



TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

CURSO 2022-2023

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Determinación de ésteres de retinilo en
hígado de ratones adultos de 1 año tras la
exposición a TCDD durante la gestación y
lactancia

Autor: Alejandro Cerdán Vicente

Tutor académico: Javier Esteban Mozo

Co-tutor: Roger Ortiz Climent

D. JAVIER ESTEBAN MOZO, Doctor y Profesor Titular del área de Toxicología del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

“Determinación de ésteres de retinilo en hígado de ratones adultos de 1 año tras la exposición a TCDD durante la gestación y lactancia”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

D. ALEJANDRO CERDÁN VICENTE

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Bioingeniería, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a **4 de septiembre** de 2023



Fdo.: Prof. Javier Esteban Mozo

Resumen

La exposición temprana a compuestos que son disruptores endocrinos, tales como las policlorodibenzo-*p*-dioxinas, se ha relacionado con enfermedades no transmisibles y crónicas en la vida adulta. En dichas enfermedades, el sistema retinoide puede ser una de las dianas de tales compuestos puesto que cumple funciones de regulación en procesos como reproducción o desarrollo. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue la determinación de los niveles de ésteres de retinilo a día post natal 365. Para ello, se expusieron ratones híbridos C57BL / 6JxFVB a la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina, agonista del receptor de hidrocarburos de arilo, en un diseño experimental relevante para la salud humana. La exposición ocurrió durante la gestación y la lactancia a través de la alimentación materna a un amplio rango de dosis (10-10,000 pg / kg de peso corporal / día). La exposición cesó en el día post natal 14 y la descendencia se siguió hasta el día post natal 365 cuando se sacrificaron. Se cuantificaron los niveles de diferentes ésteres de retinilo, entre los que se encuentran el palmitato de retinilo y el estearato, mediante cromatografía líquida de alta resolución. Se evaluó la presencia o ausencia de relaciones dosis-respuesta mediante el paquete *Proast* en R. Se observó un incremento de los ésteres de retinilo en machos, mientras que en hembras hubo una ausencia de efectos. Los ésteres de retinilo determinan el estatus de la vitamina A y la activación del AhR reduce los niveles de ésteres de retinilo en hígado. Por tanto, en base a los resultados del presente TFM, la exposición a niveles medioambientales de TCDD no causaría una deficiencia de vitamina A.

Palabras Clave

TCDD, disruptores endocrinos, hígado y ésteres de retinilo.

Abstract

Early exposure to endocrine-disrupting compounds, such as polychlorodibenzo-p-dioxins, has been linked to noncommunicable and chronic diseases in adult life. In said diseases, the retinoid system can be one of the targets of such compounds since it fulfills regulatory functions in processes such as reproduction or development. Therefore, the objective of this work was the determination of retinyl ester levels at postnatal day 365. For this, C57BL / 6JxFVB hybrid mice were exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, aryl hydrocarbon receptor agonist, in an experimental design relevant to human health. Exposure occurred during gestation and lactation through maternal feeding at a wide range of doses (10-10,000 pg/kg bw/day). Challenge ceased on postnatal day 14 and offspring were followed until postnatal day 365 when they were sacrificed. The levels of different retinyl esters, including retinyl palmitate and stearate, were quantified by high performance liquid chromatography. The presence or absence of dose-response relationships was evaluated using the Proast package in R. An increase in retinyl esters was observed in males, while in females there was no effect. Retinyl esters determine vitamin A status, and AhR activation reduces liver retinyl ester levels. Therefore, based on the results of this TFM, exposure to environmental levels of TCDD would not cause vitamin A deficiency.

Key words

TCDD, endocrine disruptors, liver and retinyl esters.



Abreviaturas

AhR	Receptor de Hidrocarburos Aromáticos	PCDD	Policlorodibenzo-p-dioxinas
AR	Ácido retinoico	PCDF	Policlorodibenzofuranos
ARAT	AcilCoA-retinol aciltransferasa	PND	Día post natal
BMD	Dosis de <i>Benchmark</i>	POP	<i>Persistent Organic Pollutants</i>
BMR	Respuesta de <i>Benchmark</i>	RARE	Elemento de Respuesta al Ácido Retinoico
CAR	Receptor Constitutivo de Androstano	RBP	Proteína de Unión a Retinol
COP	Compuesto orgánico persistente	RE	Éster De Retinilo
CRABP	Proteína de unión al ácido retinoico intracelular	REAC	Acetato de retinilo
CRBP	Proteína Celular de Unión al Retinol	REH	Retinil éster hidrolasa
DHRS3	Retinaldehído reductasa 3	REOH	Retinol
DL50	Dosis letal 50	REPA	Palmitato de retinilo
EDC	Compuesto Disruptor Endocrino	RXR	Receptor X de Retinoides
GD	Día gestacional	STRA6	Proteína de membrana, estimulada por el ácido retinoico
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer	TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-para-dioxina
LRAT	Lecitina:Retinol Aciltransferasa	TEF	Factor de equivalencia tóxica
MW	Peso molecular	TTR	Transtiretina
NOAEL	Nivel sin efectos adversos observables	TWI	Ingesta semanal tolerable
PCB	Bifenilo Policlorado		

Índice

1. Introducción y antecedentes	12
1.1. Contaminantes orgánicos persistentes	12
1.2. Dioxina modelo: TCDD.....	13
1.2. Sistema retinoide	16
1.2.1. Fundamentos del sistema retinoide.....	16
1.2.2. Reservorios celulares de retinoides en el organismo	17
1.2.3. Rutas metabólicas de retinoides: absorción, transporte y modulación celular	17
1.2.4. Interacción celular: receptores y modulación genética	19
1.3. Antecedentes	20
2. Objetivos	20
3. Procedimiento experimental.....	21
3.1. Estudio experimental con animales de experimentación.....	21
3.2. Determinación de ésteres de retinilo en hígado.....	22
3.2.1. Precauciones de laboratorio.....	22
3.2.2. Preparación de estándares	23
3.2.3. Estabilidad química de los patrones	23
3.2.4. Reactivos.....	24
3.2.5. Disoluciones y rectas de calibración.....	25
3.2.6. Equipos.....	26
3.2.7. Procesado de la muestra.....	26
3.2.8. Condiciones cromatográficas.....	27
3.3. Análisis estadístico.....	28
4. Resultados.....	29
4.1. Estabilidad de química de los patrones	29
4.1.1. Fotoisomerización y fotodegradación de ésteres de retinilo	29
4.1.2. Estabilidad química a -20 °C.....	30
4.2. Niveles de ésteres de retinilo en animales tratados durante la gestación y la lactancia a TCDD.....	1
5. Discusión.....	4
6. Conclusiones.....	8
7. Bibliografía.....	10

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de PCDDs (A) y PCDFs (B). $Cl_x + Cl_y = 1 - 8$	13
Figura 2. Estructura de la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-para-dioxina (TCDD).....	13
Figura 3. (A) Pictograma GHS06 (toxicidad aguda), (B) GHS09 (peligro para el ambiente acuático) y (C) GHS08 (peligro para la salud humana).....	15
Figura 4. Representación de compuestos retinoides como REOH y REPA.....	16
Figura 5. Descripción de la Absorción, Captación, Metabolismo y Señalización Nuclear de Retinoides en el organismo. (1) Co-represores/Co-activadores transcripcionales.....	19
Figura 6. Representación de compuestos retinoides ácidos como ATRA y A9CR.....	19
Figura 7. Diseño experimental para la exposición a TCDD durante la gestación y lactancia y posterior estudio de los efectos provocados en la descendencia. GD: día gestacional y PND: día postnatal.	22
Figura 8. Sala oscura (izquierda) y campana extractora de gases (derecha) donde se llevó a cabo el procesado de muestras.....	23
Figura 9. Representación de la recta de calibración con la ecuación de la recta ($y=m \cdot [C]$) y el coeficiente de correlación (R^2) del éster de retinilo REPA.....	25
Figura 10. Protocolo del procesado de las muestras, análisis mediante HPLC y programas de cromatografía.....	27
Figura 11. Espectro de absorción del estándar interno REAC. La línea azul se corresponde con el compuesto en oscuridad, mientras que la línea roja se trata del compuesto sometido a luz blanca y solar.....	29
Figura 12. Espectro de absorción del éster de retinilo REPA. La línea azul se corresponde con el compuesto en oscuridad, mientras que la línea roja se trata del compuesto sometido a luz blanca y solar.....	29
Figura 13. Cromatograma del estándar interno REAC. La línea roja corresponde al grupo de oscuridad, mientras que la línea azul se corresponde con las muestras expuestas a la luz blanca y al sol.	30
Figura 14. Cromatograma del éster de retinilo REPA. La línea roja corresponde al grupo de oscuridad, mientras que la línea azul se corresponde con las muestras expuestas a la luz blanca y al sol.	30
Figura 15. Cromatograma del éster de retinilo REPA. La línea roja se corresponde con la muestra de REPA analizada en marzo de 2023. La línea azul se corresponde con la muestra del estándar analizada en julio de 2022.....	31
Figura 16. Cromatograma con los tiempos de retención de ésteres de retinilo (REOH, REAC, Mistearato y Linoleato, Oleato, REPA y Estearato). Los compuestos retinoides presentes en el cromatograma en orden de elución son: REOH (tiempo de retención = 4,67 min), el estándar interno REAC (tiempo de retención = 5,81 min), los ésteres de retinilo, que coeluyeron, Mistearato y Linoleato (tiempo de	

retención = 17,64 min), Oleato de retinilo (tiempo de retención = 18,96 min), el más abundante de los ésteres que es REPA (tiempo de retención = 19,21 min) y por último Estearato de retinilo (tiempo de retención = 20,49 min).	1
Figura 17. Modelado lineal de concentraciones hepáticas del REPA en ratones hembra F ₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.	1
Figura 18. Modelado lineal de concentraciones hepáticas de los ésteres de retinilo Mistearato y Linoleato (Mist/Lin) en ratones hembra F ₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.	1
Figura 19. Modelado lineal de concentraciones hepáticas del Oleato de retinilo en ratones hembra F ₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.	1
Figura 20. Modelado lineal de concentraciones hepáticas del Estearato de retinilo en ratones hembra F ₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.	1
Figura 21. Modelado lineal de concentraciones hepáticas del contenido total de ésteres de retinilo en ratones hembra F ₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.	2
Figura 22. Modelado dosis-respuestas mediante BMD de concentraciones hepáticas del REPA en ratones macho F ₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.	2
Figura 23. Modelado dosis-respuestas mediante BMD de concentraciones hepáticas de los ésteres de retinilo Mistearato y Linoleato (Mist/Lin) en ratones macho F ₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.	2
Figura 24. Modelado dosis-respuestas mediante BMD de concentraciones hepáticas del Oleato de retinilo en ratones macho F ₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.	3
Figura 25. Modelado dosis-respuestas mediante BMD de concentraciones hepáticas del Estearato de retinilo en ratones macho F ₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.	3
Figura 26. Modelado dosis-respuestas mediante BMD de concentraciones hepáticas del total de ésteres de retinilo en ratones macho F ₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.	4

Índice de tablas

Tabla 1. Rango de concentraciones empleado para las soluciones de calibración.....	25
Tabla 2. Niveles hepáticos de ésteres de retinilo a PND365 en ratones hembra F ₁ tratados con TCDD durante la gestación y lactancia, expresados con la media más la desviación estándar.....	1
Tabla 3. Resultados del modelado dosis-respuesta de las concentraciones de ésteres de retinilo en hígado de ratones macho F ₁ sacrificados en PND365 y cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación y la lactancia.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 4. Niveles hepáticos de ésteres de retinilo a PND365 en ratones hembra F ₁ tratados con TCDD durante la gestación y lactancia, expresados con la media más la desviación estándar.....	1
Tabla 1. Efectos de la exposición a TCDD en diferentes estudios con exposición in vivo.....	¡Error! Marcador no definido.



1. Introducción y antecedentes

1.1. Contaminantes orgánicos persistentes

Los Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs), también conocidos por su acrónimo en inglés POPs (Persistent Organic Pollutants), son sustancias químicas ampliamente presentes en el medio ambiente. Estos compuestos incluyen sustancias organocloradas empleadas en su mayoría como plaguicidas y en aplicaciones industriales (Soto et al., 2021).

Estos compuestos orgánicos presentan diversas características que los hacen perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente. Una de esas características es la persistencia de estos compuestos en el ambiente que se debe a su alta estabilidad química. Lo que explica la baja tasa de biodegradación que presentan y la resistencia a la degradación natural, lo que se relaciona con su alta halogenación (Cerro Martín et al., 2012; Haffner & Schecter, 2014).

Otra de esas características es la bioacumulación que se debe a la liposolubilidad de los compuestos, es decir, a la acumulación en el tejido adiposo dificultando la degradación de estos. Este factor genera una acumulación progresiva en el tejido adiposo a medida que se escala en la cadena alimentaria, en un proceso conocido como biomagnificación (Cerro Martín et al., 2012). También, estos compuestos tienen una gran capacidad de transportarse a largas distancias lo que favorece su ubicuidad (Haffner & Schecter, 2014). Y se trata de agentes tóxicos que se han relacionado con daños en el sistema nervioso central, endocrino o reproductivo, malformaciones fetales, trastornos del comportamiento, diabetes, reducción del período de lactancia y carcinogénesis (WHO UNEP, 1995).

El Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes es un tratado internacional que tiene como objetivo controlar y reducir la emisión de estos contaminantes para proteger la salud humana y el medio ambiente de los efectos adversos que causan. El acuerdo fue adoptado en el año 2001 y entró en vigor el 17 de mayo de 2004. Con el fin de alcanzar este objetivo, se han establecido medidas para eliminar y/o reducir las emisiones de COPs en todo el mundo (WHO UNEP, 2001).

Hay diferentes tipos de estos compuestos y algunos han sido prohibidos o restringidos desde los años 70 debido a su toxicidad y efectos negativos en la salud humana y el medio ambiente (WHO UNEP, 1995)(EFSA, 2018). Un ejemplo de este tipo de compuestos que se pretende reducir su emisión son los policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDD) y policlorodibenzofuranos (PCDF).

Es relevante investigar los efectos de las dioxinas debido a su capacidad de persistencia en el medio ambiente y su toxicidad para los seres humanos, ya que pueden causar graves problemas de salud,

como cáncer, trastornos hormonales y daños al sistema inmunológico (Haffner & Schecter, 2014; Soto et al., 2021).

1.2. Dioxina modelo: TCDD

El término «dioxinas» se utiliza a menudo para referirse a una familia de hidrocarburos clorados de origen natural y antropogénico. Estos compuestos orgánicos tricíclicos clorados consisten en dos anillos bencénicos interconectados por uno o dos átomos de oxígeno y con 1 a 8 átomos de hidrógeno reemplazados por cloros (Schecter et al., 2006). Constituida por un grupo de 75 congéneres PCDD y 135 PCDF (**WHO, 2016**) (Figura 1). Bajo esta designación también se incluyen los bifenilos policlorados (PCB) análogos a las dioxinas.

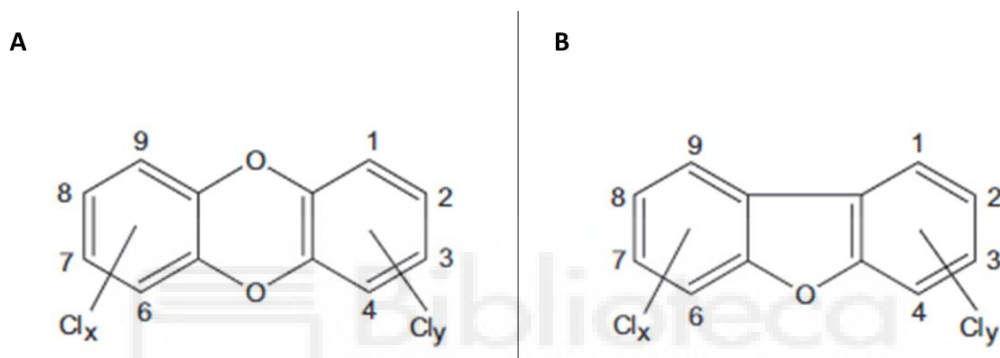


Figura 1. Estructura de PCDDs (A) y PCDFs (B). $Cl_x + Cl_y = 1 - 8$

El nombre químico de la dioxina modelo es la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-para-dioxina (TCDD) (Figura 2).

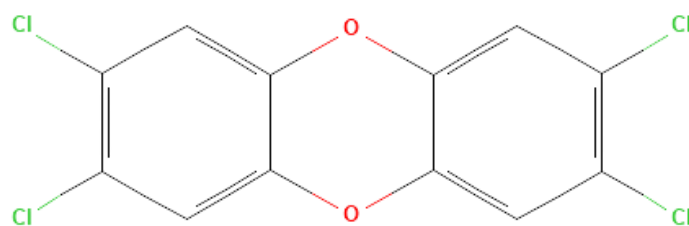


Figura 2. Estructura de la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-para-dioxina (TCDD)

La producción de estos compuestos se trata principalmente de subproductos no intencionados de procesos industriales, así como de procesos de combustión. Pero también, son productos no deseados de numerosos procesos de fabricación como la fundición, el blanqueo de la pasta de papel con cloro o la fabricación de algunos herbicidas y plaguicidas (Schecter et al., 2006a). Los suelos, sedimentos y alimentos, especialmente los productos lácteos, carnes, pescados y mariscos, son depósitos importantes de dioxinas dada la persistencia de estos contaminantes en el medio ambiente. Mientras que sus concentraciones son muy bajas en plantas, agua y aire (**WHO, 2016**).

Se trata de compuestos altamente resistentes a ácidos y bases, poseen una baja presión de vapor y son térmicamente estables por debajo de 600 °C. Son poco solubles en agua, pero altamente solubles en lípidos.

Debido a que este tipo de compuestos nunca se han producido a escala industrial y no tienen ningún uso tecnológico, se tomaron una serie de medidas reglamentarias a partir de la década de 1980, lo que conllevó que su emisión al medio ambiente en Europa haya disminuido considerablemente (Hites, 2011; EFSA, 2018).

A lo largo de los años ha habido incidentes de contaminación por dioxinas y algunos de los más recientes sucedieron en Irlanda a finales de 2008 cuando se detectaron niveles muy elevados de este compuesto en productos cárnicos de cerdos y sus derivados. Mientras que otro caso, ocurrió en 1999 en Bélgica y en este caso se hallaron alimentos de origen animal que habían sido contaminados con aceite industrial residual que había sido eliminado ilegalmente (WHO, 2016).

En cualquier caso, las dioxinas se encuentran en el medioambiente y en los alimentos formando mezclas complejas, sin un patrón fijo, y a concentraciones muy pequeñas, del orden de nanogramos por gramo (partes por trillón) (EFSA, 2018). Una vez que penetran en el organismo, persisten en él durante mucho tiempo gracias a su estabilidad química y a su fijación al tejido graso, donde quedan almacenadas. Se calcula que su semivida en el organismo oscila entre 7 y 11 años y en el medio ambiente se biomagnifican en la cadena alimentaria (Milbrath et al., 2009). También, hay que destacar que presenta un coeficiente de bioacumulación ($\log K_{ow}$) de 6,8, que se corresponde con una afinidad muy alta por su acumulación en el tejido adiposo, suelos y sedimentos (WHO, 2016).

La ingesta semanal tolerable (TWI) determinada por la EFSA para dioxinas y PCB similares a dioxinas en alimentos fue de 2 picogramos por kilogramo de peso corporal, siete veces más bajo que el consumo tolerable anterior (EFSA, 2018). Mientras que para los PCB no similares a dioxinas, no se ha podido establecer un valor de referencia toxicológico (EFSA, 2005).

El modo de acción toxicológico de las dioxinas y en concreto de dioxina modelo, TCDD, es mediante la unión al receptor de hidrocarburos de arilo (AhR). La sobreactivación de este receptor provoca la sobreexpresión de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, como la CYP1A (Denison & Nagy, 2003; Esteban et al., 2021; Safe, 1995) y efectos tóxicos en el ser humano. Esta interacción es similar a la que llevan a cabo los PCBs similares a dioxina (Bao et al., 2013; Elabbas et al., 2014).

Para la determinación de la toxicidad de las mezclas complejas de dioxinas y compuestos que comparten su mecanismo de acción (PCDD, PCDF y PCB similares a dioxinas) se emplea el factor de

equivalencia tóxica (TEF). La equivalencia tóxica expresa la toxicidad de este tipo de compuestos en términos de la forma más tóxica de dioxina conocida que es la TCDD y en consecuencia se utiliza como sustancia de referencia (TEF = 1). Este concepto se puede emplear para aquellos compuestos que compartan el mismo mecanismo de acción toxicológico de la TCDD (Birnhurn & Devito, 1995; Safe, 1998; Van Den Berg et al., 1998; Van Den Berg et al., 2006)

De hecho, la TCDD es muy potente con una DL50 (Dosis Letal, 50%) de 0,6 µg/kg de peso corporal (Schwetz et al., 1973; Van Den Berg et al., 2006). Por ello y otras observaciones, las dioxinas están clasificadas como compuestos tóxicos para el ser humano, de toxicidad aguda y peligrosos para el medio ambiente, y tienen asignados pictogramas que informan de la peligrosidad que suponen (Figura 3) y unos códigos de declaración de peligro también denominadas frases H. Los códigos de declaración de peligros asociados a estos compuestos son H300 (mortal en caso de ingestión), H319 (causa irritación ocular grave), H400 (muy tóxico para la vida acuática) y H410 (muy tóxico para la vida acuática con efectos duraderos) (Reglamento (CE) Nº 1272/2008 del parlamento europeo).

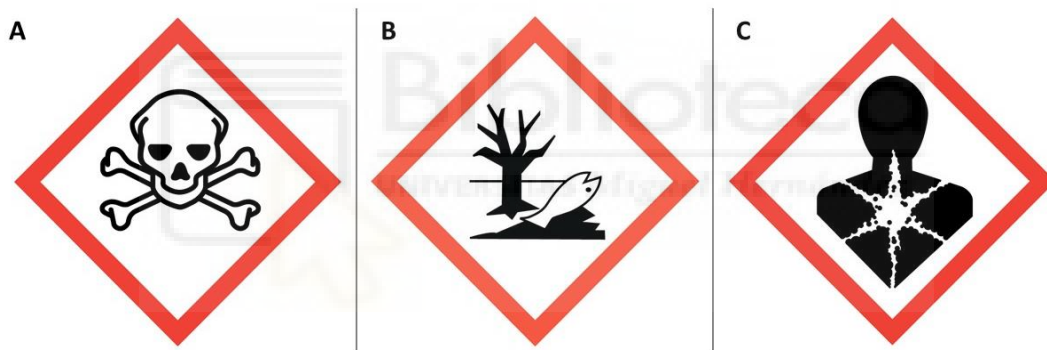


Figura 3. (A) Pictograma GHS06 (toxicidad aguda), (B) GHS09 (peligro para el ambiente acuático) y (C) GHS08 (peligro para la salud humana)

La exposición aguda del ser humano a altas concentraciones de dioxinas puede causar lesiones cutáneas, así como alteraciones funcionales hepáticas. La exposición prolongada se ha relacionado con alteraciones inmunitarias, del sistema nervioso en desarrollo, del sistema endocrino y de la función reproductora. La exposición crónica de los animales a las dioxinas ha causado varios tipos de cáncer (Kogevinas, 2001; Schecter et al., 2006). Se ha observado que el feto es particularmente sensible a la exposición a las dioxinas. Mientras que los recién nacidos, puede ser más vulnerables a algunos efectos. También se ha visto que algunos individuos o grupos de individuos pueden estar expuestos a mayores concentraciones de dioxinas debido a sus dietas o a su trabajo (White & Birnbaum, 2009).

El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) realizó en 1997 y 2012 evaluaciones de TCDD, el congénere más tóxico de las dioxinas, y lo clasificó como un compuesto carcinógeno (grupo

1) para los seres humanos. También se ha observado que se trata de un compuesto teratogénico y tóxico para la reproducción (WHO, 2016).

Se trata de un compuesto capaz de alterar el normal funcionamiento del sistema endocrino, lo que se conoce como disruptor endocrino. Presenta múltiples mecanismos de acción de disrupción endocrina, por ejemplo, mediante los efectos xenoestrogénico y antiandrogénicos, pero también altera los niveles de hormonas tiroideas y a la síntesis de hormonas esteroideas (esteroidogénesis) (Dhanabalan et al., 2015; Kharat & Saatcioglu, 1996; Pocar et al., 2006).

Asimismo, altera el sistema retinoide por lo que presenta una potencial aplicación para la identificación de disruptores endocrinos. Por lo tanto, se está estudiando la alteración de la ruta de señalización del ácido retinoico (OECD, 2021) (Piersma et al., 2017).

1.2. Sistema retinoide

1.2.1. Fundamentos del sistema retinoide

Los retinoides son un grupo de compuestos químicamente relacionados, que incluyen la vitamina A, y son considerados micronutrientes esenciales que deben ser suministrados en la dieta. Estos compuestos pueden obtenerse de fuentes vegetales en forma de carotenoides o de fuentes animales en forma de retinol (ROH) y ésteres de retinilo (RE) (Al Tanoury et al., 2013) (Figura 4).

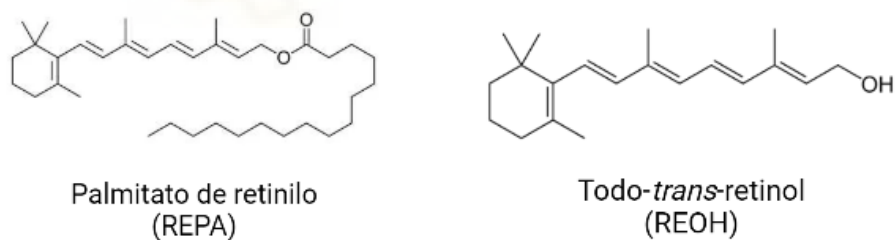


Figura 4. Representación de compuestos retinoides como REOH y REPA

La importancia de los retinoides en el organismo es fundamental, ya que desempeñan un papel crucial en diversas funciones biológicas, como la visión, la reproducción, el desarrollo embrionario, el crecimiento y desarrollo en la etapa adulta, así como en el mantenimiento de la inmunidad y las barreras epiteliales (O'Byrne & Blaner, 2013).

Además de ser considerados nutrientes esenciales, los retinoides también actúan como hormonas debido a su capacidad de señalizar a través de receptores nucleares (Petkovich et al., 1987).

Los niveles de la forma activa de los retinoides, conocida como ácido todo-*trans*-retinoico (ATRA), están estrechamente regulados mediante mecanismos enzimáticos celulares locales, como el catabolismo mediado por las enzimas citocromo P450 (CYP) 26A1, B1 y C1 (Topletz et al., 2015). Esta regulación es esencial para asegurar una adecuada señalización a través de los receptores nucleares (Ghyselinck & Duester, 2019).

1.2.2. Reservorios celulares de retinoides en el organismo

Los retinoides, principalmente en forma de retinol (ROH) y ésteres de retinilo (RE), son las formas más abundantes presentes en el organismo. Para que estos retinoides sean biológicamente activos y puedan desempeñar sus funciones en las células diana, es necesario someterlos a una serie de pasos de conversión que los transformen en su forma activa de ácido retinoico (AR) dentro de las células diana (Blaner et al, 2019).

En cuanto al almacenamiento de retinoides en el organismo, la gran mayoría, alrededor del 80-85%, se encuentra en el hígado. Este órgano es esencial para el procesamiento y conservación de estos compuestos vitales. Dentro del hígado, tanto las células estrelladas hepáticas como los hepatocitos desempeñan un papel crucial en este proceso. Los hepatocitos están especialmente involucrados en la absorción inicial de retinoides en el hígado y, además, son responsables de la síntesis y secreción de una proteína de transporte sérico llamada RBP4 (proteína transportadora de retinol) (Blomhoff et al., 1982). Estas funciones hacen que los hepatocitos sean fundamentales tanto para la absorción como para la movilización de la vitamina A dentro y fuera del hígado, manteniendo un equilibrio esencial en el metabolismo de los retinoides (Reboul, 2013).

Por otra parte, el tejido adiposo también cumple un papel relevante en el almacenamiento de retinoides. En este tejido, tanto el retinol como los ésteres de retinilo se acumulan para mantener su homeostasis y asegurar su disponibilidad en momentos de necesidad. Investigaciones recientes han mostrado una correlación entre los niveles de retinoides presentes en el tejido adiposo y los niveles en el hígado, lo que sugiere una estrecha interacción entre ambos sistemas para garantizar el correcto funcionamiento del organismo (Sheftel et al., 2019; Sheftel & Tanumihardjo, 2021).

1.2.3. Rutas metabólicas de retinoides: absorción, transporte y modulación celular

La absorción, transporte y metabolismo de retinoides juegan un papel crucial en el equilibrio de estos compuestos esenciales en el organismo. La absorción intestinal de retinoides de la dieta comienza con la hidrólisis de los ésteres de retinilo (RE) en retinol (ROH) en la luz intestinal por la REH (retinil éster hidrolasa), seguida por la reesterificación de ROH en RE después de la absorción en los enterocitos. En

situaciones en las que los niveles de ROH exceden los niveles fisiológicos normales, la enzima ARAT se suma a LRAT para mantener la homeostasis mediante la síntesis de ésteres de retinilo (Figura 5) (Blomhoff et al., 1982; Reboul, 2013).

Los RE, junto con los carotenoides, son liberados en la circulación como parte de las partículas de quilomicrones. En el hígado, los RE se hidrolizan nuevamente en ROH. Este ROH puede ser reesterificado para su almacenamiento hepático o se une a la RBP4 para su liberación en la circulación. Dentro del torrente sanguíneo, el complejo ROH-RBP4 se asocia con la transtiretina (TTR) (D'Ambrosio et al., 2011) (Figura 5). Esta forma de transporte de retinoides permite la distribución de ROH a tejidos extrahepáticos a través de la sangre.

Una vez en el órgano diana, RBP4 presenta afinidad por el transportador de membrana conocido como proteína de membrana estimulada por el ácido retinoico (STRA6), facilitando el acceso de ROH al interior de la célula. La absorción de ROH por STRA6 parece ser reforzada por la presencia de dos proteínas que son LRAT y CRPB1 en el lado intracelular de la membrana, dependiendo de la disponibilidad de ROH dentro de la célula (Figura 5) (Kelly & von Lintig, 2015).

En este proceso, ocurren varias etapas cruciales en las células diana. El retinol (ROH) se oxida de manera reversible a retinaldehído mediante la acción de la enzima RDH10, y este último puede reducirse nuevamente a ROH gracias a la enzima DHRS3 (retinaldehído reductasa 3) (Kelly & von Lintig, 2015). Este ciclo de oxidación y reducción está regulado por una respuesta de retroalimentación negativa en función de la disponibilidad de ácido retinoico y la proporción de las formas holo y apo de las proteínas de unión al retinol celular (CRBP). El retinaldehído, a su vez, puede someterse a una oxidación irreversible a ácido retinoico (AR) mediante la enzima RALDH (Retinaldehído deshidrogenasa) y este puede ser degradado a su vez por las enzimas CYP26 dando lugar a metabolitos oxidados, que la mayoría son inactivos (Figura 5) (Ghyselinck & Duester, 2019).

Las proteínas de unión al ácido retinoico intracelular (CRABP) son fundamentales en el transporte del AR desde el citoplasma hacia el núcleo donde se encuentran los receptores de ácido retinoico nuclear (RAR). El AR es un ligando de los receptores de ácido retinoico (RAR) (Ghyselinck & Duester, 2019). Los receptores RAR inactivos se asocian con co-represores (CoR), lo que suprime la transcripción génica, mientras que los RAR activados por AR se unen a co-activadores (CoA), lo que activa la transcripción génica y modula la expresión de genes diana regulados por elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE) (Vilhais-Neto & Pourquié, 2008) (Figura 5).

Además de transportar AR al núcleo, las CRABPs también desempeñan un papel crucial en la regulación de los niveles intracelulares de AR, ya que controlan la cantidad de AR que ha de degradarse y, por lo

tanto, influyen en los procesos de retroalimentación y regulación de los retinoides en la célula (Ghyselinck & Duester, 2019).

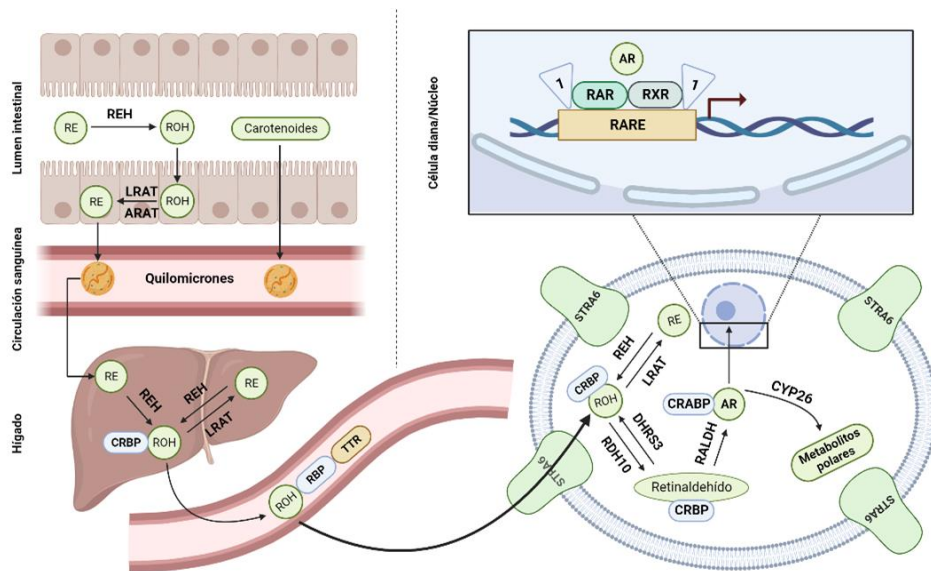


Figura 5. Descripción de la Absorción, Captación, Metabolismo y Señalización Nuclear de Retinoides en el organismo. (1) Co-represores/Co-activadores transcripcionales.

1.2.4. Interacción celular: receptores y modulación genética

Los RARs desempeñan un papel fundamental en la regulación génica mediante su interacción con el ácido retinoico (AR). Estos receptores forman heterodímeros con receptores X de retinoides (RXR), lo que les permite influir en una amplia variedad de procesos celulares al regular la transcripción de genes (Germain et al., 2006).

Aunque tanto el AR como el 9-*cis*-RA (Figura 6), así como ligandos sintéticos, pueden activar RAR, se considera que el AR es el ligando endógeno de RAR (Mouchon et al., 1999). En estado no ligado, los receptores RAR funcionan como represores transcripcionales, manteniendo bajo control la expresión de genes específicos. En los heterodímeros RAR-RXR, RXR actúa como un "socio silencioso", lo que significa que el ligando de RAR es esencial y suficiente para disociar el complejo co-represor, permitiendo una respuesta adecuada ante el estímulo del ácido retinoico (le Maire et al., 2019).

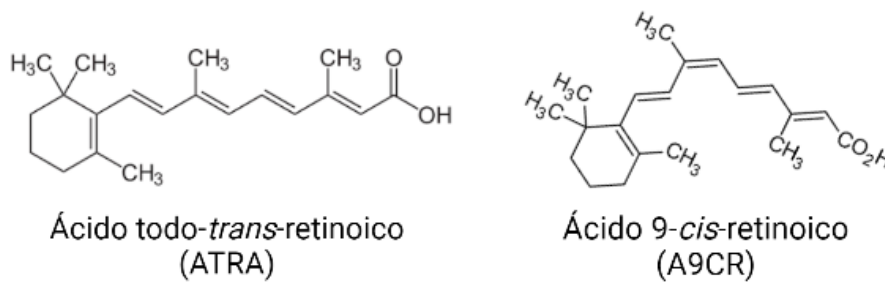


Figura 6. Representación de compuestos retinoides ácidos como ATRA y A9CR

Los RAR y RXR pertenecen a la misma familia de receptores de hormonas nucleares que incluye las hormonas esteroideas, la hormona tiroidea y los receptores de vitamina D, además de varios receptores huérfanos y receptores activados por metabolitos intermediarios (Szanto et al., 2004). Entre los receptores retinoides, RAR α , RXR α y RXR β presentan patrones de expresión más generalizados, mientras que RAR β , RAR γ y RXR γ muestran una expresión más específica y restringida a ciertos tejidos. Esta diversidad de expresión implica que la señalización retinoide tiene el potencial de afectar a la mayoría de los tejidos en el organismo (Rhinn & Dollé, 2012).

1.3. Antecedentes

El presente Trabajo Fin de Máster se ha llevado a cabo en el marco del proyecto OBELIX (*OBesogenic Endocrine disrupting chemicals (EDCs): Linking prenatal eXposure to the development of obesity later in life*). OBELIX es un proyecto de investigación europeo multidisciplinar que se realizó desde mayo de 2009 hasta noviembre de 2013 (Legler et al., 2011) donde se ha estudiado si la exposición temprana a los EDC desempeña un papel en el desarrollo de la obesidad y los trastornos relacionados más adelante en la vida, tanto en seres humanos como en animales de experimentación. OBELIX demostró que la exposición perinatal a las principales clases de EDC en alimentos está muy extendida en toda Europa (Govarts et al., 2012; Thomsen et al., 2010). En estudios epidemiológicos, se observó que la exposición postnatal a PCB 153 se relacionó con la reducción del peso al nacer, el índice de masa corporal (IMC) y los niveles séricos de leptina a los 6 años (Gascon et al., 2014; Govarts et al., 2014; Sonnenschein-Van Der Voort et al., 2014). Los estudios en ratones mostraron que la exposición perinatal en la dieta a los EDC resultó en niveles alterados de lípidos séricos y/o hormona adipocina en la edad adulta (Bastos Sales et al., 2013; Ghosh et al., 2013; Kamstra et al., 2014). Los estudios en animales también mostraron que la exposición perinatal a diferentes EDC modelo causó efectos a nivel metabólico que fueron específicos de este tipo de compuestos, así como dependientes de sexos, ocurriendo estos con una latencia, lo que sugiere que existe una relación entre la exposición durante la gestación y lactancia con el padecimiento de una enfermedad en edad adulta (Barker et al., 1989; Bergman et al., 2013; Ramírez-Vélez, 2012).

En conjunto, los resultados del proyecto OBELIX indican que la exposición temprana a los EDC puede alterar las vías metabólicas que desempeñan un papel esencial en el metabolismo energético y la regulación del peso (De Cock & Van de Bor, 2014; Legler, 2013). Las consecuencias a largo plazo de estos efectos en la primera infancia justifican su investigación.

2. Objetivos

Los objetivos del presente TFM fueron:

- Determinación de los niveles de ésteres de retinilo en hígado de ratones a día post-natal 365 que fueron tratados con TCDD durante la gestación y la lactancia, y alimentados finalmente con una dieta rica en grasas.
- Evaluación de las potenciales relaciones dosis-respuesta en los ésteres de retinilo por la exposición a TCDD durante la gestación y la lactancia, y alimentados finalmente con una dieta rica en grasas.

3. Procedimiento experimental

3.1. Estudio experimental con animales de experimentación

En el presente estudio, ratonas nulíparas C57BL/6J F₀ (Charles River, Sulzfeld, Alemania) se alojaron en cubículos aislados durante 1 semana (período de aclimatación) y posteriormente se aparearon con machos FVB (GPL, Bilthoven, Países Bajos y Harlan, Alemania) para producir descendencia híbrida (Dollé et al., 2011).

Desde el punto de vista dietético, se emplearon dos dietas diferentes para la alimentación de los ratones. Desde el comienzo del estudio hasta el PND308 se empleó la dieta NIH-07, optimizada para la gestación y lactancia para ratones (Research Diet Services, Wijk bij Duurstede, Países Bajos). Mientras que desde el PND308 hasta el sacrificio (PND365) de las crías, se les suministró la dieta alta en grasas D12451 (Research Diet Services, Wijk bij Duurstede, Países Bajos) (Figura 7).

La dieta D12451 contenía 45 % kcal de grasa en comparación con 15 % kcal de grasa en la dieta NIH-07 (van Esterik et al., 2015).

La exposición a TCDD comenzó al inicio del preapareamiento (2 semanas) y finalizó en el PND14, para una reducción óptima de la excreción de TCDD después del destete. Los ratones fueron finalmente sacrificados al año (PND365) (van Esterik et al., 2015) (Figura 7).

Concretamente, inicialmente se administró a las hembras F₀ una dosis de carga por vía oral. Posteriormente, el tratamiento con TCDD se mezcló en la dieta (NIH-07, Research Diet Services, Wijk bij Duurstede, Países Bajos). Se establecieron 7 grupos tratados con TCDD (rango de dosis: 10-10.000 pg / kg de peso corporal) y un grupo control (Figura 7) (van Esterik et al., 2015).

La dosis máxima fue inferior al LOAEL y NOAEL en ratas de 25 ng/kg de peso corporal/día (ng/kg pc/día) (Faqi et al., 1998) elegidas por el Comité Científico sobre Alimentos de la Comisión Europea (SCF, 2001) y descritas en Larsen (2006).

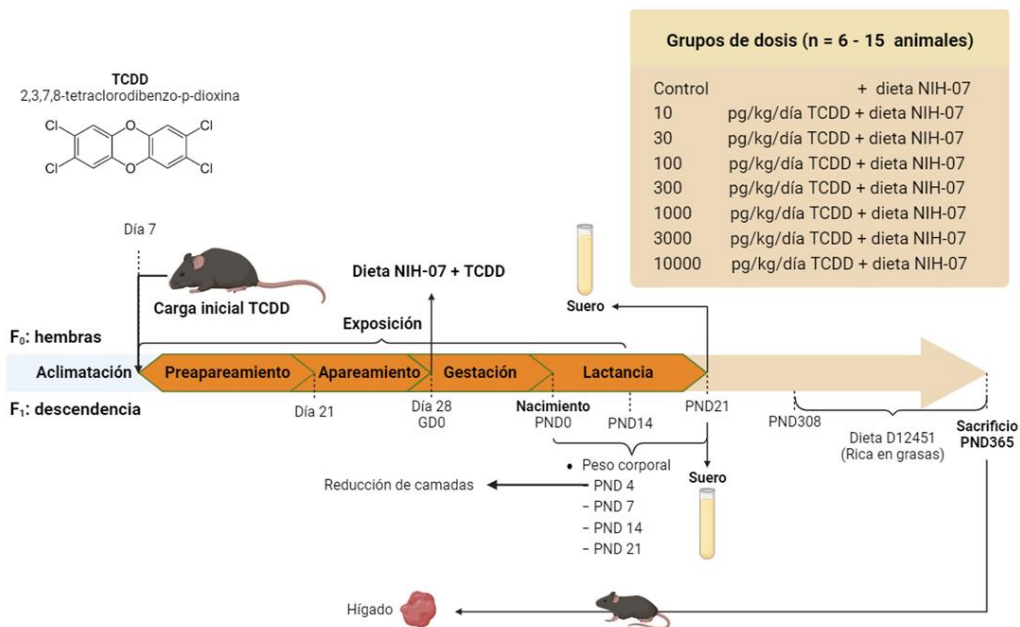


Figura 7. Diseño experimental para la exposición a TCDD durante la gestación y lactancia y posterior estudio de los efectos provocados en la descendencia. GD: día gestacional y PND: día postnatal.

Con respecto a las madres, se registró el peso corporal y el consumo de alimentos durante las diferentes fases (preapareamiento, gestación y lactancia). También, se midieron los niveles de TCDD en el suero de las madres en el PND21 y de los 3 grupos de dosis superior de las crías. Para limitar los efectos del tamaño de la camada en el crecimiento, las camadas se redujeron a 9 crías en el PND4 (Figura 7).

Con respecto a las crías, después del destete en el PND21 continuaron con la dieta NIH-07. Los grupos de dosis tenían en promedio 9,3 ratas por sexo (rango 6-10, reclutadas uniformemente) y el grupo de control tenía 15 ratas por sexo (van Esterik et al., 2015). También, se les midió el peso corporal en el PND4, 7, 14, 21 y semanalmente desde la semana 5 hasta el final del estudio.

3.2. Determinación de ésteres de retinilo en hígado

3.2.1. Precauciones de laboratorio

El procesamiento de las muestras y estándares se llevó a cabo en una sala oscura donde se emplearon lámparas con luz amarilla. En la campana extractora de gases se utilizar luz roja tenue. De esta forma se evitan procesos de fotoisomerización y/o fotodegradación (Figura 8). Las disoluciones de retinoides y los retinoides sólidos se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que las muestras biológicas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tanto los patrones como las muestras se almacenaron en atmósfera de nitrógeno (Schmidt et al., 2003).

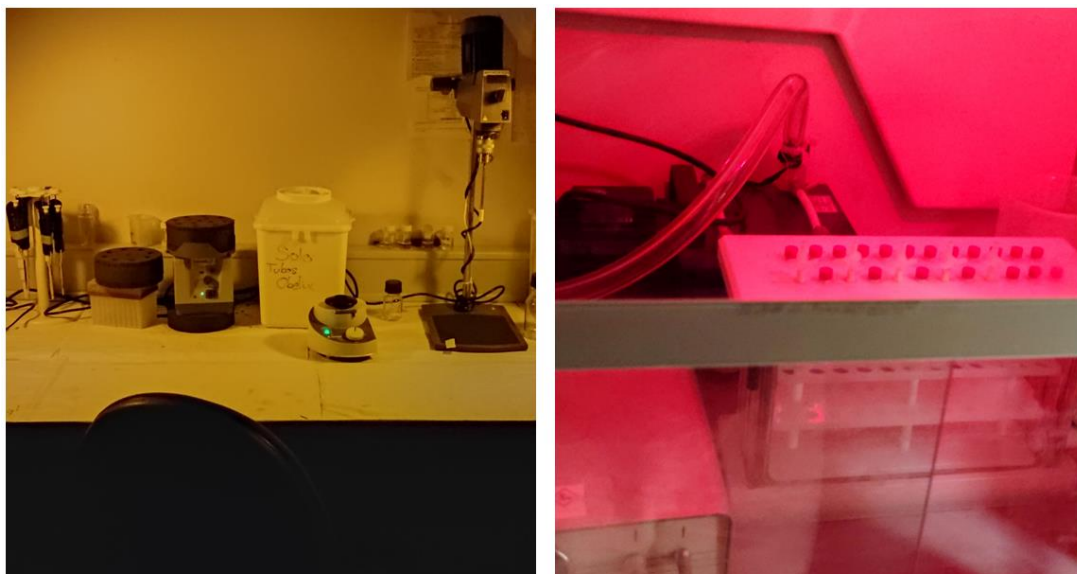


Figura 8. Sala oscura (izquierda) y campana extractora de gases (derecha) donde se llevó a cabo el procesado de muestras

Los tubos empleados en la homogenización y tubos de centrifuga se reutilizaron y para ello se lavaron y después se enjuagaron manualmente con etanol y agua destilada. Posteriormente se pirolizaron a 450-500 °C en un horno durante 2,5 horas.

3.2.2. Preparación de estándares

Se prepararon disoluciones de los patrones de ésteres de retinilo a partir del principio activo, tanto para el estándar interno REAC como para REPA. En el caso del REAC, se obtuvo una disolución final con una concentración en torno a 156,8 nmol/mL, que fue confirmada espectrofotométricamente. Mientras que el REPA, se preparó un patrón a una concentración final de 1072,49 nmol/mL. Ambos estándares se disolvieron en etanol y se sumergieron en un baño donde se sonicaron para favorecer la completa disolución de los ésteres.

Las concentraciones exactas de los estándares se determinaron espectrofotométricamente utilizando un espectrofotómetro UV/Vis D520 (Beckman Coulter, Palo Alto, California, EE. UU.) conforme se describió previamente (Barua & Furr, 1998). Todos los patrones preparados se mantuvieron en frascos de color topacio a – 20 °C en una atmósfera de nitrógeno.

3.2.3. Estabilidad química de los patrones

3.2.3.1. Fotoisomerización y fotodegradación de ésteres de retinilo

Se comprobó la estabilidad química de REAC y REPA en condiciones de exposición a la luz blanca y al sol. Un tubo de REAC (con una concentración en torno a un 2 nmol/mL) y otro de REPA (con una concentración alrededor de 5 nmol/mL) se expusieron a luz solar durante 1 hora y 45 minutos (21 de

julio de 2024 a las 11:08 horas, índice UV muy alto de 10 en Elche y una temperatura superior a los 30 °C). Otros tubos de REAC y REPA se expusieron a luz amarilla o roja tenue, como control, reproduciendo las condiciones de operación en el laboratorio. Después, se evaluó el espectro de absorción (rango 260 – 400 nm) y se comprobó espectrofotométricamente la concentración de REAC y REPA. Asimismo, se realizó un análisis por HPLC para evaluar la alteración del perfil cromatográfico debido a la fotoisomerización o fotodegradación producida por la luz.

3.2.3.2. Estabilidad química a – 20 °C

También, se evaluó la estabilidad de los patrones del éster de retinilo REPA en el tiempo. Para ello, después de la preparación de estos, se almacenaron a – 20 °C durante 8 meses y posteriormente se midió la concentración cromatográficamente. Finalmente, se comparó el cromatograma resultante para determinar las diferencias entre ambos en cuanto a la aparición de nuevos picos y la concentración obtenida con la inicial que se tenía del compuesto.

3.2.4. Reactivos

Los disolventes empleados tenían una calidad para HPLC y fueron: cloroformo suministrado por Scharlab (Barcelona, España) junto con metanol, etanol, isopropanol, acetonitrilo, n-hexano y ácido acético glacial suministrados por J. T. Baker (Center Valley, USA).

Los principios activos de los ésteres de retinilo que se emplearon fueron el estándar interno acetato de retinilo (REAC, Peso molecular (MW) = 328,5 g/mol) y todo-*trans*-palmitato de retinilo (REPA, MW = 524,9 g/mol) que fueron suministrados por Merck (Madrid, España). También, se determinaron otros ésteres de retinilo mediante la recta de calibrado del REPA en molar (M) y fueron: todo-*trans*-misteato de retinilo (Misteato, MW = 496.8 g/mol) y todo-*trans*-linoleato de retinilo (Linoleato, MW = 546.9 g/mol) que coeluyeron juntos, todo-*trans*-oleato de retinilo (Oleato, MW = 550,9 g/mol) y todo-*trans*-estearato de retinilo (Estearato, MW = 552,9 g/mol).

Se emplearon para las rectas de calibrado un polvo de grado microbiológico que contenía albúmina de suero bovino (BSA) con una pureza $\geq 95\%$ que suministró Termo Fisher Scientific (Madrid, España) y una mezcla de lípidos suministrada por Merk (Schnelldorf, Alemania). También se utilizó agua desionizada purificada por el módulo Mili Q (Millipore, Molsheim, Francia) y una botella de nitrógeno gaseoso (Air Liquide, Madrid, España).

3.2.5. Disoluciones y rectas de calibración

Se prepararon veinte soluciones patrón de calibración diferentes en una solución de albúmina sérica bovina (BSA 5 % p/v) y una mezcla lipídica (50% v/v) para simular la matriz que presenta una muestra de un animal de experimentación (Figura 9). Se prepararon las soluciones para un éster de retinilo (REPA) junto con la adición del estándar interno (REAC 156,8 nmol/mL, igual que las muestras). Para el estándar interno, se manejó la misma concentración para todas las soluciones de calibración y se emplearon para corregir los datos de concentración obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución.

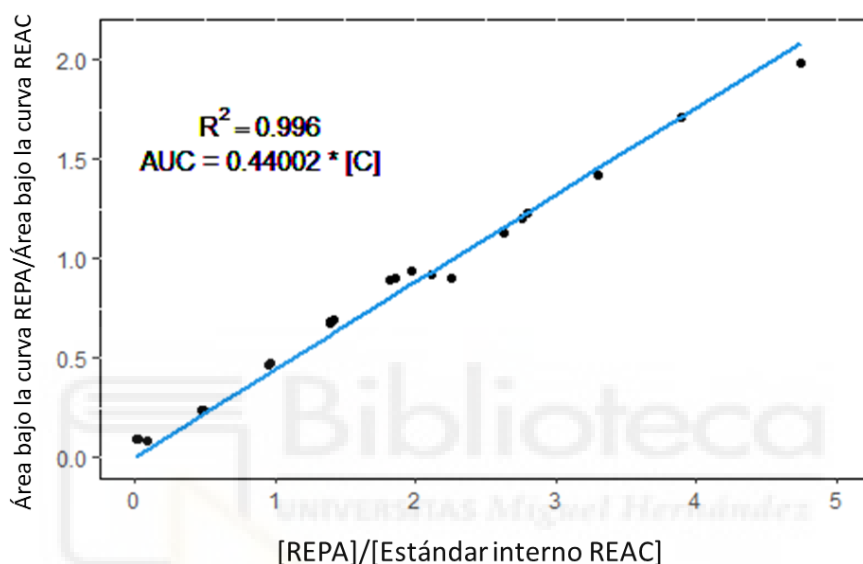


Figura 9. Representación de la recta de calibración con la ecuación de la recta ($y=m \cdot [C]$) y el coeficiente de correlación (R^2) del éster de retinilo REPA.

Las concentraciones finales en los patrones de calibración estuvieron comprendidas entre los niveles reales en hígado de ratones (Schmidt et al., 2003) (Tabla 1). Los niveles de estos compuestos estuvieron por encima del límite de detección. Se preparó un blanco que solo contenía el estándar interno y la solución de BSA con mezcla de lípidos que permitió comprobar el correcto funcionamiento del proceso.

Tabla 1. Rango de concentraciones empleado para las soluciones de calibración

	REPA	REAC
$[C]_f$ (nmol/mL)	19,1 – 1501,5	156,8

Las soluciones de trabajo de estándar interno REAC se prepararon diluyendo las soluciones stock con etanol para obtener unas concentraciones finales de 156,8 nmol/mL. Las concentraciones del resto de ésteres de retinilo (Mistearato/Linoleato, Oleato y Estearato) se determinaron en base a la recta de

calibrado de REPA (en molar) como se ha descrito anteriormente (Barua & Furr, 1998; Schmidt et al., 2003). La concentración del estándar interno REAC se corroboró espectrofotométricamente al final de cada semana.

3.2.6. Equipos

Para la realización de este trabajo se utilizaron diferentes instrumentos entre los que podemos encontrar: centrifuga Allegra™ 21R (Beckman Coulter, Palo Alto, California, EE. UU.), un homogeneizador potter IKA RW20 digital con un pistón de TFE (IKA, Staufen, Alemania), una balanza New Classic (Mettler Toledo, Greifensee, Suiza), agitador vórtex VV3 (VWR, Darmstadt, Alemania), un colector de vacío de 24 puertos conectado a una bomba de vacío (Fisher Scientific, Madrid, España) que se usó para la extracción en fase sólida. También se usó un evaporador Centrivap (Labconco, Missouri, EE. UU.) conectado a una trampa de frío Centrivap (Labconco, Missouri, EE. UU.) y un espectrofotómetro UV/Vis D520 (Beckman Coulter, Palo Alto, California, EE. UU.).

Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo Agilent serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE. UU.) que estuvo conectado a un desgasificador de vacío (G1322A), una bomba binaria (G1312A), un auto muestreador (G1313A), un compartimento termostatzado para la columna (G1316A) y un detector de longitud de onda variable (G1314A). Los datos se adquirieron por una ChemStation LC/MSD (Rev. A. 09. 01 [1206], 1990 – 2001) y fueron analizados mediante el uso del programa Clarity Chromatography Station (versión 6.2).

3.2.7. Procesado de la muestra

Las muestras se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de que se procediera a su análisis utilizando un método adaptado de Schmidt et al., 2003 (Figura 10).

Primero se homogeneizó la masa de hígado (300 mg) en la misma cantidad de agua Mili Q utilizando un homogeneizador potter IKA. A continuación, se añadieron en un tubo de centrifuga 1,6 mL de isopropanol, 100 μL de estándar interno REAC con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 400 μL de homogenizado de hígado (Figura 10).

La mezcla se agitó en vórtex la muestra unos 5 segundos y después se tuvo durante 5 minutos en agitación mecánica. Para precipitar las proteínas se centrifugó la muestra a 5000 G y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Una vez completada, se rechazó el precipitado y se trasvasó el sobrenadante (donde se encuentran las especies de ésteres disueltas) a otro tubo junto con 3,2 mL de cloroformo. La mezcla se llevó a agitación en vórtex unos 5 segundos y se agitó durante 5 minutos en agitación mecánica. Posteriormente, se centrifugó a 3000 G y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos para facilitar la extracción líquido-

líquido. La fase acuosa se desecha y la fase orgánica donde se encuentran los retinoides se trasvasó a otro tubo para continuar con la extracción. Para este paso se utilizaron pipetas Pasteur (Figura 10).

Para la extracción en fase sólida, primero se acondicionaron las columnas de aminopropilo (-NH₂, Agilent Technologies, USA) utilizadas con 2 mL de hexano a un caudal de 6 mL/min. Después se añadió la muestra a un caudal de 2 mL/min y posteriormente se le añadió 1 mL de cloroformo: isopropanol 2:1 (v/v) para eluir los retinoides apolares de la columna.

Posteriormente, se agitaron en vórtex. Una fracción de 1 mL se evaporó en un evaporador Centrivap (Labconco, Missouri, EE. UU.) a una presión de 1 mbar durante 90 minutos y a una temperatura de 30°C. Se utilizó nitrógeno para romper el vacío.

Una vez se evaporó el disolvente, el residuo seco se reconstituyó añadiendo, en una primera etapa, 20 µL de cloroformo. Los tubos se llevaron a vórtex durante 30 segundos, después 5 segundos de ultrasonificación y 5 minutos de agitación mecánica. En la segunda etapa, se añadieron 180 µL de acetonitrilo a los tubos que se agitaron en vórtex durante 30 segundos, 5 segundos de ultrasonificación y 5 minutos de agitación mecánica. Por último, se recogió todo el contenido de los tubos y se depositó en el interior de los microviales de vidrio de color topacio a los que se les añadió nitrógeno y se colocaron en el auto muestreador para el análisis en el HPLC.



Figura 10. Protocolo del procesado de las muestras, análisis mediante HPLC y programas de cromatografía

3.2.8. Condiciones cromatográficas

Los distintos retinoides se separaron en una columna C18 Poroshell 120 CE (150 mm x 3,0 mm; 2,7 µm de partícula, Agilent Technologies, USA) junto con una precolumna Zorbax Eclipse Plus-C18 Narrow Bore Guard Column (2,1 x 12,5 mm; 5 µm de partícula, Agilent Technologies, USA).

Se utilizó una fase móvil compuesta por metanol-acetonitrilo en proporción 85:15 (v/v) (fase A) y acetonitrilo-cloroformo en proporción 1:1 (v/v) (fase B). Se acondicionó la columna a una temperatura de trabajo de 5°C y un flujo de 0,300 mL/min. Se realizó una elución en gradiente multilineal que consistió en pasar del 0% al 100% de la fase B en 25 minutos. Este método tenía un tiempo de trabajo de 27 minutos y un tiempo posterior a la ejecución de 8 minutos. Los analitos (REOH y REPA) se detectaron a 325 nm.

Los cromatogramas se obtuvieron mediante el software HPCHEM AGILENT y se importaron para realizar la integración con el programa Clarity Chromatography Station para poder calcular las concentraciones de los diferentes compuestos retinoicos con el método del estándar interno.

3.3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las concentraciones de retinoides en hígado de las muestras de ratones F1 a PND365. Los datos se expresaron utilizando la media, desviación estándar. Se rechazó la hipótesis nula para valores de $p < 0.05$. Se evaluó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk. A las distribuciones estadísticas se le realizaron transformaciones logarítmicas para que se ajustaran a una distribución normal.

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete *compareGroups* en la versión 4.2.1 del software R (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). Si las varianzas eran homogéneas, se realizó el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) para conocer si las medias diferían entre grupos. Si no lo eran se realizó una transformación logarítmica de los datos para que se ajustasen a una distribución normal.

Se modelaron las relaciones dosis-respuesta mediante el paquete *Proast 70.3* (RIVM, Bilthoven, Países Bajos) en la versión 4.2.1 del programa estadístico R (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). El modelado se llevó a cabo de conformidad con la guía de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (Hardy et al., 2017).

La técnica de BMD determina la dosis de *Benchmark* para una respuesta de referencia (BMR). En este trabajo, se calculó la dosis de *benchmark* (BMD) para una BMR del 5% respecto a las concentraciones de los controles, así como su límite de confianza (BMDL y BMDU). La respuesta (BMR) del 5 % generalmente está cerca del nivel sin efectos adversos observables (NOAEL) (Alarcón et al., 2021; Bokkers & Slob, 2007; Buha Djordjevic et al., 2023).

4. Resultados

4.1. Estabilidad de química de los patrones

4.1.1. Fotoisomerización y fotodegradación de ésteres de retinilo

Para el REAC, se observó una alteración en el espectro de absorción cuando estuvo expuesto a la luz blanca y solar con respecto al control (luz amarilla y roja). Concretamente, supuso la reducción de los valores de absorbancia en comparación con el compuesto en oscuridad (Figura 11).

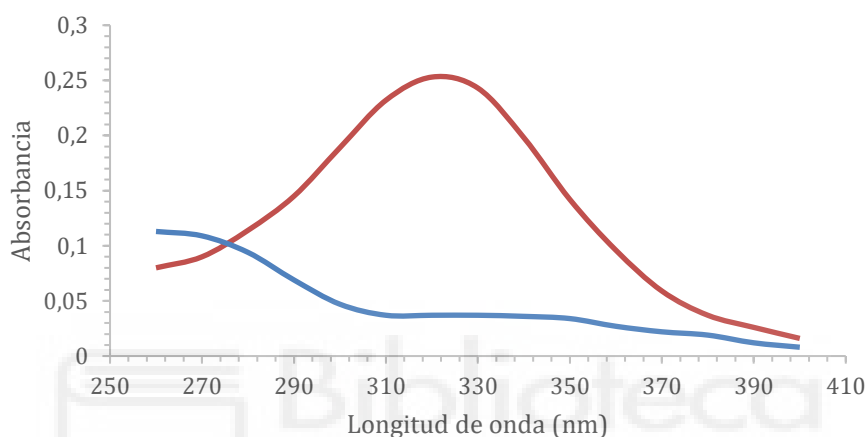


Figura 11. Espectro de absorción del estándar interno REAC. La línea azul se corresponde con el compuesto en oscuridad, mientras que la línea roja se trata del compuesto sometido a luz blanca y solar

Asimismo, para el REPA, se observó una reducción de los valores del estándar expuesto a la luz blanca y solar en comparación con el control (luz amarilla y roja) (Figura 12).

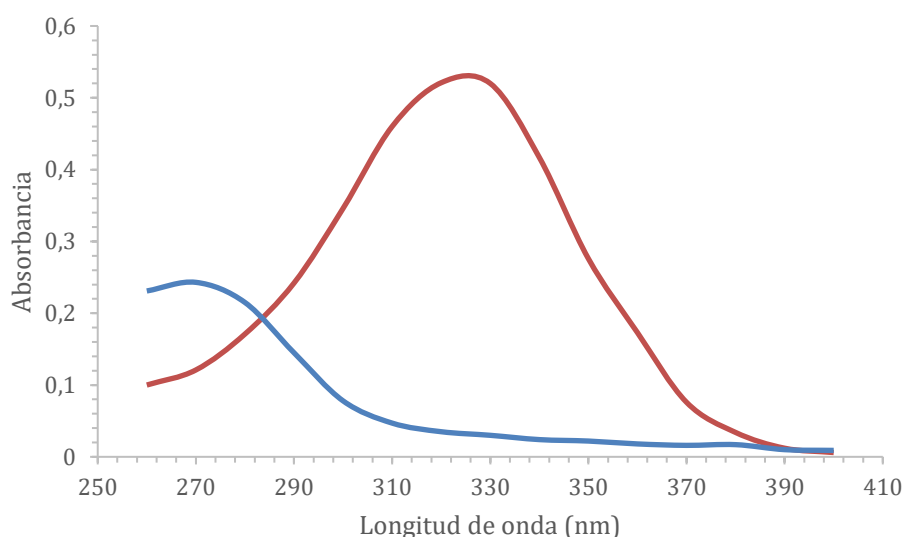


Figura 12. Espectro de absorción del éster de retinilo REPA. La línea azul se corresponde con el compuesto en oscuridad, mientras que la línea roja se trata del compuesto sometido a luz blanca y solar

También, se midieron cromatográficamente los patrones para comprobar si existían alteraciones en los picos por la exposición a la luz blanca y solar en comparación al control (luz amarilla y roja).

En el cromatograma de REAC, se aprecia en el estándar expuesto a luz blanca y solar una ausencia del pico correspondiente al estándar interno (azul), en comparación con el control (rojo) (Figura 13).

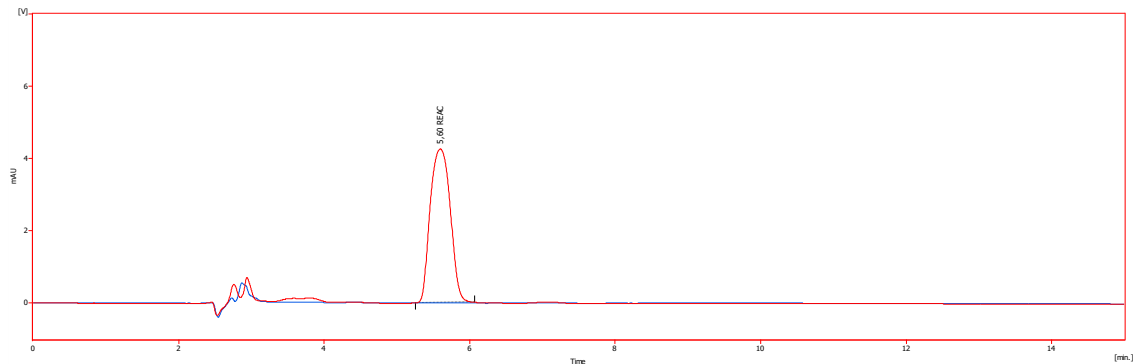


Figura 13. Cromatograma del estándar interno REAC. La línea roja corresponde al grupo de oscuridad, mientras que la línea azul se corresponde con las muestras expuestas a la luz blanca y al sol.

En el cromatograma de REPA, se aprecia una ausencia del pico correspondiente al estándar (azul), en comparación con el control (rojo) (Figura 14).

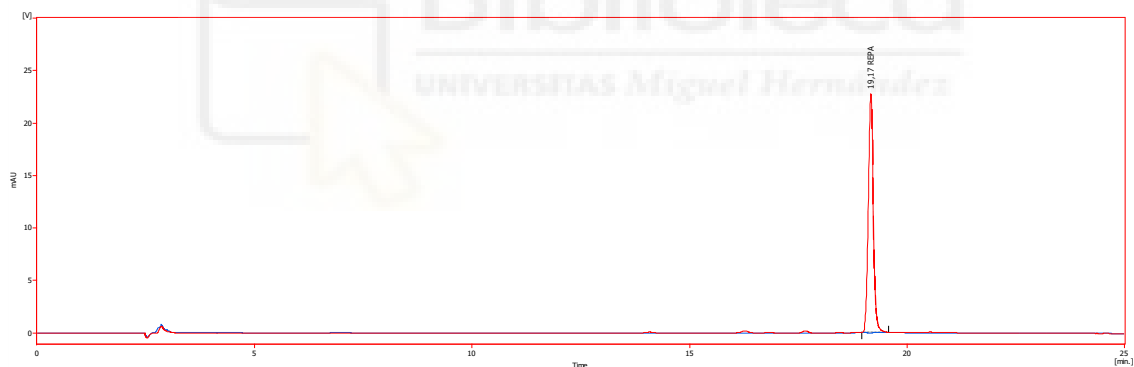


Figura 14. Cromatograma del éster de retinilo REPA. La línea roja corresponde al grupo de oscuridad, mientras que la línea azul se corresponde con las muestras expuestas a la luz blanca y al sol.

4.1.2. Estabilidad química a -20 °C

También, se analizó la estabilidad del REPA después de 8 meses habiendo conservado el estándar con una atmósfera de nitrógeno a -20 °C.

Se puede observar como el estándar de REPA analizado en tiempos diferentes presenta nuevos picos que se pudieron deber a su posible degradación por el tiempo que transcurrió entre un análisis y otro (Figura 15). Con lo que se puede establecer que el REPA tiene una vida útil inferior a 8 meses.

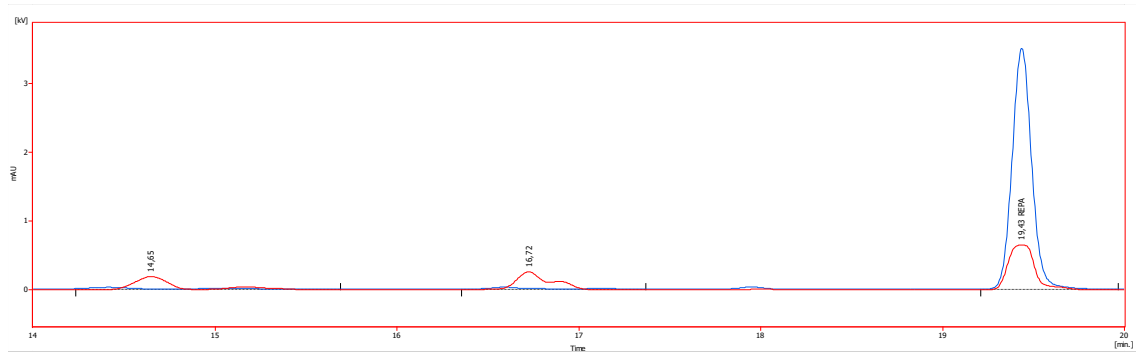


Figura 15. Cromatograma del éster de retinilo REPA. La línea roja se corresponde con la muestra de REPA analizada en marzo de 2023. La línea azul se corresponde con la muestra del estándar analizada en julio de 2022

En todo momento, cuando se requería el uso de los patrones tanto del estándar interno REAC como del REPA se prepararon ese día para que los resultados observados no se debieran a degradaciones o isomerizaciones que suceden con el tiempo (Gundersen et al., 1997; Wyss & Bucheli, 1997).



A continuación, se muestra un ejemplo de los cromatogramas que se obtuvieron para los ésteres de retinilo medidos (Figura 16) y donde se puede observar el REOH, no medido en este trabajo.

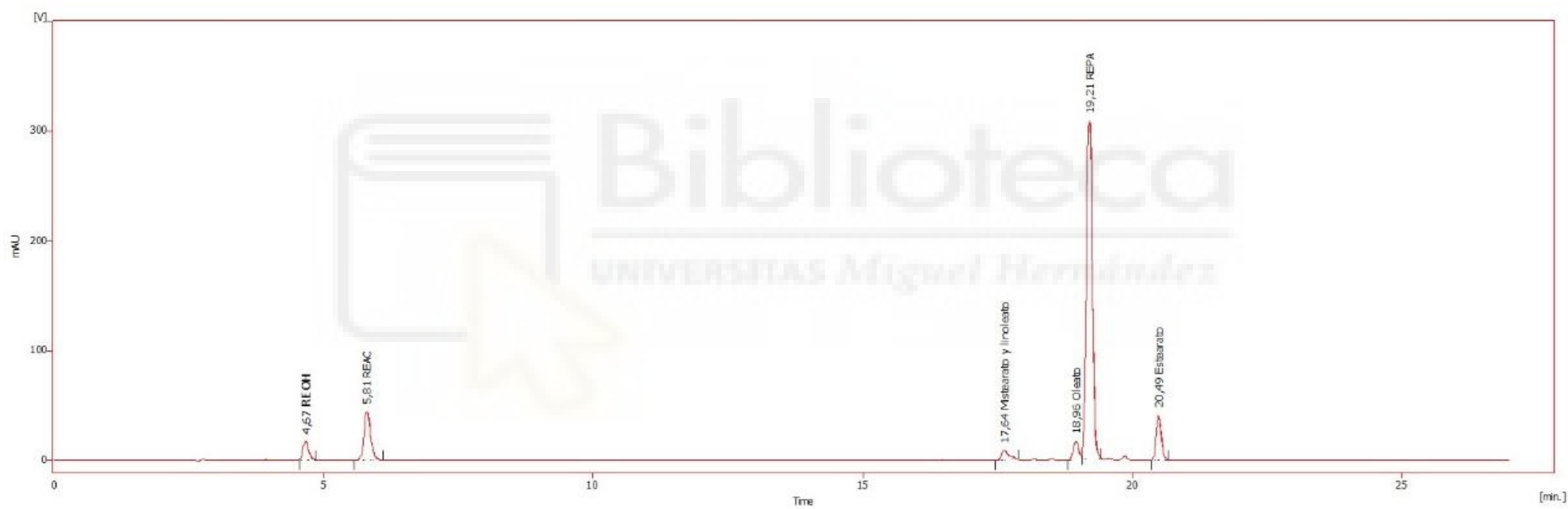


Figura 16. Cromatograma con los tiempos de retención de ésteres de retinilo (REOH, REAC, Mistearato y Linoleato, Oleato, REPA y Estearato). Los compuestos retinoides presentes en el cromatograma en orden de elución son: REOH (tiempo de retención = 4,67 min), el estándar interno REAC (tiempo de retención = 5,81 min), los ésteres de retinilo, que coeluyeron, Mistearato y Linoleato (tiempo de retención = 17,64 min), Oleato de retinilo (tiempo de retención = 18,96 min), el más abundante de los ésteres que es REPA (tiempo de retención = 19,21 min) y por último Estearato de retinilo (tiempo de retención = 20,49 min).

4.2. Niveles de ésteres de retinilo en animales tratados durante la gestación y la lactancia a TCDD

En hembras a PND365, las concentraciones hepáticas del éster de retinilo REPA no difirieron entre grupos según ANOVA de un factor (Tabla 2). Asimismo, no se observó una relación dosis-respuesta significativa para las concentraciones hepáticas del éster de retinilo REPA mediante el análisis BMD (Figura 17).

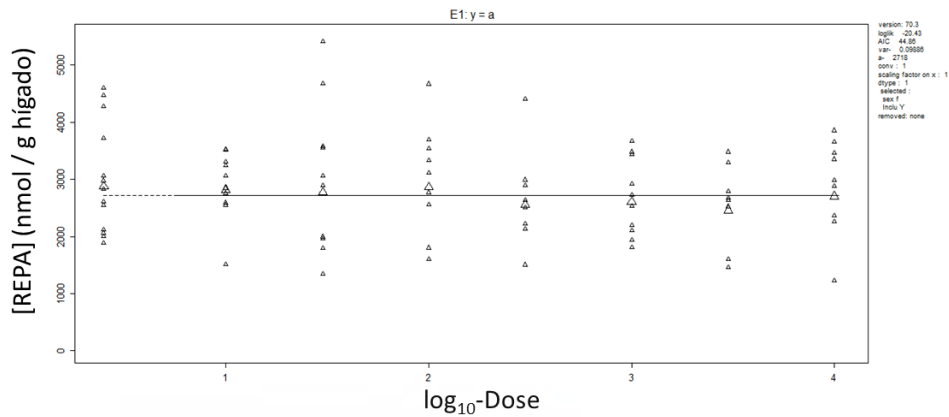


Figura 17. Modelado lineal de concentraciones hepáticas del REPA en ratones hembra F_1 a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.

En hembras a PND365, las concentraciones hepáticas de los ésteres de retinilo mistearato y linoleato no difirieron entre grupos según ANOVA de un factor (Tabla 2). Asimismo, no se observó una relación dosis-respuesta significativa para las concentraciones hepáticas de estos ésteres de retinilo mediante el análisis BMD (Figura 18).

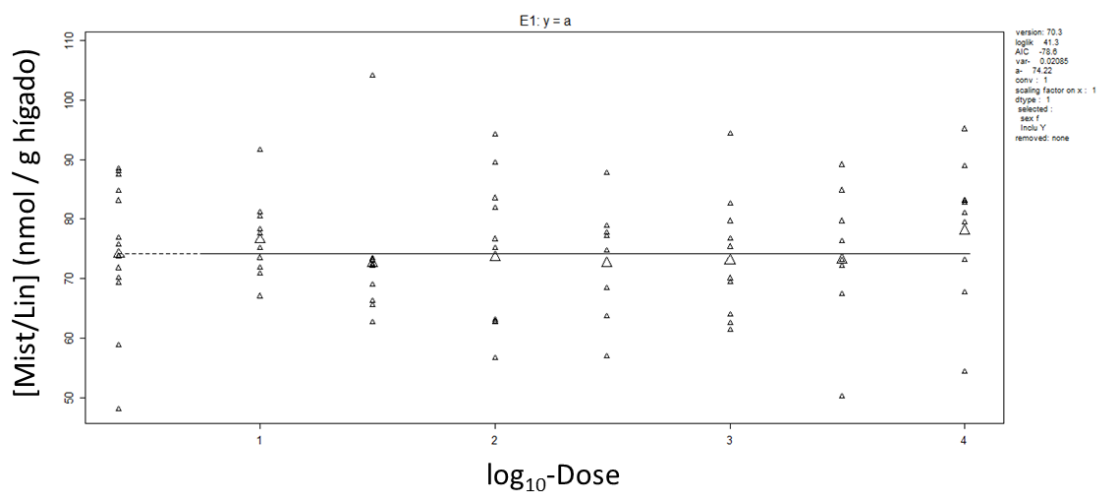


Figura 18. Modelado lineal de concentraciones hepáticas de los ésteres de retinilo Mistearato y Linoleato (Mist/Lin) en ratones hembra F_1 a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.

Tabla 2. Niveles hepáticos de ésteres de retinilo a PND365 en ratones hembra F₁ tratados con TCDD durante la gestación y lactancia, expresados con la media más la desviación estándar

		Dosis (pg/kg pc)								p-valor*
		0 (N=15)	10 (N=10)	30 (N=10)	100 (N=10)	300 (N=6)	1000 (N=9)	3000 (N=9)	10000 (N=10)	
Hembras	Concentraciones (nmol / g hígado)									
	REPA	3013 ± 964	2891 ± 600	3028 ± 1315	3009 ± 957	2661 ± 850	2681 ± 680	2558 ± 718	2830 ± 809	0,955
	Mist/Lin	75,0 ± 11,5	76,8 ± 6,9	73,2 ± 11,5	74,6 ± 12,8	73,2 ± 9,7	73,6 ± 10,3	74,1 ± 11,9	78,8 ± 11,4	0,948
	Oleato	86,5 ± 16,2	88,4 ± 14,9	85,9 ± 19,8	84,1 ± 18,2	84,6 ± 9,3	83,7 ± 9,4	87,7 ± 17,6	81,0 ± 15,1	0,981
	Estearato	170 ± 53,8	190 ± 56,7	169 ± 70,9	168 ± 60,2	175 ± 40,2	187 ± 23,1	206 ± 68,2	177 ± 43,0	0,700
	RE totales	3363 ± 1004	3245 ± 658	3357 ± 1399	3336 ± 998	2993 ± 899	3025 ± 691	2926 ± 785	3161 ± 857	0,972

* Se aplicaron transformaciones logarítmicas a los datos. P-valor, obtenido mediante ANOVA

En hembras a PND365, las concentraciones hepáticas del éster de retinilo oleato no difirieron entre grupos según ANOVA de un factor (Tabla 2). Asimismo, no se observó una relación dosis-respuesta significativa para las concentraciones hepáticas del oleato de retinilo mediante el análisis BMD (Figura 19).

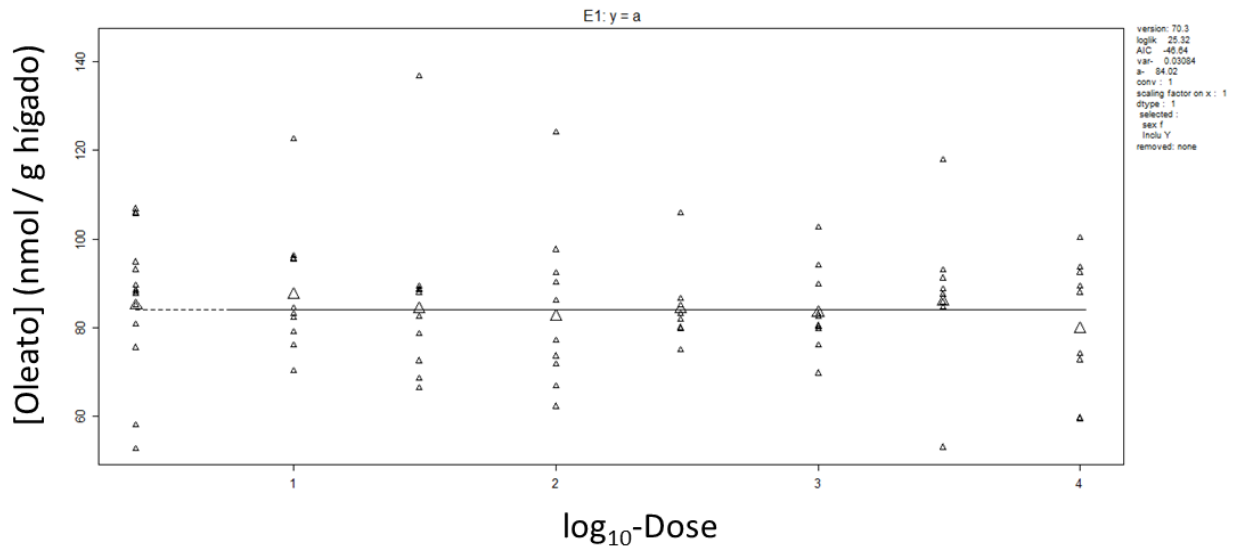


Figura 19. Modelado lineal de concentraciones hepáticas del Oleato de retinilo en ratones hembra F₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.

En hembras a PND365, las concentraciones hepáticas del éster de retinilo estearato no difirieron entre grupos según ANOVA de un factor (Tabla 2). Asimismo, no se observó una relación dosis-respuesta significativa para las concentraciones hepáticas del estearato de retinilo mediante el análisis BMD (Figura 20).

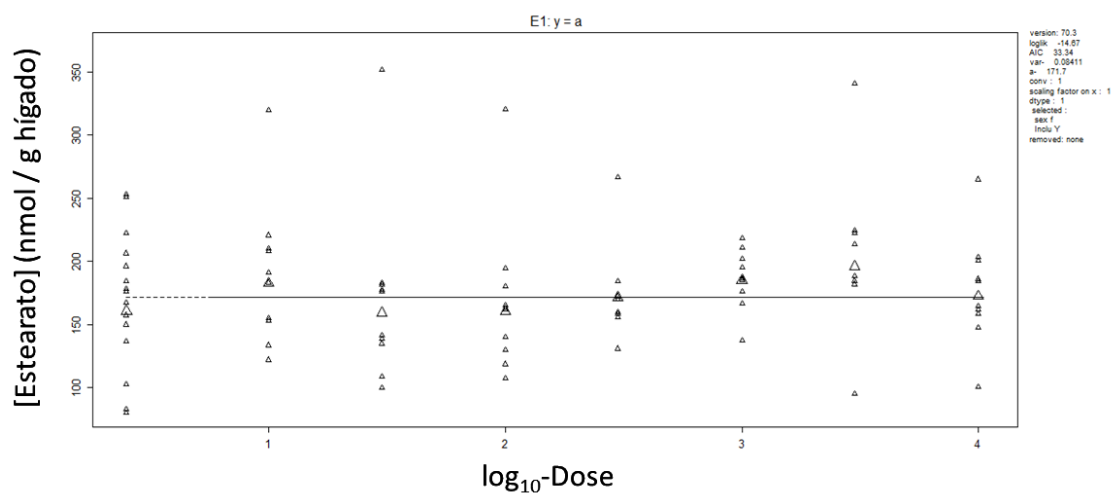


Figura 20. Modelado lineal de concentraciones hepáticas del Estearato de retinilo en ratones hembra F₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.

En hembras a PND365, las concentraciones hepáticas del total de ésteres de retinilo no difirieron entre grupos según ANOVA de un factor (Tabla 2). Asimismo, no se observó una relación dosis-respuesta

significativa para las concentraciones hepáticas del total de ésteres de retinilo mediante el análisis BMD (Figura 21).

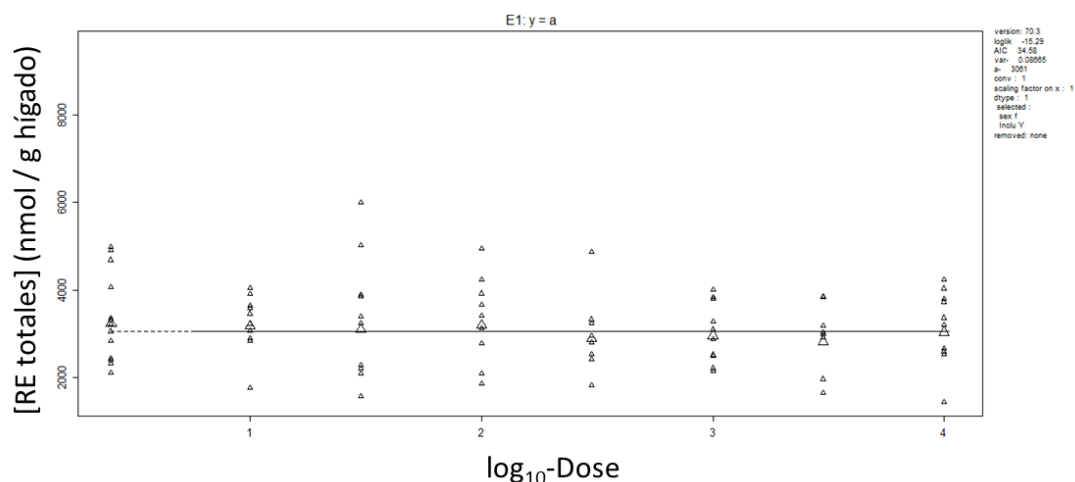


Figura 21. Modelado lineal de concentraciones hepáticas del contenido total de ésteres de retinilo en ratones hembra F₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.

En machos a PND365, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones hepáticas del Estearato de retinilo, según ANOVA de un factor (Tabla 4). En este caso, se realizó el análisis mediante el modelo BMD y se obtuvieron relaciones dosis-respuesta significativas para todos los ésteres de retinilo. Se observó que los niveles de ésteres aumentaron con el tratamiento.

Tabla 3. Resultados del modelado dosis-respuesta de las concentraciones de ésteres de retinilo en hígado de ratones macho F₁ sacrificados en PND365 y cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación y la lactancia

Parámetro	Modelado dosis-respuesta BMD (BMR 5%)				
	BMDL (pg/kg pc)	BMD (pg/kg pc)	BMDU (pg/kg pc)	Ratio (BMDU/BMDL)	E _{máx}
Concentración REPA	1,53	428,2	7340	4797,4	30%
Concentración Mist/Lin	4,96	490,5	6120	1233,9	17%
Concentración Oleato	2,87	328,2	3200	1115,0	25%
Concentración Estearato	0,396	66,7	1120	2828,3	47%
Concentración total RE	1,53	376,9	5670	3705,9	30%

Mist/Lin se trata de mistearato y linoleato

BMDU es el margen superior del intervalo de confianza de la BMD

BMDL es el margen inferior del intervalo de confianza de la BMD

E_{máx} es la eficacia máxima, calculada como el cociente entre la diferencia entre la respuesta a dosis 10000 pg/kg pc y dosis 0 pg/kg pc, y la respuesta a dosis 0 pg/kg pc

Tabla 4. Niveles hepáticos de ésteres de retinilo a PND365 en ratones macho F₁ tratados con TCDD durante la gestación y lactancia, expresados con la media más la desviación estándar

		Dosis (pg/kg pc)								p-valor*
		0 (N=15)	10 (N=10)	30 (N=10)	100 (N=10)	300 (N=6)	1000 (N=9)	3000 (N=9)	10000 (N=10)	
Machos	Concentraciones (nmol / g hígado)									
	REPA	2074 ± 633	1780 ± 576	1783 ± 357	1914 ± 673	1667 ± 503	2196 ± 562	2306 ± 718	2501 ± 1236	0,217
	Mist/Lin	61,7 ± 8,90	61,3 ± 12,00	58,1 ± 5,95	62,9 ± 13,00	58,4 ± 9,55	64,7 ± 6,87	71,7 ± 10,10	69,8 ± 17,90	0,154
	Oleato	72,2 ± 12,10	71,9 ± 15,60	68,5 ± 7,77	71,2 ± 16,70	68,0 ± 15,20	77,9 ± 11,50	85,7 ± 15,10	87,7 ± 25,80	0,068
	Estearato	143 ± 36,2	137 ± 45,4	122 ± 21,8	139 ± 50,5	125 ± 35,4	168 ± 45,2	197 ± 57,4	188 ± 67,1	0,008
	RE totales	2351 ± 680	2051 ± 643	2032 ± 386	2188 ± 745	1919 ± 549	2506 ± 611	2661 ± 781	2828 ± 1314	0,184

* Se aplicaron transformaciones logarítmicas a los datos. P-valor, obtenido mediante ANOVA

En machos a PND365, la concentración hepática del éster de retinilo REPA aumentó con una BMD de 428,2 pg/kg pc (Figura 22; Tabla 3) y una eficacia máxima del 30% (Tabla 3), según el modelado dosis-respuesta BMD.

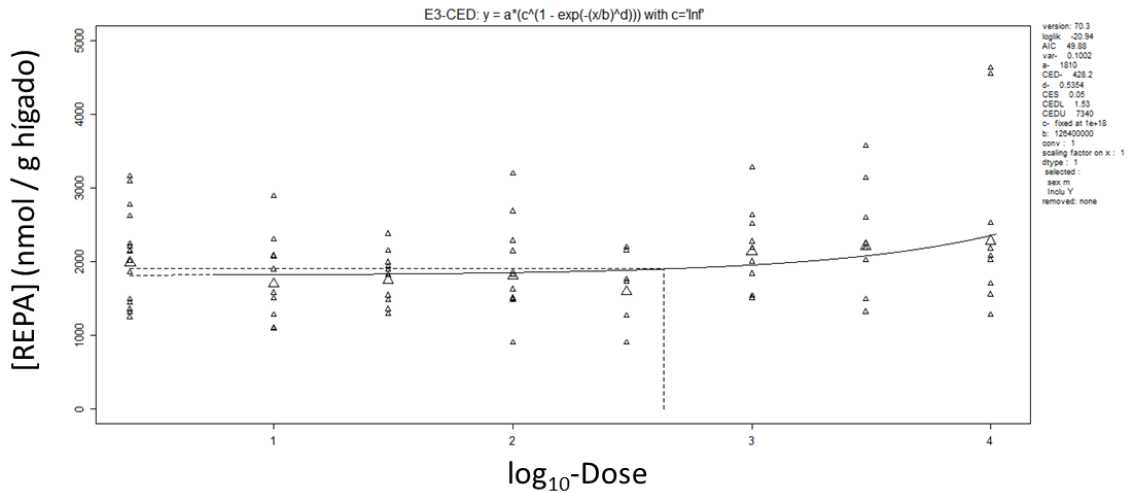


Figura 22. Modelado dosis-respuestas mediante BMD de concentraciones hepáticas del REPA en ratones macho F_1 a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.

En machos a PND365, las concentraciones de los ésteres de retinilo Mistearato y Linoleato de retinilo, que coeluyeron juntos, aumentaron con una BMD de 4,96 pg/kg pc (Figura 23; Tabla 3) y una eficacia máxima del 17% (Tabla 3), según el modelado dosis-respuesta BMD.

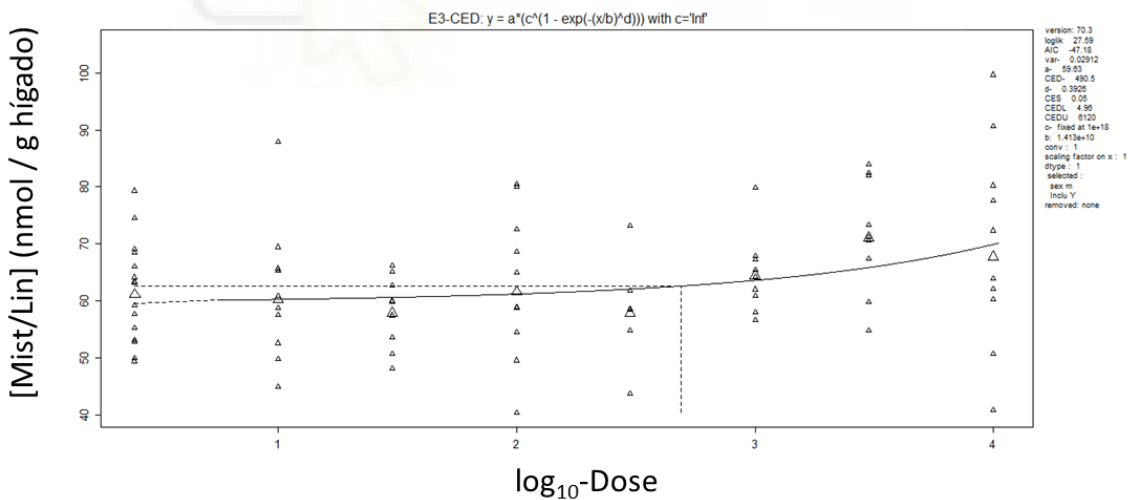


Figura 23. Modelado dosis-respuestas mediante BMD de concentraciones hepáticas de los ésteres de retinilo Mistearato y Linoleato (Mist/Lin) en ratones macho F_1 a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.

En machos a PND365, la concentración hepática del éster de retinilo Oleato de retinilo aumentó con una BMD de 2,87 pg/kg pc (Figura 24; Tabla 3) y una eficacia máxima del 25% (Tabla 3), según el modelado dosis-respuesta BMD.

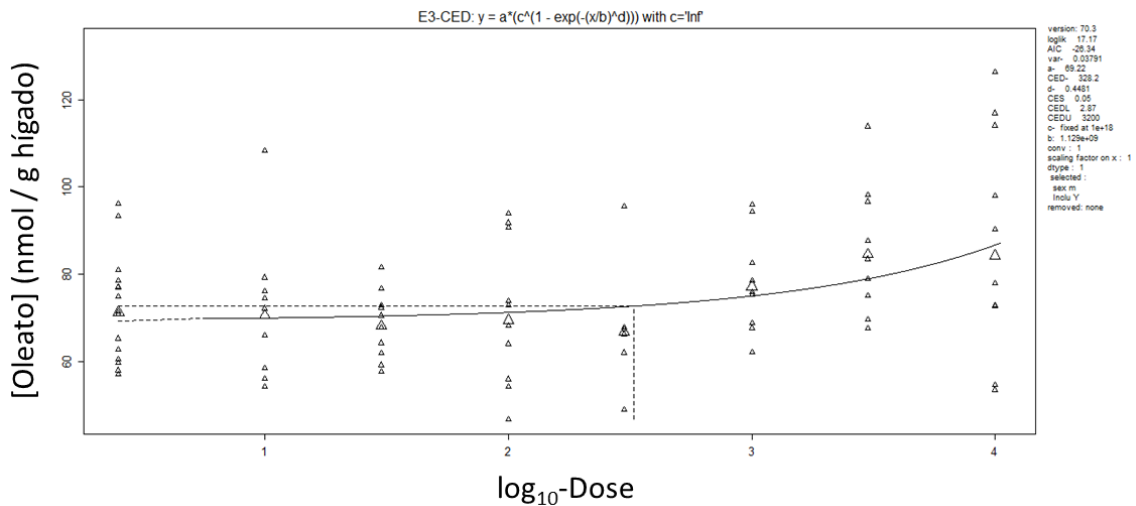


Figura 24. Modelado dosis-respuestas mediante BMD de concentraciones hepáticas del Oleato de retinilo en ratones macho F1 a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.

En machos a PND365, la concentración hepática del éster de retinilo Estearato de retinilo aumentó con una BMD de 0,396 pg/kg pc (Figura 25; Tabla 3) y una eficacia máxima del 47% (Tabla 3), según el modelado dosis-respuesta BMD. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones hepáticas del Estearato de retinilo, según ANOVA de un factor (Tabla 4)

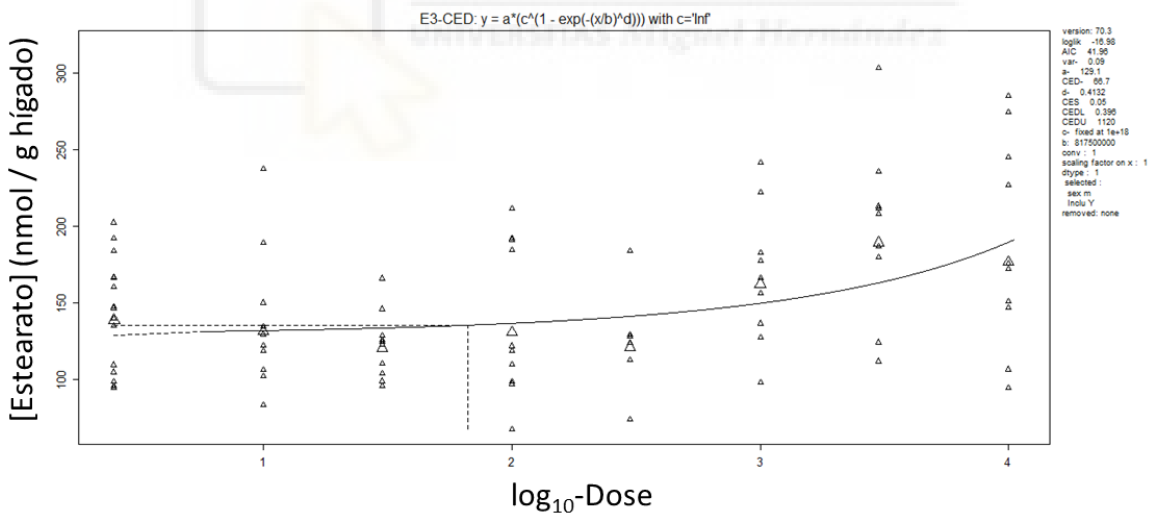


Figura 25. Modelado dosis-respuestas mediante BMD de concentraciones hepáticas del Estearato de retinilo en ratones macho F1 a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.

En machos a PND365, la concentración hepática del total de ésteres de retinilo se observó que aumentó con una BMD de 1,53 pg/kg pc (Figura 26; Tabla 3) y una eficacia máxima del 30% (Tabla 3), según el modelado dosis-respuesta BMD.

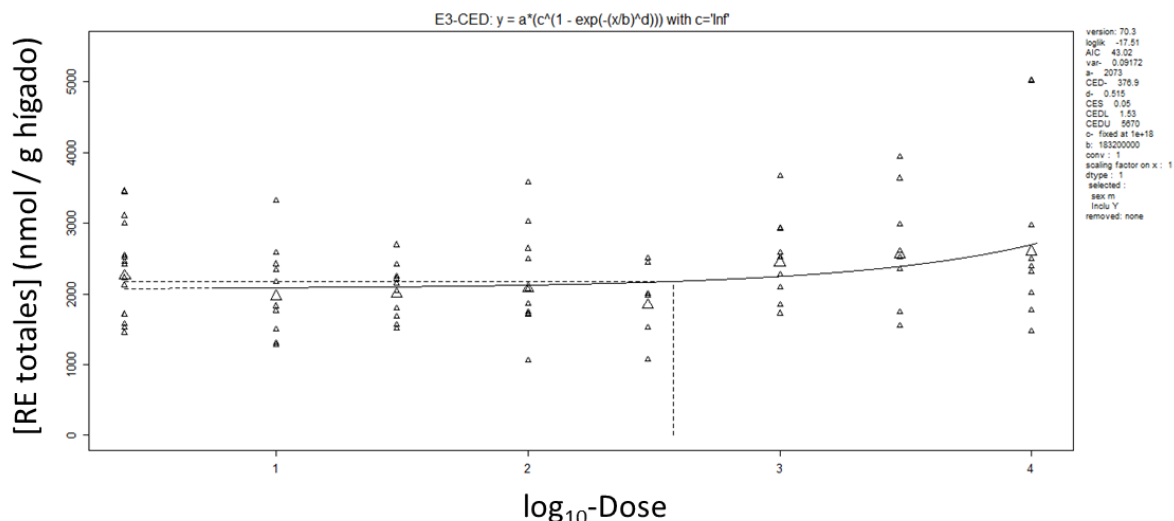


Figura 26. Modelado dosis-respuestas mediante BMD de concentraciones hepáticas del total de ésteres de retinilo en ratones macho F₁ a PND365 después de la exposición durante la gestación y lactancia a TCDD.

5. Discusión

La exposición a las dioxinas y compuestos similares supone una alteración del metabolismo de los retinoides mediante un mecanismo de acción que involucra al AhR (Esteban et al., 2021). Se ha determinado que este receptor tiene un papel fisiológico importante en la regulación de procesos metabólicos fundamentales incluyendo la sobreexpresión de las enzimas CYP1A1 (Shmarakov, 2015).

Otro mecanismo de acción de alteración del sistema retinoide es llevado a cabo por compuestos no similares a dioxinas, entre los que se encuentran los PCB no coplanares. En este caso, la exposición a estos compuestos supone la unión al receptor constitutivo de androstano (CAR) que produce la sobreexpresión de enzimas CYP CYP2B (Shmarakov, 2015; Shmarakov et al., 2019). Las mezclas complejas de origen medioambiental y relevantes para la salud humana producen sus efectos a través de ambos mecanismos simultáneamente (Safe, 1998).

Sin embargo, la toxicidad de las sustancias contaminantes más potentes se produce a través de la activación del AhR que es el mecanismo más estudiado, mediante el cual el compuesto modelo TCDD genera su efecto. Por lo tanto, su estudio es importante para poder establecer la toxicidad de otras sustancias en base a la suya, que se emplea como referencia para el TEF por ser la dioxina más potente conocida (Van Den Berg et al., 2006b).

Los ésteres de retinilo son la principal forma de almacenamiento de vitamina A en el hígado y se trata de precursores de las formas activas del sistema retinoide (Senoo et al., 2017). Las reservas hepáticas de ésteres de retinilo, es decir, las concentraciones totales de estos en el hígado, se

consideran el biomarcador estándar de oro para el estudio del estatus de la vitamina A (Tanumihardjo, 2011; Tanumihardjo et al., 2016).

Las concentraciones de retinoides hepáticos empleadas para la clasificación del estatus de la vitamina A son: deficiente ($< 0,1 \mu\text{mol} / \text{g}$ de tejido), normal ($0,1 - 0,7 \mu\text{mol} / \text{g}$), alto ($0,7 - 1,0 \mu\text{mol} / \text{g}$), hipervitaminosis ($> 1,0 \mu\text{mol} / \text{g}$) y tóxico ($\sim 10 \mu\text{mol} / \text{g}$) (Tanumihardjo et al., 2016). No se observó que el estatus de vitamina A en los ratones se viese alterado, sino que fue normal en base a esta clasificación.

Cabe destacar que alrededor del 95% del almacenamiento total de retinoides se produce en el hígado tanto de humanos como de ratas (Tanumihardjo et al., 2016). En estudios con células, se demostró que hasta un 90% de los retinoides hepáticos se encuentran presentes en las células estrelladas del hígado en forma de ésteres de retinilo, predominantemente en forma de REPA (Senoo et al., 2017).

En cuanto a los ésteres de retinilo, se observó un aumento en los niveles de los machos adultos. En el caso de las hembras, se produjo una ausencia de efectos con significación biológica. Con esto se puede decir que los machos fueron más sensibles a la exposición a TCDD.

En los machos, el incremento de los ésteres de retinilo a día post-natal 365 pudo deberse posiblemente a un efecto adaptativo como respuesta a la exposición a TCDD durante la gestación y lactancia seguida de una dieta rica en grasas en la edad adulta, lo que corrobora lo descrito en la literatura (Esteban et al., 2019; Tanumihardjo et al., 2016). Esto no significa que durante la exposición al compuesto y la lactancia no ocurriera algún tipo de alteración como puede ser la hidrólisis de los ésteres (Esteban et al., 2014).

Por lo tanto, la exposición a TCDD durante la gestación y lactancia no causa una deficiencia posterior de ésteres de retinilo, sino que como sucede en machos puede suponer un efecto de adaptación que produce un leve aumento de estos.

En estudios similares a dosis superiores a las ensayadas, se observó que los niveles de ésteres de retinilo hepáticos, en concreto de REPA, sufrieron una disminución a PND350 debido a la exposición a mezclas de compuestos con actividad tipo dioxina o compuestos similares a dioxina (Tabla 5) (Alarcón et al., 2021; Elabbas et al., 2014; Esteban et al., 2014; Esteban et al., 2021). En comparación, en la exposición a TCDD se observó que a PND365 solo se produjo un aumento de los ésteres de retinilo hepáticos en machos, mientras que en hembras no hubo diferencias. Esto

pudo corresponderse con la ingestión de una dieta rica en grasas. Los niveles medioambientales de TCDD no supondrían una deficiencia de vitamina A.

Teniendo en cuenta el diseño experimental, en los estudios de la Tabla estudios la exposición comienza desde el GD1 y termina en el PND23 que es cuando se produce el destete, e incluso se produce la exposición desde el GD1 hasta el GD10 (Alarcón et al., 2021; Elabbas et al., 2014; Esteban et al., 2014). Mientras que en el estudio del que proceden estas muestras, la exposición comienza antes del apareamiento con una dosis de carga oral, continua después mediante la inclusión de TCDD en la dieta diaria y termina en el PND14 cuando todavía se produce la lactancia. En los estudios analizados las reducciones de los ésteres de retinilo se producen porque las dosis empleadas son tremendamente elevadas comparadas con las de este trabajo. De ahí, la relevación de este estudio para la salud humana

Una de las similitudes que se pueden encontrar entre los diferentes estudios analizados (Tabla 5) es que la exposición de los animales a los contaminantes se produce mediante la inclusión de estos en la dieta y de manera diaria.

En este TFM se midieron los niveles de los ésteres de retinilo en muestras de hígado procedentes de ratones expuestos a TCDD por vía oral (dieta) hasta el PND14 y sacrificados en PND365.

En futuros estudios, se podrían medir los niveles de REOH que es la forma en la que se transporta la vitamina A los tejidos diana. Además, podrían medirse los niveles de formas activas como los ácidos retinoicos donde se puede destacar al ácido todo-*trans*-retinoico y al ácido 13-*cis*-retinoico que pueden verse alteradas frente a la exposición a estos compuestos. Incluso, se podrían medir las formas oxidadas de los ácidos retinoicos, como el ácido 4-hidroxi-9-*cis*-retinoico, que pueden dar una visión de los procesos de estrés producidos por la exposición a TCDD.

Por otra parte, se deberían tomar muestras para la medición de compuestos retinoides al final de la lactancia o PND35.

Asimismo, se podrían medir componentes del sistema retinoide como enzimas involucradas en el metabolismo de retinoides, proteínas transportadoras de retinoides en la circulación y a nivel celular, los transportadores de membrana que facilitan su transporte a través de las membranas y receptores nucleares que regulan la expresión génica. Se deberían determinar los niveles de proteínas como LRAT, que es la encargada de la reesterificación del REOH en RE en el hígado, y la que posiblemente hace que se produzca el efecto de recuperación (Senoo et al., 2017).

Tabla 5. Efectos de la exposición a TCDD en diferentes estudios con exposición in vivo

Referencia	Dosificación	Diseño experimental	Especie	Efectos observados
Elabbas, 2014	Dosis diaria en la dieta 0,05; 0,5 o 5 mg/kg de peso corporal	Administración de una mezcla de compuestos (poblaciones árticas canadienses). A través de la dieta en dosis diarias desde el GD1 hasta el destete en el PND23. Obtención de muestras de las crías en diferentes PND (35, 77, 350).	Ratas Sprague-Dawley embarazadas	↓ REPA hepático a PN350
Esteban, 2014	Dosis diaria en la dieta 15 mg de A1254/kg de peso corporal en total	Administración de una disolución dosificadora en la dieta a las hembras embarazadas desde GD1 hasta el destete en PND23. Obtención de muestras de las crías en diferentes PND (35, 77, 350).	Ratas hembra Sprague-Dawley embarazadas	↓ REPA hepático a PND350
Esteban, 2021	Dosis total TCDD de 200 µg/kg de peso corporal	Administración de una dosis de carga (40 µg/kg) y 9 dosis de mantenimiento (18 µg/kg), semanalmente por sonda oral. Comienza con ratones de 8-12 semanas de edad.	Ratones <i>wild type</i> y AHRKO con una base genética de C57BL/6J	↓ REPA hepático en <i>wild type</i>
Alarcón, 2021	Dosis diaria de 0, 10, 30, 100, 300 o 1000 mg/kg de peso corporal	Administración de cuatro dosis diarias iguales de PCB-180 por sonda oral que se aplicó desde el GD7 hasta el GD10 obteniéndose seis niveles de dosis. Se realizaron medidas a PND7, 35 y 84.	Ratas hembra y macho Sprague-Dawley	↓ REPA hepático en PND84

En el estudio del que proceden las muestras analizadas en este trabajo fin de máster, se investigaron las consecuencias metabólicas en la vida adulta después de la exposición perinatal a TCDD, y también se exploraron algunas funciones inmunes y neuroconductuales. La exposición perinatal con dosis bajas de TCDD fue diseñada para imitar la exposición dietética humana y dio lugar a efectos específicos de compuesto en ratones híbridos adultos C57BL/6JxFVB antes y después de un desafío de una dieta rica en grasas (van Esterik et al., 2015).

En el estudio observaron efectos leves, variables y dependientes de la edad sobre el peso corporal y el crecimiento a lo largo de la vida. En los machos expuestos a TCDD, observaron que la dieta rica en grasas dio lugar a una disminución del crecimiento que asociaron con una disminución del peso de la almohadilla de grasa perigonadal. Mientras que en las hembras, se produjo un aumento de las almohadillas de grasa perigonadal y perirrenal (van Esterik et al., 2015). Esto se encuentra en la misma línea que anteriores estudios realizados a diferentes concentraciones de TCDD y compuestos similares (Rashid et al., 2013; Sugai et al., 2014).

Observaron que la exposición perinatal a TCDD produjo una alteración permanente del sistema inmunológico en la descendencia adulta (van Esterik et al., 2015). Esto se corresponde con estudios similares llevados a cabo a dosis superiores (Mustafa et al., 2011; Tarkowski et al., 2010).

Durante el estudio realizado, los investigadores no observaron efectos provocados por la exposición a TCDD sobre el comportamiento neurológico. Para ello, evaluaron la actividad física, la preferencia de sacarosa y la capacidad de reconocer objetos de los ratones (van Esterik et al., 2015). Sin embargo, se han llevado a cabo otros estudios a dosis superiores en los que se han observado efectos después de la exposición prenatal a TCDD (Endo et al., 2012; Mitsui et al., 2006).

En resumen, los investigadores observaron efectos específicos de compuesto (TCDD) y sexo sobre el peso corporal y el crecimiento, el peso de las almohadillas de grasa, los criterios de valoración metabólicos, los pesos de algunos órganos y la respuesta inmune.

6. Conclusiones

El estudio de la exposición tanto a TCDD durante la gestación y la lactancia y como a una dieta rica en grasas (durante 57 días) en ratones híbridos C57BL/6JxFVB se ha relacionado con las siguientes conclusiones a PND365.

1. No se observa ninguna alteración a PND365 en los niveles de ésteres de retinilo en las hembras adultas.
2. Se ha observado un aumento de los niveles de ésteres de retinilo a PND365 en machos adultos.



7. Bibliografía

EFSA. (2018). Risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food. Recuperado el 14 de agosto de 2023, de <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5333>

OECD. (26 de julio de 2021). Detailed review paper on the Retinoid System. Recuperado el 20 de agosto de 2023, de [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-CBC-MONO\(2021\)20%20&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-CBC-MONO(2021)20%20&doclanguage=en)

SCF. (30 de Mayo de 2001). Opinion of the scientific committee on food on the risk assessment of dioxins. Recuperado el 16 de Mayo de 2023, de https://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out90_en.pdf

WHO UNEP. (1995). The 12 initial POPs under the Stockholm Convention. Recuperado el 3 de agosto de 2023, de <http://www.pops.int/TheConvention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx>

WHO UNEP. (2001). History of the negotiations of the Stockholm Convention. Recuperado el 20 de agosto de 2023, de <http://www.pops.int/TheConvention/Overview/History/Overview/tabid/3549/>

EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), Knutsen, HK, Alexander, J, Barregård, L, Bignami, M, Brüschweiler, B, Ceccatelli, S, Cottrill, B, Dinovi, M, Edler, L, Grasl-Kraupp, B, Hogstrand, C, Nebbia, CS, Oswald, IP, Petersen, A, Rose, M, Roudot, A-C, Schwerdtle, T, Vleminckx, C, Vollmer, G, Wallace, H, Fürst, P, Håkansson, H, Halldorsson, T, Lundebye, A-K, Pohjanvirta, R, Rylander, L, Smith, A, van Loveren, H, Waalkens-Berendsen, I, Zeilmaier, M, Binaglia, M, Gómez Ruiz, JÁ, Horváth, Z, Christoph, E, Ciccolallo, L, Ramos Bordajandi, L, Steinkellner, H and Hoogenboom, LR, 2018. Scientific Opinion on the risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food. EFSA Journal 2018;16(11):5333, 331 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5333>

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, 2005. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food. EFSA Journal, 2005; 3(11):284, 262 pp. [doi:10.2903/j.efsa.2005.284](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.284)

- WHO, 2016: World Health Organization: WHO. (4 de octubre de 2016). Las dioxinas y sus efectos en la salud humana. Recuperado el 12 de julio de 2022 de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dioxins-and-their-effects-on-human-health>
- Al Tanoury, Z., Piskunov, A., & Rochette-Egly, C. (2013). Vitamin a and retinoid signaling: Genomic and nongenomic effects. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 54, Issue 7, pp. 1761–1775). <https://doi.org/10.1194/jlr.R030833>
- Alarcón, S., Esteban, J., Roos, R., Heikkinen, P., Sánchez-Pérez, I., Adamsson, A., Toppari, J., Koskela, A., Finnilä, M. A. J., Tuukkanen, J., Herlin, M., Hamscher, G., Leslie, H. A., Korkalainen, M., Halldin, K., Schrenk, D., Håkansson, H., & Viluksela, M. (2021a). Endocrine, metabolic and apical effects of in utero and lactational exposure to non-dioxin-like 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB 180): A postnatal follow-up study in rats. *Reproductive Toxicology*, 102, 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.04.004>
- Alarcón, S., Esteban, J., Roos, R., Heikkinen, P., Sánchez-Pérez, I., Adamsson, A., Toppari, J., Koskela, A., Finnilä, M. A. J., Tuukkanen, J., Herlin, M., Hamscher, G., Leslie, H. A., Korkalainen, M., Halldin, K., Schrenk, D., Håkansson, H., & Viluksela, M. (2021b). Endocrine, metabolic and apical effects of in utero and lactational exposure to non-dioxin-like 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB 180): A postnatal follow-up study in rats. *Reproductive Toxicology*, 102, 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.04.004>
- Bao, L., Gao, C., Li, M., Chen, Y., Lin, W., Yang, Y., Han, N., Bian, H., Zhu, M., & Wang, J. (2013). Biomonitoring of Non-Dioxin-Like Polychlorinated Biphenyls in Transgenic Arabidopsis Using the Mammalian Pregnane X Receptor System: A Role of Pectin in Pollutant Uptake. *PLoS ONE*, 8(11), e79428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079428>
- Barker, D. J. P., Osmond, C., Winter, P. D., Margetts, B., & Simmonds, S. J. (1989). ISCHAEMIC HEART DISEASE.
- Barua, A. B., & Furr, H. C. (1998). Properties of Retinoids Structure, Handling, and Preparation. *Molecular Biotechnology*, 10, 167–182. <https://doi.org/10.1007/BF02760863>
- Bastos Sales, L., Kamstra, J. H., Cenijn, P. H., van Rijt, L. S., Hamers, T., & Legler, J. (2013). Effects of endocrine disrupting chemicals on in vitro global DNA methylation and adipocyte differentiation. *Toxicology in Vitro*, 27(6), 1634–1643. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.04.005>

- Bergman, A., United Nations Environment Programme., & World Health Organization. (2013). State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012 an assessment of the state of the science of endocrine disruptors. WHO.
- Birnhaurn, L. S., & Devito, M. J. (1995). Use of toxic equivalency factors for risk assessment for dioxins and related compounds. In *Toxicology* (Vol. 105).
- Blaner, W. S. (2019). Vitamin A signaling and homeostasis in obesity, diabetes, and metabolic disorders. *Pharmacology and Therapeutics*, 197, 153–178. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.01.006>
- Blomhoff, R., Rasmussen, M., Berg, T., & Norum, K. R. (1982). In vivo uptake of chylomicron [3H]retinyl ester by rat liver: Evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells (chylomicron remnants/fat-storing cells/vitamin A). In *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (Vol. 79).
- Bokkers, B. G. H., & Slob, W. (2007). Deriving a data-based interspecies assessment factor using the NOAEL and the benchmark dose approach. In *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 37, Issue 5, pp. 355–373). <https://doi.org/10.1080/10408440701249224>
- Cerro Martín, G. del, Diamantopoulos Fernández, J., Morell Rodríguez, I., & Espanya. Ministerio de Agricultura, A. y M. Ambiente. (2012). Introducción al conocimiento y prevención de los contaminantes orgánicos persistentes. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- De Cock, M., & Van de Bor, M. (2014). Obesogenic effects of endocrine disruptors, what do we know from animal and human studies? *Environment International*, 70, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04.022>
- Denison, M. S., & Nagy, S. R. (2003). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 43, pp. 309–334). <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828>
- Dhanabalan, S., Mathur, P., & Latha, P. (2015). TCDD and corticosterone on testicular steroidogenesis and antioxidant system of epididymal sperm in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 31(9), 811–822. <https://doi.org/10.1177/0748233713475501>

- Dollé, M. E. T., Kuiper, R. V., Roodbergen, M., Robinson, J., de Vlugt, S., Wijnhoven, S. W. P., Beems, R. B., de la Fonteyne, L., de With, P., van der Pluijm, I., Niedernhofer, L. J., Hasty, P., Vijg, J., Hoeijmakers, J. H. J., & van Steeg, H. (2011). Broad segmental progeroid changes in short-lived Ercc1 -/Δ7 mice . *Pathobiology of Aging & Age-Related Diseases*, 1(1), 7219. <https://doi.org/10.3402/pba.v1i0.7219>
- Elabbas, L. E., Esteban, J., Barber, X., Hamscher, G., Nau, H., Bowers, W. J., Nakai, J. S., Herlin, M., Åkesson, A., Viluksela, M., Borg, D., & Hakansson, H. (2014a). In utero and lactational exposure to a mixture of environmental contaminants detected in canadian arctic human populations alters retinoid levels in rat offspring with low margins of exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 77(5), 223–245. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.861776>
- Elabbas, L. E., Esteban, J., Barber, X., Hamscher, G., Nau, H., Bowers, W. J., Nakai, J. S., Herlin, M., Åkesson, A., Viluksela, M., Borg, D., & Hakansson, H. (2014b). In utero and lactational exposure to a mixture of environmental contaminants detected in canadian arctic human populations alters retinoid levels in rat offspring with low margins of exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 77(5), 223–245. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.861776>
- Endo, T., Kakeyama, M., Uemura, Y., Haijima, A., Okuno, H., Bito, H., & Tohyama, C. (2012). Executive Function Deficits and Social-Behavioral Abnormality in Mice Exposed to a Low Dose of Dioxin In Utero and via Lactation. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050741>
- Esteban, J., Elabbas, L. E., Borg, D., Herlin, M., Åkesson, A., Barber, X., Hamscher, G., Nau, H., Bowers, W. J., Nakai, J. S., Viluksela, M., & Håkansson, H. (2014a). Gestational and lactational exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 modulates retinoid homeostasis in rat offspring. *Toxicology Letters*, 229(1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.04.021>
- Esteban, J., Elabbas, L. E., Borg, D., Herlin, M., Åkesson, A., Barber, X., Hamscher, G., Nau, H., Bowers, W. J., Nakai, J. S., Viluksela, M., & Håkansson, H. (2014b). Gestational and lactational exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 modulates retinoid homeostasis in rat offspring. *Toxicology Letters*, 229(1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.04.021>

- Esteban, J., Sánchez-Pérez, I., Hamscher, G., Miettinen, H. M., Korkalainen, M., Viluksela, M., Pohjanvirta, R., & Håkansson, H. (2021a). Role of aryl hydrocarbon receptor (AHR) in overall retinoid metabolism: Response comparisons to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure between wild-type and AHR knockout mice. *Reproductive Toxicology*, 101, 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.02.004>
- Esteban, J., Sánchez-Pérez, I., Hamscher, G., Miettinen, H. M., Korkalainen, M., Viluksela, M., Pohjanvirta, R., & Håkansson, H. (2021b). Role of aryl hydrocarbon receptor (AHR) in overall retinoid metabolism: Response comparisons to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure between wild-type and AHR knockout mice. *Reproductive Toxicology*, 101, 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.02.004>
- Esteban, J., Serrano-Maciá, M., Sánchez-Pérez, I., Alonso-Magdalena, P., Pellín, M. de la C., García-Arévalo, M., Nadal, Á., & Barril, J. (2019). In utero exposure to bisphenol-A disrupts key elements of retinoid system in male mice offspring. *Food and Chemical Toxicology*, 126, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.023>
- Faqi, A. S., Dalsenter, P. R., Merker, H.-J., & Chahoud, I. (1998). Reproductive Toxicity and Tissue Concentrations of Low Doses of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin in Male Offspring Rats Exposed Throughout Pregnancy and Lactation 1.
- Gascon, M., Sunyer, J., Casas, M., Martínez, D., Ballester, F., Basterrechea, M., Bonde, J. P., Chatzi, L., Chevrier, C., Eggesbø, M., Esplugues, A., Govarts, E., Hannu, K., Ibarluzea, J., Kasper-Sonnenberg, M., Klümper, C., Koppen, G., Nieuwenhuijsen, M. J., Palkovicova, L., ... Vrijheid, M. (2014). Prenatal exposure to DDE and PCB 153 and respiratory health in early childhood: A meta-analysis. *Epidemiology*, 25(4), 544–553. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000097>
- Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R. M., Lazar, M. A., Leid, M., de Lera, A. R., Lotan, R., Mangelsdorf, D. J., & Gronemeyer, H. (2006). International union of pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 58, Issue 4, pp. 712–725). <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.4>
- Ghosh, S., Trnovec, T., Palkovicova, L., Hoffman, E. P., Washington, K., & Dutta, S. K. (2013). Status of LEPR Gene in PCB-exposed Population: A Quick Look. *International Journal of Human Genetics*, 13(1), 27–32. <https://doi.org/10.1080/09723757.2013.11886193>

- Govarts, E., Casas, M., Schoeters, G., Eggesbø, M., Valvi, D., Nieuwenhuijsen, M., & Peter Bonde, J. (2014). Prenatal PCB-153 exposure and decreased birth weight: The role of gestational weight gain. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 122, Issue 4). Public Health Services, US Dept of Health and Human Services. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307796>
- Govarts, E., Nieuwenhuijsen, M., Schoeters, G., Ballester, F., Bloemen, K., de Boer, M., Chevrier, C., Eggesbø, M., Guxens, M., Krämer, U., Legler, J., Martínez, D., Palkovicova, L., Patelarou, E., Ranft, U., Rautio, A., Petersen, M. S., Slama, R., Stigum, H., ... Bonde, J. P. (2012). Birth weight and prenatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE): A meta-analysis within 12 European birth cohorts. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 120, Issue 2, pp. 162–170). <https://doi.org/10.1289/ehp.1103767>
- Gundersena, T. E., Lundanesa', E., & Blomhoffb, R. (1997). Quantitative high-performance liquid chromatographic determination of retinoids in human serum using on-line solid-phase extraction and column switching Determination of 9-cis-retinoic acid, 13-cis-retinoic acid, all-trans-retinoic acid, 4-oxo-all-trans-retinoic acid and 4-OxO-13-cis-retinoic acid. In *Journal of Chromatography B* (Vol. 691).
- Haffner, D., & Schechter, A. (2014). Persistent Organic Pollutants (POPs): A Primer for Practicing Clinicians. In *Current environmental health reports* (Vol. 1, Issue 2, pp. 123–131). Springer. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0009-9>
- Hardy, A., Benford, D., Halldorsson, T., Jeger, M. J., Knutsen, K. H., More, S., Mortensen, A., Naegeli, H., Noteborn, H., Ockleford, C., Ricci, A., Rychen, G., Silano, V., Solecki, R., Turck, D., Aerts, M., Bodin, L., Davis, A., Edler, L., ... Schlatter, J. R. (2017). Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA Journal*, 15(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4658>
- Hites, R. A. (2011). Dioxins: An overview and history. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 45, Issue 1, pp. 16–20). <https://doi.org/10.1021/es1013664>
- Kamstra, J. H., Hrubá, E., Blumberg, B., Janesick, A., Mandrup, S., Hamers, T., & Legler, J. (2014). Transcriptional and epigenetic mechanisms underlying enhanced in vitro adipocyte differentiation by the brominated flame retardant bde-47. *Environmental Science and Technology*, 48(7), 4110–4119. <https://doi.org/10.1021/es405524b>

- Kharat, I., & Saatcioglu, F. (1996). Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor: Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 271(18), 10533–10537. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10533>
- Kogevinas, M. (n.d.). Human health effects of dioxins: cancer, reproductive and endocrine system effects.
- Larsen, J. C. (2006). Risk assessments of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in food. In *Molecular Nutrition and Food Research* (Vol. 50, Issue 10, pp. 885–896). <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500247>
- Le Maire, A., Teyssier, C., Balaguer, P., Bourguet, W., & Germain, P. (2019). Regulation of rxr-rar heterodimers by rxr-and rar-specific ligands and their combinations. *Cells*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/cells8111392>
- Legler, J. (2013). An integrated approach to assess the role of chemical exposure in obesity. In *Obesity* (Vol. 21, Issue 6, pp. 1084–1085). <https://doi.org/10.1002/oby.20478>
- Legler, J., Hamers, T., Van Eck Van Der Sluijs-van De Bor, M., Schoeters, G., Van Der Ven, L., Eggesbo, M., Koppe, J., Feinberg, M., & Trnovec, T. (2011). The OBELIX project: Early life exposure to endocrine disruptors and obesity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 94(6). <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001669>
- Milbrath, M. O. G., Wenger, Y., Chang, C. W. C. W., Emond, C., Garabrant, D., Gillespie, B. W., & Jolliet, O. (2009). Apparent half-lives of dioxins, furans, and polychlorinated biphenyls as a function of age, body fat, smoking status, and breast-feeding. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 117, Issue 3, pp. 417–425). <https://doi.org/10.1289/ehp.11781>
- Mitsui, T., Sugiyama, N., Maeda, S., Tohyama, C., & Arita, J. (2006). Perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses contextual fear conditioning-accompanied activation of cyclic AMP response element-binding protein in the hippocampal CA1 region of male rats. *Neuroscience Letters*, 398(3), 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.12.087>
- Mouchon, A., Le`ne, M.-H., Delmotte, L. L., Formstecher, P., & Lefebvre, P. (1999). Allosteric Regulation of the Discriminative Responsiveness of Retinoic Acid Receptor to Natural and

Synthetic Ligands by Retinoid X Receptor and DNA. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 19, Issue 4). <http://mcb.asm.org/>

Mustafa, A., Holladay, S. D., Witonsky, S., Sponenberg, D. P., Karpuzoglu, E., & Gogal, R. M. (2011). A single mid-gestation exposure to TCDD yields a postnatal autoimmune signature, differing by sex, in early geriatric C57BL/6 mice. *Toxicology*, 290(2–3), 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.08.021>

O'Byrne, S. M., & Blaner, W. S. (2013). Retinol and retinyl esters: Biochemistry and physiology. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 54, Issue 7, pp. 1731–1743). <https://doi.org/10.1194/jlr.R037648>

Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A., & Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*, 330, 444–450. <https://doi.org/10.1038/330444a0>

Piersma, A. H., Hessel, E. V., & Staal, Y. C. (2017). Retinoic acid in developmental toxicology: Teratogen, morphogen and biomarker. In *Reproductive Toxicology* (Vol. 72, pp. 53–61). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.05.014>

Pocar, P., Klonisch, T., Brandsch, C., Eder, K., Fröhlich, C., Hoang-Vu, C., & Hombach-Klonisch, S. (2006). AhR-agonist-induced transcriptional changes of genes involved in thyroid function in primary porcine thyrocytes. *Toxicological Sciences*, 89(2), 408–414. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj042>

Ramírez-Vélez, R. (2012). Programación Fetal in utero y su impacto en la salud del adulto. In *Endocrinología y Nutrición* (Vol. 59, Issue 6, pp. 383–393). <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2012.02.002>

Rashid, C. S., Carter, L. G., Hennig, B., & Pearson, K. J. (2013). Perinatal polychlorinated biphenyl 126 exposure alters offspring body composition. *Journal of Pediatric Biochemistry*, 3(1), 47–53. <https://doi.org/10.3233/JPB-120072>

Reboul, E. (2013). Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: Focus on transport proteins. In *Nutrients* (Vol. 5, Issue 9, pp. 3563–3581). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu5093563>

- Rhinn, M., & Dollé, P. (2012). Retinoic acid signalling during development. *Development*, 139(5), 843–858. <https://doi.org/10.1242/dev.065938>
- Safe, S. H. (n.d.). Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures Using the Toxic Equivalency Factor Approach.
- Safe, S. H. (1995). MODULATION OF GENE EXPRESSION AND ENDOCRINE RESPONSE PATHWAYS BY 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-p-DIOXIN AND RELATED COMPOUNDS (Vol. 61, Issue 2).
- Safe, S. H. (1998). Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures Using the Toxic Equivalency Factor Approach.
- Schechter, A., Birnbaum, L., Ryan, J. J., & Constable, J. D. (2006a). Dioxins: An overview. In *Environmental Research* (Vol. 101, Issue 3, pp. 419–428). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.12.003>
- Schechter, A., Birnbaum, L., Ryan, J. J., & Constable, J. D. (2006b). Dioxins: An overview. In *Environmental Research* (Vol. 101, Issue 3, pp. 419–428). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.12.003>
- Schmidt, C. K., Brouwer, A., & Nau, H. (2003). Chromatographic analysis of endogenous retinoids in tissues and serum. *Analytical Biochemistry*, 315(1), 36–48. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00662-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00662-0)
- Schwetz, B. A., Norris, I., Sparschu, G. L., Rowe, V. K., & Gehring, P. I. (n.d.). Toxicology of Chlorinated Dibenzo-p-dioxins.
- Senoo, H., Mezaki, Y., & Fujiwara, M. (2017a). The stellate cell system (vitamin A-storing cell system). In *Anatomical Science International* (Vol. 92, Issue 4, pp. 387–455). Springer Tokyo. <https://doi.org/10.1007/s12565-017-0395-9>
- Senoo, H., Mezaki, Y., & Fujiwara, M. (2017b). The stellate cell system (vitamin A-storing cell system). In *Anatomical Science International* (Vol. 92, Issue 4, pp. 387–455). Springer Tokyo. <https://doi.org/10.1007/s12565-017-0395-9>
- Sheftel, J., Sowa, M., Mourao, L., Zoué, L. T., Davis, C. R., Simon, P. W., & Tanumihardjo, S. A. (2019). Total adipose retinol concentrations are correlated with total liver retinol concentrations in Male Mongolian gerbils, but only partially explained by chylomicron

deposition assessed with total α -retinol. *Current Developments in Nutrition*, 3(2).
<https://doi.org/10.1093/cdn/nzy096>

Sheftel, J., & Tanumihardjo, S. A. (2021). Systematic review and meta-analysis of the relative dose-response tests to assess vitamin A status. In *Advances in Nutrition* (Vol. 12, Issue 3, pp. 904–941). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa136>

Shmarakov 2015 retinoid-xenobiotic interactions. (n.d.).

Shmarakov, I. O., Lee, Y. J., Jiang, H., & Blaner, W. S. (2019). Constitutive androstane receptor mediates PCB-induced disruption of retinoid homeostasis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 381. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114731>

Sonnenschein-Van Der Voort, A. M. M., Arends, L. R., De Jongste, J. C., Annesi-Maesano, I., Arshad, S. H., Barros, H., Basterrechea, M., Bisgaard, H., Chatzi, L., Corpeleijn, E., Correia, S., Craig, L. C., Devereux, G., Dogaru, C., Dostal, M., Duchon, K., Eggesbø, M., Van Der Ent, C. K., Fantini, M. P., ... Duijts, L. (2014). Preterm birth, infant weight gain, and childhood asthma risk: A meta-analysis of 147,000 European children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(5), 1317–1329. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.1082>

Soto, A. M., Schaeberle, C. M., & Sonnenschein, C. (2021). From Wingspread to CLARITY: a personal trajectory. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 17, Issue 4, pp. 247–256). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00460-3>

Sugai, E., Yoshioka, W., Kakeyama, M., Ohsako, S., & Tohyama, C. (2014). In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates dysregulation of the lipid metabolism in mouse offspring fed a high-calorie diet. *Journal of Applied Toxicology*, 34(3), 296–306. <https://doi.org/10.1002/jat.2881>

Szanto, A., Narkar, V., Shen, Q., Uray, I. P., Davies, P. J. A., & Nagy, L. (2004). Review retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 11, pp. S126–S143). <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401533>

Tanumihardjo, S. A. (2011). Vitamin A: Biomarkers of nutrition for development. In *American Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 94, Issue 2). <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.005777>

Tanumihardjo, S. A., Russell, R. M., Stephensen, C. B., Gannon, B. M., Craft, N. E., Haskell, M. J., Lietz, G., Schulze, K., & Raiten, D. J. (2016). Biomarkers of nutrition for development

(BOND)-vitamin A review. *Journal of Nutrition*, 146(9), 1816S-1848S.
<https://doi.org/10.3945/jn.115.229708>

Tarkowski, M., Kur, B., Nocuń, M., & Sitarek, K. (2010). Perinatal exposure of mice to TCDD decreases allergic sensitisation through inhibition of IL-4 production rather than T regulatory cell-mediated suppression. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 23(1), 75–83. <https://doi.org/10.2478/v.10001-010-0006-7>

Thomsen, C., Stigum, H., Frøshaug, M., Broadwell, S. L., Becher, G., & Eggesbø, M. (2010). Determinants of brominated flame retardants in breast milk from a large scale Norwegian study. *Environment International*, 36(1), 68–74.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.002>

Topletz, A. R., Tripathy, S., Foti, R. S., Shimshoni, J. A., Nelson, W. L., & Isoherranen, N. (2015). Induction of CYP26A1 by metabolites of retinoic acid: Evidence that CYP26A1 is an important enzyme in the elimination of active retinoids. *Molecular Pharmacology*, 87(3), 430–441. <https://doi.org/10.1124/mol.114.096784>

Van Den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Walker, N., & Peterson, R. E. (2006a). Bureau of Chemical Safety, Health Canada, 13 International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland; 14 National Public Health Institute. In *Toxicol Sci* (Vol. 5, Issue 2).

Van Den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Walker, N., & Peterson, R. E. (2006b). Bureau of Chemical Safety, Health Canada, 13 International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland; 14 National Public Health Institute. In *Toxicol Sci* (Vol. 5, Issue 2).

Van Den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A. T. C., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J. P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S. W., Kubiak, T., Larsen, J. C., Rolaf Van Leeuwen, F. X., Liem, A. K. D., Nolt, C., Peterson, R. E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., ... Zacharewski, T. (1998). Review of Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and Wildlife. In *Environ Health Perspect* (Vol. 106). <http://>

- van Esterik, J. C. J., Verharen, H. W., Hodemaekers, H. M., Gremmer, E. R., Nagarajah, B., Kamstra, J. H., Dollé, M. E. T., Legler, J., & van der Ven, L. T. M. (2015a). Compound- and sex-specific effects on programming of energy and immune homeostasis in adult C57BL/6JxFVB mice after perinatal TCDD and PCB 153. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 289(2), 262–275. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.09.017>
- van Esterik, J. C. J., Verharen, H. W., Hodemaekers, H. M., Gremmer, E. R., Nagarajah, B., Kamstra, J. H., Dollé, M. E. T., Legler, J., & van der Ven, L. T. M. (2015b). Compound- and sex-specific effects on programming of energy and immune homeostasis in adult C57BL/6JxFVB mice after perinatal TCDD and PCB 153. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 289(2), 262–275. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.09.017>
- Vilhais-Neto, G. C., & Pourquié, O. (2008). Retinoic acid (DOI:10.1016/j.cub.2007.12.042). In *Current Biology* (Vol. 18, Issue 7, pp. 550–552). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.03.032>
- White, S. S., & Birnbaum, L. S. (2009). An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology. In *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews* (Vol. 27, Issue 4, pp. 197–211). <https://doi.org/10.1080/10590500903310047>
- Wvss, R., & Bucheli, F. (1997). Determination of endogenous levels of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin), all-trans-retinoic acid (tretinoin) and their 4-oxo metabolites in human and animal plasma by high-performance liquid chromatography with automated column switching and ultraviolet detection. In *Journal of Chromatography B* (Vol. 700).

