



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Estudi de l'efecte del consum matern d'emulgents presents en aliments ultra-processats en la salut metabòlica i neuropsicològica de la descendència

Maria Milà Guasch



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Programa de Doctorat en Biomedicina

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona

Estudi de l'efecte del consum matern d'emulgents presents en aliments ultra-processats en la salut metabòlica i neuro- psicològica de la descendència

Memòria presentada per
Maria Milà Guasch
per l'obtenció del títol de Doctorat en Biomedicina
per la Universitat de Barcelona.

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de
Marc Claret Carles i Roberta Haddad Tóvolli
en el Laboratori de Control Neuronal del Metabolisme ubicat en l'Institut
d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Doctorand

Maria Milà Guasch

Director de la tesi

Marc Claret Carles

Co-directora de la tesi

Roberta Haddad Tóvolli

Tutor

**Pablo Miguel García-
Rovés González**

Barcelona, Abril 2024

*Als meus pares Sílvia i Xavier,
al meu germà Pau
i a la meva padrineta.*

RESUM

Resum

L'estil de vida moderna està associat a un major consum d'aliments ultra-processats (UPF) degut a la seva practicitat i palatabilitat. El consum d'emulgents, un dels principals additius dels UPF, s'ha relacionat relacionat amb la inflamació intestinal, disbiosi de la microbiota, adipositat i obesitat. Uns hàbits nutricionals materns desequilibrats durant l'etapa embrionària i perinatal alteren la salut metabòlica de la descendència a llarg termini, augmentant el risc d'obesitat i comorbiditats associades. No obstant, encara es desconeix si el consum matern d'emulgents influeix en la programació fetal de la descendència. En aquest estudi, mostrem que, en ratolins, el consum matern d'emulgents (1% carboximetilcel·lulosa sòdica (CMC) i 1% polisorbat 80 (P80) en aigua), durant el període de gestació i lactància, altera el desenvolupament hipotalàmic dels centres que regulen el balanç energètic de la descendència, condueix a disfuncions metabòliques, dèficits cognitiu i indueix conductes similars al trastorn d'ansietat depenent del sexe. Aquests resultats donen suport a la idea de que un consum matern d'emulgents, additiu comú en els UPFs, causa una mala programació, tot i que lleu, en la salut metabòlica i neuro-psicològica de la descendència. L'estudi vol ser un reclam a tenir consciència nutricional durant el període de gestació i lactància.

Abstract

Modern lifestyle is associated with a major consumption of ultra-processed foods (UPF) due to their practicality and palatability. The ingestion of emulsifiers, a main additive in UPFs, has been related to gut inflammation, microbiota dysbiosis, adiposity and obesity. Maternal unbalanced nutritional habits during embryonic and perinatal stages perturb offspring's long-term metabolic health, thus increasing obesity and associated comorbidity risk. However, whether maternal emulsifier consumption influences developmental programming in the offspring remains unknown. Here, we show that, in mice, maternal consumption of dietary emulsifiers (1% carboxymethyl cellulose (CMC) and 1% polysorbate 80 (P80) in drinking water), during gestation and lactation, perturbs the development of hypothalamic energy balance regulation centers of the progeny, leads to metabolic impairments, cognition deficits, and induces anxiety-like traits in a sex-specific manner. Our findings support the notion that maternal consumption of emulsifiers, common additives of UPFs, causes mild metabolic and neuropsychological malprogramming in the progeny. Our data call for nutritional advice during gestation and lactation.

ABREVIATURES

Abreviatures

Abreviacions	Definició
AgRP	Proteïna relacionada amb l'agouti
Arc	Nucli arcuat
α-MSH	Hormona estimulant dels melanòcits
BHE	Barrera hematoencefàlica
CART	Pèptid de la transcripció regulada per cocaïna i amfetamina
CMC	Carboximetilcel·lulosa sòdica
DLB	Prova de la caixa foscor/llum
DMH	Nuclis hipotalàmics dorsomedial
E	Dia embrionari
EDC	Disruptors endocrins
EFSA	Autoritat Europea de Seguretat Alimentària
EPM	Prova del laberint elevat en forma de creu
FASN	Àcid gras sintasa
FAO	Organització per a l'Agricultura i l'Alimentació
GTT	Prova de tolerància a la glucosa
GW	Setmana de gestació (humans)
HFD	Dieta alta en greixos
IMC	Índex de Massa Corporal
IPC	Cèl·lules progenitores intermediàries
ITT	Prova de tolerància a la insulina
LH	Àrea lateral de l'hipotàlem
LPS	Lipopolisacàrids
LPL	Lipoproteïna lipasa
MC3R	Receptors de la melanocortina 3
MC4R	Receptors de la melanocortina 4
MNT	Malalties no transmissibles
NORT	Prova de reconeixement d'un objecte nou
NPY	Neuropèptid Y
NTS	Nucli del tracte solitari

OF	Prova de camp obert
OMS	Organització Mundial de la Salut
P	Dia post-natal
P80	Polisorbat 80
PAG	Fenilacetilglicina
Pcsk1	Proproteïna convertasa 1
POA	Àrea pre-òptica
Pomc	Pro-opiomelanocortina
PVN	Nucli hipotalàmic paraventricular
RGC	Cèl·lules glials radials
RNA-seq	Seqüenciació d'ARN
SHH	Sònic hedgehog
TDAH	Trastorn per dèficit d'atenció i hiperactivitat
UE	Unió Europea
UPF	Aliments ultra-processats
VMH	Nucli hipotalàmic ventromedial
WT	Animal <i>Wild Type</i>

TAULA DE CONTINGUTS

Taula de continguts

INTRODUCCIÓ	13
1 Obesitat	14
1.1 Obesitat en l'embaràs	15
2 Aliments ultra-processats	16
2.1 Classificació	17
2.2 Consum d'aliments ultra-processats: incidència en la població	18
2.3 Els aliments ultra-processats i la salut	19
3 Additius	20
3.1 Els additius i la salut	21
4 Emulgents	21
4.1 Carboximetilcel·lulosa sòdica i Polisorbat 80	22
4.2 Exposició materna als emulgents	26
5 Programació materna	27
5.1 Hipotàlem	28
5.2 Sistema de la melanocortina	32
5.3 Paper de les hormones metabòliques en el desenvolupament dels circuits neuronals hipotalàmics.	35
5.4 Condicions fisiopatològiques que alteren el desenvolupament del sistema de la melanocortina.	37
HIPÒTESI I OBJECTIUS	39
MATERIALS I MÈTODES	41
1 Animals	42
1.1 Declaració ètica	42
1.2 Cura dels animals, soca de ratolí i dieta	42
1.3 Condicions de reproducció, descendència i tractament amb emulgents	42
2 Expressió gènica	44
2.1 Extracció i quantificació de l'àcid ribonucleic (ARN)	44
2.2 Síntesis de l'àcid desoxiribonucleic (ADN) complementari	45
2.3 Reacció en cadena de la polimerasa en temps real (Q-PCR)	46
3 Seqüenciació d'ARN	46
3.1 Preparació i seqüenciació de l'ARN	46
3.2 Anàlisi de la seqüenciació de l'ARN	47
4 Immunofluorescència	47

4.1 Processament del teixit.....	47
4.2 Immunofluorescència.....	48
4.3 Anàlisi quantitatiu de fibres neuronals.....	49
4.4 Quantificació de neurones POMC.....	49
5 Estudi temporal de la concentració de leptina durant el desenvolupament post-natal.....	49
6 Paràmetres fisiològics i metabòlics.....	50
6.1 Pes i greix corporal.....	50
6.2 Longitud corporal.....	50
6.3 Mesura de la ingesta de menjar i aigua.....	50
6.4 Concentració de glucosa en sang.....	50
6.5 Concentració d'insulina i leptina en plasma.....	51
6.6 Prova de tolerància a la glucosa.....	51
6.7 Prova de sensibilitat a la insulina.....	51
6.8 Prova de sensibilitat a la leptina.....	52
7 Estudis de comportament.....	52
7.1 Camp obert.....	53
7.2 Caixa foscor/llum.....	53
7.3 Laberint elevat en forma de creu.....	54
7.4 Reconeixement d'un objecte nou.....	55
8 Anàlisi estadístic.....	56
RESULTATS.....	57
1 Estudi de l'efecte del consum d'emulgentes en femelles embarassades.....	58
2 Estudi de l'efecte del consum matern d'emulgentes en l'estat metabòlic de la descendència en el deslletament.....	61
3 Estudi de l'efecte del consum matern d'emulgentes sobre els circuits de la melanocortina en la descendència al deslletament.....	65
4 Estudi de l'efecte del consum matern d'emulgentes en l'estat metabòlic de la descendència a llarg termini.....	71
5 Estudi de l'efecte d'una combinació d'emulgentes i una dieta tipus "Western" en l'estat metabòlic de la descendència.....	76
6 Estudi de la salut neuro-psicològica de la descendència.....	78
DISCUSSIÓ.....	85

1	Circuits neuronals i metabolisme	87
2	Microbiota intestinal i metabolisme	88
3	Efectes neuro-psiquiàtrics i cognitius	88
4	Dimorfisme sexual.....	89
5	Programació materna.....	89
6	Reproductibilitat	90
7	Conscienciació social	90
8	Investigacions futures	91
	CONCLUSIONS.....	92
	BIBLIOGRAFIA.....	94
	Annex 1	108
	Annex 2	111
	Annex 3 Article publicat de la tesi	116
	Annex 4 Comentari publicat sobre l'article de la tesi	139

INTRODUCCIÓ

Introducció

1 Obesitat

L'Organització Mundial de la Salut (OMS) defineix l'obesitat com una malaltia crònica i progressiva on intervenen múltiples factors biològics, ambientals i socials causant una acumulació anormal o excessiva de greix que pot ser perjudicial per la salut. La principal causa d'aquesta patologia és un desequilibri en el balanç energètic entre el consum de calories i les calories cremades (Blüher, 2019; Bodden et al., 2021). En adults, per tal de determinar el sobrepès i l'obesitat s'utilitza l'Índex de Massa Corporal (IMC) on es divideix el pes corporal pel quadrat de l'estatura (kg/m^2). Les persones amb un IMC igual o superior a $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ presenten sobrepès i les que presenten un IMC igual o superior a $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ es considera que presenten obesitat.

La prevalença a l'obesitat s'ha triplicat a nivell mundial al llarg dels últims 50 anys fins assolir nivells pandèmics (Blüher, 2019; WHO, 2021) (Fig 1). Segons l'OMS, al 2016 el 39% de la població adulta tenia sobrepès, i el 13% patia obesitat. En la població infantil aquest augment és especialment alarmant, on més de 340 milions d'infants i adolescents d'entre 5 i 19 anys presentaven sobrepès (18%) i dels quals 124 milions patien obesitat (entre un 6 i un 8% segons sexe) (WHO, 2021).

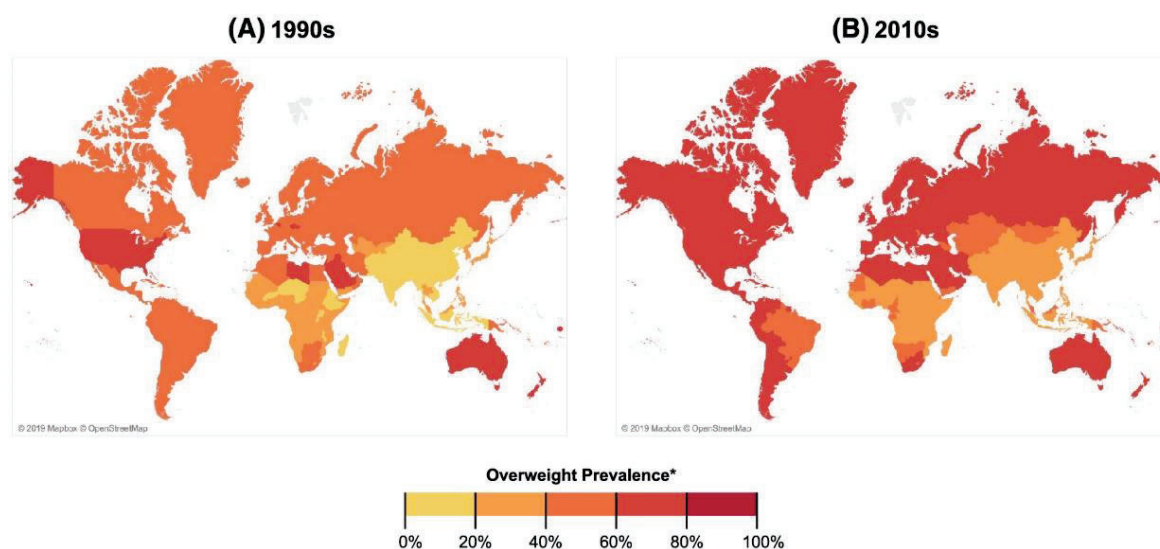


Figura 1. Prevalença global d'individus amb sobrepès/obesitat als anys 1990 i 2010. (Dades d'estimacions d'UNICEF, OMS, Banc Mundial i NCD-RisC). Imatge de (Popkin & Ng, 2022).

L'obesitat augmenta substancialment el risc de patir malalties no transmissibles (MNT), que avui en dia representen més del 70% de les morts a escala mundial. Els principals tipus de MNT són les malalties metabòliques (diabetis tipus II i fetge gras), malalties cardiovasculars (hipertensió, infart de miocardi i ictus), trastorns musculoesquelètics (osteoartritis), Alzheimer, depressió o alguns tipus de càncer (pròstata, ovari, mama, fetge, ronyó i còlon) (Blüher, 2019; Laster et al., 2019; WHO, 2021). Aquest augment tant dràstic en la prevalença de l'obesitat, i altres comorbiditats associades a nivell mundial, coincideix amb un canvi en l'estil de vida moderna, associat a un major consum d'aliments rics en greixos saturats i sucres i combinat amb uns hàbits més sedentaris. També hi ha altres factors que hi juguen un paper important com ara l'estrès, els hàbits maternals i l'augment del consum d'aliments ultra-processats (Keith et al., 2006; Laster et al., 2019).

També s'ha reportat que l'obesitat infantil està associada a un major risc de patir una mort prematura o de desenvolupar problemes respiratoris (asma, apnea), desordres metabòlics (hipertensió, diabetis tipus 2), factors de risc de malalties cardiovasculars i efectes psicològics (cognitiu, d'ansietat, de depressió) (Horesh et al., 2021; Rankin et al., 2016).

Segons la OMS, les mesures més fàcils i accessibles per tal de combatre i prevenir l'obesitat a nivell individual és promoure una alimentació saludable, evitant aliments rics en greixos i sucres, augmentant el consum de verdures, fruites, llegums i cereals integrals i mantenint una activitat física regular (WHO, 2021). Però per mantenir un estil de vida sana, també cal que els governs implementin polítiques socials que afavoreixin i permetin a la població més desfavorida tenir-hi accés. Aquests canvis de política també haurien d'anar dirigits cap a la indústria alimentària, promovent el consum d'aliments saludables i nutritius i assegurant que aquests siguin assequibles per a qualsevol consumidor. A més, aquestes polítiques també haurien d'estar dirigides a reduir el contingut de greixos, sucres i sals dels aliments processats i limitant la comercialització d'aquests tipus d'aliments destinats a infants i adolescents (Blüher, 2019; WHO, 2021).

1.1 Obesitat en l'embaràs

L'augment de la prevalença d'obesitat també s'ha observat en dones en edat reproductiva durant les últimes dues dècades en els Estats Units, on hi ha hagut un increment del 33% relatiu d'obesitat entre les dones de 20 a 39 anys (Creanga et al., 2022; Haddad-Tóvolli & Claret, 2023; NHANES, 2021). També s'ha reportat que de les dones que van donar a llum l'any 2020, només 2 de cada 5 iniciaven l'embaràs amb un

IMC normal, mentre que un 26.7% presentava sobrepès i un 29.5% obesi­tat (CDC WONDER, 2016; Creanga et al., 2022).

L'obesitat durant l'embaràs causa inflamació i canvis metabòlics en la mare, associats a un augment dels nivells de resistència a la insulina comparats amb els d'embarassades que no pateixen obesitat, alterant el metabolisme de la glucosa, dels lípids i de les proteïnes (Creanga et al., 2022; Haddad-Tóvolli & Claret, 2023). També augmenta la probabilitat del risc de patir diabetis gestacional (Chu et al., 2007), avortaments prematurs (Vats et al., 2021), hipertensió (O'Brien et al., 2003) o trastorns de depressió i ansietat (Molyneaux et al., 2014). Però a part d'afectar la salut de la mare, l'obesitat materna també pot tenir conseqüències negatives durant l'etapa fetal, neonatal i infantil de la descendència (Creanga et al., 2022; Haddad-Tóvolli & Claret, 2023; Moholdt & Hawley, 2020).

2 Aliments ultra-processats

En les últimes dècades, amb els avenços de la tecnologia, la indústria alimentaria ha experimentat una profunda transformació en el processament dels aliments, on a part d'alterar un aliment amb tècniques com l'assecat, congelació o afegint sals, sucres, greixos o additius per millorar el gust o la conservació, han aparegut els aliments ultra processats (UPF) que són formulacions totalment industrials que normalment contenen poc o res de l'aliment intacte, presenten mala qualitat nutricional i generalment són rics en greixos, sals i sucres, a més de tenir poca fibra dietètica, proteïnes, micronutrients i compostos bioactius (Monteiro et al., 2018). Alguns exemples d'UPF són les galetes, brioxeria, begudes carbonatades, begudes làcties, productes d'aperitiu, carns processades, cereals, fórmules infantils per a lactants, begudes alcohòliques destil·lades, entre d'altres (Fig 2).

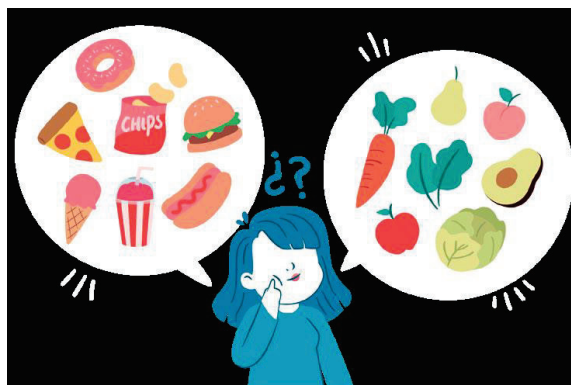


Figura 2. Aliments ultra processats vs aliments no processats.

L'aparició dels UPF ha afectat el tipus d'alimentació de la societat, on el consum d'aquests aliments ha augmentat dràsticament en la majoria de països del món (Pagliai et al., 2021) degut a la seva practicitat, palatabilitat, conveniència econòmica i les campanyes agressives de màrqueting que habitualment els acompanyen, afavorit que els UPF desplacin els aliments no processats o mínimament processats (coneguts com a "menjar real") en molts països del món (Monteiro et al., 2019).

Els aliments UPF, a part de la mala qualitat nutricional, també presenten quantitats substancials d'additius (colorants, aromatitzants, edulcorants, emulgents entre d'altres) per tal de que el producte final sigui més atractiu i apetitós (Monteiro et al., 2019). Aquesta gran presència dels additius en molts dels aliments en fa difícil evitar-ne el seu consum i on s'ha demostrat que alguns d'aquests compostos tenen efectes negatius per a la salut (Carocho et al., 2014; Gultekin et al., 2019).

2.1 Classificació

Existeixen diferents sistemes de classificació dels aliments segons el seu grau de processament, però el més utilitzat a nivell mundial és la classificació NOVA, proposada per Carlos Monteiro i el seu grup d'investigació (Monteiro et al., 2018). Aquesta classificació agrupa els aliments en quatre grups segons el grau de processament industrial sotmès, considerant tots els mètodes físics, biològics i químics utilitzats durant el procés de fabricació del producte (Monteiro et al., 2018). Segons diferents estudis, actualment és la classificació més coherent, clara i viable (Moubarac et al., 2014).

- **Grup 1. Aliments no processats o mínimament processats (MPF).** Consta d'aliments d'origen vegetal o animal alterats per tècniques senzilles que no afegeixen cap nova substància. Alguns exemples d'aliments són les verdures, fruites, arròs, llavors, carn i peix fresc, llet, ous, etc.
- **Grup 2. Ingredients culinaris processats (PCI).** Consta de productes alimentaris extrets i purificats per la indústria a partir de components del grup 1 o obtinguts de la naturalesa. Alguns exemples d'aliments són els olis vegetals, greixos animals, sucres i sal.
- **Grup 3. Aliments processats (PF).** Consta d'aliments fabricats mitjançant l'addició de substàncies del grup 2 (com l'oli, sucre o sal) al grup 1 perquè siguin més gustosos i es conservin millor. Alguns exemples d'aliments són vegetals, fruites i peixos en conserva, fruits secs salats, formatges, iogurt, etc.

- **Grup 4. Aliments ultra-processats (UPF).** Consta de formulacions completament industrials que normalment contenen poc o res de l'aliment intacte. Sempre acompanyades d'additius. Alguns exemples d'aliments són els dolços, pans industrials, galetes, cereals ensucrats, suc de fruites, carns processades, plats preparats, etc.

2.2 Consum d'aliments ultra-processats: incidència en la població

El major consum d'UPF s'ha observat en països com Estats Units, Canadà i Anglaterra on ja representen més del 50% de l'energia alimentària total consumida. En països del Mediterrani, com Itàlia, aquest percentatge és molt menor i correspon aproximadament a un 10% (Marino et al., 2021; Rauber et al., 2020). En països de l'Amèrica Llatina com Brasil, Xile o Mèxic el consum d'UPF representa entre una tercera i una cinquena part del total de l'energia alimentària (Monteiro et al., 2019). A Austràlia representa un 40%, en països Asiàtics com Corea, Japó, Malàisia o Indonèsia és d'entre un 19 i 29% i en països del Mig Orient com el Líban el percentatge és del 36.5% (Marino et al., 2021; Almarshad et al., 2022). A Espanya, segons l'estudi ENRICA, el consum d'UPF correspon a un 24.4% del total d'energia alimentària (Blanco-Rojo et al., 2019) i tot i que el consum és menor que en països com Estats Units, Anglaterra, Canadà o França, s'ha començat a observar que la població espanyola també s'està allunyant de la dieta mediterrània per adoptar dietes menys saludables (León-Muñoz et al., 2012), especialment entre nens, joves i adolescents (García-Meseguer et al., 2014). Aquests percentatges podrien seguir augmentant a nivell mundial, atès que la venda d'UPF suposa un augment a l'any del voltant de l'1% en països amb una renda alta, i al voltant d'un 10% en països amb una renda mitjana-baixa (Monteiro et al., 2019).

A part de la distribució per països, el consum d'UPF generalment també disminueix amb l'edat, i per tant la població més desprotegida avui en dia són els infants i adolescents, que són els que presenten el major consum d'UPF en països com Estats Units, Canadà o Anglaterra (Chang et al., 2021; Marino et al., 2021; Wang et al., 2021).

Finalment, també s'ha observat que les persones que segueixen una alimentació vegana o vegetariana presenten un major consum d'UPF comparat amb els que segueixen una dieta pesco-vegetariana o que també consumeixen carn (Marino et al., 2021).

2.3 Els aliments ultra-processats i la salut

Un consum regular i excessiu d'UPF en humans, incrementa el risc de mortalitat i està associat a diferents problemes de salut, augmentat el risc de desenvolupar malalties cròniques com ara el sobrepès i l'obesitat, malalties metabòliques, malalties cardiovasculars, càncer, depressió o malalties gastrointestinals (Elizabeth et al., 2020; Almarshad et al., 2022; Hall et al., 2019; Pagliai et al., 2021).

Un dels possibles efectes nocius d'aquests tipus d'aliments deriva de la seva composició nutricional que, com ja s'ha comentat anteriorment, contenen una baixa quantitat de nutrients, una alta densitat energètica i un elevat contingut en sucres i greixos. Aquest fet conduiria a una desregulació metabòlica afavorint el sobrepès, l'obesitat i la diabetis tipus II, i en conseqüència augmentar el risc de desenvolupar malalties cardiovasculars (Pagliai et al., 2021). També s'ha observat que el consum d'UPF augmenta la ingesta total de calories degut al baix potencial de sacietat que tenen aquests tipus d'aliments i això també es veu reflectit en un augment del pes corporal (Hall et al., 2019).

Més enllà de la composició nutricional, també hi ha altres factors que podrien explicar l'efecte negatiu dels UPF com ara:

- A. Components contaminants:** compostos químics nocius que es formen durant el processament dels aliments, com l'acrilamida o l'acroleïna, que estan associats a un augment del risc de malalties cardiovasculars en humans (DeJarnett et al., 2014; Zhang et al., 2018; Pagliai et al., 2021).
- B. Químics sintètics:** compostos químics que s'utilitzen majoritàriament en el procés d'embalatge dels UPF com ara el bisfenol A (BPA; actualment prohibit en molts països), el bisfenol S (BPS) o el ftalat, on la seva exposició en humans s'ha relacionats amb el càncer, la diabetis, l'obesitat o la resistència a la insulina, entre d'altres (Almarshad et al., 2022; Buckley et al., 2019; Pagliai et al., 2021).
- C. Additius:** El consum d'additius com el glutamat sòdic, la carragenina o l'aspartam, entre d'altres, també han estat associats a alteracions de la microbiota intestinal i en l'increment del risc de desenvolupar malalties metabòliques tant en humans com en models animals (Almarshad et al., 2022; Gultekin et al., 2019).

Atès que l'ús d'additius és una de les principals característiques dels UPF, en els següents apartats es detallen els diferents tipus i conseqüències del seu consum.

3 Additius

Un additiu és “qualsevol substància que s’afegeix intencionadament a un producte alimentari, sense el propòsit de canviar el seu valor nutritiu, però amb la finalitat de modificar les característiques, tècniques d’elaboració, conservació i/o per millorar l’adaptació del producte” tal com es defineix en el (BOE *Real Decreto 3177/1983*, s. f.).

L’ús dels additius en la indústria alimentària, des de la seva primera aparició a principis del 1800, ha anat augmentant dràsticament amb els anys. Actualment hi ha més de 2500 additius permesos per tal de millorar el sabor, la textura, l’aparença, el color, l’estabilitat i la conservació dels UPF (Carocho et al., 2014; Partridge et al., 2019). Això fa que la majoria d’aliments que es troben en un supermercat continguin algun tipus d’additiu en la seva composició i que per tant, sigui molt difícil d’evitar-ne el seu consum. De fet, molts dels aliments que es venen com a “saludables” (baixos en sucre, rics en fibra, productes diatètics equilibrats, vegans, sense gluten o lactosa, ecològics, etc.) són en realitat UPF i contenen un gran nombre d’additius (Fardet & Rock, 2019).

A la Unió Europea (UE) tots els additius alimentaris que han passat els controls de seguretat de la Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) se’ls hi assigna la lletra “E” i un número específic (FSA, 2018; *Regulation EU - 1333/2008*, s. f.). Aquesta nomenclatura permet identificar-los en els productes alimentaris que els contenen, ja que segons la UE l’ús dels additius ha d’estar degudament etiquetat (Carocho et al., 2014; Tahiri et al., 2023). Segons la UE, els additius es classifiquen en 26 categories diferents depenent de la seva funció en l’aliment que el conté (Carocho et al., 2014; Partridge et al., 2019).

Les tres categories més utilitzades per la indústria alimentària són:

- A. Colorants:** utilitzats per alterar o conferir colors als aliments per tal d’augmentar el seu atractiu als consumidors. Un exemple de colorant natural és la curcumina (Carocho et al., 2014; Partridge et al., 2019).
- B. Edulcorants:** són un grup de compostos que confereixen dolçor als aliments i poden ser edulcorants naturals nutricionals (sucrosa, fructosa, estèvia) o edulcorants artificials no nutricionals (sacarina, aspartam, sucralosa) (Carocho et al., 2014; Partridge et al., 2019).

- C. Emulgents: la seva funció és mantenir els aliments en una mescla homogènia. Alguns exemples són la goma aràbiga, la carragenina, els polisorbats o la carboximetilcel·lulosa sòdica (CMC) (Carocho et al., 2014; Partridge et al., 2019).

3.1 Els additius i la salut

Diferents estudis científics han demostrat que alguns tipus d'additius tenen efectes negatius per a la salut (Carocho et al., 2014; Gultekin et al., 2019). Un exemple seria el consum d'aliments que contenen un grup determinat de colorants artificials (E110, E104, E122, E129, E102 i E124) i/o el conservant Benzoat de sodi, ja que s'ha relacionat el seu consum amb un augment del trastorn per dèficit d'atenció i hiperactivitat (TDAH) en infants d'entre 3 i 9 anys (Mephram, 2011).

Un altre exemple són els edulcorants artificials no nutricionals, on el seu consum s'ha relacionat amb alteracions en el metabolisme de la glucosa tant en ratolins com en humans (Pepino, 2015; Romo-Romo et al., 2018; Suez et al., 2014). En el cas específic de la sacarina, s'ha descrit que aquests efectes metabòlics adversos en ratolins es deuen a alteracions de la composició i funció de la microbiota intestinal (Pepino, 2015; Suez et al., 2014). També s'ha demostrat que l'exposició materna a certs edulcorants artificials en ratolins, com l'aspartam o el rebaudiòsid A, afecta a la programació fetal de la descendència, causant alteracions metabòliques i remodelant els circuits de la melanocortina a l'hipotàlem mitjançant el metabòlit fenilacetilglicina (PAG), metabolitzat per la microbiota de l'intestí (Park et al., 2023).

Finalment, també s'ha relacionat el consum d'emulgents en ratolins amb alteracions en la microbiota intestinal afavorint el risc de desenvolupar desordres metabòlics (Chassaing et al., 2015; Singh & Ishikawa, 2016; Viennois et al., 2017) i el desenvolupament d'un comportament similar al trastorn d'ansietat (Holder et al., 2019).

4 Emulgents

La principal funció dels emulgents és actuar com a estabilitzadors per tal de formar o mantenir una mescla homogènia de dos o més fases immiscibles per tal de mantenir l'aspecte i la textura dels aliments. Aquests poden ser de procedència natural o sintètica i habitualment la seva estructura molecular consta d'un cap hidrofílic i una cua lipofílica (Halmos et al., 2019). Concretament, entre els anys 2012 i 2018 segons estudis

publicats, el mercat d'emulgents ha augmentat un 35%, essent un dels additius més àmpliament utilitzats en UPF (Lerner & Matthias, 2015a).

L'Organització per a l'Agricultura i l'Alimentació (FAO), així com l'OMS, permeten afegir emulgents com a additius fins a un 1% (WHO, 2016 Technical Report). Però la presència d'aquests a la majoria d'aliments i la manca d'informació, fins ara, per a poder conèixer amb exactitud la concentració present en els aliments, porta a pensar que la quantitat d'emulgents que s'està ingerint diàriament podria arribar o fins i tot superar el que actualment és acceptat com a límit segur (Halmos et al., 2019; Laster et al., 2019; Shah et al., 2017). En el mercat dels aliments, els emulgents es troben en margarines, salses, pans i brioixeria, gelats, pastissos, suc de fruita, xocolates, llets i productes vegetals, suplementos nutricionals, sopes i fideus instantanis, entre d'altres (Laster et al., 2019).

4.1 Carboximetilcel·lulosa sòdica i Polisorbat 80

Alguns dels emulgents més utilitzats en la indústria alimentaria són la carboximetilcel·lulosa sòdica (CMC), el polisorbat 80 (P80), els arabinogalactans, les carragenines i la goma aràbiga (Halmos et al., 2019; Shah et al., 2017).

En els darrers anys però, han aparegut diferents evidències científiques alarmants sobre el consum del CMC i el P80 que mostren, majoritàriament en ratolins, un efecte negatiu d'aquests emulgents en la composició de la microbiota i la inflamació intestinal, el desenvolupament de càncer, la salut metabòlica o en trastorns psiquiàtrics (Swidsinski et al., 2009; Chassaing et al., 2015, 2017; Singh & Ishikawa, 2016; Holder et al., 2019; Viennois et al., 2017).

4.1.1 Disbiosi microbiana i inflamació intestinal

El CMC i que el cap hidrofílic del P80 són indigeribles, això significa que no es degraden i passen a través del tracte gastrointestinal sense absorbir-se ni metabolitzar-se fins arribar al lumen de l'intestí, on s'ha reportat que tenen efectes sobre la mucosa intestinal (Halmos et al., 2019; Viennois et al., 2017). La mucosa intestinal és l'encarregada d'actuar com a barrera física, inhibint el pas de molècules i bacteries des del lumen a l'epiteli que puguin ser perjudicials per a la salut i d'aquesta manera mantenir la homeòstasis intestinal.

En els següents estudis, realitzats en models animals, *in vitro* i en humans, s'ha demostrat que el consum d'emulgents (CMC i P80) altera la composició de la microbiota intestinal promovent una inflamació intestinal crònica i en conseqüència, afavorint el desenvolupament de malalties intestinals associades a la disbiosi microbiana (Tahiri et al., 2023) (Fig 3).

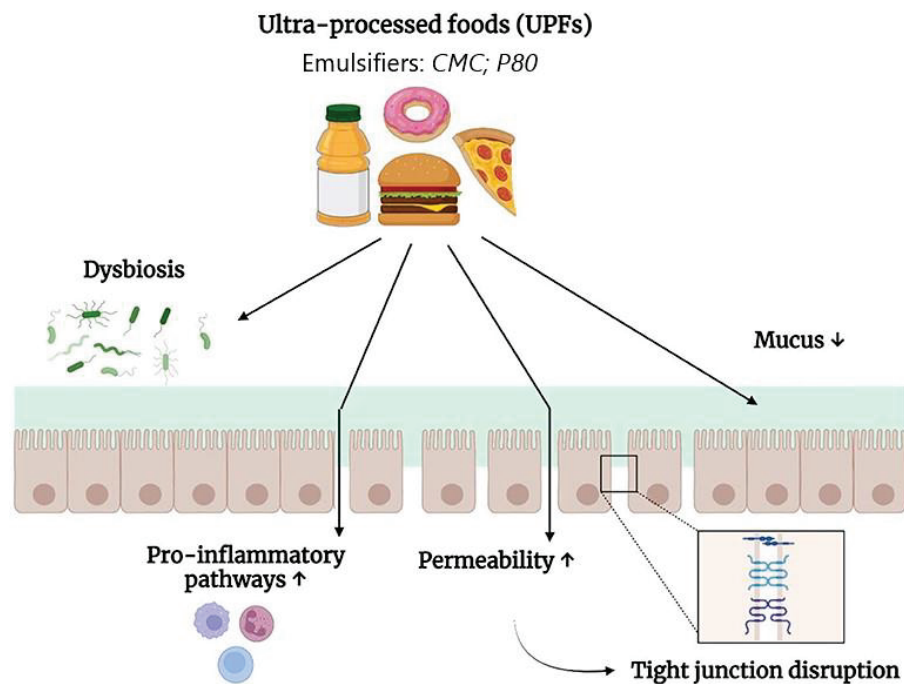


Figura 3. Efectes negatius dels emulgents CMC i P80, que es troben en UPF, a la barrera intestinal. Aquests emulgents indueixen disbiosi microbiana, augmenten la permeabilitat de l'epiteli, alteren la mucosa intestinal i estimulen factors pro-inflamatoris promovent una inflamació intestinal crònica. Imatge modificada de (Visser et al., 2022).

En el primer estudi, l'exposició de CMC en adults durant 3 setmanes a ratolins d'una soca genèticament susceptible (IL10^{-/-}) demostrà un sobrecreixement bacterià, una separació entre vellositats intestinals permetent el pas de les bactèries per adherir-se a la mucosa intestinal i la migració de leucòcits al lumen intestinal. Aquests canvis que s'observaren són similars als observats en humans que pateixen la malaltia de Crohn (Swidsinski et al., 2009). En un altre estudi on s'administrà CMC o P80 mitjançant l'aigua durant 12 setmanes a ratolins WT (de l'anglès *Wild Type*) i a dues soques genèticament sensibles (IL10^{-/-}; TLR5^{-/-}) s'observà que el consum d'ambdós emulgents induïa una alteració en la composició de la microbiota intestinal i la disminució de la mucosa intestinal, permetent la invasió de bactèries pro-inflamatòries a la mucosa intestinal i reduint la distància entre les bactèries i l'epiteli, promovent una inflamació intestinal

crònica de baix grau en ratolins WT i el desenvolupament de Colitis en les soques predisposades a aquesta malaltia (Chassaing et al., 2015). El consum de P80 durant 8 setmanes en ratolins també demostrà que no només s'altera la composició de la microbiota en el colon, sinó que també es dona en l'intestí prim conduint-lo a una major vulnerabilitat a patir petites lesions intestinals (Furuhashi, 2020). En un altre estudi, també es demostrà que una inflamació intestinal crònica de baix grau, degut al consum de CMC o P80, en un model preclínic de càncer associat a la colitis augmenta el desenvolupament de tumors promovent càncer de colon (Viennois et al., 2017). També s'ha observat que el consum d'emulgents afavoreix el desenvolupament de tumors en un model de ratolí genètic de càncer de colon (Viennois & Chassaing, 2021).

En un cinquè estudi, s'utilitzà un model *ex vivo* M-SHIME (de l'anglès *mucosal simulator of the human intestinal microbial ecosystem*) que revelà que el CMC i el P80 actuen directament sobre la microbiota intestinal humana per tal d'augmentar el potencial inflamatori (augmentant els nivells bioactius de flagel·lina). Posteriorment es trasplantà la microbiota provinent del model M-SHIME a ratolins receptors recapitulant moltes de les alteracions descrites anteriorment en ratolins tractats directament amb emulgents (Chassaing et al., 2017). També s'observà que els canvis en la composició de la microbiota generats per el consum de CMC i P80 en ratolins depenen del sexe (Holder et al., 2019).

L'exposició diària al P80 a través d'una sonda oral durant 4 setmanes en ratolins també demostrà una reducció de l'expressió de Muc2 (gen que codifica la glicoproteïna secretora Mucina-2 secretada per les cèl·lules caliciformes al lumen de l'intestí), una reducció de la mucosa intestinal, un augment de la permeabilitat intestinal, un augment de la invasió de bacteries en la mucosa i un augment dels nivells bioactius de lipopolisacàrids (LPS), flagel·lines i de l'expressió gènica de LCN2 (gen que codifica la proteïna encarregada de segrestar el ferro per evitar-ne l'ús dels bacteris) (Singh & Ishikawa, 2016).

En un altre estudi es demostrà, mitjançant ratolins amb una microbiota coneguda i colonitzats per *E.coli* (associada a la malaltia de Crohn), que el consum d'emulgents promou la virulència i la invasió d'aquesta bactèria indicant per tant, que aquests compostos poden afavorir la inflamació en un hoste que conté cert tipus de bacteries amb capacitats patogèniques (Viennois et al., 2020). També s'investigà l'efecte del CMC i el P80 en ratolins genèticament susceptibles (IL10^{-/-}) i trasplantats amb una combinació de femtes de tres pacients que pateixen una malaltia inflamatòria intestinal. En aquest cas, s'observà que els ratolins exposats al CMC durant 4 setmanes, tot i no

presentar canvis en la composició de la microbiota, presentaven una inflamació intestinal més agressiva que els ratolins tractats amb P80 (Rousta et al., 2021).

Recentment, també s'ha estudiat l'impacte del consum del CMC en humans on s'ha descrit que el grup exposat al CMC (15g/dia, 11 dies consecutius) presentava una major alteració de la microbiota intestinal reduint-ne la diversitat bacteriana, un augment del mal estar estomacal i una reducció d'àcids grassos volàtils i aminoàcids lliures presents en les femtes. En dos dels subjectes estudiats, també s'observà una major invasió de la microbiota en la mucosa intestinal, característic de la inflamació intestinal (Chassaing et al., 2022).

4.1.2 Malalties metabòliques

El consum d'emulgents també contribueix al desenvolupament de malalties metabòliques. En un estudi realitzat en ratolins WT on se'ls hi administrà CMC o P80 a través de l'aigua durant 12 setmanes, s'observà un augment de la ingesta i l'adipositat, i en conseqüència un augment moderat del pes corporal. Aquests ratolins també desenvoluparen hiperglucèmia en condicions de dejú, intolerants a la glucosa i resistents a la insulina (Chassaing et al., 2015). En dos estudis més, també s'observà un augment del teixit adipós (Holder et al., 2019), el pes corporal i la ingesta en ratolins exposats a emulgents (Sandall et al., 2020). En un quart estudi, els ratolins exposats al P80 durant 2 setmanes, a través d'una sonda oral, presentaren alteracions metabòliques com hiperglucèmia, hiperinsulinèmia i resistència a la insulina. També mostraren un augment del pes corporal, l'adipositat i la ingesta. A més, també es van descriure disfuncions en el fetge, on s'observaren alteracions enzimàtiques i canvis en la mida de les mitocòndries (Singh & Ishikawa, 2016). També hi ha un estudi on s'observà que els peixos zebra exposats al CMC no presentaven efectes morfològics ni neurotòxics, tanmateix si que s'observà una acumulació de lípids desencadenat per canvis en l'expressió gènica associada a l'obesitat i que tenen un paper important en funcions com el metabolisme dels lípids i dels carbohidrats (Lipoproteïna lipasa (LPL), àcid gras sintasa (FASN), receptor activat per proliferadors peroxisomals (PPAR α i PPAR δ), i del comportament alimentari (AgRP i POMC) (Baran et al., 2020). En un altre estudi recent, els resultats mostraren que el consum de P80 *per se* en ratolins no afectava al pes corporal ni a la ingesta, però la combinació de P80 amb una dieta alta en greixos (HFD) sí que augmentà la ingesta calòrica total, tot i no veure's reflectit en un augment del pes corporal. A més, s'observà que tant el P80 com el P80+HFD augmentava el greix corporal i els nivells lipídics en sang (Lv et al., 2023). Finalment,

s'observà que una exposició crònica als emulgents CMC i P80 accelerà el desenvolupament de la diabetis tipus 1 en ratolins NOD (de l'anglès *non-obese diabetic*) que desenvolupen espontàniament aquesta malaltia (Delaroque & Chassaing, 2024).

4.1.3 Trastorns psiquiàtrics

La salut intestinal té un paper molt important en les malalties psiquiàtriques (J. Kim et al., 2020). En un estudi recent, s'ha demostrat com el consum d'emulgents en ratolins afavoreix el desenvolupament d'ansietat i alteracions en el comportament social depenent del sexe. En mascles, s'observa un augment del desordre d'ansietat i en canvi en femelles, una reducció en el comportament social (Holder et al., 2019).

4.2 Exposició materna als emulgents

L'exposició materna al P80 en ratolins també ha mostrat tenir efectes negatius en la descendència (Jin et al., 2021; Liang et al., 2023). En el primer estudi, es va descriure que el consum matern de P80, durant el període de gestació i lactància, presentava un retard en el desenvolupament intestinal en la descendència a les 3 setmanes d'edat associat a una disminució de les bactèries *Mucispirillum*, *Clostridium XI* i *Parabacteroides*, correlacionades positivament amb la proliferació i la diferenciació de l'intestí. També s'observa un augment d'algunes bactèries perjudicials (*Proteobacteria*, *Helicobacteraceae*, *Campylobacterales* i *Desulfovibrionales*) que van persistir des del deslletament fins a l'etapa adulta. Aquestes alteracions en la microbiota també afectaren la mucosa intestinal, generant una inflamació intestinal crònica de baix grau que predisposà a la descendència a desenvolupar colitis al llarg del temps (Jin et al., 2021). El consum matern de P80 també perjudica el desenvolupament de la immunitat de la descendència, conduint a la pèrdua de l'homeòstasi intestinal degut a una desregulació de les cèl·lules limfoides innates (ILC) durant l'etapa prenatal (Liang et al., 2023).

No obstant, es desconeixia si el consum matern d'emulgents, com el CMC i el P80, durant el desenvolupament embrionari i l'etapa prenatal tenien algun efecte en la programació i el control neuronal del metabolisme en la descendència.

5 Programació materna

Diferents evidències epidemiològiques i estudis en models animals demostren, tal i com es descriu en la teoria “Els orígens del desenvolupament de la salut i les malalties” (DOHaD), que uns hàbits nutricionals materns desequilibrats durant la primera etapa de vida (fetal i post-natal) estan vinculats a una major predisposició de la descendència a desenvolupar malalties associades al metabolisme com l’obesitat, la diabetis tipus 2 o malalties cardiovasculars al llarg de l’etapa adulta (Fig 4) (Barker et al., 2002; Mcmillen & Robinson, 2005; Blackmore & Ozanne, 2013; Duque-Guimarães & Ozanne, 2013; Hanson & Gluckman, 2014; Gali Ramamoorthy et al., 2015; Friedman, 2018). Aquest fenomen també se’l coneix com a programació fetal (Gali Ramamoorthy et al., 2015).

Alguns exemples descrits en la literatura com la desnutrició, la restricció calòrica o la sobre-nutrició materna, i conjuntament amb altres factors com el temps d’exposició, el gènere de la descendència o la severitat dels canvis nutricionals, demostren una connexió entre els hàbits nutricionals materns i les alteracions en la programació del desenvolupament fetal i post-natal de la descendència i on la diana principal són els circuits neuronals hipotalàmics, que s’estableixen durant les primeres etapes del desenvolupament, i que controlen la ingesta i la despesa energètica de l’organisme (Mcmillen & Robinson, 2005; S. G. Bouret, 2009; Gali Ramamoorthy et al., 2015).

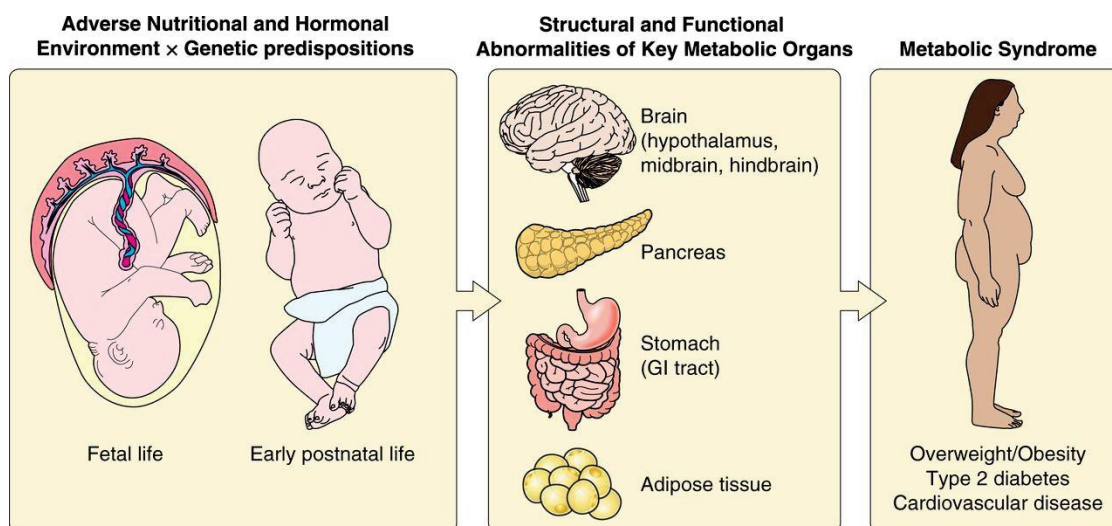


Figura 4. Orígens del desenvolupament de les malalties metabòliques a partir de la programació de sistemes reguladors claus durant l’etapa perinatal. Imatge de (S. Bouret et al., 2015).

5.1 Hipotàlem

5.1.1 Anatomia

L'hipotàlem només representa un 2% del volum total del cervell humà (Fong et al 2023), però consta d'un conjunt de circuits essencials pel manteniment de la homeòstasis de diversos processos biològics que garanteixen la supervivència de l'organisme com són la regulació de la temperatura corporal i el control energètic, la gana i la sacietat, la son, la resposta a l'estrès, la reproducció i el creixement, entre altres (Saper & Lowell, 2014; Xie & Dorsky, 2017).

Es localitza a la part ventral del diencèfal, just sota el tàlem, i és una estructura integrada per diverses agrupacions de neurones que constitueixen diferents nuclis hipotalàmics, tots ells amb una citoarquitectura complexa al voltant del tercer ventricle (3V) i amb funcions diverses (Saper & Lowell, 2014; Fong et al., 2023). Es divideix en quatre grups segons la seva posició rostral-caudal en tots els vertebrats, independentment de l'espècie (Fig 5).

- **Àrea pre-òptica (POA):** Situada a la part més rostral de l'hipotàlem, està formada per els nuclis pre-òptics mitjà (MnPO), el medial (MPO), el ventrolateral (VLPO), el anteroventral periventricular (AVPV) i el periventricular (PVpo).
- **Àrea anterior:** Està composta per l'hipotàlem anterior (AH) i els nuclis supraòptic (SON), supraquiasmàtic (SCN) i paraventricular (PVN).
- **Àrea tubular:** Formada per l'àrea lateral de l'hipotàlem (LH) i els nuclis hipotalàmics dorsomedial (DMH), ventromedial (VMH), arcuat (Arc) i tuberal (TuN). En la zona ventral d'aquesta àrea tubular de l'hipotàlem també es troba l'eminència mediana (Me).
- **Àrea mamil·lar:** Situada a la part més caudal de l'hipotàlem, està composta per els nuclis premamil·lar (PM), supramamil·lar (SuM), tuberomamil·lar (TM) i el nucli hipotalàmic posterior (PH).

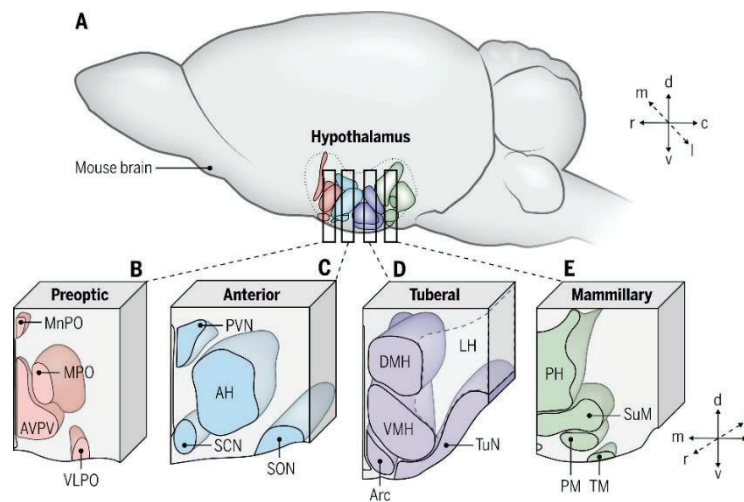


Figura 5. Representació esquemàtica de la subdivisió de l'hipotàlem en el cervell de ratolí. (A) L'hipotàlem amb els seus nuclis dividits en quatre regions rostral-caudals. B) Secció coronal representativa de l'àrea pre-òptica. C) Secció coronal representativa de l'àrea anterior. D) Secció coronal representativa de l'àrea tubular. E) Secció coronal representativa de l'àrea mamil·lar. Imatge de (Fong et al., 2023).

5.1.2 Desenvolupament de l'hipotàlem

En el model de ratolí, les estructures de l'hipotàlem es comencen a desenvolupar a partir del dia embrionari (E) 8.5, que en humans correspondria a la setmana 5 de gestació (GW5). El desenvolupament hipotalàmic s'inicia a la placa neural mitjançant un gradient de senyals Nodal i sònic hedgehog (SHH) que confereixen una identitat anterior-ventral a l'hipotàlem. Aquests factors són antagonistes de WNT i per tant, inhibeixen les senyals WNT i β -catenin, secretades en el mesoderma axial posterior i que tenen un paper important en la formació de l'eix anterior-posterior (Xie & Dorsky, 2017; Benevento et al., 2022). El dia E10 la làmina neuroectodèrmica i l'ectoderma pateixen una invaginació conjunta obtenint l'inici de l'estructura hipotalàmica i el E13, aquesta invaginació desencadena la formació del infundíbul hipotalàmic i les bases de Rathke, que més tard originaran la glàndula pituïtària (Kano et al., 2021; Benevento et al., 2022). Aproximadament al mateix moment que s'origina l'estructura hipotalàmica, també apareixen límits cel·lulars mitjançant l'expressió de gens que codifiquen diferents factors de transcripció i lligands, també coneguts com a senyals morfogèniques, que permeten la diferenciació dels diferents nuclis hipotalàmics com per exemple *Foxg1* (Forkhead Box G1) que s'expressa en l'àrea POA, *Nkx6.2* (factor de transcripció Nkx6.2) que s'expressa en l'àrea hipotalàmica anterior ventral (vAH), *Sim1* (Single-minded homolog 1) i *Rgs4* (regulador de la senyalització de la proteïna G 4) que s'expressen en el PVN i *Nkx2.1* (Factor de transcripció tiroïdal 1) que s'expressa en la

part més terminal (medio-ventral) i acroterminal (ventral) de l'hipotàlem, i que alhora es subdivideix per l'expressió localitzada de *Isl1* (Factor de transcripció LIM-homeodomini illot 1) i *Pomc* (pro-opiomelanocortina) en l'Arc, *Sf1* (steroidogenic factor 1) en el VMH i *Lef1* (factor d'unió del potenciador limfoide 1), *Foxb1* (Forkhead Box B1) i *Irx5* (Iroquois homeobox 5) en l'àrea mamil·lar (Fig 6) (Shimogori et al., 2010; Benevento et al., 2022).

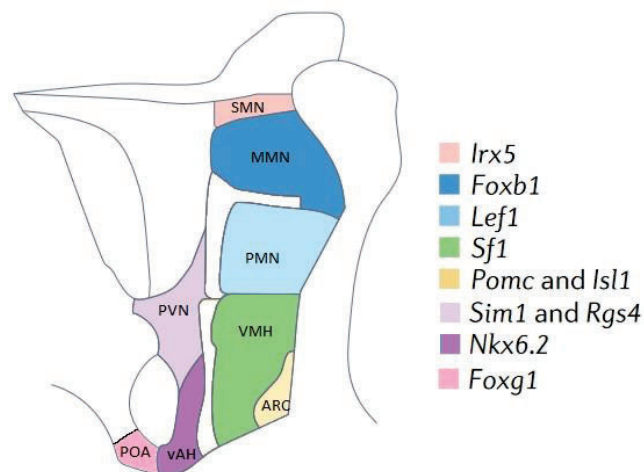


Figura 6. Representació sagital de la subdivisió de l'hipotàlem i l'expressió de factors de transcripció durant el desenvolupament del cervell de ratolí. Nucli supramamili·lar (SMN), nucli mamili·lar (MMN), nucli mamili·lar posterior (PMN), ventro-medial hipotàlem (VMH), nucli arcuat (ARC), nucli paraventricular (PVN), ventro-anterior hipotàlem (vAH) i àrea pre-òptica (POA). Imatge modificada de (Benevento et al., 2022).

5.1.3 Neurogènesi, migració neuronal, diferenciació i sinaptogènesi

L'hipotàlem, com ja s'ha comentat anteriorment en l'apartat 5.1.1, control moltes de les funcions fisiològiques bàsiques i aquesta complexitat funcional depèn d'una àmplia diversitat neuronal generada durant el procés de desenvolupament del cervell. Per això, al mateix temps que es desenvolupa l'estructura de l'hipotàlem, s'inicia el procés de neurogènesi entre els dies E9.5-E15 en ratolins (Fig 7), i entre la GW5-GW35 en humans (Benevento et al., 2022). Per aquest procés s'ha proposat un model a través dels quals els progenitors hipotalàmics adopten una estratègia de diversificació neuronal en forma de cascada genètica gradual en el que les cèl·lules glials radials (RGC), residents en la zona ventricular, produeixen cèl·lules progenitores intermediàries (IPC) que migren al parènquima on generen neurones immadures (glutamatèrgiques, GABAèrgiques i dopaminèrgiques) que es preparen mitjançant la combinació de factors de transcripció per generar diverses identitats neuropeptídiques que són reclutades en les diferents regions específiques de l'hipotàlem (Benevento et al., 2022; Fong et al., 2023; D. W. Kim et al., 2020; Zhang et al., 2018).

Les connexions sinàptica en ratolins, a diferència dels humans que es generen durant el període prenatal, es comencen a generar a partir del naixement, entre el dia post-natal (P) 1 i P4, i estan regulades per senyals i estímuls perifèrics (neurotransmissors, hormones) que permeten la formació dels circuits hipotalàmics funcionals a partir del dia P20-P30 (Fig 7) (Benevento et al., 2022; S. G. Bouret et al., 2004a).

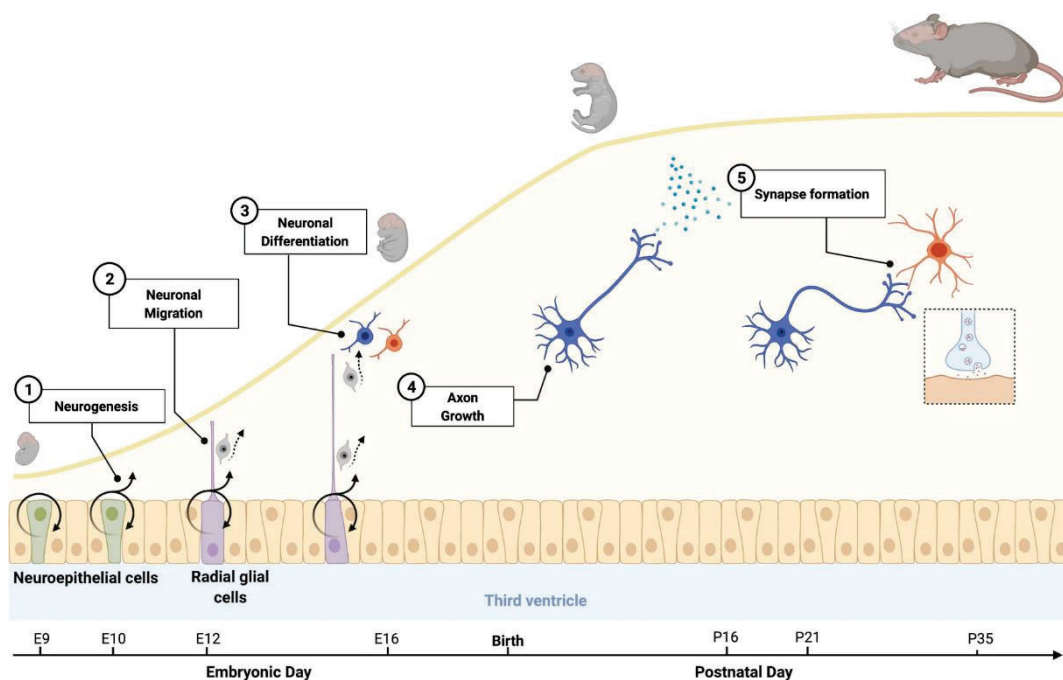


Figura 7. Cronologia del desenvolupament de l'hipotàlem en ratolins. Processos de neurogènesi, migració i diferenciació neuronal, creixement axonal i sinaptogènesi per la formació de circuits neuronals funcionals en ratolins. Imatge de (Bouret, 2022).

A l'hipotàlem, a part de les neurones, també es troben les cèl·lules glijals que s'ha descrit recentment que també tenen un paper important en el control del metabolisme (Brüning & Fenselau, 2023). Aquestes cèl·lules no-neuronals són generades pel procés de gliogènesi que s'inicia amb la disminució del procés de neurogènesi, i a partir del qual es formen els diferents tipus de cèl·lules com els tanicits, els oligodendròcits, els astròcits i les cèl·lules ependimals (Fong et al., 2023; D. W. Kim et al., 2020).

5.2 Sistema de la melanocortina

La majoria de les funcions dutes a terme per l'hipotàlem estan coordinades a través de complexes interconnexions entre múltiples nuclis. Un exemple paradigmàtic és el sistema de la melanocortina, el principal circuit hipotalàmic encarregat de la regulació de la ingesta, la despesa energètica i el control del metabolisme de la glucosa i dels lípids (S. G. Bouret, 2022; Brüning & Fenselau, 2023).

5.2.1 Composició i funcions del sistema de la melanocortina

El sistema de la melanocortina està format per les neurones anorexigèniques que coexpressen pro-opiomelanocortina/ pèptid de la transcripció regulada per cocaïna i amfetamina (POMC/CART), les neurones orexigèniques que coexpressen la proteïna relacionada amb l'agouti/ neuropèptid Y (AgRP/NPY) i les neurones que presenten els receptors de la melanocortina 3 (MC3R) i 4 (MC4R) (Fig 8) (Cone, 2005; Gali Ramamoorthy et al., 2015; Jais & Brüning, 2022). Aquests dos receptors juguen un paper clau en la regulació del metabolisme i el balanç energètic (Cone, 2006; Krashes et al., 2016; Jais & Brüning, 2022). En termes generals, les subpoblacions neuronals POMC/CART i AgRP/NPY exerceixen efectes oposats en la regulació de la ingesta, la despesa energètica i el control metabòlic a través del receptor de la MC4R, expressat en diversos tipus neuronals en regions hipotalàmiques i extra-hipotalàmiques (Jais & Brüning, 2022; Sweeney et al., 2023). Les neurones POMC són activades en un estat de balanç energètic positiu i amb els canvis hormonals associats, inhibint la sensació de gana i augmenten la despesa energètica a través de l'alliberament de l'hormona peptídica estimulants dels melanòcits (α -MSH), que actua com a agonista del MC4R. Les neurones AgRP/NPY, en canvi, són activades amb un balanç energètic negatiu on exerceixen l'efecte contrari a través de l'activitat antagonista i d'agonista invers de l'AgRP promovent la ingesta d'aliments. Senyals metabòliques com la leptina i la insulina inhibeixen la seva activitat (Cone, 2005; Gali Ramamoorthy et al., 2015; Jais & Brüning, 2022; Sweeney et al., 2023).

Tant les neurones POMC/CART com les AgRP/NPY es localitzen principalment en l'Arc, on degut a la seva proximitat al 3V i a la Me permet que aquestes neurones tinguin l'habilitat de detectar i integrar les senyals hormonals perifèriques (leptina, ghrelina i insulina) que creuen la barrera hematoencefàlica (BHE), influint en la seva senyalització per tal de produir les respostes metabòliques adequades (Jais & Brüning, 2022; Sweeney et al., 2023). També s'ha descrit que una petita població de neurones POMC es troba en el nucli del tracte solitari (NTS), situat en el bulb raquidi, i que aquestes també podrien

tenir una funció similar a les neurones POMC de l'Arc (Cone, 2005; Coupe & Bouret, 2013).

Ambdues poblacions neuronals estan interconnectades mitjançant projeccions axonals amb altres nuclis i àrees hipotalàmiques implicades en la regulació de la ingesta i el metabolisme energètic com el PVN, DMH o LH (S. G. Bouret et al., 2004a), essent el PVN el que major quantitat de projeccions rep (Coupe & Bouret, 2013; Gali Ramamoorthy et al., 2015).

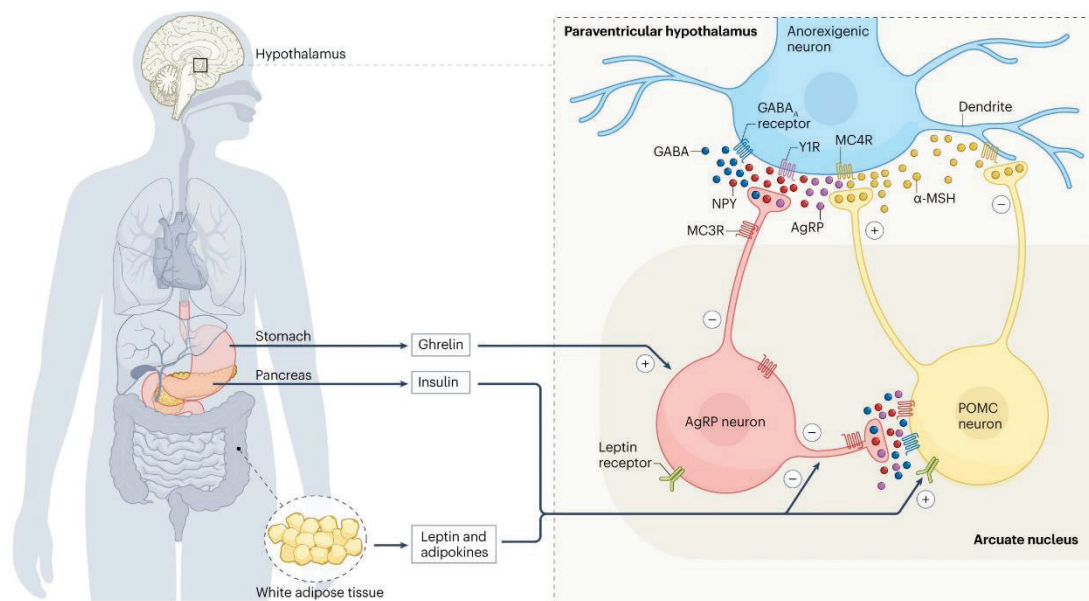


Figura 8. Sistema de la melanocortina. Imatge de (Sweeney et al., 2023).

5.2.2 Hormones metabòliques: Leptina, insulina i ghrelina

Diferents hormones metabòliques circulants alliberades per òrgans perifèrics com el teixit adipós, el pàncreas o el tracte gastrointestinal actuen com a senyals de control en l'hipotàlem, concretament en les neurones anorexigèniques i orexigèniques de l'Arc que responen per tal de mantenir la homeòstasis energètica i metabòlica de l'organisme corresponent (Fig 8) (Gali Ramamoorthy et al., 2015; Jais & Brüning, 2022).

La leptina és una hormona anorexigènica alliberada per els adipòcits del teixit adipós i que s'ha descrit que presenta receptors tant en les neurones POMC/CART com en les AgRP/NPY. Alguns dels seus efectes són mitjançant les neurones POMC/CART augmentant la secreció d' α MSH i en les neurones AgRP/NPY disminuint l'expressió dels neuropeptids AgRP i NPY (Gali Ramamoorthy et al., 2015). Diferents estudis, realitzats

tant en ratolins com en humans, han demostrat la importància de la leptina en la regulació del comportament alimentari i el balanç energètic (Campfield et al., 1995; Farooqi i Sadaf et al., 1999). També s'ha observat que la majoria de pacients obesos presenten alts nivells de leptina en sang degut a una resistència a la leptina, fet que fa que aquesta hormona no sigui capaç d'induir els seus efectes reduint la ingesta i en conseqüència el pes corporal (Schneeberger et al., 2014).

La insulina, alliberada per el pàncrees, també és una hormona anorexigènica que actua a l'Arc reduint la ingesta i el pes corporal mitjançant la regulació de l'expressió de les neurones POMC/CART i AgRP/NPY, on ambdues expressen els receptors d'insulina (Gali Ramamoorthy et al., 2015). Com amb la leptina, també hi ha evidències d'una resistència a la insulina (IR), disminuint la capacitat de la insulina per reduir la ingesta i el pes corporal en pacients obesos (Hallschmid et al., 2008).

I finalment, una altra hormona que té un paper important en la regulació del balanç energètic és la ghrelina, alliberada per el tracte gastro-intestinal i que presenta una activitat orexigènica. Aquesta hormona actua a través del receptor secretagog de l'hormona del creixement (GHS-R), altament expressat en l'hipotàlem i específicament en els nuclis Arc, VMH, DMH i PVN (Zigman et al., 2006), induint un augment de la ingesta mitjançant l'activació de les neurones AgRP/NPY (H. Y. Chen et al., 2004; Gali Ramamoorthy et al., 2015).

5.2.3 Desenvolupament intrauterí i formació de les projeccions

En ratolins, la majoria de neurones POMC i AgRP/NPY de l'Arc s'originen principalment a E11-12. Diferents estudis han descrit que la gran majoria de neurones de l'Arc a E10-E12 expressen *Pomc* de manera transitòria, anomenades neurones progenitores POMC, i que a partir d'E14.5 i fins a E18.5 desapareix l'expressió de *Pomc* en més de la meitat d'aquestes cèl·lules, algunes de les quals es diferencien en neurones NPY coincidint amb l'inici d'expressió de *Npy* a E13-E14 (Padilla et al., 2010; Croizier & Bouret, 2022). S'ha identificat també un microRNA (miR103/107) com a candidat involucrat en aquest procés de diferenciació de les neurones NPY (Croizier et al., 2018; Croizier & Bouret, 2022). Per tant, tenint en compte això només una porció de les neurones progenitores POMC finalment s'acabarà diferenciant en neurones POMC madures (Padilla et al., 2010).

El desenvolupament embrionari de les neurones progenitores POMC també està regulat per diferents factors de transcripció (Mash1, Isl1, NKx2.1, Shh, Six3, Rax i Otp) que tenen

un paper important en el desenvolupament ventral de l'hipotàlem, l'especificació de l'Arc i el desenvolupament de les neurones POMC (Toda et al., 2017; Croizier & Bouret, 2022).

Les projeccions axonals de les neurones POMC i AgRP/NPY són immadures en el naixement, i van madurant al llarg de les primeres setmanes de vida per tal d'acabar esdevenint circuits totalment funcionals (S. G. Bouret et al., 2004a; Nilsson et al., 2005). On les innervacions d'aquestes neurones des de l'Arc al DMH s'estableixen entre els dies P5 i P6, seguidament per el PVN entre els dies P8 i P10 i finalment al LH a P12, obtenint a P18 un patró de creixement axonal similar al dels adults (S. G. Bouret et al., 2004a; Coupe & Bouret, 2013).

Resumidament, en el cas dels ratolins existeixen dos períodes crítics en el desenvolupament dels circuits hipotalàmics que controlen l'homeòstasi energètica i metabòlica: (1) el fetal, concretament a partir de la meitat del període de gestació i (2) el post-natal, corresponent a les primeres setmanes de vida, on les alteracions en l'ambient poden afectar al desenvolupament de l'hipotàlem (neurogènesi, migració i diferenciació neuronal i/o creixement axonal) causant a la descendència conseqüències en el comportament alimentari i en el metabolisme a llarg termini (S. G. Bouret, 2009).

5.3 Paper de les hormones metabòliques en el desenvolupament dels circuits neuronals hipotalàmics.

En una sèrie d'estudis pioners, es va demostrar la importància de les hormones metabòliques en l'organització i estructuració dels circuits hipotalàmics que controlen el balanç energètic durant les primeres setmanes de vida (S. G. Bouret et al., 2004b; S. G. Bouret & Simerly, 2007; S. G. Bouret, 2010b; Steculorum & Bouret, 2011a; Steculorum et al., 2015; S. G. Bouret, 2017). Això demostra que aquestes hormones exerceixen una funció important com a senyals neurotròfiques durant la maduració hipotalàmica neonatal (Fig 9) (S. G. Bouret, 2010b).

En ratolins, està descrit que els nivells circulants de leptina es mantenen baixos fins a P4, moment en el que augmenten bruscament fins aconseguir els nivells màxims entre els dies P7 i P10 abans de tornar a disminuir als nivells de leptina presents en adults. Aquest augment pronunciat dels nivells de leptina circulant en sang durant l'etapa post-natal no correlaciona, com en l'etapa adulta, ni amb la quantitat de teixit adipós ni amb una disminució de la ingesta d'aliments dels nounats (Ahima et al., 1998a). No obstant, s'ha demostrat que aquest augment en els nivells de leptina és el responsable

d'estimular específicament la formació de projeccions neuronals des de l'Arc a altres regions com el PVN (P8-P10), DMH (P5-P6) i LH (P12) implicades en el control de la ingesta i el metabolisme (S. G. Bouret et al., 2004a, 2004b; S. Bouret & Simerly, 2006). Una deficiència en els nivells de leptina perjudica específicament la formació del creixement axonal d'aquests circuits (S. G. Bouret et al., 2004b). Per tant, tant l'excés com el dèficit de leptina durant el desenvolupament hipotalàmic altera la formació de projeccions neuronals del sistema de la melanocortina (Yura et al., 2005; Delahaye et al., 2008; Kirk et al., 2009; Coupé et al., 2010; Vogt et al., 2014).

L'estat nutricional és un factors que influeix en el perfil hormonal durant el desenvolupament, on una sobre-nutrició post-natal i una dieta materna HFD allarga i augmenta el pic màxim de nivells de leptina, mentre que la desnutrició en l'etapa post-natal retarda i disminueix aquest pic màxim de leptina (Skowronski et al., 2022).

També hi ha evidències del paper de la ghrelina com a factor neurotròfic en la fase neonatal, on en aquest cas els nivells d'aquesta hormona augmenten entre P10 i P14, per tal de frenar un creixement excessiu de les connexions neuronals que esdevenen en l'Arc (Steculorum et al., 2015). I finalment la insulina, que tot i mantenir-se constant durant l'etapa post-natal (Ahima et al., 1998a), també s'ha observat que alteracions en la seva senyalització poden influir en el desenvolupament dels circuits metabòlics de l'hipotàlem (Vogt et al., 2014). (Sominsky et al., 2018)

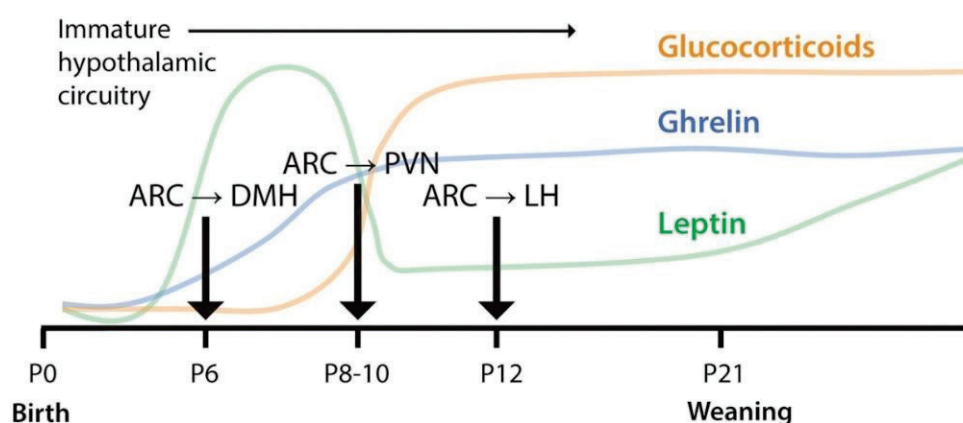


Figura 9. Hormones que exerceixen com a senyals neurotròfiques en el desenvolupament hipotalàmic.
Imatge modificada de (Sominsky et al., 2018).

5.4 Condicions fisiopatològiques que alteren el desenvolupament del sistema de la melanocortina.

En la literatura s'han descrit diferents factors (moleculars, cel·lulars, genètics i hormonal) que regulen el desenvolupament del sistema de la melanocortina. Però també, està àmpliament demostrat que uns hàbits nutricionals desequilibrats durant el període de gestació i lactància com podria ser un ambient obesogènic i/o diabètic de la mare, una mala nutrició materna o una sobre-nutrició de la descendència interfereixen en la programació fetal d'aquests circuits neuronals hipotalàmics implicats en la gana i la regulació del balanç energètic (H. Chen et al., 2008; S. G. Bouret, 2009; Kirk et al., 2009; Steculorum & Bouret, 2011b; Coupe & Bouret, 2013; Vogt et al., 2014), augmentant així el risc d'obesitat i comorbiditats associades a la descendència en l'edat adulta (S. G. Bouret et al., 2012).

5.4.1 Ambient matern obesogènic

Com ja s'ha comentat anteriorment en l'apartat 1.1, l'obesitat en dones embarassades ha augmentat en els últims anys i això representa un factor de risc per el desenvolupament de malalties metabòliques de la descendència. En ratolins, l'administració materna d'una dieta HFD és l'aproximació experimental més utilitzada per tal de generar un ambient obesogènic en la mare i estudiar-ne l'impacte en la descendència. La descendència provinent de mares exposades a una dieta HFD durant el període de gestació i/o lactància presenten progressivament sobrepès, hiperfàgia, intolerància a la glucosa i un augment de l'adipositat (H. Chen et al., 2009; Kirk et al., 2009; S. G. Bouret, 2022). Aquestes alteracions metabòliques estan associades a un desequilibri en el desenvolupament del sistema de la melanocortina, afectant les projeccions de les neurones POMC i AgRP/NPY al PVN (Kirk et al 2009, Vogt 2014, Park 2020, Haddad-Tovoli 2020, Sullivan et al 2017).

La majoria dels models experimentals d'obesitat materna també presenten hiperglucèmia i resistència a la insulina. Així doncs, també hi ha estudis en ratolins que descriuen que els efectes de la diabetis materna *per se* en la descendència augmenten el pes corporal, la ingesta i els nivells de glucosa i insulina en sang. Aquestes disfuncions metabòliques estan associades a una resistència a la insulina en l'etapa adulta. A més, s'observa un augment del número de neurones POMC en l'Arc i una reducció en la densitat de fibres α -MSH al PVN. Aquesta disfunció en les projeccions neuronals podria ser degut a la reducció de l'habilitat de la leptina per activar la senyalització neuronal en l'Arc durant el desenvolupament neonatal (Steculorum & Bouret, 2011b).

5.4.2 Mala nutrició materna

La descendència provinent de mares exposades a una mala nutrició durant el període de gestació i/o lactància presenten un fenotip similar a la descendència provinent de mares obesas, amb una predisposició a desenvolupar obesitat o malalties metabòliques al llarg de l'etapa adulta. Això és degut a una mala programació del sistema de la melanocortina, ja que la descendència de ratolins femella exposades a una restricció calòrica presenten una disminució dràstica en els nivells post-natals màxims de leptina alterant especialment les projeccions neuronals hipotalàmiques i disminuint l'expressió gènica de les neurones POMC i el número en l'Arc (Delahaye et al., 2008; García, 2010)

5.4.3 Sobre-nutrició post-natal

En ratolins, l'estat nutricional de la descendència durant l'etapa post-natal també influeix en la programació hipotalàmica del sistema de la melanocortina. On s'ha descrit que una sobre-nutrició de les cries durant aquest període disminueix l'expressió gènica de *Pomc* (H. Chen et al., 2009) i altera les projeccions de les neurones POMC i AgRP al PVN durant la primera setmana de vida, independentment de les disfuncions metabòliques, com el sobrepès o la hiperfàgia, que apareixen posteriorment (Coupe & Bouret, 2013).

Per això és molt important controlar i normalitzar el més aviat possible la mida de les camades en els estudis de programació materna, per tal de minimitzar l'impacte que pugui causar l'estat nutricional de la descendència, on una camada amb menys de 5 ratolins o més de 10 presenten sobre-nutrició i desnutrició respectivament, en el desenvolupament hipotalàmic i les disfuncions metabòliques que en puguin derivar.

Per últim, també s'ha descrit en estudis recents que una exposició materna a additius (com els edulcorants) o compostos químics com els disruptors endocrins (EDC), que són components que formen part dels UPF, també pertorben el desenvolupament dels circuits neuronals hipotalàmics que s'encarreguen de regular l'homeòstasi energètica de la descendència (Fong et al., 2023; MacKay et al., 2013; Park et al., 2023).

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Hipòtesi i Objectius

La **hipòtesis** d'aquest projecte és que el consum matern d'emulgents durant el període de gestació i lactància afecta al desenvolupament i maduració dels circuits hipotalàmics implicats en la regulació del balanç energètic de la descendència, perjudicant també la seva salut metabòlica i neuro-psicològica.

Per tal de donar resposta a aquesta hipòtesis, l'**objectiu principal** d'aquest estudi és definir l'impacte del consum matern d'emulgents (CMC+P80) durant el període de gestació i lactància en la salut de la descendència en ratolins.

Els **objectius específics** són:

- 1) Investigar si el consum matern d'emulgents altera l'estat metabòlic i el desenvolupament i maduració de les neurones hipotalàmiques involucrades en el sistema de la melanocortina en la descendència.
- 2) Examinar si el consum matern d'emulgents té un impacte en el deteriorament neuro-psicològic dels ratolins.

MATERIALS I MÈTODES

Materials i mètodes

1 Animals

1.1 Declaració ètica

Tots els procediments experimentals amb animals es van realitzar d'acord les normes bàsiques en la política de protecció animal publicades pel Govern d'Espanya al Reial Decret 53/2013, que compleix amb la Directiva de la Unió Europea 2010/63 relativa a la protecció d'animals utilitzats per experimentació i altres fins científics. A més, el protocol utilitzat va ser aprovat per el Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona (protocol numero: 00346-22 "Estudi de l'efecte del consum d'emulsionants en la programació post-natal de les neurones hipotalàmiques i el metabolisme sistèmic").

1.2 Cura dels animals, soca de ratolí i dieta

Tots els estudis es van realitzar en ratolins de la soca C57Bl/6, criats a l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. Els animals es mantingueren en un cicle de 12 h de llum i fosc sota unes condicions controlades de temperatura ($21\pm1^{\circ}\text{C}$) i humitat ($50\pm10\%$), amb accés lliure a una dieta estàndard (Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet; 2014, Envigo). En estudis específics, també es va proporcionar una dieta tipus "Western" (40% Kcal derivats de greixos i 43% Kcal derivats de carbohidrats; D12079B, Research Diets) *ad libitum* a la descendència durant 11 setmanes (començant a les 10 setmanes d'edat).

1.3 Condicions de reproducció, descendència i tractament amb emulgents

Femelles de la soca C57Bl/6 de 6-7 setmanes d'edat es van dividir en 2 grups experimentals: (a) dieta estàndard sense cap suplement a l'aigua (mares control; CTRL) o (b) dieta estàndard amb un suplement d'emulgents a l'aigua (mares emulgents; Emul) consistent en 1% de Carboximetilcel·lulosa sòdica (CMC; 419311, Sigma) i 1% de Polisorbat 80 (P80; W291706, Sigma) durant 12 setmanes, incloent tot el període de gestació i lactància (Fig 10). Aquesta solució es va preparar i canviar setmanalment.

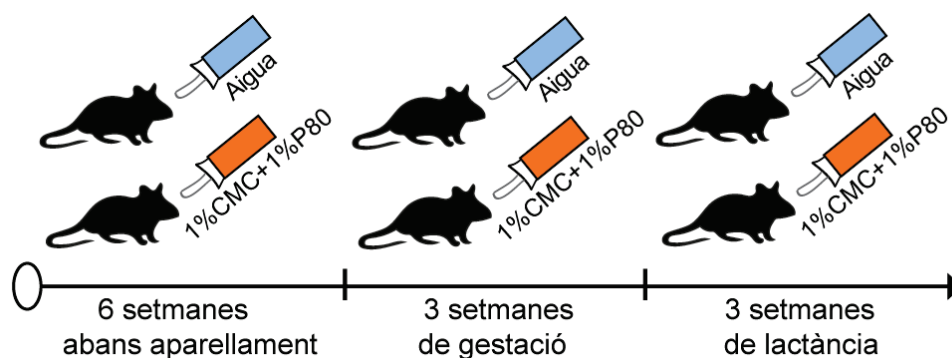


Figura 10. Esquema del disseny experimental del tractament matern d'emulents.

A les 6 setmanes de tractament les femelles es van aparellar amb mascles C57Bl/6 i es realitzà un seguiment setmanal del pes corporal per tal de monitoritzar el seu embaràs.

Una vegada les femelles van parir, es normalitzà la mida de la ventrada a 6-8 ratolins per ventrada per tal de garantir una alimentació adequada i estàndard fins al deslletament. Aquesta normalització es dugué a terme entre els dies P5-P7.

Les cries es mantingueren amb les mares fins al deslletament a P21. En el moment del deslletament, les cries provinents de les mares CTRL i de les mares Emul, es van subdividir en 2 subgrups: controls (CTRL) i emulents (Emul). Així s'acabà tenint 4 condicions diferents: (1) mares control - cries control (CTRL - CTRL); (2) mares control - cries emulents (CTRL - Emul); (3) mares emulents - cries control (Emul - CTRL) i (4) mares emulents - cries emulents (Emul - Emul) (Fig 11).

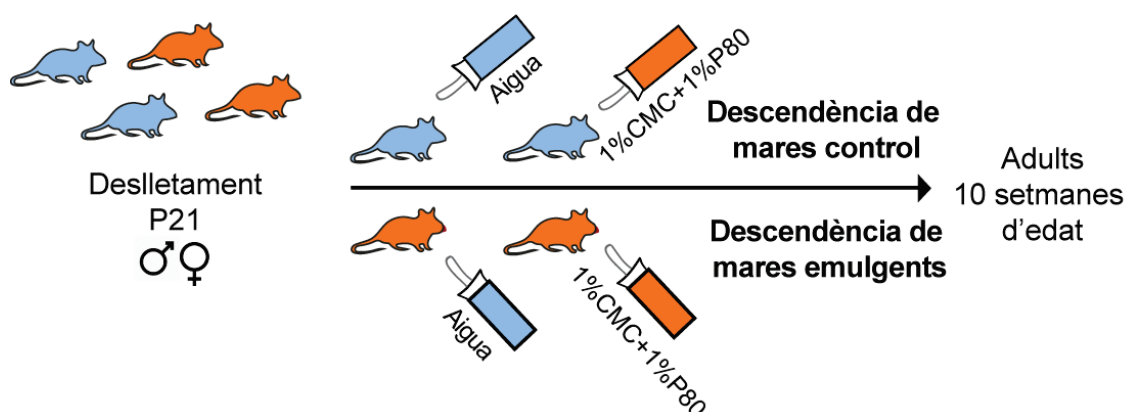


Figura 11. Esquema del disseny experimental del tractament d'emulents de la descendència des del deslletament (P21) fins a l'edat adulta (10 setmanes).

Aquest disseny experimental té l'avantatge de diferenciar clarament entre l'efecte del tractament amb emulgents derivat de la programació fetal materna amb l'efecte durant les etapes posteriors al deslletament. D'aquesta manera permet tenir una visió més completa de l'impacte d'aquests additius alimentaris durant diferents etapes i condicions. Com ja s'ha comentat anteriorment, a les 10 setmanes d'edat també es proporcionà a tots els grups de la descendència una dieta "Western" *ad libitum* durant 11 setmanes (Fig 12).

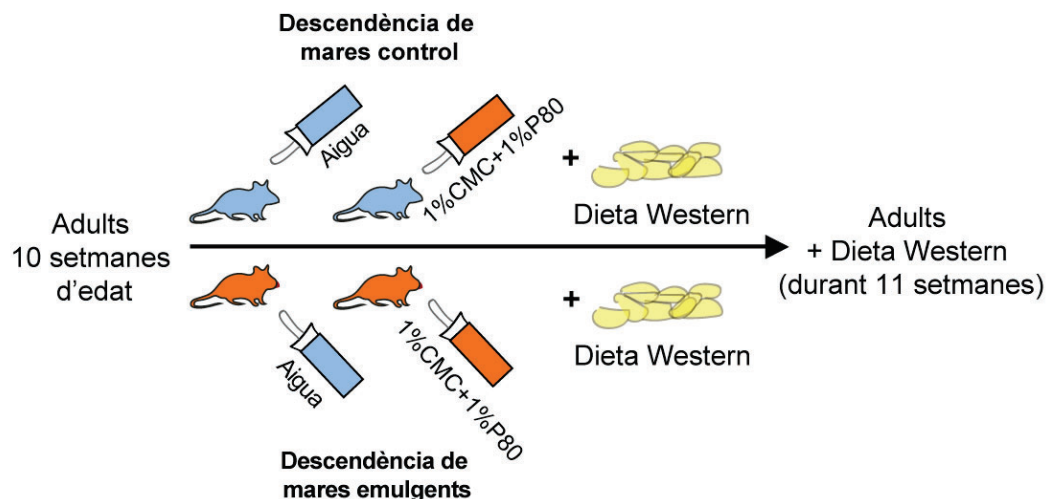


Figura 12. Esquema del disseny experimental del tractament d'emulgents de la descendència en l'etapa adulta suplementat amb una dieta "Western".

Les edats i el número de ratolins corresponents a cada un dels experiments que es dugueren a terme estan detallats en els diferents apartats de material i mètodes o bé en els peus de figura corresponents.

2 Expressió gènica

2.1 Extracció i quantificació de l'àcid ribonucleic (ARN)

Per analitzar l'expressió gènica es va recollir l'hipotàlem medial basal (MBH) d'animals a P21 derivats de 14 mares diferents (7 mares per tractament matern), es van congelar immediatament en nitrogen líquid i emmagatzemar a -80°C.

L'extracció d'ARN es va fer mitjançant el reactiu TRIzol (15596026, Invitrogen). Resumidament, el protocol consistia en homogeneïtzar mecànicament amb xeringa el teixit en 1 ml de TRIzol. Després, les mostres es deixaren reposar durant 5 minuts a temperatura ambient, se'ls hi va afegir 200 µl de cloroform (C2432, Sigma) per ml de

TRIzol i les mostres es van agitar amb força durant 15 segons. Després de 10 minuts d'incubació a temperatura ambient les mostres es van centrifugar durant 15 minuts a 12000g a 4°C. Finalitzada la centrifugació, es va recollir la fase aquosa superior, corresponent al ARN, i transferir a un nou tub amb 500 µl d'isopropanol (190764, Sigma) on les mostres es van agitat amb força durant uns segons i incubar durant 10 minuts a temperatura ambient. Seguidament, les mostres es tornaren a centrifugar durant 10 minuts a 12000g a 4°C i s'eliminà el sobrenedant. Els pellets es rentaren dues vegades amb 1 ml d'Etanol 70% i es centrifugaren durant 5 minuts a 7500x a 4°C. Els pellets d'ARN es deixaren assecar a l'aire durant 5-10 minuts i una vegada secs es dissolgueren en 30 µl d'aigua lliure d'ARNases (11050104, IDT). Finalment, les mostres es van incubar 10 minuts a 55°C per tal de facilitar la dissolució i tenir-les preparades per quantificar-les al Nanodrop (Thermo Scientific).

2.2 Síntesis de l'àcid desoxiribonucleic (ADN) complementari

Per sintetitzar l'ADN complementari (ADNc) es van utilitzar els reactius d'un kit comercial (4368813, Applied Biosystems) seguint el protocol recomanat. Primer es van afegir 10 µl de la mescla de la reacció (Taula 1) en 10 µl de la mostra d'ARN diluïda en aigua lliure d'ARNases (1 µg d'ARN total), per tal d'obtenir un volum final de 20 µl per mostra. Després els tubs es van fer córrer en un termociclador seguint el protocol establert per la retrotranscripció: 10 min a 25°C, 2 h a 37°C, 5 min a 85°C i manteniment a 4°C.

Reactius	Volum per mostra
10x RT tampó	2 µl
25x mescla dNTPs	0,8 µl
10x Random primers	2 µl
Inhibidor d'ARNases	1 µl
RT enzim	1 µl
Aigua lliure d'ARNases	3,2 µl
Volum TOTAL	10 µl

Taula 1. Mescla de la reacció per la retrotranscripció.

2.3 Reacció en cadena de la polimerasa en temps real (Q-PCR)

Una vegada obtingut el ADNc es va dur a terme una PCR quantitativa (qPCR) utilitzant una mescla de reacció Premix Ex Taq (RR39WR, Takara) en un termociclador ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems). Les sondes Taqman FAM/TAMRA (Applied Biosystems) específiques per cada gen utilitzades per l'anàlisi de la qPCR es mostren a la taula 2. Els nivells d'expressió gènica es van normalitzar amb el gen constitutiu *Gapdh*.

Gen	Referència
<i>Pomc</i>	Mm00435874_m1
<i>Cart</i>	Mm00489086_m1
<i>Agrp</i>	Mm00475829_g1
<i>Npy</i>	Mm00445771_m1
<i>Pscck1</i>	Mm00479023_m1
<i>Mcr3</i>	Mm00434876_s1
<i>Mcr4</i>	Mm00457483_s1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1

Taula 2. Llistat de sondes utilitzades per l'anàlisi de l'expressió gènica. *Pomc*, pro-opiomelanocortina; *Cart*, pèptid relacionat amb la cocaïna i l'amfetamina; *Agrp*, pèptid relacionat amb l'agouti; *Npy*, neuropèptid Y; *Pscck1*, proproteïna convertasa 1; *Mcr3*, receptor de la melanocortina 3; *Mcr4*, receptor de la melanocortina 4; *Gapdh*, gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa.

3 Seqüenciació d'ARN

3.1 Preparació i seqüenciació de l'ARN

Per la seqüenciació de l'ARN (RNA-seq) es va procedir a l'extracció d'ARN del MBH de ratolins mascles a P21 provinents de 4 mares CTRL i 5 mares Emul, mitjançant el protocol de TRIzol tal i com s'ha detallat anteriorment en l'apartat 2.1 de material i mètodes. Aquestes mostres es van quantificar i s'avaluà la seva integritat mitjançant el Bioanalyzer 2100. Totes les mostres enviades a seqüenciar tenien un número d'integritat de l'ARN (RIN) > 8 i es van processar i seqüenciar a la plataforma de Genòmica Funcional de l'IDIBAPS.

Les llibreries d'ARN específiques de cadenes d'ARN missatger (ARNm) es generaren utilitzant 200 ng de l'ARN total utilitzant el kit Stranded mRNA Prep Ligation de la casa comercial Illumina i seguint les instruccions del fabricant. Les llibreries van ser seqüenciades en un equip Illumina NextSeq2000 des dels dos extrems de la molècula

amb una longitud de lectura de 2x50 parells de bases. D'aquesta manera es generà al voltant de 40 milions de lectures dels dos extrems per a cada mostra/condició.

3.2 Anàlisi de la seqüenciació de l'ARN

S'utilitzà l'anàlisi FastQC per tal d'avaluar la qualitat de les lectures de seqüències generades (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). L'alineació dels transcrits per cada una de les mostres s'ha realitzat utilitzant el programa Kallisto (Bray et al., 2016) sobre el genoma de referència mm10 de ratolí. Només es van conservar els gens amb un cpm (de l'anglès *counts per millon*) superior a 1 en almenys quatre mostres. El paquet Limma es va utilitzar per fer l'anàlisi d'expressió gènica diferencial (Ritchie et al., 2015). Els gens amb un fold change (FC) superior o inferior a 1,5 i un p-valor de menys de 0,05 es van considerar significatius. També es va fer un anàlisi PEA (de l'anglès *pathway enrichment analysis*) amb el programa g:Profiler (Reimand et al., 2016) per tal d'identificar funcions biològiques sobrerrepresentades a partir de la llista de gens expressats. El programa Cytoscape es va utilitzar per representar gràficament els mapes d'enriquiment (Shannon et al., 2003).

4 Immunofluorescència

4.1 Processament del teixit

A les 3 setmanes d'edat, els ratolins es van anestesià de manera profunda mitjançant la injecció intraperitoneal (IP) de Ketamina (580393.7, VetViva Richter) i Xilazina (572126.2, Elanco) (100 mg/Kg de Pes corporal i 10 mg/Kg de Pes corporal). Posteriorment es va realitzar una perfusió intracardiaca on primer es va passar una solució tampó fosfat salí 1X (PBS) per tal d'eliminar la sang del sistema circulatori, i seguidament una solució fixadora al 4% de paraformaldehid en tampó fosfat (PFA; pH 7,4). Els cervells es van disseccionar, post-fixar en PFA (15710-S, Electron Microscopy Sciences) al 4% durant 24h a 4°C i crioprotegir passant per una bateria seqüencial de 10-30% de sucrosa (S0389, Sigma) preparada en 1X PBS a 4°C fins que els cervells precipitaren. Finalment, es van congelar en neu carbònica en pols i guardar a -80°C.

Mitjançant un criòstat (Leica CM 1950) es van realitzar talls de 20 µm de gruix del PVN i l'Arc recollits en portaobjectes d'adhesió SuperFrost UltraPlus (10417002, Thermo Fisher Scientific) i dividits en 4 series per experiments posteriors.

Els cervells de ratolí recollits i tallats provenien de 10 mares diferents (5 mares per tractament).

4.2 Immunofluorescència

4.2.1 α -MSH

Per a la tinció d' α -MSH es va seleccionar una sèrie de les quatre tallades i les seccions es van bloquejar amb un 2% de sèrum d'ase (017000121, Jackson ImmunoResearch) en KPBS + 0.4% Triton X-100 (X-100-500ML, Sigma) durant 1 hora a temperatura ambient. Posteriorment es van incubar amb un anticòs primari de l'espècie ovella anti- α -MSH (1:750; AB5087, Millipore) preparat en la solució de bloqueig durant tota la nit a 4°C. L'anticòs secundari que es va utilitzar és un ase anti-ovella Alexa Fluor 594 (1:300; A11016, Life Technologies) preparat en KPBS + 0.4% Triton X-100 i incubat durant 2 hores a temperatura ambient.

4.2.2 AgRP

Per a la tinció de les fibres de les neurones AgRP es va seleccionar una segona sèrie de les quatre tallades i les seccions es van bloquejar amb un 2% de sèrum de gallina (C5405, Sigma) en KPBS + 0.4% Triton X-100 durant 1 hora a temperatura ambient. Posteriorment es van incubar amb un anticòs primari de l'espècie conill anti-AgRP (1:500; H00357, Phoenix Pharmaceuticals) preparat en la solució de bloqueig, durant 48 hores a 4°C. L'anticòs secundari que es va utilitzar és un gallina anti-conill Alexa Fluor 488 (1:300; A21441, Life Technologies) preparat en KPBS + 0.4% Triton X-100 i incubat durant 2 hores a temperatura ambient.

4.2.3 POMC

Per a la tinció de les neurones POMC es va seleccionar una altra sèrie de les quatre tallades i les seccions es van bloquejar amb un 2% de sèrum de gallina en KPBS + 0.4% Triton X-100 durant 1 hora a temperatura ambient. Posteriorment es van incubar amb un anticòs primari de l'espècie conill anti-POMC (1:1000; H-029-30, Phoenix Pharmaceuticals) preparat en la solució de bloqueig durant tota la nit a 4°C. L'anticòs secundari que es va utilitzar és un gallina anti-conill Alexa Fluor 594 (1:200; A21442, Life Technologies) preparat en KPBS + 0.4% Triton X-100 i incubat durant 2 hores a temperatura ambient.

4.3 Anàlisi quantitatiu de fibres neuronals

Per a la quantificació de la densitat de fibres neuronals α -MSH i AgRP es van obtenir les imatges de quatre seccions representatives de cada animal al llarg del PVN (bregma entre -0.59mm i -1.23mm) mitjançant un microscopi de fluorescència (Olympus) equipat amb un objectiu de 20x. L'anàlisi es va dur a terme a cegues utilitzant el programa FIJI Launcher (ImageJ) i basat en publicacions prèvies (S. G. Bouret et al., 2004b; Haddad-Tóvolli et al., 2020).

Primer de tot, totes les imatges es van transformar a binàries per compensar la diferència en intensitat de la fluorescència entre les mostres. Després es va seleccionar una regió aleatòria de 200 x 200 μ m per imatge i es va fer una esqueletització, on cada segment de fibra passava a correspondre a un únic píxel de gruix i es mesurava la intensitat total. Finalment s'obtingué la densitat de fibres total amb la suma de totes les imatges analitzades.

4.4 Quantificació de neurones POMC

Per a determinar el número i l'àrea somàtica de les neurones POMC es van obtenir les imatges amb un microscopi de fluorescència (Olympus) amb un objectiu de 20x, i es van quantificar totes les seccions d'una sèrie al llarg de l'Arc (entre -1.1 mm i -2.7mm de bregma) de tres ratolins per grup.

En el cas de l'àrea somàtica ocupada, es va mesurar manualment l'àrea de 20 neurones POMC per ratolí i es va calcular la mitjana dels 3 ratolins per grup. En quan al número de neurones POMC, es van comptabilitzar manualment totes les neurones tenyides per POMC de cada una de les seccions de la sèrie i es va normalitzar el total de neurones per el número de seccions per animal. L'anàlisi s'ha dut a terme a cegues utilitzant el programa FIJI (ImageJ) i basat en publicacions prèvies (Claret et al., 2007; Haddad-Tóvolli et al., 2020).

5 Estudi temporal de la concentració de leptina durant el desenvolupament post-natal.

Per estudiar el patró temporal dels nivells de leptina en plasma en la descendència durant l'etapa post-natal es van utilitzar mascles i femelles provinents de 6 mares control i 9 mares tractades amb emulgents. Aquestes cries es van eutanasiar per decapitació per tal d'obtenir-ne sang, recollida del tronc, a diferents temps: P7, P10, P13 i P21. Els nivells de leptina en plasma es van mesurar mitjançant la tècnica ELISA (de

l'anglès, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) utilitzant un kit comercial específic per aquesta hormona (90080, Crystal Chem).

6 Paràmetres fisiològics i metabòlics

Per mesurar diferents paràmetres metabòlics, les mateixes cohorts van ser seguides des del deslletament (P21) fins a l'edat adulta.

6.1 Pes i greix corporal

Ambdós paràmetres es van mesurar mitjançant una balança de precisió en les diferents etapes estudiades. El pes corporal està representat en grams i el greix corporal, provinent dels reservoris gonadals (eWAT per mascles i gWAT per femelles), està normalitzat per el pes corporal total i representat en forma de percentatge respecte el grup control. Els ratolins utilitzats provenien d'un total d'11 mares control i 10 mares tractades amb emulgents.

6.2 Longitud corporal

La longitud corporal, representada en centímetres (cm), es va mesurar amb un regle des del nas a la base de la cua del ratolí tant al deslletament com en edat adulta. Els ratolins utilitzats provenien d'un total de 4 mares control i 5 mares tractades amb emulgents.

6.3 Mesura de la ingesta de menjar i aigua

Per mesurar el consum de menjar i aigua, els ratolins es van individualitzar en gàbies durant una setmana per tal d'habituar-se a l'aïllament. Les mesures de la ingesta tant del menjar com del líquid (aigua o aigua suplementada amb emulgents) es van realitzar diàriament durant cinc dies consecutius. En el cas del menjar, mesurat en grams (g), es va utilitzar una balança de precisió. En el cas del líquid, mesurat en mil·lilitres (ml), es van utilitzar provetes calibrades.

6.4 Concentració de glucosa en sang

Els nivells de glucosa basal en sang es van mesurar després de 6 hores de dejú, a través d'una petita incisió a la punta de la cua, mitjançant un glucòmetre (Nova Pro Biomedical). Els ratolins utilitzats provenien d'un total d'11 mares control i 10 mares tractades amb emulgents.

6.5 Concentració d'insulina i leptina en plasma

Es van mesurar els nivells de diferents hormones metabòliques com la insulina i la leptina en plasma. Amb aquest objectiu, es va recollir sang del tronc, en el cas dels animals eutanasiats, o d'una petita incisió a la punta de la cua després de 6 hores de dejú. La sang es va recollir mitjançant tubs del tipus *Microvettes*, un sistema de recol·lecció per capil·laritat, recoberts d'EDTA (16444, Sarstedt). Els tubs amb les mostres de sang recollides es mantingueren en gel fins ser centrifugades a 3600 revolucions per minut (rpm) durant 20 minuts a 4°C. Posteriorment, es va recollir el sobrenedant, corresponent al plasma, i es van emmagatzemar a -20°C. Els nivells d'insulina i leptina en plasma es van mesurar, segons les instruccions del fabricant, mitjançant un kit ELISA comercial específic per cada una de les hormones: insulina (90080, Crystal Chem) i leptina (90030, Crystal Chem). Els ratolins utilitzats provenien d'un total d'11 mares control i 10 mares tractades amb emulgents.

6.6 Prova de tolerància a la glucosa

Per avaluar l'homeòstasi de la glucosa, es realitzà una prova de tolerància a la glucosa (GTT) on els ratolins s'injectaren amb un bolus de D-glucosa (2g/kg) via IP després de 6 hores (ratolins al deslletament) o 14-16 hores (ratolins adults) de dejú. Els nivells de glucosa en sang es mesuraren després de 0, 15, 30, 60 i 120 minuts de l'administració de la glucosa (620724, Fresenius Kabi) a través d'una petita incisió a la punta de la cua i mitjançant un glucòmetre. En aquest estudi s'han utilitzat ratolins provinents d'un total d'11 mares control i 10 mares tractades amb emulgents.

6.7 Prova de sensibilitat a la insulina

La sensibilitat a la insulina s'avaluà mitjançant una prova de tolerància a la insulina (ITT) on es va seguir el mateix procediment que amb la GTT, però en aquest cas en comptes d'injectar glucosa se'ls hi administrà (via IP) un bolus d'insulina (0,3 mU/Kg ratolins al deslletament; 0,4 mU/kg en ratolins adults en dieta estàndard; 0,5 mU/Kg en ratolins adults en dieta "*Western*") després de 6 hores de dejú. En aquest cas, també es mesurà els nivells de glucosa en sang després de 0, 15, 30, 60 i 120 minuts de l'administració de la insulina amb un glucòmetre. La dosi d'insulina (710008.9, Lilly) administrada s'optimitzà segons l'edat i/o condicions ja que la diferència en pes corporal i composició podia alterar la sensibilitat a la insulina. Els ratolins utilitzats provenien d'un total d'11 mares control i 10 mares tractades amb emulgents.

6.8 Prova de sensibilitat a la leptina

Per a mesurar la sensibilitat dels animals als efectes anorexigènics de la leptina, els ratolins es van individualitzar i habitar a la subjecció, manipulació i injecció IP cada dia (durant una setmana) abans de l'experiment. Aquesta estratègia va permetre minimitzar l'estrès i la seva interferència als resultats.

Durant la prova de la leptina, ratolins de 12 setmanes d'edat de cada grup experimental, es van injectar via IP amb 1,5 mg/g de leptina per ratolí (498OB05M, R&D Systems) o salí dues vegades al dia (1 hora abans d'apagar les llums (19.00h) i 1 hora abans d'encendre-les (08.00h) durant 3 dies consecutius. Es va mesurar diàriament, a la mateixa hora, la ingesta i el pes corporal.

Per aquest estudi es va realitzar un disseny experimental de creuament de tractaments, on els mateixos ratolins se'ls hi ha intercanviat el tractament aplicat (salí-leptina i leptina-salí) després d'un període de rentat (*wash out*) d'una setmana. Aquesta estratègia ens va permetre mesurar els efectes del salí i la leptina en els mateixos individus, reduint la variabilitat entre subjectes, controlant millor les variables i augmentant el poder estadístic de l'estudi. Els ratolins utilitzats provenien d'un total de 4 mares control i 5 mares tractades amb emulgent.

7 Estudis de comportament

Per a la realització de les diferents proves conductuals, els ratolins es van aclimatar a la sala de comportament durant una hora abans de la realització de l'experiment. La intensitat de la llum de la sala on estava situada l'arena es va regular segons els requeriments de cada una de les proves realitzades. Abans i després de cada ronda, l'arena es netejà amb etanol al 70% i es deixà 1-2 minuts per tal d'eliminar l'olor del desinfectant.

Durant l'enregistrament de les proves, l'investigador sempre es mantingué fora de la sala experimental. Totes les proves es van enregistrar mitjançant una videocàmera, localitzada de manera fixa sobre l'arena, emmagatzemades en un ordinador i posteriorment analitzades amb un programa específic per a comportament, que ens permetia fer el seguiment del ratolí a partir del vídeo (SMART v3.0, Panlab).

Per als estudis amb dieta estàndard, es van utilitzar ratolins adults provinents de 5 mares control i 6 mares tractades amb emulgents. En el cas dels estudis en adults amb

dieta tipus “Western”, els ratolins provenien de 5 mares control i 4 mares tractades amb emulgents.

7.1 Camp obert

La prova de camp obert, coneguda en anglès com a *open field* (OF), és àmpliament utilitzada en el camp de la conducta per tal de mesurar l’exploració i l’activitat general del ratolí. El protocol que es va utilitzar està basat en estudis previs (Fan et al., 2019). Els ratolins es van col·locar individualment i per primera vegada al centre d’una arena de metacrilat opaca (35 x 35 x 35 cm) en una habitació amb la intensitat de la llum baixa (<30 lux) per tal de generar un entorn segur i sense estrès (Fig 13). S’enregistrà, mitjançant una videocàmera, la seva activitat exploratòria durant 15 minuts i s’analitzà posteriorment la distància total i el temps en cada posició (centre o cantonada) dins l’arena amb el programa SMART v3.0 (Panlab).

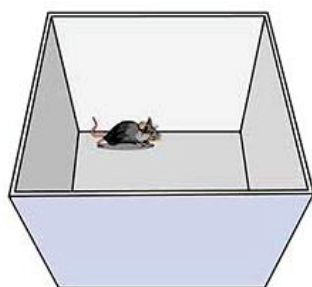


Figura 13. Representació esquemàtica de la prova camp obert (OF).
Imatge de (La-Vu et al., 2020).

7.2 Caixa foscor/llum

La prova de la caixa foscor/llum, coneguda en anglès com a *dark-light box* (DLB), és àmpliament utilitzada per a detectar trastorns d’ansietat en ratolins aprofitant l’aversió d’aquests a les zones amb molta llum. El protocol que es va seguir està basat en estudis previs (Fan et al., 2019). L’arena de metacrilat utilitzada per aquest paradigma constava de dos compartiments, un tancat i fosc i l’altre obert i fortament il·luminat (200 lux), de la mateixa mida i connectats entre ells (Fig 14). Al ratolí se’l col·locà a dins del compartiment fosc i se’l va permetre moure’s lliurement entre els dos compartiments durant 5 minuts. La seva activitat es va enregistrar mitjançant videocàmera i s’analitzà posteriorment amb el programa SMART v3.0 (Panlab), permetent mesurar el temps que passava en cada compartiment. Els models amb desordres d’ansietat tendeixen a passar menys temps en el compartiment il·luminat.

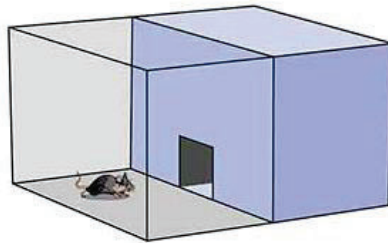


Figura 14. Representació esquemàtica de la prova de la caixa foscor/llum (DLB).
Imatge de (La-Vu et al., 2020).

7.3 Laberint elevat en forma de creu

La prova del laberint elevat en forma de creu, coneguda en anglès com *elevated plus-maze* (EPM), també és una prova clàssica per a mesurar desordres d'ansietat aprofitant l'aversion dels ratolins a estar en espais oberts. El protocol que es va utilitzar està basat en estudis previs (Fan et al., 2019). L'aparell que s'utilitzà està dissenyat específicament per aquesta tasca, i que constava d'un laberint elevat en forma de creu amb quatre braços, dos dels quals estaven oberts i els altres dos tancats i protegits per una paret (Fig 15). El ratolí es col·locà en el centre de l'aparell i mitjançant una videocàmera es va enregistrar el seu comportament durant 5 minuts. Posteriorment, s'analitzà amb el programa SMART v3.0 (Panlab) el temps que passava en els braços oberts i en els tancats. Els models amb desordres d'ansietat tendeixen a preferir estar en els braços tancats.

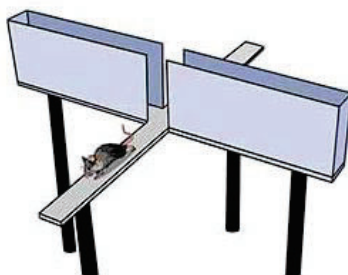


Figura 15. Representació esquemàtica de la prova del laberint elevat en forma de creu (EPM).
Imatge de (La-Vu et al., 2020).

7.4 Reconeixement d'un objecte nou

La prova de reconeixement d'un objecte nou, coneguda en anglès com a *novel object recognition test* (NORT), és àmpliament utilitzada per la comunitat científica per tal d'avaluar la memòria de reconeixement visual en ratolins. El protocol que es va utilitzar ha estat adaptat d'estudis previs (Leger et al., 2013). Per aquesta prova s'utilitzà la mateixa arena (35 x 35 x 35 cm) i condicions lumíniques (<30 lux) que en la prova del camp obert.

El paradigma consta de tres fases: (1) Fase d'habitució, on els ratolins van estar exposats durant 10 minuts, 3 dies consecutius, a una arena totalment buida. (2) Fase d'entrenament, els ratolins al quart dia, se'ls va tornar a col·locar a la mateixa arena durant 10 minuts però amb dos objectes idèntics i distribuïts de manera equidistants entre ells. (3) Fase experimental, 2 hores després d'haver realitzat la fase d'entrenament, els ratolins es tornaren a deixar durant 10 minuts a la mateixa arena però en aquest cas un dels dos objectes es canvià per un de nou (Fig 16).

Les dues últimes fases, la d'entrenament i l'experimental, van ser enregistrades mitjançant una videocàmera i l'anàlisi dels vídeos es va dur a terme a posteriori, on es mesurà el temps d'exploració de cada objecte manualment i a cegues per tal de calcular l'índex de discriminació:

$$\text{Índex de discriminació} = \frac{\text{Temps exploració (objecte nou)} - \text{Temps exploració (objecte familiar)}}{\text{Temps total d'exploració (objecte nou + objecte familiar)}}$$

Un valor d'índex de discriminació igual a 0 està indicant una exploració equitativa per ambdós objectes; un valor igual a 1 mostra una preferència total per l'objecte nou i un valor igual a -1 indica una preferència total per l'objecte familiar.

A través del programa SMART v3.0 (Panlab) també es va mesurar automàticament la distància total recorreguda. Els animals amb un comportament immòbil o amb un comportament d'exploració menor a 5 segons es van excloure de l'anàlisi.

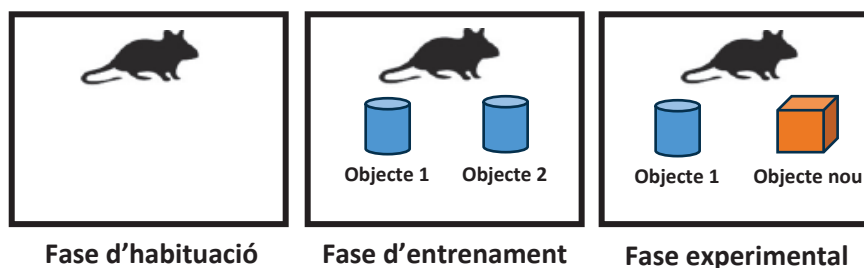


Figura 16. Representació esquemàtica de la prova de reconeixement d'un objecte nou (NORT).

8 Anàlisi estadístic

Tots els resultats estan expressats amb la mitjana $\pm$ SEM. Els anàlisis estadístics es van realitzar utilitzant el programa GraphPad Prism versió 8.0. Els experiments realitzats en les mares, així com la caracterització de la descendència al deslletament (dos grups i una variable) es van analitzar amb una prova t-Student (mostres independents i contrast bilateral). Per els estudis en adults, per tal de tenir en compte l'efecte de la programació materna (dos factors-una variable dependent), l'anàlisi estadístic que es va realitzar és una ANOVA de dos-factors amb la prova de Sidak. Una $p < 0.05$ és considerada estadísticament significatiu. Els símbols utilitzats són: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Els paràmetres estadístics es troben detallats en les figures i les seves llegendes corresponents.

RESULTATS

Resultats

1 Estudi de l'efecte del consum d'emulgents en femelles embarassades.

Per estudiar l'efecte del consum matern d'emulgents en la salut de la descendència, com ja s'ha comentat anteriorment en l'apartat 1.3 de material i mètodes, els ratolins femella C57Bl/6 es tractaren amb aigua (CTRL) o amb una barreja d'emulgents que consistia en 1% CMC i 1% P80 (Emul) durant 12 setmanes en total, 6 setmanes prèvies a l'aparellament i 6 setmanes corresponents al període de gestació i lactància (Fig 10).

En primer lloc, es realitzà una caracterització fisiològica avaluant diferents paràmetres metabòlics abans de l'aparellament (després de les 6 setmanes de tractament amb emulgents) per tal de comprovar l'estat metabòlic de les femelles previ a l'embaràs (Fig 17).

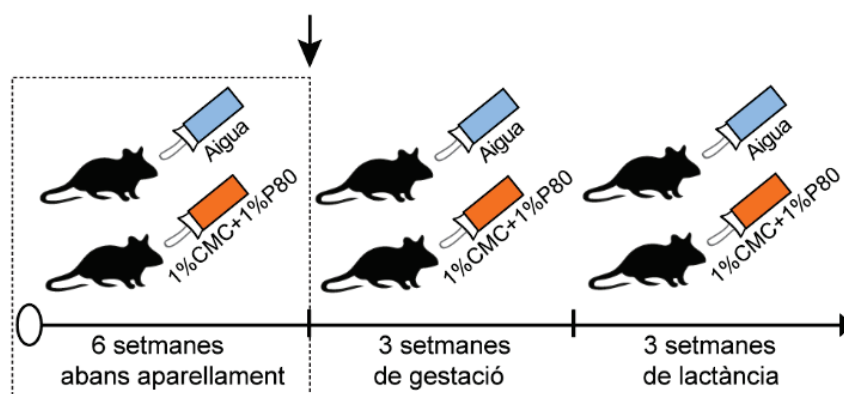


Figura 17. Esquema del disseny experimental del consum matern d'emulgents on destaca el període de caracterització matern abans de l'aparellament.

S'observà que el consum d'emulgents en femelles durant 6 setmanes no afectava el consum d'aigua en cap dels dos grups (Fig 18A), però sí que afectava (lleugera però significativament) la ingesta d'aliments, ja que les femelles tractades amb CMC+P80 disminuïren la ingesta diària de menjar un 11,57% comparades amb el grup CTRL (Fig 18B). Tanmateix, aquesta disminució en la ingesta no es veié reflectida en canvis sobre el pes corporal (Fig 18C).

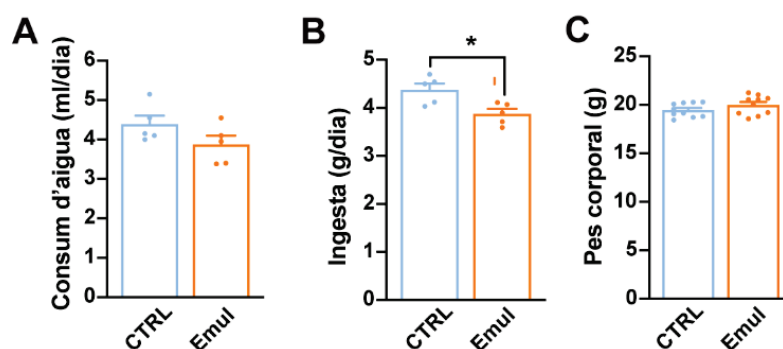


Figura 18. El consum d'emulgents durant les 6 setmanes prèvies a l'aparellament redueix lleugerament la ingesta en ratolins femella. A) Consum d'aigua diari de les femelles control i tractades amb emulgents abans de l'aparellament (n=5/grup). B) Ingesta diària de les femelles control i tractades amb emulgents abans de l'aparellament (n=5/grup). C) Pes corporal de les femelles control i tractades amb emulgents abans de l'aparellament (n=10/grup). Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova t-Student per mostres independents. * $p < 0.05$.

En relació al metabolisme de la glucosa, l'exposició als emulgents durant 6 setmanes provocà hiperglucèmia en condicions de dejú (Fig 19C), així com una lleugera intolerància a la glucosa (Fig 19A i 19B). Consistent amb la manca de canvis en el pes corporal descrit anteriorment, els nivells de leptina en plasma tampoc es van veure afectats pel tractament (Fig 19D).

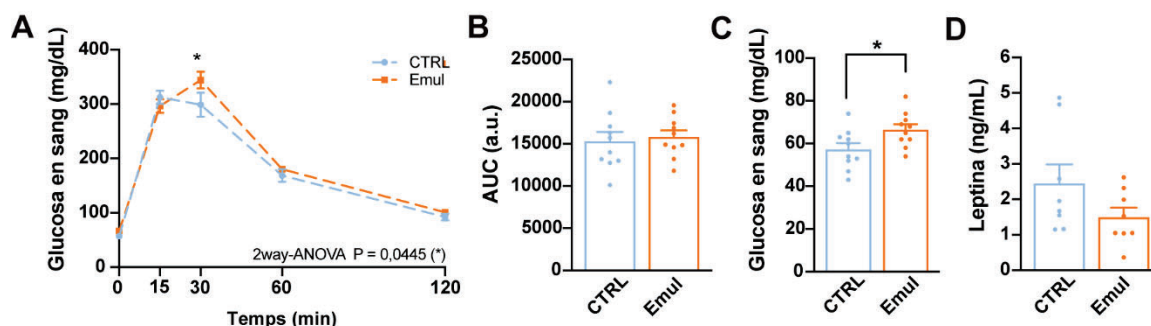


Figura 19. El consum d'emulgents durant les 6 setmanes prèvies a l'aparellament produeix hiperglucèmia i una lleu intolerància a la glucosa en ratolins femella. A) Prova de tolerància a la glucosa (GTT) i B) àrea sota la corba (AUC) de les femelles control i tractades amb emulgents abans de l'aparellament (n=10/grup). C) Nivells de glucosa basal en sang en condicions de dejú de les femelles control i tractades amb emulgents abans de l'aparellament (n=10/grup). D) Nivells de leptina en plasma després de 6h de dejú de les femelles control i tractades amb emulgents abans de l'aparellament (n=8/grup). Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova t-Student per mostres independents en els gràfics B, C i D i mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak en el gràfic A. * $p < 0.05$.

Adicionalment, també s'avaluà els diferents paràmetres metabòlics després d'una exposició continuada amb emulgents durant el període de gestació i lactància (Fig 20).

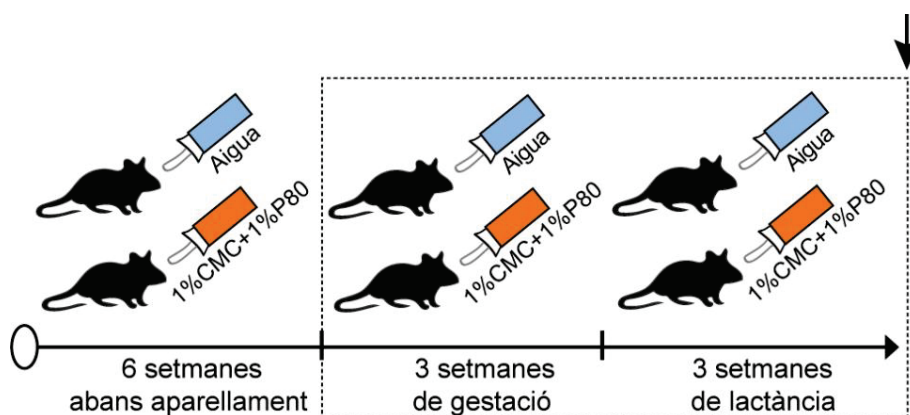


Figura 20. Esquema del disseny experimental del consum matern d'emulgents on destaca el període de caracterització matern després d'una exposició continuada als emulgents durant el període de gestació i lactància.

En aquest cas, la diferència en la ingesta d'aliments entre ambdós grups observada prèviament desaparegué després d'un tractament més llarg i continuat (Fig 21A). Tampoc es detectaren canvis en el pes corporal (Fig 21B) ni en la massa del teixit adipós gonadal (Fig 21C).

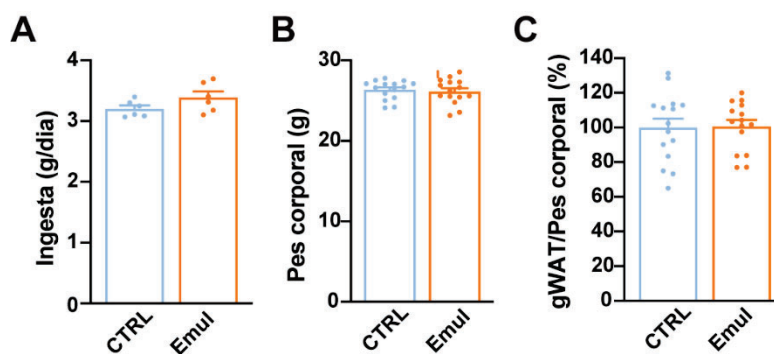


Figura 21. Una exposició prolongada als emulgents en ratolins femella durant el període de gestació i lactància no afecta la ingesta, el pes corporal ni l'adipositat. A) Ingesta diària de les femelles control i tractades amb emulgents després del deslletament (n=6/grup). B) Pes corporal de les femelles control i tractades amb emulgents després del deslletament (n=15/grup). C) Pes del teixit adipós gonadal (gWAT) normalitzat per el pes corporal total i representat en % respecte el grup control de femelles control i tractades amb emulgents després del deslletament (n=15/grup). Les dades del gràfic A provenen d'un sol experiment. Les dades dels gràfics B i C corresponen a la combinació de dos experiments diferents. Les dades estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova t-Student per mostres independents.

Per el que fa al metabolisme de la glucosa, després d'una exposició als emulgents prolongada, la intolerància a la glucosa observada anteriorment s'intensificà (Fig 22A i 22B). Tanmateix, no s'observaren canvis en els nivells de glucosa basal (Fig 22C) ni tampoc en els nivells de leptina i insulina en plasma en condicions de dejú (Fig 22D i 22E).

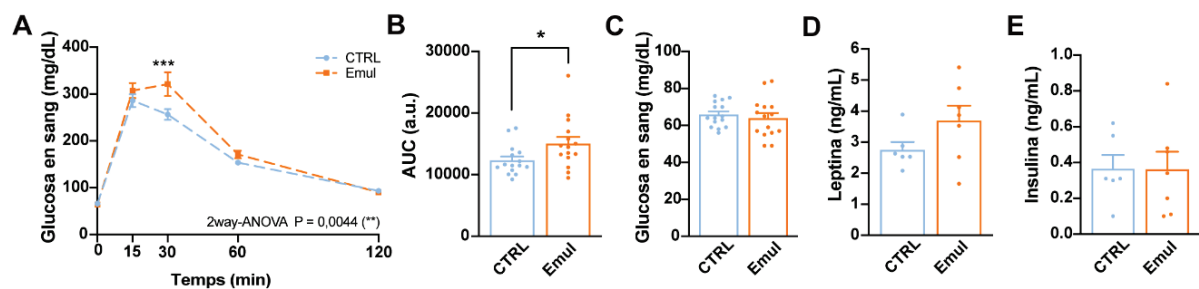


Figura 22. Una exposició prolongada als emulgents en ratolins femella durant el període de gestació i lactància intensifica la intolerància a la glucosa. A) Prova de tolerància a la glucosa (GTT) i B) àrea sota la corba (AUC) de les femelles control i tractades amb emulgents després del deslletament (n=15/grup). C) Nivells de glucosa basal en sang en condicions de dejú de les femelles control i tractades amb emulgents després del deslletament (n=15/grup). D) Nivells de leptina en plasma després de 6h de dejú de les femelles control i tractades amb emulgents després del deslletament (n=6 CTRL i n=7 Emul). E) Nivells d'insulina en plasma després de 6h de dejú de les femelles control i tractades amb emulgents després del deslletament (n=7/grup). Les dades dels gràfics D i E provenen d'un sol experiment. Les dades dels gràfics A, B i C corresponen a la combinació de dos experiments diferents. Les dades estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova t-Student per mostres independents en els gràfics B, C, D i E i mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak en el gràfic A. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Aquests resultats demostren que el consum d'emulgents altera lleugerament l'homeòstasi de la glucosa en les femelles, causant així un desequilibri en el metabolisme matern durant el període de gestació i lactància.

2 Estudi de l'efecte del consum matern d'emulgents en l'estat metabòlic de la descendència en el deslletament.

Per determinar si el consum matern d'emulgents durant el període de gestació i lactància afectava l'estat metabòlic de la descendència al deslletament, es realitzà una caracterització fisiològica avaluant diferents paràmetres metabòlics.

En primer lloc, es va determinar si el número de cries per ventrada estava alterat degut al consum matern d'emulgents. L'anàlisi de la mida de 22 camades per grup va demostrar que el tractament no afectava aquest paràmetre (Fig 23).

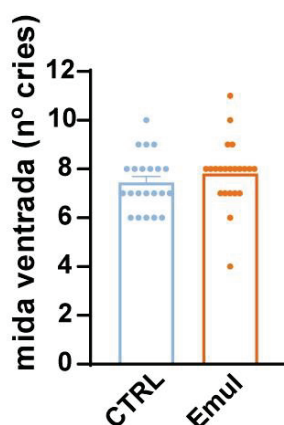


Figura 23. Una exposició prolongada als emulgents en ratolins femella durant el període de gestació i lactància no afecte la mida de la ventrada. Número de cries per ventrada de les femelles control i tractades amb emulgents ($n=22/\text{grup}$). Les dades del gràfic A provenen d'un sol experiment. Les dades del gràfic corresponen a la combinació de tots els experiments. Les dades estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova t-Student per mostres independents.

A continuació, es realitzà una caracterització a nivell fisiològic. Tant els mascles com les femelles, provinents de mares tractades amb emulgents, presentaren una longitud corporal equivalent a la dels grups control (Fig 24A) malgrat la pèrdua de pes corporal (més notable en el cas dels mascles) (Fig 24B). Els mascles, a diferència de les femelles, també presentaren una disminució del teixit adipós epididimal (Fig 24C). En relació a la glicèmia basal (Fig 24D), els nivells d'insulina (Fig 24E) i leptina (Fig 24F) en plasma en condicions de dejú, tant en mascles com en femelles, no s'observaren canvis entre grups.

En relació al metabolisme de la glucosa al deslletament, l'exposició materna als emulgents causà una lleugera intolerància a la glucosa en mascles (Fig 25A i 25B) que no s'observà en femelles (Fig 25E i 25F). Tanmateix, en relació a la sensibilitat a la insulina no s'observaren canvis entre els grups experimentals en mascles (Fig 25C i 25D) ni en femelles (Fig 25G i 25H).

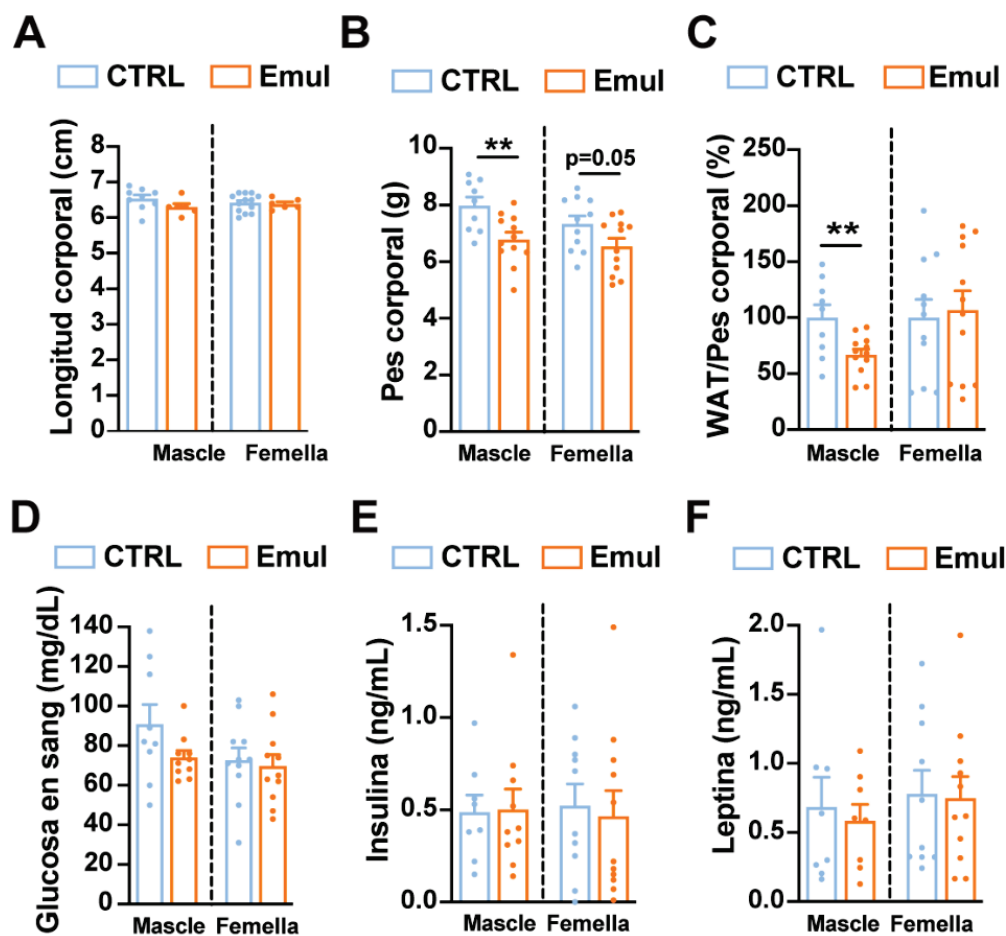


Figura 24. El consum materna d'emulgentes afecta el pes corporal i l'adipositat en mascles al deslletament. A) Longitud corporal al deslletament en mascles (n=9 CTRL i n=6 Emul) i femelles (n=13 CTRL i n=6 Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgentes. B) Pes corporal al deslletament en mascles (n=9 CTRL i n=12 Emul) i femelles (n=11 CTRL i n=12 Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgentes. C) Pes del teixit adipós (epididimal i gonadal) normalitzat per el pes corporal total i representat en % respecte el grup control al deslletament en mascles (n=9 CTRL i n=12 Emul) i femelles (n=11 CTRL i n=12 Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgentes. D) Nivells de glucosa basal en sang després de 6h de dejú al deslletament en mascles (n=9 CTRL i n=10 Emul) i femelles (n=11 CTRL i n=11 Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgentes. E) Nivells d'insulina en plasma després de 6h de dejú al deslletament en mascles (n=8 CTRL i n=10 Emul) i femelles (n=10 CTRL i n=11 Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgentes. F) Nivells de leptina en plasma després de 6h de dejú al deslletament en mascles (n=8 CTRL i n=8 Emul) i femelles (n=10 CTRL i n=11 Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgentes. Les dades del gràfic A provenen d'un sol experiment. Les dades dels gràfics B, C, D, E i F corresponen a la combinació de dos experiments diferents. Les dades estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova t-Student per mostres independents. ** $p < 0.01$.

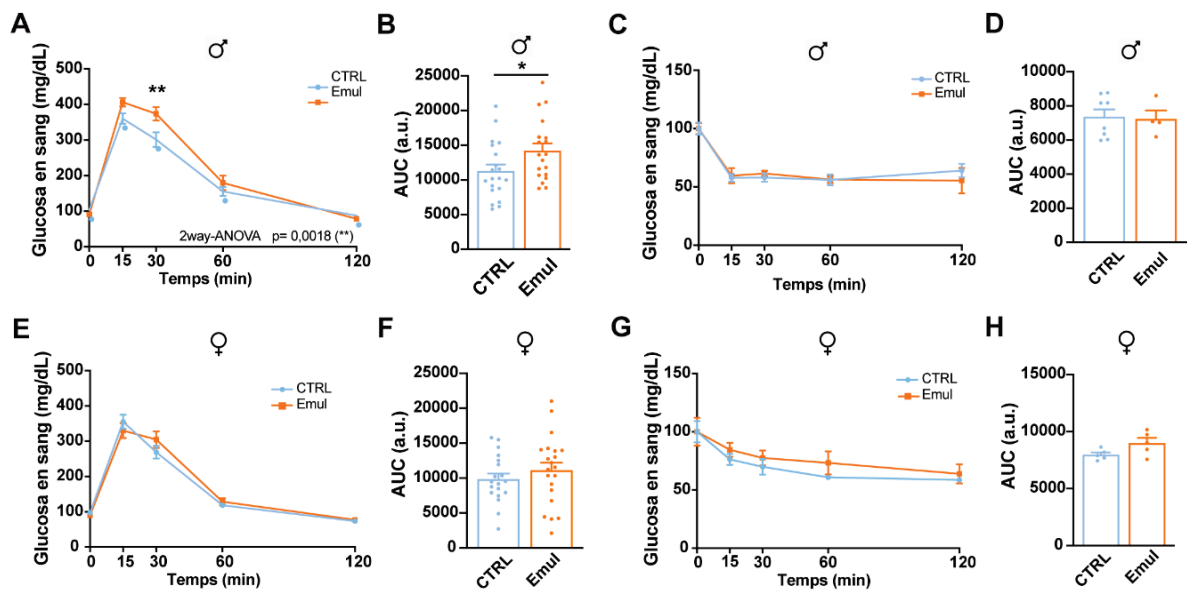


Figura 25. El consum matern d'emulgents provoca alteracions lleus en el metabolisme de la glucosa al deslletament en mascles. A) Prova de tolerància a la glucosa (GTT) i B) àrea sota la corba (AUC) al deslletament en mascles (n=20 CTRL i n=19 Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents. C) Prova de tolerància a la insulina (ITT) i D) àrea sota la corba (AUC) al deslletament en mascles (n=8 CTRL i n=4 Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents. E) Prova de tolerància a la glucosa (GTT) i F) àrea sota la corba (AUC) al deslletament en femelles (n=19 CTRL i n=21 Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents. G) Prova de tolerància a la insulina (ITT) i H) àrea sota la corba (AUC) al deslletament en mascles (n=5 CTRL i n=5 Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents. Les dades dels gràfics C, D, G i H provenen d'un sol experiment. Les dades dels gràfics A, B, E, i F corresponen a la combinació de dos experiments diferents. Les dades estan expressades amb la mitjana ± SEM. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una prova t-Student per mostres independents en els gràfics B, D, F i H i mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak en els gràfics A, C, E i G. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Està ben documentat que entre els dies P7-P10 els ratolins experimenten un augment molt marcat de la concentració circulante de leptina independent de l'adipositat o la ingesta d'aliment (Ahima et al., 1998b; Skowronski et al., 2022). Aquest pic de leptina juga un paper fonamental en la formació i maduració dels circuits neuronals hipotalàmics implicats en la regulació del balanç energètic i el metabolisme (S. G. Bouret et al., 2004b; S. G. Bouret, 2010a). Per això es va decidir realitzar, en el nostre model, un estudi més acurat dels nivells de leptina en plasma en diferents edats del desenvolupament post-natal (P7, P10, P13 i P21).

Congruent amb anteriors estudis, els mascles nascuts de mares control presentaren el punt màxim característic en l'augment de la leptina a P10. En canvi, en el cas dels mascles nascuts de mares tractades amb emulgents, aquest pic es veié retardat fins a P13 malgrat que la magnitud de concentració de leptina és equivalent (Fig 26A). A P10 s'observà una reducció significativa de la concentració de leptina en plasma en aquest grup experimental (Fig 26A i 26B). En el cas de les femelles, no s'observaren canvis destacables entre ambdós grups (Fig 26C).

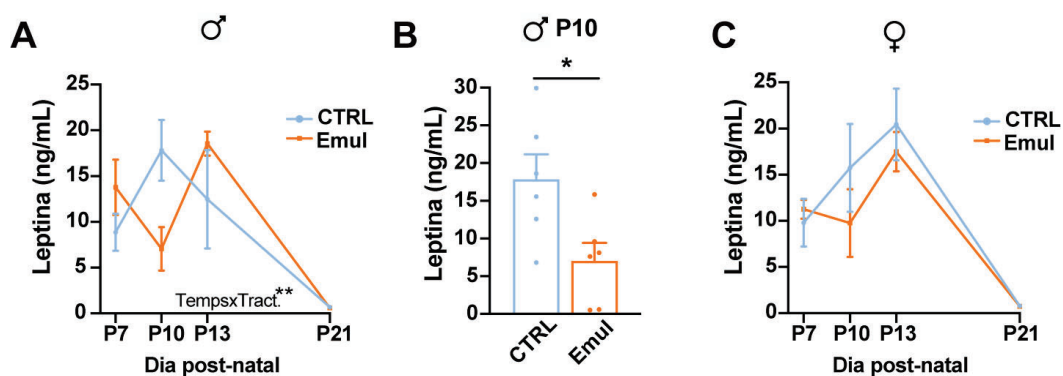


Figura 26. El consum matern d'emulgents altera els nivells de leptina durant el desenvolupament hipotalàmic en mascles. A) Nivells de leptina en plasma durant el desenvolupament post-natal (P7; P10; P13 i P21) (P7 n=6 CTRL i n=5 Emul; P10 n=6 CTRL i n=6 Emul; P13 n=6 CTRL i n=6 Emul; P21 n=8 CTRL i n=8 Emul) en mascles descendents de mares control i tractades amb emulgents. B) Nivells màxims de leptina en plasma a P10 (n=6 CTRL i n=6 Emul) en mascles descendents de mares control i tractades amb emulgents. C) Nivells de leptina en plasma durant el desenvolupament post-natal (P7; P10; P13 i P21) (P7 n=6 CTRL i n=4 Emul; P10 n=6 CTRL i n=4 Emul; P13 n=6 CTRL i n=4 Emul; P21 n=10 CTRL i n=11 Emul) en femelles descendents de mares control i tractades amb emulgents. Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una prova t-Student per mostres independents en el gràfic B i mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak en els gràfics A i C. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

3 Estudi de l'efecte del consum matern d'emulgents sobre els circuits de la melanocortina en la descendència al deslletament.

El consum matern d'emulgents està associat a canvis en l'expressió de neuropèptids relacionats amb el comportament alimentari en ratolins adults (Holder et al., 2019). Per tal de tenir una visió més ampla i exhaustiva de l'impacte de l'exposició materna als emulgents durant la gestació i la lactància en el desenvolupament de l'hipotàlem, es seqüencià el MBH (RNA-seq) de mascles provinents de mares control i mares tractades amb emulgents al deslletament.

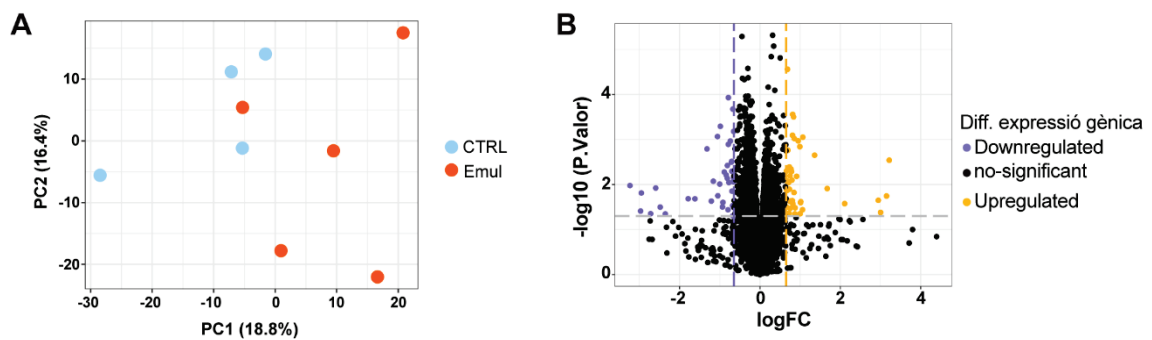


Figura 27. Anàlisi de la seqüenciació d'ARN de l'hipotàlem de la descendència al deslletament. A) Gràfic PCA on es mostra la distribució de les mostres seqüenciades (n=4 CTRL i n=5 Emul). B) Diagrama de volcà on es representen els nivells d'expressió gènica del MBH al deslletament descendents de mares control i tractades amb emulgents (n=4 CTRL i n=5 Emul). Es va considerar el llindar per el FC (± 1.5) i FDR ($p < 0.05$). En negre estan representats els gens sense canvis en l'expressió gènica, en groc els gens amb una sobre expressió i en lila els que presenten una expressió reduïda.

En primer lloc, es realitzà un anàlisi de components principals (PCA) de totes les mostres seqüenciades on es poden identificar dues agrupacions de les mostres que es comporten i distribueixen de forma diferent entre elles segons el tractament que hagin rebut de les mares durant el període de gestació i lactància (Fig 27A). Aquests resultats indiquen que els dos grups experimentals presenten patrons generals d'expressió gènica distintius.

L'anàlisi dels resultats obtinguts de l'RNA-seq també van mostrar un clar patró diferencial d'expressió gènica. Concretament, es van observar 83 gens del MBH de la descendència expressats de manera diferencial entre els dos grups experimentals, on un 54% (45) dels gens estaven sobre expressats, i un 46% (38) presentaven una expressió gènica reduïda (Fig 27B; Annex 1).

També es realitzà un anàlisi PEA (de l'anglès *enriched pathway analysis*) partint dels 38 gens amb una expressió gènica reduïda per tal d'identificar diferents vies i processos biològics comuns que estiguessin significativament associats amb l'activitat reguladora d'aquests gens. Bàsicament, aquest anàlisi va revelar 4 funcions principals: (a) comportament alimentari/neuropèptids, (b) activitat neuronal, (c) metabolisme i (d) regulació transcripcional (Fig 28, Annex 2).

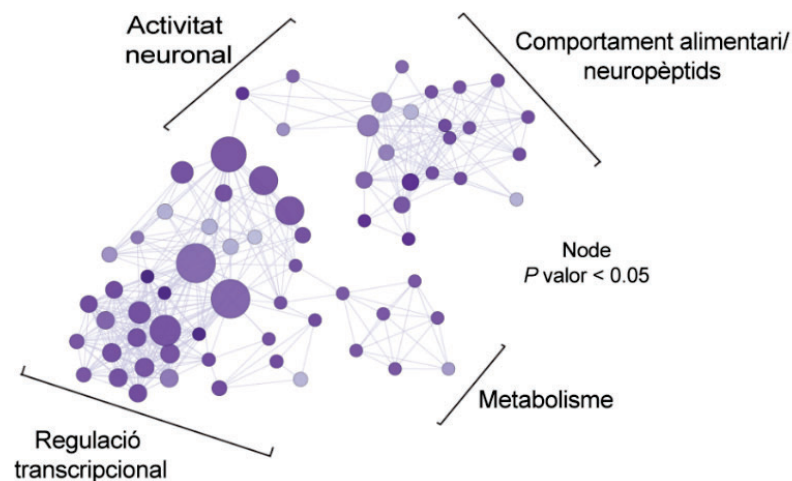


Figura 28. Representació de les principals funcions biològiques associades a una baixa expressió gènica en la descendència provinent d'una exposició materna als emulgents. Gràfic de tipus "Cytoscape".

Per verificar si el consum matern d'emulgents té un efecte en el desenvolupament dels circuits neuronals que controlen la ingesta, s'analitzà l'expressió de diferents gens associats al control homeostàtic de l'alimentació i el balanç energètic (*pomc*, *cart*, *agrp*, *npv*, *pcsk1*, *mc3r* i *mc4r*) mitjançant la tècnica de qPCR en mostres del MBH de la descendència de femelles exposades a emulgents durant el període de gestació i lactància.

Tant els gens *pomc* com *cart* codifiquen els neuropèptids anorexigènics POMC i CART respectivament, ambdós coexpressats en les neurones POMC/CART i tenen un paper important en la reducció de la ingesta i l'augment de la despesa energètica. Els gens *agrp* i *npv* codifiquen els neuropèptids orexigènics AgRP i NPY respectivament, que estan coexpressats en les neurones AgRP/NPY i que promouen un augment de la ingesta i una disminució de la despesa energètica (Gali Ramamoorthy et al., 2015). La proproteïna convertasa 1 (PC1/3) codificada per el gen *psck1* és crucial per el processament de la proteïna POMC en l'obtenció dels pèptids que se'n deriven com és el cas de l' α MSH en l'Arc (Hill, 2010). I finalment els gens *mcr3* i *mcr4* codifiquen els receptors de melanocortina 3 i 4 respectivament, on ambos també s'ha descrit que tenen un paper clau en la regulació del metabolisme i el balanç energètic (Jais & Brüning, 2022; Krashes et al., 2016).

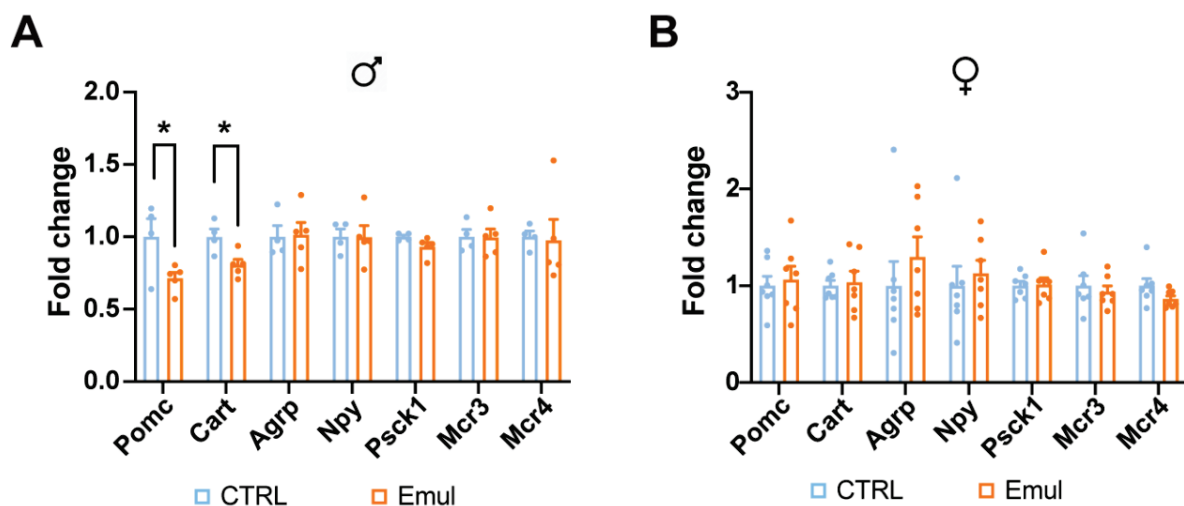


Figura 29. Disminució de l'expressió gènica de *Pomc* i *Cart* al deslletament en mascles provinents de mares exposades als emulgents. A) Expressió gènica de gens orexigènics i anorexigènics en l'MBH associats al control homeostàtic de l'alimentació i el balanç energètic en mascles (n=4 CTRL i n=5 Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents al deslletament. B) Expressió gènica de gens orexigènics i anorexigènics en l'MBH associats al control homeostàtic de l'alimentació i el balanç energètic en femelles (n=7 CTRL i n=7 Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents al deslletament. Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova t-Student per mostres independents. * $p < 0.05$. *Pomc*, pro-opiomelanocortina; *Cart*, pèptid relacionat amb la cocaïna i l'amfetamina; *Agrp*, pèptid relacionat amb l'agouti; *Npy*, neuropèptid Y; *Pscck1*, proproteïna convertasa 1; *Mcr3*, receptor de la melanocortina 3; *Mcr4*, receptor de la melanocortina 4.

L'anàlisi de l'expressió gènica del MBH al deslletament va revelar que el consum matern d'emulgents no afectava l'expressió dels gens *agrp*, *npv*, *psck1*, *mcr3* i *mc4* ni en mascles ni en femelles però sí que reduïa l'expressió de *pomc* i *cart* en mascles, que no en femelles, nascuts de mares tractades amb emulgents (Fig 29A i 29B). No obstant, aquesta reducció en l'expressió gènica de *pomc* i *cart* no es veïé reflectida ni en el número de neurones POMC en l'Arc (Fig 30A i 30B) ni tampoc en la seva mida (Fig 30C), ja que no es van observar canvis entre grups.

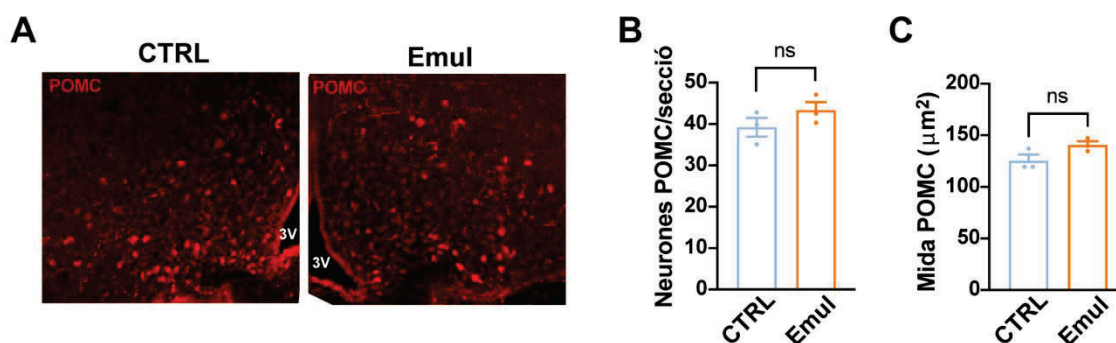


Figura 30. El consum matern d'emulgentes no afecte el número de neurones POMC ni la seva mida en l'Arc en mascles al deslletament. A) Imatge representativa a 20x de les neurones POMC a l'Arc en mascles descendents de mares control i tractades amb emulgentes a P21. B) Número de neurones POMC per secció a l'Arc en mascles descendents de mares control i tractades amb emulgentes a P21 (n=3/grup). C) Àrea de les neurones POMC a l'Arc en mascles descendents de mares control i tractades amb emulgentes a P21 (n=20 neurones per animal; 3 animals/grup). Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova t-Student per mostres independents. ns: no-significatiu; 3V: tercer ventricle.

S'ha reportat prèviament que els canvis en la dieta materna afecten el desenvolupament de les projeccions axonals a les seves àrees diana, afectant la funcionalitat dels circuits neuronals (Vogt et al., 2014; Haddad-Tóvolli et al., 2020).

Per tant, també es va avaluar si el consum matern d'emulgentes podria influenciar la densitat de les projeccions que emanen de les neurones del sistema de la melanocortina al PVN, una de les àrees diana clau. Mentre que la densitat de fibres positives pel neuropèptid AgRP al PVN mostrava una tendència a l'alça no significativa (Fig 31A), s'observà un augment molt notable en la densitat de fibres de les neurones POMC utilitzant com a marcador α -MSH (un neuropèptid derivat del processat de la pro-hormona POMC), en mascles provinents de mares tractades amb emulgentes (Fig 31B).

Aquests resultats suggereixen que el consum maternal d'emulgentes *per se* és suficient per afectar l'adequat desenvolupament dels circuits hipotalàmics anorexigènics. Aquestes alteracions podrien estar contribuint als canvis metabòlics que s'observen en els mascles descendents de mares tractades amb emulgentes.

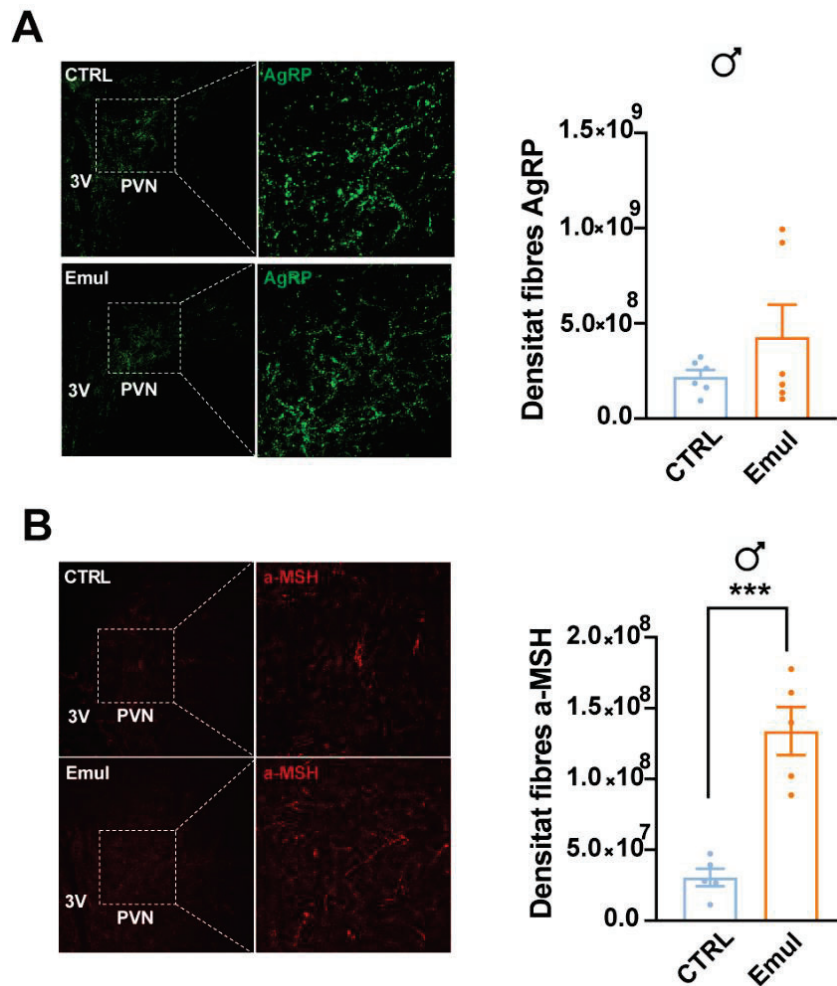


Figura 31. Alteració dels neuropèptids hipotalàmics relacionats amb la regulació del control de la ingesta en mascles provinents de mares tractades amb emulgents. A) Imatges representatives de la immunofluorescència que mostren la tinció de les fibres AgRP en el PVN en mascles descendents de mares control i tractades amb emulgents al deslletament i la quantificació de la densitat de fibres AgRP ($n=6/\text{grup}$). B) Imatges representatives de la immunofluorescència que mostren la tinció de les fibres α -MSH en el PVN en mascles descendents de mares control i tractades amb emulgents al deslletament i la quantificació de la densitat de fibres α -MSH ($n=5/\text{grup}$). Les dades corresponen a la combinació de dos experiments diferents i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova t-Student per mostres independents. *** $p < 0.001$. PVN, nucli paraventricular de l'hipotàlem; 3V, tercer ventricle.

4 Estudi de l'efecte del consum matern d'emulgents en l'estat metabòlic de la descendència a llarg termini.

També es volgué estudiar si l'exposició en edats prematures d'aquest tipus d'additius, presents en molts aliments ultra-processats, induïa alteracions metabòliques a llarg termini. Per això, com ja s'ha comentat en l'apartat 1.3 de metodologia, al deslletament la descendència que provenia de mares CTRL i Emul es va subdividir en 4 condicions diferents: (1) mares control - cries control (CTRL - CTRL); (2) mares control - cries emulgents (CTRL - Emul); (3) mares emulgents - cries control (Emul - CTRL) i (4) mares emulgents - cries emulgents (Emul - Emul).

Aquest disseny experimental permet diferenciar entre les conseqüències metabòliques en adults degut a la programació materna o als efectes del consum d'emulgents *per se* després del deslletament.

En mascles, el consum matern d'emulgents, independentment de l'exposició al tractament després del deslletament, condueix a una disminució del pes corporal (Fig 32A), però sense canvis significatius en adipositat (Fig 32B), en la longitud corporal dels ratolins (Fig 32C), en la ingesta d'aliments (Fig 32D), en els nivells basals de glucosa en sang (Fig 32E) o en els nivells de leptina (Fig 32F) i insulina circulant (Fig 32G).

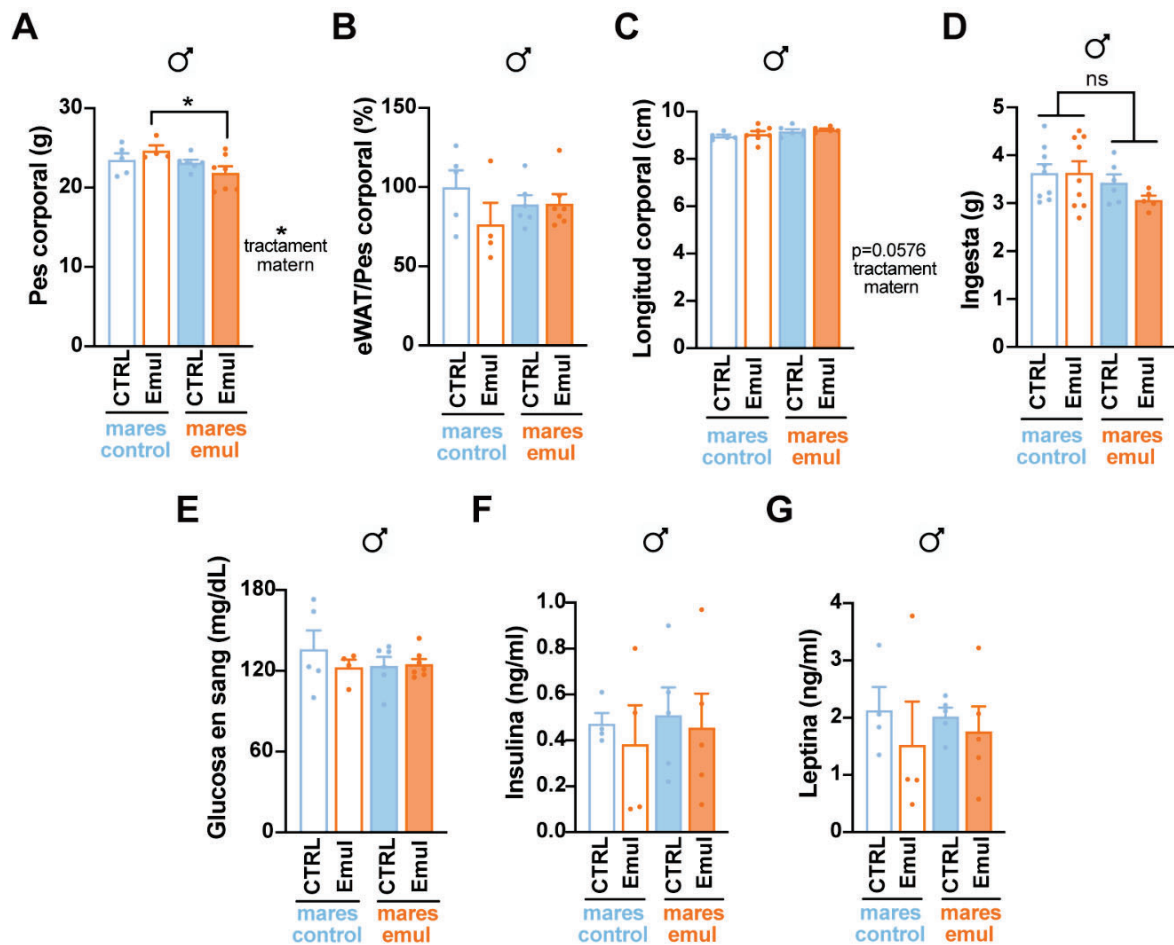


Figura 32. El consum matern d'emulgents no genera alteracions en la caracterització fisiològica de la descendència en mascles en edat adulta. **A)** Pes corporal a les 10 setmanes d'edat (n=5 CTRL-CTRL; n=4 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=7 Emul-Emul). **B)** Pes del teixit adipós epididimal normalitzat per el pes corporal total i representat en % respecte el grup control (CTRL-CTRL) a les 10 setmanes d'edat (n=5 CTRL-CTRL; n=4 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=7 Emul-Emul). **C)** Longitud corporal a les 10 setmanes d'edat (n=5 CTRL-CTRL; n=7 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul). **D)** Ingesta a les 20 setmanes d'edat (n=9 CTRL-CTRL; n=9 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul). **E)** Nivells de glucosa basal en sang després de 6h de dejú a les 10 setmanes d'edat (n=5 CTRL-CTRL; n=4 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=7 Emul-Emul). **F)** Nivells d'insulina en plasma després de 6h de dejú a les 10 setmanes d'edat (n=4 CTRL-CTRL; n=4 CTRL-Emul; n=5 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul). **G)** Nivells de leptina en plasma després de 6h de dejú a les 10 setmanes d'edat (n=4 CTRL-CTRL; n=4 CTRL-Emul; n=5 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul). Les dades dels gràfics A, B, C, E, F i G provenen d'un sol experiment. Les dades del gràfic D corresponen a la combinació de dos experiments diferents. Les dades estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak. * $p < 0.05$. ns: no-significatiu.

En relació al metabolisme de la glucosa, l'exposició materna als emulgents en mascles presentava una lleugera sensibilitat a la insulina (Fig 33C i 33D) tot i que no s'observaren canvis en els nivells de tolerància a la glucosa (Fig 33A i Fig 33B). Cal destacar però, que una llarga exposició als emulgents, durant les etapes intrauterina i post-natal, si que indueix alteracions a l'homeòstasi de la glucosa conduint a una major intolerància a la glucosa (Fig 33A i 33B).

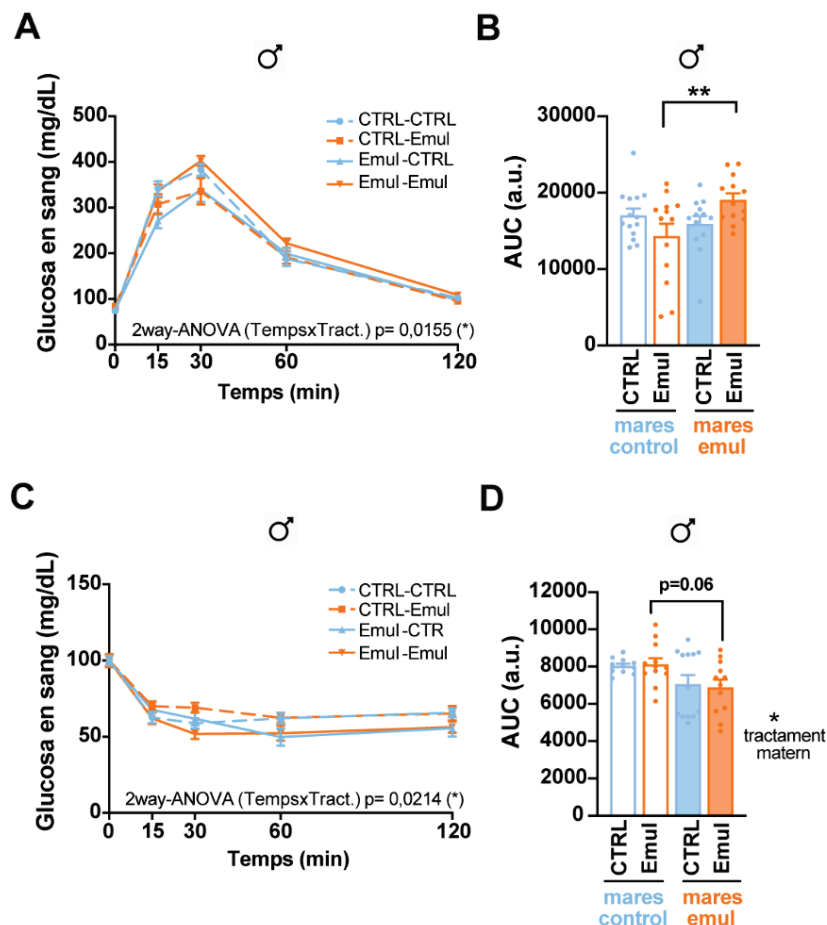


Figura 33. Una exposició prolongada als emulgents genera alteracions en el metabolisme de la glucosa de la descendència en mascles en edat adulta. A) Prova de tolerància a la glucosa (GTT) i B) àrea sota la corba (AUC) a les 10 setmanes d'edat (n=14 CTRL-CTRL; n=13 CTRL-Emul; n=13 Emul-CTRL; n=13 Emul-Emul). C) Prova de tolerància a la insulina (ITT) i D) àrea sota la corba (AUC) a les 10 setmanes d'edat (n=11 CTRL-CTRL; n=12 CTRL-Emul; n=13 Emul-CTRL; n=12 Emul-Emul). Les dades corresponen a la combinació de dos experiments diferents i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova ANOVA de dos factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Aquests efectes són dependents del sexe, ja que en les femelles no s'observà cap pertorbació en cap dels paràmetres metabòlics analitzats anteriorment (Fig 34A-K).

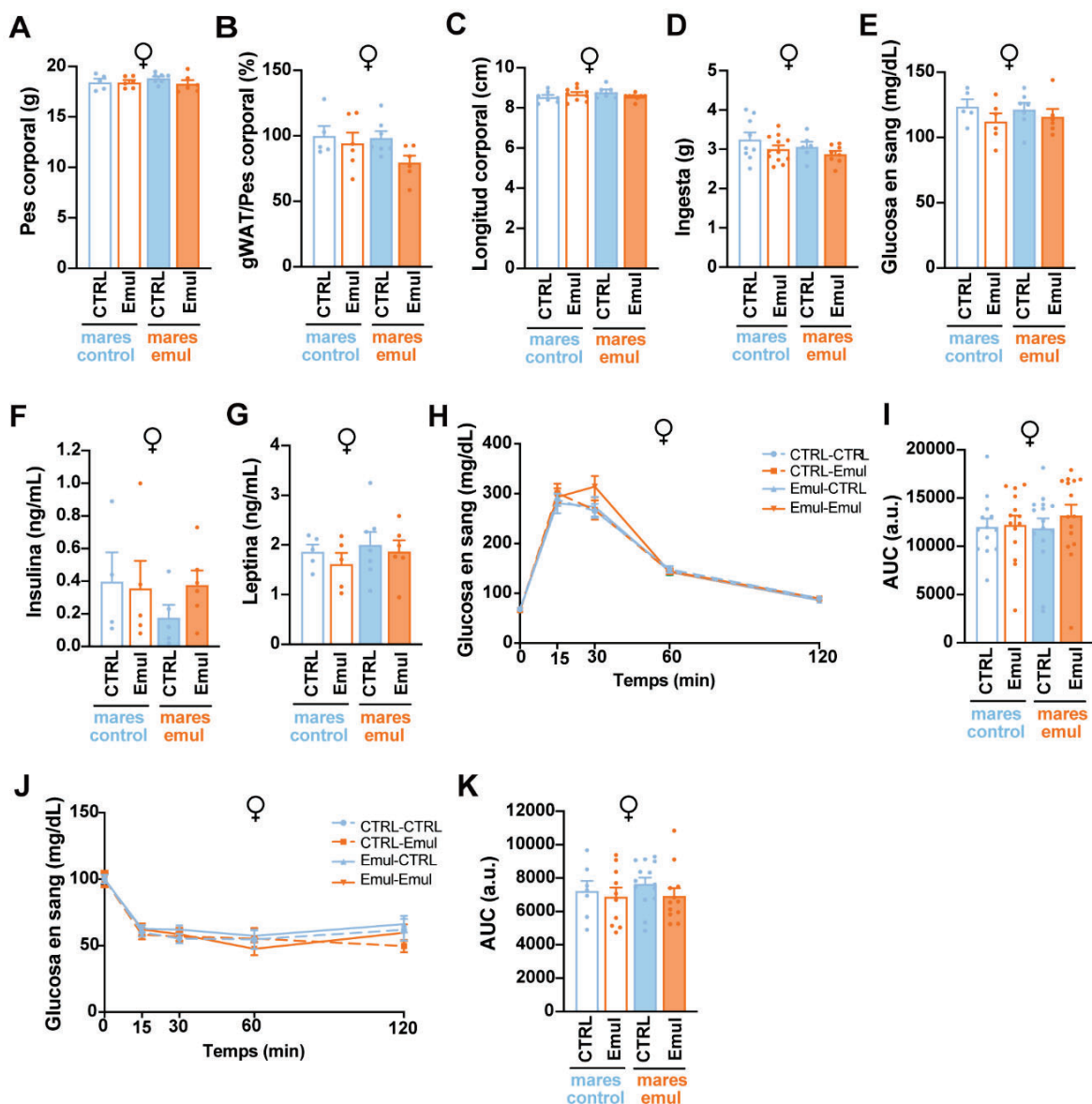


Figura 34. El consum matern d'emulgents no afecte en la caracterització fisiològica de la descendència en femelles en edat adulta. A) Pes corporal a les 10 setmanes d'edat (n=5 CTRL-CTRL; n=6 CTRL-Emul; n=7 Emul-CTRL; n=6 Emul-Emul). B) Pes del teixit adipós gonadal normalitzat per el pes corporal total i representat en % respecte el grup control (CTRL-CTRL) a les 10 setmanes d'edat (n=5 CTRL-CTRL; n=6 CTRL-Emul; n=7 Emul-CTRL; n=6 Emul-Emul). C) Longitud corporal a les 10 setmanes d'edat (n=7 CTRL-CTRL; n=9 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=8 Emul-Emul). D) Ingesta a les 20 setmanes d'edat (n=9 CTRL-CTRL; n=12 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=8 Emul-Emul). E) Nivells de glucosa basal en sang després de 6h de dejú a les 10 setmanes d'edat (n=5 CTRL-CTRL; n=6 CTRL-Emul; n=7 Emul-CTRL; n=6 Emul-Emul). F) Nivells d'insulina en plasma després de 6h de dejú a les 10 setmanes d'edat (n=4 CTRL-CTRL; n=5 CTRL-Emul; n=5 Emul-CTRL; n=6 Emul-Emul). G) Nivells de leptina en plasma després de 6h de dejú a les 10 setmanes d'edat (n=5 CTRL-CTRL; n=5 CTRL-Emul; n=7 Emul-CTRL; n=6 Emul-Emul). H) Prova de tolerància a la glucosa (GTT) i I) àrea sota la corba (AUC) a les 10 setmanes d'edat (n=13 CTRL-CTRL; n=14 CTRL-Emul; n=15 Emul-CTRL; n=15 Emul-Emul). J) Prova de tolerància a la insulina (ITT) i K) àrea sota la corba (AUC) a les 10 setmanes d'edat (n=7 CTRL-CTRL; n=10 CTRL-Emul; n=14 Emul-CTRL; n=12 Emul-Emul). Les dades dels gràfics A, B, C, E, F i G provenen d'un sol experiment. Les dades dels gràfics D, H, I, J i K corresponen a la combinació de dos experiments diferents. Les dades estan expressades amb la mitjana ± SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak.

També s'investigà la capacitat de resposta als efectes anorexigènics de la leptina en adults, ja que com anteriorment s'havia observat, la descendència masculina provinent de mares tractades amb emulgents presentava un retard en el pic post-natal de leptina (Fig 26A i 26B).

Amb aquest objectiu s'administrà leptina de forma exògena a la descendència, i s'observà que induïa una reducció del pes corporal i la ingesta d'aliments equivalent tant en els ratolins provinents de mares exposades amb emulgents com en els sotmesos a una exposició als emulgents prolongada (Fig 35A i 35B).

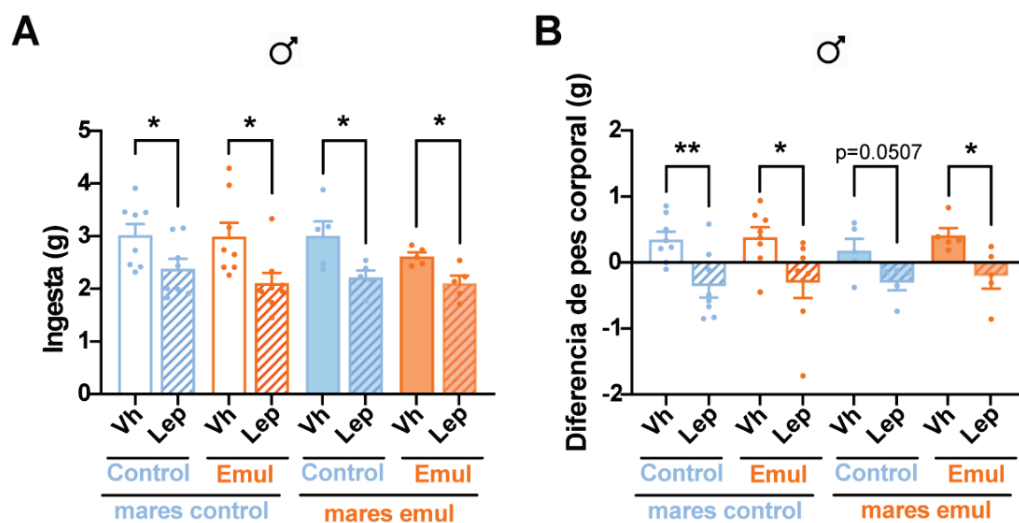


Figura 35. La descendència provinent de mares tractades amb emulgents respon amb normalitat a l'exposició exògena de leptina. A) Mitja de la ingesta nocturna en mascles després d'injectar salí (Vh) (n=8 CTRL-CTRL; n=8 CTRL-Emul; n=5 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul) o leptina (Lep) (n=8 CTRL-CTRL; n=8 CTRL-Emul; n=5 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul) a les 20 setmanes d'edat. B) Pes corporal en mascles després d'injectar salí (Vh) (n=8 CTRL-CTRL; n=8 CTRL-Emul; n=5 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul) o leptina (Lep) (n=8 CTRL-CTRL; n=8 CTRL-Emul; n=5 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul) a les 20 setmanes d'edat. Les dades corresponen a la combinació de dos experiments diferents i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova t-Student per mostres independents. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

En conjunt, aquests resultats suggereixen que el consum matern d'emulgents només afecta la programació fetal dels mascles, desencadenant petites alteracions en el metabolisme de la glucosa en l'edat adulta.

5 Estudi de l'efecte d'una combinació d'emulgents i una dieta tipus “Western” en l'estat metabòlic de la descendència.

A continuació es volgué emular experimentalment les propietats nutricionals dels UPF, que a més de contenir emulgents també contenen un elevat valor calòric. Amb aquest objectiu, es va examinar si els efectes del consum matern d'emulgents sobre la programació fetal metabòlica es podrien veure accentuats quan es combinava amb una dieta rica en greixos i sucres.

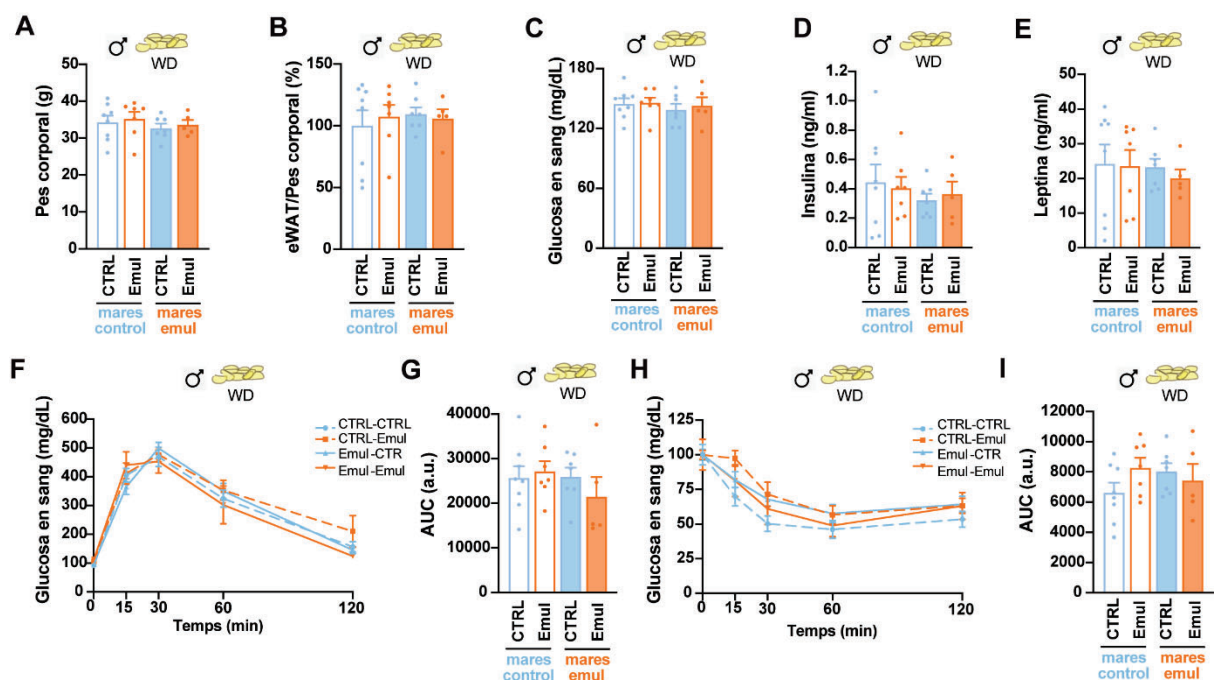


Figura 36. Les alteracions metabòliques derivades del consum d'una dieta “Western” no es veuen agreujades en mascles provinents de mares tractades amb emulgents. A) Pes corporal a les 22 setmanes d'edat, després d'11 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (WD) (n=8 CTRL-CTRL; n=7 CTRL-Emul; n=7 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul). B) Pes del teixit adipós epididimal normalitzat per el pes corporal total i representat en % respecte el grup control (CTRL-CTRL) a les 22 setmanes d'edat, després d'11 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (n=8 CTRL-CTRL; n=7 CTRL-Emul; n=7 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul). C) Nivells de glucosa basal en sang després de 6h de dejú a les 22 setmanes d'edat, després d'11 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (n=8 CTRL-CTRL; n=7 CTRL-Emul; n=7 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul). D) Nivells d'insulina en plasma després de 6h de dejú a les 22 setmanes d'edat, després d'11 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (n=8 CTRL-CTRL; n=7 CTRL-Emul; n=7 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul). E) Nivells de leptina en plasma després de 6h de dejú a les 22 setmanes d'edat, després d'11 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (n=8 CTRL-CTRL; n=7 CTRL-Emul; n=7 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul). F) Prova de tolerància a la glucosa (GTT) i G) àrea sota la corba (AUC) a les 19 setmanes d'edat, després de 8 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (n=8 CTRL-CTRL; n=7 CTRL-Emul; n=7 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul). H) Prova de tolerància a la insulina (ITT) i I) àrea sota la corba (AUC) a les 19 setmanes d'edat, després de 8 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (n=8 CTRL-CTRL; n=7 CTRL-Emul; n=7 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul). Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak.

Per això, la descendència de mares controls i tractades amb emulgents a les 10 setmanes d'edat s'exposaren a una dieta tipus “Western” durant 11 setmanes consecutives. Sorprenentment, la combinació d'emulgents i dieta “Western” no empitjorà la salut metabòlica de la descendència, ja que no s'observà canvis significatius en els diversos paràmetres mesurats en ratolins mascle (Fig 36A-I).

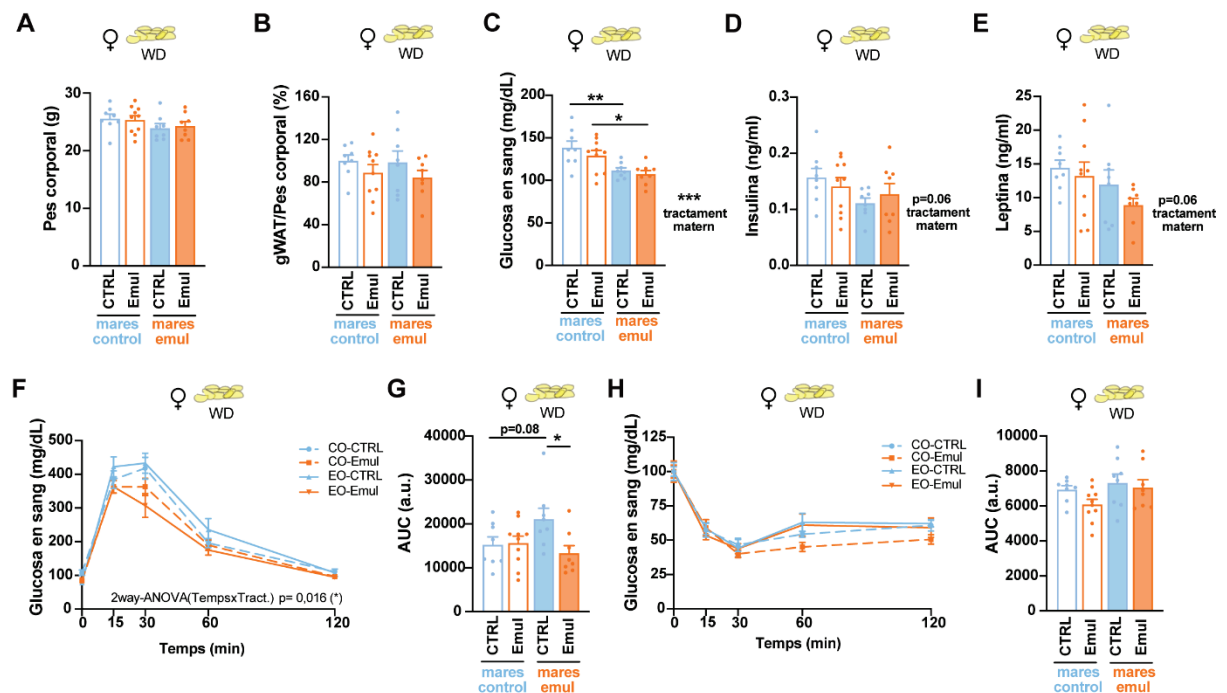


Figura 37. Resultats metabòlics derivats del consum d'una dieta “Western” en femelles descendents de mares tractades amb emulgents. A) Pes corporal a les 22 setmanes d'edat, després d'11 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (WD) (n=8 CTRL-CTRL; n=10 CTRL-Emul; n=8 Emul-CTRL; n=8 Emul-Emul). B) Pes del teixit adipós gonadal normalitzat per el pes corporal total i representat en % respecte el grup control (CTRL-CTRL) a les 22 setmanes d'edat, després d'11 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (n=8 CTRL-CTRL; n=10 CTRL-Emul; n=8 Emul-CTRL; n=8 Emul-Emul). C) Nivells de glucosa basal en sang després de 6h de dejú a les 22 setmanes d'edat, després d'11 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (n=8 CTRL-CTRL; n=10 CTRL-Emul; n=8 Emul-CTRL; n=8 Emul-Emul). D) Nivells d'insulina en plasma després de 6h de dejú a les 22 setmanes d'edat, després d'11 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (n=8 CTRL-CTRL; n=10 CTRL-Emul; n=8 Emul-CTRL; n=8 Emul-Emul). E) Nivells de leptina en plasma després de 6h de dejú a les 22 setmanes d'edat, després d'11 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (n=8 CTRL-CTRL; n=10 CTRL-Emul; n=8 Emul-CTRL; n=8 Emul-Emul). F) Prova de tolerància a la glucosa (GTT) i G) àrea sota la corba (AUC) a les 19 setmanes d'edat, després de 8 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (n=8 CTRL-CTRL; n=10 CTRL-Emul; n=8 Emul-CTRL; n=8 Emul-Emul). H) Prova de tolerància a la insulina (ITT) i I) àrea sota la corba (AUC) a les 19 setmanes d'edat, després de 8 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (n=8 CTRL-CTRL; n=10 CTRL-Emul; n=8 Emul-CTRL; n=8 Emul-Emul). Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova ANOVA de dos factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

En canvi, el consum maternal d'emulgent conjuntament amb una dieta "*Western*" en femelles adultes, s'observà que disminuïa els nivells de glicèmia (Fig 37C), insulina (Fig 37D) i leptina circulant en condicions de dejú (Fig 37E), sense presentar canvis en pes corporal i adipositat (Fig 37A i 37B). A més, les femelles provinents de mares tractades amb emulgent i amb una exposició prolongada s'observà que eren menys intolerants a la glucosa (Fig 37F i 37G) però sense canvis en relació a la sensibilitat a la insulina (Fig 37H i 37I).

En conjunt, aquests resultats suggereixen que els efectes de combinar els emulgent i una dieta "*Western*" son dependents del sexe. On en mascles aquesta combinació no accentua els efectes metabòlics observats anteriorment en la descendència, però en femelles sembla alleugerir els efectes en el metabolisme de la glucosa causats per una dieta rica en greixos i sucres.

6 Estudi de la salut neuro-psicològica de la descendència.

El consum de CMC o P80 influeix a l'aparició d'una conducta similar al trastorn d'ansietat en ratolins (Holder et al., 2019). Per tant, en aquest estudi també es va voler estudiar si el consum matern d'emulgent era suficient per causar un deteriorament neuro-psicològic en la descendència. Amb aquest objectiu es dugueren a terme diferents paradigmes conductuals, incloent la prova de camp obert (OF), el laberint elevat en forma de creu (EPM) i la prova de fosc/llum (DLB) per tal d'avaluar l'aparició d'una conducta similar al trastorn d'ansietat. .

En el paradigma de l'OF, per tal de mesurar l'activitat general del ratolí s'avaluà la distància total recorreguda. En mascles provinents de mares tractades amb emulgent no s'observaren diferències entre grups (Fig 38B) en canvi, en les femelles sense tractament descendents de mares tractades amb emulgent presentaven una distància total recorreguda més elevada, indicant que es movien més que les provinents de mares control (Fig 38D). No obstant, alhora de determinar l'activitat exploratòria mesurant el temps dedicat en cada zona (centre o cantonada) no s'observaren canvis entre grups en cap dels dos sexes (Fig 38A i 38C).

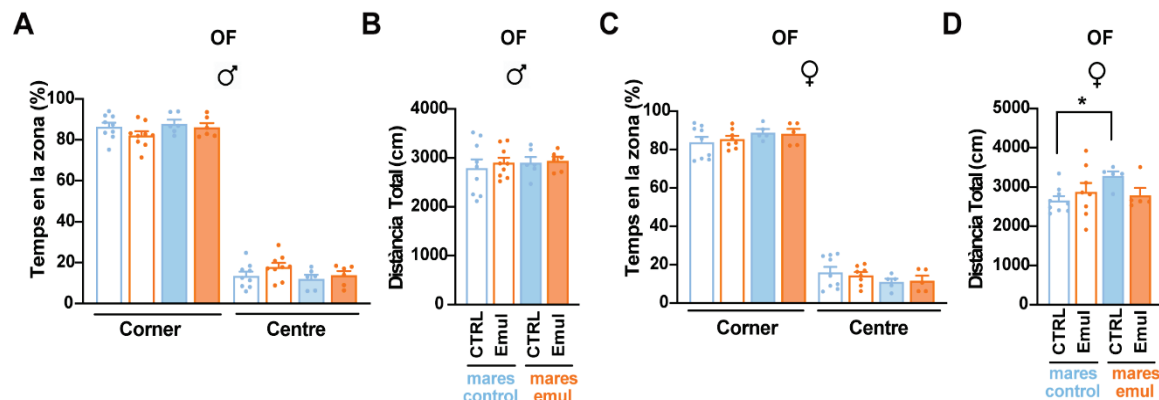


Figura 38. Avaluació de l'activitat motora de la descendència en edat adulta. A-D) Prova de camp obert a les 9 setmanes d'edat en mascles (A i B) (n=9 CTRL-CTRL; n=9 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=6 Emul-Emul) i femelles (C i D) (n=9 CTRL-CTRL; n=8 CTRL-Emul; n=5 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents on s'inclou el temps per zona representat en percentatge (A i C) i la distància total recorreguda (B i D). Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak. * $p < 0.05$.

En el paradigma de l'EPM, prova clàssica per a mesurar conductes similars al trastorn d'ansietat aprofitant l'aversion dels ratolins a estar en espais oberts, no s'observaren canvis entre grups en cap dels dos sexes ni en el temps passat en cada braç (Fig 39A i 39C) ni en la distància total recorreguda (Fig 39B i 39D).

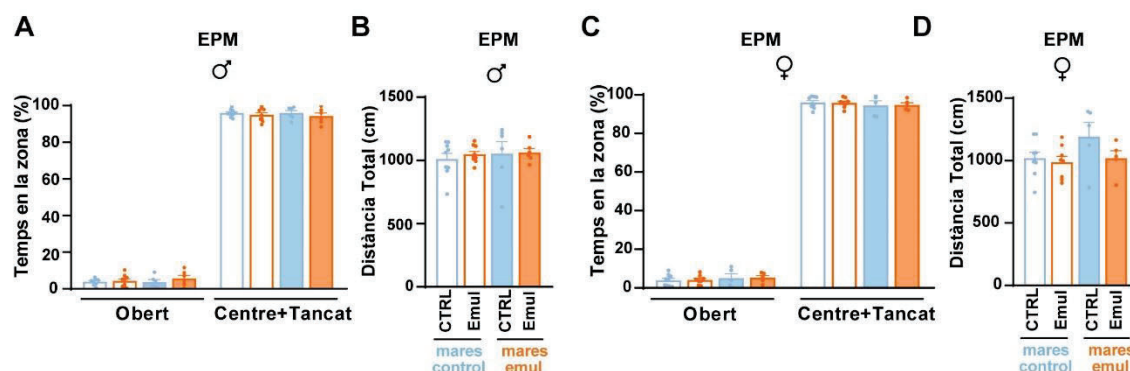


Figura 39. Avaluació d'una conducta similar al trastorn d'ansietat de la descendència en edat adulta mitjançant la prova EPM. A-D) Prova del laberint elevat en forma de creu a les 9 setmanes d'edat en mascles (A i B) (n=9 CTRL-CTRL; n=9 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=6 Emul-Emul) i femelles (C i D) (n=9 CTRL-CTRL; n=8 CTRL-Emul; n=5 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents on s'inclou el temps per zona representat en percentatge (A i C) i la distància total recorreguda (B i D). Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak.

En canvi, en el paradigma DLB, també utilitzat per a detectar conductes similars al trastorn d'ansietat aprofitant l'avversió dels ratolins a la llum, s'observà que els mascles que provenien de mares exposades als emulgents, a diferència de les femelles, 80mostraven una lleugera però significativa disminució en el temps que passaven en el compartiment il·luminat (Fig 40A i 40B). Aquest últim resultat suggereix que l'exposició materna als emulgents durant la gestació i la lactància provocarien una conducta similar al trastorn d'ansietat davant d'un factor de conflicte com la llum depenent del sexe (únicament en mascles).

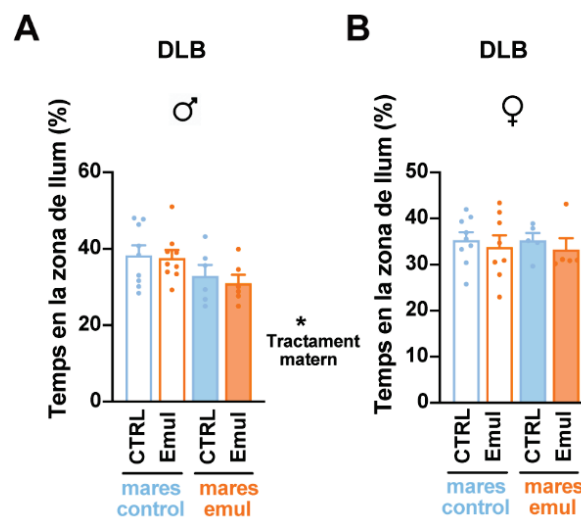


Figura 40. Avaluació d'una conducta similar al trastorn d'ansietat de la descendència en edat adulta mitjançant la prova DLB. A i B) Prova de foscor/llum a les 9 setmanes d'edat en mascles (A) (n=9 CTRL-CTRL; n=9 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=6 Emul-Emul) i femelles (B) (n=9 CTRL-CTRL; n=8 CTRL-Emul; n=5 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents on s'inclou el temps en la zona il·luminada representat en percentatge (A i B). Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana ± SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak. * $p < 0.05$.

En aquest cas, també es va volgué estudiar si els efectes observats en la salut neuropsicològica de la descendència degut al consum matern d'emulgents es podien veure accentuats amb una dieta "Western".

Els resultats van mostrar que la descendència provinent de mares tractades amb emulgents i exposades posteriorment a una dieta "Western" continuaven sense presentar canvis en l'activitat locomotora mesurada en la prova de l'OF (Fig 41A-D). Tampoc s'observà una conducta similar al trastorn d'ansietat davant d'un factor de conflicte com és l'avversió als espais oberts, mesurada per la prova de l'EPM (Fig 42A-D).

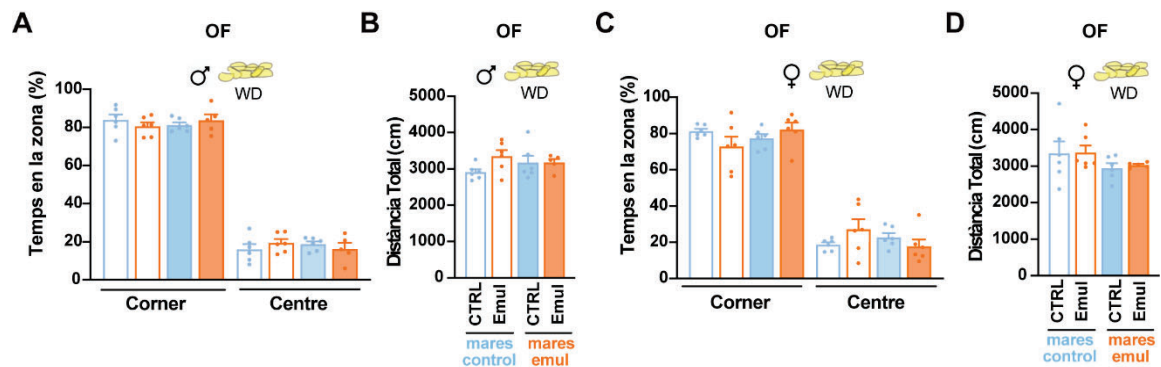


Figura 41. Avaluació de l'activitat motora de la descendència exposats a una dieta "Western" en edat adulta. A-D) Prova de camp obert a les 23 setmanes d'edat, després de 12 setmanes d'exposició a una dieta "Western" (WD) en mascles (A i B) (n=6 CTRL-CTRL; n=6 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul) i femelles (C i D) (n=6 CTRL-CTRL; n=6 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=6 Emul-Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents on s'inclou el temps per zona (A i C) i la distància total recorreguda (B i D). Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

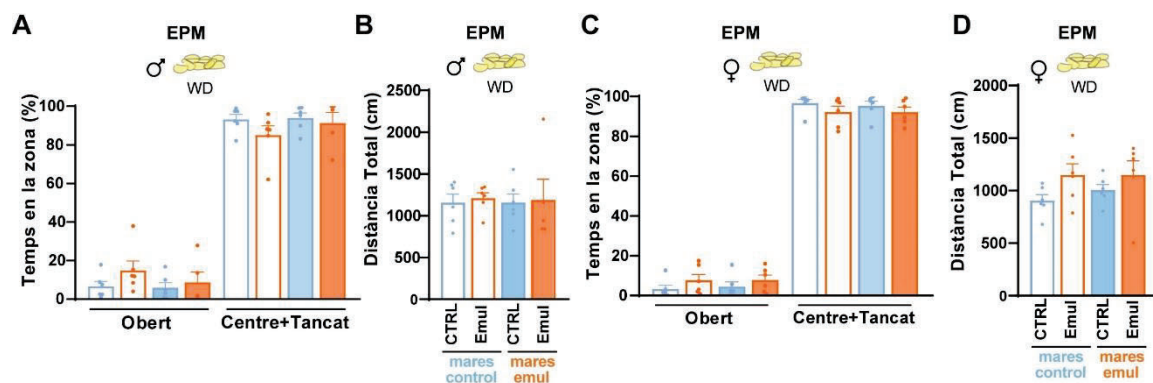


Figura 42. Avaluació d'una conducta similar al trastorn d'ansietat de la descendència exposats a una dieta "Western" en edat adulta mitjançant la prova EPM. A-D) Prova del laberint elevat en forma de creu a les 23 setmanes d'edat, després de 12 setmanes d'exposició a una dieta "Western" (WD) en mascles (A i B) (n=6 CTRL-CTRL; n=6 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=5 Emul-Emul) i femelles (C i D) (n=6 CTRL-CTRL; n=6 CTRL-Emul; n=6 Emul-CTRL; n=6 Emul-Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents on s'inclou el temps per zona (A i C) i la distància total recorreguda (B i D). Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana $\pm$ SEM. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak.

En canvi, la combinació d'una exposició a emulgents i una dieta “Western” intensificà l'aversió a la llum en la prova DLB, sobretot en femelles, on disminuï significativament el temps que passaven en el compartiment il·luminat (Fig43A i 43B).

Aquestes observacions indiquen que la combinació d'una exposició als emulgents i una dieta “Western” podria augmentar el risc de desenvolupar una conducta similar al trastorn d'ansietat en ratolins adults d'ambdós sexes descendents de mares exposades als emulgents durant la gestació i la lactància.

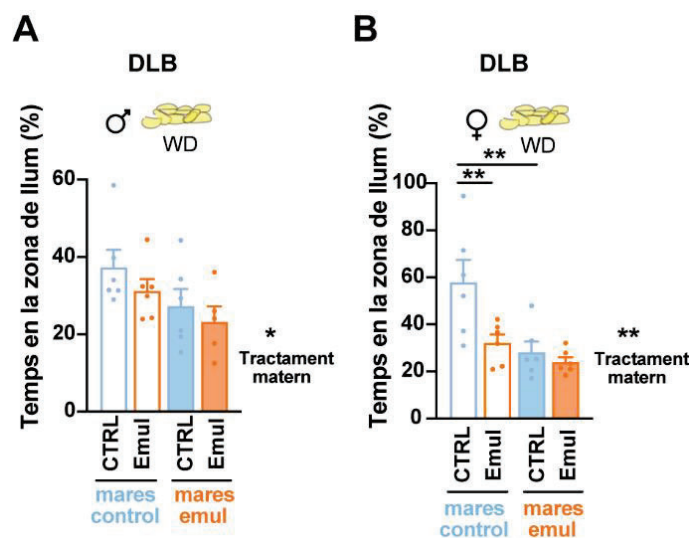


Figura 43. Avaluació d'una conducta similar al trastorn d'ansietat de la descendència exposats a una dieta “Western” en edat adulta mitjançant la prova DLB. A i B) Prova de foscor/llum a les 23 setmanes d'edat, després de 12 setmanes d'exposició a una dieta “Western” (WD), en mascles (A) (n=6 CTRL–CTRL; n=6 CTRL–Emul; n=6 Emul–CTRL; n=5 Emul– Emul) i femelles (B) (n=6 CTRL–CTRL; n=6 CTRL–Emul; n=6 Emul–CTRL; n=6 Emul– Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents on s'inclou el temps en la zona il·luminada representat en percentatge (A i B). Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana ± SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Finalment, es volgué avaluar el deteriorament de la memòria de reconeixement en la descendència provinent de mares exposades a CMC i P80 mitjançant la prova de reconeixement d'un objecte (NORT), ja que està descrit que certs insults dietètics en períodes de gestació estan relacionats amb disfuncions cognitives en la descendència (Hasebe et al., 2021; Bodden et al., 2021).

En aquest cas, no es van observar canvis significatius en el reconeixement de memòria després d'una exposició materna als emulgents tant en mascles com en femelles (Fig 44A-D).

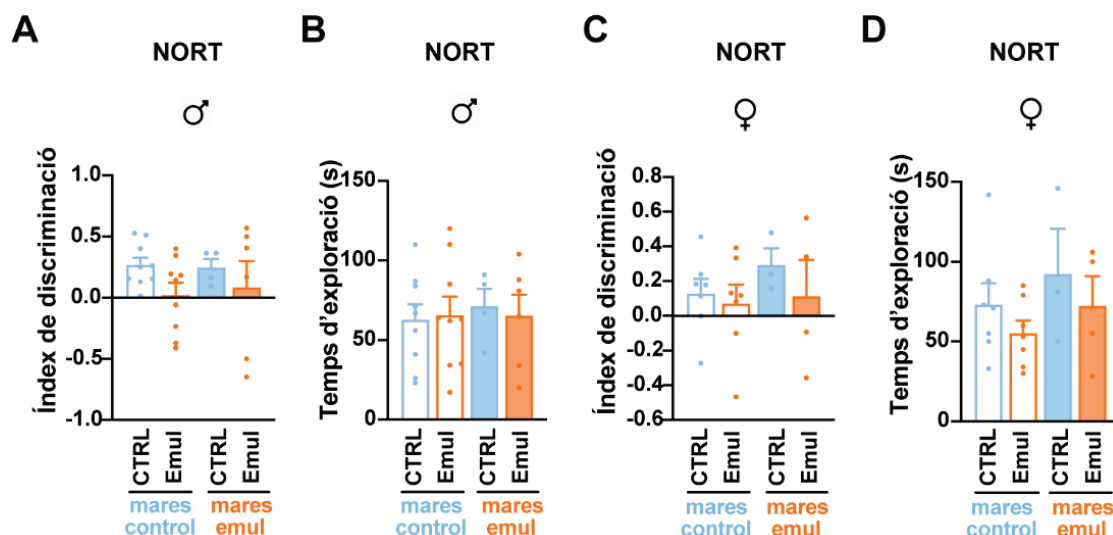


Figura 44. Avaluació de la memòria de reconeixement visual de la descendència en edat adulta. A-D) Prova de reconeixement d'un objecte a les 10 setmanes d'edat en mascles (A i B) (n=9 CTRL-CTRL; n=9 CTRL-Emul; n=4 Emul-CTRL; n=6 Emul-Emul) i femelles (C i D) (n=7 CTRL-CTRL; n=7 CTRL-Emul; n=3 Emul-CTRL; n=4 Emul-Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents on s'inclou l'índex de discriminació (A i C) i el temps d'exploració (B i D). Les dades provenen d'un sol experiment i estan expressades amb la mitjana ± SEM. L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d'una prova de rang post hoc Sidak.

Tanmateix, en el cas dels mascles, la combinació d'una dieta "Western" i una llarga exposició als emulgents causa un lleuger deteriorament cognitiu en la prova NORT (Fig 45A) tot hi havent-li dedicat més temps d'exploració a l'objecte (Fig 45B). En canvi, tot i que les femelles provinents de mares tractades amb emulgents presentaven menys temps d'exploració (Fig 44D), no s'observaren canvis en el deteriorament cognitiu (Fig 45D).

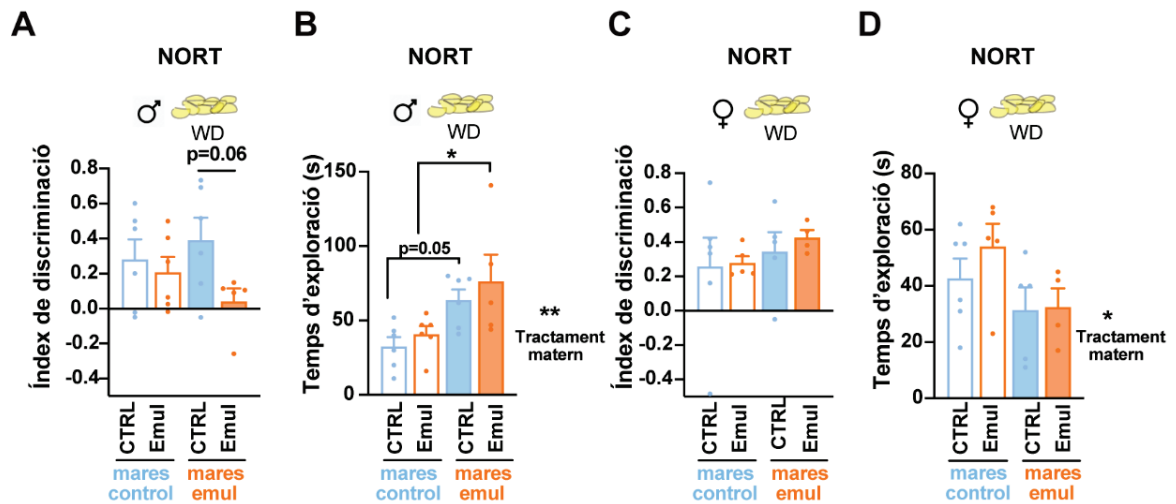


Figura 45. Avaluació de la memòria de reconeixement visual de la descendència exposats a una dieta “Western” en edat adulta. A-D) Prova de reconeixement d’un objecte a les 24 setmanes d’edat, després de 13 setmanes d’exposició a una dieta “Western” (WD), en mascles (A i B) (n=6 CTRL–CTRL; n=6 CTRL–Emul; n=6 Emul–CTRL; n=5 Emul–Emul) i femelles (C i D) (n=6 CTRL–CTRL; n=5 CTRL–Emul; n=5 Emul–CTRL; n=4 Emul–Emul) descendents de mares control i tractades amb emulgents on s’inclou l’índex de discriminació (A i C) i el temps d’exploració (B i D). Les dades provenen d’un sol experiment i estan expressades amb la mitjana ± SEM. L’anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una prova ANOVA de dos-factors seguit d’una prova de rang post hoc Sidak. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

DISCUSSIÓ

Discussió

En les últimes dècades el consum d'UPF ha augmentat de manera dràstica a nivell mundial tant en adults, on representa un 25-50% del consum total de calories (Partridge et al., 2019), com sobretot en infants i adolescents, on aquest consum representa més d'un 60% en països com Anglaterra i Estats Units (Neri et al., 2019; Onita et al., 2021; Marino et al., 2021).

També s'ha reportat que el consum d'UPF durant el període de gestació i lactància té efectes negatius sobre la salut dels infants, on el seu consum s'ha associat a un augment del pes gestacional, un augment d'adipositat en nadons i en el desenvolupament de trastorns neuro-psiquiàtrics com el dèficit d'atenció i hiperactivitat (TDAH) (Rohatgi et al., 2017; Oliveira et al., 2022; Cummings et al., 2022; Smit et al., 2022).

Aquests tipus d'aliments sempre venen acompanyats per un gran nombre d'additius que també poden exercir un efecte negatiu per la salut. Per aquesta raó és fonamental avaluar individualment la contribució de cada un d'aquests additius en la salut materna i la programació del desenvolupament de la descendència.

En els darrers anys, el mercat d'emulgents ha crescut de manera molt significativa en el sector de la indústria alimentària (Lerner & Matthias, 2015b). Per aquest motiu, en aquest estudi s'ha investigat l'impacte del consum matern d'emulgents en la salut de la descendència en ratolins.

En el nostre disseny experimental tant les mares com les cries s'han exposat a un tractament de CMC+P80 durant un període llarg i continuat de temps durant diferents etapes vitals (fetal i/o post-natal). A diferència d'altres estudis, en que s'administra un únic emulgent (CMC o P80), en el present treball hem administrat una combinació d'aquests amb la finalitat de reflectir la presència de diferents emulgents en els UPF.

Les mares també han estat exposades als emulgents durant unes setmanes abans de la fecundació, a més del període de gestació i lactància, per tal de simular l'efecte d'una exposició recurrent als emulgents. En efecte, el consum d'aquests tipus d'additius sol ser persistent i no només durant un període concret de temps.

En línies generals, el que hem constatat és que el consum matern d'emulgents és suficient per induir lleus alteracions metabòliques, cognitives i psicològiques en la descendència depenent del sexe. Majoritàriament, les alteracions en mascles són més rellevants que en les femelles.

En les femelles tractades amb CMC+P80 durant les 6 setmanes prèvies a l'embaràs s'observa una lleu disminució de la ingesta, però aquesta desapareix al llarg d'una exposició prolongada. Això podria ser degut a una adaptació després del consum d'emulgents durant un període curt de temps.

Aquests estudis també indiquen que el consum matern d'emulgents induïx una intolerància a la glucosa, tot i no haver-hi un increment de pes.

1 Circuits neuronals i metabolisme

En aquest estudi, s'ha observat que el consum matern d'emulgents retarda el pic post-natal de leptina en els mascles de la descendència.

En la literatura està descrit que les alteracions en els nivells de leptina i glucosa durant el període de gestació poden interferir en l'especificació, la proliferació i les connexions neuronals dels circuits hipotalàmics de la descendència. A més, també s'ha demostrat que els nivells de leptina influeixen directament en el creixement axonal de les neurones POMC i AgRP durant el període de lactància (S. G. Bouret et al., 2004b; S. G. Bouret, 2022).

Així doncs, el retard en el pic de leptina post-natal en mascles provinents de mares tractades amb emulgents podria explicar les alteracions en la densitat de fibres α -MSH que projecten al PVN en l'etapa del deslletament.

Tot i això, el sistema de la leptina sembla no estar afectat en l'etapa adulta, ja que tant els nivells de leptina en plasma com la resposta anorexigènica induïda per leptina exògena no estan alterats.

Les pertorbacions en l'expressió gènica i la densitat de fibres α -MSH que s'observa en aquest estudi també suggereixen que els circuits neuronals anorexigènics són més sensibles als efectes negatius del consum matern d'emulgents. A més, la reducció en l'expressió de *pomc* i *cart* en mascles provinents de mares tractades amb emulgents podria ser degut a un mecanisme de compensació en resposta a els elevats nivells d' α -MSH en el PVN. Aquest fet podria explicar la pèrdua de pes corporal i adipositat que s'observa en aquests ratolins en el deslletament i en l'etapa adulta.

Finalment, aquests resultats suggereixen que el consum matern d'emulgents pot influenciar el desenvolupament dels circuits neuronals de l'hipotàlem durant les primeres etapes de vida, tal i com també s'ha observat en un desequilibri nutricional (dieta HFD, mala nutrició, sobre-nutrició post-natal) o amb altres tipus d'additius (Dearden et al., 2020; Park et al., 2020, 2023).

2 Microbiota intestinal i metabolisme

Diversos estudis han demostrat que el consum d'emulgents a baixes concentracions és suficient per corrompre la barrera intestinal, afectant la composició de la microbiota i les seves funcions i generant un ambient pro-inflamatòri a l'intestí que s'ha associat amb l'augment de malalties intestinals i metabòliques (Roberts et al., 2010; Chassaing et al., 2015; Cani & Everard, 2015; Lock et al., 2018; Naimi et al., 2021; Daniel et al., 2023). Per exemple, s'ha descrit que el consum matern de P80 durant el període de gestació i lactància afecta la integritat de la barrera intestinal de la descendència, generant una inflamació crònica i una disbiosis intestinal que predisposa a la descendència a desenvolupar colitis al llarg del temps (Jin et al., 2021). També s'ha demostrat que l'alteració en la microbiota intestinal durant l'embaràs modula l'axonogènesis dels circuits talamocorticals en el fetus (Vuong et al., 2020) i interfereix en les funcions cerebrals i de comportament de la descendència (Buffington et al., 2016; S. Kim et al., 2017; Jašarević et al., 2018).

En el present estudi, malauradament, no hem analitzat la composició de la microbiota ni la funció intestinal de les mares o la descendència. Tanmateix, donades les evidències científiques, és raonable suggerir que pertorbacions en la microbiota i la inflamació crònica de l'intestí degudes a l'exposició a emulgents podrien contribuir a les alteracions metabòliques que s'han observat en aquest estudi.

3 Efectes neuro-psiquiàtrics i cognitius

Les alteracions en la microbiota intestinal podrien estar jugant un paper important en el trastorn d'ansietat que s'observa en aquest estudi en ambdós sexes, ja que el consum d'emulgents també s'ha relacionat amb desordres d'ansietat en ratolins (Marraudino et al., 2021). Aquestes observacions suggereixen que el consum d'emulgents també podria interferir en el desenvolupament d'altres àrees del cervell relacionades amb diferents processos conductuals.

4 Dimorfisme sexual

Els resultats d'aquest estudi ens mostren que el consum matern d'emulgents té un efecte depenent del sexe en la descendència. Concretament, hem constatat que els mascles provinents de mares tractades amb emulgents són més sensibles a alteracions metabòliques i neuro-psicològiques que les femelles. Aquestes observacions proporcionen evidències addicionals de que els mascles i les femelles responen de manera diferent al desequilibri de les condicions de l'entorn matern (Dearden et al., 2018; Sandovici et al., 2022).

En aquest estudi, també s'ha observat que les femelles en etapa adulta són capaces de contrarestar els efectes provocats per una dieta rica en greixos i sucres sobre el metabolisme de la glucosa quan combinen aquest tipus de dieta western amb l'exposició als emulgents. Però aquestes alteracions podrien ser conseqüència d'una mala absorció de la glucosa a l'intestí, un augment de la glicosúria o un defecte del transport de nutrients a través de l'intestí.

Per això és necessari seguir investigant, per conèixer quins són els mecanismes durant el desenvolupament que generen aquest dimorfisme sexual.

5 Programació materna

En aquest estudi també es mostra que els efectes del consum d'emulgents durant la gestació i lactància són més intensos que l'exposició a partir del deslletament. Això remarca la importància de l'entorn intrauterí i la primera etapa de vida pel desenvolupament de la descendència, i que si aquestes etapes s'alteren poden tenir conseqüències metabòliques en l'edat adulta. A més, una exposició prolongada als emulgents (mares emulgents–cries emulgents) empitjora algunes d'aquestes conseqüències metabòliques, com la intolerància a la glucosa o el deteriorament cognitiu. El disseny experimental d'aquest estudi no permet determinar si els desordres metabòlics i neuro-psicològics observats en la descendència són deguts a l'exposició maternal d'emulgents prèvia a l'embaràs, o si és degut a l'exposició durant el període de gestació i/o lactància. Per respondre aquesta pregunta caldria portar a terme una investigació més profunda on s'analitzi cada una de les etapes individualment.

De cara a futurs estudis, també seria interessant estudiar com afecta una exposició prolongada als emulgents en l'estat reproductiu de les femelles, en la viabilitat embrionària o en la salut de la mare i la seva descendència en altres àmbits.

6 Reproductibilitat

En estudis publicats prèviament es descriu que el consum diari de CMC o P80 en ratolins adults és suficient per induir alteracions metabòliques, obesitat i disbiosis de la microbiota intestinal (Chassaing et al., 2015; Holder et al., 2019; Singh & Ishikawa, 2016; Viennois et al., 2017). En canvi, en aquest estudi, l'exposició diària i conjunta de CMC+P80 en la descendència provinents de mares control no mostren alteracions metabòliques.

La discordança observada entre estudis podria ser degut a la diferència en el disseny experimental utilitzat, ja que difereixen amb l'edat d'inici, la durada del tractament o la combinació d'emulgents. Aquesta combinació dels dos emulgents podria ser un factor important alhora de no poder reproduir els resultats d'estudis anteriors, ja que tot i pensar que conjuntament tindrien un efecte superior i de sinèrgia, també és possible que la barreja d'ambdós components hagi induït un efecte més lleu.

7 Conscienciació social

En conjunt, l'estudi en ratolins mostra que el consum matern d'emulgents, majoritàriament presents en UPF, indueix efectes metabòlics, cognitius i psicològics lleus en la descendència depenent del sexe. Aquests resultats es sumen a l'àmplia literatura que emfatitza la importància de mantenir un entorn gestacional saludable per la descendència. En aquest context, aquest estudi també és un clam a la necessitat de conscienciar a la població sobre el risc potencial que comporta consumir elevades quantitats d'UPF durant l'embaràs i la lactància sobre la salut metabòlica i neuropsicològica de la descendència. També és important generar consciència social de que alguns productes que percebem com aparentment "saludables" (productes vegans o vegetarians, baixos en calories, sense sucres, entre d'altres) també poden contenir un gran nombre d'additius, entre ells emulgents, i per tant el seu consum també pot induir a alteracions metabòliques en un grau similar a productes generalment catalogats com a "no saludables". Per això és tant necessari construir uns hàbits nutricionals més saludables tant per les mares com per els infants.

8 Investigacions futures

Però com els emulgents poden afectar la programació de la descendència al deslletament sense tenir-hi un contacte directe? Una de les explicacions podria ser que els emulgents es transferissin a través de la placenta o la llet materna, però se sap que tant el CMC com el P80 gairebé no s'absorbeixen per l'intestí ni són metabolitzats, així que en la seva majoria són excretats en les femtes i l'orina (Viennois et al., 2017; Jin et al., 2021). També se sap que la microbiota de la mare és el major donador de microbiota a la descendència, i que aquesta transmissió de microbiota té un paper molt important per el desenvolupament de la microbiota intestinal infantil, per tant una altra explicació podria ser mitjançant una transferència de la microbiota intestinal mare-infant a través de les femtes, del part vaginal, la llet materna o la pell (Jin et al., 2021).

CONCLUSIONS

Conclusions

En aquest estudi es proporcionen evidències de que el consum matern d'emulgentes durant el període de gestació i lactància:

- Retarda l'augment del pic de leptina en l'etapa post-natal en mascles.
- Altera el sistema melanocortina en el deslletament.
- Indueix alteracions lleus en el pes corporal i l'homeòstasi de la glucosa.
- Els efectes del seu consum matern són dependents del sexe, amb una major susceptibilitat per els mascles.
- Compromet la salut neuro-psicològica de la descendència.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

- Ahima, R. S., Prabakaran, D., & Flier, J. S. (1998a). Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *Journal of Clinical Investigation*, 101(5), 1020-1027.
- Ahima, R. S., Prabakaran, D., & Flier, J. S. (1998b). Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *Journal of Clinical Investigation*, 101(5), 1020-1027.
- Almarshad, M. I., Algonaiman, R., Alharbi, H. F., Almujaaydil, M. S., & Barakat, H. (2022). Relationship between Ultra-Processed Food Consumption and Risk of Diabetes Mellitus: A Mini-Review. *Nutrients*, 14(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/nu14122366>
- Baran, A., Sulukan, E., Türkoğlu, M., Ghosigharehagaji, A., Yildirim, S., Kankaynar, M., Bolat, I., Kaya, M., Topal, A., & Ceyhun, S. B. (2020). Is sodium carboxymethyl cellulose (CMC) really completely innocent? It may be triggering obesity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 2465-2473. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.169>
- Barker, D., Eriksson, J., Forsén, T., & Osmond, C. (2002). Fetal origins of adult disease: Strength of effects and biological basis. *International Journal of Epidemiology*, 31(6), 1235-1239. <https://doi.org/10.1093/ije/31.6.1235>
- Benevento, M., Hökfelt, T., & Harkany, T. (2022). Ontogenetic rules for the molecular diversification of hypothalamic neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 23(10), 611-627. <https://doi.org/10.1038/s41583-022-00615-3>
- Blackmore, H. L., & Ozanne, S. E. (2013). Maternal diet-induced obesity and offspring cardiovascular health. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 4(5), 338-347. <https://doi.org/10.1017/S2040174412000761>
- Blanco-Rojo, R., Sandoval-Insausti, H., López-García, E., Graciani, A., Ordovás, J. M., Banegas, J. R., Rodríguez-Artalejo, F., & Guallar-Castillón, P. (2019). Consumption of Ultra-Processed Foods and Mortality: A National Prospective Cohort in Spain. *Mayo Clinic Proceedings*, 94(11), 2178-2188. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.03.035>
- Blüher, M. (2019). Obesity: Global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>
- Bodden, C., Hannan, A. J., & Reichelt, A. C. (2021). Of 'junk food' and 'brain food': How parental diet influences offspring neurobiology and behaviour. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 32(8), 566-578. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.04.001>
- Bouret, S. G. (2009). Early Life Origins of Obesity: Role of Hypothalamic Programming. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 48(S1), S31-S38. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181977375>
- Bouret, S. G. (2010a). Neurodevelopmental actions of leptin. *Brain Research*, 1350, 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.04.011>

- Bouret, S. G. (2010b). Role of early hormonal and nutritional experiences in shaping feeding behavior and hypothalamic development. *The Journal of Nutrition*, 140(3), 653-657. <https://doi.org/10.3945/jn.109.112433>
- Bouret, S. G. (2017). Development of Hypothalamic Circuits That Control Food Intake and Energy Balance. En R. B. S. Harris (Ed.), *Appetite and Food Intake: Central Control* (2nd ed.). CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453139/>
- Bouret, S. G. (2022). Developmental programming of hypothalamic melanocortin circuits. *Experimental & Molecular Medicine*, 54(4), 403-413. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00625-8>
- Bouret, S. G., Bates, S. H., Chen, S., Myers, M. G., & Simerly, R. B. (2012). Distinct roles for specific leptin receptor signals in the development of hypothalamic feeding circuits. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(4), 1244-1252. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2277-11.2012>
- Bouret, S. G., Draper, S. J., & Simerly, R. B. (2004a). Formation of Projection Pathways from the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus to Hypothalamic Regions Implicated in the Neural Control of Feeding Behavior in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 24(11), 2797-2805. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004>
- Bouret, S. G., Draper, S. J., & Simerly, R. B. (2004b). Trophic Action of Leptin on Hypothalamic Neurons That Regulate Feeding. *Science*, 304(5667), 108-110. <https://doi.org/10.1126/science.1095004>
- Bouret, S. G., & Simerly, R. B. (2007). Development of leptin-sensitive circuits. *Journal of Neuroendocrinology*, 19(8), 575-582. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01563.x>
- Bouret, S., & Simerly, R. (2006). Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clinical Genetics*, 70(4), 295-301. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00684.x>
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology*, 34(5), 525-527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
- Brüning, J. C., & Fenselau, H. (2023). Integrative neurocircuits that control metabolism and food intake. *Science*, 381(6665), eabl7398. <https://doi.org/10.1126/science.abl7398>
- Buckley, J. P., Kim, H., Wong, E., & Rebholz, C. M. (2019). Ultra-processed food consumption and exposure to phthalates and bisphenols in the US National Health and Nutrition Examination Survey, 2013–2014. *Environment International*, 131, 105057. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105057>
- Buffington, S. A., Prisco, G. V. D., Auchtung, T. A., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., & Costa-Mattioli, M. (2016). Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell*, 165(7), 1762-1775. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.001>
- Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R., & Burn, P. (1995). Recombinant Mouse OB Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks. *Science*, 269(5223), 546-549. <https://doi.org/10.1126/science.7624778>

- Cani, P. D., & Everard, A. (2015). Keeping gut lining at bay: Impact of emulsifiers. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(6), 273-274. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.03.009>
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377-399. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>
- CDC WONDER. (2016, 2020). *Natality, 2016-2022 expanded Request*. <https://wonder.cdc.gov/natality-expanded-current.html>
- Chang, K., Khandpur, N., Neri, D., Touvier, M., Huybrechts, I., Millett, C., & Vamos, E. P. (2021). Association Between Childhood Consumption of Ultraprocessed Food and Adiposity Trajectories in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children Birth Cohort. *JAMA Pediatrics*, 175(9), e211573. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2021.1573>
- Chassaing, B., Compher, C., Bonhomme, B., Liu, Q., Tian, Y., Walters, W., Nessel, L., Delaroque, C., Hao, F., Gershuni, V., Chau, L., Ni, J., Bewtra, M., Albenberg, L., Bretin, A., McKeever, L., Ley, R. E., Patterson, A. D., Wu, G. D., ... Lewis, J. D. (2022). Randomized Controlled-Feeding Study of Dietary Emulsifier Carboxymethylcellulose Reveals Detrimental Impacts on the Gut Microbiota and Metabolome. *Gastroenterology*, 162(3), 743-756. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.11.006>
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J. K., Poole, A. C., Srinivasan, S., Ley, R. E., & Gewirtz, A. T. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, 519(7541), Article 7541. <https://doi.org/10.1038/nature14232>
- Chassaing, B., Wiele, T. V. de, Bodt, J. D., Marzorati, M., & Gewirtz, A. T. (2017). Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression ex vivo potentiating intestinal inflammation. *Gut*, 66(8), 1414-1427. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313099>
- Chen, H., Simar, D., Lambert, K., Mercier, J., & Morris, M. J. (2008). Maternal and Postnatal Overnutrition Differentially Impact Appetite Regulators and Fuel Metabolism. *Endocrinology*, 149(11), 5348-5356. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0582>
- Chen, H., Simar, D., & Morris, M. J. (2009). Hypothalamic Neuroendocrine Circuitry is Programmed by Maternal Obesity: Interaction with Postnatal Nutritional Environment. *PLoS ONE*, 4(7), e6259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006259>
- Chen, H. Y., Trumbauer, M. E., Chen, A. S., Weingarth, D. T., Adams, J. R., Frazier, E. G., Shen, Z., Marsh, D. J., Feighner, S. D., Guan, X.-M., Ye, Z., Nargund, R. P., Smith, R. G., Van der Ploeg, L. H. T., Howard, A. D., MacNeil, D. J., & Qian, S. (2004). Orexigenic Action of Peripheral Ghrelin Is Mediated by Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein. *Endocrinology*, 145(6), 2607-2612. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1596>
- Chu, S. Y., Callaghan, W. M., Kim, S. Y., Schmid, C. H., Lau, J., England, L. J., & Dietz, P. M. (2007). Maternal Obesity and Risk of Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 30(8), 2070-2076. <https://doi.org/10.2337/dc06-2559a>
- Claret, M., Smith, M. A., Batterham, R. L., Selman, C., Choudhury, A. I., Fryer, L. G. D., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A. W., Speakman, J. R., Barsh, G. S., Viollet, B., Vaulont, S., Ashford, M. L. J., Carling, D., & Withers, D. J. (2007). AMPK is essential for

- energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2325-2336. <https://doi.org/10.1172/JCI31516>
- Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience*, 8(5), 571-578. <https://doi.org/10.1038/nn1455>
- Cone, R. D. (2006). Studies on the Physiological Functions of the Melanocortin System. *Endocrine Reviews*, 27(7), 736-749. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0034>
- Coupé, B., Amarger, V., Grit, I., Benani, A., & Parnet, P. (2010). Nutritional Programming Affects Hypothalamic Organization and Early Response to Leptin. *Endocrinology*, 151(2), 702-713. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0893>
- Coupe, B., & Bouret, S. (2013). Development of the Hypothalamic Melanocortin System. *Frontiers in Endocrinology*, 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2013.00038>
- Creanga, A. A., Catalano, P. M., & Bateman, B. T. (2022). Obesity in Pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 387(3), 248-259. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1801040>
- Croizier, S., & Bouret, S. G. (2022). Molecular control of the development of hypothalamic neurons involved in metabolic regulation. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 123, 102117. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2022.102117>
- Croizier, S., Park, S., Maillard, J., & Bouret, S. G. (2018). Central Dicer-miR-103/107 controls developmental switch of POMC progenitors into NPY neurons and impacts glucose homeostasis. *eLife*, 7, e40429. <https://doi.org/10.7554/eLife.40429>
- Cummings, J. R., Lipsky, L. M., Schwedhelm, C., Liu, A., & Nansel, T. R. (2022). Associations of ultra-processed food intake with maternal weight change and cardiometabolic health and infant growth. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 19(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12966-022-01298-w>
- Daniel, N., Gewirtz, A. T., & Chassaing, B. (2023). Akkermansia muciniphila counteracts the deleterious effects of dietary emulsifiers on microbiota and host metabolism. *Gut*, 72(5), 906-917. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326835>
- Dearden, L., Bouret, S. G., & Ozanne, S. E. (2018). Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. *Molecular Metabolism*, 15, 8-19. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.04.007>
- Dearden, L., Buller, S., Furigo, I. C., Fernandez-Twinn, D. S., & Ozanne, S. E. (2020). Maternal obesity causes fetal hypothalamic insulin resistance and disrupts development of hypothalamic feeding pathways. *Molecular Metabolism*, 42, 101079. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101079>
- DeJarnett, N., Conklin, D. J., Riggs, D. W., Myers, J. A., O'Toole, T. E., Hamzeh, I., Wagner, S., Chugh, A., Ramos, K. S., Srivastava, S., Higdon, D., Tollerud, D. J., DeFilippis, A., Becher, C., Wyatt, B., McCracken, J., Abplanalp, W., Rai, S. N., Ciszewski, T., ... Bhatnagar, A. (2014). Acrolein Exposure Is Associated With Increased Cardiovascular Disease Risk. *Journal of the American Heart Association*, 3(4), e000934. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.000934>
- Delahaye, F., Breton, C., Risold, P.-Y., Enache, M., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C., Lesage, J., & Vieau, D. (2008). Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in

- neonatal male rat pups. *Endocrinology*, 149(2), 470-475.
<https://doi.org/10.1210/en.2007-1263>
- Delaroque, C., & Chassaing, B. (2024). Dietary emulsifier consumption accelerates type 1 diabetes development in NOD mice. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 10(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/s41522-023-00475-4>
- Duque-Guimarães, D. E., & Ozanne, S. E. (2013). Nutritional programming of insulin resistance: Causes and consequences. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(10), 525-535.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.05.006>
- Elizabeth, L., Machado, P., Zinöcker, M., Baker, P., & Lawrence, M. (2020). Ultra-Processed Foods and Health Outcomes: A Narrative Review. *Nutrients*, 12(7), Article 7.
<https://doi.org/10.3390/nu12071955>
- Fan, K., Li, Y., Wang, H., Mao, X., Guo, J., Wang, F., Huang, L., Li, Y., Ma, X., Gao, Z., Chen, W., Qian, D., Xue, W., Cao, Q., Zhang, L., Shen, L., Zhang, L., Tong, C., Zhong, J., ... Jin, J. (2019). Stress-Induced Metabolic Disorder in Peripheral CD4+ T Cells Leads to Anxiety-like Behavior. *Cell*, 179(4), 864-879.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.001>
- Fardet, A., & Rock, E. (2019). Ultra-processed foods: A new holistic paradigm? *Trends in Food Science & Technology*, 93, 174-184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.016>
- Farooqi I. Sadaf, Jebb Susan A., Langmack Gill, Lawrence Elizabeth, Cheetham Christopher H., Prentice Andrew M., Hughes leuan A., McCamish Mark A., & O’Rahilly Stephen. (1999). Effects of Recombinant Leptin Therapy in a Child with Congenital Leptin Deficiency. *New England Journal of Medicine*, 341(12), 879-884.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199909163411204>
- Fong, H., Zheng, J., & Kurrasch, D. (2023). The structural and functional complexity of the integrative hypothalamus. *Science*, 382(6669), 388-394.
<https://doi.org/10.1126/science.adh8488>
- Friedman, J. E. (2018). Developmental Programming of Obesity and Diabetes in Mouse, Monkey, and Man in 2018: Where Are We Headed? *Diabetes*, 67(11), 2137-2151.
<https://doi.org/10.2337/dbi17-0011>
- FSA. (2018). *Approved additives and E numbers* | Food Standards Agency. <https://www.food.gov.uk/business-guidance/approved-additives-and-e-numbers>
- Furuhashi, H. (2020). *Dietary emulsifier polysorbate-80-induced small-intestinal vulnerability to indomethacin-induced lesions via dysbiosis—Furuhashi—2020—Journal of Gastroenterology and Hepatology—Wiley Online Library*. <https://onlinelibrary-wiley-com.sire.ub.edu/doi/10.1111/jgh.14808>
- Gali Ramamoorthy, T., Begum, G., Harno, E., & White, A. (2015). Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: Impact on energy balance control. *Frontiers in Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00126>
- García, A. P. (2010). *Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus NPY- and αMSH-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats*. <https://dom.pubs.pericles.prod.literatumonline.com/doi/epdf/10.1111/j.1463-1326.2009.01174.x>

- García-Meseguer, M. J., Burriel, F. C., García, C. V., & Serrano-Urrea, R. (2014). Adherence to Mediterranean diet in a Spanish university population. *Appetite*, 78, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.03.020>
- Gultekin, F., Oner, M. E., Savas, H. B., & Dogan, B. (2019). Food additives and microbiota. *Northern Clinics of Istanbul*, 7(2), 192-200. <https://doi.org/10.14744/nci.2019.92499>
- Haddad-Tóvolli, R., Altirriba, J., Obri, A., Sánchez, E. E., Chivite, I., Milà-Guasch, M., Ramírez, S., Gómez-Valadés, A. G., Pozo, M., Burguet, J., Velloso, L. A., & Claret, M. (2020). Pro-opiomelanocortin (POMC) neuron transcriptome signatures underlying obesogenic gestational malprogramming in mice. *Molecular Metabolism*, 36, 100963. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.02.006>
- Haddad-Tóvolli, R., & Claret, M. (2023). Metabolic and feeding adjustments during pregnancy. *Nature Reviews Endocrinology*, 19(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00871-y>
- Hall, K. D., Ayuketah, A., Brychta, R., Cai, H., Cassimatis, T., Chen, K. Y., Chung, S. T., Costa, E., Courville, A., Darcey, V., Fletcher, L. A., Forde, C. G., Gharib, A. M., Guo, J., Howard, R., Joseph, P. V., McGehee, S., Ouwerkerk, R., Raisinger, K., ... Zhou, M. (2019). Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake. *Cell Metabolism*, 30(1), 67-77.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.008>
- Hallschmid, M., Benedict, C., Schultes, B., Born, J., & Kern, W. (2008). Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signaling. *International Journal of Obesity*, 32(2), 275-282. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803722>
- Halmos, E. P., Mack, A., & Gibson, P. R. (2019). Review article: Emulsifiers in the food supply and implications for gastrointestinal disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 49(1), 41-50. <https://doi.org/10.1111/apt.15045>
- Hanson, M. A., & Gluckman, P. D. (2014). Early Developmental Conditioning of Later Health and Disease: Physiology or Pathophysiology? *Physiological Reviews*, 94(4), 1027-1076. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2013>
- Hasebe, K., Kendig, M. D., & Morris, M. J. (2021). Mechanisms Underlying the Cognitive and Behavioural Effects of Maternal Obesity. *Nutrients*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/nu13010240>
- Hill, J. W. (2010). Gene Expression and the Control of Food Intake by Hypothalamic POMC/CART Neurons. *Open neuroendocrinology journal (Online)*, 3, 21-27.
- Holder, M. K., Peters, N. V., Whylings, J., Fields, C. T., Gewirtz, A. T., Chassaing, B., & de Vries, G. J. (2019). Dietary emulsifiers consumption alters anxiety-like and social-related behaviors in mice in a sex-dependent manner. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36890-3>
- Horesh, A., Tsur, A. M., Bardugo, A., & Twig, G. (2021). Adolescent and Childhood Obesity and Excess Morbidity and Mortality in Young Adulthood—A Systematic Review. *Current Obesity Reports*, 10(3), 301-310. <https://doi.org/10.1007/s13679-021-00439-9>
- Jais, A., & Brüning, J. C. (2022). Arcuate Nucleus-Dependent Regulation of Metabolism—Pathways to Obesity and Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews*, 43(2), 314-328. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab025>

- Jašarević, E., Howard, C. D., Morrison, K., Misic, A., Weinkopff, T., Scott, P., Hunter, C., Beiting, D., & Bale, T. L. (2018). The maternal vaginal microbiome partially mediates the effects of prenatal stress on offspring gut and hypothalamus. *Nature Neuroscience*, 21(8), 1061-1071. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0182-5>
- Jin, G., Tang, Q., Ma, J., Liu, X., Zhou, B., Sun, Y., Pang, X., Guo, Z., Xie, R., Liu, T., Wang, B., & Cao, H. (2021). Maternal Emulsifier P80 Intake Induces Gut Dysbiosis in Offspring and Increases Their Susceptibility to Colitis in Adulthood. *mSystems*, 6(2), 10.1128/msystems.01337-20. <https://doi.org/10.1128/msystems.01337-20>
- Kano, M., Suga, H., & Arima, H. (2021). Induction of Functional Hypothalamus and Pituitary Tissues From Pluripotent Stem Cells for Regenerative Medicine. *Journal of the Endocrine Society*, 5(3). <https://doi.org/10.1210/jendso/bvaa188>
- Keith, S. W., Redden, D. T., Katzmarzyk, P. T., Boggiano, M. M., Hanlon, E. C., Benca, R. M., Ruden, D., Pietrobelli, A., Barger, J. L., Fontaine, K. R., Wang, C., Aronne, L. J., Wright, S. M., Baskin, M., Dhurandhar, N. V., Lijoi, M. C., Grilo, C. M., DeLuca, M., Westfall, A. O., & Allison, D. B. (2006). Putative contributors to the secular increase in obesity: Exploring the roads less traveled. *International Journal of Obesity*, 30(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803326>
- Kim, D. W., Washington, P. W., Wang, Z. Q., Lin, S. H., Sun, C., Ismail, B. T., Wang, H., Jiang, L., & Blackshaw, S. (2020). The cellular and molecular landscape of hypothalamic patterning and differentiation from embryonic to late postnatal development. *Nature Communications*, 11(1), 4360. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18231-z>
- Kim, J., Yoon, S., Lee, S., Hong, H., Ha, E., Joo, Y., Lee, E. H., & Lyoo, I. K. (2020). A double-hit of stress and low-grade inflammation on functional brain network mediates posttraumatic stress symptoms. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15655-5>
- Kim, S., Kim, H., Yim, Y. S., Ha, S., Atarashi, K., Tan, T. G., Longman, R. S., Honda, K., Littman, D. R., Choi, G. B., & Huh, J. R. (2017). Maternal gut bacteria promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. *Nature*, 549(7673), 528-532. <https://doi.org/10.1038/nature23910>
- Kirk, S. L., Samuelsson, A.-M., Argenton, M., Dhonye, H., Kalamatianos, T., Poston, L., Taylor, P. D., & Coen, C. W. (2009). Maternal Obesity Induced by Diet in Rats Permanently Influences Central Processes Regulating Food Intake in Offspring. *PLOS ONE*, 4(6), e5870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005870>
- Krashes, M. J., Lowell, B. B., & Garfield, A. S. (2016). Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis. *Nature Neuroscience*, 19(2), 206-219. <https://doi.org/10.1038/nn.4202>
- Laster, J., Bonnes, S. L., & Rocha, J. (2019). Increased Use of Emulsifiers in Processed Foods and the Links to Obesity. *Current Gastroenterology Reports*, 21(11), 61. <https://doi.org/10.1007/s11894-019-0723-4>
- Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, 8(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>
- León-Muñoz, L. M., Guallar-Castillón, P., Graciani, A., López-García, E., Mesas, A. E., Aguilera, M. T., Banegas, J. R., & Rodríguez-Artalejo, F. (2012). Adherence to the Mediterranean Diet

- Pattern Has Declined in Spanish Adults, 3. *The Journal of Nutrition*, 142(10), 1843-1850. <https://doi.org/10.3945/jn.112.164616>
- Lerner, A., & Matthias, T. (2015a). Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*, 14(6), 479-489. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.01.009>
- Lerner, A., & Matthias, T. (2015b). Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*, 14(6), 479-489. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.01.009>
- Liang, Y., Liu, D., Li, Y., Hou, H., Li, P., Ma, X., Li, P., Zhan, J., & Wang, P. (2023). Maternal polysorbate 80 exposure causes intestinal ILCs and CD4+ T cell developmental abnormalities in mouse offspring. *Environmental Pollution*, 336, 122392. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122392>
- Lock, J. Y., Carlson, T. L., Wang, C.-M., Chen, A., & Carrier, R. L. (2018). Acute Exposure to Commonly Ingested Emulsifiers Alters Intestinal Mucus Structure and Transport Properties. *Scientific Reports*, 8(1), 10008. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27957-2>
- Lv, W., Song, J., Nowshin Raka, R., Sun, J., Shi, G., Wu, H., Xiao, J., & Xu, D. (2023). Effects of food emulsifiers on high fat-diet-induced obesity, intestinal inflammation, changes in bile acid profile, and liver dysfunction. *Food Research International*, 173, 113302. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113302>
- MacKay, H., Patterson, Z. R., Khazall, R., Patel, S., Tsirlin, D., & Abizaid, A. (2013). Organizational Effects of Perinatal Exposure to Bisphenol-A and Diethylstilbestrol on Arcuate Nucleus Circuitry Controlling Food Intake and Energy Expenditure in Male and Female CD-1 Mice. *Endocrinology*, 154(4), 1465-1475. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2044>
- Marino, M., Puppo, F., Del Bo', C., Vinelli, V., Riso, P., Porrini, M., & Martini, D. (2021). A Systematic Review of Worldwide Consumption of Ultra-Processed Foods: Findings and Criticisms. *Nutrients*, 13(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/nu13082778>
- Marraudino, M., Ponti, G., Moussu, C., Farinetti, A., Macchi, E., Accornero, P., Gotti, S., Collado, P., Keller, M., & Panzica, G. (2021). Early Postnatal Genistein Administration Affects Mice Metabolism and Reproduction in a Sexually Dimorphic Way. *Metabolites*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/metabo11070449>
- Mcmillen, I. C., & Robinson, J. S. (2005). Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming. *Physiological Reviews*, 85(2), 571-633. <https://doi.org/10.1152/physrev.00053.2003>
- Mephram, B. (2011). Food additives: An ethical evaluation. *British Medical Bulletin*, 99(1), 7-23. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldr024>
- Moholdt, T., & Hawley, J. A. (2020). Maternal Lifestyle Interventions: Targeting Preconception Health. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 31(8), 561-569. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.03.002>
- Molyneaux, E., Poston, L., Ashurst-Williams, S., & Howard, L. M. (2014). Obesity and Mental Disorders During Pregnancy and Postpartum: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstetrics & Gynecology*, 123(4), 857. <https://doi.org/10.1097/AOG.000000000000170>

- Monteiro, C. A., Cannon, G., Levy, R. B., Moubarac, J.-C., Louzada, M. L., Rauber, F., Khandpur, N., Cediel, G., Neri, D., Martinez-Steele, E., Baraldi, L. G., & Jaime, P. C. (2019). Ultra-processed foods: What they are and how to identify them. *Public Health Nutrition*, 22(5), 936-941. <https://doi.org/10.1017/S1368980018003762>
- Monteiro, C. A., Cannon, G., Moubarac, J.-C., Levy, R. B., Louzada, M. L. C., & Jaime, P. C. (2018). The UN Decade of Nutrition, the NOVA food classification and the trouble with ultra-processing. *Public Health Nutrition*, 21(1), 5-17. <https://doi.org/10.1017/S1368980017000234>
- Moubarac, J.-C., Parra, D. C., Cannon, G., & Monteiro, C. A. (2014). Food Classification Systems Based on Food Processing: Significance and Implications for Policies and Actions: A Systematic Literature Review and Assessment. *Current Obesity Reports*, 3(2), 256-272. <https://doi.org/10.1007/s13679-014-0092-0>
- Naimi, S., Viennois, E., Gewirtz, A. T., & Chassaing, B. (2021). Direct impact of commonly used dietary emulsifiers on human gut microbiota. *Microbiome*, 9(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00996-6>
- Neri, D., Martinez-Steele, E., Monteiro, C. A., & Levy, R. B. (2019). Consumption of ultra-processed foods and its association with added sugar content in the diets of US children, NHANES 2009-2014. *Pediatric Obesity*, 14(12), e12563. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12563>
- NHANES. (2021). <https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/visualization/index.htm>
- Nilsson, I., Johansen, J. E., Schalling, M., Hökfelt, T., & Fetissov, S. O. (2005). Maturation of the hypothalamic arcuate agouti-related protein system during postnatal development in the mouse. *Developmental Brain Research*, 155(2), 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.01.009>
- O'Brien, T. E., Ray, J. G., & Chan, W.-S. (2003). Maternal Body Mass Index and the Risk of Preeclampsia: A Systematic Overview. *Epidemiology*, 14(3), 368. <https://doi.org/10.1097/01.EDE.0000059921.71494.D1>
- Oliveira, P. G., de Sousa, J. M., Assunção, D. G. F., de Araujo, E. K. S., Bezerra, D. S., Dametto, J. F. D. S., & Ribeiro, K. D. da S. (2022). Impacts of Consumption of Ultra-Processed Foods on the Maternal-Child Health: A Systematic Review. *Frontiers in Nutrition*, 9, 821657. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.821657>
- Onita, B. M., Azeredo, C. M., Jaime, P. C., Levy, R. B., & Rauber, F. (2021). Eating context and its association with ultra-processed food consumption by British children. *Appetite*, 157, 105007. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.105007>
- Padilla, S. L., Carmody, J. S., & Zeltser, L. M. (2010). Pomc-expressing progenitors give rise to antagonistic neuronal populations in hypothalamic feeding circuits. *Nature Medicine*, 16(4), 403-405. <https://doi.org/10.1038/nm.2126>
- Pagliai, G., Dinu, M., Madarena, M. P., Bonaccio, M., Iacoviello, L., & Sofi, F. (2021). Consumption of ultra-processed foods and health status: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition*, 125(3), 308-318. <https://doi.org/10.1017/S0007114520002688>
- Park, S., Belfoul, A. M., Rastelli, M., Jang, A., Monnoye, M., Bae, H., Kamitakahara, A., Giavalisco, P., Sun, S., Barelle, P.-Y., Plows, J., Jang, C., Fodor, A., Goran, M. I., & Bouret, S. G. (2023).

- Maternal low-calorie sweetener consumption rewires hypothalamic melanocortin circuits via a gut microbial co-metabolite pathway. *JCI Insight*, 8(10). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.156397>
- Park, S., Jang, A., & Bouret, S. G. (2020). Maternal obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes metabolic alterations and abnormal hypothalamic development in the offspring. *PLOS Biology*, 18(3), e3000296. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000296>
- Partridge, D., Lloyd, K. A., Rhodes, J. M., Walker, A. W., Johnstone, A. M., & Campbell, B. J. (2019). Food additives: Assessing the impact of exposure to permitted emulsifiers on bowel and metabolic health – introducing the FADiets study. *Nutrition Bulletin*, 44(4), 329-349. <https://doi.org/10.1111/nbu.12408>
- Pepino, M. Y. (2015). Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. *Physiology & Behavior*, 152, 450-455. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.024>
- Rankin, J., Matthews, L., Cobley, S., Han, A., Sanders, R., Wiltshire, H. D., & Baker, J. S. (2016). Psychological consequences of childhood obesity: Psychiatric comorbidity and prevention. *Adolescent Health, Medicine and Therapeutics*, 7, 125-146. <https://doi.org/10.2147/AHMT.S101631>
- Rauber, F., Steele, E. M., Louzada, M. L. da C., Millett, C., Monteiro, C. A., & Levy, R. B. (2020). Ultra-processed food consumption and indicators of obesity in the United Kingdom population (2008-2016). *PLOS ONE*, 15(5), e0232676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232676>
- Real Decreto 3177/1983*. (s. f.).
- Regulation EU - 1333/2008*. (s. f.). Recuperado 31 de enero de 2024, de <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/1333/oj>
- Reimand, J., Arak, T., Adler, P., Kolberg, L., Reisberg, S., Peterson, H., & Vilo, J. (2016). g:Profiler—A web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W83-W89. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw199>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Roberts, C. L., Keita, Å. V., Duncan, S. H., O’Kennedy, N., Söderholm, J. D., Rhodes, J. M., & Campbell, B. J. (2010). Translocation of Crohn’s disease *Escherichia coli* across M-cells: Contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut*, 59(10), 1331-1339. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.195370>
- Rohatgi, K. W., Tinius, R. A., Cade, W. T., Steele, E. M., Cahill, A. G., & Parra, D. C. (2017). Relationships between consumption of ultra-processed foods, gestational weight gain and neonatal outcomes in a sample of US pregnant women. *PeerJ*, 5, e4091. <https://doi.org/10.7717/peerj.4091>
- Romo-Romo, A., Aguilar-Salinas, C. A., Brito-Córdova, G. X., Gómez-Díaz, R. A., & Almeda-Valdes, P. (2018). Sucralose decreases insulin sensitivity in healthy subjects: A randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 108(3), 485-491. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy152>
- Rousta, E., Oka, A., Liu, B., Herzog, J., Bhatt, A. P., Wang, J., Habibi Najafi, M. B., & Sartor, R. B. (2021). The Emulsifier Carboxymethylcellulose Induces More Aggressive Colitis in

- Humanized Mice with Inflammatory Bowel Disease Microbiota Than Polysorbate-80. *Nutrients*, 13(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/nu13103565>
- Sandall, A. M., Cox, S. R., Lindsay, J. O., Gewirtz, A. T., Chassaing, B., Rossi, M., & Whelan, K. (2020). Emulsifiers Impact Colonic Length in Mice and Emulsifier Restriction is Feasible in People with Crohn's Disease. *Nutrients*, 12(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/nu12092827>
- Sandovici, I., Fernandez-Twinn, D. S., Hufnagel, A., Constância, M., & Ozanne, S. E. (2022). Sex differences in the intergenerational inheritance of metabolic traits. *Nature Metabolism*, 4(5), 507-523. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00570-4>
- Saper, C. B., & Lowell, B. B. (2014). The hypothalamus. *Current Biology*, 24(23), R1111-R1116. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.023>
- Schneeberger, M., Gomis, R., & Claret, M. (2014). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *Journal of Endocrinology*, 220(2), T25-T46. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0398>
- Shah, R., Kolanos, R., DiNovi, M. J., Mattia, A., & Kaneko, K. J. (2017). Dietary exposures for the safety assessment of seven emulsifiers commonly added to foods in the United States and implications for safety. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(6), 905-917. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1311420>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Shimogori, T., Lee, D. A., Miranda-Angulo, A., Yang, Y., Wang, H., Jiang, L., Yoshida, A. C., Kataoka, A., Mashiko, H., Avetisyan, M., Qi, L., Qian, J., & Blackshaw, S. (2010). A genomic atlas of mouse hypothalamic development. *Nature Neuroscience*, 13(6), 767-775. <https://doi.org/10.1038/nn.2545>
- Singh, R. K., & Ishikawa, S. (2016). Food Additive P-80 Impacts Mouse Gut Microbiota Promoting Intestinal Inflammation, Obesity and Liver Dysfunction. *SOJ microbiology & infectious diseases*, 4(1), 10.15226/sojmid/4/1/00148.
- Skowronski, A. A., Shaulson, E. D., Leibel, R. L., & LeDuc, C. A. (2022). The postnatal leptin surge in mice is variable in both time and intensity and reflects nutritional status. *International Journal of Obesity*, 46(1), 39-49. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00957-5>
- Smit, A. J. P., Hojeij, B., Rousian, M., Schoenmakers, S., Willemsen, S. P., Steegers-Theunissen, R. P. M., & Rossem, L. van. (2022). A high periconceptional maternal ultra-processed food consumption impairs embryonic growth: The Rotterdam periconceptional cohort. *Clinical Nutrition*, 41(8), 1667-1675. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.06.006>
- Sominsky, L., Jasoni, C. L., Twigg, H. R., & Spencer, S. J. (2018). Hormonal and nutritional regulation of postnatal hypothalamic development. *Journal of Endocrinology*, 237(2), R47-R64. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0722>
- Steculorum, S. M., & Bouret, S. G. (2011a). Developmental effects of ghrelin. *Peptides*, 32(11), 2362-2366. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.06.021>

- Steculorum, S. M., & Bouret, S. G. (2011b). Maternal Diabetes Compromises the Organization of Hypothalamic Feeding Circuits and Impairs Leptin Sensitivity in Offspring. *Endocrinology*, 152(11), 4171-4179. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1279>
- Steculorum, S. M., Collden, G., Coupe, B., Croizier, S., Lockie, S., Andrews, Z. B., Jarosch, F., Klusmann, S., & Bouret, S. G. (2015). Neonatal ghrelin programs development of hypothalamic feeding circuits. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(2), 846-858. <https://doi.org/10.1172/JCI73688>
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., Kuperman, Y., Harmelin, A., Kolodkin-Gal, I., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E., & Elinav, E. (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, 514(7521), Article 7521. <https://doi.org/10.1038/nature13793>
- Sweeney, P., Gimenez, L. E., Hernandez, C. C., & Cone, R. D. (2023). Targeting the central melanocortin system for the treatment of metabolic disorders. *Nature Reviews Endocrinology*, 19(9), 507-519. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00855-y>
- Swidsinski, A., Ung, V., Sydora, B. C., Loening-Baucke, V., Doerffel, Y., Verstraelen, H., & Fedorak, R. N. (2009). Bacterial overgrowth and inflammation of small intestine after carboxymethylcellulose ingestion in genetically susceptible mice. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(3), 359-364. <https://doi.org/10.1002/ibd.20763>
- Tahiri, M., Johnsrud, C., & Steffensen, I.-L. (2023). Evidence and hypotheses on adverse effects of the food additives carrageenan (E 407)/processed Eucheuma seaweed (E 407a) and carboxymethylcellulose (E 466) on the intestines: A scoping review. *Critical Reviews in Toxicology*, 53(9), 521-571. <https://doi.org/10.1080/10408444.2023.2270574>
- Toda, C., Santoro, A., Kim, J. D., & Diano, S. (2017). POMC Neurons: From Birth to Death. *Annual review of physiology*, 79, 209-236. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034110>
- Vats, H., Saxena, R., Sachdeva, M. P., Walia, G. K., & Gupta, V. (2021). Impact of maternal pre-pregnancy body mass index on maternal, fetal and neonatal adverse outcomes in the worldwide populations: A systematic review and meta-analysis. *Obesity Research & Clinical Practice*, 15(6), 536-545. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2021.10.005>
- Viennois, E., Bretin, A., Dubé, P. E., Maue, A. C., Dauriat, C. J. G., Barnich, N., Gewirtz, A. T., & Chassaing, B. (2020). Dietary Emulsifiers Directly Impact Adherent-Invasive E. coli Gene Expression to Drive Chronic Intestinal Inflammation. *Cell Reports*, 33(1). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108229>
- Viennois, E., & Chassaing, B. (2021). Consumption of Select Dietary Emulsifiers Exacerbates the Development of Spontaneous Intestinal Adenoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/ijms22052602>
- Viennois, E., Merlin, D., Gewirtz, A. T., & Chassaing, B. (2017). Dietary Emulsifier–Induced Low-Grade Inflammation Promotes Colon Carcinogenesis. *Cancer Research*, 77(1), 27-40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1359>
- Vogt, M. C., Paeger, L., Hess, S., Steculorum, S. M., Awazawa, M., Hampel, B., Neupert, S., Nicholls, H. T., Mauer, J., Hausen, A. C., Predel, R., Kloppenburg, P., Horvath, T. L., & Brüning, J. C. (2014). Neonatal Insulin Action Impairs Hypothalamic Neurocircuit

- Formation in Response to Maternal High-Fat Feeding. *Cell*, 156(3), 495-509. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.008>
- Vuong, H. E., Pronovost, G. N., Williams, D. W., Coley, E. J. L., Siegler, E. L., Qiu, A., Kazantsev, M., Wilson, C. J., Rendon, T., & Hsiao, E. Y. (2020). The maternal microbiome modulates fetal neurodevelopment in mice. *Nature*, 586(7828), 281-286. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2745-3>
- Wang, L., Martínez Steele, E., Du, M., Pomeranz, J. L., O'Connor, L. E., Herrick, K. A., Luo, H., Zhang, X., Mozaffarian, D., & Zhang, F. F. (2021). Trends in Consumption of Ultraprocessed Foods Among US Youths Aged 2-19 Years, 1999-2018. *JAMA*, 326(6), 519-530. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.10238>
- WHO. (2016). *Evaluation of certain food additives and contaminants: Eightieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/204410>
- WHO. (2021). *Obesity and overweight*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Xie, Y., & Dorsky, R. I. (2017). Development of the hypothalamus: Conservation, modification and innovation. *Development*, 144(9), 1588-1599. <https://doi.org/10.1242/dev.139055>
- Yura, S., Itoh, H., Sagawa, N., Yamamoto, H., Masuzaki, H., Nakao, K., Kawamura, M., Takemura, M., Kakui, K., Ogawa, Y., & Fujii, S. (2005). Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metabolism*, 1(6), 371-378. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.005>
- Zhang, Y., Huang, M., Zhuang, P., Jiao, J., Chen, X., Wang, J., & Wu, Y. (2018). Exposure to acrylamide and the risk of cardiovascular diseases in the National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2006. *Environment International*, 117, 154-163. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.047>
- Zigman, J. M., Jones, J. E., Lee, C. E., Saper, C. B., & Elmquist, J. K. (2006). Expression of Ghrelin Receptor mRNA in the Rat and the Mouse Brain. *The Journal of comparative neurology*, 494(3), 528-548. <https://doi.org/10.1002/cne.20823>

Annex 1

Llista dels gens expressats de manera diferencial (DEG) obtinguts a partir de l'RNA-seq de mascles a l'edat de P21 provinents de mares control i mares tractades amb emulgents.

geneID	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	signif
4833420G17Rik	-3,23555748	1,48022634	-3,0647922	0,01055222	0,26529822	-2,7332113	Down
Gm10146	3,21619458	-0,55029434	3,79274387	0,00288776	0,18750931	-2,97486305	Up
Clasrp	3,148785	1,01688426	2,76809938	0,01801353	0,29669461	-3,25812568	Up
Ogdhl	3,00087684	1,7344272	2,29940622	0,04167949	0,36175199	-3,63356145	Up
Pck2	-2,97096361	-0,52156503	-2,33914717	0,03884495	0,3560898	-3,76607147	Down
Espl1	-2,95241789	-1,68012144	-2,85474382	0,01540878	0,2838964	-3,6138478	Down
Hspa2	2,94439773	-1,63849251	2,64590238	0,02244577	0,3195028	-3,82299127	Up
Rab11b-ps2	-2,72091286	-1,11744727	-2,26339062	0,04441927	0,36838155	-3,89483428	Down
Gm21598	-2,59413235	0,94747941	-2,99558057	0,01195348	0,27028304	-2,89680501	Down
Morc3	-2,4824739	2,65905921	-2,45279607	0,03172939	0,33662413	-3,39494958	Down
Gm21541	-2,35525638	0,25580165	-2,25759767	0,04487577	0,36933687	-3,73715789	Down
Gm10171	2,10665572	-0,2732212	2,55174894	0,02658023	0,32823662	-3,63539102	Up
Gm10233	2,10665572	-0,2732212	2,55174894	0,02658023	0,32823662	-3,63539102	Up
Vip	-1,78661486	1,84662995	-2,69107923	0,02069376	0,31062849	-3,100098	Down
Eed	-1,61772576	1,82665462	-2,68894334	0,02077347	0,31092018	-3,10272155	Down
Dmrta2	1,35892711	1,54239944	3,93979195	0,0022349	0,17587088	-1,82432778	Up
Slc37a4	-1,31821185	1,49220712	-4,12645003	0,00161986	0,17156218	-1,51304039	Down
B230216G23Rik	-1,2104348	0,35122811	-2,62372368	0,02335867	0,32252512	-3,36912945	Down
Nr4a1	-1,16077394	4,17922854	-3,18791525	0,00845601	0,25030131	-2,37545075	Down
Gm10182	1,0664905	1,39148075	4,4809551	0,0008894	0,15488258	-1,34670829	Up
Gm21961	1,05962239	1,36470352	2,37782324	0,03626544	0,34605855	-3,53038371	Up
Nr4a3	-1,0566608	3,45366134	-4,50099999	0,00086017	0,15488258	-0,42467735	Down
Syt17	-1,04891749	1,38078427	-2,77575585	0,0177667	0,2948863	-3,04532613	Down
Scyl1	1,01599769	2,85946774	2,6059558	0,02411633	0,32346467	-3,18404657	Up
Nhej1	1,01069103	0,7287999	2,58050049	0,02524408	0,32581901	-3,39014215	Up
Adam32	-1,00129051	-0,31612456	-3,10749413	0,00977149	0,25613826	-3,09234932	Down
Ubn1	0,99842858	1,44565218	2,26131499	0,04458232	0,36923371	-3,65525788	Up
Gnb1l	0,99186328	1,44149269	4,19425102	0,0014426	0,16576305	-1,57546616	Up
Tnfrsf25	-0,98603576	0,07094719	-4,81779884	0,00051093	0,13881363	-1,71183703	Down
Rapgef5	0,95043204	1,94757971	4,37061175	0,00107003	0,15894322	-1,16173712	Up
Dhx30	-0,93305703	4,03538428	-2,4569234	0,03149638	0,33662413	-3,52941562	Down
Gal	-0,92020819	0,50288745	-2,58865809	0,02487714	0,32537224	-3,3806065	Down
Tm6sf2	-0,88871708	0,41088838	-3,45086878	0,00528251	0,22550163	-2,58081854	Down
Sipa1	0,87677987	2,91703137	2,43138151	0,03296554	0,33984392	-3,43259828	Up
Dynlt1-ps1	0,86826925	0,34939362	2,25877929	0,04478229	0,36933687	-3,74463491	Up
Strc	0,85100848	0,0453983	4,44201101	0,0009492	0,15808858	-2,07692597	Up

Traf3ip3	0,84691256	0,16058098	2,86794836	0,01504625	0,28256363	-3,22478498	Up
Rbm7	-0,84190937	3,2152332	-3,36676648	0,0061375	0,23582454	-2,07155045	Down
mt-Co2	0,83663769	11,1053447	5,11805401	0,00031589	0,12183554	0,36374173	Up
Ms4a6b	0,81948296	0,65437508	2,54425244	0,02693986	0,32823662	-3,43362804	Up
Ndufa9	0,81392735	3,07909582	5,19931605	0,00027795	0,12183554	0,26896609	Up
Zfp598	-0,81261604	2,44925208	-3,27037886	0,00729294	0,24302757	-2,27188587	Down
Gm14387	-0,81196635	1,01896204	-3,63885844	0,00378495	0,20646436	-2,19357245	Down
Zfp930	0,80970459	0,8826254	4,53835063	0,00080836	0,15242146	-1,5488501	Up
Lrrc17	0,80311726	7,56490133	2,63795642	0,02276872	0,3204387	-3,64599684	Up
Llg12	-0,7958375	-0,22470919	-2,37581466	0,03639522	0,34638038	-3,68478441	Down
Taf1d	0,79534099	1,56731833	3,21937337	0,0079916	0,24696444	-2,53368506	Up
Dnd1	-0,78763604	0,48414454	-4,26281357	0,00128381	0,16315175	-1,87186394	Down
Fam133b	0,78671132	2,40595852	3,46619325	0,00514035	0,2248947	-2,05325341	Up
Gm9747	-0,78647831	1,66771916	-5,76162019	0,00011764	0,11445205	0,04627195	Down
Rarb	-0,77321685	0,27213213	-3,15118427	0,00903302	0,25383721	-2,89447756	Down
Krt17	0,77271348	-0,05031622	3,53248211	0,00456911	0,22151848	-2,74170426	Up
Olf1536	0,75150669	-0,23962989	2,41618736	0,03387087	0,34219335	-3,67708112	Up
Sh3tc1	0,74948315	0,32812051	2,61273648	0,02382437	0,32302917	-3,41678833	Up
Serpina9	0,74649026	0,14770841	3,3407853	0,00642925	0,23813317	-2,82189484	Up
Pcx	0,74262917	3,24138637	2,6312635	0,02304429	0,32196805	-3,16214478	Up
Rad54b	-0,73663834	0,3149881	-4,36305172	0,00108373	0,15894322	-1,88462378	Down
Rsad2	0,73340399	1,30753263	2,96072437	0,01272858	0,27028304	-2,88039606	Up
Zbtb16	0,73210078	4,77101618	3,5988602	0,00406216	0,21011486	-1,74167686	Up
2010107G12Rik	0,72356853	0,04819322	2,2738295	0,04360787	0,36551959	-3,76190876	Up
Pla2g4b	-0,71324173	1,98531908	-3,73478864	0,00319666	0,19040359	-1,77391432	Down
Csrp2	0,70957915	0,06846653	3,14734583	0,00909557	0,25383721	-3,00152984	Up
Rrad	-0,70332234	3,40637363	-3,76108372	0,00305249	0,18955445	-1,47874087	Down

Annex 2

Llista de l'ontologia gènica (GO) segons un anàlisi PAE dels gens regulats a la baixa obtinguts a partir de l'RNA-seq de mascles a l'edat de P21 provinents de mares control i mares tractades amb emulgents.

GO.ID	Description	p.Val	FDR	Phenotype	Genes
CORUM:5308	Rb-NeuroD1-Ngfi-B complex	0,0165974	0,0165974	-1	Nr4a1
CORUM:7572	MiCEE complex	0,0165974	0,0165974	-1	Eed
GO:0071376	cellular response to corticotropin-releasing hormone stimulus	0,0084793	0,0084793	-1	Nr4a3,Nr4a1
GO:0043435	response to corticotropin-releasing hormone	0,0084793	0,0084793	-1	Nr4a3,Nr4a1
GO:1901842	negative regulation of high voltage-gated calcium channel activity	0,0088902	0,0088902	-1	Rrad,Gem
GO:0046903	secretion	0,0088902	0,0088902	-1	Llgl2,Gal,Syt17,Pck2,Nr4a3,Anpep,Nr4a1,Hcrt
GO:0032940	secretion by cell	0,0190538	0,0190538	-1	Llgl2,Gal,Syt17,Pck2,Nr4a3,Nr4a1,Hcrt
GO:0140352	export from cell	0,0211948	0,0211948	-1	Llgl2,Gal,Syt17,Pck2,Nr4a3,Nr4a1,Hcrt
GO:1901841	regulation of high voltage-gated calcium channel activity	0,0211948	0,0211948	-1	Rrad,Gem
GO:0051046	regulation of secretion	0,0304528	0,0304528	-1	Llgl2,Gal,Syt17,Pck2,Anpep,Hcrt
GO:0061469	regulation of type B pancreatic cell proliferation	0,0304528	0,0304528	-1	Nr4a3,Nr4a1
GO:0032879	regulation of localization	0,0304528	0,0304528	-1	Llgl2,Gal,Syt17,Pck2,Rrad,Gem,Nr4a3,Anpep,Vip,Hcrt
GO:0051049	regulation of transport	0,0322401	0,0322401	-1	Llgl2,Gal,Syt17,Pck2,Rrad,Gem,Nr4a3,Anpep,Hcrt
GO:1901386	negative regulation of voltage-gated calcium channel activity	0,0322401	0,0322401	-1	Rrad,Gem
GO:0009791	post-embryonic development	0,0415602	0,0415602	-1	Llgl2,Morc3,Slc37a4
GO:0023061	signal release	0,0429046	0,0429046	-1	Gal,Syt17,Pck2,Nr4a1,Hcrt
GO:0060669	embryonic placenta morphogenesis	0,0429046	0,0429046	-1	Llgl2,Zfp568
GO:0007631	feeding behavior	0,0429046	0,0429046	-1	Gal,Nr4a3,Hcrt
GO:2001257	regulation of cation channel activity	0,0480113	0,0480113	-1	Gal,Rrad,Gem

GO:0005184	neuropeptide hormone activity	0,001074	0,001074	-1	Gal,Vip,Hcrt
GO:0098531	ligand-activated transcription factor activity	0,0022125	0,0022125	-1	Rarb,Nr4a3,Nr4a1
GO:0004879	nuclear receptor activity	0,0022125	0,0022125	-1	Rarb,Nr4a3,Nr4a1
GO:0035259	nuclear glucocorticoid receptor binding	0,01473	0,01473	-1	Nr4a3,Nr4a1
GO:0000978	RNA polymerase II cis-regulatory region sequence-specific DNA binding	0,0154604	0,0154604	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Eed,Nr4a3,Nr4a1,Onecut3
GO:0000987	cis-regulatory region sequence-specific DNA binding	0,0154604	0,0154604	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Eed,Nr4a3,Nr4a1,Onecut3
GO:0016922	nuclear receptor binding	0,015967	0,015967	-1	Rarb,Nr4a3,Nr4a1
GO:0005179	hormone activity	0,015967	0,015967	-1	Gal,Vip,Hcrt
GO:0031772	type 2 orexin receptor binding	0,015967	0,015967	-1	Hcrt
GO:0031764	type 1 galanin receptor binding	0,015967	0,015967	-1	Gal
GO:0071855	neuropeptide receptor binding	0,015967	0,015967	-1	Gal,Hcrt
GO:0031771	type 1 orexin receptor binding	0,015967	0,015967	-1	Hcrt
GO:0001221	transcription coregulator binding	0,015967	0,015967	-1	Zfp568,Eed,Nr4a3
GO:0000977	RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	0,015967	0,015967	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Eed,Nr4a3,Nr4a1,Onecut3
GO:0042324	orexin receptor binding	0,015967	0,015967	-1	Hcrt
GO:0008134	transcription factor binding	0,015967	0,015967	-1	Rarb,Zfp568,Eed,Nr4a3,Nr4a1
GO:0031765	type 2 galanin receptor binding	0,0182367	0,0182367	-1	Gal
GO:1990837	sequence-specific double-stranded DNA binding	0,0182367	0,0182367	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Eed,Nr4a3,Nr4a1,Onecut3
GO:0031763	galanin receptor binding	0,0182367	0,0182367	-1	Gal
GO:0046914	transition metal ion binding	0,0182367	0,0182367	-1	Rarb,Pck2,Morc3,Nr4a3,Anpep,Nr4a1
GO:0000976	transcription cis-regulatory region binding	0,0182367	0,0182367	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Eed,Nr4a3,Nr4a1,Onecut3
GO:0031766	type 3 galanin receptor binding	0,0182367	0,0182367	-1	Gal
GO:0003677	DNA binding	0,0182367	0,0182367	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Eed,Thap2,Rad54b,Nr4a3,Nr4a1,Onecut3

GO:0001222	transcription corepressor binding	0,0182367	0,0182367	-1	Zfp568,Eed
GO:0004611	phosphoenolpyruvate carboxykinase activity	0,0182367	0,0182367	-1	Pck2
GO:0008270	zinc ion binding	0,0182367	0,0182367	-1	Rarb,Morc3,Nr4a3,Anpep,Nr4a1
GO:0004613	phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) activity	0,0182367	0,0182367	-1	Pck2
GO:0001067	transcription regulatory region nucleic acid binding	0,0182367	0,0182367	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Eed,Nr4a3,Nr4a1,Onecut3
GO:0003676	nucleic acid binding	0,0191807	0,0191807	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Eed,Thap2,Morc3,Rad54b,Nr4a3,Dnd1,Rbm7,Dhx30,Nr4a1,Onecut3
GO:0015152	glucose-6-phosphate transmembrane transporter activity	0,0191807	0,0191807	-1	Slc37a4
GO:0015119	hexose phosphate transmembrane transporter activity	0,0191807	0,0191807	-1	Slc37a4
GO:0015526	hexose-phosphate:inorganic phosphate antiporter activity	0,0191807	0,0191807	-1	Slc37a4
GO:0003690	double-stranded DNA binding	0,0191807	0,0191807	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Eed,Nr4a3,Nr4a1,Onecut3
GO:0043167	ion binding	0,0191807	0,0191807	-1	Rarb,Zfp568,Syt17,Thap2,Pck2,Morc3,Rad54b,Rrad,Gem,Nr4a3,Zfp598,Anpep,Pla2g4b,Dhx30,Nr4a1
GO:0015315	organophosphate:inorganic phosphate antiporter activity	0,0191807	0,0191807	-1	Slc37a4
GO:0043565	sequence-specific DNA binding	0,0191807	0,0191807	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Eed,Nr4a3,Nr4a1,Onecut3
GO:0016787	hydrolase activity	0,0191807	0,0191807	-1	Adam32,Espl1,Morc3,Rad54b,Rrad,Gem,Anpep,Pla2g4b,Dhx30
GO:0046872	metal ion binding	0,0191807	0,0191807	-1	Rarb,Zfp568,Syt17,Thap2,Pck2,Morc3,Gem,Nr4a3,Zfp598,Anpep,Pla2g4b,Nr4a1
GO:0001228	DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific	0,0191807	0,0191807	-1	Fosl2,Nr4a3,Nr4a1,Onecut3
GO:0061513	glucose 6-phosphate:inorganic phosphate antiporter activity	0,0191807	0,0191807	-1	Slc37a4
GO:0001216	DNA-binding transcription activator activity	0,0195078	0,0195078	-1	Fosl2,Nr4a3,Nr4a1,Onecut3
GO:0043169	cation binding	0,019673	0,019673	-1	Rarb,Zfp568,Syt17,Thap2,Pck2,Morc3,Gem,Nr4a3,Zfp598,Anpep,Pla2g4b,Nr4a1
GO:0004966	galanin receptor activity	0,0228469	0,0228469	-1	Gal
GO:0000981	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific	0,0228469	0,0228469	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Nr4a3,Nr4a1,Onecut3

GO:1901363	heterocyclic compound binding	0,0228469	0,0228469	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Eed,Thap2,Pck2,Morc3,Rad54b,Rrad,Gem,Nr4a3,Dnd1,Rbm7,Dhx30,Nr4a1,Onecut3
GO:0097159	organic cyclic compound binding	0,0255121	0,0255121	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Eed,Thap2,Pck2,Morc3,Rad54b,Rrad,Gem,Nr4a3,Dnd1,Rbm7,Dhx30,Nr4a1,Onecut3
GO:0015616	DNA translocase activity	0,0268308	0,0268308	-1	Rad54b
GO:0003700	DNA-binding transcription factor activity	0,0268308	0,0268308	-1	Rarb,Zfp568,Fosl2,Nr4a3,Nr4a1,Onecut3
GO:0017111	ribonucleoside triphosphate phosphatase activity	0,041002	0,041002	-1	Morc3,Rrad,Gem,Dhx30
GO:0015114	phosphate ion transmembrane transporter activity	0,045759	0,045759	-1	Slc37a4
GO:0045159	myosin II binding	0,0477132	0,0477132	-1	Llgl2
GO:0005525	GTP binding	0,0477132	0,0477132	-1	Pck2,Rrad,Gem
GO:0016818	hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides	0,0477132	0,0477132	-1	Morc3,Rrad,Gem,Dhx30
GO:0016817	hydrolase activity, acting on acid anhydrides	0,0477132	0,0477132	-1	Morc3,Rrad,Gem,Dhx30
GO:0016462	pyrophosphatase activity	0,0477132	0,0477132	-1	Morc3,Rrad,Gem,Dhx30
GO:0061629	RNA polymerase II-specific DNA-binding transcription factor binding	0,0477132	0,0477132	-1	Rarb,Nr4a3,Nr4a1
REAC:R-MMU-383280	Nuclear Receptor transcription pathway	0,0011717	0,0011717	-1	Rarb,Nr4a3,Nr4a1
REAC:R-MMU-70263	Gluconeogenesis	0,0190924	0,0190924	-1	Pck2,Slc37a4

Annex 3

RESEARCH ARTICLE

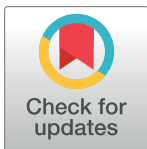
Maternal emulsifier consumption programs offspring metabolic and neuropsychological health in mice

Maria Milà-Guasch¹, Sara Ramírez¹, Sergio R. Llana¹, Júlia Fos-Domènech¹, Lea Maria Dropmann¹, Macarena Pozo¹, Elena Eyre¹, Alicia G. Gómez-Valadés¹, Arnaud Obri¹, Roberta Haddad-Tóvolli^{1‡*}, Marc Claret^{1,2,3‡*}

1 Neuronal Control of Metabolism (NeuCoMe) Laboratory, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain, **2** CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Barcelona, Spain, **3** School of Medicine, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

‡ These authors jointly supervised this work.

* haddad@recerca.clinic.cat (RHT); mclaret@recerca.clinic.cat (MC)



OPEN ACCESS

Citation: Milà-Guasch M, Ramírez S, Llana SR, Fos-Domènech J, Dropmann LM, Pozo M, et al. (2023) Maternal emulsifier consumption programs offspring metabolic and neuropsychological health in mice. *PLoS Biol* 21(8): e3002171. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002171>

Academic Editor: Sebastien G. Bouret, INSERM, FRANCE

Received: September 28, 2022

Accepted: May 24, 2023

Published: August 24, 2023

Copyright: © 2023 Milà-Guasch et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The data that underlie the figures are publicly accessible in DOI:[10.6084/m9.figshare.22742759](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.22742759). RNASeq datasets generated and/or analyzed during the current study are available in the NCBI GEO repository under accession number GSE231769 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE231769>).

Funding: This study was funded by the European Research Council under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement no. 725004) and supported by:

Abstract

Modern lifestyle is associated with a major consumption of ultra-processed foods (UPF) due to their practicality and palatability. The ingestion of emulsifiers, a main additive in UPFs, has been related to gut inflammation, microbiota dysbiosis, adiposity, and obesity. Maternal unbalanced nutritional habits during embryonic and perinatal stages perturb offspring's long-term metabolic health, thus increasing obesity and associated comorbidity risk. However, whether maternal emulsifier consumption influences developmental programming in the offspring remains unknown. Here, we show that, in mice, maternal consumption of dietary emulsifiers (1% carboxymethyl cellulose (CMC) and 1% P80 in drinking water), during gestation and lactation, perturbs the development of hypothalamic energy balance regulation centers of the progeny, leads to metabolic impairments, cognition deficits, and induces anxiety-like traits in a sex-specific manner. Our findings support the notion that maternal consumption of emulsifiers, common additives of UPFs, causes mild metabolic and neuropsychological malprogramming in the progeny. Our data call for nutritional advice during gestation.

Introduction

Modern lifestyle promotes the disproportionate consumption of sugar and saturated fats together with a sedentary life, leading to the development of obesity (and its associated comorbidities), which has reached pandemic proportions [1]. In recent years, the so-called ultra-processed foods (UPFs) have become remarkably popular in the market due to their convenience and palatability. As defined by the NOVA classification, UPFs are industrial formulations with little or no whole food, poor nutritional quality, high glycemic load, low dietary fibers, and substantial amounts of additives (colorants, flavorings, sweeteners, thickeners, emulsifiers, etc.) [2]. Importantly, scientific evidence has associated UPF consumption with the development of obesity, type 2 diabetes (T2D), cardiovascular disease, cancer, depression, and gastrointestinal disorders [3–6].

'la Caixa' Foundation (ID100010434) under agreement LCF/PR/HR19/52160016 and the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya (to M. C.); Marie Skłodowska-Curie Action fellowship (H2020-MSCA-IF) NEUROPREG (grant agreement no. 891247; to R.H.-T.); the Spanish Ministry of Science and Innovation, Juan de la Cierva fellowship (IJC2018-037341-I to S.R.); Miguel Servet contract (CP19/00083) from Instituto de Salud Carlos III co-financed by ERDF (to A.O.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: AgRP, agouti-related peptide; AUC, area under the curve; CMC, carboxymethyl cellulose; DEG, differentially expressed gene; FAO, Food and Agriculture Organization; GTT, glucose tolerance test; gWAT, gonadal white adipose tissue; IP, intraperitoneally; MBH, mediobasal hypothalamus; NORT, novel object recognition test; P80, polysorbate 80; PCA, principal component analysis; POMC, pro-opiomelanocortin; PVH, paraventricular nucleus of the hypothalamus; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; RIN, RNA integrity number; T2D, type 2 diabetes; UPF, ultra-processed food; WD, western-style diet; WHO, World Health Organization.

Emulsifiers, one of the most common UPF additives, are used as stabilizers to form or maintain a homogenous mixture of 2 or more immiscible phases. They can be found in numerous UPF items, including margarines, mayonnaise, salad dressings, bread, ice creams, cake mixes, fruit juices, snacks, instant soups, and noodles among many others. The Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) allows the addition of emulsifiers up to 1%. Among the most used emulsifiers, sodium carboxymethyl cellulose (CMC), and polysorbate 80 (P80) have been extensively added to UPFs for over 30 years. Alarming, recent studies indicated that emulsifier consumption causes gut microbiota dysbiosis, intestinal inflammation and cancer, metabolic syndrome, and obesity [7–12].

Epidemiological and experimental evidence show that a perturbed environment during early life results in developmental adaptations that predispose the offspring to health disturbances in adulthood in both humans and rodents ("The Developmental Origins of Health and Disease" (DOHaD)) [13–16]. In this context, maternal dietary insults during gestation and lactation interfere with the programming of multiple neurocircuits [17–22], thus contributing to the development of diverse metabolic and neuropsychological disorders [23–25]. Indeed, it is worth noting that such pre- and perinatal nutritional challenges compromise the adequate development of hypothalamic feeding systems, including pro-opiomelanocortin (POMC) and agouti-related peptide (AgRP) neurons [19,20,26,27], which are crucial for systemic energy and metabolic homeostasis [28].

Within the context outlined above, the current study aimed to investigate the impact of emulsifier consumption during pregnancy and lactation on offspring's long-term health using the mouse as an experimental model. Our data showed that maternal intake of emulsifiers induced mild metabolic and neuropsychological alterations in the progeny, thus calling for nutritional advice towards UPF consumption during gestation.

Results

Emulsifier consumption induces maternal glucose homeostasis disarrangements

To investigate the effects of maternal consumption of emulsifiers on offspring health, water (CTRL) or a mixture of 1% CMC and 1% P80 in drinking water (Emul) was provided to C57Bl/6 female mice for 6 weeks before pregnancy and throughout gestation and lactation (Fig 1A). Before the onset of pregnancy (after 6 weeks of emulsifier supplementation), CMC+P80 consumption did not affect the dams' liquid intake (water or water supplemented with emulsifiers) (Fig 1B), but induced a slight decrease in daily food intake (Fig 1C) that did not reflect in changes in body weight (Fig 1D). However, emulsifier-treated females exhibited fasting hyperglycemia and presented mild glucose intolerance (Fig 1E–1G) with no changes in plasma leptin levels (Fig 1H). Continuous CMC+P80 exposure throughout pregnancy and lactation (S1A Fig) restored food intake (S1B Fig). Body weight (S1C Fig) and adiposity (S1D Fig) were unaltered. Glucose intolerance was intensified by the end of the treatment (S1E and S1F Fig), with no changes in basal glycemia (S1G Fig) and plasma leptin and insulin levels (S1H and S1I Fig). These results indicate that emulsifier consumption causes mild glucose homeostasis impairments in dams, thus altering the maternal environment during gestation and lactation.

Maternal consumption of emulsifiers leads to mild metabolic impairments in the offspring at weaning in a sex-specific manner

We next assessed whether the consumption of emulsifiers during pregnancy and lactation impacted the metabolic health of the progeny (Fig 2A). Litter size was not altered upon

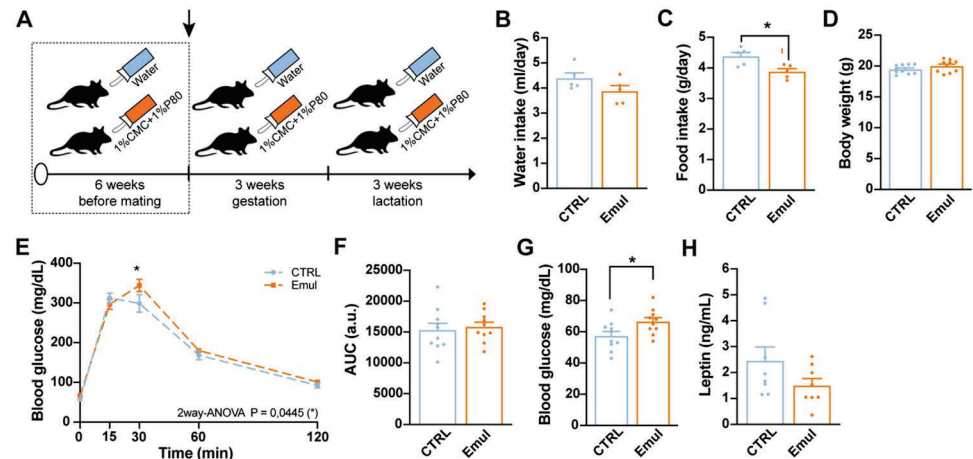


Fig 1. Emulsifiers induce mild glucose intolerance in female mice before the onset of pregnancy. (A) Experimental design of maternal emulsifier consumption highlighting the period of maternal characterization. (B) Daily water consumption of control and emulsifier-treated females before mating ($n = 5/\text{group}$). (C) Daily food intake of control and emulsifier-treated females before mating ($n = 5/\text{group}$). (D) Body weight of control and emulsifier-treated females before mating ($n = 10 \text{ CTRL}$ and $n = 10 \text{ Emul}$). (E) GTT and (F) AUC of control and emulsifier females before mating ($n = 10 \text{ CTRL}$ and $n = 10 \text{ Emul}$). (G) Fasting blood glucose levels of control and emulsifier-supplemented females before mating ($n = 10 \text{ CTRL}$ and $n = 10 \text{ Emul}$). (H) Plasma leptin levels after 6 h of fasting in control and emulsifier-treated females before mating ($n = 8 \text{ CTRL}$ and $n = 8 \text{ Emul}$). Data are derived from 1 single experiment. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed with an unpaired t test in B, C, D, F, G, H, and by two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc analysis in E. * $p < 0.05$. The data underlying this figure can be found at DOI:10.6084/m9.figshare.22742759. AUC, area under the curve; GTT, glucose tolerance test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002171.g001>

maternal emulsifier consumption (CTRL: 7.4 ± 1.1 pups/litter; Emul: 8.8 ± 1.4 pups/litter, t test, $p = 0.34$). At weaning, male and female offspring from emulsifier-treated dams exhibited equivalent body lengths (Fig 2B) albeit were lighter (Fig 2C), and male mice showed decreased adiposity (Fig 2D). Despite this reduction in body weight and adiposity, male offspring from emulsifier-treated dams were mild glucose intolerant (Fig 2E and 2F) with no changes in insulin sensitivity (Fig 2G and 2H), glycemia or circulating insulin and leptin levels at weaning (Fig 2I–2K). Regardless comparable plasma leptin levels at weaning, male offspring from emulsifier-treated dams presented a delayed postnatal leptin surge that occurred at P13 instead of P10 (Fig 2L and 2M) [29]. No changes in overall metabolic parameters were observed in female offspring from emulsifier-treated dams (Fig 2I–2K and 2N–2R).

Hypothalamic feeding-related determinants are altered upon maternal emulsifier consumption

Emulsifier consumption has been associated with changes in feeding-related neuropeptides in adult mice [11]. To understand the impact of maternal emulsifier consumption on hypothalamic development, we performed RNA sequencing (RNAseq) in the mediobasal hypothalamus (MBH) of male offspring at weaning. Principal component analysis (PCA) of individual samples identified 2 distinct clusters (S2A Fig). RNAseq analysis uncovered 83 differentially expressed genes (DEGs) upon maternal emulsifier consumption (Fig 3A). Out of the total amount of DEGs, 54% (45) of the genes were up-regulated and 46% (38) were down-regulated (Fig 3A and S1 Table). Enrichment pathway analysis of the down-regulated DEGs revealed significant changes in 4 main pathways: feeding behavior/neuropeptides, neuronal activity, metabolism, and transcriptional regulation (Fig 3B and S1 Table). To confirm that maternal consumption of emulsifiers affects the development of neuronal circuits controlling feeding

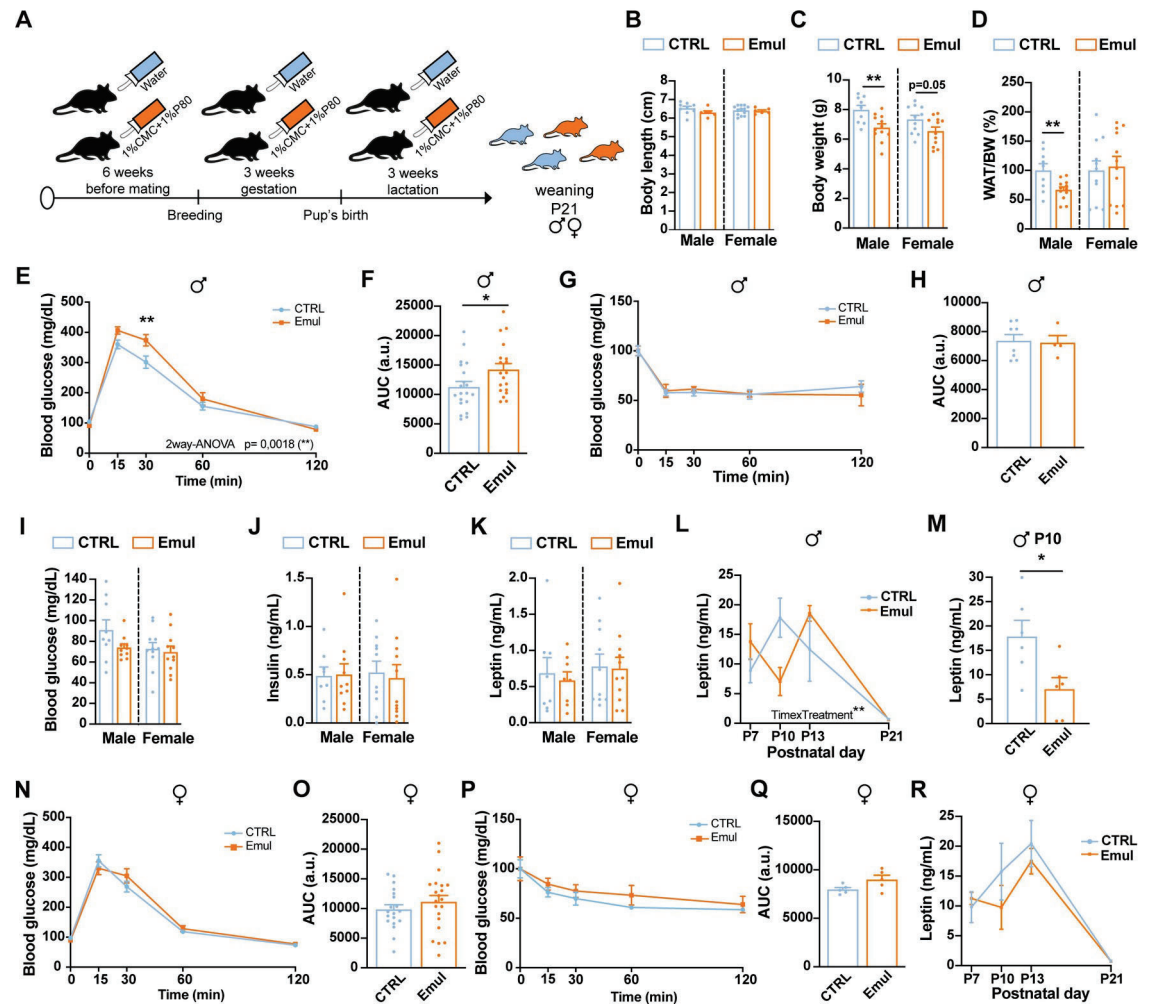


Fig 2. Maternal emulsifier consumption leads to mild metabolic impairments at weaning. (A) Experimental design of maternal emulsifier consumption and offspring collection at weaning. (B) Body length at weaning of male ($n = 9$ CTRL and $n = 6$ Emul) and female ($n = 13$ CTRL and $n = 6$ Emul) offspring from control and emulsifier-exposed dams. (C) Body weight at weaning of male ($n = 9$ CTRL and $n = 12$ Emul) and female ($n = 11$ CTRL and $n = 12$ Emul) offspring from control and emulsifier-exposed dams. (D) Epididymal and gWAT weight normalized by total body weight and represented as % of control animals in male ($n = 9$ CTRL and $n = 12$ Emul) and female ($n = 11$ CTRL and $n = 12$ Emul) offspring from control and emulsifier-exposed dams at weaning. (E) GTT and (F) AUC in male ($n = 20$ CTRL and $n = 19$ Emul) offspring from control and emulsifier-exposed dams at weaning. (G) ITT and (H) AUC in male ($n = 8$ CTRL and $n = 4$ Emul) offspring from control and emulsifier-exposed dams at weaning. (I) Six-hour fasting blood glucose levels in male ($n = 9$ CTRL and $n = 10$ Emul) and female ($n = 11$ CTRL and $n = 11$ Emul) offspring from control and emulsifier-exposed dams at weaning. (J) Plasma insulin levels in male ($n = 8$ CTRL and $n = 10$ Emul) and female ($n = 10$ CTRL and $n = 11$ Emul) offspring from control and emulsifier-exposed dams at weaning after 6 h of fasting. (K) Plasma leptin levels in male ($n = 8$ CTRL and $n = 8$ Emul) and female ($n = 10$ CTRL and $n = 11$ Emul) offspring from control and emulsifier-exposed dams at weaning after 6 h of fasting. (L) Plasma leptin levels across postnatal development (P7–P10–P13–P21) (P7 $n = 6$ CTRL and $n = 5$ Emul; P10 $n = 6$ CTRL and $n = 6$ Emul; P13 $n = 6$ CTRL and $n = 6$ Emul; P21 $n = 8$ CTRL and $n = 8$ Emul) in male offspring from control and emulsifier-exposed dams. (M) Peak plasma leptin levels at P10 ($n = 6$ CTRL and $n = 6$ Emul) in male offspring from control and emulsifier-exposed dams. (N) GTT and (O) AUC in female ($n = 19$ CTRL and $n = 21$ Emul) offspring from control and emulsifier-exposed dams at weaning. (P) ITT and (Q) AUC in female ($n = 5$ CTRL and $n = 5$ Emul) offspring from control and emulsifier-exposed dams at weaning. (R) Plasma leptin levels across postnatal development (P7–P10–P13–P21) (P7 $n = 6$ CTRL and $n = 4$ Emul; P10 $n = 6$ CTRL and $n = 4$ Emul; P13 $n = 6$ CTRL and $n = 4$ Emul; P21 $n = 10$ CTRL and $n = 11$ Emul) in female offspring from control and emulsifier-exposed dams. Data in B, G, H, L, M, P, Q, and R are derived from 1 single experiment. Data in C, D, E, F, I, J, K, N, and O are pools from 2 different experiments. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed by unpaired t test in B, C, D, F, H, I, J, K, M, O, and Q and two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc analysis in E, G, N, and P. Panels L and R were analyzed using a two-way ANOVA mixed effects. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. The data underlying this figure can be found at DOI:10.6084/m9.figshare.22742759. AUC, area under the curve; GTT, glucose tolerance test; gWAT, gonadal white adipose tissue; ITT, insulin tolerance test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002171.g002>

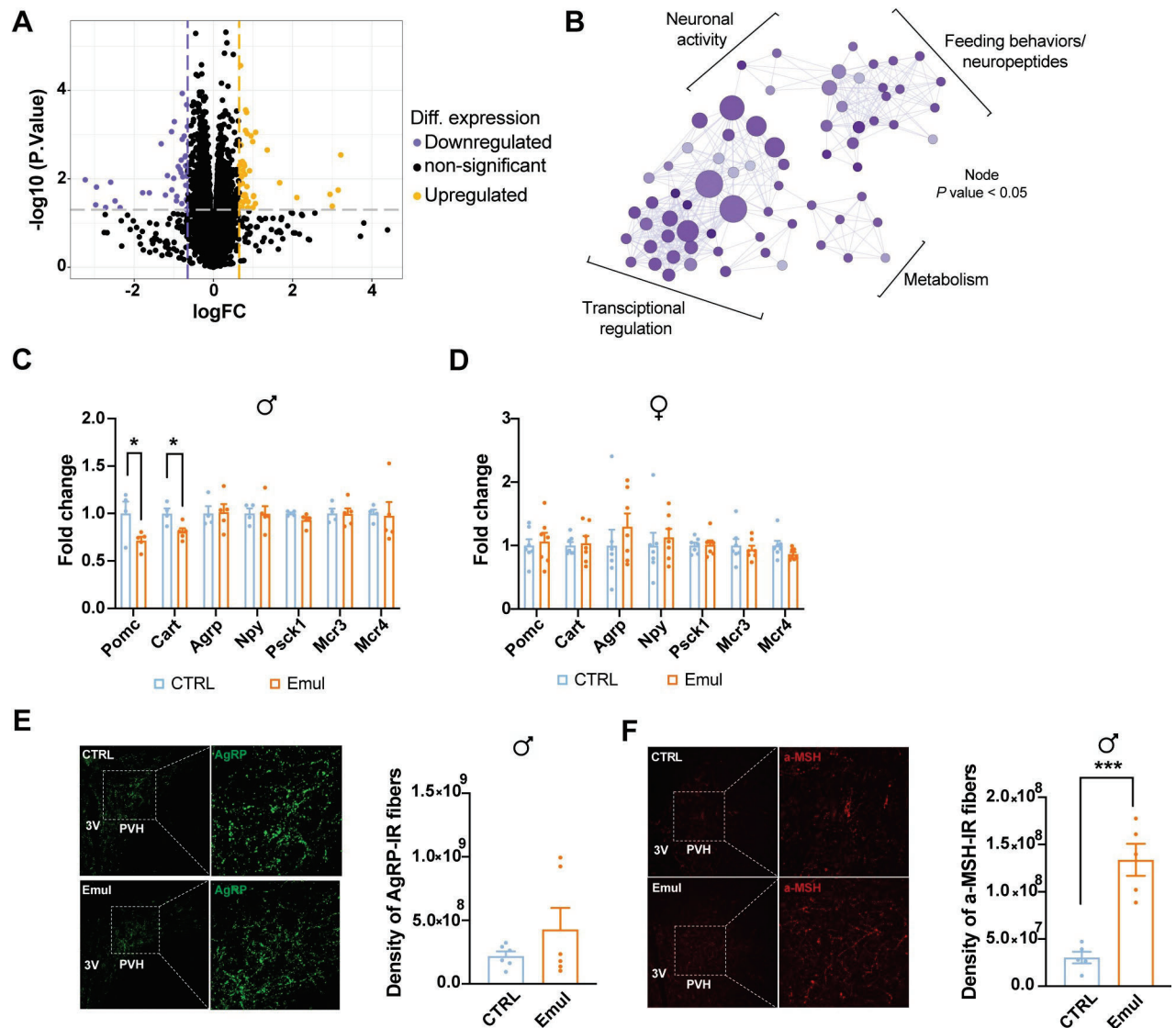


Fig 3. Hypothalamic feeding-related neuropeptides are altered upon maternal emulsifier consumption. (A) Volcano plot of transcript expression in the MBH between control and emulsifier offspring at weaning. Threshold for FC (± 1.5) and FDR ($p < 0.05$) was considered. DEGs upon maternal emulsifier consumption are depicted in blue (down-regulated) and orange (up-regulated). Unchanged genes are represented in black ($n = 4$ CTRL and $n = 5$ Emul). (B) Cytoscape plot of the down-regulated enriched pathways ($p < 0.05$) in the offspring of emulsifier-exposed dams. (C) Transcript expression of orexigenic and anorexigenic peptides in the MBH in male offspring from control and emulsifier-exposed dams at weaning ($n = 4$ CTRL and $n = 5$ Emul). (D) Transcript expression of orexigenic and anorexigenic peptides in the MBH in female offspring from control and emulsifier-exposed dams at weaning ($n = 7$ CTRL and $n = 7$ Emul). (E) Representative immunofluorescence images showing AgRP staining density in the PVH of control and emulsifier male offspring at weaning and integrated density quantification ($n = 6$ mice/group). (F) Representative immunofluorescence images showing α -MSH staining density in the PVH of control and emulsifier male offspring at weaning and integrated density quantification ($n = 5$ mice/group). Data in C and D are derived from 1 single experiment. Data in E and F are pools from 2 different experiments. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed by unpaired t test in C, D, E, and F. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. The data underlying this figure can be found at DOI:10.6084/m9.figshare.22742759. *Pomc*, pro-opiomelanocortin; *Cart*, cocaine- and amphetamine-regulated transcript; *AgRP*, agouti-related peptide; *Npy*, neuropeptide Y; *Pcsk1*, proprotein convertase 1; *Mcr3*, melanocortin 3 receptor; *Mcr4*, melanocortin 4 receptor; α -MSH, alpha-melanocyte-stimulating hormone; PVH, paraventricular hypothalamic nucleus; 3V, third ventricle; DEG, differentially expressed gene; FC, fold change; FDR, false discovery rate; MBH, mediobasal hypothalamus.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002171.g003>

behaviors, we analyzed the expression of key genes related to energy balance and food intake control in the MBH of the progeny of female mice exposed to emulsifiers during gestation and lactation. This analysis included the assessment of pro-opiomelanocortin (*pomc*), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (*cart*), agouti-related peptide (*agrp*), neuropeptide Y (*npv*), proprotein convertase 1 (*pcsk1*), melanocortin 3 receptor (*mc3r*), and melanocortin 4 receptor (*mc4r*). Gene expression analysis revealed that maternal consumption of emulsifiers reduced *pomc* and *cart* expression at weaning exclusively in male offspring (Fig 3C and 3D), with no changes in the overall number and size of POMC neurons (S2B–S2D Fig).

Maternal dietary insults affect the development of axonal projections to target areas [19,26,30]. The changes observed in the expression of anorexigenic genes (*pomc* and *cart*) in males (Fig 3C) prompted us to evaluate if maternal emulsifier consumption would influence melanocortin projections to the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH). While PVH AgRP staining density showed a non-significant trend to increase (Fig 3E), there was a notable increase in the density of α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH, a bioactive anorexigenic product of POMC processing) staining in male offspring from emulsifier-treated dams at weaning (Fig 3F). These data suggested that maternal emulsifier consumption per se, without other components usually present in UPFs, is sufficient to induce a rewiring of the melanocortin hypothalamic feeding circuit that might underlie the metabolic changes observed in male offspring.

Maternal emulsifier consumption leads to mild long-term metabolic impairments in male offspring

Next, we interrogated whether early life exposure to CMC+P80 induces long-term metabolic health disruptions. To differentiate between maternal programming consequences and emulsifier consumption after birth, we divided control and emulsifier offspring into 4 groups at weaning: maternal control + water (CTRL—CTRL), maternal control + emulsifiers after weaning (CTRL—Emul), maternal emulsifier + water (Emul—CTRL), and maternal emulsifier + emulsifier (Emul—Emul) treatment after weaning until 10 weeks of age (Fig 4A). In males, maternal consumption of emulsifiers, independent of its exposure after weaning, led to body weight reduction (Fig 4B), without significant changes in adiposity (Fig 4C) or body length (Fig 4D). Male offspring born from dams treated with emulsifiers showed higher insulin sensitivity (Fig 4E and 4F), without changes in food intake (S4A Fig), glucose tolerance, blood glucose, insulin, and leptin levels (Fig 4G–4K). Of note, life-long exposure to emulsifiers (intrauterine and postnatal life) induced stronger glucose homeostasis impairments leading to glucose intolerance (Fig 4H) (maternal control + emulsifier: $14,326 \pm 5,834$ area under the curve (AUC) versus maternal emulsifier + emulsifier: $19,084 \pm 3,039$ AUC, $p = 0.0099$). These effects were sex-specific since female offspring from emulsifier-treated dams did not show alterations in any of the analyzed parameters (S3A–S3J and S4B Figs). The delayed leptin surge seen in male offspring from emulsifiers-treated dams (Fig 2L and 2M) prompted us to investigate their ability to respond to the anorexigenic effects of leptin. Maternal emulsifier consumption, or emulsifier consumption during life, did not perturb the weight- and food intake-reducing effects of exogenously administered leptin (S4C and S4D Fig). These results suggest that maternal consumption of emulsifiers affects the metabolic programming of male offspring, triggering mild alterations in glucose metabolism in adulthood.

The combination of emulsifiers and western diet does not exacerbate the metabolic impairments derived from maternal programming

Emulsifiers are mostly present in UPFs, which are highly rich in carbohydrates and fats. We then wondered if the metabolic programming effects due to maternal consumption of

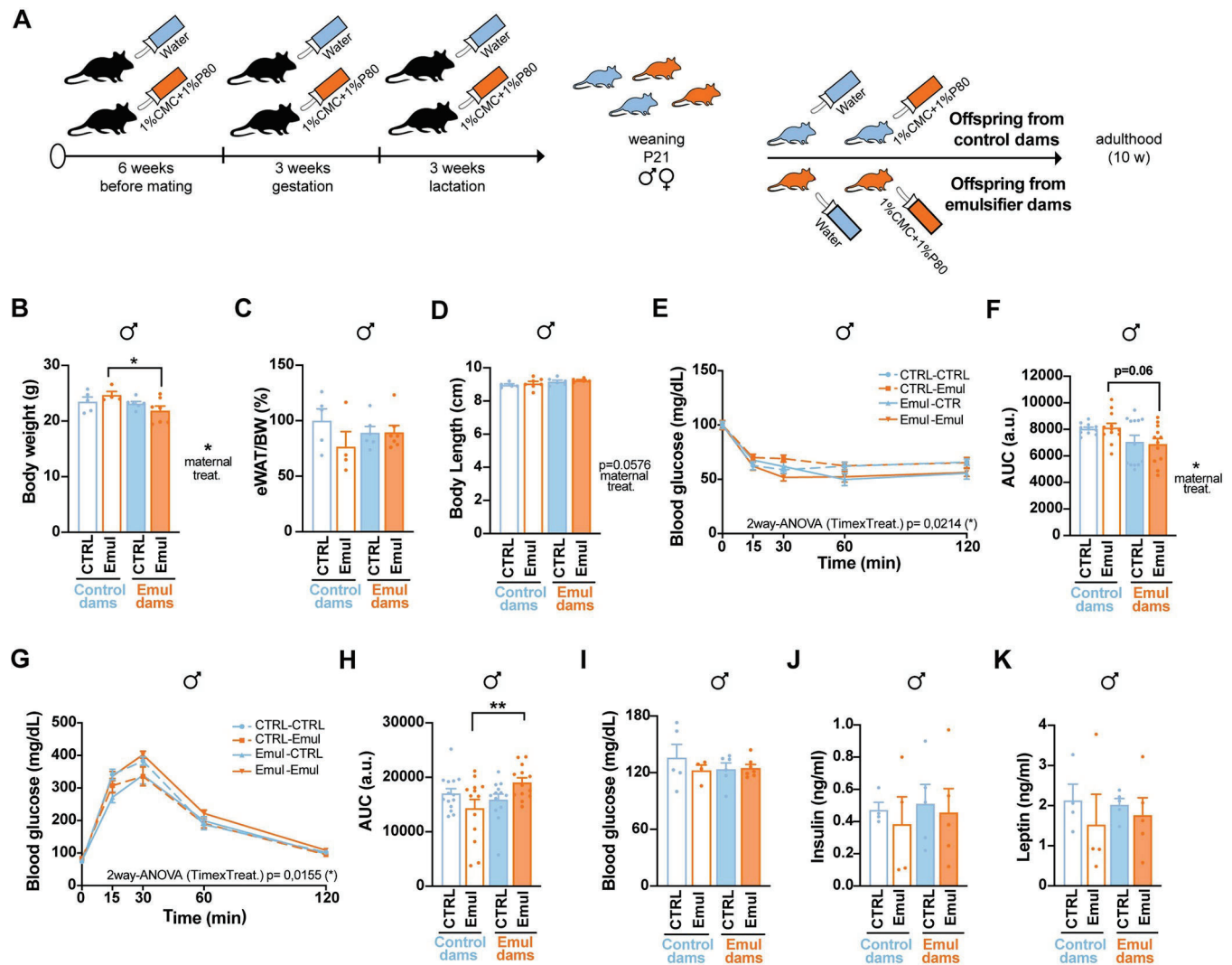


Fig 4. Maternal emulsifier consumption leads to mild long-term metabolic impairments in male offspring. (A) Schematic illustration of offspring treatment until adulthood (10 weeks of age). (B) Body weight at 10 weeks of age ($n = 5$ CTRL-CTRL; $n = 4$ CTRL-Emul; $n = 6$ Emul-CTRL; $n = 7$ Emul-Emul). (C) eWAT weight normalized by total body weight and represented as % of control animals at 10 weeks of age ($n = 5$ CTRL-CTRL; $n = 4$ CTRL-Emul; $n = 6$ Emul-CTRL; $n = 7$ Emul-Emul). (D) Body length at 10 weeks of age ($n = 5$ CTRL-CTRL; $n = 7$ CTRL-Emul; $n = 6$ Emul-CTRL; $n = 5$ Emul-Emul). (E) ITT and (F) AUC ($n = 11$ CTRL-CTRL; $n = 12$ CTRL-Emul; $n = 13$ Emul-CTRL; $n = 12$ Emul-Emul) at 10 weeks of age. (G) GTT and (H) AUC ($n = 14$ CTRL-CTRL; $n = 13$ CTRL-Emul; $n = 13$ Emul-CTRL; $n = 13$ Emul-Emul) at 10 weeks of age. (I) Six-hour fasting blood glucose levels ($n = 5$ CTRL-CTRL; $n = 4$ CTRL-Emul; $n = 6$ Emul-CTRL; $n = 7$ Emul-Emul) at 10 weeks of age. (J) Plasma insulin levels after 6 h of fasting at 10 weeks of age ($n = 4$ CTRL-CTRL; $n = 4$ CTRL-Emul; $n = 5$ Emul-CTRL; $n = 5$ Emul-Emul). (K) Plasma leptin levels after 6 h of fasting at 10 weeks of age ($n = 4$ CTRL-CTRL; $n = 4$ CTRL-Emul; $n = 5$ Emul-CTRL; $n = 5$ Emul-Emul). Data in B, C, D, I, J, and K are derived from 1 single experiment. Data in E, F, G, and H are pools from 2 different experiments. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc analysis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. The data underlying this figure can be found at DOI:10.6084/m9.figshare.22742759. AUC, area under the curve; eWAT, epididymal white adipose tissue; GTT, glucose tolerance test; ITT, insulin tolerance test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002171.g004>

emulsifiers would be accentuated once challenged with a high-fat high-sucrose western-style diet (WD). To this end, offspring from control and emulsifier-treated dams were exposed to WD for 11 weeks (Fig 5A). Surprisingly, the combination of emulsifiers and WD did not exacerbate any of the metabolic changes observed in male offspring (Fig 5B–5J). In females, concomitant exposure to maternal emulsifiers and WD access during adulthood (Fig 6A) lowered fasting glucose levels (Fig 6B) and decreased diet-induced hyperinsulinemia and hyperleptinemia (Fig 6C and 6D), while showing similar body weight (Fig 6E) and adiposity (Fig 6F) as

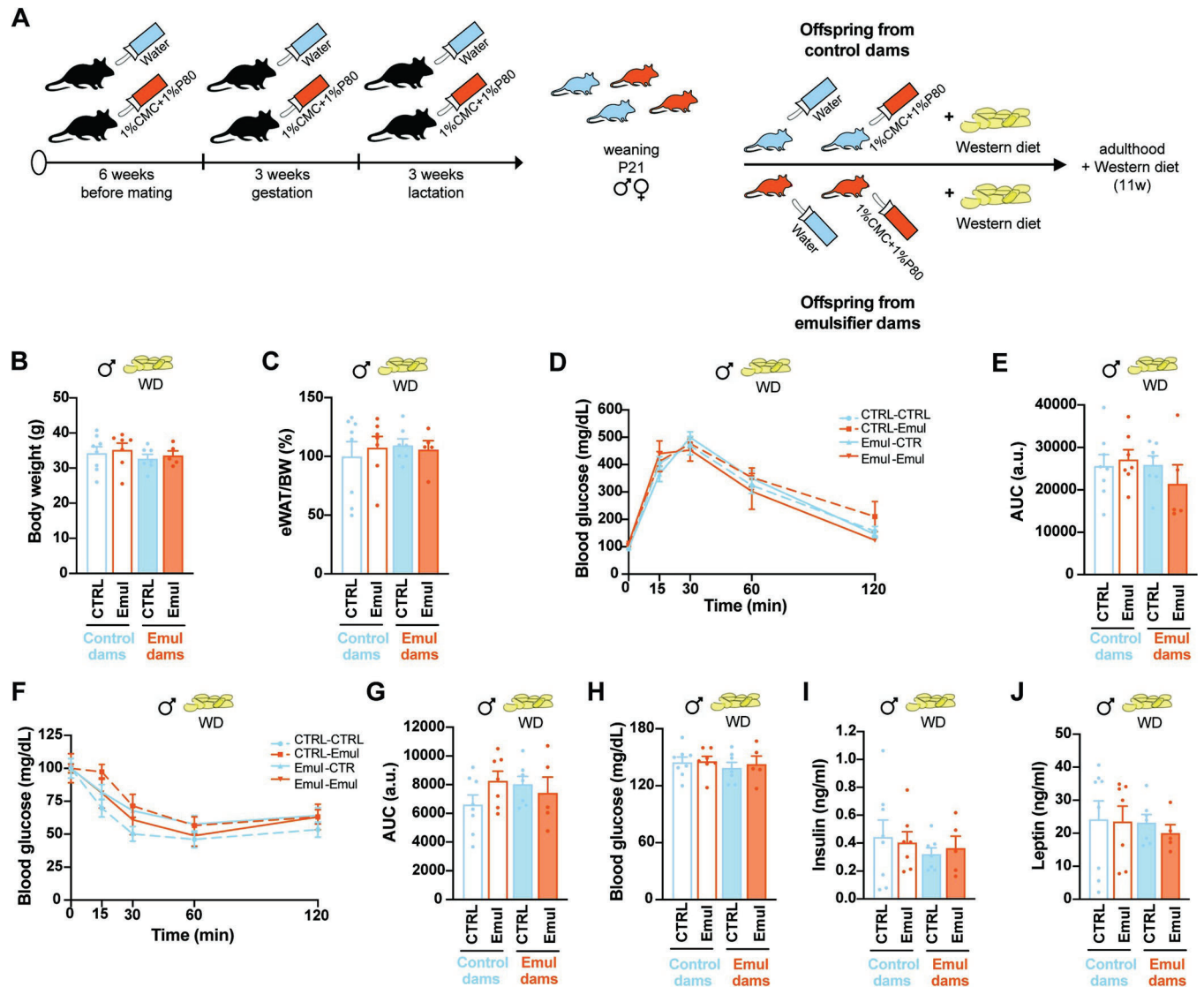


Fig 5. Metabolic impairments derived from western diet consumption are not exacerbated in male offspring from emulsifier-treated dams. (A) Schematic illustration of offspring treatment until adulthood. (B) Body weight at 22 weeks of age, after 11 weeks of WD exposure ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 7$ CTRL-Emul; $n = 7$ Emul-CTRL; $n = 5$ Emul-Emul). (C) eWAT weight normalized by total body weight and represented as % of control animals at 22 weeks of age, after 11 weeks of WD exposure ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 7$ CTRL-Emul; $n = 7$ Emul-CTRL; $n = 5$ Emul-Emul). (D) GTT and (E) AUC ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 7$ CTRL-Emul; $n = 7$ Emul-CTRL; $n = 5$ Emul-Emul) at 19 weeks of age, after 8 weeks of WD exposure. (F) ITT and (G) AUC ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 7$ CTRL-Emul; $n = 7$ Emul-CTRL; $n = 5$ Emul-Emul) at 19 weeks of age, after 8 weeks of WD exposure. (H) Six-hour fasting blood glucose levels at 22 weeks of age, after 11 weeks of WD exposure ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 7$ CTRL-Emul; $n = 7$ Emul-CTRL; $n = 5$ Emul-Emul). (I) Plasma insulin levels after 6 h of fasting at 22 weeks of age, after 11 weeks of WD exposure ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 7$ CTRL-Emul; $n = 7$ Emul-CTRL; $n = 5$ Emul-Emul). (J) Plasma leptin levels after 6 h of fasting at 22 weeks of age, after 11 weeks of WD exposure ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 7$ CTRL-Emul; $n = 7$ Emul-CTRL; $n = 5$ Emul-Emul). Data are derived from 1 single experiment. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc analysis. The data underlying this figure can be found at DOI:10.6084/m9.figshare.22742759. AUC, area under the curve; eWAT, epididymal white adipose tissue; GTT, glucose tolerance test; ITT, insulin tolerance test; WD, western-style diet.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002171.g005>

control counterparts. Furthermore, WD-fed females born to emulsifier-treated dams with continuous exposure to emulsifier were less glucose intolerant (Fig 6G and 6H) (maternal emulsifier + water: $21,114 \pm 7,020$ AUC versus maternal emulsifier + emulsifier: $13,350 \pm 4,885$ AUC, $p = 0.0178$) with no changes in insulin sensitivity (Fig 6I and 6J).

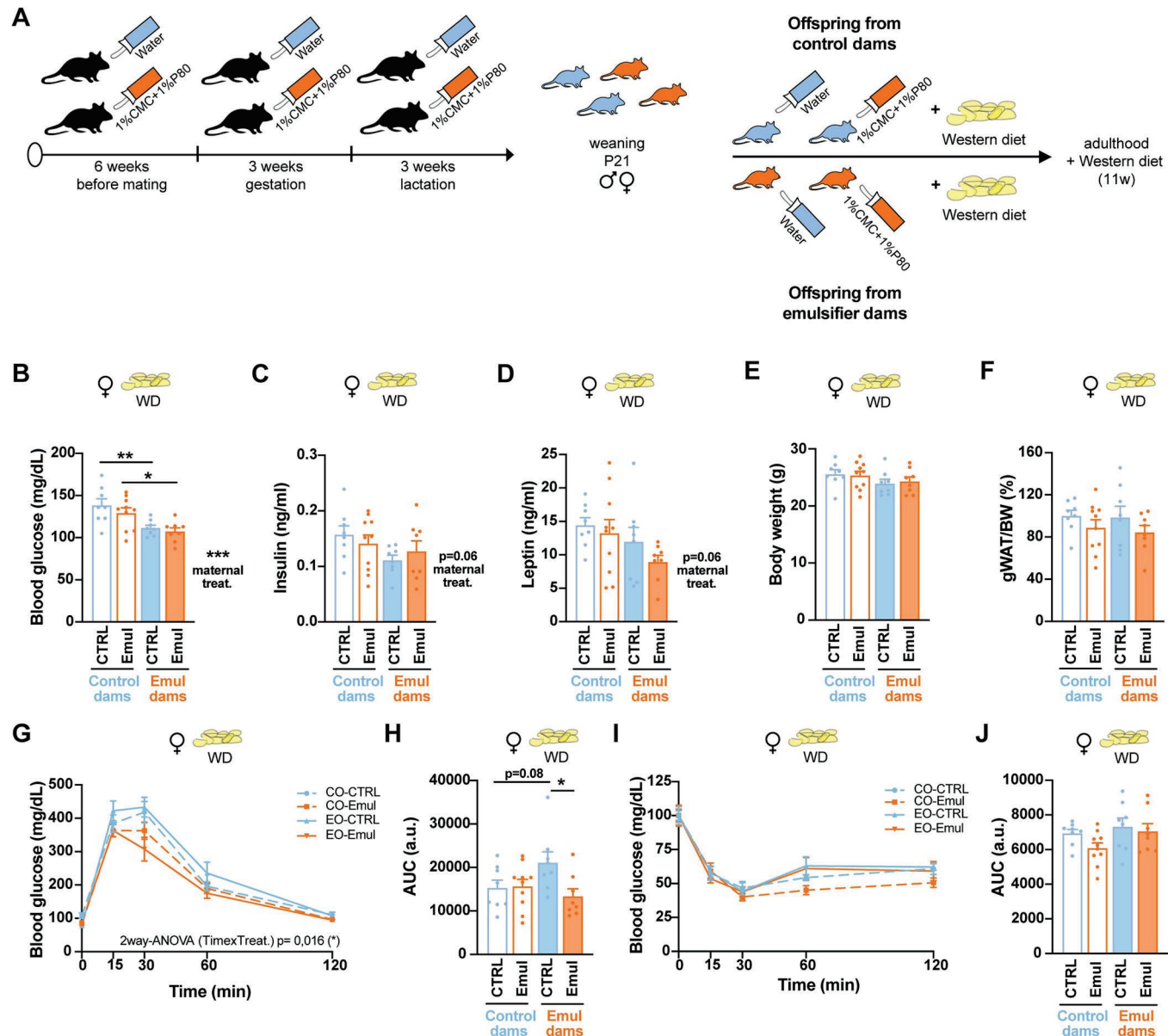


Fig 6. Metabolic outcomes derived from western diet consumption on female offspring from emulsifier-treated dams. (A) Schematic illustration of offspring treatment until adulthood. (B) Six-hour fasting blood glucose levels at 22 weeks of age, after 11 weeks of WD exposure ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 10$ CTRL-Emul; $n = 8$ Emul-CTRL; $n = 8$ Emul-Emul). (C) Plasma insulin levels after 6 h of fasting at 22 weeks of age, after 11 weeks of WD exposure ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 10$ CTRL-Emul; $n = 8$ Emul-CTRL; $n = 8$ Emul-Emul). (D) Plasma leptin levels after 6 h of fasting at 22 weeks of age, after 11 weeks of WD exposure ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 10$ CTRL-Emul; $n = 8$ Emul-CTRL; $n = 8$ Emul-Emul). (E) Body weight at 22 weeks of age, after 11 weeks of WD exposure ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 10$ CTRL-Emul; $n = 8$ Emul-CTRL; $n = 8$ Emul-Emul). (F) gWAT weight normalized by total body weight and represented as % of control animals at 22 weeks of age, after 11 weeks of WD exposure ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 10$ CTRL-Emul; $n = 8$ Emul-CTRL; $n = 8$ Emul-Emul). (G) GTT and (H) AUC ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 10$ CTRL-Emul; $n = 8$ Emul-CTRL; $n = 8$ Emul-Emul) at 19 weeks of age, after 8 weeks of WD exposure. (I) ITT and (J) AUC ($n = 8$ CTRL-CTRL; $n = 10$ CTRL-Emul; $n = 8$ Emul-CTRL; $n = 8$ Emul-Emul) at 19 weeks of age, after 8 weeks of WD exposure. Data are derived from 1 single experiment. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc analysis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. The data underlying this figure can be found at DOI:10.6084/m9.figshare.22742759. AUC, area under the curve; GTT, glucose tolerance test; gWAT, gonadal white adipose tissue; ITT, insulin tolerance test; WD, western-style diet.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002171.g006>

Maternal emulsifier consumption disrupts offspring neuropsychological health

CMC or P80 consumption have been shown to cause anxiety-like behaviors [11]. We next asked if maternal consumption of emulsifiers was sufficient to induce neuropsychological deficits in the offspring. To test this, we conducted a behavioral screening of anxiety-like phenotypes by exposing the offspring to the open field and dark-light box paradigms. Offspring of emulsifier-treated dams presented no changes in locomotor activity in an open field test (S5A–S5D Fig) but male offspring exhibited a significant decrease in the time spent in the light compartment of a dark-light box paradigm (S5E and S5F Fig). Anxiety-like behaviors were intensified upon WD challenge during adulthood, particularly in females (Fig 7A–7F). These results suggested increased anxiety-like states in the offspring of dams exposed to CMC+P80 during gestation and lactation. In addition, dietary insults during pregnancy have been linked to cognitive dysfunction in the offspring [25,31]. While cognition was not impaired in the offspring born to emulsifier-treated dams fed with normal chow diet (S5G–S5J Fig), life-long exposure to emulsifiers in combination with WD led to cognitive impairments in a novel object

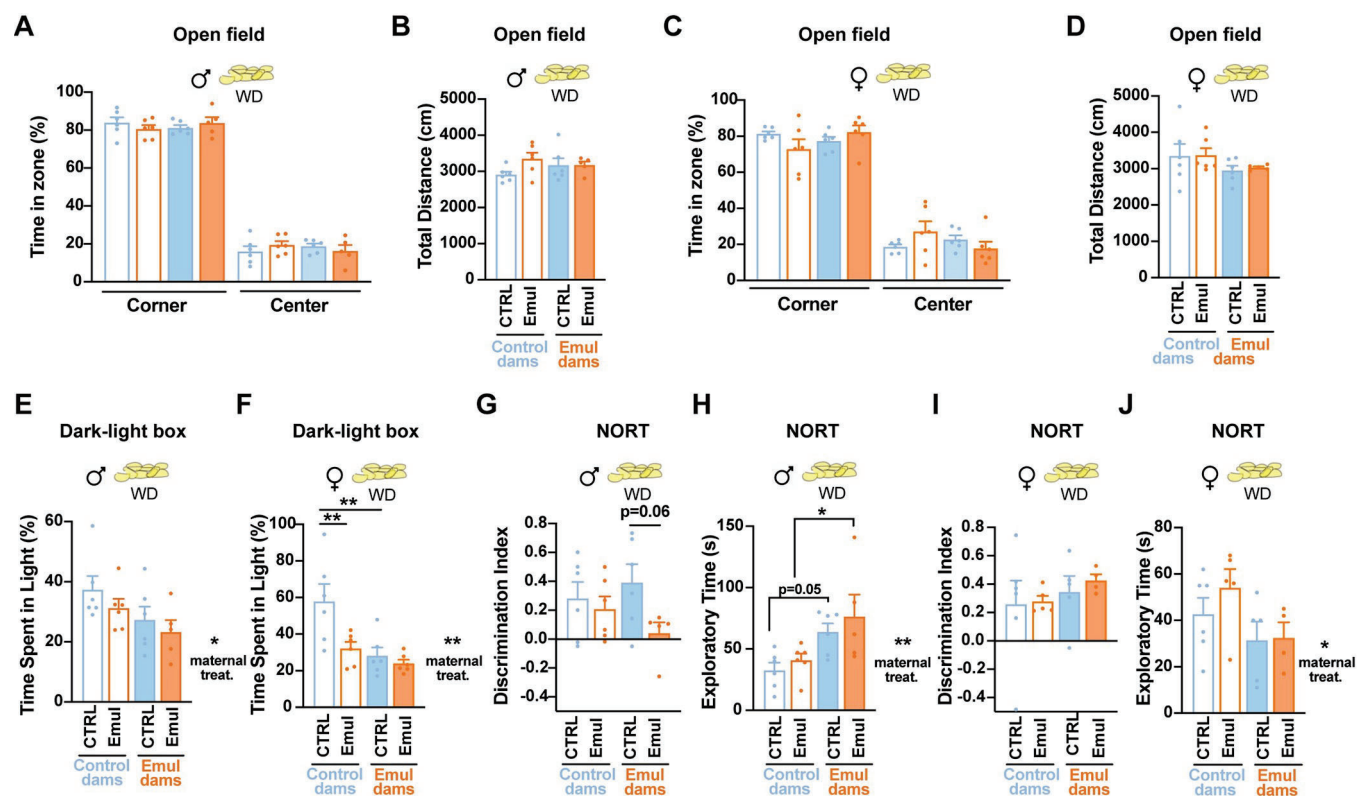


Fig 7. Maternal emulsifier consumption disrupts offspring neuropsychological health. (A–D) Open field performance in 23-week-old male (A and B) ($n = 6$ CTRL–CTRL; $n = 6$ CTRL–Emul; $n = 6$ Emul–CTRL; $n = 5$ Emul–Emul) and female (C and D) ($n = 6$ mice/group) offspring born of control and emulsifier-exposed mothers, including time spent per zone (A and C) and total distance traveled (B and D) after 12 weeks of WD exposure. (E, F) Time spent in the light compartment during the dark-light box test in 23-week-old male (E) ($n = 6$ CTRL–CTRL; $n = 6$ CTRL–Emul; $n = 6$ Emul–CTRL; $n = 5$ Emul–Emul) and female (F) ($n = 6$ mice/group) offspring born of control and emulsifier-exposed mothers after 12 weeks of WD exposure. (G–J) Short-term memory parameters in 24-week-old male (G and H) ($n = 6$ CTRL–CTRL; $n = 6$ CTRL–Emul; $n = 6$ Emul–CTRL; $n = 5$ Emul–Emul) and female (I and J) ($n = 6$ CTRL–CTRL; $n = 5$ CTRL–Emul; $n = 5$ Emul–CTRL; $n = 4$ Emul–Emul) offspring born of control and emulsifier-exposed mothers, after 13 weeks of WD exposure, including discrimination index (G and I) and exploratory time (H and J). Data are derived from 1 single experiment. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc analysis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. The data underlying this figure can be found at DOI:10.6084/m9.figshare.22742759. WD, western-style diet.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002171.g007>

recognition test (NORT) in males (Fig 7G and 7H). Female offspring did not present memory recognition deficits (Figs 7I and 7J and S5I and S5J). Together, these results demonstrate that emulsifier consumption during pregnancy could induce life-long consequences in offspring neuropsychological and metabolic health.

Discussion

The consumption of UPFs has increased sharply over the last 2 decades. In fact, recent surveys have shown that UPF consumption contributes to 25% to 50% of the total daily caloric intake in adults [32] and more than 60% among school-age children in the United Kingdom and the United States [33,34]. UPF intake during pregnancy and its potential adverse effects on maternal–child health have started to be investigated in humans, identifying a positive association between UPF consumption and gestational weight gain, neonatal adiposity, and the development of attention deficit hyperactivity disorder [35–38]. The combination of distinct additives (emulsifiers, sweeteners, colorants, flavorings, etc.) concur with saturated fats and sugars in UPFs and, therefore, the precise contribution of each of these additives to maternal health and offspring developmental programming needs to be carefully assessed. In the present study, we investigated the transgenerational health impact of emulsifiers in mice. In our experimental model, dams and/or offspring mice were exposed to prolonged and continuous amount of CMC+P80, 2 extensively used emulsifiers in the UPF industry. This pattern of administration echoes to some extent the human environment, where exposure to emulsifiers is high and usually combined with other additives, although its consumption occurs in an intermittent manner. Given that access to UPF occurs throughout life (and not only during pregnancy and breastfeeding), we opted for an extended experimental design by providing CMC+P80 several weeks before fecundation. This approach considered the potential long-term effects of emulsifiers on the female intrauterine environment. We found that the maternal consumption of these emulsifiers was sufficient to induce mild metabolic, cognitive, and psychological impairments in male offspring (and to a lesser extent in females).

As regards metabolism, the mild decrease in food intake observed in the female mice before the onset of pregnancy (after 6 weeks of CMC+P80 treatment) disappeared upon prolonged exposure to emulsifiers. This could account to an adaptative response after short-term supplementation with emulsifiers. Our results also indicated that maternal ingestion of emulsifiers resulted in glucose intolerance, even in the absence of body weight gain. In addition, maternal emulsifier consumption delayed the postnatal leptin surge in male offspring. Alterations in leptin levels and glycemic fluctuations during pregnancy can disrupt neuronal specification, proliferation and wiring of hypothalamic circuits in the offspring. Indeed, leptin levels directly influence axonal outgrowth of POMC and AgRP neurons during lactation [23,39]. Therefore, the delayed leptin surge in male offspring of dams exposed to CMC+P80 could underlie the alterations in α -MSH staining innervating the PVH at weaning. Nevertheless, the leptin system seems to function correctly as plasma leptin levels and leptin response were not compromised in adult offspring.

Moreover, our gene expression and α -MSH staining density analysis suggested that anorexigenic brain circuits were more sensitive to the detrimental effects of emulsifier consumption during pregnancy. In addition, the reduction in *pomc* and *cart* expression in male offspring could reflect a compensatory mechanism for the higher α -MSH staining density reaching the PVH. This could underlie the decrease in body weight and adiposity observed in these animals at weaning and during adulthood. Together, our results suggest that emulsifiers can influence the development of hypothalamic neurocircuits during early life in a similar fashion as variations in nutrients do, including glucose, lipids, and food additives [40–42].

Emerging evidence suggests, in both mice and humans, that low concentrations of dietary emulsifiers are sufficient to impact intestinal barrier function and to induce gut inflammation, thus increasing the incidence of intestinal diseases and metabolic syndrome [8,43–46]. The fact that emulsifiers can modulate the gut microbiome [8,47], perturbing its function and generating inflammation, could also contribute to the metabolic impairments and cognition deficits observed in male offspring. In this context, maternal consumption of P80 during gestation and lactation leads to gut dysbiosis and predisposes to colitis in the offspring [48]. Moreover, dysbiosis of the maternal gut microbiome during pregnancy has been shown to modulate fetal thalamocortical axonogenesis [49], disrupt brain function and behavior in the offspring [50–52]. Alterations in gut microbiome could also play a part in the anxiety-like traits we observed in both sexes since emulsifier consumption has been linked to anxiety-like behavior in mice [11]. These observations suggest that emulsifiers may also interfere with the development of other brain regions related with diverse behavioral processes.

Our results also indicated that maternal emulsifier consumption had a sex-specific effect in the offspring. Indeed, male offspring were more susceptible to metabolic and neuropsychological disruptions caused by maternal emulsifier consumption, providing additional evidence that males and females respond differently to a suboptimal maternal environment [21,53]. In addition, at a first glance, the combined exposure of emulsifiers and western diet during adulthood seems to alleviate female mice from the effects of energy-dense diets on glucose metabolism. This alteration, however, could be the consequence of impaired glucose absorption by the gut, increased glycosuria or defective nutrient transport throughout the intestinal cavity. The sex-related developmental mechanisms underlying these metabolic and cognitive sexual dimorphisms require further investigation.

The effects of emulsifier ingestion on maternal programming were stronger than those from exposure after weaning, agreeing with the idea that intrauterine and early postnatal life are critical developmental periods that, if disrupted, can have profound metabolic consequences in adulthood. Some of these effects (e.g., glucose tolerance, cognition) seemed to be slightly worsen upon prolonged exposure to emulsifiers (maternal plus after weaning treatments). Whether the alterations in offspring metabolic and neuropsychological health arise from disturbances induced by emulsifiers in the mothers before pregnancy onset or directly derive from effects during gestation and lactation could not be addressed in the present study. Follow-up studies analyzing the consequences of emulsifiers at each stage separately would be necessary. In addition, how long-term emulsifiers (mimicking persistent exposure to UPFs throughout life) affect female reproductive status, embryonic survival as well as maternal and offspring health outcomes demand further evaluation.

Previous studies have showed that consumption of CMC or P80 individually during adulthood was sufficient to induce metabolic alterations and microbiota dysbiosis in mice [8,11]. However, mice from control dams exposed to CMC+P80 did not show metabolic alterations under our experimental settings. This discrepancy with previous studies may be due to differences in the experimental protocol implemented, as our approach differed in the onset and length of treatment as well as in the combination of compounds. We combined these 2 broadly used emulsifiers in order to maximize their effects and mimic, to some extent, the presence of diverse emulsifiers in most contemporary processed food items. It is plausible that the mixture of CMC+P80 induces a milder (rather than an additive or synergistic) effect, but this requires further investigation.

Food packaging labels provide null or scarce information regarding the actual content of additives in UPFs. This greatly limits consumer knowledge regarding the levels eaten and our ability to avoid the ingestion of a large and diverse array of food additives [32,54]. Even food items that are perceived as “healthy,” such as vegan/vegetarian products, contain large

amounts of additives (including emulsifiers) that per se could induce long-term metabolic impairments. In this regard, it is important to bring about greater societal consciousness that some apparently “healthy” industrial formulations might induce metabolic alterations to a similar extent as products usually considered “unhealthy.”

Collectively, our study showed that maternal consumption of emulsifiers commonly present in UPF items induced mild metabolic, cognitive, and psychological programming effects in the offspring in a sex-dependent manner. Our findings emphasize the importance of a healthy developmental environment during gestation and endorse the idea that the amount of UPFs consumed during gestation should be taken into serious consideration. We call for awareness of UPF intake during pregnancy and lactation to avoid potential detrimental effects on the metabolic and neuropsychiatric health of the progeny, thus building adequate nutritional habits for mothers and infants.

Materials and methods

Ethics statement

All animal procedures were performed according to the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which complies with the European Union Directive 2010/63 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. The protocol was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee from the University of Barcelona (protocol number: 00346–22) and performed by accredited personnel.

Animal care, mouse lines, and diets

In-house bred C57BL/6 mice were maintained on a temperature-controlled, 12-h light/dark cycle with free access to standard chow diet (Teklad maintenance diet 14% protein; Envigo). In specific studies, western diet (40% kcal from fat and 43% kcal from carbohydrates; Research Diets) was provided ad libitum to the offspring for 11 weeks (starting at 10 weeks of age). The age and number of mice analyzed per experiment are detailed in the figure legends. All animal studies were performed with the approval of the University of Barcelona Ethics Committee, complying with current Catalan, Spanish and European legislation.

Mouse breeding, offspring, and emulsifier treatment

Wild-type C57BL/6 female mice of 6 to 7 weeks of age fed with standard diet were exposed to either drinking water without any supplement (maternal control) or supplemented with emulsifiers (maternal emulsifiers): sodium carboxymethyl cellulose (CMC; 41931, Sigma) and polysorbate 80 (P80; W291706, Sigma) (1% each in drinking water). These solutions were changed weekly. After 6 weeks of treatment, female mice were crossed with chow-fed wild-type C57BL/6 male mice. Weight gain was measured weekly to confirm pregnancies. Litter size was adjusted (between postnatal day (P)5–P7) to 6–8 pups to ensure adequate and standardized nutrition until weaning. Dams were kept with their offspring until weaning at P21.

After weaning, the offspring were subdivided into control (drinking water without supplementation) and emulsifier group (CMC+P80; 1% in drinking water), ending up with 4 different conditions: maternal control—offspring control (CTRL–CTRL), maternal control—offspring emulsifiers (CTRL–Emul), maternal emulsifiers—offspring control (Emul–CTRL), and maternal emulsifiers—offspring emulsifiers (Emul–Emul).

This experimental plan has the advantage of clearly differentiating the effects of emulsifiers derived from maternal programming from post-weaning stages. This way, we offer a wider view of the impact of these food additives during different life periods on diverse health

aspects. A limitation of this design is that we cannot rule out direct exposure of emulsifiers during perinatal life (P0-P21).

Food and water intake measurements

For food and water intake studies, mice were singly housed and acclimatized for 1 week. Daily food intake (in grams) was manually measured for 5 consecutive days using a precision scale. Water intake (water or water supplemented with emulsifiers) was assessed by the total daily liquid intake (in mL) for 5 consecutive days.

Offspring body length

Body length (in cm) was measured with a ruler from the nose to the base of the tail at weaning (P21) and adulthood. A total number of 4 control litters and 5 emulsifier-treated litters were used. The same cohorts were followed from weaning until adulthood.

Physiological measurements

Body weights and gonadal fat pads were monitored using a precision scale. For metabolic studies, the same cohorts were followed from weaning until adulthood. A total number of 11 control litters and 10 emulsifier-treated litters were used for metabolic studies. For the glucose tolerance test (GTT), mice were intraperitoneally (IP) injected with a single bolus of D-glucose (2 g/kg) after 6 h (P21 animals) or overnight (adult mice) fasting. For insulin sensitivity tests, mice were IP injected with a single bolus of insulin (0.3 mU/kg during weaning, 0.4 mU/kg for adults on chow diet, 0.5 mU/kg for adults on western diet) after 6 h fasting. Blood glucose levels were measured using a glucometer (Nova Pro Biomedical) 0, 15, 30, 60, and 120 min after glucose/insulin administration. Plasma insulin and leptin levels were measured after 6 h of fasting using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Crystal Chem).

Leptin surge assay

Male and female offspring from control ($n = 6$) or emulsifier-treated ($n = 9$) dams were culled on P7, P10, P13, and P21, and trunk blood was collected. Leptin levels in the plasma were assayed using commercially available ELISA kits (Crystal Chem).

Leptin sensitivity test

Mice were singly housed and acclimatized by subjecting them to handling and sham injections for 1 week prior to study. Leptin tests were conducted in a crossover fashion. Twelve-week-old mice from each experimental group were IP injected with either 5 μ g/g of mouse leptin (R&D Systems) or vehicle 1 h before lights out (7 PM). Food intake and body weights were recorded next morning (9 AM). A total number of 5 control litters and 4 emulsifier-treated litters were used.

RNA preparation and sequencing

Total RNA samples from P21 male mice (4 control litters and 5 emulsifier-treated litters) were processed at the IDIBAPS genomics' platform for TapeStation quality control and subsequent sequencing. All samples had an RNA integrity number (RIN) > 8 . mRNA strand-specific RNA libraries were generated using 200 ng of total RNA using the Stranded mRNA Prep Ligation kit (Illumina) following the manufacturer's instructions. Libraries were sequenced on an

Illumina NextSeq2000 (Illumina) in paired-end mode with a read length of 2×50 bp. Around 40 million of paired-end reads were generated for each sample/condition.

RNA sequencing analysis

FastQC analysis was used to assess the quality of sequence readings (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Transcript quantification for each sample was accomplished using Kallisto [55] on the mouse reference genome mm10. Only genes with a cpm > 1 in at least 4 samples were considered. Limma package was used to perform differential gene expression analysis [56]. Genes with a fold change higher/lower than 1.5 and a *p*-value less than 0.05 were considered significant. Pathway enrichment analysis on differentially expressed genes was performed on g:Profiler [57]. Cytoscape was used to create enrichment maps [58].

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

MBH samples derived from 14 different litters ($n = 7$ litters/maternal treatment) were harvested, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . Tissues were homogenized and total mRNA was isolated using Trizol (Invitrogen). RNA products were reverse transcribed using reagents from Applied Biosystems. Quantitative PCR was conducted using Pre-mix Ex Taq master mix (Takara) in an ABI Prism 7900 HT system (Applied Biosystems). Taqman Gene Expression assay FAM/TAMRA probes (Applied Biosystems) used for qPCR analysis were: *Pomc* (Mm00435874_m1); *Cart* (Mm00489086_m1); *Agrp* (Mm00475829_g1); *Npy* (Mm00445771_m1); *Pcsk1* (Mm00479023_m1); *Mcr3* (Mm00434876_s1); and *Mcr4* (Mm00457483_s1). The expression level was normalized against the housekeeping gene *Gapdh* (Mm99999915_g1). Data were analyzed using the standard curve method.

α -MSH and AgRP immunofluorescence

Three-week-old brains derived from 10 different litters ($n = 5$ litters/maternal treatment) were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C . Cryoprotected 3-week-old brains were frozen in smashed dry ice and sectioned using a cryostat (Leica CM 1950). Selected 20 μm -thick sections (1 out of 4 sections) throughout the PVH were used. For α -MSH staining, sections were blocked with 2% donkey serum in KPBS + 0.4% Triton X-100 for 1 h and subsequently incubated with sheep anti- α -MSH (1:750; Millipore) in blocking solution overnight at 4°C . As secondary antibody, a donkey anti-sheep Alexa Fluor 488 or 594 (1:300; Life Technologies) in KPBS + 0.4% Triton X-100 was used (2 h at room temperature). For AgRP staining, sections were blocked with 2% chicken serum in KPBS + 0.4% Triton X-100 for 1 h and subsequently incubated with rabbit anti-AgRP (1:500; Phoenix Pharmaceuticals) in blocking solution for 48 h at 4°C . As secondary antibody, a chicken anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:300; Life Technologies) in KPBS + 0.4% Triton X-100 was used (2 h at room temperature).

Fiber density quantitative analysis

For quantification of neuronal fiber density staining, images of 4 representative sections throughout the PVH (bregma between -0.59 mm and -1.23 mm) from each animal were acquired using an Olympus fluorescence microscope equipped with a $20\times$ objective. α -MSH and AgRP fiber density analyses were performed in blind conditions using FIJI (ImageJ) Launcher based on previously published reports [26,39]. Briefly, each image was binarized to compensate for differences in fluorescence intensity, specified in a random 200×200 μm region and skeletonized, so that each fiber segment corresponded to 1 pixel thick. The

integrated intensity was then measured for each image. The total density value was obtained by the sum of all image planes analyzed.

General behavioral procedures

Mice were acclimatized to the behavioral room for 1 h before each test. The arena was cleaned with 70% ethanol before and after each trial. Light intensity was adapted to each task. During testing, the investigator remained outside the behavioral laboratory. A video camera, positioned directly above the arena, was used to record the behavior of each animal. Videos were recorded on a computer and analyzed with a dedicated behavioral video-tracking software (SMART v3.0, Panlab). For chow studies, a total number of 6 control and 4 emulsifiers-treated litters were used. During western diet exposure, a total of 5 controls and 3 emulsifiers-treated litters were used.

Open field test

The open field test is generally used for measuring the exploratory behavior and general activity of animals. Our protocol was based on former studies [59]. Mice were placed in the center of a dark methacrylate arena ($35 \times 35 \times 35$ cm) and allowed to freely explore it for 15 min. Light was set at low intensity (<30 lux) to avoid stress. Total distance and time spent in the corner and center of the arena were scored using SMART v3.0 software (Panlab).

Dark-light box test

The dark-light box test assesses anxiety-like behavior. This paradigm takes advantage of the aversion of rodents to brightly illuminated areas. Our protocol was based on a previous report by Fan and colleagues [59]. The test apparatus comprised a methacrylate arena ($35 \times 35 \times 35$ cm) divided into a small dark (safe) compartment and a large strongly illuminated (200 lux; aversive) compartment. The 2 compartments were connected. Mice were positioned in the dark chamber and allowed to freely explore the 2 compartments for 5 min. Video-tracking data was analyzed to measure the time spent in each chamber and the latency to enter the illuminated area using SMART v3.0 software (Panlab).

Novel object recognition test (NORT)

NORT is a widely validated task to evaluate recognition memory. Our protocol was based on previous reports [60]. The test was conducted in a methacrylate arena ($35 \times 35 \times 35$ cm) with low-intensity light (20 lux) environment. NORT comprises 3 phases: habituation, training, and test. During habituation (days 1 to 3), mice were allowed to freely explore the arena for 10 min. In the training period (day 4), mice were allowed to explore 2 equidistantly spaced identical objects (in the arena) for 10 min and returned to their home cages afterward. The test phase was conducted 2 h after the training phase. In this stage, one of the objects was replaced by a new one (novel object). Mice were allowed to explore the objects for 10 min. The position of the 2 items was constant across sessions. Discrimination indices were calculated as: $(\text{Time exploring novel object} - \text{Time exploring familiar object}) / (\text{Time exploring novel object} + \text{Time exploring familiar object})$. We also scored total exploration time ($\text{Time exploring novel object} + \text{Time exploring familiar object}$) and total distance traveled. Mice that exhibited freezing behavior or <5 s of exploration behavior were excluded from the analyses. Trials were video recorded and analyzed offline in a blind manner using SMART v3.0 software (Panlab). Total distance was automatically scored by the software.

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 8.0). For dams' experiments and offspring's characterization at weaning (two-group one-factor comparisons) statistical analysis using a two-tailed unpaired Student's *t* test was performed. For all adulthood studies, in order to take into account the effect of maternal programming (2 factors-1 dependent variable), statistical analysis was performed using two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Symbols used were: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Statistical parameters can be found in the figures and their legends.

Supporting information

S1 Table. List of differentially expressed genes (DEGs) and gene ontology (GO) enriched pathway analysis of the down-regulated genes obtained from RNA sequencing of P21 male offspring from control and emulsifiers-treated dams.

(XLSX)

S1 Fig. Emulsifiers induce mild maternal glucose intolerance. (A) Experimental design of maternal emulsifier consumption highlighting the period of maternal characterization. (B) Daily food intake of control and emulsifier-treated dams post-weaning ($n = 6/\text{group}$). (C) Body weight of control and emulsifier-treated dams post-weaning ($n = 15$ CTRL and $n = 15$ Emul). (D) gWAT weight normalized by total body weight and represented as % of control animals of control and emulsifier dams post-weaning ($n = 15$ CTRL and $n = 15$ Emul). (E) GTT and (F) AUC of control and emulsifier-treated dams post-weaning ($n = 15$ CTRL and $n = 15$ Emul). (G) Fasting blood glucose levels of control and emulsifier-treated dams post-weaning ($n = 15$ CTRL and $n = 15$ Emul). (H) Plasma leptin levels after 6 h of fasting of control and emulsifier-treated dams post-weaning ($n = 6$ CTRL and $n = 7$ Emul). (I) Plasma insulin levels after 6 h of fasting of control and emulsifier-treated dams post-weaning ($n = 7$ CTRL and $n = 7$ Emul). Data in B, H, and I are derived from 1 single experiment. Data in C, D, E, F, and G are pools from 2 different experiments. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed with an unpaired *t* test in B, C, D, F, G, H, and I and by two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc analysis in E. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. The data underlying this figure can be found at DOI:[10.6084/m9.figshare.22742759](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.22742759).

(TIF)

S2 Fig. (A) PCA plot showing the distribution of sequenced samples ($n = 4$ CTRL and $n = 5$ Emul). (B) Representative 20 $\times$ images of POMC neurons in the ARC of control and emulsifier-treated male offspring at P21. (C) Number of POMC neurons per section of control and emulsifier offspring at P21 ($n = 3$ mice/group). (D) POMC neuronal area of control and emulsifier offspring at P21 ($n = 20$ neurons per animal; 3 mice/group). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed by *t* test. POMC: pro-opiomelanocortin; 3V: third ventricle; ns: non-significant. The data underlying this figure can be found at DOI:[10.6084/m9.figshare.22742759](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.22742759).

(TIF)

S3 Fig. Female offspring from emulsifier-treated dams do not present metabolic impairments. (A) Body weight at 10 weeks of age ($n = 5$ CTRL-CTRL; $n = 6$ CTRL-Emul; $n = 7$ Emul-CTRL; $n = 6$ Emul-Emul). (B) Body length at 10 weeks of age ($n = 7$ CTRL-CTRL; $n = 9$ CTRL-Emul; $n = 6$ Emul-CTRL; $n = 8$ Emul-Emul). (C) gWAT weight normalized by total body weight and represented as % of control animals at 10 weeks of age ($n = 5$ CTRL-

CTRL; $n = 6$ CTRL–Emul; $n = 7$ Emul–CTRL; $n = 6$ Emul–Emul). (D) GTT and (E) AUC ($n = 13$ CTRL–CTRL; $n = 14$ CTRL–Emul; $n = 15$ Emul–CTRL; $n = 15$ Emul–Emul) at 10 weeks of age. (F) ITT and (G) AUC ($n = 7$ CTRL–CTRL; $n = 10$ CTRL–Emul; $n = 14$ Emul–CTRL; $n = 12$ Emul–Emul) at 10 weeks of age. (H) Six-hour fasting blood glucose levels at 10 weeks of age ($n = 5$ CTRL–CTRL; $n = 6$ CTRL–Emul; $n = 7$ Emul–CTRL; $n = 6$ Emul–Emul). (I) Plasma insulin levels after 6 h of fasting at 10 weeks of age ($n = 4$ CTRL–CTRL; $n = 5$ CTRL–Emul; $n = 5$ Emul–CTRL; $n = 6$ Emul–Emul). (J) Plasma leptin levels after 6 h of fasting at 10 weeks of age ($n = 5$ CTRL–CTRL; $n = 5$ CTRL–Emul; $n = 7$ Emul–CTRL; $n = 6$ Emul–Emul). Data in A, B, C, H, I, and J are derived from 1 single experiment. Data in D, E, F, and G are pools from 2 different experiments. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc analysis. The data underlying this figure can be found at DOI:[10.6084/m9.figshare.22742759](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.22742759). (TIF)

S4 Fig. Male offspring from emulsifier-treated dams respond normally to leptin. (A) Food intake of males at 20 weeks of age ($n = 9$ CTRL–CTRL; $n = 9$ CTRL–Emul; $n = 6$ Emul–CTRL; $n = 5$ Emul–Emul). (B) Food intake of females at 20 weeks of age ($n = 9$ CTRL–CTRL; $n = 12$ CTRL–Emul; $n = 6$ Emul–CTRL; $n = 8$ Emul–Emul). (C) Average overnight food intake of males after vehicle (Vh) ($n = 8$ CTRL–CTRL; $n = 8$ CTRL–Emul; $n = 5$ Emul–CTRL; $n = 5$ Emul–Emul) or leptin (Lep) ($n = 8$ CTRL–CTRL; $n = 8$ CTRL–Emul; $n = 5$ Emul–CTRL; $n = 5$ Emul–Emul) injection at 20 weeks of age. (D) Overnight body weight after vehicle ($n = 8$ CTRL–CTRL; $n = 8$ CTRL–Emul; $n = 5$ Emul–CTRL; $n = 5$ Emul–Emul) or leptin ($n = 8$ CTRL–CTRL; $n = 8$ CTRL–Emul; $n = 5$ Emul–CTRL; $n = 5$ Emul–Emul) injection in males at 20 weeks of age. Data in A, B, C, and D are pools from 2 different experiments. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc analysis in A, B, and by t test in C and D. ns: not significant; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$. The data underlying this figure can be found at DOI:[10.6084/m9.figshare.22742759](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.22742759). (TIF)

S5 Fig. Maternal emulsifier consumption induces anxiety-related states in male offspring. (A–D) Open field performance in 9-week-old male (A and B) ($n = 9$ CTRL–CTRL; $n = 9$ CTRL–Emul; $n = 6$ Emul–CTRL; $n = 6$ Emul–Emul) and female (C and D) ($n = 9$ CTRL–CTRL; $n = 8$ CTRL–Emul; $n = 5$ Emul–CTRL; $n = 5$ Emul–Emul) offspring born of control and emulsifier-exposed mothers, including time spent per zone (A and C) and total distance traveled (B and D). (E, F) Time spent in the light compartment during the dark–light box test in 9-week-old male (E) ($n = 9$ CTRL–CTRL; $n = 9$ CTRL–Emul; $n = 6$ Emul–CTRL; $n = 6$ Emul–Emul) and female (F) ($n = 9$ CTRL–CTRL; $n = 8$ CTRL–Emul; $n = 5$ Emul–CTRL; $n = 5$ Emul–Emul) offspring born of control and emulsifier-exposed mothers. (G–J) Short-term memory parameters in 10-week-old male (G and H) ($n = 9$ CTRL–CTRL; $n = 9$ CTRL–Emul; $n = 4$ Emul–CTRL; $n = 6$ Emul–Emul) and female (I and J) ($n = 7$ CTRL–CTRL; $n = 7$ CTRL–Emul; $n = 3$ Emul–CTRL; $n = 4$ Emul–Emul) offspring born of control and emulsifier-exposed mothers, including discrimination index (G and I) and exploratory time (H and J). Data are derived from 1 single experiment. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Sidak's post hoc analysis. $*p < 0.05$. The data underlying this figure can be found at DOI:[10.6084/m9.figshare.22742759](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.22742759). (TIF)

Acknowledgments

This work was carried out in part at the Esther Koplowitz Centre.

Author Contributions

Conceptualization: Roberta Haddad-Tóvolli, Marc Claret.

Data curation: Maria Milà-Guasch, Elena Eyre, Arnaud Obri, Roberta Haddad-Tóvolli, Marc Claret.

Formal analysis: Maria Milà-Guasch, Sergio R. Llana, Elena Eyre, Arnaud Obri, Roberta Haddad-Tóvolli, Marc Claret.

Funding acquisition: Marc Claret.

Investigation: Maria Milà-Guasch, Sara Ramírez, Sergio R. Llana, Júlia Fos-Domènech, Lea Maria Dropmann, Macarena Pozo, Alicia G. Gómez-Valadés, Arnaud Obri, Roberta Haddad-Tóvolli.

Methodology: Maria Milà-Guasch, Sara Ramírez, Sergio R. Llana, Júlia Fos-Domènech, Lea Maria Dropmann, Macarena Pozo, Alicia G. Gómez-Valadés, Roberta Haddad-Tóvolli, Marc Claret.

Project administration: Roberta Haddad-Tóvolli, Marc Claret.

Resources: Marc Claret.

Supervision: Roberta Haddad-Tóvolli, Marc Claret.

Visualization: Sara Ramírez, Sergio R. Llana, Arnaud Obri, Roberta Haddad-Tóvolli, Marc Claret.

Writing – original draft: Roberta Haddad-Tóvolli, Marc Claret.

Writing – review & editing: Roberta Haddad-Tóvolli, Marc Claret.

References

1. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019; 15:288–98. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8> PMID: 30814686
2. Monteiro CA, Cannon G, Levy RB, Moubarac J–C, Louzada ML, Rauber F, et al. Ultra-processed foods: what they are and how to identify them. *Public Health Nutr*. 2019; 22:936–41. <https://doi.org/10.1017/S1368980018003762> PMID: 30744710
3. Hall KD, Ayuketah A, Brychta R, Cai H, Cassimatis T, Chen KY, et al. Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake. *Cell Metab*. 2019; 30:67–77.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.008> PMID: 31105044
4. Almarshad MI, Algonaiman R, Alharbi HF, Almujaiddil MS, Barakat H. Relationship between Ultra-Processed Food Consumption and Risk of Diabetes Mellitus: A Mini-Review. *Nutrients*. 2022; 14:2366. <https://doi.org/10.3390/nu14122366>.
5. Pagliai G, Dinu M, Madarena MP, Bonaccio M, Iacoviello L, Sofi F. Consumption of ultra-processed foods and health status: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr*. 2021; 125:308–18. <https://doi.org/10.1017/S0007114520002688> PMID: 32792031
6. Elizabeth L, Machado P, Zinöcker M, Baker P, Lawrence M. Ultra-Processed Foods and Health Outcomes: A Narrative Review. *Nutrients*. 2020; 12:1955. <https://doi.org/10.3390/nu12071955> PMID: 32630022
7. Swidsinski A, Ung V, Sydora BC, Loening-Baucke V, Doerffel Y, Verstraelen H, et al. Bacterial Overgrowth and Inflammation of Small Intestine After Carboxymethylcellulose Ingestion in Genetically Susceptible Mice: Inflamm Bowel Dis. 2009; 15:359–64. <https://doi.org/10.1002/ibd.20763> PMID: 18844217

8. Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*. 2015; 519:92–6. <https://doi.org/10.1038/nature14232> PMID: 25731162
9. Chassaing B, Van de Wiele T, De Bodt J, Marzorati M, Gewirtz AT. Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression ex vivo potentiating intestinal inflammation. *Gut*. 2017; 66:1414–27. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313099> PMID: 28325746
10. Singh RK. Food Additive P-80 Impacts Mouse Gut Microbiota Promoting Intestinal Inflammation, Obesity and Liver Dysfunction. *SOJ MID*. 2016; 4:01–10. <https://doi.org/10.15226/sojmid/4/1/00148> PMID: 27430014
11. Holder MK, Peters NV, Whylings J, Fields CT, Gewirtz AT, Chassaing B, et al. Dietary emulsifiers consumption alters anxiety-like and social-related behaviors in mice in a sex-dependent manner. *Sci Rep*. 2019; 9:172. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36890-3> PMID: 30655577
12. Viennois E, Merlin D, Gewirtz AT, Chassaing B. Dietary Emulsifier-Induced Low-Grade Inflammation Promotes Colon Carcinogenesis. *Cancer Res*. 2017; 77:27–40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1359> PMID: 27821485
13. Barker DJP. Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health*. 2004; 58:114–5. <https://doi.org/10.1136/jech.58.2.114> PMID: 14729887
14. Barker D, Eriksson J, Forsén T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol*. 2002; 31:1235–9. <https://doi.org/10.1093/ije/31.6.1235> PMID: 12540728
15. Mcmillen IC, Robinson JS. Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming. *Physiol Rev*. 2005; 85:571–633. <https://doi.org/10.1152/physrev.00053.2003> PMID: 15788706
16. Friedman JE. Developmental Programming of Obesity and Diabetes in Mouse, Monkey, and Man in 2018: Where Are We Headed? *Diabetes*. 2018; 67:2137–51. <https://doi.org/10.2337/dbi17-0011> PMID: 30348820
17. Kirk SL, Samuelsson A-M, Argenton M, Dhonye H, Kalamatianos T, Poston L, et al. Maternal Obesity Induced by Diet in Rats Permanently Influences Central Processes Regulating Food Intake in Offspring. *PloS One*. 2009; 4:e5870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005870> PMID: 19516909
18. Coupe B, Bouret SG. Development of the hypothalamic melanocortin system. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 4:38. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00038> PMID: 23543895
19. Vogt MC, Paeger L, Hess S, Steculorum SM, Awazawa M, Hampel B, et al. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell*. 2014; 156:495–509. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.008> PMID: 24462248
20. Chen H, Simar D, Lambert K, Mercier J, Morris MJ. Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology*. 2008; 149:5348–56. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0582> PMID: 18635655
21. Dearden L, Bouret SG, Ozanne SE. Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. *Molecular Metabolism*. 2018; 15:8–19. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.04.007> PMID: 29773464
22. Steculorum SM, Bouret SG. Maternal diabetes compromises the organization of hypothalamic feeding circuits and impairs leptin sensitivity in offspring. *Endocrinology*. 2011; 152:4171–9. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1279> PMID: 21862611
23. Bouret SG. Developmental programming of hypothalamic melanocortin circuits. *Exp Mol Med*. 2022; 54:403–13. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00625-8> PMID: 35474338
24. Schoonejans JM, Ozanne SE. Developmental programming by maternal obesity: Lessons from animal models. *Diabet Med*. 2021;38. <https://doi.org/10.1111/dme.14694> PMID: 34553414
25. Bodden C, Hannan AJ, Reichelt AC. Of “junk food” and “brain food”: how parental diet influences offspring neurobiology and behaviour. *Trends Endocrinol Metab*. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.04.001>.
26. Haddad-Tóvolli R, Altirriba J, Obri A, Sánchez EE, Chivite I, Milà-Guasch M, et al. Pro-opiomelanocortin (POMC) neuron transcriptome signatures underlying obesogenic gestational malprogramming in mice. *Mol Metab*. 2020; 36:100963. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.02.006> PMID: 32283518
27. Desai M, Ferrini MG, Han G, Narwani K, Ross MG. Maternal High Fat Diet Programs Male Mice Offspring Hyperphagia and Obesity: Mechanism of Increased Appetite Neurons via Altered Neurogenic Factors and Nutrient Sensor AMPK. *Nutrients*. 2020; 12:3326. <https://doi.org/10.3390/nu12113326> PMID: 33138074
28. Jais A, Brüning JC. Arcuate nucleus-dependent regulation of metabolism—pathways to obesity and diabetes mellitus. *Endocr Rev*. 2021:bnab025. <https://doi.org/10.1210/edrev/bnab025>.

29. Skowronski AA, Shaulson ED, Leibel RL, LeDuc CA. The postnatal leptin surge in mice is variable in both time and intensity and reflects nutritional status. *Int J Obes (Lond)*. 2022; 46:39–49. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00957-5> PMID: 34475504
30. Bouret SG, Gorski JN, Patterson CM, Chen S, Levin BE, Simerly RB. Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats. *Cell Metab*. 2008; 7:179–85. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.12.001> PMID: 18249177
31. Hasebe K, Kendig MD, Morris MJ. Mechanisms Underlying the Cognitive and Behavioural Effects of Maternal Obesity. *Nutrients*. 2021; 13:240. <https://doi.org/10.3390/nu13010240> PMID: 33467657
32. Partridge D, Lloyd KA, Rhodes JM, Walker AW, Johnstone AM, Campbell BJ. Food additives: Assessing the impact of exposure to permitted emulsifiers on bowel and metabolic health—introducing the FADiets study. *Nutr Bull*. 2019; 44:329–49. <https://doi.org/10.1111/nbu.12408> PMID: 31866761
33. Onita BM, Azeredo CM, Jaime PC, Levy RB, Rauber F. Eating context and its association with ultra-processed food consumption by British children. *Appetite*. 2021; 157:105007. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.105007> PMID: 33075442
34. Neri D, Martinez-Steele E, Monteiro CA, Levy RB. Consumption of ultra-processed foods and its association with added sugar content in the diets of US children, NHANES 2009–2014. *Pediatric Obesity*. 2019; 14. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12563> PMID: 31364315
35. Oliveira PG de, Sousa JM de, Assunção DGF, Araujo EKS de, Bezerra DS, Dametto JF dos S, et al. Impacts of Consumption of Ultra-Processed Foods on the Maternal–Child Health: A Systematic Review. *Front Nutr*. 2022; 9:821657. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.821657> PMID: 35634416
36. Cummings JR, Lipsky LM, Schwedhelm C, Liu A, Nansel TR. Associations of ultra-processed food intake with maternal weight change and cardiometabolic health and infant growth. *Int J Behav Nutr Phys Act*. 2022; 19:61. <https://doi.org/10.1186/s12966-022-01298-w> PMID: 35619114
37. Rohatgi KW, Tinius RA, Cade WT, Steele EM, Cahill AG, Parra DC. Relationships between consumption of ultra-processed foods, gestational weight gain and neonatal outcomes in a sample of US pregnant women. *PeerJ*. 2017; 5:e4091. <https://doi.org/10.7717/peerj.4091> PMID: 29230355
38. Smit AJP, Hojeij B, Rousian M, Schoenmakers S, Willemsen SP, Steegers-Theunissen RPM, et al. A high periconceptional maternal ultra-processed food consumption impairs embryonic growth: The Rotterdam periconceptional cohort. *Clin Nutr*. 2022; 41:1667–75. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.06.006> PMID: 35772220
39. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*. 2004; 304:108–10. <https://doi.org/10.1126/science.1095004> PMID: 15064420
40. Dearden L, Buller S, Furigo IC, Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Maternal obesity causes fetal hypothalamic insulin resistance and disrupts development of hypothalamic feeding pathways. *Mol Metab*. 2020; 42:101079. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101079> PMID: 32919096
41. Park S, Jang A, Bouret SG. Maternal obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes metabolic alterations and abnormal hypothalamic development in the offspring. *PLoS Biol*. 2020; 18:e3000296. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000296> PMID: 32163401
42. Park S, Belfoul AM, Rastelli M, Jang A, Monnoye M, Bae H, et al. Maternal low-calorie sweeteners consumption rewires hypothalamic melanocortin circuits via a gut microbial co-metabolite pathway. *JCI Insight*. 2023:e156397. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.156397>.
43. Naimi S, Viennois E, Gewirtz AT, Chassaing B. Direct impact of commonly used dietary emulsifiers on human gut microbiota. *Microbiome*. 2021; 9:66. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00996-6> PMID: 33752754
44. Lock JY, Carlson TL, Wang C–M, Chen A, Carrier RL. Acute Exposure to Commonly Ingested Emulsifiers Alters Intestinal Mucus Structure and Transport Properties. *Sci Rep*. 2018; 8:10008. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27957-2> PMID: 29968743
45. Roberts CL, Keita AV, Duncan SH, O’Kennedy N, Soderholm JD, Rhodes JM, et al. Translocation of Crohn’s disease *Escherichia coli* across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut*. 2010; 59:1331–9. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.195370> PMID: 20813719
46. Cani PD, Everard A. Keeping gut lining at bay: impact of emulsifiers. *Trends Endocrinol Metab*. 2015; 26:273–4. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.03.009> PMID: 25887492
47. Daniel N, Gewirtz AT, Chassaing B. Akkermansia muciniphila counteracts the deleterious effects of dietary emulsifiers on microbiota and host metabolism. *Gut*. 2023; 72:906–17. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326835> PMID: 36646449
48. Jin G, Tang Q, Ma J, Liu X, Zhou B, Sun Y, et al. Maternal Emulsifier P80 Intake Induces Gut Dysbiosis in Offspring and Increases Their Susceptibility to Colitis in Adulthood. *MSystems*. 2021; 6:e01337–20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01337-20> PMID: 33727402

49. Vuong HE, Pronovost GN, Williams DW, Coley EJJ, Siegler EL, Qiu A, et al. The maternal microbiome modulates fetal neurodevelopment in mice. *Nature*. 2020; 586:281–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2745-3> PMID: [32968276](#)
50. Kim S, Kim H, Yim YS, Ha S, Atarashi K, Tan TG, et al. Maternal gut bacteria promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. *Nature*. 2017; 549:528–32. <https://doi.org/10.1038/nature23910> PMID: [28902840](#)
51. Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF, Costa-Mattioli M. Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell*. 2016; 165:1762–75. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.001> PMID: [27315483](#)
52. Jašarević E, Howard CD, Morrison K, Misic A, Weinkopff T, Scott P, et al. The maternal vaginal microbiome partially mediates the effects of prenatal stress on offspring gut and hypothalamus. *Nat Neurosci*. 2018; 21:1061–71. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0182-5> PMID: [29988069](#)
53. Sandovici I, Fernandez-Twinn DS, Hufnagel A, Constância M, Ozanne SE. Sex differences in the intergenerational inheritance of metabolic traits. *Nat Metab*. 2022; 4:507–23. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00570-4> PMID: [35637347](#)
54. Halmos EP, Mack A, Gibson PR. Review article: emulsifiers in the food supply and implications for gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019; 49:41–50. <https://doi.org/10.1111/apt.15045> PMID: [30484878](#)
55. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol*. 2016; 34:525–7. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519> PMID: [27043002](#)
56. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43:e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007> PMID: [25605792](#)
57. Reimand J, Arak T, Adler P, Kolberg L, Reisberg S, Peterson H, et al. g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res*. 2016; 44:W83–89. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw199>.
58. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003; 13:2498–504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303> PMID: [14597658](#)
59. Fan K, Li Y, Wang H, Mao X, Guo J, Wang F, et al. Stress-Induced Metabolic Disorder in Peripheral CD4+ T Cells Leads to Anxiety-like Behavior. *Cell*. 2019; 179:864–879.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.001> PMID: [31675497](#)
60. Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, et al. Object recognition test in mice. *Nat Protoc*. 2013; 8:2531–7. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155> PMID: [24263092](#)

Annex 4

PRIMER

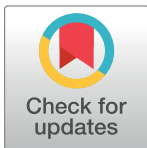
Emulsifiers during gestation: The risks of ultra-processed food revealed in mice

Delphine Franssen¹, Anne-Simone Parent^{2,3*}

1 Division of Endocrinology, Diabetes and Hypertension, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States of America, **2** GIGA-Neurosciences, University of Liège, Liège, Belgium, **3** Pediatric Department, University Hospital, Liège, Belgium

* asparent@uliege.be

Several dietary components disrupt the control of energy balance. A new study in PLOS Biology shows that, in mice, maternal consumption of emulsifiers induces a rewiring of the hypothalamic feeding circuits and causes neuropsychological impairment in the offspring.



OPEN ACCESS

Citation: Franssen D, Parent A-S (2023) Emulsifiers during gestation: The risks of ultra-processed food revealed in mice. PLoS Biol 21(8): e3002265. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002265>

Published: August 25, 2023

Copyright: © 2023 Franssen, Parent. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Belgian National Foundation for Research, Fonds National de la Recherche Scientifique, grant number J.0150.22 - CDR (ASP) and the University of Liège (FSR 2022) (ASP). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

The prevalence of obesity is escalating and it appears that the classic obesity risk factors of increased food intake, sedentary lifestyle, and genetics are probably insufficient to explain the rapid increase in obesity incidence. Notably, men are more commonly overweight but severe obesity is more frequent in women; these sex differences are not always sufficiently accounted for. In parallel with the rise in obesity, the consumption of ultra-processed food has been increasing over the past few decades, and recent epidemiological data have indicated that several components of such a diet may disrupt the control of energy balance and promote weight gain independently of caloric value [1,2]. In addition to sweeteners, emulsifiers, colorants, and flavorings, ultra-processed products also contain endocrine-disrupting chemicals [3]. While sweeteners in particular are known to impair metabolism and predispose to adiposity in rodent models [4], a new article in *PLOS Biology* by Mila-Guasch and colleagues [5] provides crucial information regarding the potential detrimental role of other additives, such as emulsifiers, in mice.

The Developmental Origins of Health and Disease theory originates from a historical cohort study in England that revealed a significant association between low birth weight and the occurrence of hypertension and coronary heart disease in middle age [6]. This theory, linking the risk of adult disease to early environmental conditions, initially focused on fetal exposure to nutritional restriction as a risk factor for metabolic syndrome and obesity in later life. It appears, however, that several components of maternal nutrition, not just food quantity, can affect the development of the hypothalamic circuits that control appetite and energy balance, as well as the differentiation of adipocytes or the function of the pancreas in the offspring [7]. These observations led to a paradigm shift and the development of the obesogen hypothesis, which proposes that developmental exposure to some exogenous chemicals promotes weight gain and metabolic disturbances through reprogramming of the metabolic organs. Data presented by Mila-Guasch and colleagues [5] fits into this hypothesis, as they show for the first time that maternal consumption of emulsifier alone leads to metabolic impairments in the offspring.

Food intake and energy expenditure are centrally regulated by complex interconnected neural networks within the hypothalamus. The arcuate nucleus (ARC) is the primary site for integration of hormonal (e.g., leptin, ghrelin, insulin) and environmental cues. In this nucleus, pro-opiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY)/agouti-related peptide (AgRP) neurons exert antagonistic effects on food intake, with POMC neurons inhibiting appetite and NPY/AgRP neurons stimulating appetite [8]. These ARC neurons project to other hypothalamic nuclei, including the paraventricular nucleus (PVN), to transmit information about peripheral energy availability. Twenty years ago, Bouret and Simerly demonstrated that these projections were established during the early postnatal period under the trophic action of leptin [8]. Not only leptin, but also ghrelin and insulin, have a role as structural organizers of the hypothalamic circuitry controlling energy balance during the first 3 weeks of life in rodents [8]. The establishment of such circuits is extremely sensitive to maternal environmental factors [9]. Postnatal overnutrition or maternal diabetes reduce the neurotrophic action of leptin during neonatal development and lead to persistent alterations of hypothalamic feeding pathways [9]. Very recent data in mice indicates that consumption of sweeteners also increases fat mass, causes glucose impairment in male offspring and decreases the density of POMC-immunoreactive fibers innervating the PVN [4]. Notably, other contaminants of modern food, such as endocrine-disrupting chemicals, have been shown to rewire hypothalamic control of appetite in a sex-specific manner [10,11].

Along this line, the study by Mila-Guasch and colleagues [5] is the first to show that maternal consumption of dietary emulsifiers disturbs the development of a hypothalamic circuit regulating energy balance in the progeny. The data suggest alterations of the maternal metabolic environment during gestation, as emulsifier-exposed mothers exhibited fasting hyperglycemia and mild glucose intolerance. At weaning, male offspring born from emulsifier-treated mothers displayed moderate glucose intolerance that persisted until adulthood. Those mice presented a delayed leptin surge during postnatal development. Transcriptional and histological analyses indicated a rewiring of the hypothalamic feeding circuits, although food intake itself was not affected. RNA sequencing analysis at weaning identified enrichment in factors regulating feeding behavior and metabolism regulation in the mediobasal hypothalamus. The authors also identified a higher staining density of α -MSH in the PVN at weaning, α -MSH being the bioactive product of POMC processing. This result was not associated with changes in the number and size of POMC neurons, but with a decrease in *POMC* and *CART* mRNA expression that could be interpreted as a compensatory mechanism. This rewiring of feeding networks was sex specific, as female offspring born from emulsifier-treated mothers did not display these alterations.

In addition to hypothalamic metabolic insults, Mila-Guasch and colleagues also brought to light the fact that maternal emulsifier exposure can lead to neuropsychological deficits, once again in a sex-specific manner. Male offspring exposed to emulsifiers showed anxiety-like traits. The combination of in utero exposure to emulsifiers with an adult Western-style diet worsened the effect in both sexes and also led to cognitive impairments in males. Neuropsychological deficits are similarly observed after early exposure to endocrine-disrupting chemicals, such as bisphenol-A (recently reviewed in [12]). The elucidation of the mechanisms of action of endocrine-disrupting chemicals and emulsifiers requires further study.

In summary, adipose sensitivity to environmental factors is not the only mechanism that can explain an increased risk of metabolic disturbances associated with disruption of the maternal environment. Maternal nutrition also affects the development of hypothalamic circuits that control energy balance, with male offspring appearing to be more sensitive than female offspring (Fig 1). The work of Mila-Guasch and colleagues [5] shows for the first time that emulsifiers rewire the melanocortin circuits. These data reinforce the notion that

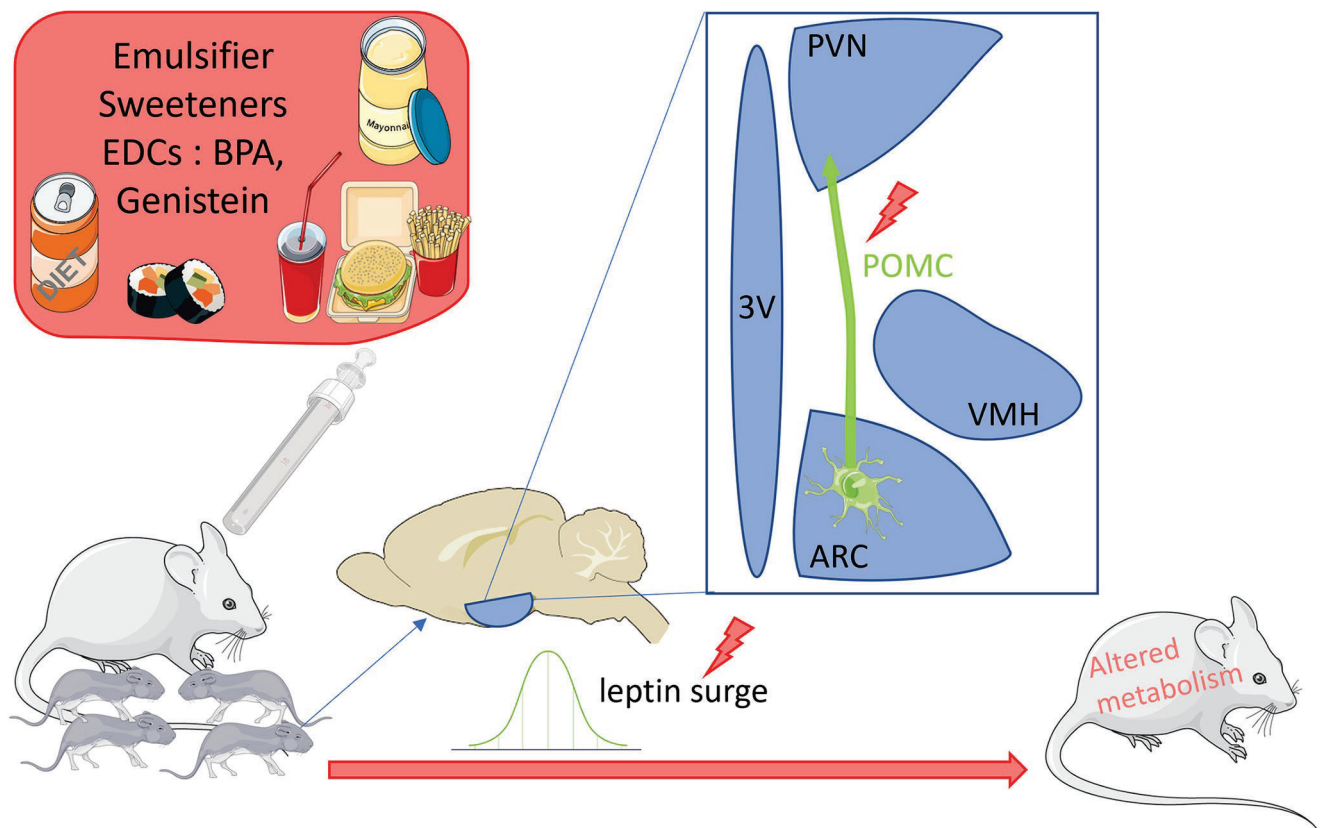


Fig 1. Alterations of the hypothalamic circuitry controlling energy balance after maternal exposure to compounds found in ultra-processed food. Food additives such as emulsifiers, sweeteners, and EDCs affect circuits in the hypothalamus that control energy balance in the offspring of mice exposed during pregnancy. Male offspring exposed to emulsifiers during gestation and lactation displayed moderate glucose intolerance associated with a delayed postnatal leptin surge and a higher density of α -MSH staining in the PVN [5]. Gestational exposure to sweeteners led to increased adiposity and glucose intolerance and reorganized hypothalamic melanocortin circuits in male, but not female, offspring [4]. Young male and female mice perinatally exposed to low-dose EDCs showed a delayed postnatal leptin surge during postnatal development as well as reduced density of POMC projections into the PVN. The same exposure induced glucose intolerance in adult male and hyperphagic and obesity-prone phenotype in females exposed to high-fat diet [9]. Early postnatal exposure to the phytoestrogen genistein from postnatal day 1 to 8 significantly decreased POMC immunoreactivity in females, but not in males. Those females presented an increase in body weight and altered plasma concentrations of metabolic hormones [10]. Red highlights indicate potential sites of action of food additives. Parts of the figure were drawn by using pictures from Servier Medical Art. Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. 3V, third ventricle; ARC, arcuate nucleus; EDCs, endocrine-disrupting chemicals; PVN, paraventricular network; VMH, ventromedial hypothalamus.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002265.g001>

compounds such as emulsifiers, sweeteners, and endocrine-disrupting chemicals that are present in ultra-processed foods could contribute to the epidemics of obesity and metabolic syndrome and suggest they may also participate in the increasing incidence of neurodevelopmental disorders. This study, even though conducted in mice, raises important public health questions, as very little data regarding food additives is present on food packaging, leading to poor information of the public. The study also suggests that limiting exposure to food additives during pregnancy may be beneficial and highlights the need for further research to examine these effects in people.

References

1. Katzmarzyk PT, Broyles ST, Champagne CM, Chaput JP, Fogelholm M, Hu G, et al. Relationship between Soft Drink Consumption and Obesity in 9–11 Years Old Children in a Multi-National Study. *Nutrients*. 2016; 8:770. <https://doi.org/10.3390/nu8120770> PMID: 27916866

2. Sylvestsky AC, Jin Y, Mathieu K, DiPietro L, Rother KI, Talegawkar SA. Low-Calorie Sweeteners: Disturbing the Energy Balance Equation in Adolescents? *Obesity*. 2017; 25:2049–2054. <https://doi.org/10.1002/oby.22005> PMID: 29086493
3. Buckley JP, Kim H, Wong E, Rebholz CM. Ultra-processed food consumption and exposure to phthalates and bisphenols in the US National Health and Nutrition Examination Survey, 2013–2014. *Environ Int*. 2019; 131:105057. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105057> PMID: 31398592
4. Park S, Belfoul AM, Rastelli M, Jang A, Monnoye M, Bae H, et al. Maternal low-calorie sweetener consumption rewires hypothalamic melanocortin circuits via a gut microbial co-metabolite pathway. *JCI Insight*. 2023; 8:e156397. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.156397> PMID: 37014702
5. Milà-Gausch M, Ramírez S, Llana SR, Fos-Domènech J, Dropmann LM, Pozo M, et al. Maternal emulsifier consumption programs offspring metabolic and neuropsychological health. *PLoS Biol*. 2023; 21(8):e3002171. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002171>
6. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989; 2(8663):577–580. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)90710-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)90710-1) PMID: 2570282
7. Heindel JJ. History of the Obesogen Field: Looking Back to Look Forward. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10:14.
8. Bouret SG. Development of Hypothalamic Circuits That Control Food Intake and Energy Balance. In: Harris RBS, editor. *Appetite and Food Intake: Central Control*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2017. p. 135–154.
9. Egusquiza RJ, Blumberg B. Environmental Obesogens and Their Impact on Susceptibility to Obesity: New Mechanisms and Chemicals. *Endocrinology*. 2020; 161:bqaa024. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa024> PMID: 32067051
10. Mackay H, Patterson ZR, Khazall R, Patel S, Tsirlin D, Abizaid A. Organizational effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on arcuate nucleus circuitry controlling food intake and energy expenditure in male and female CD-1 mice. *Endocrinology*. 2013; 154:1465–1475. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2044> PMID: 23493373
11. Marraudino M, Ponti G, Moussu C, Farinetti A, Macchi E, Accornero P, et al. Early Postnatal Genistein Administration Affects Mice Metabolism and Reproduction in a Sexually Dimorphic Way. *Metabolites*. 2021; 11:449. <https://doi.org/10.3390/metabo11070449> PMID: 34357343
12. Patisaul HB. Achieving CLARITY on bisphenol A, brain and behaviour. *J Neuroendocrinol*. 2020; 32:e12730. <https://doi.org/10.1111/jne.12730> PMID: 31063678