



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Expresión de GLUT1 y estrés oxidante en el hígado
de ratas macho que consumieron sacarosa durante las
etapas prenatal y posnatal

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

Aldair Aguilar Lazcano

Director y codirector

Dr. Jorge Rodríguez Antolín
Dra. Verónica Velazquez Orozco



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Expresión de GLUT1 y estrés oxidante en el hígado
de ratas macho que consumieron sacarosa durante las
etapas prenatal y posnatal

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

Aldair Aguilar Lazcano

Comité Tutorial

Dr. Jorge Rodríguez Antolín
Dra. Verónica Velazquez Orozco
Dra. Leticia Nicolás Toledo
Dra. Martha Elba González Mejía

Tlaxcala, Tlax

Noviembre, 2024

Financiamiento

El presente trabajo fue realizado en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Para su realización se contó con una beca de maestría del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CVU: 1233370) (No. de apoyo 822022).

La maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Sistema nacional de Posgrados del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y tecnologías (SNP-CONAHCyT)



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Aldair Aguilar Lazcano** realiza para la obtención del grado de **Maestro en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es "Expresión de GLUT1 y estrés oxidante en el hígado de ratas macho que consumieron sacarosa durante las etapas prenatal y posnatal" .

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., A 05 DE NOVIEMBRE DEL 2024

DRA. MARTHA ELBA GONZÁLEZ MEJÍA

DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO

DR. FRANCISCO CASTELÁN

DRA. VERÓNICA VELÁZQUEZ OROZCO

DRA. SARET DAVILA SANTACRUZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



COMITÉ ACADÉMICO POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

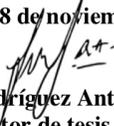
Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por el estudiante **Aldair Aguilar Lazcano** titulada “**Expresión de GLUT1 y estrés oxidante en el hígado de ratas macho que consumieron sacarosa durante las etapas prenatal y posnatal**” para optar por su grado de **Maestro en Ciencias Biológicas**.

El documento de la tesis de Aldair Aguilar Lazcano fue revisado por mí como director de tesis antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente a los exámenes tutorales, los miembros de su comité tutorial realizaron también sus respectivas observaciones. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. En el mes de noviembre, el documento final de la tesis fue procesado con el programa del Turnitin marcando similitudes del 4%. Los textos detectados con similitud fueron marcados Introducción, Antecedentes, Justificación, Pies de figura, Discusión, Conclusión y Perspectivas correspondiendo a lenguaje común por lo que esta similitud no podría ser considerada como plagio.

Por lo anterior, confirmo que **el estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable** en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE
Tlaxcala, Tlax., a 8 de noviembre de 2024


Jorge Rodríguez Antolín
Director de tesis



Sistema Institucional de Autogestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015

Agradecimientos

Al posgrado por permitirme usar sus instalaciones en mi búsqueda de superación y felicidad.

A mis tutores por su tiempo y dedicación en cada una de sus intervenciones.

Al comité tutorial por sus atinadas observaciones, por mostrarme el camino hacia la autocrítica y al rigor científico.

Agradecimientos personales

A mi familia, por su respaldo.

A mis compañeros y amigos, por su ayuda desinteresada.

A mi hermano, por ser mi principal inspiración.

A mi pareja, por su apoyo.

A Tayler Gregory Okonma, a Malcom James McCormick y Cristiano Ronaldo dos Santos Aveiro, por ser la luz en los momentos de oscuridad.

“You are the lighth
It’s not on you, it’s in you
Don’t yo ever ir your motherfucking life
Dim your lighth for nobody”

Resumen

Introducción: En épocas recientes el consumo azúcar y en particular de bebidas azucaradas ha incrementado en la población mundial, lo cual supone una problemática de salud pública debido a las comorbilidades asociadas a su consumo. En particular, investigaciones recientes sugieren que el consumo de azúcar tiene repercusiones directas en la descendencia en diferentes órganos a diferentes niveles. En el hígado, diversos estudios señalan una mayor acumulación de tejido adiposo intrahepático, lo cual puede traducirse en hígado graso no alcohólico en exposiciones prolongadas. A pesar de este conocimiento, pocos estudios establecen una relación directa entre el consumo de azúcar, el transporte de glucosa al interior de los hepatocitos y estrés oxidante.

Objetivos: El objetivo fundamental de este trabajo es identificar y cuantificar la expresión del transportador de glucosa tipo 1 y algunos marcadores de estrés oxidante.

Metodología: Para conseguir este objetivo fue empleado un modelo animal de ratas hembras de la cepa Wistar, las cuales fueron alimentadas con dietas sólidas y agua con sacarosa al 5% a lo largo de la gestación y lactancia. Este estímulo de agua con sacarosa continuó hasta los 121 días que equivalen a la etapa adulta. A partir de la eutanasia de estos animales se obtuvo el hígado en el que se le realizaron las técnicas destinadas a la medición de estrés oxidante y cuantificación e identificación del transportador de glucosa 1.

Discusión: Los datos obtenidos de la expresión de GLUT1 muestran por un lado la inmunolocalización de la proteína, la cual puede ser descrita como heterogénea o sin un patrón específico. Por el otro lado la cuantificación por la prueba de Western Blot revela una baja cantidad de proteína expresada en el hígado en todas las condiciones evaluadas. Esto puede significar que el estímulo por sí sólo no es capaz de alterar la expresión de esta proteína en la descendencia, ya sea durante etapas prenatales o durante la vida adulta. Ambos resultados coinciden con la mayoría de trabajos que han evaluado la presencia de GLUT1 en el hígado. Sin embargo ocurre lo contrario al evaluar algunos marcadores de estrés oxidante

los cuales están ligados a un metabolismo anormal de la glucosa y a la glucotoxicidad. Al respecto, los resultados son homogéneos en casi todas las pruebas evidenciando que la adición de sacarosa en la vida adulta no es suficiente para alterar estos parámetros. Sin embargo, la adición de sacarosa durante las etapas prenatales sí lo hacen. En este sentido los resultados sugieren que la dieta materna es capaz de activar genes que promueven una mayor cantidad de radicales libres y una menor capacidad para neutralizarlos, en la descendencia. Esto sin lugar a duda respalda la teoría de la programación fetal y ha sido recientemente estudiada en condiciones parecidas, mostrando resultados similares. Sin embargo esta investigación representa una de las primeras aproximaciones a las repercusiones dietéticas de la sacarosa sobre la descendencia, en estrés oxidante y en la expresión de GLUT1.

Palabras clave: Malnutrición, estrés oxidante, descendencia, hígado.

Índice

1. Introducción.....	3
2. Antecedentes	5
2.1 Hígado	5
2.2 Hígado de ratas	8
2.3 Consumo de bebidas azucarada	9
2.4 Transportadores de glucosa (GLUTs).....	12
2.4.1 Transporte de glucosa en el hígado.....	12
2.5 Estrés oxidante	16
2.5 Dieta materna y epigenética.....	18
3. Justificación	21
3.1 Pregunta de investigación	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivo	23
5.1 General	23
5.2 Específicos	23
6. Metodología	24
6.1 Diseño.....	24
6.2 Ubicación espacio temporal.....	24
6.3 Grupos experimentales	24
6.3.1 Grupo experimental madres.....	24
6.3.2 Grupos experimentales de las crías.....	24
6.4 Diseño experimental	25
6.5 Obtención del órgano	25
6.6 Inclusión y cortes del hígado.....	26
6.7 Inmunohistoquímica	26
6.8 Western Blot	26

6.9 Estrés oxidante	27
6.10 Diseño estadístico.....	27
7. Resultados	28
7.1 Peso	28
7.1.1 Comportamiento de peso de las madres.....	28
7.1.2 Comportamiento de peso de las crías.....	29
7.2 Inmunolocalización y cuantificación de GLUT1.....	30
7.3. Estrés oxidativo.	32
7.3.1 TBARS (MDA).....	32
7.2.2 Glutación	33
7.2.3 SOD	34
7.2.4 CAT	35
9. Discusión	36
8. Conclusiones	41
9. Perspectivas	43
10. Referencias.....	45

1. Introducción

El hígado humano es una glándula café rojizo, que pesa aproximadamente 1400 gramos, responsable de funciones fundamentales en el metabolismo de la glucosa, como glucólisis, glucogénesis, glucogenólisis y gluconeogénesis (Nordlie y cols. 1999; Kur y cols. 2021). Se compone por cuatro lóbulos a los que se les une la vesícula biliar y ramificaciones del sistema circulatorio tales como la vena portal, la arteria hepática y la vena cava inferior (Vdoviakova y cols., 2016). En su composición microscópica encontramos células ordenadas en placas de tal manera que forman canales cuya función principal es el curso normal de la sangre. Las células hepáticas reciben el nombre de hepatocitos las cuales tienen microvellosidades encargadas de absorber las sustancias contenidas en sangre, tales como azúcares, aminoácidos, lípidos, etc. Al mismo tiempo segrega sustancias como albúmina y glucógeno, además de tener una función de eliminación de desechos contenidos en sangre. (Vdoviakova y cols., 2016). En ratas existe diferencia en la lobulación, ya que podemos encontrar dos lóbulos derechos (lateral y medial) y dos izquierdos (lateral y medial), cuadrado y caudado. Sin embargo, los procesos hepáticos ocurren igual que en los seres humanos (Abdel-Misih y Bloomston, 2010; Vdoviakova y cols., 2016).

En épocas recientes el sobre peso y la obesidad, así comorbilidades subsecuentes han incrementado su incidencia de manera alarmante. Gran parte de esto se debe a la mala alimentación en la que destacamos el consumo de alimentos de alta densidad energética, dentro de los cuales podemos encontrar a las bebidas azucaradas (Malik y cols., 2006; Toop y Gentili, 2016). El azúcar, ya sea dietética o liberada por las reservas corporales (glucógeno en hígado o músculo), requiere proteínas de transporte para mediar su absorción o almacenamiento. Estas proteínas han sido caracterizadas como transportadores de glucosa (GLUTs), simportadores de sodio-glucosa (SGLT) y SWEETS. Los GLUTs, están involucradas en todos los procesos del manejo de las moléculas de azúcar en el organismo y su expresión en diversos tejidos está mediada por la tasa de metabolismo de glucosa individual de estos (Chadt y Al-Hasani, 2020). Estas proteínas van del uno al 14 (GLUT1 – GLUT14). La

proteína GLUT1, fue la primera en ser caracterizada por Mueckler y colaboradores en 1985 y puede ser encontrada en casi todos los tejidos (Chadt y Al-Hasani, 2020). En hígado particularmente, su aparición ha sido descrita en el desarrollo orgánico de los productos en etapas intrauterinas y la maduración hepática posnatal (Tal y cols., 1990). También se expresa de manera anormal en procesos de hepatotoxicidad y estrés oxidativo. Así mismo, la sobreexpresión de GLUT1 tiene una alta prevalencia en tejido tumoral y en particular en el carcinoma hepatocelular (Tal y cols., 1990). De tal forma que podemos inferir que la alta consumo de carbohidratos simples en la dieta, a partir de la adición de bebidas azucaradas, podría estar alterando el procesamiento normal de los azúcares en el metabolismo de las células hepáticas, y por lo tanto, sobre expresar los transportadores de glucosa, en particular GLUT1. Además, podría estar alterando el balance entre moléculas prooxidantes y antioxidantes.

2. Antecedentes

2.1 Hígado

En los seres humanos el hígado es un órgano que se localiza en las regiones hipocondriacas y epigástricas y representa aproximadamente del 2 al 3% del peso corporal total. (Vdoviakova y cols., 2016). Tiene una amplia variedad de funciones, por ejemplo, el manejo metabólico de los carbohidratos en procesos como la glucólisis, glucogénesis, glucogenólisis o gluconeogénesis. Esto le da una responsabilidad fundamental en la homeostasis, ya que mantiene el balance entre la ingesta, el almacenamiento (vía glucogénesis) y la liberación de glucosa en el cuerpo (vía glucogenólisis y gluconeogénesis) (Nordlie y cols. 1999; Kur y cols. 2021). La función metabólica del hígado se extiende hasta el manejo de proteínas y lípidos. (Trefts y cols., 2017). Al mismo tiempo tiene un rol fundamental en el manejo del volumen sanguíneo, control endócrino y procesamiento de xenobióticos (Trefts y cols., 2017).

Está organizado en cuatro lóbulos: derecho, izquierdo, cuadrado y caudado. El lóbulo derecho, de mayor tamaño, se encuentra separado del izquierdo desde una perspectiva anatómica y no funcional, por un ligamento falciforme (Vdoviakova y cols., 2016). Por otra parte, entre los lóbulos cuadrado y caudado, se encuentra una estructura llamada hilio portal que recibe y ubica a la vena portal y a la arteria hepática. La vesícula biliar se halla entre los lóbulos cuadrado y derecho (Vdoviakova y cols., 2016). Este órgano se encuentra sostenido por los ligamentos triangular derecho e izquierdo, los cuales tienen su origen en el ligamento coronario que a su vez está adherido al diafragma (Vdoviakova y cols., 2016).

En el interior del hígado la arquitectura celular es semejante en todos los lóbulos, por lo que se considera un “parénquima isotrópico” y es similar en todos los mamíferos (Kruepunga y cols., 2019; Abdel-Misih y Bloomston, 2010). La unidad funcional del hígado recibe el nombre de lobulillo hepático y tiene un tamaño aproximado de dos milímetros de ancho y 1 milímetro de largo (Kruepunga y cols., 2019). Los lobulillos están formados por hepatocitos ordenados en

placas de una o dos células de grosor, entre las cuales atraviesan canales llenos de sangre llamados sinusoides hepáticos. En estos canales fluye sangre proveniente de las triadas portales, las cuáles se ubican en los vértices de los lobulillos y están formadas por una arteria hepática, una vena portal y un conducto biliar (Abdel-Misih y Bloomston, 2010). El contenido sanguíneo que se vierte en los sinusoides proviene principalmente de la vena porta que transporta sangre proveniente de las venas mesentérica, gástrica, esplénica y pancreática, que en su conjunto abastecen del 70 al 75% del suministro total (Abdel-Misih y Bloomston, 2010; Vdoviakova y cols., 2016). El flujo sanguíneo restante proviene de la arteria hepática (Vdoviakova y cols., 2016). Esta sangre fluye y es filtrada a lo largo de los sinusoides en dirección al centro del lobulillo. Una vez en el centro, la sangre es colectada por una estructura venular llamada vena central, que es una ramificación de venas hepáticas de mayor calibre, las cuales convergen en la vena cava (Abdel-Misih & Bloomston, 2010). El hígado es un órgano altamente vascularizado, ya que recibe hasta un 25% más del gasto cardiaco total más que otros órganos (Vdoviakova et al., 2016).

Este contenido sanguíneo es filtrado por dos tipos celulares, hepatocitos y células endoteliales sinusoidales (Abdel-Misih y Bloomston, 2010). Los hepatocitos constituyen a la mayoría de la población celular, alrededor de un 60 a 80% del total (Abdel-Misih y Bloomston, 2010). Además de los hepatocitos y células sinusoidales endoteliales (SECs), hay células de Kupffer, células estrelladas hepáticas (HSC) y un epitelio biliar o colangiocitos, que en su conjunto representan aproximadamente al 20% de las células restantes (Abdel-Misih y Bloomston, 2010).

Cada tipo celular tiene funciones específicas que en su conjunto alcanzan la función hepática total (Trefts y cols., 2017). Los hepatocitos realizan la mayoría de las funciones en el hígado (Trefts y cols., 2017). La segunda población más abundante es la de colangiocitos y están encargados principalmente de recubrir los ductos biliares, (Trefts y cols., 2017). Las SECs se encargan principalmente de proteger a los hepatocitos y permitir o negar el contacto del contenido sanguíneo con los hepatocitos (Abdel-Misih y Bloomston, 2010). Los poros por los cuales permiten este intercambio son de aproximadamente de 50 a 180 nanómetros en seres

humanos y de 50 a 280 nanómetros en ratas y ratones (Trefts y cols., 2017). Las células estrella tienen funciones que no son del todo claras, sin embargo son la población celular más activa en el hígado (Trefts y cols., 2017). En su forma quiescente mantienen reservas de vitamina A en gotas lipídicas que pierden progresivamente al activarse (Trefts y cols., 2017). La organización del colágeno en el hígado lastimado depende de estas células en su forma activa (Trefts y cols., 2017). La población de macrófagos específica del hígado recibe el nombre de células de Kupffer, su función es reconocer patógenos y dar una respuesta pro o antiinflamatoria (Trefts y cols., 2017).

El metabolismo hepático de la glucosa incluye el almacenamiento, síntesis y liberación de ésta a la circulación (Trefts y cols., 2017). Esto se logra a partir de la interpretación de la cantidad de dos hormonas, principalmente. La baja proporción de glucagón y un incremento de insulina promueven una menor producción de glucosa a partir de glucógeno (glucogenólisis) y de otras moléculas (gluconeogénesis) (Trefts y cols., 2017). Esta configuración hormonal también vuelve a los hepatocitos susceptibles a la formación de glucógeno (glucogénesis) y de glucólisis. El caso contrario, aumento en glucagón y disminución de la insulina conduce a una mayor tasa en la producción de glucosa a partir de glucogenólisis y gluconeogénesis (Trefts y cols., 2017). Estos cambios son dinámicos y responden a las necesidades energéticas del resto del cuerpo (Trefts y cols., 2017).

De la misma forma el hígado tiene un rol fundamental en el metabolismo de lípidos y colesterol al ser capaz de regular procesos como captación, síntesis, empaquetamiento y secreción de algunos lípidos y lipoproteínas (Trefts y cols., 2017). Además de estos procesos, los lípidos pueden ser usados como sustrato energético por el hígado y (Trefts y cols., 2017). Por otra parte el hígado tiene una alta tasa de síntesis de proteínas, contribuyendo al 85-90% del volumen total de proteínas en circulación (Trefts y cols., 2017). En este órgano se sintetiza albúmina, responsable de una multitud de funciones como el transporte de una gran variedad de moléculas, proteínas de transición, factores de crecimiento y otros péptidos (Trefts y cols., 2017).

2.2 Hígado de ratas

A diferencia de los seres humanos, el hígado de la rata representa alrededor del seis por ciento del peso corporal y se ubica en la porción caudal del diafragma, extendiéndose en ambos lados del plano mediano, desde el arco costal derecho hasta el izquierdo (Möller Bredo y Vázquez Odo, 2011; Abdel-Misih y Bloomston, 2010). Desde la vista anterior (parietal) tiene una forma convexa relacionada al diafragma. Desde la vista posterior (visceral) tiene forma cóncava relacionada al estómago y duodeno (Möller Bredo y Vázquez Odo, 2011). Se encuentra segmentado anatómicamente en seis lóbulos: medial y lateral izquierdos, medial y lateral derechos, cuadrado y caudado, que a su vez tiene dos procesos, un papilar pequeño y orientado a la izquierda y un caudado que se extiende hacia la derecha (Abdel-Misih y Bloomston, 2010; Vdoviakova y cols., 2016).

El contenido sanguíneo hepático en la rata es suministrado principalmente por dos estructuras: 1) la vena porta, con sangre rica en nutrientes proveniente de capilares de órganos digestivos y 2) la arteria hepática, que transporta sangre rica en oxígeno (Abdel-Misih y Bloomston, 2010). A diferencia de los humanos las ratas carecen de vesícula biliar, en su lugar tienen un ducto hepático común, formado por ductos derecho e izquierdo en el área portal (Abdel-Misih y Bloomston, 2010). La unidad funcional del hígado de la rata es el lobulillo hepático. Aquí el contenido sanguíneo es depositado a partir de las triadas portales y es filtrado por los sinusoides en dirección a la vena central del lobulillo (Abdel-Misih y Bloomston, 2010; Kruepunga y cols., 2019). La sangre hepática es concomitante con el tamaño del hígado, y regulado por el principio de Fick el cual describe el transporte de sustancias a través de un gradiente de concentración (Kruepunga y cols., 2019). Este contexto nos encamina a la exploración de factores externos, como el consumo de azúcares simples, y sus repercusiones a nivel anatómico y fisiológico.

2.3 Consumo de bebidas azucarada

En las últimas décadas ha incrementado el consumo de bebidas azucaradas (BA) escalando a una problemática de naturaleza epidémica debido a los efectos que producen sobre la salud (Malik y cols., 2006; Toop y Gentili, 2016; Imamura y cols., 2015). Se estima que al día se consumen 78 gramos de azúcares provenientes de bebidas azucaradas, lo que representa de un seis a 16% del total de calorías consumidas (Malik y cols., 2006; Eng y Estall, 2021). Su alta ingesta en las sociedades occidentales se asocia a enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como el sobrepeso y obesidad. La organización mundial de la salud estima que más de un mil millones de personas tienen exceso de peso y por lo menos 300 mil de ellas son obesas (Malik y cols., 2006; Toop y Gentili, 2016). En este sentido existe una estrecha relación entre su consumo y una mayor incidencia en ECNT tales como hipertensión, cardiopatías, diabetes, resistencia a la glucosa, etc. (Malik y cols., 2006; Eng y Estall, 2021). Estas enfermedades son el resultado de interacciones complejas que parten de un desbalance energético positivo a la que se le suman factores genéticos, metabólicos, conductuales, ambientales, culturales y socioeconómicos (Malik y cols., 2006).

Estudios realizados en modelos animales han revelado que el consumo de bebidas azucaradas, en etapas tempranas del desarrollo y vida adulta, tienen consecuencias multiorgánicas en distintos niveles. Estas consecuencias, están dotadas de un sentido lógico de acuerdo con hipótesis de los orígenes de la salud y enfermedad (Witek y cols. 2022). Estudios variados realizados en roedores han mostrado descendencia con predisposición a enfermedades metabólicas (ganancia de peso y niveles altos de triglicéridos, colesterol, leptina, glucosa e insulina), enfermedades cardiacas e hipertensión) (Witek y cols. 2022). Esta condición dietética está relacionada a la predisposición del desarrollo de desórdenes neuroconductuales (Witek y cols. 2022). Por ejemplo, afecciones a la memoria (reconocimiento y espacial), alteraciones al receptor de glutamato o conductas de hiperfagia en etapa adulta (Mizera y cols., 2021; Bayol y cols., 2007) Por otra parte las dietas ricas en azúcares simples también suelen tener repercusiones sobre las madres, como el riesgo aumentado de cursar diabetes mellitus gestacional, hipertensión o fetos con crecimiento anormal (Witek y cols., 2022). De la misma

forma, el consumo de bebidas azucaradas tiene implicaciones en la ganancia de peso, presión sanguínea y concentraciones basales anormales de glucosa, insulina y triglicéridos en sangre (Toop y Gentili, 2016). Dietas ricas en azúcares pueden provocar inflamación, lo que podría indicar que el estrés oxidativo medie y modifique los procesos fisiológicos celulares (Ling-Tan B. y cols., 2018).

Estas repercusiones multinivel se repiten en un número variado de modelos experimentales, por ejemplo, el modelo de malnutrición durante gestación y lactancia con bebidas azucaradas al cinco %. En este modelo se ha demostrado que en la musculatura del piso pélvico existen cambios morfométricos que afectan a la actividad eléctrica de los músculos bulboesponjoso y pubococcigeo durante el reflejo urogenital, lo que podría traer consigo disfunciones sexuales, por ejemplo la eyaculación precoz, respectivamente (Corona-Quintanilla y cols., 2021). Por otro lado, el mismo modelo experimental en ratas mostró un cambio en el peso de la grasa perigonadal y un mayor número de adipocitos más grandes en los testículos (Córdoba-Sosa y cols., 2022).

En el hígado la malnutrición causada por el exceso de este nutriente ha mostrado consecuencias patológicas en diversas etapas. Por ejemplo, su consumo se asocia a un mayor almacenamiento de lípidos en ratas hembras y una mayor posibilidad de desarrollar hígado graso no alcohólico (HGNA) (Nicolás-Toledo et al., 2017; Eng y Estall, 2021). Particularmente el consumo de bebidas azucaradas, más que la ingesta de fructosa sólida está relacionado con la aparición de HGNA (Eng y Estall, 2021). Esta respuesta negativa se caracteriza por la resistencia a la insulina en el hígado, la cual tiene un vínculo estrecho con estas y otras enfermedades (Trefts y cols., 2017). Esta relación resulta bilateral, ya que la mayoría de las veces, la aparición de HGNA incrementa la incidencia de DM2 por resistencia a la insulina y la DM2 acelera la progresión de HGNA hacia esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), cirrosis y carcinoma hepatocelular (Chadt y Al-Hasani., 2020). A nivel molecular la ingesta incrementada de fructosa dentro de los hepatocitos estimula la expresión de enzimas lipogénicas como sintasas de ácidos grasos, estearil CoA desaturasa uno y acetil CoA carboxilaza, a través de la activación del factores de transcripción (CgREBP). Las

concentraciones elevadas de lípidos (ceramidas o diacilglicéridos), particulares en HGNA y EHNA, generan lipotoxicidad (Chadt y Al-Hasani., 2020). A la par, la hiperglicemia y la ingesta excesiva de carbohidratos generan glucotoxicidad y acumulación de lípidos. (Chadt y Al-Hasani., 2020). Ambas, lipotoxicidad y glucotoxicidad provocan estrés del retículo endoplásmico, que eventualmente se traduce en esteatosis y muerte celular (Figura 1) (Chadt y Al-Hasani., 2020).

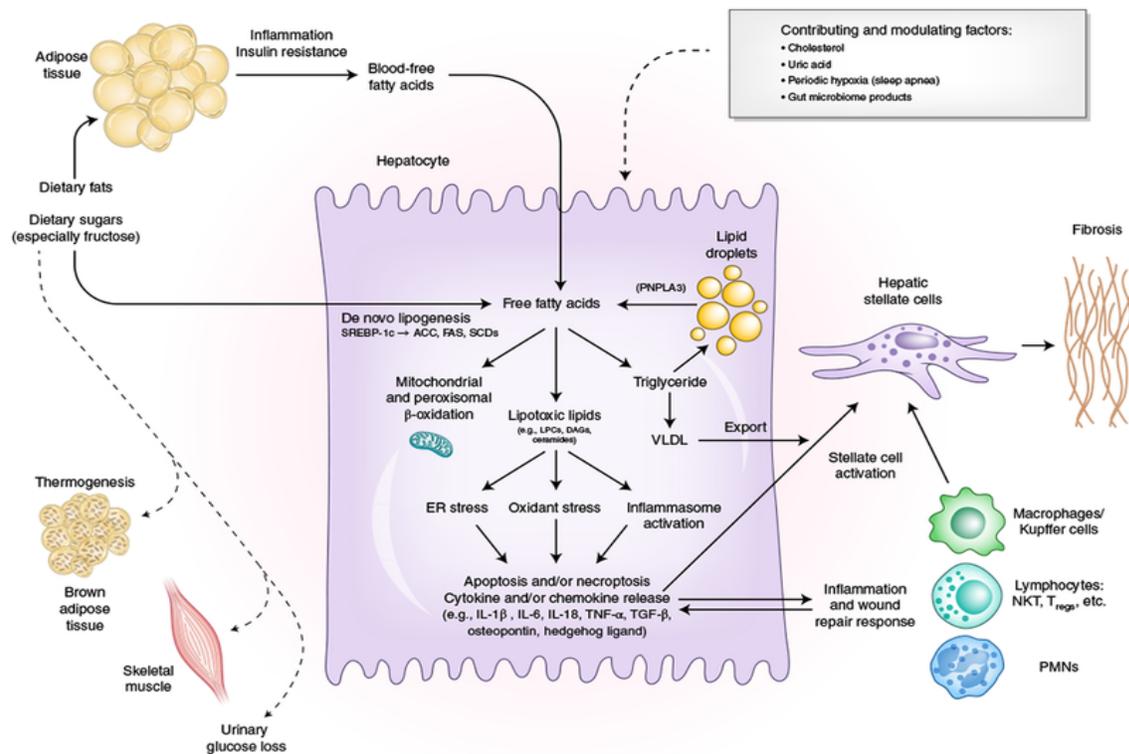


Figura. 1. Mecanismo patológico en el desarrollo de HGNA (Friedman y cols., 2018)

Por ello, se vuelve fundamental el entendimiento del transporte de glucosa al interior de la célula. Este transporte es mediado por proteínas transmembranales transportadoras llamadas GLUTS (Kur y cols., 2021b). Estas tienen un rol fundamental en el metabolismo de la glucosa y por lo tanto en la homeostasis (Kur y cols., 2021b).

2.4 Transportadores de glucosa (GLUTs)

La familia de transportadores de glucosa (GLUTs) está involucrada en todos los pasos del manejo de glucosa y otras hexosas. Desde la absorción y distribución, hasta la excreción y recuperación (Chadt y Al-Hasani, 2020). En seres humanos existen 14 isoforma de GLUTs (GLUT1 – GLUT14) todos con diferentes afinidades de unión y diversos perfiles de expresión, por lo cual su respuesta es distinta en diversos tejidos (Kur y cols., 2021b).

2.4.1 Transporte de glucosa en el hígado.

El hígado es capaz de la expresión génica de todos los transportadores de glucosa o GLUTS (Chadt y Al-Hasani., 2020). Sin embargo, la expresión de algunos sobresale, tal es el caso del GLUT1, GLUT2, GLUT5, GLUT8 y GLUT9 (Chadt y Al-Hasani., 2020). Esto se debe a que ellos tienen un rol fundamental en procesos metabólicos mientras que el resto, con menor expresión, no son relevantes para tales menesteres.

GLUT1 también llamado Hep2/eritrocito/cerebro, fue el primero en ser caracterizado por Mueckler y colaboradores en 1985 y es codificado por el gen SLC2A1 (Thorens, 1996; Chen y cols., 2015; Koch y Weber, 2019). Es capaz de transportar glucosa, galactosa y manosa (Thorens, 1996). Se expresa principalmente en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, ya que asegura el transporte de glucosa al cerebro (Koch y Weber, 2019) (Thorens, 1996). Sin embargo, este transportador puede ser expresado por casi todos los tejidos con distintos niveles de expresión, permitiendo un transporte constante de glucosa. (Amann y Hellerbrand, 2009; Pragallapati & Manyam, 2019). Esta expresión está relacionada con la tasa metabólica celular de la glucosa, es bidireccional y lo regula el gradiente de glucosa en sangre (Amann y Hellerbrand, 2009; Pragallapati y Manyam, 2019). En condiciones normales el incremento de su transcripción está dado por los receptores de tirosina quinasa (RTKs) que conducen a las vías que regulan las enzimas fosfatidilinositol 3

quinasa (PIK-3, por sus siglas en inglés) y proteína quinasa B (AKT) (Di Dedda y cols., 2019; Ward y Thompson, 2012). A la par, estas enzimas son capaces de activar a los depósitos citoplasmáticos de GLUT1 y permitir su translocación a la membrana celular (Figura 2) (Di Dedda y cols., 2019).

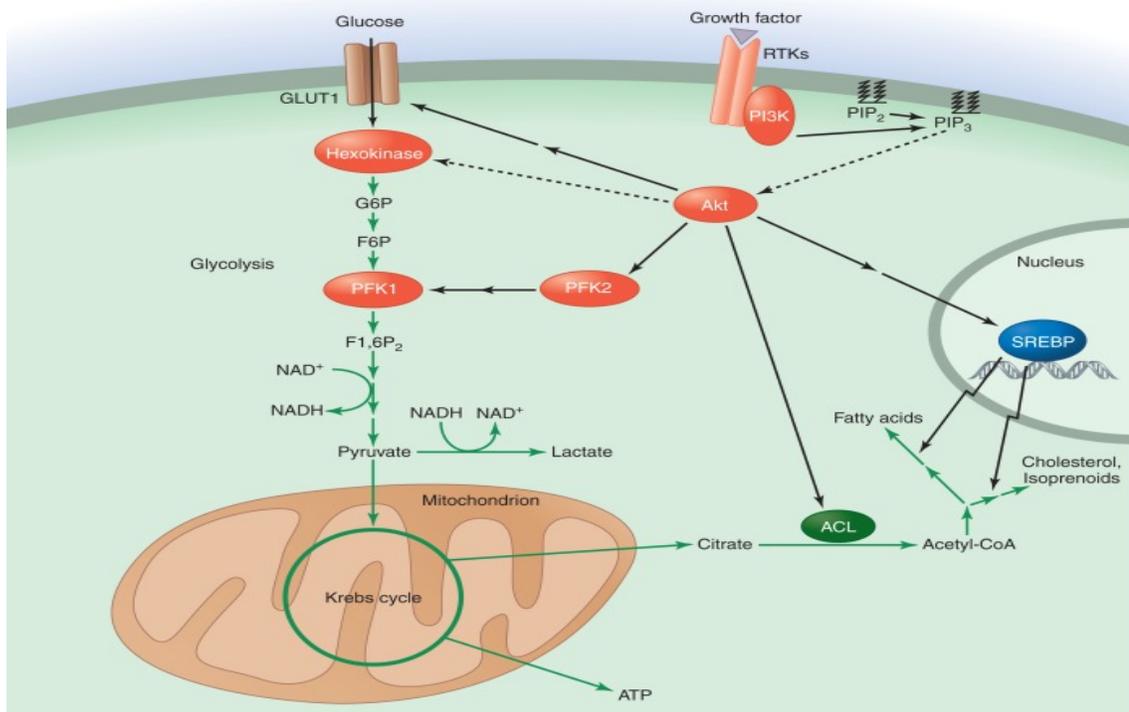


Figura. 2. Mecanismo de señalización de la expresión de GLUT1. (Ward & Thompson, 2012)

En algunos tejidos, como el músculo, contribuye al transporte de glucosa basal específica del tipo de fibra (Chadt y Al-Hasani, 2020b). Su expresión se encuentra aumentada durante periodos de estrés metabólico y tiene un aumento en la participación de captación de glucosa muscular durante la hipertrofia (Chadt y Al-Hasani, 2020b). La sobre expresión está asociada a la presencia de tejido tumoral y características agresivas, como alta tasa de proliferación, metástasis y resistencia a la quimioterapia y radioterapia (Thamrongwarangoon y cols., 2021). Esto puede explicarse por el metabolismo acelerado en células malignas, es decir, un incremento en los requerimientos de glucosa y en consecuencia el aumento en la captación de la misma (Amann y Hellerbrand, 2009). En el tejido adiposo contribuye al transporte de glucosa basal reciclándola a través de compartimentos de membrana internos (Chadt y Al-Hasani, 2020b).

Además, GLUT1 tiene funciones fisiológicas primarias en el hígado que abarcan desde el desarrollo orgánico embrionario hasta su maduración posnatal (Chadt y Al-Hasani, 2020b). Esto se debe a que es el principal regulador del transporte de la glucosa en células hepáticas fetales (Wang y cols., 2020). También es el principal transportador de glucosa en células no parenquimatosas y en condiciones normales se encuentra en niveles relativamente bajos en hepatocitos (Chadt y Al-Hasani, 2020b). Su expresión se eleva en algunos padecimientos, tales como carcinoma hepatocelular y esteatohepatitis no alcohólica (Chadt y Al-Hasani, 2020b) y disminuida en padecimientos tales como hepatitis C. También puede estar relacionada con la hepatotoxicidad y el estrés oxidativo (Chadt y Al-Hasani, 2020b). En el carcinoma hepatocelular, uno de los cánceres más mortales y prevalentes en seres humanos, este transportador es altamente expresado y promueve la tumorigenicidad (Du y cols., 2022).

GLUT2 es capaz del manejo de glucosa, galactosa, manosa, fructosa y glucosamina. Es posible encontrar este transportador en una variedad de tejidos como intestino, riñón y sistema nervioso, aunque es particularmente abundante en las células beta pancreáticas y hepatocitos (Chadt y Al-Hasani, 2020b). Debido a su característica baja sensibilidad a los azúcares tiene función esencial en células sensibles a la glucosa (Chadt y Al-Hasani, 2020b). Por ejemplo, en el sistema nervioso es capaz de relacionarse en los mecanismos de señalización de la conducta alimentaria o la termogénesis (Thorens, 2015). GLUT2 tiene el control de la mayoría de la absorción en los hepatocitos (Chadt y Al-Hasani, 2020b). Su sobreexpresión está asociada a la acumulación de lípidos y gluconeogénesis, lo que conduce habitualmente al desarrollo de esteatosis hepática (Chadt y Al-Hasani, 2020b).

GLUT5 es considerado el mayor transportador de fructosa y no es capaz del transporte de otro monosacárido (Chadt y Al-Hasani, 2020b). Similar a otros transportadores se encuentra involucrado en el desarrollo HGNA a partir de la ingesta facilitada de fructosa (Zhang DM. y cols., 2017). GLUT8 por su parte se expresa en diversos tejidos como testículos, cerebro, músculo, riñón e hígado y transporta solamente glucosa y fructosa (Chadt y Al-Hasani, 2020b). Este transportador responde a la translocación derivada de estímulos hormonales y su

función principal es la regulación de energía en células espermáticas (Ibberson M. y cols., 2000). GLUT9 por otro lado es un transportador de ácido úrico, inicialmente considerado transportador de glucosa y fructosa, que se expresa en hígado, riñón e intestinos (Chadt y Al-Hasani, 2020b).

2.5 Estrés oxidante

El desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes es lo que se conoce como estrés oxidante u oxidativo (Jones, 2008). Este desbalance usualmente está ligado a daño molecular y desbalance e inestabilidad en procesos de señalización celular (Jones, 2008). Además, juegan un rol fundamental en los procesos de salud y enfermedad (Ling-Tan y cols., 2018). Lo anterior es causado debido a la aparición de radicales libres, los cuales en términos generales son moléculas con un electrón no apareado o desapareado que lo dota de una alta capacidad reactiva (Jones, 2008). Podemos encontrar a estas moléculas derivadas del oxígeno o ROS por sus siglas en inglés y especies reactivas de nitrógeno o RNS por sus siglas en inglés (Ling-Tan y cols., 2018). Por ejemplo, el anión súper oxido (O_2^-), es capaz de causar peroxidación lipídica, en los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular (Jones, 2008). Se especula que un solo evento de la cadena de reacciones de O_2^- puede causar daño oxidativo en 200-400 moléculas de lípidos antes de poder ser neutralizados (Jones, 2008).

Dentro de las ROS podemos encontrar principalmente al anión superóxido, ácido hipocloroso, peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete, hipoclorito, radical hidroxilo y peróxidos lipídicos (Ling-Tan y cols., 2018). Estas moléculas pueden fácilmente entrar en contacto e interactuar con ácidos nucleicos, enzimas, membranas lipídicas, proteínas y algunas moléculas pequeñas (Ling-Tan y cols., 2018). Usualmente son un subproducto metabólico aeróbico producido en las mitocondrias durante el proceso de la fosforilación oxidativa en la generación de ATP (Ling-Tan y cols., 2018). Por otro lado, en las RNS podemos encontrar al óxido nítrico o NO por sus siglas en inglés y al peroxinitrito o ONOO por sus siglas en inglés (Ling-Tan y cols., 2018).

El consumo anormal de algunos nutrientes ha mostrado tener influencia en promover estrés oxidativo e inflamación (Ling-Tan y cols., 2018). Por ejemplo, uno de los nutrientes a los que se le atribuye a la aparición de estrés y la consecuente inflamación, es al alto consumo de carbohidratos. En particular, aquellos con un alto índice glicémico. (Ling-Tan y cols., 2018).

Dietas altas en carbohidratos o grasas proveen a las células de mayor cantidad de sustratos para ser metabolizados. Esto supone un aumento subsecuente de electrones producto de las propias reacciones celulares (Ling-Tan y cols., 2018). De la misma forma este tipo de dietas está ligada a trastornos metabólicos y endocrinos asociados al hígado, debido a al rol fundamental que tiene en el metabolismo de estos nutrientes (Ling-Tan y cols., 2018).

La principal propuesta para explicar estos desordenes es la relación consecuente de fructosa y estrés oxidativo, que lleva a un metabolismo anormal (Ling-Tan y cols., 2018). Esto se ha visto demostrado en trabajos donde hay una asociación directa entre la fructosa y la modulación hepática de la actividad de glucoquinasa a través de la producción de ROS (Ling-Tan y cols., 2018). Otras asociaciones patológicas incluyen al tetracloruro de carbono (CCL_3) que causa hepatotoxicidad como resultado de la peroxidación lipídica (Jones, 2008). Los ejemplos anteriores evidencian los cambios provocados por la fructoquinasa, los cuales son traducidos en adaptaciones que pueden cambiar el flujo de sustratos energéticos mitocondriales a almacenamiento de energía (Ling-Tan y cols., 2018).

Estas interacciones oxidativas están presentes en un gran número de patologías como cáncer y diabetes (Ling-Tan y cols., 2018). Otros estados patológicos como altas concentraciones de glucosa y diversas condiciones dietéticas también puede generar la formación de ROS (Ling-Tan y cols., 2018). Sin embargo las interacciones de las moléculas prooxidantes pueden ser neutralizadas por defensas antioxidantes. Estas defensas circunscriben a enzimas capaces de limitar y eliminar a los radicales libres. Tal es el caso de la enzima superóxido dismutasa, o vitaminas como E y C (Jones, 2008). Si bien, el cuerpo es capaz de producir sus propias defensas antioxidantes, existe evidencia fidedigna de la dietas especializadas como un mediador en la neutralización de los efectos del estrés oxidativo (Ling-Tan y cols., 2018).

2.5 Dieta materna y epigenética

Epigenética significa literalmente “encima de la genética” y es una ciencia que tiene como objetivo fundamental estudiar las modificaciones en la expresión génica de la progenie que no sean necesariamente cambios en la cadena secuencial del ADN. Es decir, que los factores ambientales tales como dieta, estrés, composición corporal o metabolismo pueden influenciar la expresión genética en etapas intrauterinas y en periodos perinatales tempranos (Block y El-Osta, 2017; Fitz-James y Cavalli, 2022). Estas influencias, maternas y paternas, tienen repercusiones directas sobre la salud o enfermedad de la descendencia, incluso durante las etapas más avanzadas de la vida (Fleming y cols., 2018; Barker y cols., 2018). A esta premisa se le ha conceptualizado como “El origen de la salud y enfermedad” en referencia a la hipótesis de Barker la cual sugiere que un individuo está preparado para sobrevivir a las carencias ambientales causadas por una mala nutrición y recursos nutricios limitados (Block y El-Osta, 2017). En otras palabras una etapa de desarrollo embrionario deficiente puede aumentar el riesgo a padecer enfermedades en la vida adulta, incluyendo sus comorbilidades (Fleming y cols., 2018; Block y El-Osta, 2017; Hanson y cols., 2017).

El mecanismo de metilación del ADN, es decir la adición de un grupo metilo a partir de un enlace covalente, es el principal modulador y predictor futuro de enfermedades el cual ha sido foco de estudios recientes debido a que regula una gran cantidad de procesos biológicos, como la impronta genómica, diferenciación celular o inflamación (Block y El-Osta, 2017; Fitz-James y Cavalli, 2022). Esta metilación es capaz de ocurrir en una amplia variedad de formas, sin embargo, la más frecuente y estudiada es la metilación de citosinas en los dinucleótidos CpG (Citosina-fosfato-Guanina) (Fitz-James y Cavalli, 2022). Además de la metilación, existen otros mecanismos de señalización genética involucrados en la expresión de genes, como la modificación de histonas o la organización tridimensional del genoma (Fitz-James y Cavalli, 2022). Aunque la heredabilidad de estos principios no es totalmente conocida, se sabe que es consecuencia de mecanismos de replicación directos o a través de la reconstrucción de una señal indirecta en las siguientes generaciones (Fitz-James y Cavalli, 2022). Por ejemplo,

se sabe que las metilaciones regulan a uno de los genes mediadores de la muerte de células beta pancreáticas (TXNIP) a partir de la glucotoxicidad causada por disminuir la expresión de GLUT1 (Block y El-Osta, 2017). En este ambiente glucotóxico, el proceso de metilación puede activar al gen SREBF1 (regulador de lipogénesis hepática), el cual está relacionada con esteatosis hepática (Block y El-Osta, 2017).

La hipótesis epigenética ha sido caracterizada y confirmada sobre todo en modelos animales. Por un lado se sabe que la obesidad materna genera un riesgo aumentado de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en los descendientes (Fleming y cols., 2018; Barker y cols., 2018; Hanson y cols., 2017). Así mismo hay evidencia de crías más pequeñas, con mayor adiposidad e intolerancia a la glucosa (Fleming y cols., 2018; Block y El-Osta, 2017). Por otro lado una nutrición deficiente durante la gestación también tiene repercusiones en el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como hipertensión (Fleming y cols., 2018; Barker y cols., 2018). Es decir que uno de los pilares en la epigenética es la dieta, la cual desde sus dos extremos, sobrenutrición o desnutrición, puede generar cambios (Fleming y cols., 2018). Estos cambios pueden presentarse partir de las características metabólicas y celulares del embrión, como en el caso de la actividad mitocondrial, y responden a la disponibilidad de nutrientes que hay en ellas (Fleming y cols., 2018). En este sentido la sobrenutrición materna, con dietas ricas en grasa en modelos de roedores principalmente, pueden disminuir la expresión de adipocitoquinas mediante la hipermetilación de ADN, lo que conduce a una descendencia predispuesta a disfunción hepática, resistencia a la insulina, disfunción tiroidea, mayor almacenamiento de grasa y presión sanguínea elevada (Block y El-Osta, 2017).

Las dietas ricas en lípidos, dietas ricas en azúcar e incluso la hiperglicemia gestacional tienen efectos adversos en la progeñe (Block y El-Osta, 2017). Por ejemplo, la diabetes mellitus gestacional (DMG) se ha relacionado con crías predispuestas a una mayor obesidad y diversas enfermedades metabólicas (Block y El-Osta, 2017). Si bien los mecanismos no son totalmente entendidos se piensa que esta respuesta ocurre a partir una metilación de hormona leptina en el ADN placentario (Block y El-Osta, 2017). De la misma forma, hay evidencia de la hipermetilación del gen ABCA1 (responsable de la expresión de una proteína transportadora

de colesterol o CERP por sus siglas en inglés), lo que podría significar un transporte de colesterol anormal y traducirse en un perfil metabólico deficiente en la descendencia (Block y El-Osta, 2017). Por otra parte la hipometilación generada en el gen de transcripción específico del mesodermo (MEST por sus siglas en inglés) ha mostrado tener una mayor expansión de grasa con adipocitos más grandes (Block y El-Osta, 2017). Este gen ha mostrado relacionarse con un mayor índice de masa corporal y circunferencia de cintura en seres humanos (Block y El-Osta, 2017). Además, crías de madres que cursaron con DMG han mostrado anomalías en vías del metabolismo energético, crecimiento y muerte celular, respuesta inmune e inflamatoria y desarrollo del sistema nervioso (Block y El-Osta, 2017).

3. Justificación

La gestación es una etapa crítica en el desarrollo del feto, ya que su ambiente y factores como la dieta u obesidad materna, pueden conducir a una serie de modificaciones e influir sobre la expresión génica y por lo tanto, la vida adulta de la progenie (Reichetzeder, 2021). En seres humanos, los niveles de lípidos intrahepatocelulares son mayores en niños cuyas madres fueron obesas y tuvieron desbalances en el metabolismo de glucosa durante la gestación (Brumbaugh y cols., 2013). Esta condición podría ser la causa del origen del hígado graso no alcohólico (Brumbaugh y cols., 2013). Adicionalmente, diversos estudios señalan que alteraciones en el metabolismo de la glucosa durante la gestación, como la diabetes mellitus gestacional, está relacionada con un riesgo significativo en el desarrollo de síndrome metabólico infantil (Boney y cols., 2005), así como tolerancia anormal a la glucosa, obesidad y presión sanguínea elevada en infantes (Tam y cols, 2017). Por otro lado, en modelos animales como ratones, se ha determinado que dietas ricas en lípidos conducen a fenómenos metabólicos como ganancia de peso, masa grasa, intolerancia a la glucosa e hipertrigliceridemia (Masuyama y cols., 2015). También en ratones se ha observado que dietas anormales, ricas en lípidos y azúcares, producen un incremento en la incidencia de esteatosis hepática y acumulación de triglicéridos hepáticos (Thompson y cols., 2019). De igual manera, en macacos japoneses, se ha determinado que dietas anormales, ricas en grasa, muestran un aumento de tres veces los niveles de triglicéridos hepáticos, además de mayores cantidades de indicadores de estrés oxidante y aumento en el desarrollo de hígado graso no alcohólico, a la par de una mayor expresión de enzimas hepáticas gluconeogénicas (McCurdy y cols., 2009). Estudios realizados en ratas, por su parte, han permitido determinar que dietas ricas exclusivamente en sacarosa tienen efectos en la progenie, como mayor adiposidad corporal y aumento en la concentración de triglicéridos hepáticos (Šedová y cols., 2007). Los cambios descritos en los sujetos que ingieren dietas ricas en lípidos y glucosa, no se circunscriben a las alteraciones en su homeostasis, ya que en el caso de madres gestantes alimentadas con este tipo de dietas, los cambios también se reflejan en su progenie. Los resultados obtenidos de diferentes trabajos sugieren que dietas ricas en grasa y azúcares, modifican la expresión de genes; así la expresión de GLUT2 se ve disminuida en ratas sometidas a dicho tipo de dietas

(Nascimento y cols., 2010). Otros transportadores de glucosa como el GLUT1 han sido descritos en condiciones diferentes a las de malnutrición. Este transportador se ve aumentado en procesos cancerígenos debido a la alta demanda energética y de glucosa de las células cancerígenas. Por otro lado también ha sido descrito como un mediador en la glucotoxicidad y estrés oxidativo en el hígado, en conjunto con la óxido nítrico sintasa (Sokolovska y cols., 2015). A pesar de esto hay escasa información de las repercusiones de la ingesta de dietas ricas en glucosa sobre la expresión de estos transportadores, en particular GLUT1 hepático.

3.1 Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto del consumo de sacarosa en ratas macho durante las etapas prenatal y posnatal, sobre la expresión del Transportador de Glucosa 1 (GLUT1) y marcadores de estrés oxidativo en el hígado?

4. Hipótesis

La expresión de GLUT1 e indicadores de estrés oxidante aumentan en el hígado de ratas macho que consumieron agua con sacarosa durante las etapas prenatal y posnatal.

5. Objetivo

5.1 General

Evaluar la expresión de GLUT1 así como algunos indicadores de estrés oxidante en las células hepáticas de ratas macho que consumieron sacarosa durante las etapas prenatal y posnatal.

5.2 Específicos

1. Cuantificar el peso de las madres durante la gestación
2. Cuantificar el peso de las crías desde su nacimiento hasta las 14 semanas de edad.
3. Identificar la localización de la expresión de GLUT1 en las células hepáticas de ratas macho que consumieron sacarosa durante las etapas prenatal y posnatal por medio de una prueba inmunohistoquímica.
4. Cuantificar la expresión de GLUT1 en las células hepáticas de ratas macho que consumieron sacarosa durante las etapas prenatal y posnatal por medio de Western Blot.
5. Cuantificar la enzima superóxido dismutasa (SOD) en el hígado de ratas macho que consumieron sacarosa durante las etapas prenatal y posnatal con método espectrofotométrico.
6. Cuantificar la cantidad de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el hígado de ratas macho que consumieron sacarosa durante las etapas prenatal y posnatal con método espectrofotométrico.
7. Cuantificar la expresión de la enzima catalasa (CAT) en el hígado de ratas macho que consumieron sacarosa durante las etapas prenatal y posnatal con método espectrofotométrico.
8. Cuantificar la expresión de la enzima glutatión en el hígado de ratas macho que consumieron sacarosa durante las etapas prenatal y posnatal con método espectrofotométrico.

6. Metodología

6.1 Diseño

Se trata de un diseño de tipo cuantitativo y longitudinal.

6.2 Ubicación espacio temporal.

El proceso experimental se llevó a cabo en el laboratorio de nutrición y metabolismo del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta en periodo comprendido entre Agosto de 2022 y Agosto de 2024. A la par los datos fueron analizados en este mismo periodo.

6.3 Grupos experimentales

6.3.1 Grupo experimental madres

Las ratas hembras fueron apareadas con machos expertos. El día del apareamiento se consideró el día 0 (cero) de gestación. A partir del día uno se midió todos los días el consumo de agua, alimento y el peso corporal. Se asignó aleatoriamente a las ratas en los diferentes grupos:

- Grupo control (MS, madre simple), ratas alimentadas con una dieta Chow 5001 de Purina y agua simple de manera *ad libitum* durante la gestación y lactancia.
- Grupo con tratamiento (MA, madre azúcar), ratas alimentadas con una dieta Chow 5001 de Purina y agua azucarada al 5% (5 g en 100 mL de agua) de manera *ad libitum* durante la gestación y lactancia.

6.3.2 Grupos experimentales de las crías

Después del parto, las camadas se ajustaron a diez crías para estandarizar las demandas alimenticias durante la lactancia. El destete se realizó el día veintidós de lactancia y se asignaron los machos aleatoriamente a los grupos experimentales correspondientes. Se formaron cuatro grupos en total: dos procedentes de las madres que tomaron agua simple durante la gestación y lactancia, un grupo consumió agua simple (MS-CS, Madre Simple-Cría

Simple) y el otro agua con sacarosa al 5% (MS-CA, Madre Simple-Cría Azúcar). De igual manera, dos grupos de las madres que consumieron agua azucarada durante la gestación y lactancia, un grupo con agua simple (MA-CS, Madre Azúcar-Cría Simple) y otro grupo con agua azucarada al 5% (MA-CA, Madre Azúcar-Cría Azúcar).

6.4 Diseño experimental

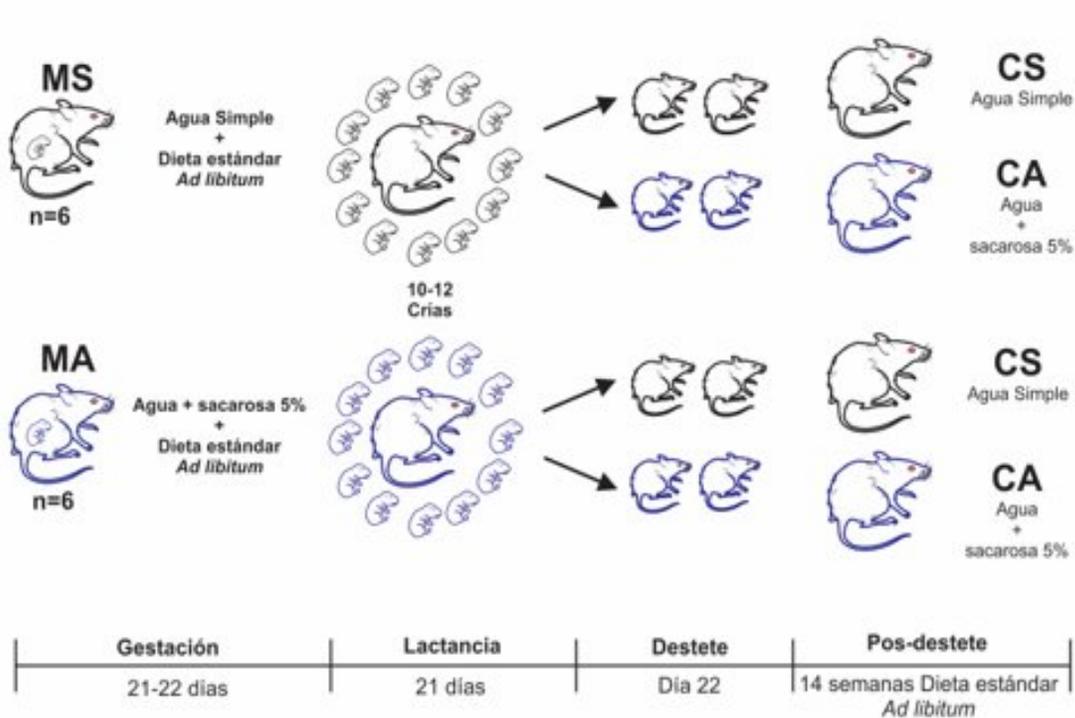


Fig 3. Diseño experimental (Dávila-Santacruz, 2023)

6.5 Obtención del órgano

Al cumplir los 121 días de vida se procede con la eutanasia por decapitación. El hígado fue obtenido, pesado y cortado. Se obtuvieron cortes de aproximadamente 5x5 mm del lóbulo lateral izquierdo (lóbulo más grande) para inclusión en parafina. El resto del hígado fue congelado a -80 °C (Western Blot).

6.6 Inclusión y cortes del hígado

El corte procedente del lóbulo lateral izquierdo fue deshidratado con alcoholes de concentraciones 60 – 100 % y Xilol. Una vez deshidratado fue incluido en paraplast X-tra de la marca Sigma-Aldrich.

Posteriormente se realizaron cortes longitudinales de 5 micrómetros en micrótomo de la marca Leica, los cuales fueron recolectados en laminillas para posteriormente dejar secar.

6.7 Inmunohistoquímica

Se realizó el protocolo para la estandarización de la prueba inmunohistoquímica, en las que se utilizó una solución de citrato de sodio para la incubación. Posteriormente lavados con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), agua oxigenada al 3%, y un bloqueo inespecífico con suelo normal de conejo.

Inmediatamente después se realizaron lavados con PBS/0.3% Tritón X100. El anticuerpo empleado fue Anti-Glucose Transporter GLUT1 antibody (EPR3915) diluido en PBS/Tritón X100, a una concentración de 1:50. Para el anticuerpo secundario fue utilizado un anti ratón desarrollado en conejo diluido en PBS/0.3% Tritón X100, a una concentración de 1:250.

Por último, para el marcaje se utilizó un revelado con el complejo enzimático Avidina-Biotica (Kit Vextastain ABC), además de diaminobencidina como sustrato.

6.8 Western Blot

Para la detección de GLUT1 por la técnica de Western Blot fueron empleados los hígados congelados. Geles de poliacrilamida para la separación por electroforesis de 75 microgramos de proteínas totales. El anticuerpo empleado fue Anti-Glucose Transporter GLUT1 antibody (EPR3915) en una concentración de 1:5000. Como anticuerpo secundario se utilizó anti ratón desarrollado en conejo a concentraciones de 1:2500. Las bandas resultantes inmunoreactivas se revelaron con el kit Super Signal West Pico, Pierce. Posteriormente, las imágenes fueron procesadas con el software Image Lab, Biorad. Los resultados fueron reportados como unidades arbitrarias (U.A).

6.9 Estrés oxidante

Los hígados congelados también fueron empleados para la medición de estrés oxidante. En el caso de las TBARS se utilizó ácido tiobarbitúrico + ácido malondialdehído. La reacción fue medida a 532 nm.

Para la detección de la actividad de la súper oxido dismutasa (SOD) se utilizó la reacción con Nitro Azul Tetrazolio (NBT). Las lecturas fueron tomadas a 560 nm.

Por su parte, en la determinación de catalasa (CAT), fue empleada la detección con peróxido de hidrógeno H_2O_2 , la lectura fue tomada a 240 nm.

Por último, la actividad de glutatión fue medida a partir de de la oxidación de NAPDH, la lectura fue tomada a 340 nm.

6.10 Diseño estadístico.

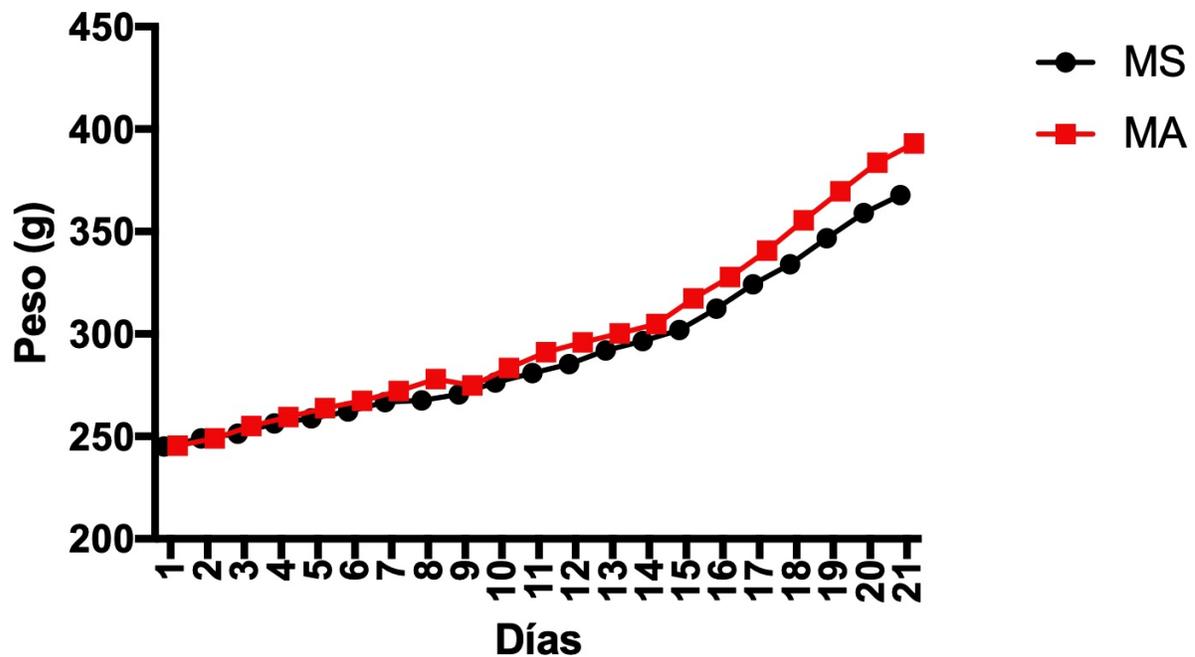
Los datos fueron analizados en el programa estadístico GraphPad Prism7. Las comparaciones en el peso de las madres fueron analizadas por una prueba t-student, mientras que los pesos de las crías por una prueba de varianza de dos vías (ANOVA). En el caso de la expresión de GLUT1 y las pruebas de estrés oxidativo también fueron analizadas por una prueba de varianza de dos vías. Se realizó la prueba post hoc de comparación múltiple de Bonferroni. Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de $p \leq 0.05$.

7. Resultados

7.1 Peso

7.1.1 Comportamiento de peso de las madres

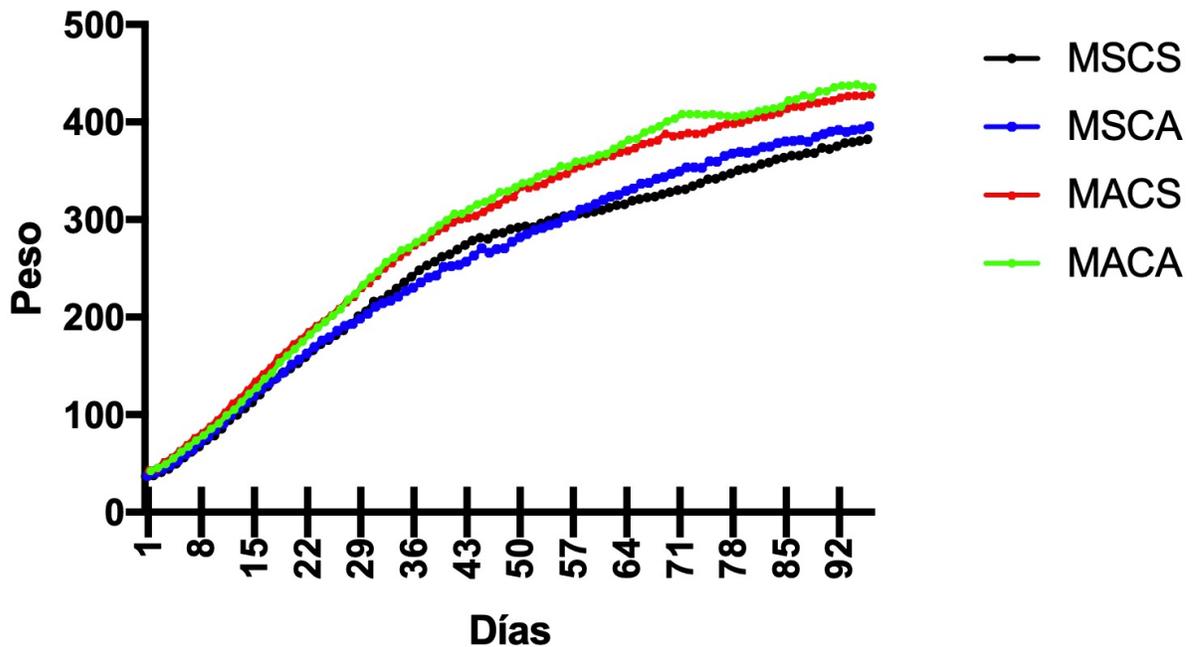
En la gráfica 1 se muestra el periodo gestacional de 21 días, en el que se analizó el comportamiento del peso corporal de las madres. El grupo de Madre Simple (290.8 ± 8.106 g) que consumió agua simple, y Madre Azúcar (301.4 ± 9.778 g) que consumió agua con sacarosa al 5%, no muestran diferencia entre sí ($P=0.4089$).



Gráfica 1. Peso de ratas hembras durante 21 días de gestación. Se muestra el comportamiento del peso durante el periodo mencionado de los dos grupos, MS (n=6) y MA (n=6). El análisis estadístico se realizó a través de la prueba t de student.

7.1.2 Comportamiento de peso de las crías

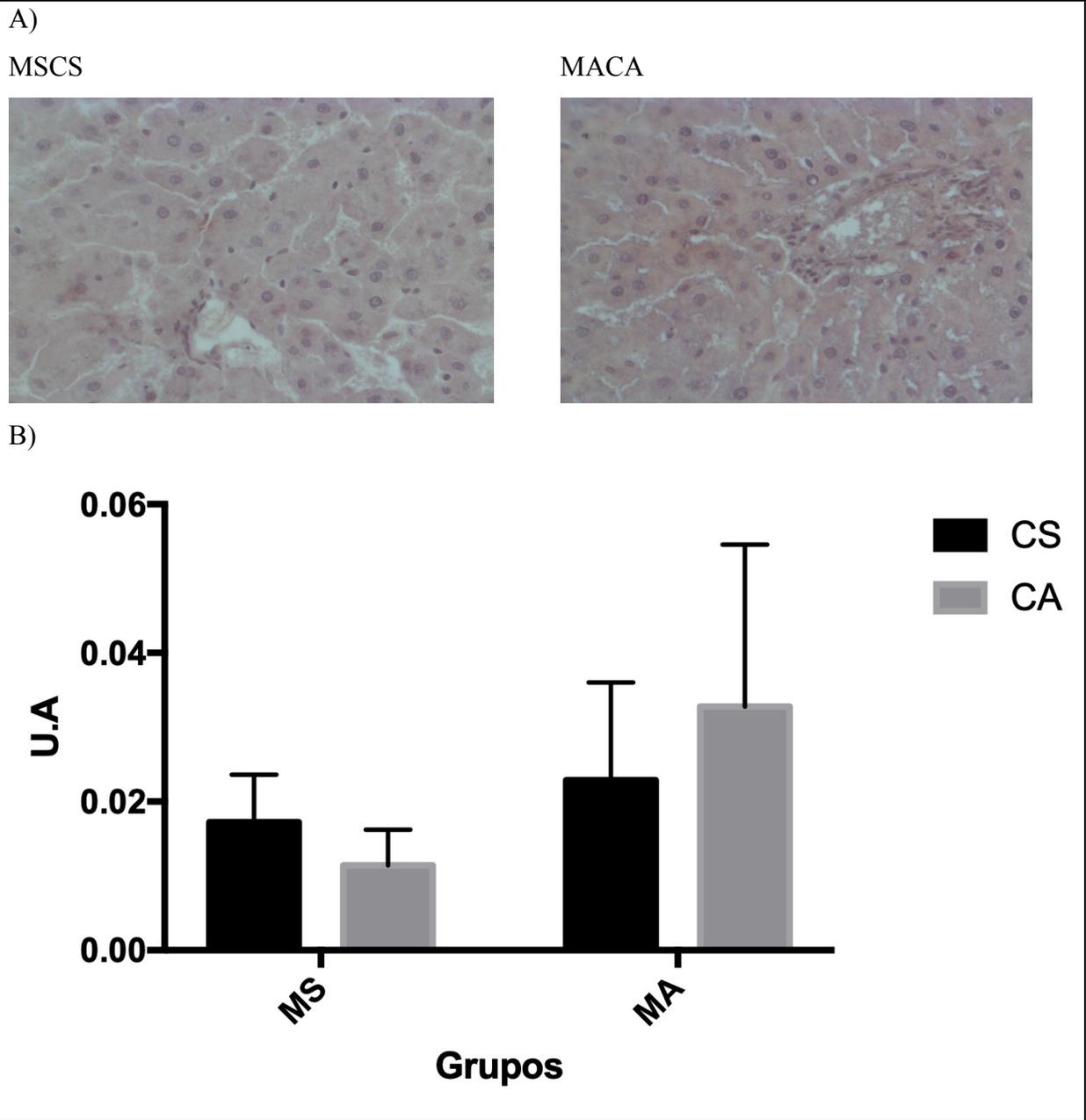
El peso de las crías fue analizado desde el inicio del tratamiento, en la gráfica 2, que coincide con el destete hasta el día 121. Al respecto, existe una diferencia entre el grupo control MSCS ($257.6 \pm 33.05\text{g}$) vs MACS ($295.3 \pm 47.32\text{g}$) ($****P=0.0001$) de 37.73g y MACA ($300.7 \pm 47.32\text{g}$) con 43.11g ($****P=0.0001$). Estas diferencias son similares cuando se comparan los grupos MSCA ($262.5\text{g} \pm 47.32$) vs MACS ($****P=0.0001$) con 32.82g y MACA ($****P=0.0001$) con 38.2g . De la misma forma existe una pequeña diferencia de 5.385g entre los grupos MACS vs MACA ($*P=0.0358$). Estas diferencias estadísticas no ocurren cuando se comparan los grupos MSCS vs MSCA ($P=0.0729$).



Grafica 2. Peso de las crías. Se observa el comportamiento del peso desde el destete hasta el cumplimiento de 14 semanas de edad de los grupos MSCS (n=6), MSCA (n=6), MACS (n=6) y MACA (n=6). con diferencias en el factor prenatal ($****P=0.0001$) y posnatal ($****P=0.0001$), lo cual otorga una interacción que no es significativa ($P=0.9999$). Se observa la media comparativa de los grupos. ANOVA 2 VÍAS, pos hoc Bonferroni.

7.2 Inmunolocalización y cuantificación de GLUT1

Por un lado se observa en la figura 3A la inmunolocalización de la proteína GLUT1 en el parénquima del hepático de dos grupos, MSCS (n=1) y MACA (n=1), sin un patrón aparente de expresión. Por el otro, en la figura 3B, se observa a expresión del transportador de glucosa 1 hepático, la cual es homogénea y similar cuando se comparan los grupos MSCS (0.0172 ± 0.006 U.A) y MSCA (0.0114 ± 0.005 U.A) ($P=0.9999$) y sin diferencias entre el grupo control vs MACS (0.0228 ± 0.013 U.A) ($P=0.9999$) y MACA (0.0327 ± 0.022 U.A) ($P=0.3423$). Por su parte, cuando se comparan los grupos MSCA vs MACS ($P=0.9151$) y MACA ($P=0.0706$) tampoco existen diferencias estadísticas. Por último, al compararse los grupos procedentes de madres expuestas a sacarosa al 5%, es decir, MACS vs MACA ($P=0.9999$), tampoco se muestran diferencias.

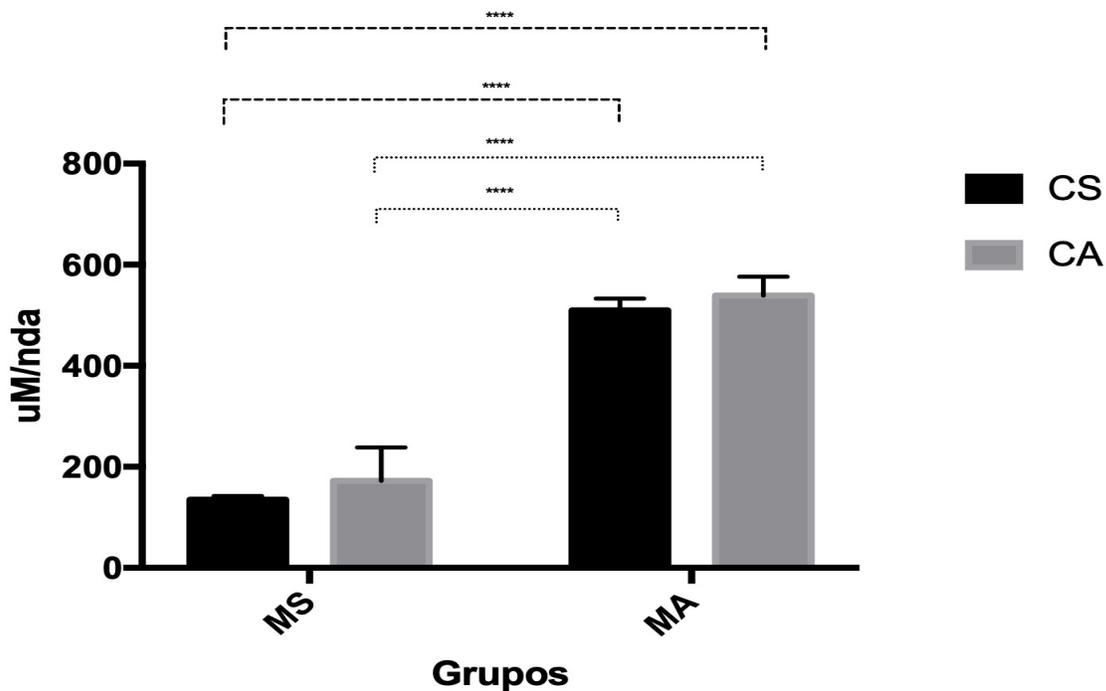


Gráfica 3. Expresión de GLUT1 en las células hepáticas de los cuatro grupos. (A) Se muestra la localización inmunológica de GLUT1 en el parénquima hepático de dos grupos, MSCS (n=1) y MACA (n=1) contrateñida con hematoxilina de Meyer. 40x. B) Se muestran las medias y desviación estándar de los grupos MSCS (n=6), MSCA (n=6), MACS (n=6) y MACA (n=6). El factor prenatal muestra diferencias (P=0.0222) , contrario al factor posnatal (P=0.7108) la interacción de ambos factores no muestra diferencias (P=0.1652). Anova 2 de dos vías y pos hoc de Bonferroni

7.3. Estrés oxidativo.

7.3.1 Ácido malondialdehído (TBARS)

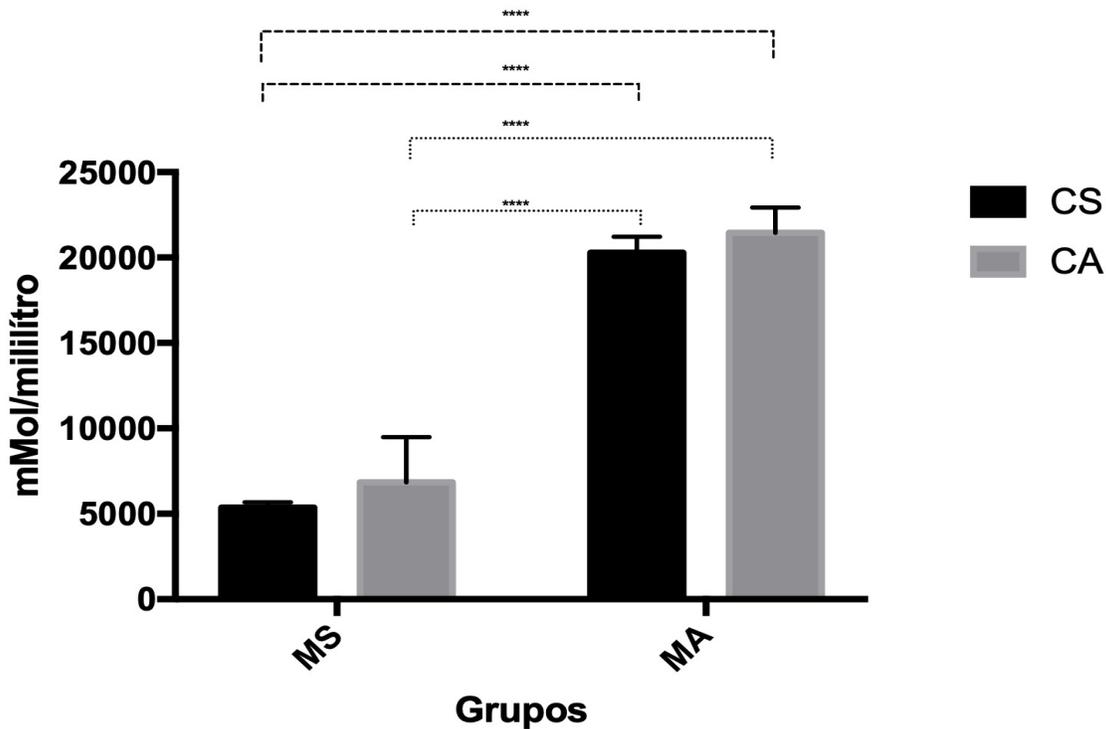
La medición de estrés oxidativo se realizó a través de la reacción del ácido malondialdehído (MDA) y el ácido tiobarbitúrico, evidenciado en la gráfica 4. La comparativa de los grupos MSCS (134.990 ± 7.525 uM/nda) y MSCA (172.198 ± 66.116 uM/nda) ($P=0.9583$) muestra una apariencia homogénea, sin cambios y sin diferencias. Sin embargo, al compararse los grupos MSCS vs MACS (509.464 ± 23.610 uM/nda) ($P=****0.0001$) y MACA (539.022 ± 37.163 uM/nda) ($****P=0.0001$) sí existen diferencias con relevancia estadística. Lo mismo ocurre entre los grupos MSCA vs MACS ($****P=0.0001$) y MACA ($****P=0.0001$). En el caso de la comparativa entre los grupos MACS vs MACA no existen diferencias ($P=0.9999$)



Gráfica 4. Cuantificación de MDA. Se muestra la media y desviación estándar de los cuatro grupos MSCS (n=5), MSCA (n=5), MACS (n=5) y MACA (n=5). Se observan diferencias en el factor prenatal ($****p=0.0001$), no así en el factor posnatal ($P=0.0797$) y sin interacción de ambos factores ($P=0.8330$). Anova de 2 vías y pos hoc de Bonferroni.

7.2.2 Glutación

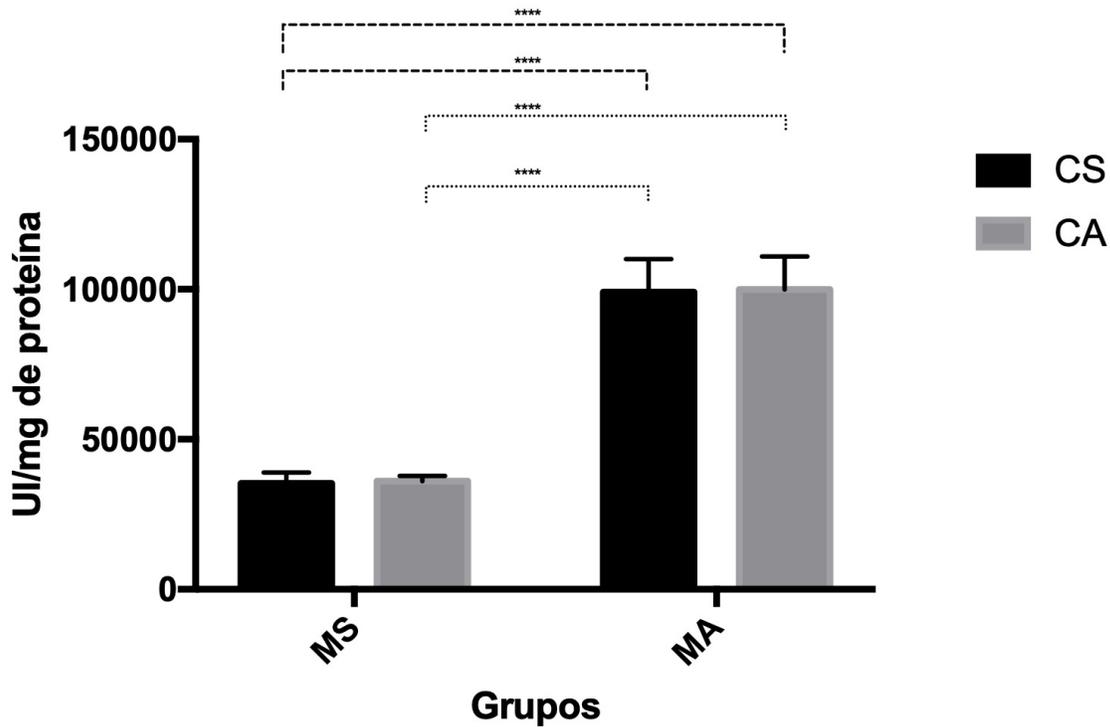
Se midió la expresión del tripérido glutación hepático evidenciada en la gráfica 5. Los resultados de los grupos MSCS (5371.190 ± 299.297 mMol/mililitro) y MSCA (6851.896 ± 2630.800 mMol/mililitro) son similares ($p=0.9580$), indicando una aparente homogeneidad en la respuesta de glutación en estas condiciones. En el caso de la comparativa de los grupos MSCS vs MACS (20271.870 ± 939.508 mMol/mililitro) ($****P=0.0001$) y MACA (21447.954 ± 1478.707 mMol/mililitro) ($****P=0.0001$) expresan una cantidad significativamente mayor. Por su parte, al contrastar los grupos MSCA vs MACS ($****P=0.0001$) y MACA ($****P=0.0001$) también podemos apreciar estas diferencias. Los grupos MACS vs MACA no muestran diferencias ($P=0.9999$).



Gráfica 5. Expresión de Glutacion hepático. Se muestra la media y desviación estándar de los cuatro grupos MSCS (n=5), MSCA (n=5), MACS (n=5) y MACA (n=5). Hay diferencias en el factor prenatal ($****p=0.0001$) las cuales no existen en el factor posnatal ($P=0.0797$), la interacción entre ambos factores tampoco es significativa ($P=0.8328$). Anova de 2 vías y pos hoc de Bonferroni.

7.2.3 SOD

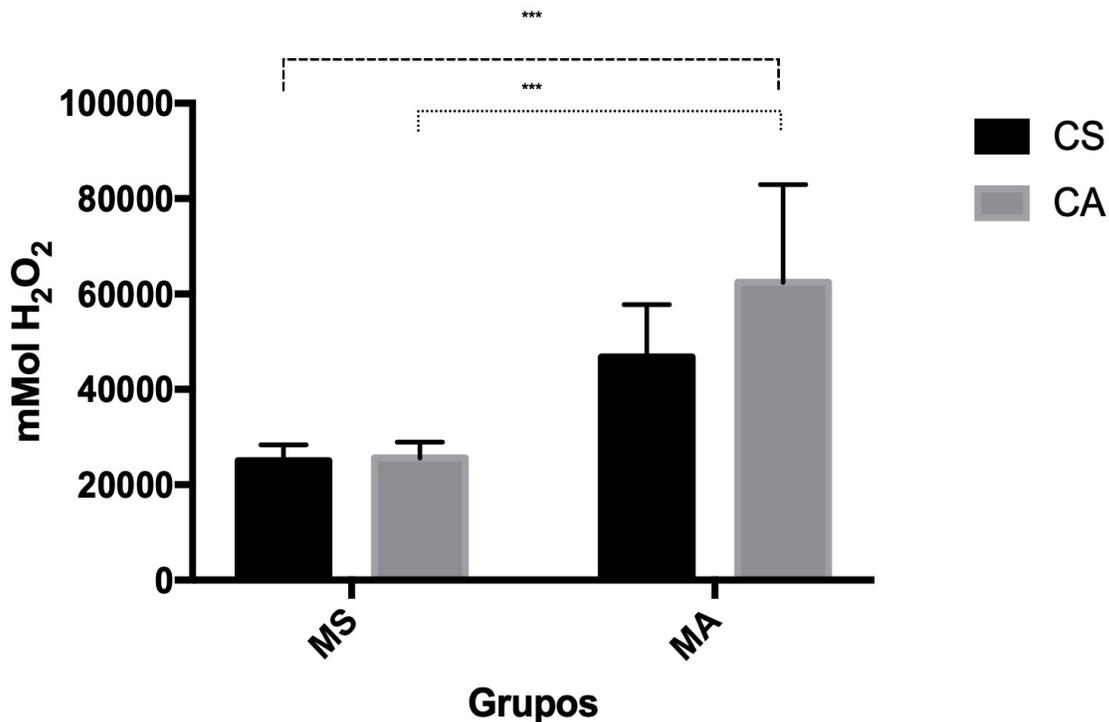
Por su parte, la expresión de la enzima superóxido dismutasa hepática en la gráfica 6 mostró uniformidad sin diferencias en los grupos MSCS (35322.739 ± 3578.570 UI/mg de proteína) y MSCA (36073.410 ± 1701.698 UI/mg de proteína) ($P=0.9999$). En contraste los grupos MSCS vs MACS (99018.354 ± 10998.450 UI/mg de proteína) ($****P=0.0001$) y MACA (99915.722 ± 10979.309 UI/mg de proteína) ($****P=0.0001$) tienden a una mayor expresión en respuesta al estímulo. Al igual que en casos anteriores hay diferencias significativas entre los grupos MSCA contra MACS ($****P=0.0001$) y MACA ($****P=0.0001$) ya que estos últimos expresan una mayor cantidad de enzima SOD, mientras que los grupos MACS y MACA no existe esta diferencia ($P=0.9999$).



Gráfica 6. Expresión de la enzima SOD hepática. Se muestra la media y desviación estándar de los cuatro grupos (MSCS (n=5), MSCA (n=5), MACS (n=5) y MACA (n=5)). Hay diferencias en el factor prenatal ($****P=0.0001$), aunque no lo hay en el factor posnatal ($P=0.8212$) ni en la interacción de ambos factores ($P=0.9839$). Anova de 2 vías y pos hoc de Bonferroni.

7.2.4 CAT

La expresión de catalasa en la gráfica 7, muestra que no hay diferencias significativas en los grupos MSCS (25032.506 ± 3319.679 mMol H_2O_2) vs MSCA (25583.880 ± 3383.083 mMol H_2O_2) ($P=0.9999$) al igual que con el grupo MACS (46756.774 ± 11034.691 mMol H_2O_2) ($P=0.0638$). Por su parte, MSCS vs MACA (62431.604 ± 20500.224 mMol H_2O_2) ($***P=0.0008$) si muestra diferencia, lo que evidencia una mayor propensión a la expresión de CAT en respuesta al tratamiento. Al contrastar los grupos MSCA vs MACS ($P=0.0742$) no observamos diferencias representativas. Contrario a esto, al comparar MSCA y MACA ($***P=0.0010$) si podemos observar una mayor expresión con relevancia estadística. Esto no ocurre al contrastar a los grupos MACS vs MACA ($P=0.3199$).



Gráfica 7. Expresión de CAT hepática. Se muestra la media y desviación estándar de los cuatro grupos MSCS (n=5), MSCA (n=5), MACS (n=5) y MACA (n=5). donde existe diferencias en el factor prenatal ($****p=0.0001$) pero no el factor posnatal ($P=0.1463$) al igual que en la interacción de ambos factores ($P=0.1738$). Anova de 2 vías y pos hoc de Bonferroni.

9. Discusión

Los resultados de este trabajo se ubican en el marco de la respuesta a la salud y enfermedad producida en las etapas tempranas del desarrollo, conocida como teoría de Barker. Esta teoría, también llamada programación fetal, sugiere que existen momentos críticos en el desarrollo de los individuos, como la gestación, que afectan directamente a la salud del individuo durante su infancia, el transcurso de su vida adulta o la vejez (Fleming y cols., 2018; Barker y cols., 2018). Existe una amplia variedad de estímulos que consiguen ser significativos en esta programación fetal, por ejemplo, el estrés, la actividad física o la alimentación (Block y El-Osta, 2017). Esta última es particularmente importante, ya que la nutrición materna durante la gestación resulta ser la primera aproximación de nutrientes a los órganos de la prole como músculo, cerebro o hígado, los cuales tienen una alta tasa metabólica (Barker y cols., 2018; Block y El-Osta, 2017).

En este sentido el hígado es un órgano tremendamente sensible a la administración de nutrientes y los cambios que puedan existir en la dieta, no sólo en etapas intrauterinas, también durante las siguientes etapas de la vida (Nicolás-Toledo et al., 2017). Es decir que la composición dietética, desde la ingesta calórica hasta la cantidad y calidad de los nutrientes consumidos repercute y genera cambios epigenéticos en el hígado (Nicolás-Toledo y cols., 2017). Algunos estudios establecen una relación entre la restricción calórica y cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa o los lípidos, lo cual puede traducirse en una predisposición a enfermedades metabólicas (Eng y Estall, 2021). Otros sugieren que las dietas ricas en grasa durante la gestación y lactancia pueden generar cambios en la expresión de genes del metabolismo de los lípidos provocando una mayor susceptibilidad a enfermedades tales como hígado graso no alcohólico (Block y El-Osta, 2017; Eng y Estall, 2021).

En algunos trabajos en ratas se ha establecido que las condiciones dietéticas durante la

gestación no generan repercusiones en variables como el peso de madres (Córdoba-Sosa y cols., 2022), lo cual coincide con nuestra investigación, ya que este indicador permanece constante y no hay diferencias que puedan ser consideradas significativas entre los grupos MS y MA. Con las crías ocurre el caso contrario, ya que existen diferencias que pueden ser consideradas significativas y exponenciales entre más habitual sea el estímulo (Córdoba-Sosa y cols., 2022). Estas diferencias acentuadas han sido descritas en otros trabajos, donde el consumo de sacarosa, y en particular de bebidas azucaradas, ha sido relacionado con el aumento de peso corporal (Havel y cols., 2018; Jackson y cols., 2011). La ganancia de peso exponencial en los animales puede deberse a un desequilibrio en los mecanismos de retroalimentación que regulan el apetito, el metabolismo y la ingesta de alimentos que aseguran un equilibrio entre el consumo y el gasto energético (Farías y cols., 2011). Es decir, que hay una falla en el “set point” o, dicho de otra forma, en la capacidad que tienen los mamíferos, no sólo las ratas, de modular la ingesta de alimentos de acuerdo a sus necesidades nutricionales (Farías y cols., 2011).

En esta investigación también se evaluó la expresión del transportador de glucosa tipo 1 en las crías a partir de la prueba de Western Blot, una proteína transportadora ligada a un metabolismo anormal de la glucosa y a la aparición de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el hígado (Chadt y Al-Hasani, 2020b). Al respecto, los datos obtenidos de la estandarización de la prueba inmunohistoquímica muestran una expresión heterogénea de esta proteína en el parénquima hepático, ya que no hay un patrón específico. De la misma forma los resultados indican una baja cantidad de expresión de esta proteína en todos los grupos que comparten un patrón heterogéneo de expresión, sin embargo los análisis estadísticos no revelan diferencias. Es decir que el estímulo por sí solo en la vida adulta, representado por el grupo MSCA, no genera cambios en la expresión de esta proteína. En el caso de los grupos que recibieron el estímulo de agua con azúcar desde las etapas prenatales, MACS y MACA, hay una mayor expresión de esta proteína, aunque no suficiente para considerar la existencia de diferencias con relevancia estadística.

En este sentido, la baja expresión de GLUT1 en todos los grupos coincide con la mayoría de

trabajos en los que se ha evaluado su presencia, ya que su concentración en condiciones basales suele considerarse muy baja e incluso nula (Thorens, 1996; Chen y cols., 2015; Koch y Weber, 2019). Algunos trabajos, sobre todo los primeros, estipulan que la aparición de esta proteína está delimitada a un área específica que abarca a las primeras células de la vena central del lobulillo hepático (Rhoads, 1994; Tal y cols., 1990). Por ello, el propósito fundamental de esta investigación fue localizar el área de expresión de esta proteína, esta es la razón de emplear únicamente dos condiciones. Nuestro trabajo sugiere que en condiciones basales y con un estímulo directo sobre la descendencia y vida adulta, la proteína fue expresada de forma mínima por hepatocitos aleatorios a lo largo del lobulillo en ambas condiciones analizadas. Este patrón, con una mínima cantidad de GLUT1, ha sido más recientemente evidenciado (Lei y cols., 2019). Es decir que este trabajo revela que la mayoría de hepatocitos del parénquima tiene la capacidad de expresar a GLUT1 en muy bajas concentraciones, lo que anteriormente estaba relegado a células inmediatas a la vena central del lobulillo (Tal y cols., 1990).

Además, el estímulo prenatal genera cambios en la cantidad de proteína expresada, aunque estos cambios no son suficientes para sugerir que ocurran modificaciones epigenéticas a nivel hepático en la expresión de esta proteína, y por lo tanto las consecuencias patológicas asociadas al transporte anormal de glucosa relacionadas con esta, tales como glucotoxicidad (Chadt y Al-Hasani, 2020b; Sokolovska J. y cols., 2015). Estas concentraciones permanecen similares seguramente debido a una serie de adaptaciones metabólicas consideradas dentro de la plasticidad epigenética, que permiten al individuo prepararse para un ambiente extrauterino similar al intrauterino (Flavahan, 2020).

A la par de la medición de GLUT1, se realizaron pruebas para evaluar algunos marcadores de estrés metabólico ligados a un metabolismo anormal de glucosa y a la glucotoxicidad. Los datos resultan interesantes debido a la relación que existe entre el consumo de azúcares simples y el incremento de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno incapaces de ser neutralizadas por el cuerpo (Ling-Tan y cols., 2018). Al respecto, fueron evaluadas las sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico, la cantidad de enzima catalasa, la enzima

superóxido dismutasa y la enzima glutatión. Los resultados de estos indicadores son homogéneos en casi todas las pruebas. Es decir que las concentraciones en los grupos MSCS y MSCA son muy parecidas, lo que indica que la dieta, en el caso particular del consumo de agua azucarada durante la etapa adulta, no es suficiente para incrementar cantidad de especies reactivas que generen estrés oxidativo. Por otra parte, los grupos MACS y MACA también muestran similitud entre ellos que no comparten con los dos grupos anteriores. Al respecto, se puede ver un incremento del estrés oxidativo, lo cual sugiere que durante la gestación y/o lactancia la dieta materna es capaz de activar genes que promueven una mayor cantidad de radicales libres y una menor capacidad para neutralizarlos.

El aumento de indicadores de estrés oxidativo ha estado asociado tradicionalmente a condiciones dietéticas particulares y en concreto a casos extremos tales como hiperglicemia (Luc y cols., 2019). De la misma forma otros mecanismos dietéticos sugieren que el consumo anormal de nutrientes, como dietas ricas en grasas o carbohidratos, siendo este último el pilar de nuestra investigación, también son capaces de activar rutas que promueven el estrés oxidativo (Ling-Tan y cols., 2018). Sin embargo para el caso de este trabajo la concentración de sacarosa al cinco % adicionada al agua de los animales no supone un reto para el desbalance entre la creación de ERO y la capacidad de los animales a neutralizarlas. A pesar de esto las crías sí muestran una respuesta a las condiciones dietéticas de la madre que no responde a su alimentación en la etapa adulta, lo cual respalda la teoría de la programación fetal (Thompson y Al-Hasan, 2012). Otros trabajos han mostrado una relación epigenética con la aparición de EROS y ON en tejidos como el corazón e hígado (Giussani y cols., 2012; Sokolovska J. y cols., 2015) e incluso una relación terapéutica entre antioxidantes y salud cardiovascular (Cambonie y cols., 2007). Desde la perspectiva dietética algunos trabajos basados en dietas altas en grasa han demostrado estrés oxidante en las crías (Ito y cols., 2016; Yan y cols., 2020). Sin embargo, hasta ahora esta investigación representa una de las primeras aproximaciones a las repercusiones dietéticas con sacarosa presente en el agua de los animales con resultados positivos, en las que se analiza el estrés oxidante en la descendencia.

En resumen, si bien la dieta de los individuos en nuestro modelo durante su adultez, puede

causar glucotoxicidad y en consecuencia mayor estrés oxidativo, no genera cambios suficientes para considerarse significativos en ninguno de los parámetros que fueron medidos (expresión de GLUT1 y marcadores de estrés oxidante). Por el contrario, la dieta materna repercute directamente sobre la descendencia en la cantidad de ERO, ya sea en la cantidad de productos o la incapacidad de ser neutralizadas. Además, aunque GLUT1 podría ser una pieza clave en el desarrollo de glucotoxicidad causada por la dieta y la consecuente generación de estrés, los resultados sugieren que no existe una relación directa entre estos. Es decir, que la glucotoxicidad puede estar mediada por otras moléculas de transporte como SWEETS o diversas variedades de las propias proteínas GLUT, como la dos, cinco y ocho.

8. Conclusiones

El consumo de sacarosa durante la gestación no modifica el peso corporal de las ratas gestantes.

El consumo de sacarosa durante la etapa prenatal (gestación y lactancia) modifica el peso corporal en la descendencia. Así mismo el consumo de sacarosa durante la etapa posnatal incrementa el peso corporal en la descendencia. La combinación de ambos factores potencia esta ganancia de peso.

La proteína transportadora de glucosa tipo 1 (GLUT1) fue expresada por hepatocitos aleatorios del parénquima celular. En ambas condiciones la estandarización de la técnica no releva que el factor prenatal o posnatal intervengan en las células que son capaces de expresarla.

La proteína transportadora de glucosa tipo 1 (GLUT1) no sufre cambios significativos en su expresión por la adición de sacarosa en la dieta prenatal y posnatal. Esta proteína muestra un patrón heterogéneo de expresión en el parénquima hepático y no se limita a un área o patrón específico.

En el caso de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), el consumo de sacarosa durante la vida adulta no altera su expresión, mientras que el consumo de sacarosa durante las etapas prenatales sí lo hace.

La enzima glutatión tampoco sufre cambios con el consumo de sacarosa durante las etapas posnatales, caso contrario cuando el consumo ocurre en etapas prenatales, ya que este aumenta su expresión.

La enzima súper oxido dismutasa (SOD) aumenta su expresión en las crías expuestas a sacarosa durante las etapas prenatales. Sin embargo, la adición de sacarosa en la vida adulta no potencia ni genera cambios en la expresión.

Por último, la enzima catalasa (CAT) no modifica su expresión por el consumo de sacarosa durante la etapa adulta. Sin embargo, el consumo de sacarosa durante las etapas prenatales sí la incrementa.

9. Perspectivas

Este trabajo analiza la expresión del transportador de glucosa tipo uno y marcadores de estrés oxidante. En el primer caso, los análisis estadísticos nos muestra que no existen diferencias en la expresión, lo que demuestra la ausencia de modificaciones epigenéticas a partir de la adición de sacarosa en el agua de los animales. En segundo caso, los marcadores inflamatorios que fueron analizados sí muestran diferencias, confirmando la activación de mecanismos pro oxidantes a partir de la dieta de las madres. Esto es sin duda, sumamente interesante a la hora de plantear intervenciones nutricionales, incluso desde la gestación, con el fin de garantizar la salud de la descendencia. Además, estos resultados da pie a un mayor número de investigaciones basadas principalmente los mecanismos adyacentes al estrés oxidante visto en este trabajo.

Como en todas las investigaciones, existen limitaciones que pueden intervenir en los resultados. En este trabajo hay cuatro limitaciones identificadas. La primera de ellas es el tiempo de exposición de los animales al estímulo. La segunda es el momento en el que se tomó la muestra de tejido. La tercera se trata de las células hepáticas que fueron estudiadas. Por último la posibilidad de estudiar otras proteínas transportadoras.

Futuras exploraciones en el mismo campo podrían tener mayores aproximaciones a las limitaciones planteadas en este trabajo. Es decir, el tiempo de exposición podría verse aumentado o disminuido ya sea en una etapas prenatales o posnatales. Así mismo, la muestra podría ser tomada en momentos distintos a los 121 días, por ejemplo de un recién nacido o durante la infancia de los animales. De la misma forma, podrían estudiarse otras células que conforman al hígado que pudieran estar relacionadas con los procesos inflamatorios, como las células estrella o los linfocitos. Por último, existe la posibilidad de tener modificaciones en otras proteínas transportadoras de glucosa que el hígado es capaz de expresar. Proteínas ligadas de la misma forma a un metabolismo anormal de la glucosa o condiciones patológicas específicas.

Por último, los hallazgos obtenidos en este trabajo aportan una base para futuras investigaciones biomédicas y epigenéticas, lo que podría traer consigo una mejor comprensión de enfermedades contemporáneas y sus mecanismos adyacentes. Esto significa más y mejores aproximaciones clínicas que abarcan desde estrategias nutricionales prenatales hasta intervenciones en la vida adulta.

10. Referencias

1. Saladin, K. (2020). *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function* (9.^a ed.). McGraw Hill.
2. Kur, P., Kolasa-Wołoskiuk, A., Grabowska, M., Kram, A., Tarnowski, M., Baranowska-Bosiacka, I., Rzeszotek, S., Piasecka, M. & Wiszniewska, B. (2021). The Postnatal Offspring of Finasteride-Treated Male Rats Shows Hyperglycaemia, Elevated Hepatic Glycogen Storage and Altered GLUT2, IR, and AR Expression in the Liver. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1242. <https://doi.org/10.3390/ijms22031242>
3. Nordlie, R. C., Foster, J. D. & Lange, A. J. (1999). REGULATION OF GLUCOSE PRODUCTION BY THE LIVER. *Annual Review of Nutrition*, 19(1), 379-406. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.19.1.379>
4. Möller Bredo, R. & Vazquez Odo, N. (2011). Anatomía del Hígado de la Rata Wistar (*Rattus norvegicus*). *International Journal of Morphology*, 29(1), 76-79. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022011000100012>
5. Malik, V. S., Schulze, M. B. & Hu, F. B. (2006). Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(2), 274-288. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.2.274>
6. Imamura, F., O'Connor, L., Ye, Z., Mursu, J., Hayashino, Y., Bhupathiraju, S. N. & Forouhi, N. G. (2015). Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. *BMJ*, h3576. <https://doi.org/10.1136/bmj.h3576>
7. Chadt, A. & Al-Hasani, H. (2020). Glucose transporters in adipose tissue, liver, and

skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 472(9), 1273-1298. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02417-x>

8. Kur, P., Kolasa-Wołoskiuk, A., Grabowska, M., Kram, A., Tarnowski, M., Baranowska-Bosiacka, I., Rzeszotek, S., Piasecka, M. & Wiszniewska, B. (2021b). The Postnatal Offspring of Finasteride-Treated Male Rats Shows Hyperglycaemia, Elevated Hepatic Glycogen Storage and Altered GLUT2, IR, and AR Expression in the Liver. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1242. <https://doi.org/10.3390/ijms22031242>

9. Thorens, B. (1996). Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 270(4), G541-G553. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1996.270.4.g541>

10. Chen, L. Q., Cheung, L. S., Feng, L., Tanner, W. & Frommer, W. B. (2015). Transport of Sugars. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 865-894. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033904>

11. Chadt, A. & Al-Hasani, H. (2020a). Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 472(9), 1273-1298. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02417-x>

12. Amann, T. & Hellerbrand, C. (2009). GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13(12), 1411-1427. <https://doi.org/10.1517/14728220903307509>

13. THAMRONGWARANGGOON, U., SANGKHAMANON, S., SEUBWAI, W., SARANARUK, P., CHA'ON, U. & WONGKHAM, S. (2021). Aberrant GLUT1 Expression Is Associated With Carcinogenesis and Progression of Liver Fluke-associated Cholangiocarcinoma. *In Vivo*, 35(1), 267-274. <https://doi.org/10.21873/invivo.12255>

14. Du, D., Liu, C., Qin, M., Zhang, X., Xi, T., Yuan, S., Hao, H. & Xiong, J. (2022). Metabolic dysregulation and emerging therapeutical targets for hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(2), 558-580. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.09.019>
15. Rhoads, D. B. (1994). Liver glut-1 expression: An enigma deepens. *Hepatology*, 19(2), 540-542. <https://doi.org/10.1002/hep.1840190237>
16. Tal, M., Schneider, D. L., Thorens, B. & Lodish, H. F. (1990). Restricted expression of the erythroid/brain glucose transporter isoform to perivenous hepatocytes in rats. Modulation by glucose. *Journal of Clinical Investigation*, 86(3), 986-992. <https://doi.org/10.1172/jci114801>
17. Reichetzedder, C. (2021). Overweight and obesity in pregnancy: their impact on epigenetics. *European Journal of Clinical Nutrition*, 75(12), 1710-1722. <https://doi.org/10.1038/s41430-021-00905-6>
18. Masuyama, H., Mitsui, T., Nobumoto, E. & Hiramatsu, Y. (2015). The Effects of High-Fat Diet Exposure In Utero on the Obesogenic and Diabetogenic Traits Through Epigenetic Changes in Adiponectin and Leptin Gene Expression for Multiple Generations in Female Mice. *Endocrinology*, 156(7), 2482-2491. <https://doi.org/10.1210/en.2014-2020>
19. Brumbaugh, D. E., Tearse, P., Cree-Green, M., Fenton, L. Z., Brown, M., Scherzinger, A., Reynolds, R., Alston, M., Hoffman, C., Pan, Z., Friedman, J. E. & Barbour, L. A. (2013). Intrahepatic Fat Is Increased in the Neonatal Offspring of Obese Women with Gestational Diabetes. *The Journal of Pediatrics*, 162(5), 930-936.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.11.017>
20. Tam, W. H., Ma, R. C. W., Ozaki, R., Li, A. M., Chan, M. H. M., Yuen, L. Y., Lao, T. T. H., Yang, X., Ho, C. S., Tutino, G. E. & Chan, J. C. N. (2017). In Utero Exposure to Maternal Hyperglycemia Increases Childhood Cardiometabolic Risk in Offspring. *Diabetes Care*, 40(5),

679-686.<https://doi.org/10.2337/dc16-2397>

21. Boney, C. M., Verma, A., Tucker, R. & Vohr, B. R. (2005a). Metabolic Syndrome in Childhood: Association With Birth Weight, Maternal Obesity, and Gestational Diabetes Mellitus. *Pediatrics*, 115(3), e290-e296. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1808>
22. Thompson, M. D., Derse, A., Ferey, J. L., Reid, M., Xie, Y., Christ, M., Chatterjee, D., Nguyen, C., Harasymowicz, N., Guilak, F., Moley, K. H. & Davidson, N. O. (2019). Transgenerational impact of maternal obesogenic diet on offspring bile acid homeostasis and nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 316(4), E674-E686. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00474.2018>
23. Šedová, L., Šeda, O., Kazdová, L., Chylíková, B., Hamet, P., Tremblay, J., Křen, V. & Křenová, D. (2007). Sucrose feeding during pregnancy and lactation elicits distinct metabolic response in offspring of an inbred genetic model of metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(5), E1318-E1324. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00526.2006>
24. Nascimento, F. A., Barbosa-da-Silva, S., Fernandes-Santos, C., Mandarim-de-Lacerda, C. A. & Aguilá, M. B. (2010). Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil (n-3 fatty acid rich oil). *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(1), 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.12.008>
25. McCurdy, C. E., Bishop, J. M., Williams, S. M., Grayson, B. E., Smith, M. S., Friedman, J. E. & Grove, K. L. (2009). Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/jci32661>
26. Abdel-Misih, S., & Bloomston, M. (2010). Liver Anatomy. *Surgical Clinics of North America*, 90(4), 643-653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>

27. Vdoviakova, K., Petrovova, E., Kresakova, L., Maloveska, M., Teleky, J., Jenčová, J., Živčák, J., & Jenča, A. (2016). Importance Rat Liver Morphology and Vasculature in Surgical Research. *Medical Science Monitor*, 22, 4716-4728. <https://doi.org/10.12659/msm.899129>
28. Kruepunga, N., Hakvoort, T. B. M., Hikspoors, J. P. J. M., Köhler, S. E., & Lamers, W. H. (2019). Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1865(5), 869-878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.05.019>
29. Gabriela, C., Leticia, N., Margarita, C., Nicté, X., De Lourdes, A. M., Elena, Z., Estela, C., & Jorge, R. (2022). Maternal and Offspring Sugar Consumption Increases Perigonadal Adipose Tissue Hypertrophy and Negatively Affects the Testis Histological Organization in Adult Rats. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.893099>
30. Rodríguez-Antolín, J., Santacruz, S. D., Corona-Quintanilla, D. L., Velázquez-Orozco, V., Martínez-Gómez, M., Castelán, F., Cuevas-Romero, E., & Toledo, L. M. (2022). Bulbospongiosus Muscle Frequency Activity is Modified by Sucrose Consumption During Pregnancy-lactation and Postweaning Offspring Male Rats. *Research Square (Research Square)*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1995382/v1>
31. Corona-Quintanilla, D. L., Velázquez-Orozco, V., Xicohtécatl-Rugerio, I., Lara-García, O., Cuevas, E., Martínez-Gómez, M., Toledo, L. M., & Rodríguez-Antolín, J. (2021). Sucrose exposure during gestation lactation and postweaning periods increases the pubococcygeus muscle reflex activity in adult male rats. *International Journal of Impotence Research*, 34(6), 564-572. <https://doi.org/10.1038/s41443-021-00450-7>
32. Nicolás-Toledo, L., Cervantes-Rodríguez, M., Cuevas-Romero, E., Corona-Quintanilla, D. L., Pérez-Sánchez, E., Zambrano, E., Castelán, F., & Rodríguez-Antolín, J. (2017). Hitting a triple in the non-alcoholic fatty liver disease field: sucrose intake in adulthood increases fat

content in the female but not in the male rat offspring of dams fed a gestational low-protein diet. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 9(2), 151-159. <https://doi.org/10.1017/s204017441700099x>

33. Eng, J. A., & Estall, J. L. (2021). Diet-Induced Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Food for Thought on Sugar, Fat, and Cholesterol. *Cells*, 10(7), 1805. <https://doi.org/10.3390/cells10071805>

34. Toop, C. R., & Gentili, S. (2016). Fructose Beverage Consumption Induces a Metabolic Syndrome Phenotype in the Rat: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 8(9), 577. <https://doi.org/10.3390/nu8090577>

35. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 2017 Nov 6;27(21):R1147-R1151. doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019. PMID: 29112863; PMCID: PMC5897118.

36. Witek, K., Wydra, K., & Filip, M. (2022). A High-Sugar Diet consumption, metabolism and health Impacts with a focus on the development of Substance Use Disorder: A Narrative review. *Nutrients*, 14(14), 2940. <https://doi.org/10.3390/nu14142940>

37. Mizera J, Kazek G, Niedzielska-Andres E, Pomierny-Chamiolo L. Maternal high-sugar diet results in NMDA receptors abnormalities and cognitive impairment in rat offspring. *FASEB J*. 2021 May;35(5):e21547. doi: 10.1096/fj.202002691R. PMID: 33855764.

38. Bayol SA, Farrington SJ, Stickland NC. A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br J Nutr*. 2007 Oct;98(4):843-51. doi: 10.1017/S0007114507812037. Epub 2007 Aug 15. PMID: 17697422.

39. Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP, Sulaiman Rahman H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Front Pharmacol.* 2018 Oct 16;9:1162. doi: 10.3389/fphar.2018.01162. PMID: 30405405; PMCID: PMC6204759.
40. Rodríguez-Antolín, J., Santacruz, S. D., Corona-Quintanilla, D. L., Velázquez-Orozco, V., Maíre –Gómez, M., Castelán, F., Cuevas-Romero, E., & Toledo, L. N. (2022). Bulbospongiosus muscle frequency activity is modified by sucrose consumption during pregnancy-lactation and postweaning offspring male rats. *Research Square (Research Square)*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1995382/v1>
41. Corona-Quintanilla DL, Velázquez-Orozco V, Xicohténcatl-Rugerio I, Lara-García O, Cuevas E, Martínez-Gómez M, Toledo LN, Rodríguez-Antolín J. Sucrose exposure during gestation lactation and postweaning periods increases the pubococcygeus muscle reflex activity in adult male rats. *Int J Impot Res.* 2022 Sep;34(6):564-572. doi: 10.1038/s41443-021-00450-7. Epub 2021 May 25. PMID: 34035466.
42. Córdoba-Sosa G, Nicolás-Toledo L, Cervantes-Rodríguez M, Xelhuantzi-Arreguin N, Arteaga-Castañeda ML, Zambrano E, Cuevas-Romero E, Rodríguez-Antolín J. Corrigendum: Maternal and offspring sugar consumption increases perigonadal adipose tissue hypertrophy and negatively affects the testis histological organization in adult rats. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Nov 17;10:1092235. doi: 10.3389/fcell.2022.1092235. Erratum for: *Front Cell Dev Biol.* 2022 Jun 17;10:893099. PMID: 36467405; PMCID: PMC9714599.
43. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2018 Jul;24(7):908-922. doi: 10.1038/s41591-018-0104-9. Epub 2018 Jul 2. PMID: 29967350; PMCID: PMC6553468.
44. Koch H, Weber YG. The glucose transporter type 1 (Glut1) syndromes. *Epilepsy Behav.* 2019 Feb;91:90-93. doi: 10.1016/j.yebeh.2018.06.010. Epub 2018 Jul 31. PMID: 30076047.

45. Pragallapati S, Manyam R. Glucose transporter 1 in health and disease. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019 Sep-Dec;23(3):443-449. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_22_18. PMID: 31942129; PMCID: PMC6948067.
46. Di Dedda C, Vignali D, Piemonti L, Monti P. Pharmacological Targeting of GLUT1 to Control Autoreactive T Cell Responses. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 8;20(19):4962. doi: 10.3390/ijms20194962. PMID: 31597342; PMCID: PMC6801424.
47. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 2012 Mar 20;21(3):297-308. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.014. PMID: 22439925; PMCID: PMC3311998.
48. Wang Y, Liu S, Liu H, Li W, Lin F, Jiang L, Li X, Xu P, Zhang L, Zhao L, Cao Y, Kang J, Yang J, Li L, Liu X, Li Y, Nie R, Mu J, Lu F, Zhao S, Lu J, Zhao J. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J Hepatol.* 2020 Oct;73(4):807-816. doi: 10.1016/j.jhep.2020.05.002. Epub 2020 May 11. PMID: 32437830; PMCID: PMC7211738.
49. Zhang DM, Jiao RQ, Kong LD. High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients.* 2017 Mar 29;9(4):335. doi: 10.3390/nu9040335. PMID: 28353649; PMCID: PMC5409674.
50. Ibberson M, Uldry M, Thorens B. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem.* 2000 Feb 18;275(7):4607-12. doi: 10.1074/jbc.275.7.4607. PMID: 10671487.
51. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 Oct;295(4):C849-68. doi: 10.1152/ajpcell.00283.2008. Epub 2008 Aug 6. PMID: 18684987; PMCID: PMC2575825.

52. Fleming, T. P., Watkins, A. J., Velazquez, M. A., Mathers, J. C., Prentice, A. M., Stephenson, J., Barker, M., Saffery, R., Yajnik, C. S., Eckert, J. J., Hanson, M. A., Forrester, T., Gluckman, P. D., & Godfrey, K. M. (2018a). Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences. *Lancet*, *391*(10132), 1842-1852. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)30312-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)30312-x)

53. Barker, M., Dombrowski, S. U., Colbourn, T., Fall, C. H. D., Kriznik, N. M., Lawrence, W. T., Norris, S. A., Ngaiza, G., Patel, D., Skordis-Worrall, J., Sniehotta, F. F., Steegers-Theunissen, R., Vogel, C., Woods-Townsend, K., & Stephenson, J. (2018). Intervention strategies to improve nutrition and health behaviours before conception. *Lancet*, *391*(10132), 1853-1864. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)30313-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)30313-1)

54. Block, T., & El-Osta, A. (2017). Epigenetic programming, early life nutrition and the risk of metabolic disease. *Atherosclerosis*, *266*, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.09.003>

54. Hanson, M., Barker, M., Dodd, J. M., Kumanyika, S., Norris, S., Steegers, E., Stephenson, J., Thangaratinam, S., & Yang, H. (2017). Interventions to prevent maternal obesity before conception, during pregnancy, and post partum. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, *5*(1), 65-76. [https://doi.org/10.1016/s2213-8587\(16\)30108-5](https://doi.org/10.1016/s2213-8587(16)30108-5)

55. Fitz-James, M. H., & Cavalli, G. (2022). Molecular mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. *Nature Reviews. Genetics*, *23*(6), 325-341. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00438-5>

56. Cambonie, G., Comte, B., Zydorczyk, C., Ntimbane, T., Germain, N., Lê, N. L. O., Pladys, P., Gauthier, C., Lahaie, I., Abran, D., Lavoie, J., & Nuyt, A. M. (2007). Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *American Journal Of Physiology*.

Regulatory, Integrative And Comparative Physiology/American Journal Of Physiology. Regulatory, Integrative, And Comparative Physiology, 292(3), R1236-R1245. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00227.2006>

57-Giussani, D. A., Camm, E. J., Niu, Y., Richter, H. G., Blanco, C. E., Gottschalk, R., Blake, E. Z., Horder, K. A., Thakor, A. S., Hansell, J. A., Kane, A. D., Wooding, F. B. P., Cross, C. M., & Herrera, E. A. (2012). Developmental Programming of Cardiovascular Dysfunction by Prenatal Hypoxia and Oxidative Stress. *PloS One*, 7(2), e31017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031017>

58 Ito, J., Nakagawa, K., Kato, S., Miyazawa, T., Kimura, F., & Miyazawa, T. (2016). The combination of maternal and offspring high-fat diets causes marked oxidative stress and development of metabolic syndrome in mouse offspring. *Life Sciences*, 151, 70-75. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.089>

59. Luc, K., Schramm-Luc, A., Guzik, T. J., & Mikolajczyk, T. P. (2019). Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *PubMed*, 70(6). <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.6.01>

60. Thompson, L. P., & Al-Hasan, Y. (2012). Impact of Oxidative Stress in Fetal Programming. *Journal Of Pregnancy*, 2012, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2012/582748>

61. Yan, S., Wang, F., & Shi, Q. (2020). The effect of maternal high-fat-diet mediated oxidative stress on ovarian function in mice offspring. *Experimental And Therapeutic Medicine*, 20(6), 1. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9264>

62. Lei, Y., Hu, Q., & Gu, J. (2019). Expressions of Carbohydrate Response Element Binding Protein and Glucose Transporters in Liver Cancer and Clinical Significance. *Pathology & Oncology Research*, 26(2), 1331-1340. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00708-y>