic rats with use of a cocktail of deficient substrates and an antioxidant. *Am. J. Obstet. Gynecol.* (1997). doi:10.1016/S0002-9378(97)70602-1
110. Joffre, C., Nadjar, A., Lebbadi, M., Calon, F. & Laye, S. N-3 LCPUFA improves cognition: The young, the old and the sick. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* (2014). doi:10.1016/j.plefa.2014.05.001
111. Valk, E. E. J. & Hornstra, G. Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: A review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* (2000). doi:10.1024/0300-9831.70.2.31
112. Amusquivar, E., Ruperez, F. J., Barbas, C. & Herrera, E. Low arachidonic acid rather than α-tocopherol is responsible for the delayed postnatal development in offspring of rats fed fish oil instead of olive oil during pregnancy and lactation. *J. Nutr.* (2000). doi:10.1093/jn/130.11.2855
113. Kucera, J. Rate and type of congenital anomalies among offspring of diabetic women. *J. Reprod. Med.* **7**, 73–82 (1971).
114. Mills, J. L. Malformations in infants of diabetic mothers. *Teratology* **25**, 385–394 (1982).
115. Bell, R., Glinianaia, S. V., Tennant, P. W. G., Bilous, R. W. & Rankin, J. Peri-conception hyperglycaemia and nephropathy are associated with risk of congenital anomaly in women with pre-existing diabetes: a population-based cohort study. *Diabetologia* **55**, 936–947 (2012).
116. Blomberg, M. I. & Källén, B. Maternal obesity and morbid obesity: The risk for birth defects in the offspring. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* NA-NA (2009). doi:10.1002/bdra.20620
117. ODDY, W. H., DE KLERK, N. H., MILLER, M., PAYNE, J. & BOWER, C. Association of maternal pre-pregnancy weight with birth defects: Evidence from a case-control study in Western Australia. *Aust. New Zeal. J. Obstet. Gynaecol.* **49**, 11–15 (2009).
118. Mills, J. L., Troendle, J., Conley, M. R., Carter, T. & Druschel, C. M. Maternal obesity and congenital heart defects: a population-based study. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 1543–1549 (2010).
119. Waller, D. K. Prepregnancy Obesity as a Risk Factor for Structural Birth Defects. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **161**, 745 (2007).
120. Watkins, M. L., Rasmussen, S. A., Honein, M. A., Botto, L. D. & Moore, C. A. Maternal obesity and risk for birth defects. *Pediatrics* **111**, 1152–8 (2003).
121. Anderson, W. L., Mitchell, S. M. & Osgood, M. P. Comparison of student performance in cooperative learning and traditional lecture-based biochemistry

classes. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **33**, 387–393 (2005).
122. Barr, M. *et al.* Holoprosencephaly in infants of diabetic mothers. *J. Pediatr.* **102**, 565–568 (1983).
123. Carmichael, S. L., Shaw, G. M., Selvin, S. & Schaffer, D. M. Diet quality and risk of neural tube defects. *Med. Hypotheses* **60**, 351–5 (2003).
124. Yazdy, M. M., Liu, S., Mitchell, A. A. & Werler, M. M. Maternal dietary glycemic intake and the risk of neural tube defects. *Am. J. Epidemiol.* **171**, 407–14 (2010).
125. Correa, A., Botto, L., Liu, Y., Mulinare, J. & Erickson, J. D. Do multivitamin supplements attenuate the risk for diabetes-associated birth defects? *Pediatrics* **111**, 1146–51 (2003).
126. Correa, A. *et al.* Lack of periconceptional vitamins or supplements that contain folic acid and diabetes mellitus–associated birth defects. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **206**, 218.e1-218.e13 (2012).
127. Jawerbaum, A. & White, V. Animal Models in Diabetes and Pregnancy. *Endocr. Rev.* **31**, 680–701 (2010).
128. Eriksson, U. J. Congenital anomalies in diabetic pregnancy. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **14**, 85–93 (2009).
129. Weigensberg, M. J., Garcia-Palmer, F.-J. & Freinkel, N. Uptake of myo-Inositol by Early-Somite Rat Conceptus: Transport Kinetics and Effects of Hyperglycemia. *Diabetes* **39**, 575–582 (1990).
130. Herrera, E. & Ortega-Senovilla, H. Disturbances in lipid metabolism in diabetic pregnancy – Are these the cause of the problem? *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **24**, 515–525 (2010).
131. Higa, R. *et al.* Safflower and olive oil dietary treatments rescue aberrant embryonic arachidonic acid and nitric oxide metabolism and prevent diabetic embryopathy in rats. *Mol. Hum. Reprod.* (2010). doi:10.1093/molehr/gap109
132. Kappen, C., Kruger, C., MacGowan, J. & Salbaum, J. M. Maternal diet modulates the risk for neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Reprod. Toxicol.* (2011). doi:10.1016/j.reprotox.2010.09.002
133. Harris, M. J. & Juriloff, D. M. Maternal diet alters exencephaly frequency in SELH/Bc strain mouse embryos. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* (2005). doi:10.1002/bdra.20170
134. Wentzel, P. & Eriksson, U. J. A diabetes-like environment increases malformation rate and diminishes prostaglandin E2 in rat embryos: Reversal by administration of vitamin E and folic acid. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* **73**, 506–511 (2005).
135. Cederberg, J., Simán, C. M. & Eriksson, U. J. Combined Treatment with Vitamin E and Vitamin C Decreases Oxidative Stress and Improves Fetal Outcome in Experimental Diabetic Pregnancy. *Pediatr. Res.* **49**, 755–762 (2001).
136. Sugimura, Y. *et al.* α-Lipoic acid reduces congenital malformations in the offspring of diabetic mice. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **25**, 287–294 (2009).
137. Singh, C. K. *et al.* Resveratrol prevents embryonic oxidative stress and apoptosis associated with diabetic embryopathy and improves glucose and lipid profile of

diabetic dam. *Mol. Nutr. Food Res.* (2011). doi:10.1002/mnfr.201000457
138. Wu, Y., Wang, F., Albert Reece, E. & Yang, P. Curcumin ameliorates high glucose-induced neural tube defects by suppressing cellular stress and apoptosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* (2015). doi:10.1016/j.ajog.2015.01.017
139. Ross, J. A. & Kasum, C. M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition* (2002). doi:10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957
140. Lanningham-Foster, L., Chen, C., Chance, D. S. & Loo, G. Grape extract inhibits lipid peroxidation of human low density lipoprotein. *Biol. Pharm. Bull.* (1995). doi:10.1248/bpb.18.1347
141. Schröder-Van Der Elst, J. P., Van Der Heide, D., Rokos, H., Morreale De Escobar, G. & Köhrle, J. Synthetic flavonoids cross the placenta in the rat and are found in fetal brain. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* (1998). doi:10.1152/ajpendo.1998.274.2.e253
142. Franssen, R., Monajemi, H., Stroes, E. S. G. & Kastelein, J. J. P. Obesity and Dyslipidemia. *Med. Clin. North Am.* **95**, 893–902 (2011).
143. Jessup, W. *et al.* α -tocopherol consumption during low-density-lipoprotein oxidation. *Biochem. J.* **265**, 399–405 (1990).
144. Gunanti, I. R., Marks, G. C., Al-Mamun, A. & Long, K. Z. Low serum concentrations of carotenoids and vitamin E are associated with high adiposity in Mexican-American children. *J. Nutr.* (2014). doi:10.3945/jn.113.183137
145. Myara, I. *et al.* Lipoprotein Oxidation and Plasma Vitamin E in Nondiabetic Normotensive Obese Patients. *Obes. Res.* **11**, 112–120 (2003).
146. Galan, P. *et al.* Serum concentrations of β-carotene, vitamins C and E, zinc and selenium are influenced by sex, age, diet, smoking status, alcohol consumption and corpulence in a general French adult population. *Eur. J. Clin. Nutr.* **59**, 1181–1190 (2005).
147. Traber, M. G., Mah, E., Leonard, S. W., Bobe, G. & Bruno, R. S. Metabolic syndrome increases dietary α-tocopherol requirements as assessed using urinary and plasma vitamin E catabolites: a double-blind, crossover clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **105**, 571–579 (2017).
148. Wallström, P. *et al.* Serum concentrations of β-carotene and α-tocopherol are associated with diet, smoking, and general and central adiposity. *Am. J. Clin. Nutr.* (2001). doi:10.1093/ajcn/73.4.777
149. ÖHRVALL, M., TENGBLAD, S. & VESSBY, B. Lower tocopherol serum levels in subjects with abdominal adiposity. *J. Intern. Med.* (1993). doi:10.1111/j.1365-2796.1993.tb00704.x
150. Virtanen, S. M., van't Veer, P., Kok, F., Kardinaal, A. F. & Aro, A. Predictors of adipose tissue tocopherol and toenail selenium levels in nine countries: the EURAMIC study. European Multicentre Case-Control Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Cancer of the Breast. *Eur. J. Clin. Nutr.* **50**, 599–606 (1996).
151. Mah, E. *et al.* -Tocopherol bioavailability is lower in adults with metabolic

syndrome regardless of dairy fat co-ingestion: a randomized, double-blind, crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **102**, 1070–1080 (2015).
152. Traber, M. G., Leonard, S. W., Fu, X., Grusak, M. A. & Booth, S. Plasma alpha-tocopherol transport studied using deuterium-labeled collard greens. *FASEB J.* **26**, (2012).
153. Vislisel, J. M., Schafer, F. Q. & Buettner, G. R. A simple and sensitive assay for ascorbate using a plate reader. *Anal. Biochem.* **365**, 31–9 (2007).
154. Buettner, G. R. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α-Tocopherol, and Ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* (1993). doi:10.1006/abbi.1993.1074
155. Kelesidis, T. *et al.* A biochemical fluorometric method for assessing the oxidative properties of HDL. *J. Lipid Res.* **52**, 2341–2351 (2011).
156. Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W. & Fu, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **20**, 470–5 (1974).
157. Spayd, R. W. *et al.* Multilayer film elements for clinical analysis: applications to representative chemical determinations. *Clin. Chem.* **24**, 1343–50 (1978).
158. Herzog, R. *et al.* A novel informatics concept for high-throughput shotgun lipidomics based on the molecular fragmentation query language. *Genome Biol.* **12**, R8 (2011).
159. Herzog, R. *et al.* LipidXplorer: A Software for Consensual Cross-Platform Lipidomics. *PLoS One* **7**, e29851 (2012).
160. Bornancin, F. & Parker, P. J. Phosphorylation of Protein Kinase C-α on Serine 657 Controls the Accumulation of Active Enzyme and Contributes to Its Phosphatase-resistant State. *J. Biol. Chem.* **272**, 3544–3549 (1997).
161. Persad, S. *et al.* Regulation of Protein Kinase B/Akt-Serine 473 Phosphorylation by Integrin-linked Kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 27462–27469 (2001).
162. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
163. De Leenheer, A. P., De Bevere, V. O., Cruyl, A. A. & Claeys, A. E. Determination of serum alpha-tocopherol (vitamin E) by high-performance liquid chromatography. *Clin. Chem.* **24**, 585–90 (1978).
164. May, J. M. The SLC23 family of ascorbate transporters: ensuring that you get and keep your daily dose of vitamin C. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 1793–1801 (2011).
165. Huo, F., Kang, J., Yin, C., Zhang, Y. & Chao, J. A turn-on green fluorescent thiol probe based on the 1,2-addition reaction and its application for bioimaging. *Sensors Actuators B Chem.* **207**, 139–143 (2015).
166. Vázquez, M. C., Balboa, E., Alvarez, A. R. & Zanlungo, S. Oxidative stress: a pathogenic mechanism for Niemann-Pick type C disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, 205713 (2012).
167. Robledinos-Antón, N., Fernández-Ginés, R., Manda, G. & Cuadrado, A. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, 9372182 (2019).
168. MORRISON, W. R. & SMITH, L. M. PREPARATION OF FATTY ACID

METHYL ESTERS AND DIMETHYLACETALS FROM LIPIDS WITH BORON FLUORIDE--METHANOL. *J. Lipid Res.* **5**, 600–8 (1964).
169. Tripathy, S., Torres-Gonzalez, M. & Jump, D. B. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity corrects dietary fat-induced hyperglycemia in obese BL/6J mice. *J. Lipid Res.* **51**, 2642–2654 (2010).
170. Lebold, K. M. & Traber, M. G. Interactions between α-tocopherol, polyunsaturated fatty acids, and lipoxygenases during embryogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* (2014). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.039
171. Ubhi, B. K. Direct Infusion-Tandem Mass Spectrometry (DI-MS/MS) Analysis of Complex Lipids in Human Plasma and Serum Using the Lipidyzer^{TM} Platform. *Methods Mol. Biol.* **1730**, 227–236 (2018).
172. Jump, D. B. The Biochemistry of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* **277**, 8755–8758 (2002).
173. Balasubramanian, P. *et al.* High fat diet affects reproductive functions in female diet-induced obese and dietary resistant rats. *J. Neuroendocrinol.* **24**, 748–55 (2012).
174. Tortoriello, D. V., McMinn, J. & Chua, S. C. Dietary-Induced Obesity and Hypothalamic Infertility in Female DBA/2J Mice. *Endocrinology* **145**, 1238–1247 (2004).
175. Wu, L. L.-Y. *et al.* High-Fat Diet Causes Lipotoxicity Responses in Cumulus–Oocyte Complexes and Decreased Fertilization Rates. *Endocrinology* **151**, 5438–5445 (2010).
176. Winzell, M. S. & Ahrén, B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 3**, S215-9 (2004).
177. Liu, Z. *et al.* High-Fat Diet Induces Hepatic Insulin Resistance and Impairment of Synaptic Plasticity. *PLoS One* **10**, e0128274 (2015).
178. Khan, H. A., Sobki, S. H., Ekhzaimy, A., Khan, I. & Almusawi, M. A. Biomarker potential of C-peptide for screening of insulin resistance in diabetic and non-diabetic individuals. *Saudi J. Biol. Sci.* **25**, 1729–1732 (2018).
179. Gastaldelli, A. & Cusi, K. From NASH to diabetes and from diabetes to NASH: Mechanisms and treatment options. *JHEP Reports* **1**, 312–328 (2019).
180. St-Amand, R., Ngo Sock, É. T., Quinn, S., Lavoie, J.-M. & St-Pierre, D. H. Two weeks of western diet disrupts liver molecular markers of cholesterol metabolism in rats. *Lipids Health Dis.* **19**, 192 (2020).
181. D'Adamo, E. *et al.* Improved oxidative stress and cardio-metabolic status in obese prepubertal children with liver steatosis treated with lifestyle combined with Vitamin E. *Free Radic. Res.* **47**, 146–153 (2013).
182. Traber, M. G. Vitamin E Inadequacy in Humans: Causes and Consequences. *Adv. Nutr.* **5**, 503–514 (2014).
183. Murao, K. *et al.* Hyperglycemia suppresses hepatic scavenger receptor class B type I expression. *Am. J. Physiol. Metab.* **294**, E78–E87 (2008).
184. Hannibal, R. L. *et al.* Copy Number Variation Is a Fundamental Aspect of the

Placental Genome. *PLoS Genet.* **10**, e1004290 (2014).
185. Wang, F. *et al.* Protein kinase C-alpha suppresses autophagy and induces neural tube defects via miR-129-2 in diabetic pregnancy. *Nat. Commun.* **8**, 15182 (2017).
186. Ioannou, G. N. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends Endocrinol. Metab.* **27**, 84–95 (2016).
187. Urquiaga, I. *et al.* Wine grape pomace flour improves blood pressure, fasting glucose and protein damage in humans: A randomized controlled trial. *Biol. Res.* (2015). doi:10.1186/s40659-015-0040-9
188. Hernández-Salinas, R. *et al.* Antioxidant and anti hyperglycemic role of wine grape powder in rats fed with a high fructose diet. *Biol. Res.* (2015). doi:10.1186/S40659-015-0045-4
189. Kratzing, C. C. & Kelly, J. D. Tissue levels of ascorbic acid during rat gestation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **52**, 326–32 (1982).
190. Kratzing, C. C. & Kelly, J. D. Ascorbic acid synthesis by the mammalian fetus. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **56**, 101–3 (1986).
191. Kratzing, C. C., Kelly, J. D. & Kratzing, J. E. Ascorbic Acid in Fetal Rat Brain. *J. Neurochem.* **44**, 1623–1624 (1985).
192. Morita, M., Naito, Y., Yoshikawa, T. & Niki, E. Plasma lipid oxidation induced by peroxynitrite, hypochlorite, lipoxygenase and peroxyl radicals and its inhibition by antioxidants as assessed by diphenyl-1-pyrenylphosphine. *Redox Biol.* **8**, 127–135 (2016).
193. Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L. & Gregolin, C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **710**, 197–211 (1982).
194. Devic, S. Warburg Effect - a Consequence or the Cause of Carcinogenesis? *J. Cancer* **7**, 817–22 (2016).
195. Moazzami, A. A., Andersson, R. & Kamal-Eldin, A. Changes in the metabolic profile of rat liver after α-tocopherol deficiency as revealed by metabolomics analysis. *NMR Biomed.* **24**, 499–505 (2011).
196. Dong, J., Sulik, K. K. & Chen, S. Y. Nrf2-mediated transcriptional induction of antioxidant response in mouse embryos exposed to ethanol in vivo: Implications for the prevention of fetal alcohol spectrum disorders. *Antioxidants Redox Signal.* (2008). doi:10.1089/ars.2007.2019
197. Cano, C. E. *et al.* Tumor Protein 53–Induced Nuclear Protein 1 Is a Major Mediator of p53 Antioxidant Function. *Cancer Res.* **69**, 219–226 (2009).
198. Zaken, V., Kohen, R. & Ornoy, A. The development of antioxidant defense mechanism in young rat embryos in vivo and in vitro. *Early Pregnancy* **4**, 110–23 (2000).
199. Gabbay-Benziv, R. Birth defects in pregestational diabetes: Defect range, glycemic threshold and pathogenesis. *World J. Diabetes* **6**, 481 (2015).
200. Conrad, M. *et al.* Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse

species. *Genes Dev.* **32**, 602–619 (2018).
201. Lin, Y. *et al.* The hepatoprotective role of reduced glutathione and its underlying mechanism in oxaliplatin-induced acute liver injury. *Oncol. Lett.* (2017). doi:10.3892/ol.2017.7594
202. Harrison, F. E., Meredith, M. E., Dawes, S. M., Saskowski, J. L. & May, J. M. Low ascorbic acid and increased oxidative stress in gulo(−/−) mice during development. *Brain Res.* **1349**, 143–152 (2010).
203. Stocker, R. & Keaney, J. F. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **84**, 1381–1478 (2004).
204. HARMAN, D. Vitamin E. *Circulation* **22**, 151–153 (1960).
205. Mecocci, P. & Polidori, M. C. Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1822**, 631–638 (2012).
206. Gohil, K., Oommen, S., Vasu, V. T., Aung, H. H. & Cross, C. E. Tocopherol transfer protein deficiency modifies nuclear receptor transcriptional networks in lungs: Modulation by cigarette smoke in vivo. *Mol. Aspects Med.* **28**, 453–480 (2007).
207. Glauert, H. P. Vitamin E and NF-κB Activation: A Review. in 135–153 (2007). doi:10.1016/S0083-6729(07)76006-5
208. Wu, D., Liu, L., Meydani, M. & Meydani, S. N. Vitamin E Increases Production of Vasodilator Prostanoids in Human Aortic Endothelial Cells through Opposing Effects on Cyclooxygenase-2 and Phospholipase A2. *J. Nutr.* **135**, 1847–1853 (2005).
209. Reddanna, P., Krishna Rao, M. & Channa Reddy, C. Inhibition of 5-lipoxygenase by vitamin E. *FEBS Lett.* **193**, 39–43 (1985).
210. Anrather, J., Racchumi, G. & Iadecola, C. NF-κB Regulates Phagocytic NADPH Oxidase by Inducing the Expression of gp91. *J. Biol. Chem.* **281**, 5657–5667 (2006).
211. Janani, C. & Ranjitha Kumari, B. D. PPAR gamma gene – A review. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **9**, 46–50 (2015).
212. Azzi, A. & Stocker, A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog. Lipid Res.* **39**, 231–255 (2000).
213. Campbell, S. E., Stone, W. L., Whaley, S. G., Qui, M. & Krishnan, K. Gamma (γ) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (γ) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. *BMC Cancer* **3**, 25 (2003).
214. Chandra, V. *et al.* First Structural Evidence of a Specific Inhibition of Phospholipase A2 by α-Tocopherol (Vitamin E) and its Implications in Inflammation: Crystal Structure of the Complex Formed Between Phospholipase A2 and α-Tocopherol at 1.8Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **320**, 215–222 (2002).
215. Murakami, M., Sato, H. & Taketomi, Y. Updating Phospholipase A2 Biology. *Biomolecules* **10**, 1457 (2020).
216. Astudillo, A. M., Balboa, M. A. & Balsinde, J. Selectivity of phospholipid

hydrolysis by phospholipase A2 enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1864**, 772–783 (2019).
217. Zhao, L. *et al.* Reactive Oxygen Species Contribute to Lipopolysaccharide-Induced Teratogenesis in Mice. *Toxicol. Sci.* **103**, 149–157 (2008).
218. Gronich, J., Konieczkowski, M., Gelb, M. H., Nemenoff, R. A. & Sedor, J. R. Interleukin 1 alpha causes rapid activation of cytosolic phospholipase A2 by phosphorylation in rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.* **93**, 1224–1233 (1994).
219. Gilman, S. C., Berner, P. R. & Chang, J. Phospholipase A2 activation by interleukin 1: Release and metabolism of arachidonic acid by IL 1-stimulated rabbit chondrocytes. *Agents Actions* **21**, 345–347 (1987).
220. Qin, Z., Zhu, H. & Hu, Y. Effects of lysophosphatidylcholine on β-amyloid-induced neuronal apoptosis. *Acta Pharmacol. Sin.* **30**, 388–395 (2009).
221. Zhou, L. *et al.* Different Cytotoxic Injuries Induced by Lysophosphatidylcholine and 7-Ketocholesterol in Mouse Endothelial Cells. *Endothelium* **13**, 213–226 (2006).
222. Law, S.-H. *et al.* An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1149 (2019).
223. Cornell, R. B. & Ridgway, N. D. CTP:phosphocholine cytidylyltransferase: Function, regulation, and structure of an amphitropic enzyme required for membrane biogenesis. *Prog. Lipid Res.* **59**, 147–171 (2015).
224. DeLong, C. J., Shen, Y.-J., Thomas, M. J. & Cui, Z. Molecular Distinction of Phosphatidylcholine Synthesis between the CDP-Choline Pathway and Phosphatidylethanolamine Methylation Pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 29683–29688 (1999).
225. Pynn, C. J. *et al.* Specificity and rate of human and mouse liver and plasma phosphatidylcholine synthesis analyzed in vivo. *J. Lipid Res.* **52**, 399–407 (2011).
226. McDougall, M. Q. *et al.* Lipidomics and H218O labeling techniques reveal increased remodeling of DHA-containing membrane phospholipids associated with abnormal locomotor responses in α-tocopherol deficient zebrafish (danio rerio) embryos. *Redox Biol.* **8**, 165–174 (2016).
227. McDougall, M. *et al.* Lethal dysregulation of energy metabolism during embryonic vitamin E deficiency. *Free Radic. Biol. Med.* **104**, 324–332 (2017).
228. Juriloff, D. & Harris, M. Insights into the Etiology of Mammalian Neural Tube Closure Defects from Developmental, Genetic and Evolutionary Studies. *J. Dev. Biol.* **6**, 22 (2018).
229. Napolitano, G., Fasciolo, G., Di Meo, S. & Venditti, P. Vitamin E Supplementation and Mitochondria in Experimental and Functional Hyperthyroidism: A Mini-Review. *Nutrients* **11**, 2900 (2019).
230. Kappen, C. Modeling anterior development in mice: Diet as modulator of risk for neural tube defects. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* **163**, 333–356 (2013).
231. Kim, M. H., Kim, M. O., Kim, Y. H., Kim, J. S. & Han, H. J. Linoleic Acid

Induces Mouse Embryonic Stem Cell Proliferation Via Ca2+/PKC, PI3K/Akt, and MAPKs. *Cell. Physiol. Biochem.* **23**, 053–064 (2009).
232. Belal, S. A. *et al.* Modulatory effect of linoleic and oleic acid on cell proliferation and lipid metabolism gene expressions in primary bovine satellite cells. *Animal Cells Syst. (Seoul).* **22**, 324–333 (2018).
233. Liu, X. *et al.* Associations of Maternal Polyunsaturated Fatty Acids With Telomere Length in the Cord Blood and Placenta in Chinese Population. *Front. Nutr.* **8**, (2022).
234. Shaw, G. M., Todoroff, K., Schaffer, D. M. & Selvin, S. Periconceptional nutrient intake and risk for neural tube defect-affected pregnancies. *Epidemiology* **10**, 711–6 (1999).
235. Harayama, T. & Shimizu, T. Roles of polyunsaturated fatty acids, from mediators to membranes. *J. Lipid Res.* **61**, 1150–1160 (2020).
236. Jarc, E. & Petan, T. Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *Yale J. Biol. Med.* **92**, 435–452 (2019).
237. Welte, M. A. & Gould, A. P. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1862**, 1260–1272 (2017).
238. Petan, T., Jarc, E. & Jusović, M. Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World. *Molecules* **23**, 1941 (2018).
239. Olzmann, J. A. & Carvalho, P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 137–155 (2019).
240. Jarc, E. *et al.* Lipid droplets induced by secreted phospholipase A2 and unsaturated fatty acids protect breast cancer cells from nutrient and lipotoxic stress. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1863**, 247–265 (2018).
241. Senkal, C. E. *et al.* Ceramide Is Metabolized to Acylceramide and Stored in Lipid Droplets. *Cell Metab.* **25**, 686–697 (2017).
242. Listenberger, L. L. *et al.* Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 3077–3082 (2003).
243. Hardy, S. *et al.* Saturated Fatty Acid-induced Apoptosis in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 31861–31870 (2003).
244. Plötz, T., Hartmann, M., Lenzen, S. & Elsner, M. The role of lipid droplet formation in the protection of unsaturated fatty acids against palmitic acid induced lipotoxicity to rat insulin-producing cells. *Nutr. Metab. (Lond).* **13**, 16 (2016).
245. Koliwad, S. K. *et al.* DGAT1-dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation. *J. Clin. Invest.* **120**, 756–67 (2010).
246. Nguyen, T. B. *et al.* DGAT1-Dependent Lipid Droplet Biogenesis Protects Mitochondrial Function during Starvation-Induced Autophagy. *Dev. Cell* **42**, 9-21.e5 (2017).
247. Wang, C. *et al.* Perilipin 5 improves hepatic lipotoxicity by inhibiting lipolysis. *Hepatology* **61**, 870–882 (2015).
248. Bosma, M. *et al.* Sequestration of fatty acids in triglycerides prevents endoplasmic reticulum stress in an in vitro model of cardiomyocyte lipotoxicity. *Biochim.*

Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids **1841**, 1648–1655 (2014).
249. Bensaad, K. *et al.* Fatty Acid Uptake and Lipid Storage Induced by HIF-1α Contribute to Cell Growth and Survival after Hypoxia-Reoxygenation. *Cell Rep.* **9**, 349–365 (2014).
250. Jeon, S.-M., Chandel, N. S. & Hay, N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* **485**, 661–665 (2012).
251. Carracedo, A., Cantley, L. C. & Pandolfi, P. P. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 227–232 (2013).
252. Bailey, A. P. *et al.* Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of Drosophila. *Cell* **163**, 340–353 (2015).
253. Desmarchelier, C. *et al.* C57Bl/6 N mice on a western diet display reduced intestinal and hepatic cholesterol levels despite a plasma hypercholesterolemia. *BMC Genomics* **13**, 84 (2012).
254. Heinonen, I. *et al.* The effects of equal caloric high fat and western diet on metabolic syndrome, oxidative stress and vascular endothelial function in mice. *Acta Physiol.* **211**, 515–527 (2014).
255. Leahy, J. L., Cooper, H. E., Deal, D. A. & Weir, G. C. Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. A study in normal rats using chronic in vivo glucose infusions. *J. Clin. Invest.* **77**, 908–915 (1986).
256. Hager, S. R., Jochen, A. L. & Kalkhoff, R. K. Insulin resistance in normal rats infused with glucose for 72 h. *Am. J. Physiol. Metab.* **260**, E353–E362 (1991).
257. Riboulet-Chavey, A. *et al.* Methylglyoxal Impairs the Insulin Signaling Pathways Independently of the Formation of Intracellular Reactive Oxygen Species. *Diabetes* **55**, 1289–1299 (2006).
258. McClain, D. A. Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *J. Diabetes Complications* **16**, 72–80 (2002).
259. McClain, D. A. *et al.* Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 10695–10699 (2002).
260. Marshall, S., Bacote, V. & Traxinger, R. R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **266**, 4706–12 (1991).
261. Patti, M. E., Virkamäki, A., Landaker, E. J., Kahn, C. R. & Yki-Järvinen, H. Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes* **48**, 1562–1571 (1999).
262. Kua, K. L. *et al.* Fetal hyperglycemia acutely induces persistent insulin resistance in skeletal muscle. *J. Endocrinol.* **242**, M1–M15 (2019).
263. Kahraman, S., Dirice, E., De Jesus, D. F., Hu, J. & Kulkarni, R. N. Maternal insulin resistance and transient hyperglycemia impact the metabolic and endocrine phenotypes of offspring. *Am. J. Physiol. Metab.* **307**, E906–E918 (2014).
264. García-Patterson, A. *et al.* Insulin requirements throughout pregnancy in women with type 1 diabetes mellitus: three changes of direction. *Diabetologia* **53**, 446–

451 (2010).
265. Hardwick, J. P., Osei-Hyiaman, D., Wiland, H., Abdelmegeed, M. A. & Song, B.-J. PPAR/RXR Regulation of Fatty Acid Metabolism and Fatty Acid -Hydroxylase (CYP4) Isozymes: Implications for Prevention of Lipotoxicity in Fatty Liver Disease. *PPAR Res.* **2009**, 1–20 (2009).
266. Carmena, R. Type 2 diabetes, dyslipidemia, and vascular risk: Rationale and evidence for correcting the lipid imbalance. *Am. Heart J.* **150**, 859–870 (2005).
267. Muis, M. J. *et al.* α-Tocopherol levels in plasma in new-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Intern. Med.* **15**, 371–374 (2004).
268. Palomer, X., Salvadó, L., Barroso, E. & Vázquez-Carrera, M. An overview of the crosstalk between inflammatory processes and metabolic dysregulation during diabetic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* **168**, 3160–3172 (2013).
269. Kim, D. Y., Kim, J., Ham, H. J. & Choue, R. Effects of d-α-tocopherol supplements on lipid metabolism in a high-fat diet-fed animal model. *Nutr. Res. Pract.* **7**, 481 (2013).
270. Fang, F., Kang, Z. & Wong, C. Vitamin E tocotrienols improve insulin sensitivity through activating peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 345–352 (2010).
271. Perumpail, B. *et al.* The Role of Vitamin E in the Treatment of NAFLD. *Diseases* **6**, 86 (2018).
272. Molnár, D., Decsi, T. & Koletzko, B. Reduced antioxidant status in obese children with multimetabolic syndrome. *Int. J. Obes.* **28**, 1197–1202 (2004).
273. Strauss, R. S. Comparison of serum concentrations of α-tocopherol and β-carotene in a cross-sectional sample of obese and nonobese children (NHANES III). *J. Pediatr.* **134**, 160–165 (1999).
274. Kljno, T. *et al.* Antioxidant Vitamin Levels in Plasma and Low Density Lipoprotein of Obese Girls. *Free Radic. Res.* **28**, 81–86 (1998).
275. Murer, S. B. *et al.* Antioxidant Supplements Reduced Oxidative Stress and Stabilized Liver Function Tests but Did Not Reduce Inflammation in a Randomized Controlled Trial in Obese Children and Adolescents. *J. Nutr.* **144**, 193–201 (2014).
276. Yuan, G., Al-Shali, K. Z. & Hegele, R. A. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ* **176**, 1113–20 (2007).
277. Hoofnagle, J. H. *et al.* Vitamin E and changes in serum alanine aminotransferase levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **38**, 134–43 (2013).
278. Lebold, K. M., Ang, A., Traber, M. G. & Arab, L. Urinary α-carboxyethyl hydroxychroman can be used as a predictor of α-tocopherol adequacy, as demonstrated in the Energetics Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **96**, 801–809 (2012).
279. Frederick, J. P. *et al.* An essential role for an inositol polyphosphate multikinase, Ipk2, in mouse embryogenesis and second messenger production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 8454–8459 (2005).
280. Eriksson, U. J., Lewis, N. J. & Freinkel, N. Growth Retardation During Early

Organogenesis in Embryos of Experimentally Diabetic Rats. *Diabetes* **33**, 281–284 (1984).
281. Zhao, J. *et al.* Maternal diabetes causes developmental delay and death in early-somite mouse embryos. *Sci. Rep.* **7**, 11714 (2017).
282. Zhao, J. *et al.* Effect of Hyperglycemia on Gene Expression during Early Organogenesis in Mice. *PLoS One* **11**, e0158035 (2016).
283. Fine, E. L., Horal, M., Chang, T. I., Fortin, G. & Loeken, M. R. Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Diabetes* **48**, 2454–2462 (1999).
284. Bozkurt, L. *et al.* The Cross-Link between Adipokines, Insulin Resistance and Obesity in Offspring of Diabetic Pregnancies. *Horm. Res. Paediatr.* **86**, 300–308 (2016).
285. Dimasuay, K. G., Boeuf, P., Powell, T. L. & Jansson, T. Placental Responses to Changes in the Maternal Environment Determine Fetal Growth. *Front. Physiol.* **7**, (2016).
286. Burton, G. J., Fowden, A. L. & Thornburg, K. L. Placental Origins of Chronic Disease. *Physiol. Rev.* **96**, 1509–1565 (2016).
287. Jansson, T. Placenta plays a critical role in maternal-fetal resource allocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 11066–11068 (2016).
288. Ganguly, A. *et al.* Glucose transporter isoform-3 mutations cause early pregnancy loss and fetal growth restriction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**, E1241-55 (2007).
289. Pinter, E. *et al.* Yolk sac failure in embryopathy due to hyperglycemia: Ultrastructural analysis of yolk sac differentiation associated with embryopathy in rat conceptuses under hyperglycemic conditions. *Teratology* **33**, 73–84 (1986).
290. Pinter, E. *et al.* Fatty acid content of yolk sac and embryo in hyperglycemia-induced embryopathy and effect of arachidonic acid supplementation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **159**, 1484–1490 (1988).
291. Noble, R. C. Lipid metabolism in the chick embryo. *Proc. Nutr. Soc.* **45**, 17–25 (1986).
292. Björkhem, I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J. Clin. Invest.* **110**, 725–730 (2002).
293. Tabas, I. Free Cholesterol-Induced Cytotoxicity. *Trends Cardiovasc. Med.* **7**, 256–263 (1997).
294. Landrier, J.-F. *et al.* Vitamin E decreases endogenous cholesterol synthesis and apo-AI-mediated cholesterol secretion in Caco-2 cells. *J. Nutr. Biochem.* **21**, 1207–1213 (2010).
295. Valastyan, S., Thakur, V., Johnson, A., Kumar, K. & Manor, D. Novel Transcriptional Activities of Vitamin E: Inhibition of Cholesterol Biosynthesis. *Biochemistry* **47**, 744–752 (2008).
296. Higa, R. *et al.* Safflower and olive oil dietary treatments rescue aberrant embryonic arachidonic acid and nitric oxide metabolism and prevent diabetic embryopathy in rats. *Mol. Hum. Reprod.* **16**, 286–295 (2010).

297. Rumbold, A. & Crowther, C. A. Vitamin E supplementation in pregnancy. in *Cochrane Database of Systematic Reviews* (ed. Rumbold, A.) (John Wiley & Sons, Ltd, 2005). doi:10.1002/14651858.CD004069.pub2
298. Busso, D. *et al.* Intake of Vitamin E and C in Women of Reproductive Age: Results from the Latin American Study of Nutrition and Health (ELANS). *Nutrients* **13**, 1954 (2021).
299. Serra-Majem, L. *et al.* Dietary patterns and nutritional adequacy in a Mediterranean country. *Br. J. Nutr.* **101**, S21–S28 (2009).
300. Fernández-Barrés, S. *et al.* Mediterranean dietary pattern in pregnant women and offspring risk of overweight and abdominal obesity in early childhood: the INMA birth cohort study. *Pediatr. Obes.* **11**, 491–499 (2016).
301. Chatzi, L. *et al.* Adherence to the Mediterranean diet during pregnancy and offspring adiposity and cardiometabolic traits in childhood. *Pediatr. Obes.* **12**, 47–56 (2017).
302. Vujkovic, M. *et al.* The maternal Mediterranean dietary pattern is associated with a reduced risk of spina bifida in the offspring. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **116**, 408–415 (2009).
303. Carmichael, S. L. Reduced Risks of Neural Tube Defects and Orofacial Clefts With Higher Diet Quality. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **166**, 121 (2012).
304. Sotres-Alvarez, D. *et al.* Maternal Dietary Patterns are Associated With Risk of Neural Tube and Congenital Heart Defects. *Am. J. Epidemiol.* **177**, 1279–1288 (2013).
305. Rigotti, A. *et al.* A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 12610–12615 (1997).
306. Pein, H. *et al.* Endogenous metabolites of vitamin E limit inflammation by targeting 5-lipoxygenase. *Nat. Commun.* **9**, 3834 (2018).

VII. ANEXO

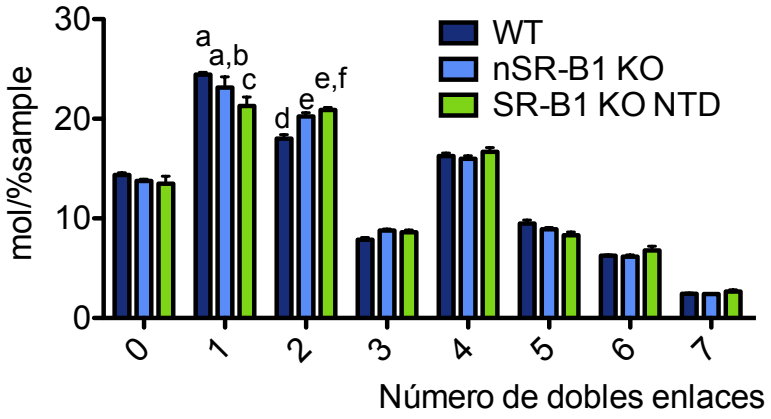


Figura 1. Abundancia de fosfatidilcolina según grado de insaturación en embriones WT, SR-B1 KO y SR-B1 KO NTD. Número de insaturaciones en fosfatidilcolina en embriones WT, nSR-B1 KO y SR-B1 KO NTD (a≠c, d≠f: ***p<0,001 ; d≠e: **p<0,01; b≠c, e≠f: *p<0,05, ANOVA de 2 vías, post test de Bonferroni, n= 3 embriones por grupo).

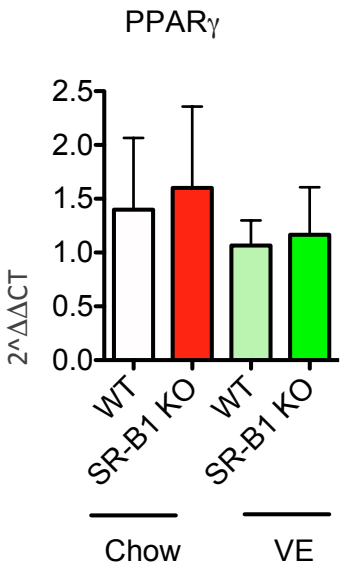


Figura 2.- Influencia de la vitamina E sobre la expresión de PPARγ en saco vitelino parietal WT y SR-B1 KO. Niveles de expresión de PPARγ en pYS de genotipo WT y SR-B1 KO obtenidos de hembras SR-B1 heterocigotas alimentadas postconcepcionalmente con dieta chow o suplementada con vitamina E (n=3 pYS por punto, n.s, ANOVA de 1 vía).

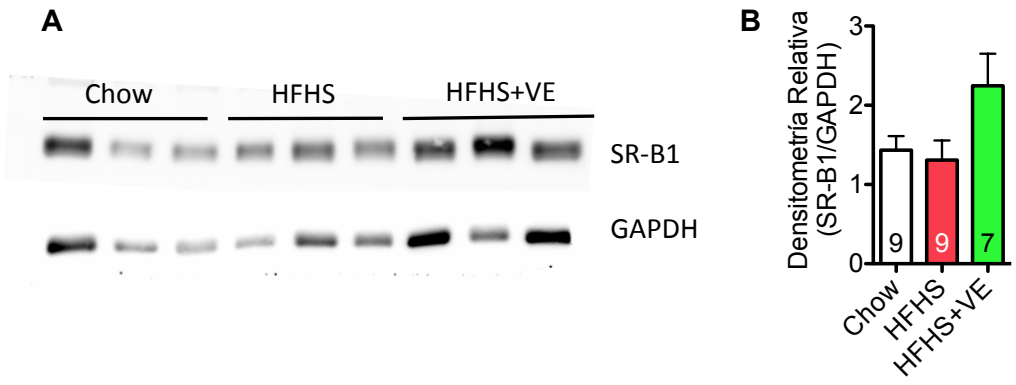


Figura 3.- Efecto de una dieta preconcepcional HFHS sola o suplementada con vitamina E sobre los niveles totales de SR-B1 en pYS. A) Detección por Western blot de SR-B1 en sacos vitelinos de genotipo SR-B1 heterocigoto obtenidos de ratonas preñadas (E9,5) alimentadas con dieta chow, HFHS ó HFHS suplementada con vitamina E. B) Cuantificación relativa por el control de carga. El número de lisados de pYS se indica dentro de las barras.

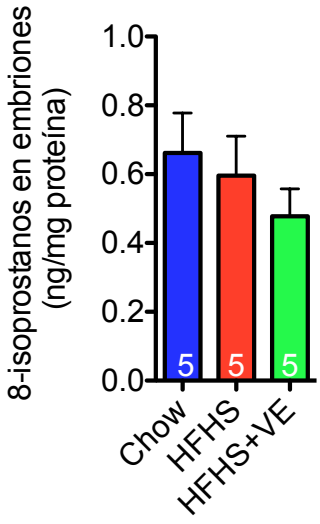


Figura 4.- Efecto de una dieta preconcepcional HFHS sola o suplementada con vitamina E sobre los niveles de 8-isoprostanos en embriones SR-B1 heterocigotos. Concentración de 8-isoprostanos como marcador de daño oxidativo en lípidos en embriones SR-B1 heterocigotos obtenidos de ratonas preñadas (E9,5) alimentadas con dieta chow, HFHS ó HFHS suplementada con vitamina E.

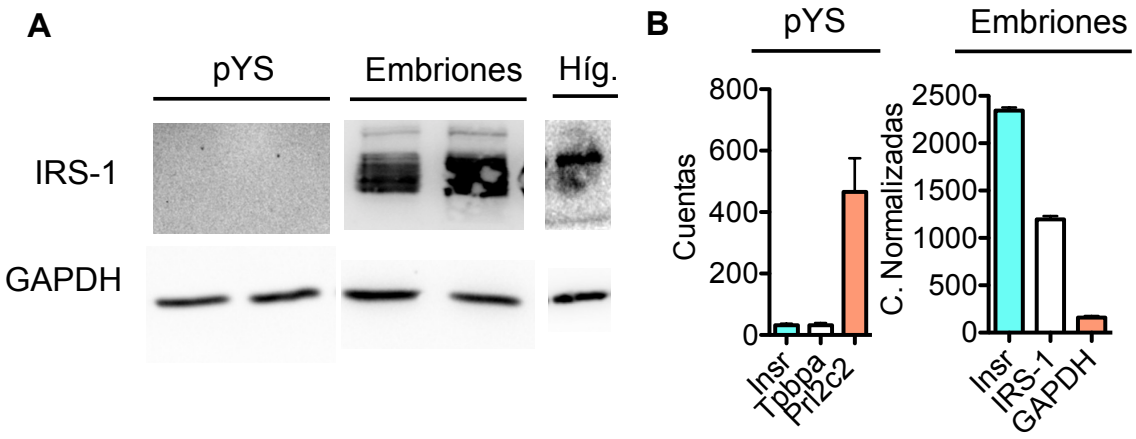


Figura 5.- Detección de la proteína de IRS-1 y del transcrito del Insr en pYS y embriones de genotipo WT. A) Detección por Western blot de IRS-1 en lisados de pYS y embriones y **B)** del transcrito de Insr a partir de bases de datos de transcriptómica previamente generadas[58,184]. Controles negativos: Tbpa. Controles positivos: Prl2c2, GAPDH.

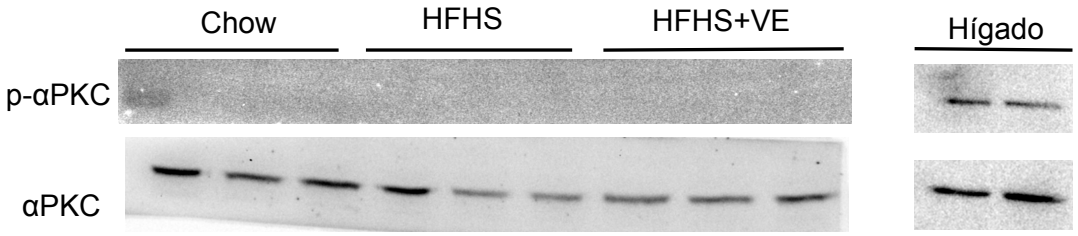


Figura 6.- Efecto de una dieta preconcepcional HFHS sola o suplementada con vitamina E sobre los niveles de fosforilación de α-PKC en embriones. Detección por Western blot de p-αPKC en lisados de A) embriones obtenidos de ratonas preñadas (E9,5) alimentadas con dieta chow, HFHS ó HFHS suplementada con vitamina E. **B)** Detección de p-αPKC y αPKC total en lisados de hígado como control positivo.