

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA
GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



“La exposición a TCDD durante la gestación y lactancia, aumentó los ésteres de retinilo hepáticos en ratones macho de 1 año”

TRABAJO FIN DE GRADO
Septiembre 2023
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Autor: Héctor Miguel Pérez Agulló

Tutor: Javier Esteban Mozo

Cotutor: Roger Ortiz Climent

Escuela Politécnica Superior de Orihuela
Universidad Miguel Hernández

Resumen

Las policlorodibenzo-*p*-dioxinas son compuestos orgánicos persistentes y disruptores endocrinos. La exposición a estos durante el desarrollo se ha asociado al padecimiento posterior de enfermedades crónicas. Asimismo, el sistema retinoide podría estar afectado puesto que está involucrado en procesos biológicos esenciales, tales como la reproducción y el desarrollo. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar los niveles de ésteres de retinilo en hígado de ratones macho, un año después de su nacimiento, habiendo sido expuestos a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) durante la gestación y lactancia. Las ratonas hembra F0 C57BL recibieron dosis de TCDD comprendidas entre 0 y 10000 pg/kg masa corporal. Tras el día postnatal 14 cesó la dosificación de TCDD a las hembras F0. La descendencia continuó con la dieta estándar hasta el PND 308 a partir del cual se les alimentó con una dieta rica en grasa hasta el PND 365, momento en que se finalizó el estudio. Se extrajeron los hígados y se almacenaron a – 80 °C hasta que se midieron, mediante cromatografía líquida de alta resolución, los niveles hepáticos de los siguientes ésteres de retinilo: estearato, oleato, palmitato, mistearato y linoleato de retinilo, así como se calcularon los niveles totales. Las relaciones dosis-respuesta se evaluaron mediante el paquete *Proast* en R. Los niveles hepáticos de ésteres de retinilo aumentaron al año de vida conforme aumentó la exposición a TCDD. El estearato de retinilo se incrementó con mayor potencia (67 mg_{TCDD} /kg pc) y eficacia (47%) que el resto de ésteres. Dichos aumentos podrían considerarse un efecto adaptativo por los potenciales efectos de TCDD ocasionados durante la exposición. Se descartó que la exposición a niveles medioambientales de TCDD indujese un estatus hepático de vitamina A deficiente a PND 365.

Palabras clave

Ésteres de retinilo, vitamina A, TCDD

Abstract

Polychlorinated dibenzo-p-dioxins are persistent organic compounds and endocrine disruptors. Exposure to them during development has been associated with subsequent chronic diseases. The retinoid system may also be affected as it is involved in essential biological processes such as reproduction and development. Therefore, the aim of the present study was to determine the levels of retinyl esters in the liver of male mice, one year after birth, having been exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) during gestation and lactation. Female F0 C57BL mice received doses of TCDD ranging from 0 to 10000 pg/kg body mass. After postnatal day 14, TCDD dosing of F0 females ceased. The offspring continued on the standard diet until PND 308, after which they were fed a high-fat diet until PND 365, at which time the study was terminated. Livers were removed and stored at -80 °C until liver levels of the following retinyl esters: retinyl stearate, oleate, palmitate, palmitate, mistearate and linoleate were measured by high performance liquid chromatography and total levels were calculated. Dose-response relationships were assessed using the Proast package in R. Hepatic levels of retinyl esters increased at 1 year of age with increasing exposure to TCDD. Retinyl stearate increased with greater potency (67 mg TCDD/kg bw) and efficacy (47%) than the other esters. Such increases could be considered an adaptive effect for the potential TCDD effects caused during exposure. Exposure to environmental levels of TCDD was ruled out as inducing a vitamin A deficient liver status at PND 365.

Key words

Retinyl esters, Vitamin A, TCDD

Abreviaturas

AhR	Receptor de hidrocarburos de arilo
AR	Ácido retinoico
BMD	Dosis <i>Benchmark</i>
CAR	Receptor Constitutivo de Androstano
EDC	Compuestos disruptores endocrinos
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta resolución
LOAEL	Nivel más bajo de efectos adversos observados
PC	Peso corporal
PCB	Bifenilos policlorados
PND	Día post natal
POPs	Compuestos orgánicos persistentes
RE	Ésteres de retinilo
REAC	Acetato de retinilo
REEST	Estearato de retinilo
REMILI	Mistearato y Linoleato de retinilo
REOLE	Oleato de retinilo
REPA	Palmitato de retinilo
TCDD	2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxinas

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. POPs	1
1.2. TCDD.....	3
1.3. SISTEMA RETINOIDE	5
1.4. ANTECEDENTES	7
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	8
3.2. DETERMINACIÓN DE RETINOIDES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	9
3.2.1. REACTIVOS.....	9
3.2.2. PRECAUCIONES EN EL LABORATORIO	9
3.2.3. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES	10
3.2.4. CONDICIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS.....	10
3.2.5. ESTABILIDAD DE LOS PATRONES.....	11
3.2.5.1. EXPOSICIÓN A LA LUZ	11
3.2.5.2. ALMACENAMIENTO DE LARGA DURACIÓN.....	11
3.2.6. PROCESADO DE LAS MUESTRAS	12
3.2.7. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	13
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	14
3.3.1. Modelado dosis-respuesta	14
4. RESULTADOS	14
4.1. ESTABILIDAD QUÍMICA	14
4.1.1. FOTOISOMERIZACIÓN.....	14
4.1.2. ALMACENAMIENTO	16
4.2. NIVELES DE ÉSTERES DE RETINILO EN RATONES MACHO TRATADOS CON TCDD DURANTE LA GESTACIÓN Y LACTANCIA	17
5. DISCUSIÓN	21
6. CONCLUSIÓN	24
7. BIBLIOGRAFÍA	25

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química del plaguicida organoclorado dicloro difenil tricloroetano.....	2
Figura 2. Estructura química de las policlorodibenzodioxinas	3
Figura 3. (A) Pictograma GHS06 (toxicidad aguda), (B) GHS08 (peligro para la salud humana) y (C) GHS09 (peligro para el ambiente acuático).....	4
Figura 4. Estructura química del TCDD	4
Figura 5. Estructura química del retinol.....	5
Figura 6. Procesos fisiológicos en los que interviene la vitamina A. (Adaptado Carazo, 2021) ...	6
Figura 7. Resumen metabolismo de la vitamina A. Adaptado de Shmarakov, I. O. (2015); (Carazo et al., 2021)	6
Figura 8. Estructura química general de los esteres de retinilo (RE)	7
Figura 9. Resumen diseño experimental con animales de experimentación detallado en van Esterik et al (2015)	8
Figura 10. Prueba exposición a la luz.....	11
Figura 11. Esquema del procesado de muestras (Schmidt et al., 2003))	13
Figura 12. Espectro de absorción del estándar interno REAC. Línea roja se corresponde con el compuesto medido en luz amarilla/roja y la línea azul se corresponde al compuesto medido en luz blanca natural.	15
Figura 13. Espectro de absorción del estándar interno REPA. Línea roja se corresponde con el compuesto medido en luz amarilla/roja y la línea azul se corresponde al compuesto medido en luz blanca natural.	15
Figura 14. Cromatograma de acetato de retinilo (REAC) en color rojo con exposición de luz amarilla y roja y en color azul tras 1 hora de exposición a la luz natural	16
Figura 15. Editar como en la figura 9 Cromatograma REPA, en rojo con exposición a la luz amarilla y roja y en color azul tras 1 hora de exposición a luz natural.....	16
Figura 16. Cromatograma del éster de retinilo REPA. Línea roja se corresponde con el estándar analizado en julio de 2022 y la línea azul se corresponde con la muestra analizada en marzo de 2023.	17
Figura 17. Modelado de la relación dosis-respuesta de los niveles hepáticos de estearato de retinilo de ratones macho sacrificados el día post natal 365, y cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación	18
Figura 18. Modelado de la relación dosis-respuesta de los niveles hepáticos de oleato de retinilo de ratones macho sacrificados el día post natal 365, y cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación	18
Figura 19. Modelado de la relación dosis-respuesta de los niveles hepáticos de palmitato de retinilo de ratones macho sacrificados el día post natal 365, y cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación	19
Figura 20. Modelado de la relación dosis-respuesta de los niveles hepáticos de mistearato y linoleato de retinilo de ratones macho sacrificados el día post natal 365, y cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación.....	19
Figura 21. Modelado de la relación dosis-respuesta de los niveles hepáticos de los esteres de retinilo totales de ratones macho sacrificados el día post natal 365, y cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación.....	20

Índice de Tablas

Tabla 1. Niveles hepáticos de ésteres de retinilo a PND365 en ratones macho F1 tratados con TCDD durante la gestación y lactancia.....	17
Tabla 2. Resultados del análisis mediante BMD de las concentraciones de ésteres de retinilo de ratones macho F1 a día postnatal 365, cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación y lactancia	20
Tabla 3. Estado de la Vitamina A	21
Tabla 4. Exposición a dioxinas en diferentes estudios in vivo	23



1. INTRODUCCIÓN

1.1. POPs

Un tipo extremadamente preocupante de contaminantes químicos son aquellos que presentan las siguientes características: persistencia, bioacumulación, biomagnificación, toxicidad y transporte de largo alcance. Tales compuestos se conocen como compuestos orgánicos persistentes (POPs, por sus siglas en inglés *Persistent Organic Pollutants*)(Ashraf, 2017).

Se han ido desarrollando convenios para abordar la contaminación atmosférica a nivel internacional, entre ellos cabe destacar el *Convenio de Estocolmo*, que fue firmado en 2001 y entró en vigor en 2004. (Naciones Unidas para el Medio Ambiente [PNUMA], Convenio de Estocolmo)

Dentro del *Convenio de Estocolmo* se reconocieron inicialmente, como causantes de efectos adversos en humanos y en el ambiente, 12 POPs, clasificándose en tres grupos:

- Pesticidas, donde encontramos el aldrín, clordano, DDT, dieldrin, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex y Toxafeno;
- Productos químicos industriales, como son el hexaclorobenceno y los bifenilos policlorados; y
- Productos secundarios, dentro del cual encontramos hexaclorobenceno, dibenzodioxinas policloradas y dibenzofuranos policlorados

Son compuestos que suponen una amenaza para los humanos, por las siguientes características que los definen (PNUMA, Stockolm Convention):

- Permanecen intactos durante largos períodos de tiempo
- Distribuidos por todo el ambiente, estando presentes en el agua, suelo y en el aire
- Se acumulan en los organismos vivos, siendo en los niveles más altos de la cadena alimentaria donde mayores concentraciones se pueden encontrar; y
- Son tóxicos para humanos y para animales

Los POPs están formados por un enlace carbono-cloro, un enlace muy estable frente a la hidrólisis y cuanto mayor es el número de cloros presentes en su estructura mayor es su resistencia a la degradación (Ashraf, 2017).

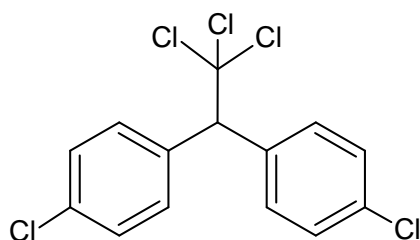


Figura 1. Estructura química del plaguicida organoclorado dicloro difenil tricloroetano

Al ser liberados, los POPs pueden permanecer en el medio ambiente durante mucho tiempo (PNUMA, Stockholm Convention, s/f), pudiendo persistir durante años e incluso décadas, distribuyéndose tanto en suelo, aire y en ecosistemas acuáticos (Ashraf, 2017).

Presentan una tasa baja de biodegradación y resistencia a degradarse de manera natural, relacionándose con su alta halogenación. Otra de las características que presentan las dioxinas, es la bioacumulación. Son compuestos liposolubles, que se acumulan en el tejido adiposo.

Generalmente son compuestos hidrofóbicos y lipofílicos, por ello en los suelos se unen a la materia orgánica y así evitan las partículas acuosas.

Al acumularse en el tejido adiposo, conforme vamos ascendiendo en la cadena trófica vemos que los niveles de dioxinas son mayores, lo que se conoce como biomagnificación (Cerro Martín et al., 2012).

Se encuentran en las posiciones más altas en la cadena alimentaria, dando lugar a que concentren los mayores niveles de POPs.

Los POPs pueden provocar ciertas enfermedades, de las que podemos destacar, cáncer, daño al sistema nervioso central, e incluso pueden llegar a provocar alteraciones endocrinas, dañar el sistema reproductivo e inmunológico y derivar en daños en la descendencia de las personas que hayan sido afectadas.

Asimismo, los POPs pueden ser transportados a largas distancias, por lo que los encontramos en lugares donde nunca se han usado, como es la zona del Ártico, lo que favorece su ubicuidad. (Haffner & Schecter, 2014)

1.2. TCDD

Como hemos mencionado anteriormente dentro de los POPs encontramos el grupo de las policlorodibenzodioxinas. Su estructura consta de dos anillos bencénicos unidos por dos átomos de oxígeno y en los huecos que quedan libres de la molécula se pueden unir moléculas de cloro (Figura 2).

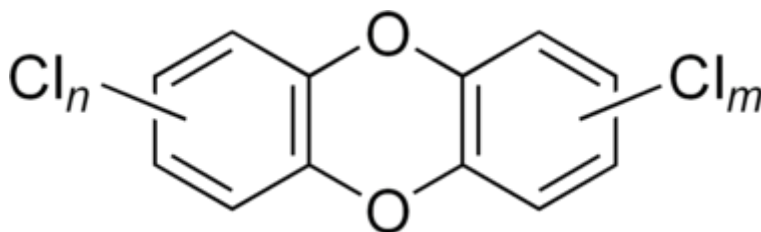


Figura 2. Estructura química de las policlorodibenzodioxinas

Se trata de compuestos que se producen de manera no intencionada, en procesos industriales (Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente y por la Secretaría del Convenio de Estocolmo, 2010), en los que interviene el cloro, como son la producción de plaguicidas, o durante procesos de combustión (Seguridad Alimentaria elika, s.f.), donde se alcanzan temperaturas entre 200-650 °C. Son compuestos muy tóxicos, persistentes y tardan mucho tiempo en degradarse permaneciendo en el ambiente durante mucho tiempo y podemos encontrarlos en el suelo, en el aire y en sedimentos.

Las dioxinas son compuestos de carácter lipofílico, acumulándose en los humanos en el tejido adiposo, bioacumulándose, metabolizándose y eliminándose muy lentamente, presentando una vida media larga, entre 7 y 11 años en humanos. Dentro del grupo de las dioxinas, el TCDD (2,3,7,8-tetra-cloro-dibenzo-*p*-dioxina) es el compuesto más estudiado, muy resistente a ácidos y bases, térmicamente estable a temperaturas por debajo de 600°C, poco soluble en agua, pero muy soluble en lípidos. (International Labour Organization, Noviembre 2003)

Además, este tipo de compuesto lo podemos encontrar no solo en el ambiente, el 90% de la exposición de los humanos a las dioxinas es a través de los alimentos, encontrándose mayoritariamente en alimentos con alto contenido de grasa, huevos, carne bovina, lácteos, pescado, etc. (ACSA – UAB, Mayo 2019)

Debido que las dioxinas son compuestos tóxicos y se encuentran clasificadas como tales para el ser humano, se les asignaron pictogramas que aportan información de su peligrosidad. (Figura 3)

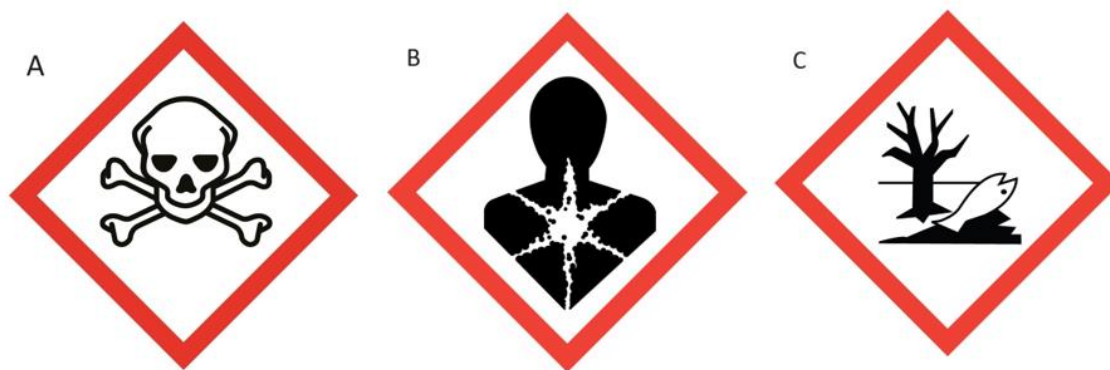


Figura 3. (A) Pictograma GHS06 (toxicidad aguda), (B) GHS08 (peligro para la salud humana) y (C) GHS09 (peligro para el ambiente acuático)

La primera vez que las dioxinas fueron sintetizadas fue en 1872 pero su estructura química no se conoció hasta 1957, cuando también se sintetizó por primera vez el TCDD (Figura 4).

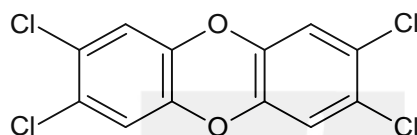


Figura 4. Estructura química del TCDD

Las dioxinas son compuestos que alteran las hormonas del sistema endocrino del organismo, lo que se conoce como disruptores endocrinos (Daniel Ruiz, Heather Patisaul, 24 de Enero, 2022) afectan al metabolismo, siendo carcinógenos, mutágenos y teratogénicos. Presentan una gran afinidad por el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR), relacionado con las expresión de genes que codifican diferentes formas del citocromo P450.

Siendo el TCDD uno de sus ligandos, interfiere con las vías reguladoras hormonales, provocando alteración endocrina. Si el AhR se encuentra activado, por alguno de sus ligandos como lo es el TCDD, provoca efectos complejos sobre los retinoides en niveles de su metabolismo.

Durante el paso de los años se han dado incidentes por contaminación con dioxinas, como fue el grave incidente que ocurrió en Seveso (Italia), en 1976, en una fábrica de productos químicos, donde se liberaron grandes cantidades de dioxinas, entre las que se encontraba el TCDD, contaminando una zona de 15 km². Otro incidente reciente fue en 2008, en el que se tuvieron que retirar grandes cantidades de carne de cerdo, ya que se detectaron cantidades muy por encima del límite de inocuidad. Aunque pueden producirse efectos del TCDD en cualquier país, suelen ocurrir en países que están industrializados (Organización Mundial de la Salud [WHO], 2016).

1.3. SISTEMA RETINOIDE

La primera vez que la vitamina A se aisló fue en los años 20 y tras ello se consiguió describir la función de la visión del retinol. Ya en la década de los 70, se consiguió la detección de retinoides y la circulación, en tejidos y en excrementos.

A partir de la década de los 80 y 90 ya se podían cuantificar, a través de la disponibilidad de compuestos estándar analíticos y de métodos de separación y detección más avanzados.

La vitamina A pertenece a un grupo de compuestos liposolubles que son esenciales para la vida. Todas las formas de la vitamina A presentan una estructura muy similar, también clasificados como retinoides.

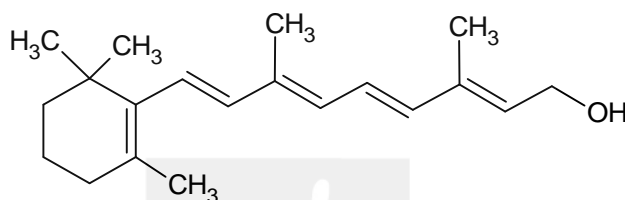


Figura 5. Estructura química del retinol

La estructura de los retinoides se puede dividir en tres partes: un anillo trimetilado de ciclohexano, una cadena lateral de tetraeno conjugado y un grupo funcional carbono-oxígeno polar. Dentro de esta definición encontramos al retinol (Figura 5), al retinaldehído y el ácido retinoico así como sus metabolitos. Debido a que en la estructura de los retinoides hay dobles enlaces conjugados, son sustancias inestables, son fácilmente oxidables debido a su contacto con la luz, presencia con otros oxidantes o si están sometidos a calor excesivo. También son muy lábiles por ácidos fuertes (Barua & Furr, 1998).

Los retinoides son sustancias que engloban tanto sustancias naturales como aquellas que se producen de forma sintética que presentan efectos biológicos similares a los de la vitamina A.

Son compuestos liposolubles que se acumulan fácilmente en el hígado y el tejido adiposo, pero una gran acumulación puede derivar en intoxicación. En cuanto a su almacenamiento, el ácido retinoico se excreta con rapidez, a diferencia de los ésteres de retinilo que sí se almacenan en el hígado.

Los retinoides son muy importantes ya que son esenciales para diferentes procesos biológicos, incluidas las funciones de crecimiento y desarrollo, reproducción y diferenciación celular (Figura 5). Una etapa muy importante es la del desarrollo, por ello, durante el embarazo, es la madre la que proporciona los retinoides al feto. Sin embargo, a pesar de su gran importancia para las funciones mencionadas, la hipervitaminosis puede causar graves efectos adversos, como la teratogénesis (Carazo et al., 2021).

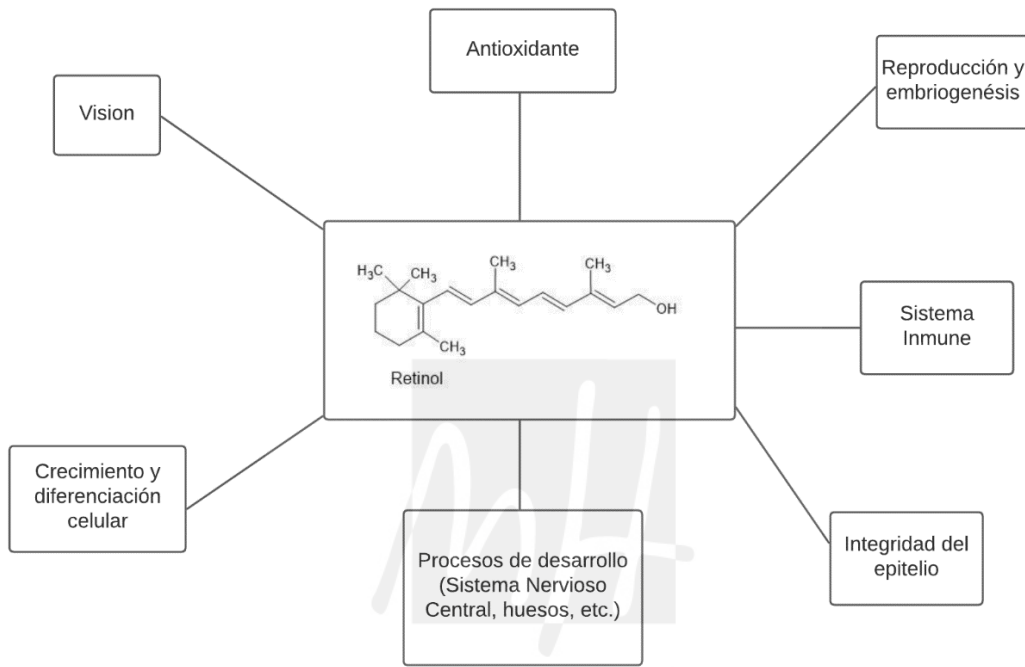


Figura 6. Procesos fisiológicos en los que interviene la vitamina A. (Adaptado Carazo, 2021)

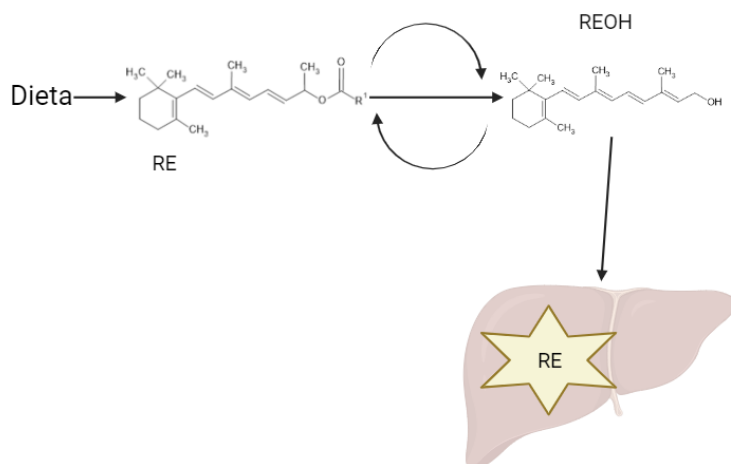


Figura 7. Resumen almacenamiento de la vitamina A. Adaptado de Shmarakov, I. O. (2015); (Carazo et al., 2021)

La vía principal de incorporación de Vitamina A es mediante la dieta, obteniéndose de productos vegetales como zanahorias, tomates. Algas como la espirulina también aportan vitamina A en forma de β -caroteno.

También de productos de origen animal, principalmente de la leche y de productos lácteos, así como de carne, huevos y pescado.

El órgano principal donde se almacenan la mayor cantidad de vitamina A es el hígado. El retinol se esterifica en ésteres de retinilo, los cuales se almacenan en las células estrelladas del hígado (Figura 7)

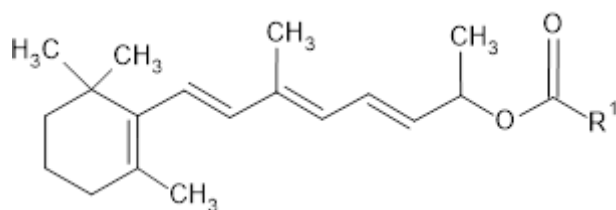


Figura 8. Estructura química general de los ésteres de retinilo (RE)

Además de que los ésteres de retinilo son compuestos muy importantes por las funciones descritas, la determinación de ésteres de retinilo hepáticos es el mejor biomarcador para la determinación de deficiencia de vitamina A (Tanumihardjo et al., 2016).

1.4. ANTECEDENTES

Este Trabajo Fin de Grado se enmarca en el proyecto OBELIX, un proyecto de investigación europeo que se llevó a cabo entre mayo de 2009 y noviembre de 2013. Su objetivo fue estudiar si la exposición temprana a sustancias químicas disruptoras endocrinas (EDC, por sus siglas en inglés) tenía un impacto en el desarrollo de la obesidad y trastornos relacionados en humanos y animales.

Se demostró que la exposición a EDC en alimentos era muy común en toda Europa. A su vez se relacionó la exposición postnatal a EDC con bajo peso al nacer y reducción de índice de masa corporal (IMC).

En estudios con ratones, se observaron efectos adversos en el metabolismo y en los niveles de hormonas relacionados con la exposición durante el desarrollo a EDC en la dieta.

Por ello, los resultados, indicaban que la exposición temprana a EDC podía afectar las vías metabólicas relacionadas con el metabolismo de la energía y la regulación del peso corporal.

2. OBJETIVOS

Se plantearon los siguientes objetivos en un estudio en el que ratones híbridos C57BL/6JxFVB fueron tratados con TCDD durante la gestación y la lactancia y alimentados con una dieta rica en grasas desde el PND308 hasta el PND365 cuando se sacrificaron:

1. Determinar ésteres de retinilo en hígado mediante HPLC
2. Evaluar las potenciales relaciones dosis-respuesta mediante PROAST en R

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio con animales de experimentación se describió en detalle en van Esterik et al. (2015) (Figura 9). En el estudio de TCDD, los ratones hembra (C57BL/6J), estuvieron divididas en jaulas separadas de manera individual durante el preapareamiento, apareamiento, gestación y lactancia. Y a todos ellos se les dejó un período para aclimatarse al ambiente de una semana.

Se experimentaron con ratones adultos (F0) para ver la respuesta en la descendencia (F1) a día postnatal (PND) 365 derivada de la exposición a TCDD durante la gestación y lactancia. A las hembras F0, se les suministró TCDD en dos fases. En primer lugar, se administró TCDD por vía oral en aceite de maíz para así conseguir alcanzar un estado estacionario de TCDD circulante. En segundo lugar, se disolvió TCDD en acetona y se mezcló con la dieta estándar del estudio (NIH-07), obteniéndose así 7 grupos de dieta y un control, consiguiendo las siguientes concentraciones: 0.056, 0.17, 0.56, 1.7, 5.6, 17 y 56, correspondiendo con los rangos de dosis de 10 hasta 10,000 pg/kg de peso corporal (Figura 9), siendo la dosis máxima inferior al LOAEL en ratas de 25 ng/kg de peso corporal/día (ng/kg bw/d) (Faqi et al. 1998) y descrito en Larsen (2006).



Estudio realizado en Center for Health Protection, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) Bilthoven, The Netherlands

Figura 9. Resumen diseño experimental con animales de experimentación, detallado en van Esterik et al (2015).

La exposición al TCDD se finalizó al PND 14 para la óptima excreción de TCDD a través de la lactancia. La excreción del TCDD se comprobó mediante un ensayo DR-LUC, tanto en la cama, como en las heces y en la piel de cada animal (Figura 9)(van Esterik et al., 2015).

Tanto el consumo de alimento como el peso corporal de las hembras F0 fue registrado durante el apareamiento, gestación y lactancia. Cada grupo de ratones presentó seis hembras F0, que fueron separadas en grupos de tres junto a un macho F0. Para limitar las camadas de ratones se decidió reducir las camadas a 9 crías en el PND4. Tras el destete, en el PND21 las crías continuaron con la dieta estándar (NIH-07). Los machos F1 fueron alojados solos, mientras que las hembras F1 estuvieron por parejas. Los pesos corporales se comprobaron tras el PND 4, 7, 14 y 21 y en la semana 5 hasta el final del estudio. el consumo de alimentación se midió durante 3 semanas. (van Esterik et al., 2015).

En la fase final del estudio (PND 308 - 365) se cambió la dieta suministrada a las crías, por una dieta (D12451 diet; 45% de grasa) basada en un alto contenido de grasa en comparación con la dieta proporcionada al principio (NIH-07; 15% de grasa). La descendencia se siguió hasta el PND365. En el sacrificio de los animales, se procedió a medir la longitud del cuerpo y pesar órganos, como el hígado, que se almacenaron a -80°C hasta su análisis (Figura 9).

3.2. DETERMINACIÓN DE RETINOIDES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.2.1. REACTIVOS

Para la determinación de retinoides hepáticos se emplearon diferentes reactivos. Se empleó como estándar interno, para la medición de ésteres de retinilo, el acetato de retinilo (REAC) suministrado por Merck (Francia). Los disolventes utilizados para el HPLC isopropanol y los disolventes metanol, etanol, hexano y acetonitrilo también fueron suministrados suministrado por J.T.Baker (Madrid, España) y el cloroformo empleado para el HPLC suministrado por Scharlab (Barcelona, España). Se empleó agua desionizada, purificada mediante un módulo de agua MiliQ (Direct-Q, Merck).

3.2.2. PRECAUCIONES EN EL LABORATORIO

Los retinoides son compuestos que se pueden degradar, por efecto de la luz, por oxidación y calor por ello se ha de tener precaución a la hora de trabajar en el laboratorio con ellos, como se ha descrito en otros estudios.(Barua & Furr, 1998; Schmidt et al., 2003; Wyss, 1995)

Se han de proteger de todo tipo de fuentes de luz, ya sea luz natural o luz interior, por ello se han de manipular bajo luz amarilla o roja para así evitar la isomerización. En cuanto a los

materiales de laboratorio que vayan a estar en contacto con los retinoides deberán ser de color ámbar, si no son de color ámbar se taparan con papel de aluminio.

Con respecto a la oxidación, los retinoides se degradan con facilidad, por culpa del aire o el oxígeno, a compuestos inactivos, por ello se han de purgar las soluciones con nitrógeno.

Y en relación al calor, son compuestos que con la temperatura se degradan, por lo que se han de almacenar en congeladores a temperaturas por debajo de -20 °C.

Por otro lado, los materiales empleados para el manejo de retinoides serán de vidrio. El silanol de la estructura de los materiales de vidrio presenta una gran afinidad por los retinoides por ello, tras su uso, el vidrio se procederá a lavarse e introducirlos en estufa donde se pirolizarán a más de 500 °C para inactivar la superficie del vidrio. (Schmidt, 2003)

3.2.3. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES

Para la determinación de ésteres de retinilo, se empleó el método del estándar interno, para que el análisis fuese más exacto y preciso. Por ello, sabiendo que queríamos cuantificar ésteres de retinilo endógenos, se empleó como estándar interno el éster sintético REAC. (Barua & Furr, 1998)

Se preparó una disolución de REAC, obteniendo una concentración final de 156,8 nmol/mL, comprobada espectrofotométricamente. (Barua & Furr, 1998) Asimismo, se preparó un patrón de REPA, con una concentración final de 1072,49 nmol/mL, comprobada espectrofotométricamente (Barua & Furr, 1998).

3.2.4. CONDICIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

La comprobación espectrofotométrica de las concentraciones de ésteres de retinilo se realizó en un espectrofotómetro de barrido (Beckman Coulter, Palo Alto, California, EE. UU) monitorizando la absorbancia entre las longitudes de onda comprendidas entre 240 nm y 440 nm. Tras lo cual, se evaluó el perfil del espectro y se calculó la concentración utilizando la absorbancia en el máximo de absorción.

Debido a la presencia de múltiples dobles enlaces de carbono conjugados en el fragmento retinilo, los ésteres de retinilo estudiados tienen una longitud de onda de absorción máxima similar. Por lo tanto, se asumió que los coeficientes de extinción molar de los distintos ésteres de retinilo endógenos eran los mismos que el del REPA (Barua & Furr, 1998).

3.2.5. ESTABILIDAD DE LOS PATRONES

Se estudió la estabilidad química de REAC (estándar interno) y REPA (éster de retinilo endógeno mayoritario) con respecto a la exposición a la luz y al almacenamiento de larga duración.

3.2.5.1. EXPOSICIÓN A LA LUZ

Se prepararon disoluciones de REAC 2 nmol/mL y REPA 5 nmol/mL. Ambos ésteres fueron expuestos a luz blanca natural durante 1 hora aproximadamente o alternativamente a luz amarilla y luz roja tenue reproduciendo las condiciones de laboratorio.

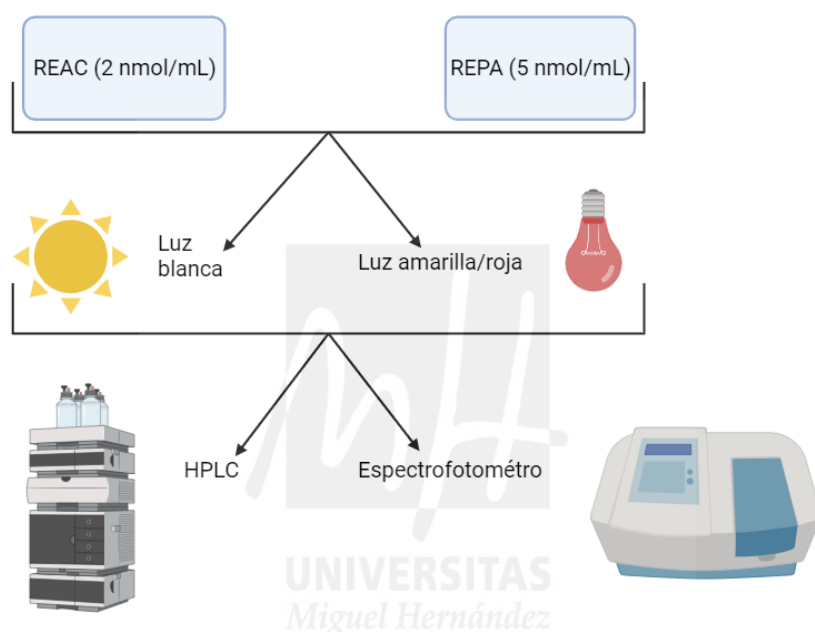


Figura 10. Prueba exposición a la luz

Tras haber realizado los pasos anteriores, se midieron las concentraciones del REAC y REPA espectrofotométricamente (como se indica en la sección 3.2.4.). Además, se midieron en el HPLC y así evaluar la alteración por fotoisomerización. (Figura 10)

3.2.5.2. ALMACENAMIENTO DE LARGA DURACIÓN

Tras a preparación de estándares, se realizó otra prueba, está relacionada con el tiempo de almacenamiento. Se almacenaron los patrones de ésteres de REPA durante 8 meses a -20°C , pasado ese tiempo se midieron las concentraciones mediante el HPLC. Posteriormente se comparó con el cromatograma del estándar fresco con el del estándar almacenado, para evaluar la estabilidad química tras ese periodo de tiempo (Figura 12).

3.2.6. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Para el procesado de las muestras se adaptó el método desarrollado por Schmidt (2003) para determinar retinoides en muestras biológicas. (Figura 11).

Primero se pesaron en balanza analítica (Mettler Toledo) 300 mg de hígado conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se homogeneizaron con un agitador digital (IKA RW 20) con la misma cantidad de agua MiliQ 300 μL , en tubos Potter S. A continuación, se recogieron del homogeneizado 400 μL y se introdujeron en tubos COREX de ensayo, donde también se añadieron 1,6 mL de isopropanol y 100 μL de estándar interno (REAC), para después agitarse 5 segundos en vórtex y 5 minutos en agitación mecánica (Schmidt, 2003).

Tras los 5 minutos, se llevaron los tubos COREX de ensayo a centrifugar (Beckman Coulter Allegra 21R Refrigerated Centrifuge) para facilitar la precipitación de proteínas, durante 10 minutos a 4800 rpm y a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante donde se encontraban los retinoides, se transfirió a otros tubos de ensayo y se añadieron 3,2 mL de cloroformo. Se agitaron de nuevo en vórtex durante 5 segundos y 5 minutos en agitación mecánica y se volvieron a llevar a centrifuga durante 5 minutos, a 3000 rpm y también a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta centrifugación sirvió para facilitar la extracción líquido-líquido, donde la fase acuosa se desechó y la fase orgánica se traspasó con pipetas Pasteur de vidrio a otros tubos de ensayo. (Schmidt, 2003)

Tras este paso, se procedió a realizar la extracción en fase sólida, donde se emplearon columnas de aminopropilo (Agilent SampliQ) para retener los retinoides ácidos y eluir los retinoides neutros (ésteres de retinilo y retinol). Primero se acondicionaron las columnas con 2 mL de hexano. Seguidamente se cargaron las muestras en las columnas y a continuación se añadió 1 mL de cloroformo-isopropanol (2:1 v/v) eluyendo y recogiendo la fase neutra. (Schmidt, 2003)

Como las muestras eran de hígado se agitaron en vórtex y se transfirió a tubos de ensayo nuevos, 1 mL de muestra. Estos tubos se introdujeron en un sistema de centrifuga evaporador LABCONCO Centrivap Concentrator, durante 1 hora a 1 mbar y a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se empleó nitrógeno para romper el vacío y así evitar la oxidación por la presencia del oxígeno en el aire ambiente (Schmidt, 2003).

El siguiente paso es la reconstitución, se les añadió a las muestras 20 μL de cloroformo, se pasó a agitar en vórtex durante 30 segundos, 5 segundos en el sonicador JP SELECTA y 5 minutos en agitación mecánica, seguidamente se añadieron 180 μL de acetonitrilo y se vuelven a pasar a agitar en vórtex durante 30 segundos y en el sonicador durante otros 5 segundos. Para finalizar

se traspasaron 200 μL a insertos de vidrio que se introdujeron en viales de color ámbar para colocarlos en el autosampler del HPLC para su análisis. (Schmidt, 2003).

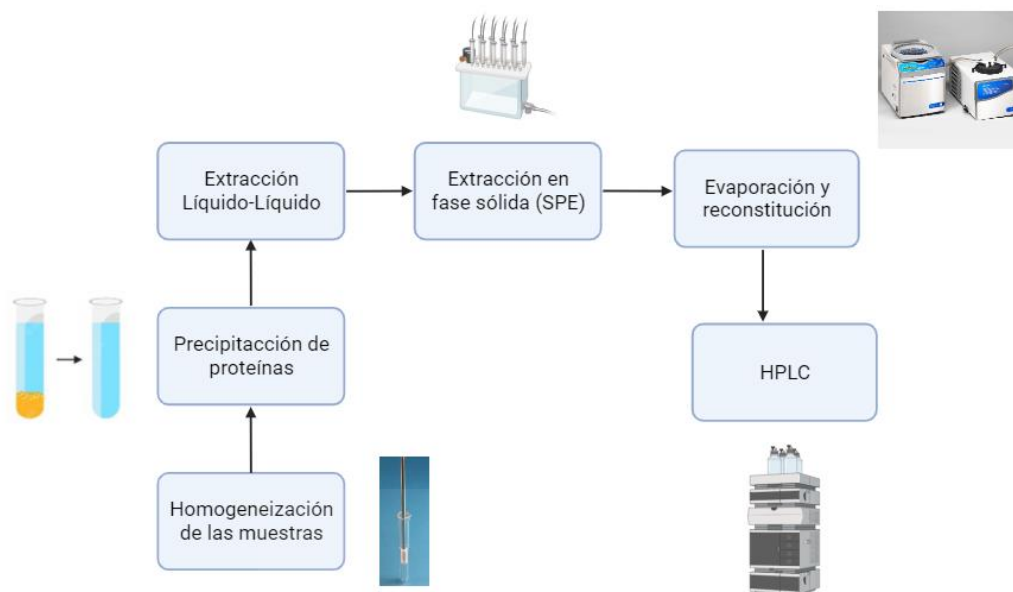


Figura 11. Esquema del procesamiento de muestras (Schmidt et al., 2003)

3.2.7. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Se realizó la cromatografía líquida de alta resolución en HPLC Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipado por un desgasificador desgasificador (G1379A), un bomba binaria (G1312A), un inyector automático (G1313A) y un compartimento de columna termostatzado (G1316A), los analitos se detectaron mediante un detector de longitud de onda variable VWD (G1314A). Para controlar el cromatógrafo se empleó el software HPCHEM AGILENT.

La fase móvil estuvo compuesta por dos fases, en la vía A se usó Metanol-Acetonitrilo (85:15) y en la vía B se usó Cloroformo-Acetonitrilo (50:50).

Para evitar potenciales contaminaciones entre muestras, se pinchó un blanco entre cada muestra.

Los cromatogramas se importaron desde el HPCHEM a Clarity. La integración de los picos de los analitos se realizó con el programa Clarity Chromatography Station y sus concentraciones se calcularon mediante el uso del método del estándar interno.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete *compare groups* 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 evaluó la normalidad mediante el test Shapiro Wilk. Se rechazó la hipótesis nula para valores de p menores que 0,05.

3.3.1. Modelado dosis-respuesta

Se evaluaron las potenciales relaciones dosis-respuesta utilizando el paquete *Proast 70.3* en la versión 4.2.1 del software 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).

Con la técnica de BMD se determina la dosis de *Benchmark* para una respuesta de referencia (BMR). En nuestro caso, calculamos la dosis de *Benchmark* (BMD) para una BMR del 5% respecto a las concentraciones de los controles, y sus límites de confianza (BMDL y BMDU). La BMR del 5% suele estar cerca del nivel sin efectos adversos observables (NOAEL) (Alarcón et al., 2021).

4. RESULTADOS

4.1. ESTABILIDAD QUÍMICA

4.1.1. FOTOISOMERIZACIÓN

La exposición a luz amarilla / roja conforme a las condiciones experimentales evitó la fotoisomerización y / o fotodegradación de los estándares, mientras que se observó una alta degradación en condiciones de exposición a luz natural.

En el caso de REAC, se aprecia una alteración en el espectro de absorción cuando se expuso a la luz natural en comparación con el control (luz amarilla/roja). (Figura 12)

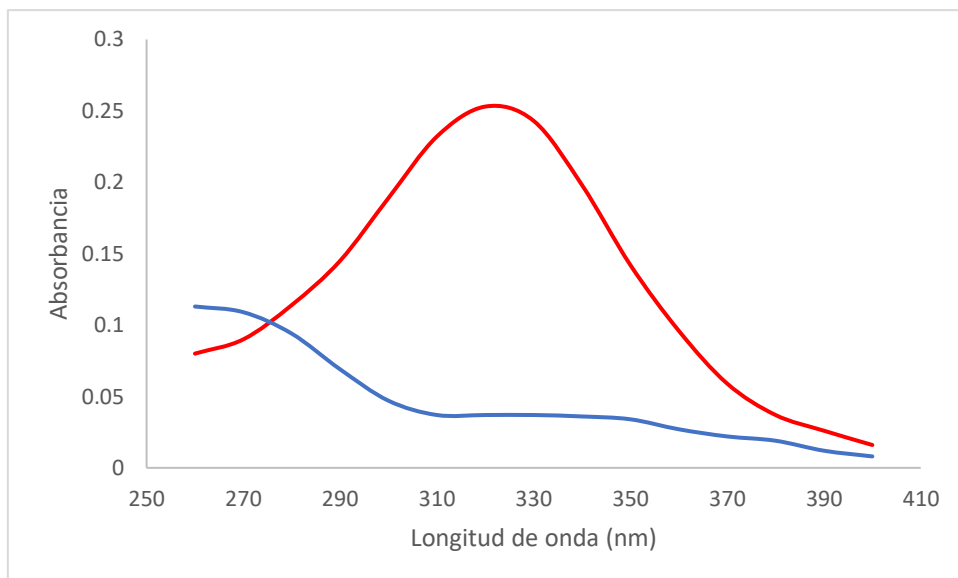


Figura 12. Espectro de absorción del estándar interno REAC. Línea roja se corresponde con el compuesto medido en luz amarilla/roja y la línea azul se corresponde al compuesto medido en luz blanca natural.

A su vez, para el REPA, también se vio una disminución de los valores de absorbancia del compuesto expuesto a la luz blanca natural, comparando con el control (luz amarilla/roja) (Figura 13).

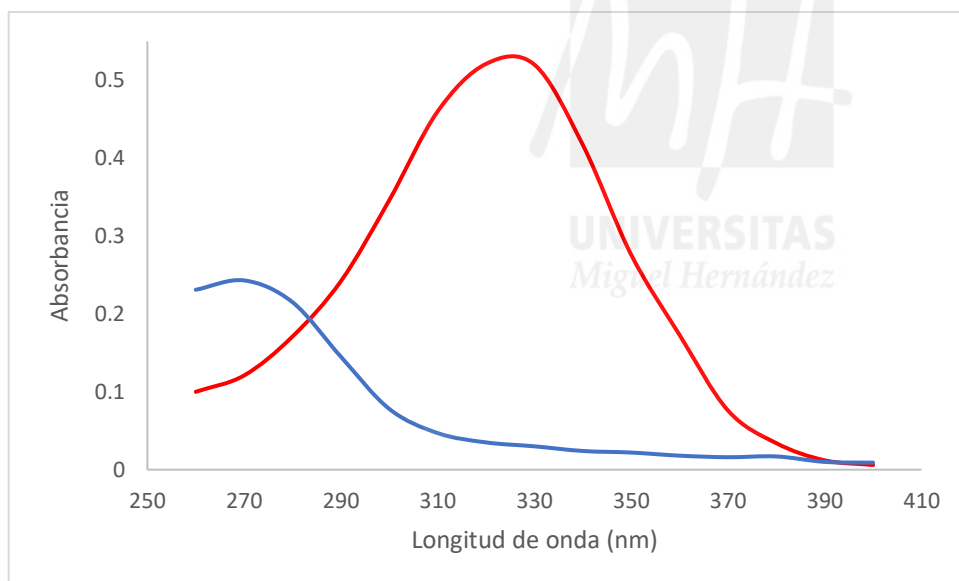


Figura 13. Espectro de absorción del estándar interno REPA. Línea roja se corresponde con el compuesto medido en luz amarilla/roja y la línea azul se corresponde al compuesto medido en luz blanca natural.

Además, también se midieron en el cromatógrafo, para ver si sufrieron cambios los compuestos en sus picos por las distintas exposiciones de luz (luz blanca natural y luz amarilla/roja)

Para el REAC, en el caso de la exposición a luz blanca solar, se aprecia una ausencia del pico correspondiente al REAC (azul), en comparación al control (luz amarilla/roja) (Figura 14).

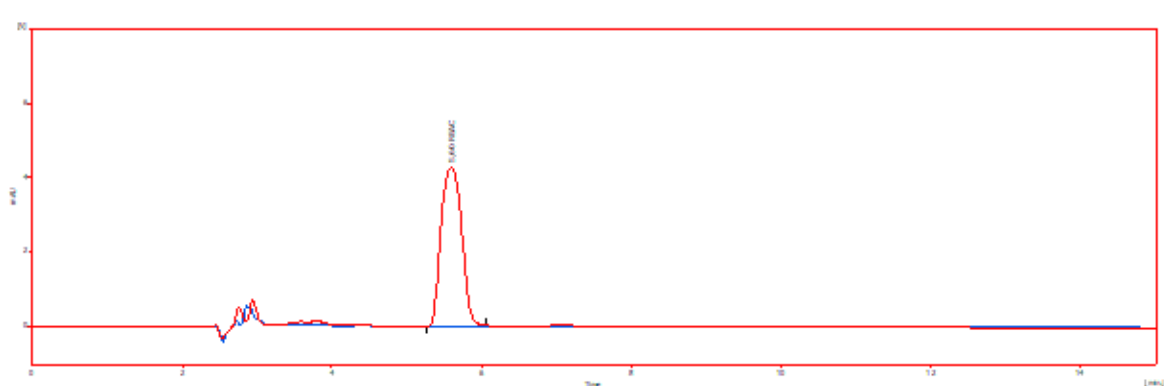


Figura 14. Cromatograma de acetato de retinilo (REAC) en color rojo con exposición de luz amarilla y roja y en color azul tras 1 hora de exposición a la luz natural

Para el REPA, se aprecia también como en el REAC, una ausencia de pico correspondiente al REPA (azul), en comparación con el control (luz amarilla/roja) (Figura 15).

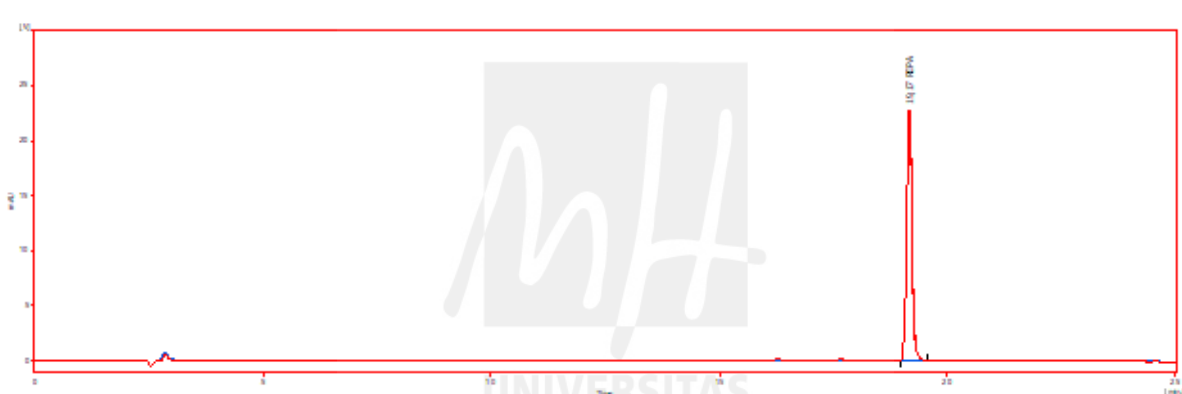


Figura 15. Editar como en la figura 9 Cromatograma REPA, en rojo con exposición a la luz amarilla y roja y en color azul tras 1 hora de exposición a luz natural

4.1.2. ALMACENAMIENTO

El almacenamiento de los estándares a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 8 meses supuso una degradación progresiva, lo que apoya la preparación de estándares frescos cuando se necesitan.

Se aprecia que el estándar REPA que ha estado durante 8 meses guardado, presenta picos nuevos debido a la degradación con el paso del tiempo, comparado con el estándar nuevo. (Figura 16).

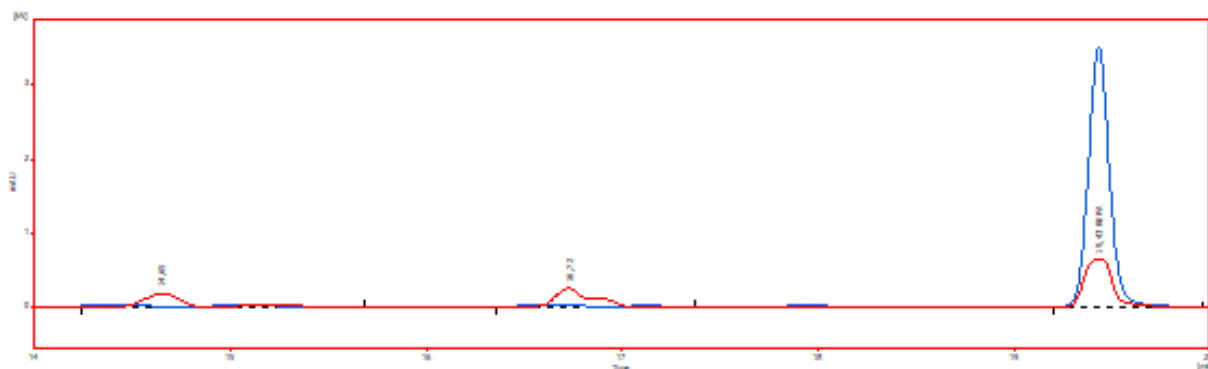


Figura 16. Cromatograma del éster de retinilo REPA. Línea roja se corresponde con el estándar analizado en julio de 2022 y la línea azul se corresponde con la muestra analizada en marzo de 2023.

4.2. NIVELES DE ÉSTERES DE RETINILO EN RATONES MACHO TRATADOS CON TCDD DURANTE LA GESTACIÓN Y LACTANCIA

A PND365, encontramos diferencias significativas en la concentración hepática del estearato de retinilo (CREEST), según ANOVA de un factor (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles hepáticos de ésteres de retinilo a PND365 en ratones macho F1 tratados con TCDD durante la gestación y lactancia

Dosis (pg/kg bw)	n	CREEST	CREOLE	CREPA	CREMILI	CtRE
0	15	143 ± 36.2	72.2 ± 12.1	2074 ± 633	61.7 ± 8.90	2351 ± 680
10	10	137 ± 45.4	71.9 ± 15.6	1780 ± 576	61.3 ± 12	2051 ± 643
30	10	122 ± 21.8	68.5 ± 7.77	1783 ± 357	58.1 ± 5.95	2032 ± 386
100	10	139 ± 50.5	71.2 ± 16.7	1914 ± 673	62.9 ± 13	2188 ± 745
300	6	125 ± 35.4	68 ± 15.2	1667 ± 503	58.4 ± 9.55	1919 ± 549
1000	9	168 ± 45.2	77.9 ± 11.5	2196 ± 562	64.7 ± 6.87	2506 ± 611
3000	9	197 ± 57.4	85.7 ± 15.1	2306 ± 718	71.7 ± 10.1	2661 ± 781
10000	10	188 ± 67.1	87.7 ± 25.8	2501 ± 1236	69.8 ± 17.9	2828 ± 1314
p.overall		0.008	0.068	0.217	0.154	0.184

Los datos se expresan como media ± SD.

CREEST (estearato de retinilo)

CREOLE (oleato de retinilo)

CREPA (palmitato de retinilo)

CREMILI (mistearato y linoleato de retinilo)

CtRE (concentración total de ésteres de retinilo)

*A todos los valores se les realizó transformación logarítmica, obteniendo valores con una distribución estadística normal conforme al test de Shapiro Wilk.

Se encontraron relaciones dosis-respuesta significativas en todos los ésteres analizados según el modelado de Benchmark (Tabla 6). El tratamiento con TCDD se asoció a un aumento de los niveles hepáticos de los ésteres de retinilo.

La concentración hepática del estearato de retinilo aumentó con un BMD de 66,7 pg/kg pc y una eficacia máxima del 30%, todo ello a PND 365 (figura 17; tabla 2).

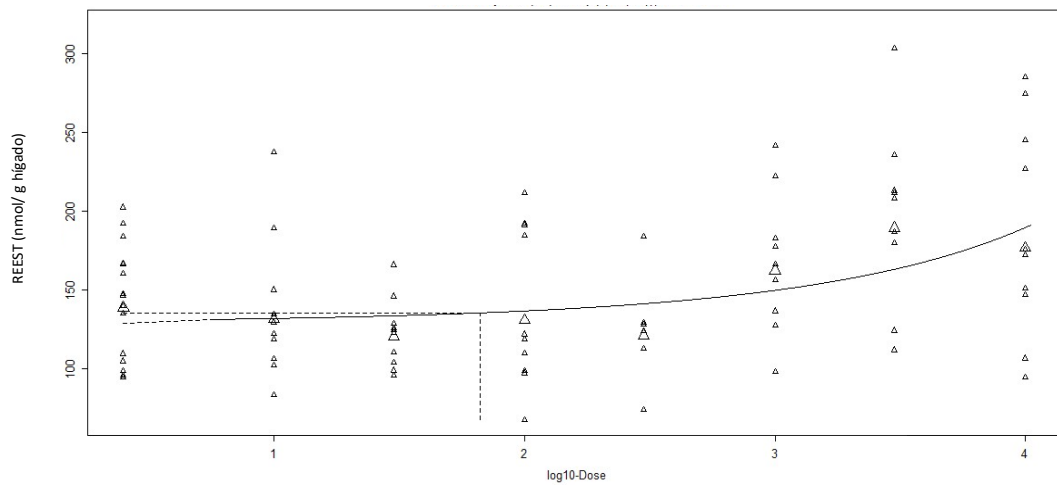


Figura 17. Modelado de la relación dosis-respuesta de los niveles hepáticos de estearato de retinilo de ratones macho sacrificados el día post natal 365, y cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación

La concentración hepática del oleato de retinilo aumentó con un BMD de 328,2 pg/kg pc y una eficacia máxima del 25%, todo ello a PND 365. (Figura 18; tabla 2)

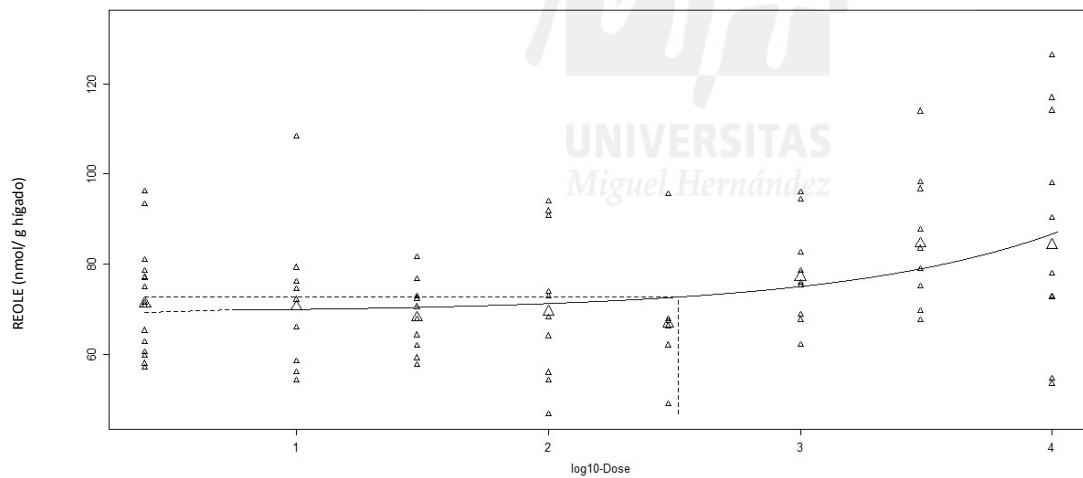


Figura 18. Modelado de la relación dosis-respuesta de los niveles hepáticos de oleato de retinilo de ratones macho sacrificados el día post natal 365, y cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación

La concentración hepática del palmitato de retinilo aumentó con un BMD de 428,2 pg/kg pc y una eficacia máxima del 30%, todo ello a PND 365. (Figura 19; tabla 2)

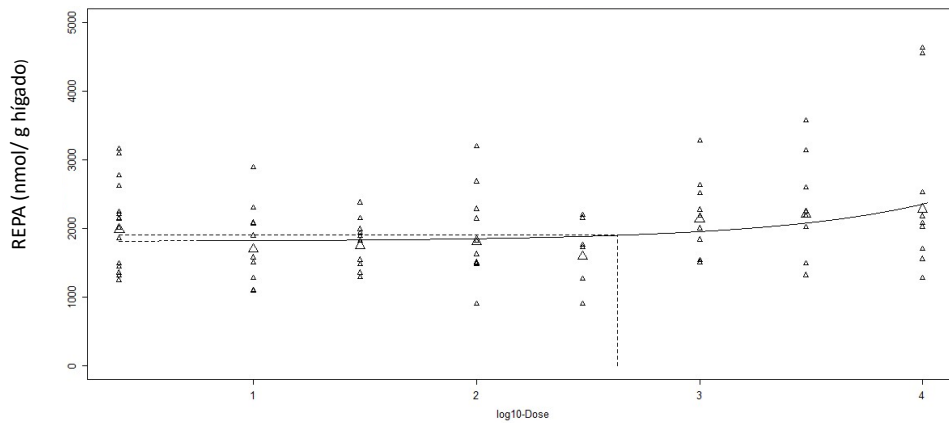


Figura 19. Modelado de la relación dosis-respuesta de los niveles hepáticos de palmitato de retinilo de ratones macho sacrificados el día post natal 365, y cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación

La concentración hepática del mistearato y linoleato de retinilo aumentó con un BMD de 490,5 pg/kg pc y una eficacia máxima del 17%, todo ello a PND 365. (Figura 20; tabla 2).

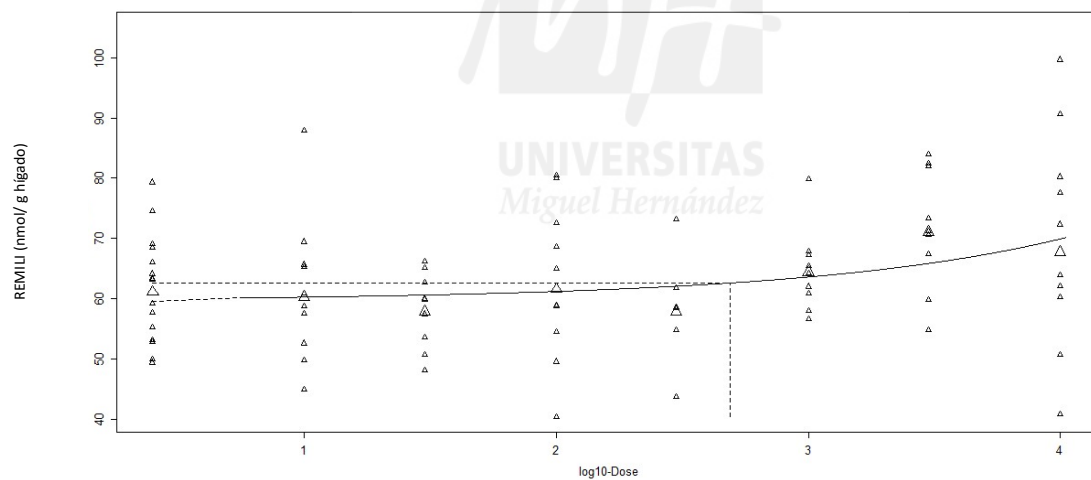


Figura 20. Modelado de la relación dosis-respuesta de los niveles hepáticos de mistearato y linoleato de retinilo de ratones macho sacrificados el día post natal 365, y cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación

En machos a PND 365, la concentración total de ésteres de retinilo aumentó con una BMD de 376,9 mg/kg pc (tabla 6) y una eficacia máxima de 30,119% (tabla 6), según BMD. (Figura 21; tabla 2)

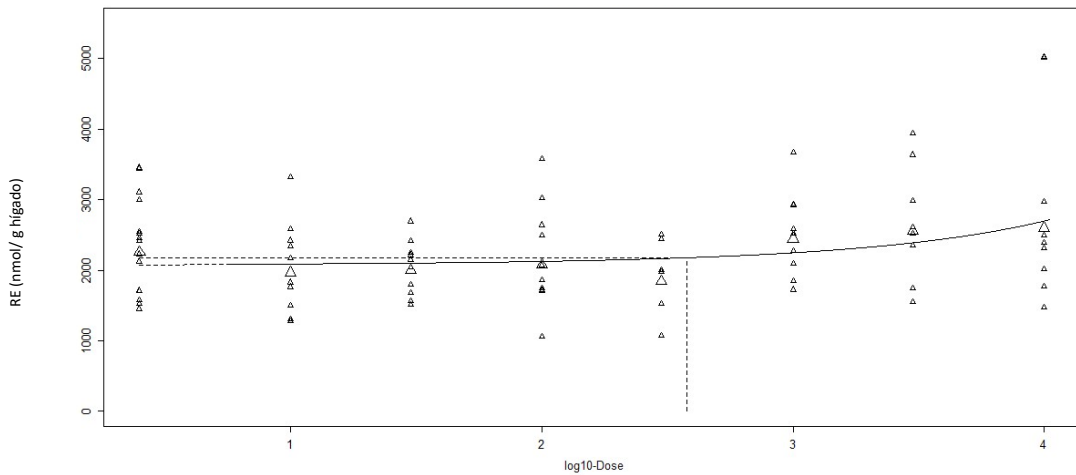


Figura 21. Modelado de la relación dosis-respuesta de los niveles hepáticos de los ésteres de retinilo totales de ratones macho sacrificados el día post natal 365, y cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación

Tabla 2. Resultados del análisis mediante BMD de las concentraciones de ésteres de retinilo de ratones macho F1 a día postnatal 365, cuyas madres fueron tratadas con TCDD durante la gestación y lactancia

Modelado de las relaciones dosis-respuesta de Benchmark						
Sexo	Éster de retinilo	BMD (mg/kg pc)	BMDU (mg/kg pc)	BMDL (mg/kg pc)	Ratio (BMDU/BMDL)	Emáx
Macho	CREEST	66,7	1120	0,396	2828	47 %
	CREOLE	328,2	3200	2,87	1115	25 %
	CREPA	428,2	7340	1,53	4797	30 %
	CMILI	490,5	6120	4,96	1234	17 %
	CtRE	376,9	5670	1,53	3706	30 %

Los datos se expresan como media (SD).

CREEST (estearato de retinilo)

CREOLE (oleato de retinilo)

CREPA (palmitato de retinilo)

CREMILI (mistearato y linoleato de retinilo)

CtRE (concentración total de ésteres de retinilo)

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

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

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

5. DISCUSIÓN

En este estudio se determinaron los niveles hepáticos de ésteres de retinilo hepáticos, (estearato, oleato, palmitato de retinilo y mistearato y linoleato), en 79 ratones macho tras exposición de TCDD durante la gestación y lactancia con una dieta rica en grasa del PND 308 al PND 365.

El hígado es el principal órgano del organismo donde se almacenan la mayor cantidad de retinoides en forma de ésteres de retinilo, que son los precursores de las formas activas de la vitamina (ácido retinoico). Por ello, las concentraciones de ésteres de retinilo hepáticos son muy importantes a la hora de estudiar el estado de la vitamina A, como se describe en Tanumihardjo et al., (2016).

En este estudio, los ratones no mostraron un estatus de vitamina A deficiente [Deficiente ($< 0,1 \mu\text{mol} / \text{g}$ de tejido) (Tanumihardjo et al., 2016) (Tabla 3).

Tabla 3. Estado de la Vitamina A *

	Estatus de la vitamina A				
	Deficiente	Marginal	Adecuado	Subtóxico	Tóxico
Vitamina A en hígado ($\mu\text{mol/g}$)	<0.07	0.07-0.1	0.1-1.0	>1.0	10 $\mu\text{mol/g}$

*Adaptado de Tanumihardjo et al., (2016)

Por lo que, se excluye que la exposición a niveles medioambientales de TCDD y una dieta rica en grasa durante 57 días deterioren el estatus de la vitamina A en los organismos de prueba.

Además, una mezcla experimental de 27 contaminantes que incluía PCB, pesticidas organoclorados y metilmercurio causó una reducción de las reservas hepáticas de retinoides en las crías de rata (Elabbas et al., 2014).

La relevancia de dichas reducciones es que los ésteres RE son precursores de los AR funcionales (De Lera et al., 2016) están indirectamente implicado en la regulación energética (Evans & Mangelsdorf, 2014).

Es importante considerar que dichos estudios administraron dosis superiores de POPs que en el presente estudio en el que se utilizaron dosis más bajas similares a las relevantes medioambientalmente.

Teniendo en cuenta esas diferencias en los niveles de exposición a POPs, los incrementos de los niveles hepáticos de RE no corresponden con las reducciones esperadas por la exposición a TCDD. En cualquier caso, tal efecto, carece de consideración de adverso puesto que los niveles estuvieron por debajo de los que se asocian a la toxicidad por exceso de vitamina A ($\sim 10 \mu\text{mol vit A / g}$). (Tabla 3)

Sin embargo, no se puede descartar que a PND cercanos a la finalización de la exposición se hubieran encontrado reducciones de los niveles hepáticos de RE.

Por lo tanto, el leve aumento de los ésteres de retinilo al PND 365 pudo deberse como respuesta adaptativa a la exposición a TCDD (Esteban et al., 2019). Es decir, tras el destete (PND 21) y la consecuente reducción de la carga corporal de TCDD, la dieta pudo contribuir a la recuperación de los niveles de vitamina A hepática y que los animales tratados con TCDD almacenaran más retinoides hepáticos que los controles (Esteban et al., 2014).

Por otro lado, en el estudio Pohjanvirta et al., (2021) se explica que una dieta rica en grasa se relacionaba de manera positiva con la afinidad del receptor AhR por la TCDD. Se vio que si se bloqueaba o inhibía la AhR por otros medios como farmacológicos o genéticos, la dieta alta en grasa inducía obesidad, hígado graso, entre otros, además en aquellos ratones tratados, con una exposición crónica de dosis baja de TCDD aumentaba la probabilidad de padecer obesidad. Se concluyó que el bloqueo de AhR promueve el gasto de energía y protege contra la obesidad inducida por la dieta en ratones.

En el presente estudio se cambió la dieta en los PND308-365 por una alta en grasa, observándose que TCDD durante la gestación y lactancia alteró el almacenamiento de energía en los machos aunque fue un efecto muy sutil (van Esterik et al., 2015).

Tabla 4. Exposición a dioxinas en diferentes estudios in vivo

Referencia	Diseño experimental	Dosificación	Especie usada en el estudio	Efectos sobre el sistema retinoide
Esteban, 2021	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	Dosis total de TCDD de 200 µg/kg de peso corporal	Ratones silvestres y AHRKO con unabase genética de C57BL/6	Disminución de REPA hepático en <i>ratones silvestres</i>
Alarcón, 2021	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	Dosis diaria de 0, 10, 30, 100, 300 o 1000 mg/kg de peso corporal	Ratas hembra y macho Sprague-Dawley	Disminución de REPA hepático en PND 84
Esteban, 2019	Administración de BPA desde el GD9 hasta el GD16, siendo la dosis más baja entre la ingesta diaria tolerable de BPA y la dosis de referencia de 50 µg/kg día	Dosis diaria de 10 o 100 µg/kg	Ratones F0-1 preñados de Charles River	REPA no difirió en comparación el resto de grupos
Esteban, 2014	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)	Dosis diaria en la dieta 15 mg de A1254/kg de peso corporal en tota	Ratas hembra Sprague-Dawley embarazadas	Disminución de REPA hepático a PND 350

Estos hallazgos proporcionan información sobre los efectos de exposiciones a largo plazo (TCDD y dieta rica en grasa) que presentan el potencial para extrapolarse a seres humanos, aunque existen ciertas limitaciones que hacen necesarias investigaciones futuras en este campo .

En general, es esencial una investigación más exhaustiva y completa en este campo para comprender plenamente los efectos de la TCDD sobre el sistema retinoide y su relevancia para la salud humana. Además, sería conveniente determinar las formas activas, como el ácido retinoico, para conocer mejor la regulación de la vitamina A en el organismo y sus potenciales implicaciones en la salud humana.

Aunque los estudios en animales de experimentación proporcionan información relevante sobre los posibles efectos en la salud humana, la extrapolación de los resultados debe evaluarse considerando las diferencias entre especies y los diversos factores epidemiológicos que influyen en la salud humana, tales como la diversidad genética, la dieta, el estilo de vida y la exposición a múltiples sustancias químicas, entre otros. Son necesarios estudios futuros tanto en animales de experimentación como en humanos, así como una evaluación más amplia de la literatura científica para comprender plenamente los posibles efectos de exposiciones conjuntas a POPs y dietas ricas en grasas sobre la salud humana.

6. CONCLUSIÓN

Las conclusiones que se derivan del estudio sobre la exposición a TCDD durante la gestación y la lactancia, así como a una dieta rica en grasas durante 57 días en ratones macho híbridos C57BL/6JxFVB a PND365 (día postnatal 365) son las siguientes:

1. Se determinaron los niveles de los siguientes ésteres de retinilo CREEST, CREOLE, CREPA y CREMILI y se calcularon los niveles totales CtRE en 79 hígados de ratones macho
2. El modelado de las relaciones dosis-respuesta identificó aumentos de los niveles hepáticos de ésteres de retinilo a PND365 en machos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ACSA-UAB, Mayo de 2019, "Mapa de peligros Alimentarios";
https://acsa.gencat.cat/web/.content/_A_Z/D/informacio-relacionada/DioxinasFuranos-ES_MP.pdf
- 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>
- Ashraf, M. A. (2017). Persistent organic pollutants (POPs): a global issue, a global challenge. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(5), 4223–4227. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5225-9>
- Barua, A. B., & Furr, H. C. (1998). Properties of retinoids. Structure, handling, and preparation. In *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology* (Vol. 10, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/BF02760863>
- Carazo, A., Macáková, K., Matoušová, K., Krčmová, L. K., Protti, M., & Mladěnka, P. (2021). Vitamin a update: Forms, sources, kinetics, detection, function, deficiency, therapeutic use and toxicity. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/nu13051703>
- 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. https://www.miteco.gob.es/content/dam/miteco/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/COPs_tcm30-185064.pdf
- De Lera, Á. R., Krezel, W., & Rühl, R. (2016). An endogenous mammalian retinoid X receptor ligand, at last! *ChemMedChem*, *11*(10), 1027–1037. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600105>
- Elabbas, L. E., Esteban, J., Barber, X., Hamscher, G., Nau, H., Bowers, W. J., Nakai, J. S., Herlin, M., Akesson, A., Viluksela, M., Borg, D., & Hakansson, H. (2014). 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>
- 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. (2014). 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. (2021). 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>
- Evans, R. M., & Mangelsdorf, D. J. (2014). Nuclear receptors, RXR, and the big bang. *Cell*, 157(1), 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.012>
- Haffner, D., & Schechter, A. (2014). Persistent Organic Pollutants (POPs): A Primer for Practicing Clinicians. *Current Environmental Health Reports*, 1(2), 123–131. <https://doi.org/10.1007/S40572-014-0009-9/FIGURES/1>
- Hardy, A., Benford, D., Halldorsson, T., John Jeger, M., Helle Knutsen, K., 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), e04658. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2017.4658>
- International Labour Organization, Fichas Internacionales de Seguridad Química (ICSCs) Noviembre 2003; https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=es&p_card_id=1467&p_version=2
- Naciones Unidas para el Medio Ambiente [PNUMA], Convenio de Estocolmo; <https://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx>
- Nilsson, C. B., & Hakansson, H. (2002). The retinoid signaling system - A target in dioxin toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 32(3), 211–232. <https://doi.org/10.1080/20024091064228>
- Nishimura, N., Yonemoto, J., Miyabara, Y., Fujii-Kuriyama, Y., & Tohyama, C. (2005). Altered thyroxin and retinoid metabolic response to 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *Archives of Toxicology*, 79(5), 260–267. <https://doi.org/10.1007/s00204-004-0626-4>
- Novak, J., Benisek, M., & Hilscherova, K. (2008). Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environment International*, 34(6), 898–913. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.12.024>
- Organización Mundial de la Salud [WHO], 2016; <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dioxins-and-their-effects-on-human-health>
- Pohjanvirta, R., Karppinen, I., Galbán-Velázquez, S., Esteban, J., Håkansson, H., Sankari, S., & Lindén, J. (2021). Effects of a high-fat diet and global aryl hydrocarbon receptor deficiency on energy balance and liver retinoid status in male Sprague-Dawley rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 95, 108762. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2021.108762>
- Roos, R., Andersson, P. L., Halldin, K., Hakansson, H., Westerholm, E., Hamers, T., Hamscher, G., Heikkinen, P., Korkalainen, M., Leslie, H. A., Niittynen, M., Sankari, S., Schmitz, H. J., van der Ven, L. T. M., Viluksela, M., & Schrenk, D. (2011). Hepatic effects of a highly purified 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorbiphenyl (PCB 180) in male and female rats. *Toxicology*, 284(1–3), 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.013>
- 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)

- Seguridad Alimentaria elika, actualizado el 19 de mayo de 2023;
<https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/dioxinas-furanos-y-pcbs/>
- Shmarakov, I. O. (2015). Retinoid-xenobiotic interactions: the Ying and the Yang. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 4(4), 243–267. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2015.05.05>
- 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, 13. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114731>
- 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. *The Journal of Nutrition*, 146(9), 1816S-1848S. <https://doi.org/10.3945/JN.115.229708>
- 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. (2015). 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). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.09.017>
- Viluksela, M., Heikkinen, P., van der Ven, L. T. M., Rendel, F., Roos, R., Esteban, J., Korkalainen, M., Lensu, S., Miettinen, H. M., Savolainen, K., Sankari, S., Lilienthal, H., Adamsson, A., Toppari, J., Herlin, M., Finnila, M., Tuukkanen, J., Leslie, H. A., Hamers, T., ... Hakansson, H. (2014). Toxicological Profile of Ultrapure 2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl (PCB 180) in Adult Rats. *Plos One*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104639>
- Wyss, R. (1995). Chromatographic and electrophoretic analysis of biomedically important retinoids. In *Journal of Chromatography B* (Vol. 671).