



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

“Morfometría del hígado en la rata macho y su relación con el consumo de agua azucarada durante la gestación, lactancia y vida posnatal”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Diana Laura Cortes Xochitemol

Codirectores

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Dra. Saret Dávila Santacruz

Tlaxcala, Tlax.

Octubre, 2024



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

“Morfometría del hígado en la rata macho y su relación con el consumo de agua azucarada durante la gestación, lactancia y vida posnatal”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Diana Laura Cortes Xochitemol

Comité tutorial

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Dra. Saret Dávila Santacruz

Dra. Estela Cuevas Romero

Dra. Diana Catalina Castro Rodríguez

Financiamiento

La presente investigación se realizó en el Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (CTBC) en la maestría en Ciencias Biológicas, programa registrado en el Sistema Nacional de Posgrados del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (SNP-CONAHCyT). El trabajo contó con financiamiento de CONAHCyT, bajo el número de becario 1234532 DLCX.



**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 **Diana Laura Cortés Xochitemol** realiza para la obtención del grado de **Maestra 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 **“Morfometría del hígado en la rata macho y su relación con el consumo de agua azucarada durante la gestación, lactancia y vida posnatal”**

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., A 04 DE OCTUBRE DEL 2024

Dra. Estela Cuevas Romero

Dra. Saret Dávila Santacruz

Dra. Diana Catalina Castro Rodríguez

Dra. Margarita Cervantes Rodríguez

Dr. Eliuj Pérez Sánchez



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 la estudiante Diana Laura Cortes Xochitemol titulada “Morfometría del hígado en la rata macho y su relación con el consumo de agua azucarada durante la gestación, lactancia y vida posnatal” para optar por su grado de Maestra en Ciencias Biológicas. El documento de la tesis de Diana Laura Cortes Xochitemol 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 5%. Los textos detectados con similitud fueron marcados en las secciones de Resumen, Introducción, Antecedentes y Discusión correspondiendo a lenguaje común por lo que esta similitud no podría ser considerada como plagio. Por lo anterior, confirmo que la 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 20 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

NOMBRE DEL TRABAJO

Tesis Maestría. Octubre Rev_docx

AUTOR

Diana Cortes Xochitemol

RECUENTO DE PALABRAS

20349 Words

RECUENTO DE CARACTERES

108110 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

94 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

14.9MB

FECHA DE ENTREGA

Nov 20, 2024 2:00 PM CST

FECHA DEL INFORME

Nov 20, 2024 2:02 PM CST**● 5% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 4% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 4% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias biológicas del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por brindarme un entorno académico y profesional excepcional.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo financiero brindado a través de la beca número 1234532 DLCX, la cual hizo posible la realización de esta investigación.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Jorge Rodríguez Antolín, Dra. Saret Dávila Santacruz, Dra. Estela Cuevas Romero y Dra. Diana Catalina Castro, por su invaluable guía, tiempo, conocimientos y apoyo a lo largo de este proceso. Su experiencia y orientación fueron esenciales para el desarrollo de esta investigación. Muchas gracias.

Agradecimientos a título personal

"La verdadera ciencia no es solo descubrir, sino compartir y aprender de aquellos que nos rodean".

A mi padre, quien desde el cielo me ha guiado en cada paso. Tu amor y guía siguen presentes, impulsándome a seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles, siempre serás mi mayor fuente de inspiración y admiración.

A mi madre, por su apoyo inquebrantable, por estar siempre a mi lado, y por recordarme cada día que los sueños se construyen con esfuerzo y dedicación.

Al Dr. Rodríguez Antolín por brindarme la oportunidad de sumergirme en el mundo de la investigación, por confiar en mis capacidades. Su guía ha sido fundamental en mi crecimiento académico y personal.

De manera especial a la Dra. Saret Dávila, por su mentoría a lo largo de este proceso, por los días de trabajo en el laboratorio, las conversaciones enriquecedoras, por contagiarme su gusto por la investigación, por su motivación constante para seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles, y por brindarme su confianza tanto a nivel profesional como personal.

Al Dr. Eliut Pérez, por compartir sus conocimientos, por su orientación en el trabajo de laboratorio, por su paciencia y disposición para resolver las innumerables dudas que surgieron a lo largo de este proceso.

Y, por supuesto, a mis compañeros de laboratorio, Adri, Dani, Baldu, May, Bere y Joan. Gracias por los momentos de compañerismo, las risas en medio del esfuerzo de cada uno de nosotros, por las horas compartidas, los retos enfrentados juntos y, sobre todo, la amistad que construimos en el proceso. Este camino habría sido mucho más difícil sin su compañía.

Resumen

La malnutrición durante los periodos críticos del desarrollo como la gestación y lactancia, se han vinculado con un mayor riesgo a padecer enfermedades metabólicas en la vida posnatal, tales como la obesidad, la diabetes y la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA). Estas enfermedades son promovidas por el consumo excesivo de carbohidratos, lo que afecta a órganos metabólicos como el caso del hígado. La producción excesiva de ácidos grasos y síntesis de triglicéridos provocan la enfermedad de hígado graso no alcohólico. El objetivo de nuestro estudio fue evaluar los cambios morfológicos y bioquímicos en el hígado de crías ratas macho por el consumo de agua azucarada durante la etapa prenatal y posnatal en crías macho de la cepa *Wistar*. Para la obtención de los animales de estudio, se utilizaron 12 ratas hembras de esta, las cuales fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos experimentales: madre simple (MS) tuvieron un consumo de agua simple más alimento *ad libitum* y el grupo madre azúcar (MA) quienes tuvieron un consumo de agua azucarada al 5% y alimento *ad libitum*, durante el período de gestación y lactancia. Después del destete, las crías macho se dividieron en cuatro grupos experimentales (n=6 por grupo): del grupo de madre simple se dividieron en 2 grupos, críos simples que continuaron con la misma dieta de la madre (MS-CS) y críos azúcar, los cuales tuvieron el consumo de agua azucarada al 5% (MS-CA). Del grupo madre azúcar, los críos también fueron divididos en dos grupos, los críos que continuaron con el consumo de agua azucarada al 5% igual que la madre (MA-CA) y los críos que tuvieron el consumo de agua simple (MA-CS), el tratamiento duro 14 semanas, una vez finalizado, las ratas fueron sacrificadas y se les extrajo el hígado para realizar los análisis histológicos y bioquímicos. Los análisis histológicos que se realizaron en el hígado de los diferentes grupos experimentales fueron: hematoxilina y eosina, tricrómica de Masson, azul de alcian y ácido peryódico de Schiff, para el análisis bioquímico, se evaluaron triglicéridos en suero y pruebas de estrés oxidativo en las cuales se cuantificaron los subproductos de la peroxidación lipídica (TBARS), actividad de catalasas (CAT), y la actividad de superóxido dismutasa (SOD). Los críos que tuvieron el consumo de sacarosa al 5% tuvieron un incremento en el área transversal de los hepatocitos a consecuencia de la acumulación de gotas de grasa y glucógeno almacenado en el citoplasma. Estos hígados mostraron una mayor infiltración de mastocitos y aumento en los niveles de estrés oxidativo, propiciando un incremento en las fibras de colágeno en el tejido hepático. Estos

hallazgos sugieren que la malnutrición por consumo de sacarosa durante periodos críticos del desarrollo predispone a la descendencia a desarrollar la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA).

Glosario de términos

Hígado: Es la glándula más grande del organismo, se encuentra en el hipocondrio derecho y parte del epigastrio, desempeña varias funciones vitales como el metabolismo de los carbohidratos.

Metabolismo: Cambios químicos que se presentan en la célula u organismo.

Glucógeno: Reserva de energía que el cuerpo almacena en el hígado y músculos.

Sacarosa: Es un disacárido resultante de la unión entre una molécula de glucosa y otra de fructuosa.

Ácidos grasos: Moléculas formadas por una cadena de átomos de carbono e hidrogeno, con un grupo carboxilo en uno de sus extremos, son los componente básicos de los lípidos.

Inflamación: Reacción biológica del sistema inmunitario ante infecciones, lesiones, irritaciones y/o daños en los tejidos.

Fibrosis: Acumulación excesiva de tejido fibroso en un órgano o tejido, como reacción a una inflamación, lesión o daño continuo.

Triglicéridos: Tipo de grasa presente en la sangre y representan la forma más habitual de grasa en el organismo. Constituyen una de las fuentes significativas de energía para el cuerpo y son almacenados en los adipocitos.

Índice

1.INTRODUCCIÓN	15
1.1. Nutrición y malnutrición	15
1.2 Hígado.....	16
2. ANTECEDENTES.....	22
2.1 Hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad	22
2.2 Metabolismo de carbohidratos en el hígado.....	23
2.2.1 Síntesis de glucógeno	24
2.2.2 Síntesis de ácidos grasos	25
2.3 Enfermedad del hígado graso no alcohólico	25
2.3.1 Acumulación de grasa en el hígado.....	26
2.3.2 Estrés Oxidativo	27
2.3.3 Inflamación y sistema inmune.....	28
2.3.4 Fibrosis y cirrosis	30
2.4 Modelos de malnutrición gestacional.....	30
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	35
5.OBJETIVO GENERAL	35
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
7. METODOLOGÍA	36
7.1 Grupos experimentales.....	36
7.1.1 Grupos experimentales de las madres	36
7.1.2 Grupos experimentales de crías.....	36
7.3 Obtención de muestras sanguíneas e hígado	37
7.4 Determinación de triglicéridos séricos	38
7.5 Análisis histológico del hígado	38
7.6 Cuantificación del número de mastocitos	39
7.7 Determinación de la expresión de colágeno.....	39
7.8 Expresión de glucógeno	39
7.9 Extractos de hígado para las pruebas de estrés oxidativo y actividad enzimática.....	40
7.9.1Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	40
7.9.2 Actividad enzimática de superóxido dismutasa	40
7.9.3 Actividad enzimática de la catalasa	41
7.9.4 Actividad enzimática de Glutación.....	41

7.10 Análisis estadístico.....	41
8. RESULTADOS.....	42
8.1 Morfometría del hígado.....	42
8.2 Análisis histológico del hígado	42
8.2.1 Zona Pericentral	42
8.2.2 Zona Periportal.....	51
8.3 Número de mastocitos.....	60
8.4 Colágeno	62
8.5 Presencia de glucógeno	65
8.6 Triglicéridos séricos	68
8.7 Estrés oxidativo.....	69
9. DISCUSIÓN	72
10. CONCLUSIÓN	79
11. PERSPECTIVAS	80
12. REFERENCIAS	81
13. ANEXOS.....	88

1.INTRODUCCIÓN

1.1.Nutrición y malnutrición

La nutrición es el mecanismo a través del cual los organismos adquieren y/o utilizan los nutrientes que se encuentran en los alimentos para mantener la salud, el crecimiento y un desarrollo adecuado. Una adecuada nutrición es aquella que contiene un equilibrio entre lo que el cuerpo necesita y lo que gasta en sus actividades diarias. Este balance se logra al asegurar la presencia correcta de macronutrientes y micronutrientes como proteínas, hidratos de carbono, lípidos, minerales y vitaminas en nuestra dieta, de acuerdo con la energía que utilizamos en nuestras actividades (Mataix 2019). Si la dieta no cubre los requerimientos esenciales de nutrientes, el estado nutricional se ve afectado, pudiendo desencadenar manifestaciones clínicas asociadas con la malnutrición. La malnutrición se define como cualquier alteración nutricional resultado de una dieta inadecuada, ya sea por deficiencia o por un exceso. La desnutrición resulta de una ingesta alimenticia deficiente o desequilibrada, mientras que la sobrenutrición ocurre por el consumo excesivo de alimentos (Fonseca y cols. 2020). El entorno nutricional durante el embarazo, la lactancia y los primeros años de vida, juegan un papel fundamental en la salud de la descendencia a largo plazo. Investigaciones como las realizadas por Barker y Osmond han vinculado la malnutrición gestacional (desnutrición) con enfermedades cardíacas en la adultez, creando una perspectiva esencial sobre la influencia de las condiciones nutricionales tempranas en la salud posterior (Li y cols. 2015).

La hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD) postula que las condiciones intrauterinas pueden modificar múltiples aspectos como: el desarrollo fetal, la organogénesis, la diferenciación celular y el metabolismo; aumentando el riesgo de desarrollar una variedad de trastornos cardio-metabólicos como la obesidad, la diabetes, dislipidemias y enfermedad de hígado graso no alcohólica, en etapas posteriores de la vida (Yang y cols. 2012). Estos trastornos también son promovidos por el consumo de bebidas azucaradas y son mediados a través del metabolismo hepático, dado que el hígado desempeña un papel clave en el procesamiento de los carbohidratos (Hannou y cols. 2018). Por lo tanto, es importante señalar las funciones principales de este órgano y su organización celular.

1.2 Hígado

El hígado es la glándula más grande del cuerpo y está ubicado en el hipocondrio derecho del abdomen y parte del epigastrio con un peso aproximado de 1400 a 1600 gramos en humanos (Fortoul y cols. 2010). Está dividido por el ligamento falciforme en dos lóbulos principalmente, lóbulo derecho y lóbulo izquierdo; de cara visceral se pueden identificar dos lóbulos más, el lóbulo cuadrado que se encuentra a la derecha la vesícula biliar y el lóbulo caudado. También puede dividirse por segmentos hepáticos funcionalmente independientes, ya que cada uno dispone de una rama de la vena porta hepática, una rama de la arteria hepática, una rama venosa de salida y un conducto biliar (Sibulesky 2013). En el caso del hígado de rata se divide en cuatro lóbulos: lóbulo derecho que a su vez se divide en lateral y medial, lóbulo izquierdo también dividido en lateral y medial, lóbulo cuadrado y lóbulo caudado el cual presenta los procesos caudado y papilar. La principal diferencia anatómica a nivel macroscópico entre ambos organismos es la falta de vesícula biliar en el hígado de rata. A pesar de estas diferencias estructurales, los lóbulos del hígado de rata se correlacionan con los segmentos del hígado humano, lo que ha convertido al hígado de rata en un modelo valioso para diversos estudios científicos (Martins y cols. 2007).

A nivel microscópico, ambos están conformados por 2 grupos de células que son: las células parenquimatosas (PC) y las células no parenquimatosas (NPC) (LeCluyse y cols. 2012). Las células parenquimatosas consisten en los hepatocitos, que representan el 60% de la población celular y son responsables de diversas funciones fisiológicas del hígado como el metabolismo de carbohidratos, proteínas, grasas, el almacenamiento de ciertas vitaminas, etc (LeCluyse y cols. 2012, Trefts y cols. 2017). El núcleo de los hepatocitos se encuentra en el centro de la célula; algunos hepatocitos son binucleados. Además, el tamaño de los hepatocitos varía, siendo los hepatocitos de la zona 1 más pequeños que los hepatocitos de la zona 3, su vida media es de 150 días. En el citoplasma de algunos hepatocitos se pueden observar gránulos de glucógeno que funcionan como reserva de energía. Estas reservas son fundamentales para mantener los niveles de glucosa en sangre en respuesta a estímulos endocrinos (Fortoul y cols. 2010). Las NPC representan el 40% de la población de células hepáticas y las componen los colangiocitos, las células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer, las células estrelladas o Ito y las células progenitoras hepáticas (HPC) (**Figura 1**). Las NPC desempeñan múltiples

funciones que respaldan y regulan el crecimiento, así como las actividades del hígado (LeCluyse y cols. 2012). A continuación, se describen las NPC:

Células endoteliales sinusoidales: Son células delgadas y alargadas que se encargan del recubrimiento de los sinusoides, formando placas con fenestraciones que permiten el flujo sanguíneo entre los sinusoides y los hepatocitos (Fortoul y cols. 2010, Krishna 2014).

Células de Kupffer: Se encuentran dentro de la microvasculatura sinusoidal, adyacentes a las células endoteliales. Su función principal es la fagocitosis y son consideradas un tipo especial de macrófago (Trefts y cols. 2015).

Células estrelladas o de Ito: Están localizadas en el espacio de Disse, que es el área situada entre la pared sinusoidal y los hepatocitos. Son células dinámicas ya que pueden estar en un estado inactivo o activo. En un estado inactivo su función principal es el almacenamiento de vitamina A; si ocurre un daño en el hígado, estas células se activan, proliferan y comienzan a perder gradualmente sus reservas de vitamina A, se encargan de reemplazar a los hepatocitos dañados por colágeno fibrilar (LeCluyse y cols. 2012, Krishna 2014).

Colangiocitos: Son células epiteliales biliares, representan un mínimo del porcentaje (5% de la población de las células hepáticas). Se encargan de recubrir los conductos biliares, en la absorción y secreción de agua, aniones orgánicos, cationes orgánicos, lípidos, electrolitos y en la secreción de bilis (LeCluyse y cols. 2012, Fortoul y cols. 2010).

Células progenitoras hepáticas: Se localizan en los canales de Hering y son células madre con la capacidad de transformarse en hepatocitos y/o colangiocitos. Tiene un papel en la reparación y regeneración del hígado en situaciones de daño o enfermedad hepática (LeCluyse y cols. 2012).

Las células del hígado se organizan de tres formas diferentes para describir al hígado en términos de unidad funcional, los cuales son: el lobulillo clásico, lobulillo portal y el acino hepático (Tanaka y cols. 2011) (**Figura 2**).

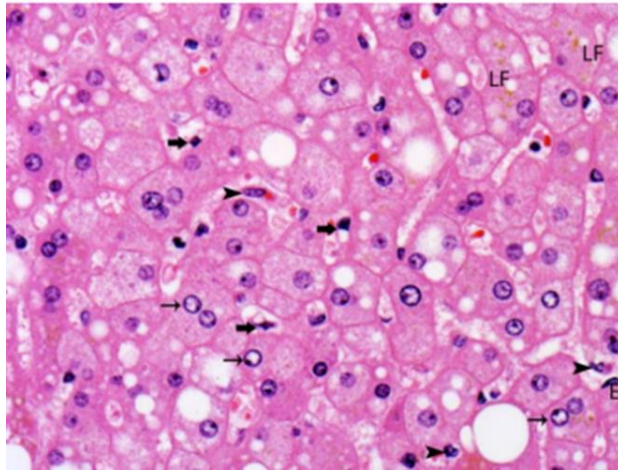


Figura 1. Representación de células estructurales del hígado. Hepatocitos (flechas delgadas) Células de Kupffer (puntas de flecha). Células estrelladas (flechas gruesas). Imagen tomada de Krishna y cols. 2013.

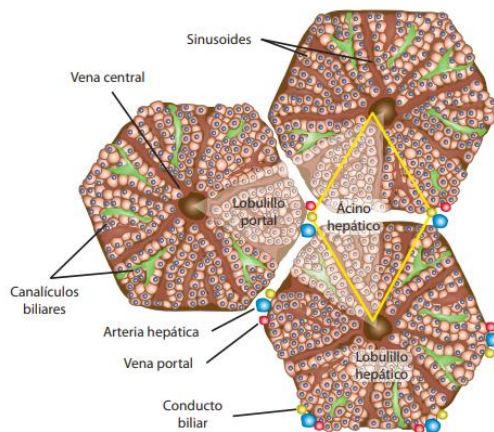


Figura 2. Representación del lobulillo portal, lobulillo hepático y acino hepático. Imagen tomada de Fortoul y cols. 2010.

Lobulillo clásico: Los hepatocitos están organizados de manera radial alrededor de la vena central, donde desembocan los sinusoides. El área que rodea esta vena central, se observa tejido estromal que contiene tríadas portales, conformadas por una vena, arteria hepática y un conducto biliar. La disposición de las tríadas portales da al lobulillo clásico su forma característica de hexágono (Fortoul y cols. 2010).

- *Vena central:* Vaso delgado que recoge la sangre de los sinusoides hepáticos. Su revestimiento está rodeado por células endoteliales y está rodeado de fibras de tejido conectivo. Se encuentra en el centro del lobulillo (Fortoul y cols. 2010).

- *Sinusoides*: Es el lugar en donde se mezcla la sangre proveniente de la rama terminal venosa y la arteria. Estos reciben sangre de los capilares, se mezclan ambas fuentes y los hepatocitos no quedan expuestos con sangre oxigenada por completo. Esta mezcla sirve para que se realice el intercambio de sustancias entre el sinusoides y los hepatocitos (Krishna y cols. 2014).
- *Tríada portal*: En el espacio portal se lleva a cabo la mezcla de sangre venosa y sangre arterial (Welsch y cols. 2009).

Lobulillo portal: muestra la función exocrina del hígado, ya que se organiza en torno al conducto biliar. Se compone por un área triangular que incluye a tres lobulillos clásicos contiguos, en los cuales las venas centrales forman los vértices del triángulo. (Fortoul y cols. 2010). En este lobulillo el flujo biliar va de adentro hacia afuera, a diferencia del flujo del lobulillo clásico el cual tiene un flujo sanguíneo de afuera hacía adentro.

Acino hepático: Se forma por dos lobulillos clásicos adyacentes, y los hepatocitos se organizan en tres zonas concéntricas, donde varían los niveles de oxígeno, la actividad metabólica y la presencia de enzimas. En la zona 1, en la cual los hepatocitos están más cerca de la vena porta y de la arteria hepática, se caracterizan por ser los primeros en recibir la sangre rica en nutrientes, oxígeno y toxinas, estos son más activos en la gluconeogénesis y el metabolismo oxidativo de la energía. Estos hepatocitos son los primeros en regenerarse y los últimos en sufrir algún daño o morir. La zona 2 actúa como una zona de transición y los hepatocitos de esta zona pueden adaptarse a realizar funciones de la zona 1 así como de la zona 3, si existe un daño o pérdida de la función en alguna de las zonas. Por último, los hepatocitos de la zona 3, que están cerca de la vena central, son los últimos en recibir la sangre sinusoidal, requieren una menor cantidad de oxígeno y son activos en los procesos de glucólisis, lipogénesis, síntesis de triglicéridos, la síntesis de glucógeno y son los primeros en almacenar lípidos (Cunningham y cols. 2021; Trefts y cols. 2017; Krishna 2014; LeCluyse y cols. 2012) **(Figura 3)**.

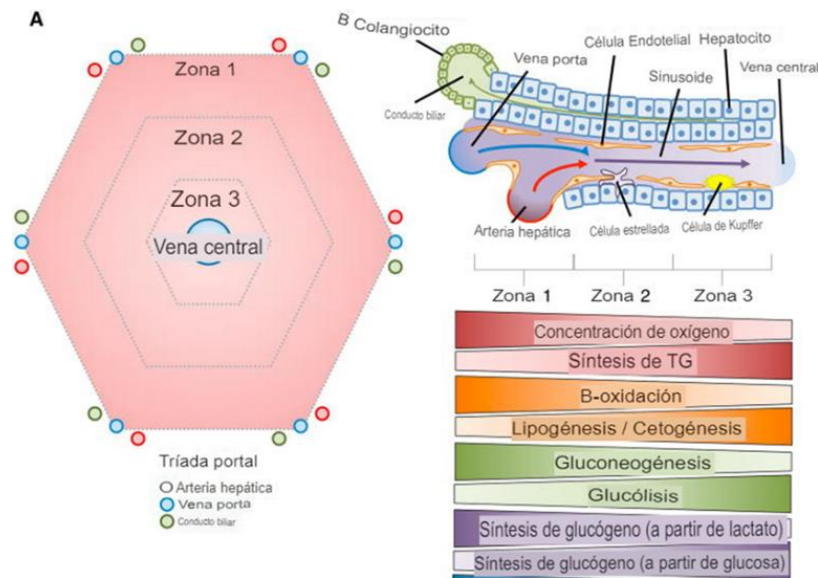


Figura 3. Representación del acino hepático. Imagen tomada y modificada de Trefts y cols. 2017.

Este órgano es vital para el cuerpo humano, ya que realiza diversas funciones indispensables que ayudan a mantener la salud y el adecuado funcionamiento del organismo. Entre sus funciones más importantes se encuentran:

Metabolismo de los macronutrientes: tiene un papel fundamental en la regulación del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Es parte fundamental para regular los niveles de glucosa en sangre al almacenarla como glucógeno y liberarla cuando es requerida. También es capaz de convertir los lípidos en energía, y producir proteínas plasmáticas necesarias para diversas funciones (Trefts y cols. 2017).

Función inmunológica: Es un componente clave en el sistema inmunológico, al eliminar bacterias y toxinas de la sangre. También produce factores inmunológicos que contribuyen a la defensa del cuerpo contra infecciones y enfermedades (Kubes, y cols. 2018).

Control endocrino: Se encarga de la producción y la descomposición de diferentes hormonas, además de regular las vías de señalización que afectan el crecimiento y el metabolismo del organismo.

Homeostasis de lípidos y colesterol: Está involucrado en la producción, almacenamiento y la descomposición de lípidos, además de controlar los niveles de colesterol en el cuerpo (Bechmann y cols. 2012).

Desintoxicación: Una de las funciones más importantes del hígado es descomponer y eliminar sustancias extrañas, como fármacos, toxinas y residuos del metabolismo. Este órgano transforma estos compuestos para que puedan ser eliminados con mayor facilidad por los riñones o a través de la bilis. (LeCluyse y cols. 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1 Hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad

El desarrollo de la salud y la enfermedad comienza desde el momento en que el individuo comienza a formarse, es decir, mientras está en el útero. Los cambios metabólicos que suceden durante el embarazo pueden influir de manera importante en la salud futura. La hipótesis de Barker sugiere que ciertas enfermedades, como la hipertensión, la enfermedad coronaria y la diabetes tipo 2, pueden “programarse” durante el desarrollo fetal y manifestarse en la vida adulta (Ramírez 2012). Esta teoría resalta dos ideas principales: la programación que se refiere a la respuesta duradera del organismo a impactos o estímulos negativos durante un periodo crítico (gestación), y la amplificación, los efectos de la programación se intensifican con el tiempo (Langley-Evans 2006). La nutrición que recibe la madre durante el embarazo es fundamental para la programación fetal y para el desarrollo de la salud en el futuro. Si la madre sufre desnutrición en esta etapa, el feto puede hacer ajustes metabólicos para aprovechar al máximo los nutrientes que han sido limitados. Sin embargo, estos ajustes pueden incrementar el riesgo de trastornos metabólicos si el individuo posteriormente se enfrenta a un entorno posnatal rico en nutrientes, a esta teoría se le conoce como “la teoría del fenotipo ahorrativo” (Li y cols. 2015).

Se ha vinculado el entorno obesogénico materno con el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas entre ellas enfermedades hepáticas en la descendencia (Modi y cols. 2011). Esto, a su vez se relaciona con el aumento en el consumo de fructosa, en paralelo con el incremento en la ingesta de sacarosa y jarabe de maíz alto en fructuosa (Stanhope 2016). Cuando se ingiere una cantidad elevada de carbohidratos, el hígado tiene dificultades para procesarlos eficientemente para obtener energía. Como resultado, una parte de estos carbohidratos se convierte en ácidos grasos y triglicéridos (Softic y cols. 2016). Por ello, es importante conocer el metabolismo y el efecto de los carbohidratos en el hígado.

2.2 Metabolismo de carbohidratos en el hígado

El hígado es fundamental en el metabolismo de los carbohidratos. Almacena, sintetiza y libera glucosa según las necesidades energéticas del cuerpo. Cambia de un modo de producción a uno de absorción en respuesta a la alimentación y el ayuno, influenciado por hormonas como la insulina y el glucagón (Trefts y cols. 2017). Por un lado, transforma la glucosa en glucógeno, almacenándola en los hepatocitos mediante el proceso de glucogénesis. En ausencia de glucosa, tiene la capacidad de convertir aminoácidos y lípidos en glucosa a través de la gluconeogénesis. Además, puede descomponer el glucógeno en glucosa mediante la glucogenólisis y convertir la glucosa en piruvato a través de la glucólisis, proporcionando así sustratos para otras vías metabólicas (Dvorkin y cols. 2010) (Figura 4).

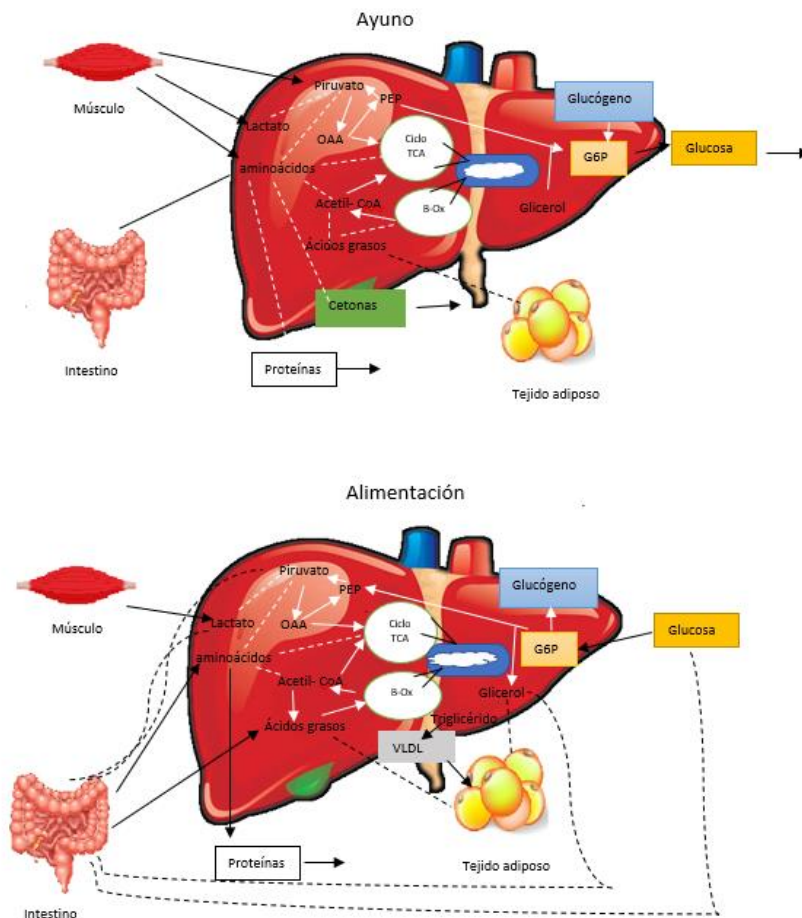


Figura 4. Metabolismo de la glucosa. Imagen tomada y modificada de Trefts y cols. 2017.

Para almacenar la energía el hígado emplea dos vías principales: primero, convierte la glucosa en glucógeno, y segundo, transforma la glucosa en ácidos grasos mediante un proceso llamado lipogénesis hepática de *novo*. Estas vías están estrechamente vinculadas; cuando hay una sobrealimentación o un exceso de carbohidratos en la dieta y se llena el almacenamiento de glucógeno, el hígado es capaz de continuar almacenando carbohidratos, pero en forma de ácidos grasos (Trefts y cols. 2017).

2.2.1 Síntesis de glucógeno

Cuando existe una ingesta de alimentos, la glucosa proporciona una vía directa para almacenar glucógeno, si la glucosa es derivada de precursores no glúcidos representa la vía indirecta y contribuye a la formación de glucógeno en un estado de alimentación o de ayunas (Woerle y cols. 2003). En personas sanas, alrededor de la mitad de la glucosa consumida se almacena como glucógeno, principalmente mediante el proceso directo (Adeva-Andany y cols. 2016a). La formación de glucógeno involucra varias etapas dentro de los hepatocitos. La glucosa se fosforila al ingresar a los hepatocitos y pasa por transformaciones enzimáticas. La glucosa 6-fosfato se convierte en glucosa 1-fosfato mediante la enzima fosfoglucomutasa-1 (PGM-1), después se convierte en uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa) mediante la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa (UGP). La UDP-glucosa es fundamental para la síntesis de glucógeno, ya que actúa como donante de glucosa. La glucogenina inicia la formación del glucógeno autoglicosilándose, creando una cadena corta de glucosa. La elongación de esta cadena inicial se lleva a cabo a través de la enzima glucógeno sintasa, que añade más residuos de glucosa a la cadena de crecimiento, formando enlaces lineales entre ellos la enzima ramificadora de glucógeno que introduce puntos de ramificación en la partícula de glucógeno para su estructura tridimensional (Adeva-Andany y cols. 2016a).

En humanos, existen diferentes isoformas de estas enzimas: la glucogenina-1 y glucogenina-2, presentes en el hígado, y dos isoformas de glucógeno sintasa, glucógeno sintasa 1 (GYS1) en músculo y glucógeno sintasa 2 (GYS2) en el hígado. Existen dos tipos de glucógeno en el hígado: partículas pequeñas β y partículas más grandes α . Las α liberan glucosa a un ritmo más lento que las β cuando hay enzimas que degradan la glucosa, lo que contribuye a mantener los niveles de azúcar en sangre durante el ayuno nocturno. La mayor parte del

glucógeno es citosólico y hasta un 10% del glucógeno de los hepatocitos está en el lisosoma de los hepatocitos (Soon y cols. 2023).

El metabolismo del glucógeno se altera en condiciones patológicas como la diabetes mellitus (DM), la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), el almacenamiento de glucógeno puede generar cambios histológicos en el hígado y resultar en una disfunción hepática (Soon y cols. 2023).

2.2.2 Síntesis de ácidos grasos

En el hígado se realiza la síntesis *de novo* de ácidos grasos cuando hay gran disponibilidad de glucosa y las reservas de glucógeno se han repletado. Este proceso está determinado por la composición de la dieta. La glucosa y sacarosa son los principales contribuyentes para el incremento de esta síntesis. La producción de ácidos grasos a partir de acetil-CoA ocurre en el citosol de los hepatocitos. La acetil-CoA que proviene de las mitocondrias se transporta al citoplasma como acetil-carnitina o como citrato, siendo este último el resultado de la primera reacción del ciclo del ácido cítrico. La enzima ATP citrato liasa (ACLY) permite la conversión de citrato a acetil-CoA en el citoplasma (Adeva-Andany y cols. 2016b). La acetil-CoA carboxilasa es esencial para transformar de acetil-CoA en malonil-CoA. La insulina y el citrato promueven la activación de esta enzima, mientras que el glucagón la inhibe. A través de la acción de la sintetasa de ácidos grasos, el malonil-CoA se convierte en ácido palmítico, que es el principal precursor de los ácidos grasos en el cuerpo. Después, los ácidos grasos se esterifican con la glicerina-3-fosfato para formar triglicéridos. Estos triglicéridos pueden ser almacenados en el hígado como reservas de energía o pueden ser exportados a otros tejidos para su almacenamiento o uso (Adeva-Andany y cols. 2016b).

El consumo elevado de sacarosa está relacionado con el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) (Softic y cols. 2016, Trefts y cols. 2017)

2.3 Enfermedad del hígado graso no alcohólico

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) se define como la acumulación de grasa hepática que supera el 5 % del peso del hígado, en ausencia del abuso de alcohol. El espectro de afecciones va desde la esteatosis simple y sin complicaciones hasta la

esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (Wong y cols. 2015). La patogenia de la EHGNA no se comprende totalmente. El “modelo de impactos múltiples” explica que varios factores actúan en conjunto en individuos genéticamente predispuestos para padecer EHGNA (Tilg y cols. 2021). Estos factores abarcan la resistencia a la insulina, concentraciones altas de ácidos grasos libres en la sangre, estrés oxidativo, inflamación hepática, hormonas liberadas por el tejido adiposo, factores genéticos y epigenéticos. La EHGNA progresa en diferentes ritmos entre los individuos y generalmente sigue un curso de cuatro etapas distintas (Buzzetti y cols. 2016). La primera etapa inicia con la acumulación de grasa en el hígado. La segunda consiste en un depósito excesivo de grasa hepática que conduce a EHNA, afecta aproximadamente del 7-30% de los pacientes con EHGNA (Younossy cols. 2016). La tercera etapa induce la formación de tejido fibroso hepático y la última es la cirrosis. A continuación, se describe el desarrollo y progresión de la EHGNA (Figura 5):

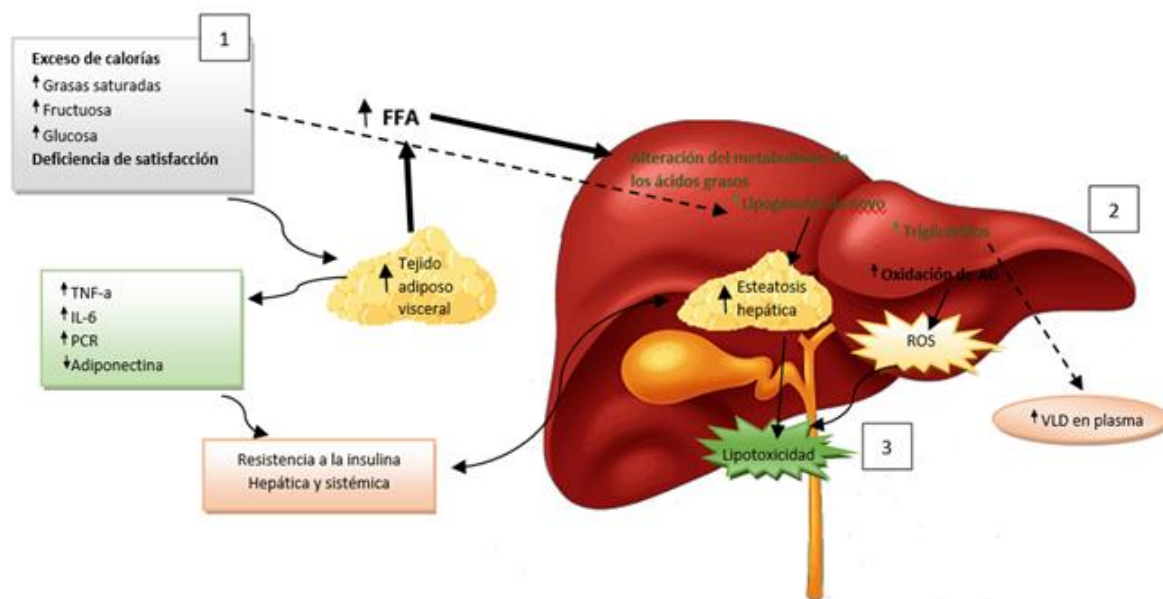


Figura 5. Fisiopatología de la EHGNA. Imagen tomada y modificada de Tiniakos y cols. 2010.

2.3.1 Acumulación de grasa en el hígado.

La teoría de los impactos múltiples comienza con la acumulación de pequeñas gotas de grasa en el citoplasma, de los hepatocitos, lo que resulta en esteatosis hepática simple (Buzzetti

y cols. 2016). Esta condición es reversible y se origina principalmente a través de cuatro mecanismos:

Reducción en el transporte de grasas en forma de triglicéridos por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL): Las VLDL son las encargadas de transportar los lípidos desde el hígado hacia otros tejidos del cuerpo. Si su capacidad para transportar triglicéridos fuera del hígado se ve reducida, esto puede favorecer la acumulación de grasa en este órgano (Buzzetti y cols. 2016).

Disminución en la oxidación de ácidos grasos libres: La oxidación de ácidos grasos es el proceso en el que estos se utilizan como fuente de energía. Cuando esta oxidación se reduce, los ácidos grasos se acumulan en forma de grasa en el hígado. (Tilg y cols. 2021).

Aumento de la lipogénesis de *novo*: Es el proceso por el cual el hígado sintetiza nuevos lípidos, como los triglicéridos, a partir de sustratos como los carbohidratos. En la EHNA, hay un incremento en la producción de nuevos lípidos en el hígado, lo que significa que se generan más triglicéridos a partir de los carbohidratos. Esta vía de síntesis de lípidos contribuye aún más a la acumulación de lípidos en el hígado (Buzzetti y cols. 2016).

Lipotoxicidad: La acumulación excesiva de lípidos, especialmente triglicéridos y ácidos grasos libres, en las células hepáticas resulta en lipotoxicidad. Significa que los lípidos se vuelven tóxicos para los hepatocitos, lo que puede causar daño celular y disfunción hepática. Además, esta acumulación de lípidos genera estrés oxidativo, lo que intensifica el daño hepático. Tanto la lipotoxicidad como el estrés oxidativo son factores clave en la aparición y evolución de la EHGNA (Friedman y cols. 2018).

2.3.2 Estrés Oxidativo

Es un proceso en el que el organismo produce una cantidad excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Aunque estas especies son necesarias para las funciones celulares normales en cantidades adecuadas, un exceso puede causar daño a las células. Las ROS actúan como moléculas de señalización en diferentes tipos de células. La producción de ROS involucra reacciones enzimáticas y no enzimáticas en varias partes de la célula (Zhang y cols. 2019). Las ROS se dividen en radicales libres y especies no radicales. Los radicales libres incluyen el anión superóxido, el radical hidroxilo, el óxido nítrico,

entre otros. Las principales especies no radicales son el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso y el peroxinitrito. Un equilibrio entre las ROS y los sistemas antioxidantes es esencial para un buen funcionamiento celular (Zhang y cols. 2019).

Existen sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que protegen a las células del daño oxidativo. Algunos sistemas enzimáticos incluyen la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. Entre las moléculas no enzimáticas se encuentran el glutatión, la tiorredoxina y las vitaminas E y C, entre otros. En condiciones normales, estos sistemas antioxidantes previenen el daño celular al neutralizar las especies oxidativas. El desequilibrio entre ROS y antioxidantes puede contribuir a diversas enfermedades y afecciones (Chaudhary y cols. 2023, Takaki y cols. 2013, Byrne y cols. 2015).

El incremento en la acumulación de lípidos en el hígado genera un aumento en la producción de ROS durante el metabolismo de estos lípidos. Además, la inflamación crónica asociada con la EHGNA también contribuye a la generación de ROS (Takaki y cols. 2013). El estrés oxidativo en la EHGNA puede tener múltiples consecuencias negativas. Puede dañar directamente las células del hígado, causando inflamación y muerte celular. Además, el estrés oxidativo puede desencadenar respuestas inflamatorias y activar vías de señalización que promueven la fibrosis hepática, es decir, la acumulación excesiva de tejido cicatricial en el hígado (Brunt y cols. 2015).

2.3.3 Inflamación y sistema inmune

La lipotoxicidad y resistencia a la insulina provocan la liberación de citocinas proinflamatorias tanto a nivel sistémico como local en el hígado (Asrih y cols. 2013). Además, la lipotoxicidad de los lípidos acumulados y la activación del sistema inmunitario innato son los principales impulsores de esteatohepatitis no alcohólica. El estrés inducido por lípidos activa los procesos inflamatorios y los mecanismos inmunitarios que involucran macrófagos, células dendríticas y linfocitos; estas células pueden liberar citoquinas proinflamatorias en respuesta a la lipotoxicidad y la resistencia a la insulina en el hígado. Entre estas citoquinas se encuentra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6), entre otras (Buzzetti y cols. 2016). El TNF- α es una citoquina proinflamatoria que tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria. Su liberación excesiva en el hígado puede promover la inflamación crónica y

contribuir al daño celular. Además, el TNF- α puede afectar la sensibilidad a la insulina y contribuir a la resistencia a la insulina (Parthasarathy y cols. 2020). La IL-6 es otra citoquina proinflamatoria que las células del sistema inmunológico pueden liberar en respuesta a la lipotoxicidad y la resistencia a la insulina. La IL-6 también promueve la inflamación y puede afectar negativamente el metabolismo de la glucosa y los lípidos. Además, tiene el potencial de estimular la producción de otras citoquinas proinflamatorias, creando un entorno inflamatorio en el hígado (Asrih y cols. 2013). La liberación de estas citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α y la IL-6, junto con otros mediadores inflamatorios, contribuye a la cascada inflamatoria y al daño hepático.

2.3.3.1 Mastocitos

Los mastocitos son células del sistema inmunológico que se presentan principalmente en reacciones alérgicas, sin embargo, varios estudios han evidenciado el papel crucial de los mastocitos en diversos procesos fisiológicos y patológicos, que incluyen la regulación del sistema inmunológico, la respuesta a infecciones, la inflamación, así como en la progresión de ciertas enfermedades como la EHGNA (Huang y cols. 2022). Estas células están presentes en todo el cuerpo, especialmente en el tejido conectivo y contienen gránulos que son mediadores inflamatorios. Cuando existe un daño hepático o inflamación, se liberan señales químicas como las citocinas y quimiocinas liberadas por las células hepáticas y otras células inmunitarias que atraen a los mastocitos al hígado. Una vez en el hígado, los mastocitos son activados por el antígeno receptor de alta afinidad para IgE (Fc ϵ RI). (Jarido y cols. 2017). Al ser activados, liberan el contenido de sus gránulos, estos se fusionan con la membrana celular y liberan sus mediadores (Weiskirchen y cols. 2019). Los mediadores que liberan los mastocitos son las histaminas que incrementan la permeabilidad de los vasos sanguíneos, provocando vasodilatación y contribuyendo a la respuesta inflamatoria liberando heparina, triptasa y quimasa, así como citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 y TGF- β 1, que amplifican la respuesta inflamatoria promoviendo la fibrosis en el hígado (Weiskirchen y cols. 2019).

2.3.4 Fibrosis y cirrosis

La inflamación crónica en el hígado hepática en el EHGNA conduce la formación de tejido fibroso, conocido como fibrosis. Durante esta etapa, las células estrelladas hepáticas se activan y reemplazan gradualmente los hepatocitos con colágeno fibrilar y otras proteínas de la matriz extracelular. Este proceso compromete la función y estructura hepática (Heyens y cols. 2021). La última etapa de la progresión de la EHGNA es la cirrosis, caracterizada por un daño extenso en el hígado, con la presencia de cicatrices y nódulos regenerativos. Esta es una etapa avanzada de la enfermedad que puede dar lugar a complicaciones severas, incluyendo insuficiencia hepática y cáncer de hígado (Vancells y cols. 2021). Las características principales de la EHNA a nivel histológico se pueden identificar a través de una biopsia hepática. Estas características incluyen la presencia de esteatosis, balonización e inflamación lobulillar. Otros cambios histológicos observados pueden ser inflamación en la zona portal, infiltrados de células polimorfonucleares, cuerpos de Mallory-Denk, cuerpos apoptóticos, núcleos vacuolados claros, esteatosis microvacuolar y megamitocondrias (Younossi y cols. 2016).

Investigaciones en humanos han evidenciado la conexión directa entre la obesidad materna y la acumulación de lípidos en el hígado de los recién nacidos (Li y cols. 2015) y se ha revelado una correlación entre el índice de masa corporal materno y el contenido de lípidos en el hígado de los recién nacidos, sugiriendo que esta acumulación de grasa hepática fetal podría estar relacionada con un exceso de ácidos grasos libres maternos, independientemente de la cantidad de grasa subcutánea en el neonato (Modi y cols. 2011). Los estudios con modelos experimentales han respaldado esta hipótesis y se han realizado diversos estudios en modelos de malnutrición y su efecto en el hígado (Li y cols. 2015).

2.4 Modelos de malnutrición gestacional

Un estudio de malnutrición gestacional en ratas *Wistar* divididas en dos grupos: madres alimentadas con una dieta control (C) de 20% de caseína y madres alimentadas con una dieta restringida (R) de 10% de caseína durante la gestación; posterior las crías fueron divididas en grupos; crías de la dieta C dividida en: dieta estándar más agua de grifo o dieta estándar más sacarosa al 5%; la camada con dieta R fue dividida en: dieta control estándar más agua de grifo y dieta estándar más sacarosa al 5% durante 10 semanas mostraron que una ingesta alta de

sacarosa durante la edad adulta incrementa o, incluso, muestra algunas alteraciones hepáticas provocadas por la ingesta baja en proteínas durante el embarazo; asimismo, se demostró que la sacarosa consumida en la vida posnatal promueve un aumento en el peso relativo del hígado de las crías hembras y machos de ratas alimentadas con una dieta baja en proteínas durante el embarazo (Nicolás y cols. 2018).

Campisano y colaboradores (2017) realizaron un modelo de malnutrición gestacional y posnatal en ratas de la cepa Wistar y su efecto en el hígado. Las ratas tuvieron una dieta baja en proteínas (8%) durante la gestación, la lactancia y la vida posnatal (60 días de tratamiento) en este trabajo fueron evaluados únicamente crías macho ya que, la programación fetal ocurre de manera diferente en machos y hembras (dimorfismo sexual). Este estudio muestra que las crías que tuvieron una restricción de proteínas durante la vida prenatal y posnatal fueron las más afectadas, mostrando cambios en la arquitectura hepática como un incremento de vacuolas lipídicas que desplazaron los núcleos de los hepatocitos a la periferia y un aumento en la expresión de tejido fibroso. También hubo cambios bioquímicos como un aumento de colesterol y triglicéridos en suero, al igual que un aumento de estrés oxidativo en el hígado, además se encontraron niveles elevados de TNF- α e IL-6. Los demás grupos mostraron un daño hepático en menor grado, mostrando que una dieta baja en proteínas durante la vida prenatal tiene un efecto a largo plazo en la vida posnatal (Campisano y cols. 2017).

Otro estudio en ratas *Wistar* con una dieta de junk food que consistió en la ingesta de alimentos como galletas, dulces, pasteles, quesos, papas fritas, etc. durante la etapa prenatal y hasta las 10 semanas postdestete, observaron cambios en el hígado como esteatosis hepática, presencia de hepatocitos en forma de balón y un aumento en la respuesta al estrés oxidativo. Las crías macho fueron mayormente afectados, ya que mostraron un aumento de la expresión de genes asociados con la sensibilidad a la insulina, la lipogénesis de novo y la oxidación de lípidos. Estos resultados muestran que una dieta de comida chatarra durante la etapa prenatal y posnatal contribuyen al desarrollo de la enfermedad de hígado graso no alcohólico en la vida adulta (Bayol y cols. 2010) (**Figura 6**). La severidad de la EHGNA en la descendencia está influenciada por la dieta posterior al destete, lo que sugiere que el período perinatal y de lactancia son críticos para programar el riesgo de padecer enfermedades hepáticas (Li y cols. 2015).

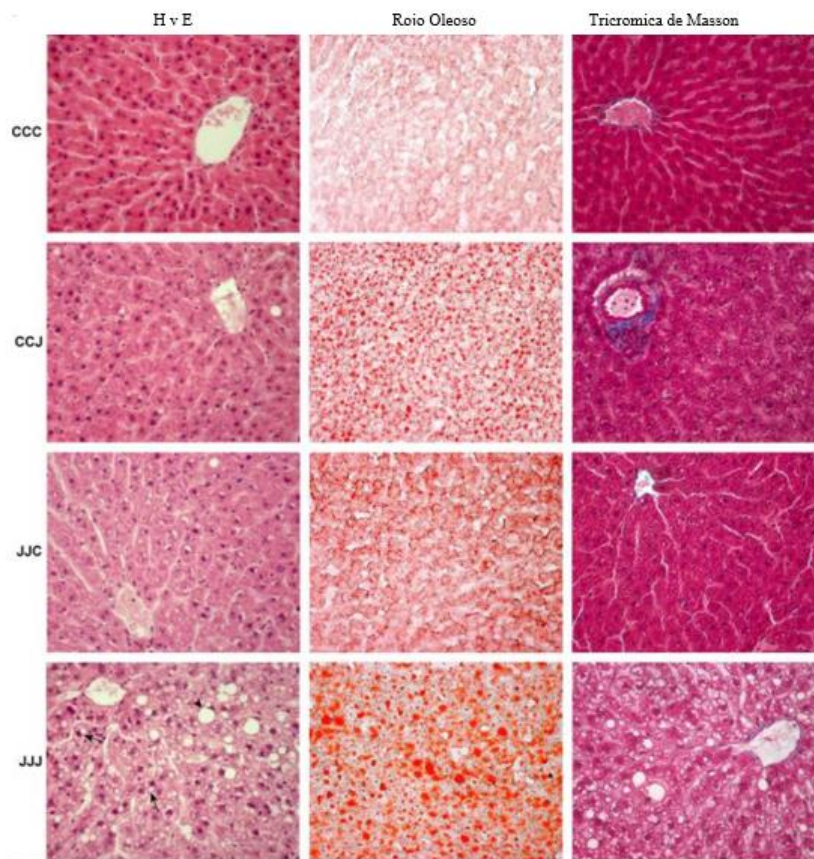


Figura 6. En el panel de microfotografías se muestran 3 diferentes tinciones (H y E, rojo oleoso y tricromica de Masson), Se observan los 4 grupos experimentales del estudio de Bayol en 2010. El grupo JJJ (dieta Junk Fod durante la vida prenatal y posnatal) muestran un mayor daño a nivel histológico, se observa esteatosis hepática y grandes vacuolas lipídicas. Imagen tomada y modificada de Bayol y cols. 2010.

3. JUSTIFICACIÓN

El aumento en el consumo de carbohidratos, como la sacarosa, ha sido vinculado con las crecientes tasas de obesidad, diabetes, riesgos cardio metabólicos y ciertos tipos de cáncer (Malik y cols. 2022). Este incremento se manifiesta principalmente en la ingesta de bebidas azucaradas, que constituyen el 15% de las calorías totales en las dietas occidentales (Yracheta y cols. 2015). En nuestro grupo de investigación hemos encontrado que el consumo crónico de sacarosa provoca cambios morfológicos y funcionales en diferentes órganos y tejidos, Corona-Quintanilla y cols. (2022) demostraron que el modelo de malnutrición gestacional y postgestacional de agua azucarada al 5% no mostraban diferencias significativas en la ganancia de peso durante la gestación y la lactancia en las madres control y las madres azúcar. Los críos de madres que consumieron agua azucarada al 5% durante la gestación y lactancia no mostraron efectos en sus medidas morfométricas (peso, talla, circunferencia cefálica, abdominal y distancia ano genital). A pesar de ello, se observó que los grupos experimentales tuvieron una mayor ganancia de peso durante la vida posnatal en comparación con el grupo control. Además, se observó que la ingesta de sacarosa promovió una mayor actividad eléctrica del músculo pubococcígeo (Pcm), pero al mismo tiempo se redujo la duración del reflejo uretrogenital en los grupos que consumieron agua azucarada. Esto plantea que una dieta rica en sacarosa durante la etapa prenatal y posnatal podría estar relacionada con disfunciones sexuales, como por ejemplo la eyaculación precoz en los hombres. En el 2022, Córdoba y cols. analizaron el consumo nutricional durante la lactancia y encontraron que las madres que consumieron sacarosa durante esta etapa disminuyeron su consumo de alimento, aumentaron el consumo de agua azucarada y de carbohidratos, y redujeron la ingesta de proteínas en su dieta 18.5% comparados con el grupo control con un 24.1% de proteínas. Las crías que tuvieron un consumo de agua azucarada después del destete mostraron una reducción en la ingesta de alimentos y un aumento en el consumo de agua. También demostraron que el tejido adiposo perigonadal y el tamaño de los adipocitos aumentaron en los grupos de madre azúcar-crío simple (MA-CS) y madre azúcar-crío azúcar (MA-CA), lo que podría indicar hipertrofia del tejido adiposo, un proceso que se asocia con inflamación en el espacio intersticial del testículo. Posteriormente Dávila y cols. en el 2024, con este mismo modelo, encontraron que el consumo de agua azucarada en la etapa prenatal incrementa la frecuencia del músculo bulboesponjoso durante el reflejo uretrogenital

en la descendencia, pero la combinación del consumo prenatal y posnatal de agua azucarada produce cambios en el peso del músculo, en el área transversal de las fibras musculares y en el número de mionúcleos, así como un aumento en la cantidad de fibras de colágeno en el músculo bulboesponjoso, indicando que las modificaciones dietéticas desde el embarazo influyen directamente en el desarrollo de este músculo, mostrando que los cambios fisiológicos en su activación pueden estar relacionados con disfunciones sexuales como la eyaculación precoz. Otro de los tejidos que tiene una importancia metabólica significativa es el hígado el cual puede ser modificado por la malnutrición materna tanto desnutrición como sobrenutrición han demostrado afectar la salud en la progenie predisponiendo a la aparición de EHGNA. Estudios han revelado que dietas altas en grasas durante el periodo prenatal se correlacionan con la incidencia de esteatosis hepática fetal persistente hasta la edad adulta (McCurdy y cols. 2009). Aunque revertir la dieta en la vida posnatal mejora la situación patológica, no elimina completamente el problema, lo que subraya la importancia crítica de la nutrición en el embarazo. No se conocen los cambios morfológicos y bioquímicos que puede tener el hígado por el consumo de sacarosa al 5% durante las etapas prenatal y posnatal. Este modelo de malnutrición está presente en diversas culturas alrededor del mundo y puede tener implicaciones significativas en la salud hepática a lo largo de la vida. Los resultados de este estudio podrían ser fundamentales para establecer estrategias de salud pública y recomendaciones dietéticas que ayuden a mitigar los riesgos asociados con el consumo de sacarosa, especialmente durante las etapas críticas del desarrollo en generaciones futuras.

4. HIPÓTESIS

El consumo de agua azucarada durante la gestación, lactancia y vida posnatal induce cambios morfométricos en el hígado de la rata macho.

5.OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del consumo de agua azucarada durante la gestación, lactancia y vida posnatal sobre la morfometría en el hígado de la rata macho.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Evaluar la organización histológica hepática.
- 2) Cuantificar el número de mastocitos en el hígado.
- 3) Determinar la expresión de colágeno del hígado.
- 4) Evaluar la presencia de glucógeno en el hígado.
- 5) Determinar la cantidad de triglicéridos séricos.
- 6) Determinar el estado oxidativo y antioxidante en extractos de hígado.

7. METODOLOGÍA

Se usaron 12 ratas adultas hembras de la cepa Wistar, cada una de tres meses de edad con un peso de 220-250 gramos. Estas ratas fueron mantenidas en un bioterio bajo un ciclo de luz de 12 horas y oscuridad de 12 horas, a una temperatura controlada de 20 ± 2 °C, con acceso a alimento y agua *ad libitum*. Los procedimientos experimentales cumplieron con las normativas del Manual de Seguridad del trabajo en el laboratorio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, así como con las directrices establecidas en la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

7.1 Grupos experimentales

7.1.1 Grupos experimentales de las madres

Las ratas hembra fueron apareadas con machos expertos. El día del apareamiento fue considerado el día 0 (cero) de gestación. A partir del día uno se midió la ingesta diaria de agua, alimento y el peso corporal de cada rata. Posteriormente se asignaron aleatoriamente a dos grupos experimentales:

Grupo madres simple (MS), ratas alimentadas con una dieta Chow 5001 de Purina y agua simple *ad libitum* durante la gestación y lactancia.

Grupo de madres con tratamiento de agua con azúcar al 5% (MA), ratas alimentadas con una dieta Chow 5001 de Purina y agua azucarada al 5% *ad libitum* durante la gestación y lactancia.

7.1.2 Grupos experimentales de crías

Después del parto, las camadas fueron ajustadas de 8-10 crías para estandarizar la demanda de alimento durante la lactancia. El destete se llevó a cabo en el día 21 de lactancia, y los machos se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos en total. Del grupo de madres con agua simple (MS), se formaron dos grupos de críos machos: el grupo control que continuo con la misma dieta materna de agua simple (MS-CS) y el otro grupo recibió agua azucarada al 5% (MS-CA). Para el grupo de madres que consumieron agua azucarada (MA), también se formaron dos grupos de críos machos: uno mantuvo la dieta materna de agua azucarada al 5% (MA-CA) y el otro tuvo la ingesta de agua simple (MA-CS). Los animales fueron monitoreados

diariamente en cuanto a su peso y consumo de agua y alimento. Este régimen se mantuvo durante un periodo de 14 semanas (**Figura 7**).

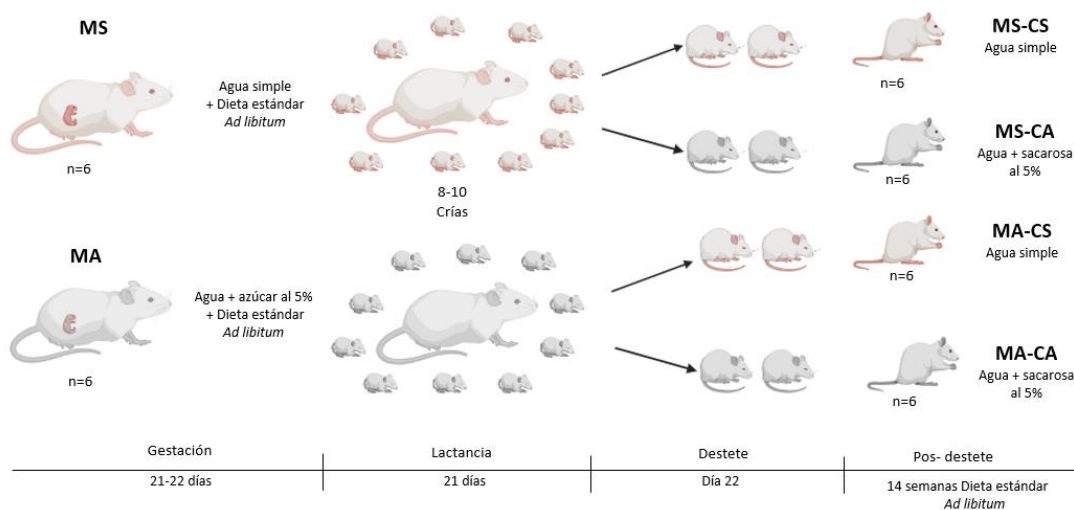


Figura. 7. Diseño experimental. Obtención de los grupos experimentales: Madre simple-Cría simple (MS-CS), Madre simple-cría azúcar (MS-CA), Madre azúcar-Cría simple (MA-CS), Madre azúcar-Cría azúcar (MA-CA). Imagen tomada y modificada de Dávila 2023.

7.3 Obtención de muestras sanguíneas e hígado

Tanto las ratas controles como las experimentales fueron sacrificadas por decapitación al cumplir las 14 semanas postdestete, se obtuvieron muestras sanguíneas para análisis bioquímicos posteriores. Para el aislamiento del hígado la rata se colocó en posición supina y se realizó una incisión longitudinal sobre la línea media ventral, desde la cavidad abdominal hasta el dorsal del pene. El hígado fue extraído y pesado. Posteriormente, se calculó el peso relativo del hígado en gramos por cada 100 gramos de peso corporal del animal. Esta medida permite estandarizar la proporción del peso del hígado.

El hígado fue dividido en lóbulos, para el histológico se utilizó una parte del lóbulo lateral izquierdo y para estrés oxidativo se utilizó el lóbulo lateral derecho, el resto del hígado fue congelado -80 °C.

7.4 Determinación de triglicéridos séricos

Para la determinación de triglicéridos séricos se utilizó el kit comercial trigliceridos Mono SL New. Los estándares y las muestras se analizaron por duplicado en un fotómetro marca Photometer 5010 v5+ a una longitud de onda de 492 nm.

7.5 Análisis histológico del hígado

A partir de una porción del lóbulo lateral izquierdo del hígado, los tejidos fueron procesados con Bouin durante 24 h. Posteriormente, fueron deshidratados con alcohol etílico en concentraciones ascendentes desde 80, 96 y 100%, se aclararon en xileno y fueron incluidos en paraplast X-tra (Anexo 1). Se obtuvieron cortes histológicos longitudinales (ocho de cada animal) de 5 μ m de espesor seriados con un micrótopo. Se colocaron cuatro cortes por laminilla para ser teñidos con hematoxilina-eosina (Anexo 2), posteriormente se tomaron fotografías con una cámara OLYMPUS de 5.1 megapíxeles, montada en un microscopio óptico Zeiss Imager A.1 (a 40 aumentos totales). Para analizar el área transversal, área citoplasmática, área nuclear de los hepatocitos, la cuantificación de hepatocitos binucleados y células inmunes, se tomaron 16 campos por animal; 8 campos de la zona pericentral tomando como referencia una vena central (**Figura 8A**) y 8 campos de la zona periportal tomando como referencia una tríada portal (**Figura 8B**). Se utilizó el programa AxioVision REL 4.6 (Zeiss Inc 2007) para realizar las mediciones histológicas.

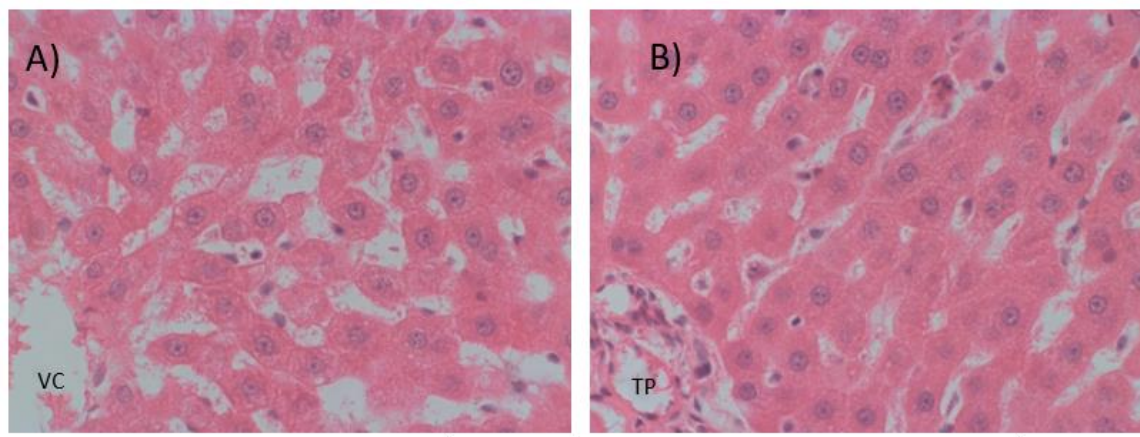


Figura 8. Corte de hígado teñido con de Hematoxilina-Eosina tomadas a 40x, VC (vena central), TP (tríada portal). Barra equivale a 50 μ m.

7.6 Cuantificación del número de mastocitos

Para la cuantificación de mastocitos en el hígado, previamente se realizó el procedimiento histológico de preservación y cortes, se empleó la tinción de azul de alcian con un pH 2.5, seguido de un contra teñido con rojo neutro (Anexo 3). Para la observación y conteo de mastocitos, se utilizó un microscopio de la marca NIKON, modelo ECLIPSE E200, se observaron los cortes a un aumento de 100X. Se examinó todo el corte histológico por animal. Se tomaron fotografías representativas de los mastocitos con una cámara OLYMPUS de 5.1 megapíxeles, montada en un microscopio óptico Zeiss Imager A.1 a 40 y 100 aumentos totales.

7.7 Determinación de la expresión de colágeno

Para evaluar la expresión de colágeno en el hígado se utilizó la tinción tricrómica de Masson (Anexo 4). El tejido hepático fue sometido al mismo procedimiento histológico de preservación y corte previamente descrito. Se tomaron 16 fotomicrografías por animal, 8 de la zona pericentral y 8 de la zona periportal. Se llevó a cabo un estudio ciego, donde dos examinadores independientes evaluaron las fotografías utilizando una escala de puntuación de 0 a 3; 0 (sin tinción), 1 (poco), 2 (moderado) y 3 (mucho). Las puntuaciones asignadas por los examinadores fueron promediadas para cada grupo experimental.

7.8 Expresión de glucógeno

La Expresión de glucógeno en el hígado se evaluó mediante la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) (Anexo 5). Se siguió el mismo protocolo de preservación y corte de tejidos. Al igual que la evaluación de colágeno, se tomaron 16 fotomicrografías por animal, 8 de la zona pericentral y 8 de la zona periportal. El análisis también se realizó mediante un estudio ciego, en el cual dos examinadores calificaron las fotografías utilizando una escala de 0 a 3: 0 (sin tinción), 1 (poco), 2 (moderado) y 3 (mucho). Las puntuaciones de los examinadores se promediaron para cada grupo experimental.

7.9 Extractos de hígado para las pruebas de estrés oxidativo y actividad enzimática

Se llevo a cabo la homogeneización de una fracción de tejido hepático (1:10, p/v) utilizando un tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA) frío (50 mM Tris-HCL), pH 7.4, 1% Tritón X-100, 0.2% desoxicolato sódico, 0.2% de docecil sulfato sódico (SDS), 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro, 5 g/mL de aprotinina, 5 g/mL de leupeptina) con un homogenizador eléctrico. Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos a 4°C para obtener el sobrenadante y descartar el pellet. La concentración de proteínas se determinó mediante un ensayo Lowry de Bio-Rad, realizando la solución de trabajo a una concentración 1:100 en agua destilada.

7.9.1 Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para la determinación del estrés oxidativo se evaluó a través de la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. En un tubo, se mezclaron 70 µL de Tris 150 mM pH7.5, 300 µL de ácido tiobarbitúrico al 0.4% en ácido tricloroacético y 90 µL de cada muestra. Se agitó en un vortéx y se incubó durante 45 minutos a 100 °C. Después las muestras se enfriaron en hielo por 2 minutos, se añadieron 200 µL de KCL al 1.2% y se centrifugaron a 7000 rpm durante 3 minutos. Para la curva de calibración, se diluyo una solución stock de MDA a 30 µL en concentraciones de 0.1, 0.3, 0.6 y 1 µL en un volumen final de 300 µL. Se colocaron 180 µL del sobrenadante en una microplaca para la lectura en un lector de placa BioTec modelo Elx800 a 532 nm.

7.9.2 Actividad enzimática de superóxido dismutasa

En una microplaca, se añadieron 20 µL de muestra y 80 µL de agua destilada, luego se incorporaron 8 µL de pirogalol 2 mM y 10 µL de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, 5 mg de MTT en 1 mL de PBS 1X). Se incubaron a temperatura ambiente con agitación constante por 5 min, donde fue cubierta para evitar la exposición a la luz. Para terminar con el análisis se agregaron 100 µL dimetilsulfóxido (DMSO). Para la curva de calibración, se realizaron diluciones de ácido úrico a partir de una solución stock de 2 mM en concentraciones de 0, 0.01, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5 mM en un volumen final de 1000 µL. La

lectura se realizó en un lector de placa BioTec modelo ELx800 a 550 nm.

7.9.3 Actividad enzimática de la catalasa

Se prepararon tubos con 5 µg de proteína de los extractos hepáticos en un volumen final de 250 µL, ajustando con agua miliQ. Se añadió 500 µL de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) al 0.1 M, 50 µL de Tris 25 mM pH 7.5, 250 µL de una solución de H₂O₂ al 0.2 M y una solución de dicromato de potasio al 0.16 M con ácido acético glacial en una proporción 1:3. La curva de calibración se realizó con H₂O₂ en concentraciones de 0, 10, 20, 40, 80 y 160 nM. Los tubos se incubaron a 97 °C se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se colocaron 200 µL en una microplaca para realizar la lectura en un lector de placa BioTec modelo ELx800 a 550nm.

7.9.4 Actividad enzimática de Glutación

En tubos de 2 mL, se colocaron 10 µg de proteína de los extractos en un volumen final de 50 µL de agua destilada, ajustando el volumen según cada muestra. Para la curva de calibración, se utilizó una solución de 5n; de cisteína y se prepararon diluciones de la siguiente manera: 1.5 mM, 1.25 mM, 1 mM, 0.75 mM, 0.50 mM y 0.25 mM. Se tomaron 100 µL de las diluciones y se colocaron en tubos. A cada tubo se añadieron 1000 µL de fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄) 0.3 M, 200 µL de reactivo de Ellman (2 mg de 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) en 5mL de citrato de sodio dihidratado al 1%) a los tubos de la curva y 250 µL a los tubos de la muestra. Luego, se agitaron en vórtex y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La lectura se realizó en un lector de placas BioTec ELx800 a 420 nm.

7.10 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism Versión 9.4.1 Se llevó a cabo un análisis de varianza bifactorial (ANOVA de 2 vías), donde el primer factor considerado fue la dieta materna y el segundo la dieta posnatal de las crías. Solo se realizaron pruebas post hoc de Bonferroni entre los grupos cuando se encontraron diferencias significativas en alguno de estos factores. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con valores de $p \leq 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Morfometría del hígado

Peso del hígado

El peso del hígado no fue modificado por el factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 0.09456$, $P=0.7616$), tampoco por el factor de la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 2.087$ $P=0.1640$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 0.005689$, $P=0.9406$) (**Figura 9**).

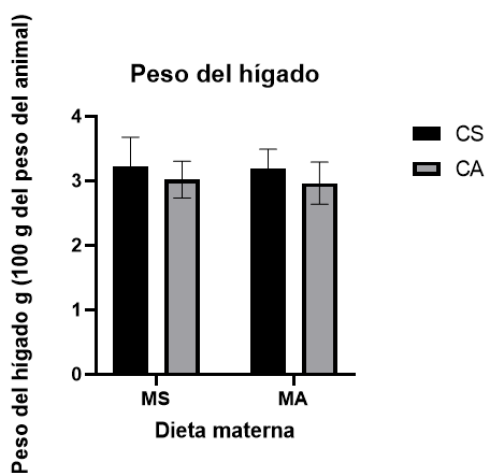


Figura 9. Peso del hígado. Se muestra la media \pm e.e. No hay diferencias significativas $P>0.05$ ANOVA de dos vías. Madre simple- Cría simple (MS-CS), Madre simple-Cría Sacarosa (MS-CA), Madre sacarosa-Cría simple (MA-CS), Madre sacarosa-Cría-Sacarosa (MA-CA) $n=6$ /grupo

8.2 Análisis histológico del hígado

8.2.1 Zona Pericentral

Área transversal

Se presenta un panel de fotografías de la zona pericentral tomada a 40X (**Figura 10**). En el grupo control (MS-CS) se observa un parénquima hepático normal, con sinusoides definidos y una arquitectura vascular adecuada, donde los cordones hepáticos son claramente distinguibles. El grupo MS-CA evidencia un inicio de esteatosis hepática caracterizado por la presencia de hepatocitos en forma de balón y gotas de grasa dentro del citoplasma de los hepatocitos, lo que ocasiona una disminución en la vasculatura sinusoidal debido al aumento de su tamaño, no se logran a distinguir adecuadamente los cordones hepáticos. El grupo MA-CS muestra núcleos picnóticos, micro vesículas de grasa y hepatocitos balonizados. Por último, el

grupo MA-CA exhibe las mismas características mencionadas, al igual que la pérdida de los cordones hepáticos, parénquima y vasculatura sinusoidal. En la figura 12 tomada a 100X se pueden apreciar las vacuolas de grasa dentro del citoplasma de los hepatocitos de los diferentes grupos experimentales (**Figura 11**).

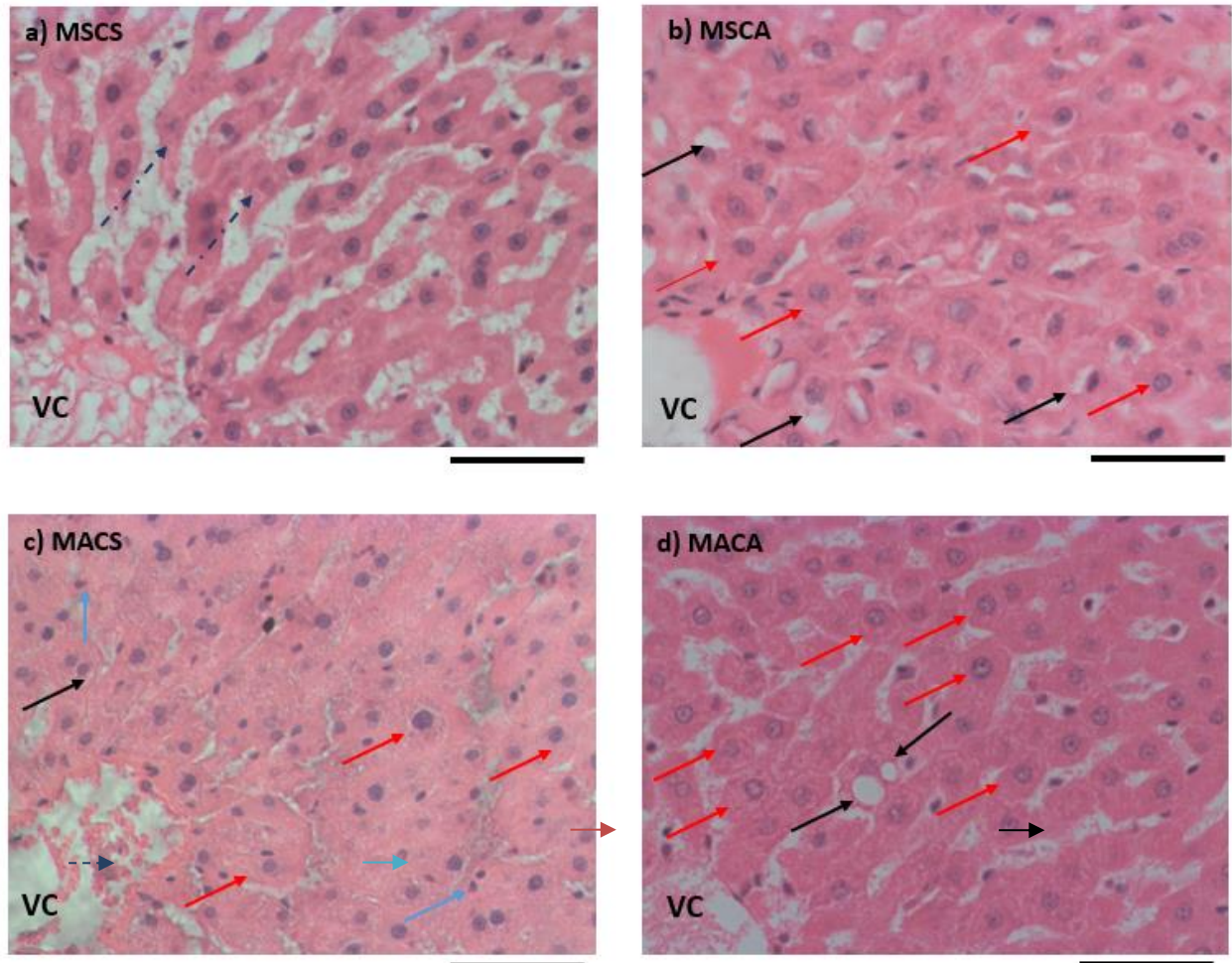


Figura 10. Cortes histológicos del hígado de la zona Pericentral de los grupos experimentales teñidos con hematoxilina- eosina. (flechas rojas) señalan hepatocitos balonizados, (flechas negras) vesículas de grasa, (flechas punteadas) cordones hepáticos, (flechas azules) núcleos picnóticos. Barra equivale a 50 μ m.

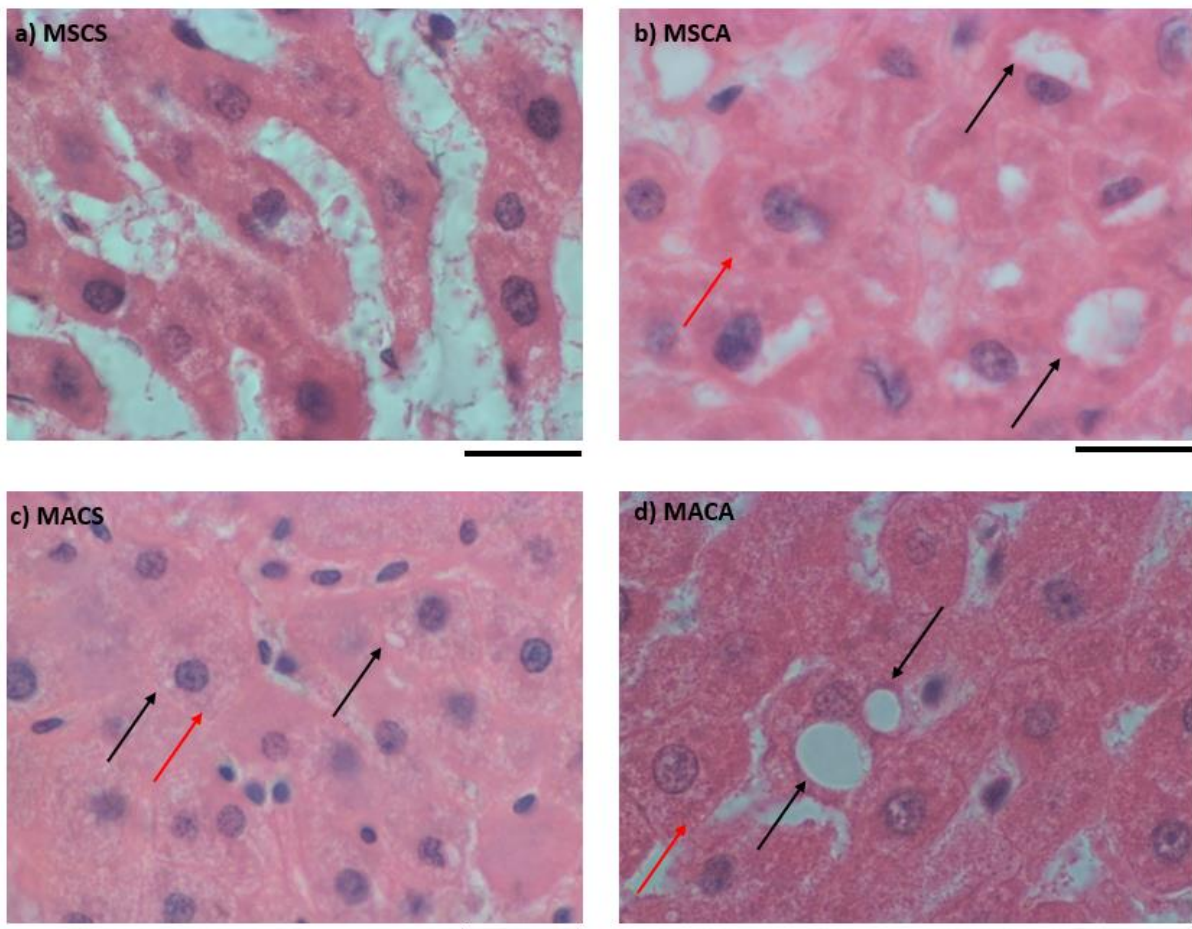


Figura 11. Cortes histológicos del hígado de la zona Pericentral de los grupos experimentales. Se observan hepatocitos en forma de balón (flechas rojas), vesículas de grasa (flechas negras) Teñidos con hematoxilina- eosina. Barra equivale a 20 μm .

El área transversal fue modificada tanto por el factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 4.756$, $P=0.0413$), por el factor de la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 15.81$ $P=0.0007$) y por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 8.305$, $P=0.0092$), mostrando un incremento en el área transversal en los grupos que tuvieron el consumo de agua azucarada durante la etapa prenatal, posnatal o en ambas etapas en comparación con el grupo control. Se realizó la prueba posthoc de Bonferroni para la comparación entre grupos, mostrando diferencias significativas $***P<0.001$ entre los grupos (MS-CS vs MS-CA, MS-CS vs MA-CS Y MS-CS vs MA-CA (**Figura 12 A**).

Se realizaron histogramas de distribución de acuerdo al tamaño del área transversal de los hepatocitos para identificar si había cambios en la distribución de hepatocitos en los diferentes grupos experimentales. Los rangos considerados abarcaron de 80 a 540 μm^2 ,

divididos en 3 categorías: $<180 \mu\text{m}^2$, de $180\text{-}259 \mu\text{m}^2$ y $>260 \mu\text{m}^2$. Estos rangos fueron obtenidos a partir de los datos del área transversal de los hepatocitos de los grupos experimentales. Se aplicó la prueba estadística ANOVA de dos vías para cada rango obteniendo los siguientes resultados: en el rango $<180 \mu\text{m}^2$ muestran cambios significativos por el factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 11.18$, $P=0.0032$), así como por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 23.35$, $P=0.0001$) y por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 15.51$, $P=0.0008$), la prueba posthoc de Bonferroni muestra diferencias significativas entre los grupos MS-CS vs MS-CA, MS-CS vs MA-CA de **** $P<0.0001$ y MS-CS vs MA-CS de *** $P<0.001$ (**Figura 12 B**). Los rangos de $180\text{-}259 \mu\text{m}^2$ no muestran diferencias significativas en relación con la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 0.1667$, $P=0.6874$), ni por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 2.074$, $P=0.1653$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 0.9031$, $P=0.3533$) (**Figura 12 C**). El rango $>260 \mu\text{m}^2$ no muestra cambios significativos por la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 2.809$, $P=0.1093$), pero sí por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 9.732$, $P=0.0054$) y por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 5.566$, $P=0.0286$), la prueba pos hoc de Bonferroni muestra diferencias significativas entre los grupos MS-CS vs MS-CA ** $P<0.01$ y MS-CS vs MA-CA * $P=0.05$ (**Figura 12 D**). En el rango de áreas transversales menores a $160 \mu\text{m}^2$, el grupo control predominó significativamente, mientras que los grupos experimentales estuvieron representados en menor cantidad. En contraste, en el rango de áreas transversales mayores a $260 \mu\text{m}^2$, se encontró una mayor cantidad de hepatocitos de los grupos experimentales y una menor representación de hepatocitos del grupo control.

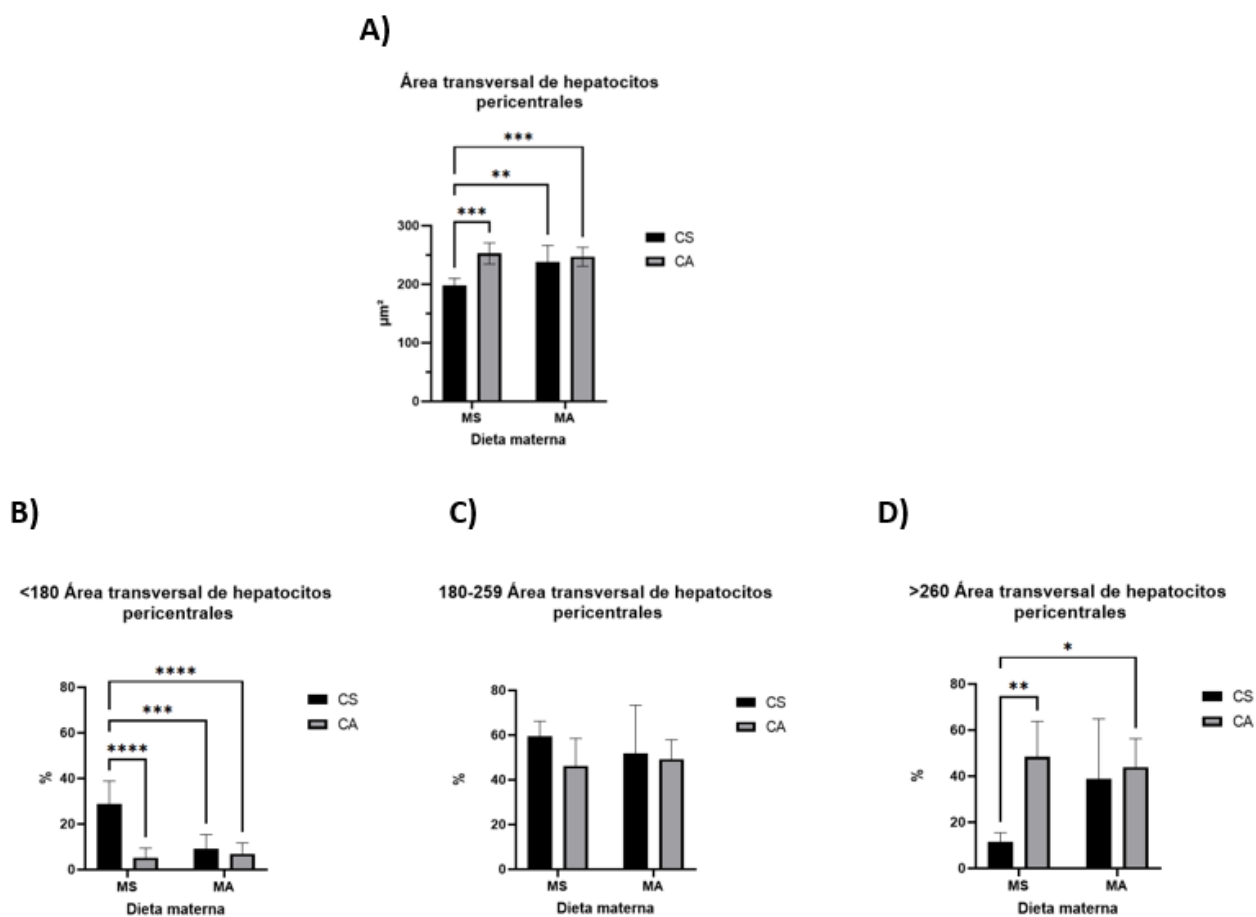


Figura 12. Área transversal de hepatocitos pericentrales. Se muestra la media \pm e.e. ANOVA de dos vías seguida de posthoc de Bonferroni **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. Madre simple-Cría simple (MS-CS), Madre simple-Cría azúcar (MS-CA), Madre azúcar-Cría simple (MA-CS), Madre azúcar-Cría-azúcar (MA-CA) $n=6$ /grupo.

Área citoplásmica

El área citoplásmica fue modificada tanto por el factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 5.536$, $P=0.0290$), por el factor de la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 18.29$ $P=0.0004$) y por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 9.334$, $P=0.0062$). Se muestra un incremento del área citoplásmica en los grupos que tuvieron consumo de agua azucarada durante la etapa prenatal, posnatal o en ambas etapas en comparación del grupo control. La prueba pos hoc de Bonferroni muestra diferencias significativas entre los grupos (MS-CS vs MS-CA, MS-CS vs MA-CA *** $P < 0.001$, MS-CS vs MA-CS ** $P < 0.01$) (**Figura 13 A**).

Se realizaron histogramas de distribución basados en el tamaño del área citoplasmática de los hepatocitos para identificar cambios en la distribución de hepatocitos en los distintos grupos experimentales. Los rangos considerados abarcaron de 60 a 480 μm^2 , divididos en 3 categorías: $<140 \mu\text{m}^2$, de $140\text{-}239 \mu\text{m}^2$ y $>240 \mu\text{m}^2$. Estos rangos se establecieron a partir de los datos del área citoplasmática de los hepatocitos de los grupos experimentales. Se aplicó la prueba estadística ANOVA de dos vías para cada rango obteniendo los siguientes resultados: En el rango $<140 \mu\text{m}^2$ muestran cambios en relación tanto por la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 10.04$, $P=0.0048$), por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 12.65$, $P=0.0020$) y por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 11.54$, $P=0.0029$), la prueba de pos hoc de Bonferroni muestra diferencias significativas en los grupos MS-CS vs MS-CA, MS-CS vs MA-CS y MS-CS vs MA-CA *** $P<0.001$ (**Figura 13 B**). Los rangos de $140\text{-}239 \mu\text{m}^2$ muestran diferencias significativas por la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 24.24$, $P=0.0001$), así como por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 11.65$, $P=0.0028$), y por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 20.17$, $P=0.0002$), la prueba de pos hoc de Bonferroni muestra diferencias significativas en los grupos MS-CS vs MS-CA *** $P<0.001$, en MS-CS vs MA-CS y MS-CS vs MA-CA **** $P=0.0001$ (**Figura 13 C**). El rango $>240 \mu\text{m}^2$ no muestra cambios significativos por la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 2.549$, $P=0.1260$), pero sí por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 10.82$, $P=0.0037$) y por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 4.596$, $P=0.0445$), la prueba posthoc de Bonferroni muestra diferencias significativas entre los grupos MS-CS vs MS-CA ** $P<0.01$ y MS-CS vs MA-CA * $P<0.05$ (**Figura 13 D**). Se observó que en el rango de áreas citoplasmáticas menores a $140 \mu\text{m}^2$, el grupo control predominó significativamente, a diferencia de los grupos experimentales que se presentaban en menor cantidad.

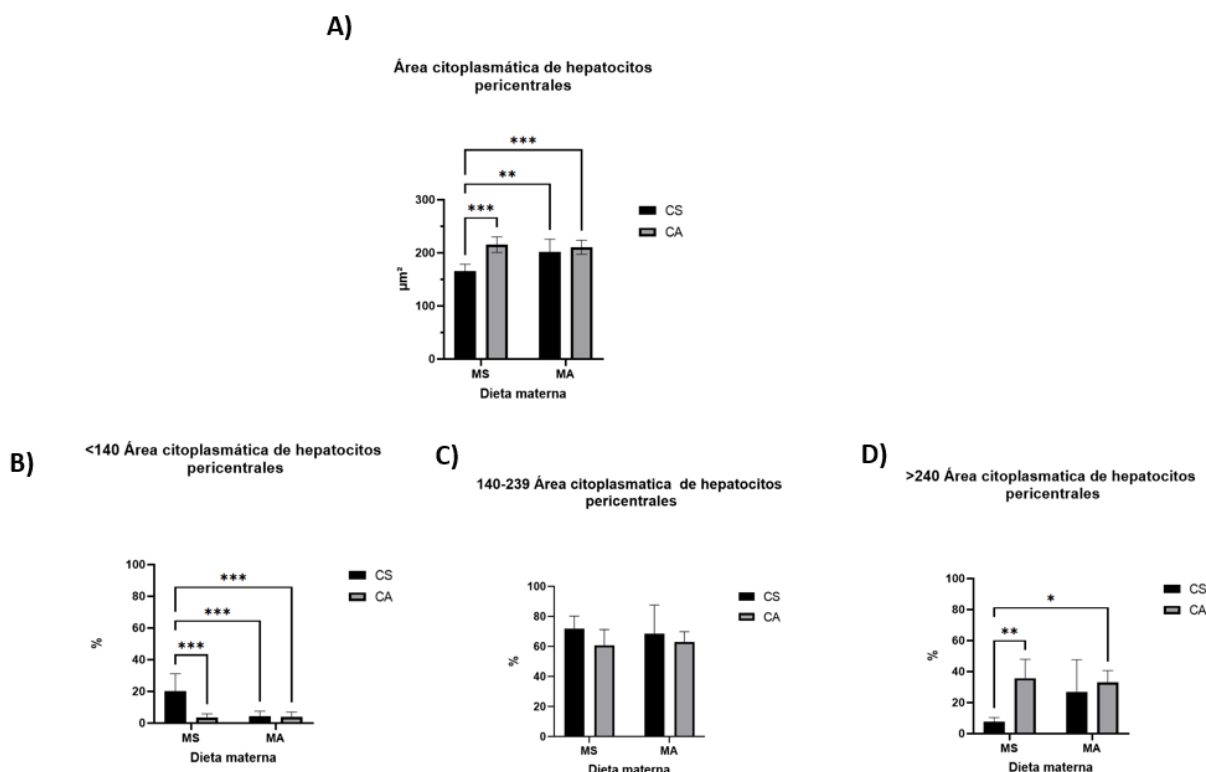


Figura 13. Área citoplasmática de los hepatocitos pericentrales. Se muestra la media \pm e.e. ANOVA de dos vías seguida de posthoc de Bonferroni *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. Madre simple- Cría simple (MS-CS), Madre simple-Cría azúcar (MS-CA), Madre azúcar-Cría simple (MA-CS), Madre azúcar-Cría-azúcar (MA-CA) $n=6$ /grupo.

Área nuclear

El área nuclear no se modificó por la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 0.6903$, $P=0.4159$) la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 2.822$, $P=0.1086$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 1.949$, $P=0.1780$) (**Figura 14 A**).

Se realizaron histogramas de distribución basados en el tamaño del área nuclear de los hepatocitos para identificar cambios en el tamaño del núcleo de los hepatocitos en los distintos grupos experimentales. Los rangos considerados abarcaron de 10 a 95 μm^2 , divididos en 3 categorías: $<25 \mu\text{m}^2$, de 25-44 μm^2 y $>45 \mu\text{m}^2$. Estos rangos se establecieron a partir de los datos del área nuclear de los hepatocitos de los grupos experimentales. Se aplicó la prueba estadística ANOVA de dos vías para cada rango obteniendo los siguientes resultados:

En el rango $<25 \mu\text{m}^2$ no muestran cambios significativos por la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 0.1971$ $P=0.6618$), por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 3.945$, $P=0.0609$) ni por la interacción de ambos

factores ($F_{(1, 20)} = 0.4623$, $P=0.5043$) (**Figura 14 B**). Los rangos de $25-44 \mu\text{m}^2$ no muestran diferencias significativas en la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 0.4376$, $P=0.5158$), por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 0.3192$, $P=0.5784$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 1.038$, $P=0.3205$) (**Figura 14 C**). El rango $>45 \mu\text{m}^2$ no muestra cambios significativos por la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 0.7535$, $P=0.3957$), por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 1.402$, $P=0.2503$) ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 1.779$, $P=0.1973$) (**Figura 14 D**).

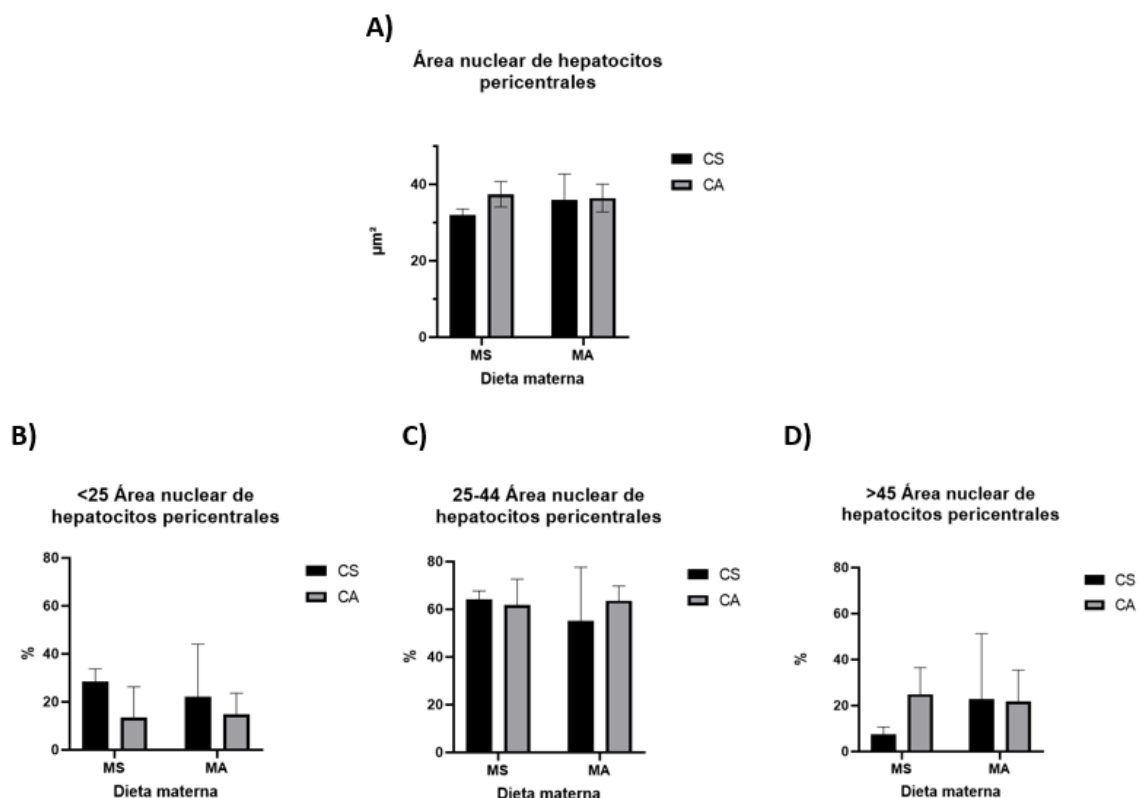


Figura 14. Área nuclear de hepatocitos pericentrales. Se muestra la media \pm e.e. No hay diferencias significativas $P>0.05$ ANOVA de dos vías. Madre simple- Cría simple (MS-CS), Madre simple-Cría azúcar (MS-CA), Madre azúcar-Cría simple (MA-CS), Madre azúcar-Cría-azúcar (MA-CA) $n=6$ /grupo.

Hepatocitos binucleados

La cuantificación de número de hepatocitos binucleados muestra diferencias significativas en relación con el factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 9.541$, $P=0.0058$) mostrando un aumento en el número de hepatocitos binucleados en los grupos provenientes de madres expuestas al consumo de azúcar durante la gestación y la lactancia, pero no existen diferencias significativas por el factor de la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 0.5364$, $P=0.4724$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 0.001014$, $P=0.9749$) (**Figura 15 A**).

Células inmunes

En el conteo de células inmunes se observan diferencias significativas por la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 15.64$, $P=0.0008$), por el factor de la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 7.280$, $P=0.0138$) y por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 10.82$ $P=0.0037$), se muestra un aumento en el número de células inmunes pericentrales en los grupos que tuvieron consumo de agua azucarada durante la etapa prenatal, posnatal o en ambas, en comparación con el grupo control. Se realizó la prueba posthoc de Bonferroni y se encontraron diferencias significativas entre los grupos (MS-CS vs MS-CA ** $P < 0.01$, MS-CS vs MA-CS y MS-CS vs MA-CA *** $P < 0.001$) (**Figura 15 B**).

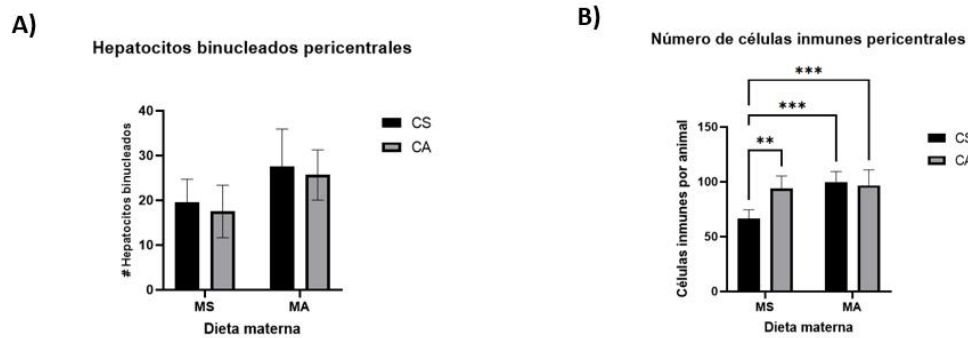
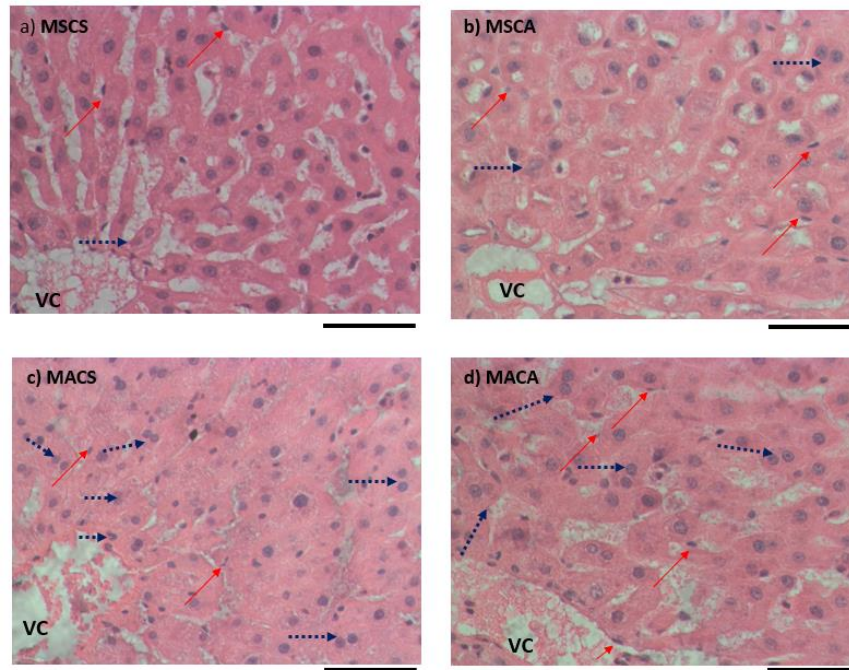


Figura 15. Número de hepatocitos binucleados y células inmunes en la zona pericentral. Se muestran zonas pericentrales de los 4 grupos experimentales, (flechas punteadas) hepatocitos binucleados, (flechas rojas) células inmunes (Kupffer), VC (vena central), Barra equivale a 50 μ m. En la gráfica se muestra la media \pm e.e. ANOVA de dos vías y pos-hoc de Bonferroni $**P<0.01$, $P<0.001$. Madre simple- Cría simple (MS-CS), Madre simple-Cría Sacarosa (MS-CA), Madre sacarosa-Cría simple (MA-CS), Madre sacarosa-Cría-Sacarosa (MA-CA) $n=6$ /grupo.

8.2.2 Zona Periportal

Área transversal

En la **figura 16** se muestran fotografías de las tinciones de hematoxilina-eosina de la zona periportal tomadas a 40X, en el grupo control (MS-CS) se pueden observar cordones hepáticos definidos, así como como una adecuada vasculatura sinusoidal. En el grupo MS-CA se observa la presencia de hepatocitos en forma de balón similar a los de la zona pericentral,

hepatocitos con grandes vesículas de grasa, además de que se pierden los cordones hepáticos. En el grupo MA-CS se pueden observar una variación en el tamaño de los núcleos, hay presencia de núcleos muy grandes y pequeños, así como hepatocitos balonizados y micro vesículas de grasa. Por último, el grupo MA-CA muestra una mayor cantidad de hepatocitos en forma de balón y macro vesículas de grasa. En la **figura 17** se muestra una ampliación a 100X que muestran hepatocitos en forma de balón y vesículas de grasa dentro de su citoplasma en los grupos experimentales (MS-CS, MA-CS y MA-CA).

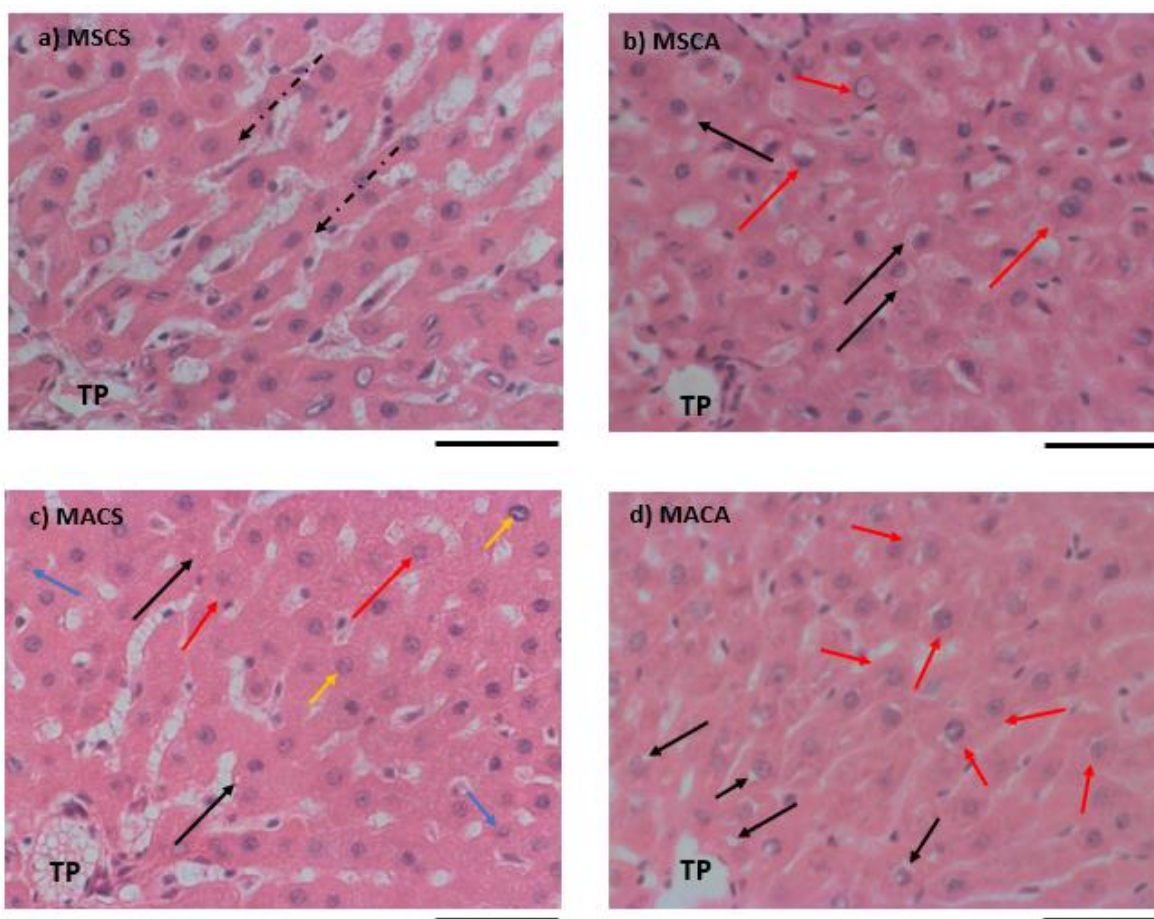


Figura 16. Cortes histológicos del hígado de la zona periportal de los grupos experimentales. Teñidos con hematoxilina- eosina. (flechas punteadas) cordones hepáticos, (flechas negras) vesículas de grasa, (flechas rojas) hepatocitos balonizados, (flechas amarillas) núcleos grandes, (flechas azules) núcleos pequeños, tríada portal (TP). Barra equivale a 50 μ m.

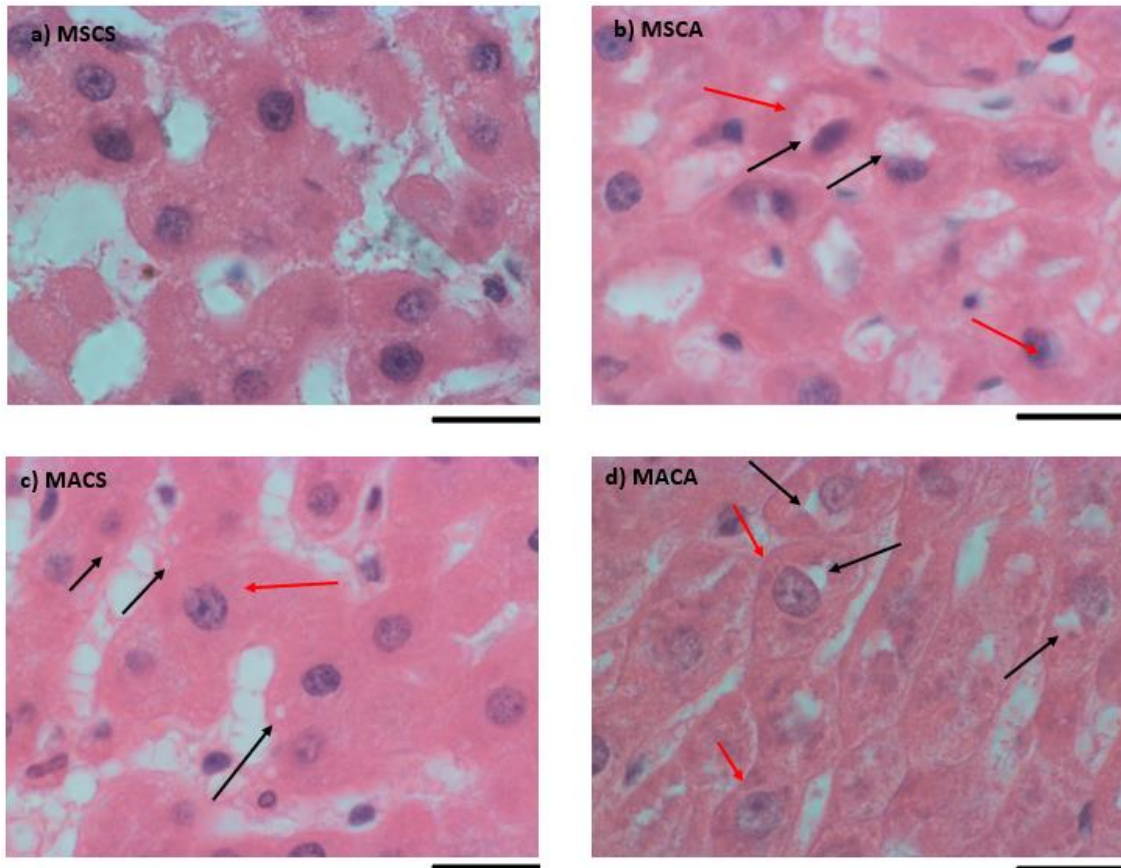


Figura 17. Cortes histológicos del hígado de la zona portal de los grupos experimentales. Se observan hepatocitos balonzados (flechas rojas), vesículas de grasa (flechas negras) Teñidos con hematoxilina- eosina. Barra equivale a 20 µm.

Los resultados del área transversal de los hepatocitos de la zona periportal, no mostraron diferencias significativas en relación con el factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)}= 3.901, P=0.0619$), pero si en relación a la dieta posnatal ($F_{(1, 20)}= 12.54 P=0.0021$) y por la interacción de ambas ($F_{(1, 20)}= 9.969, P=0.0050$) se muestra un incremento del área transversal de los hepatocitos periportales en los grupos de críos que, durante la etapa prenatal, posnatal o en ambas tuvieron el consumo de sacarosa en comparación del grupo control. Se realizó la prueba posthoc de Bonferroni y se encontraron diferencias significativas entre los grupos (MS-CS vs MS-CA *** $P<0.001$, MS-CS vs MA-CS, MS-CS vs MA-CA ** $P<0.01$) los resultados se observan en la (**Figura 18 A**).

Se realizaron histogramas de distribución basados en el tamaño del área transversal de los hepatocitos periportales para determinar si existían cambios en la distribución de los diferentes grupos experimentales. Los rangos considerados abarcaron de 80 a 480 μm^2 , divididos en 3 categorías: $<160 \mu\text{m}^2$, de $160\text{-}259 \mu\text{m}^2$ y $>260 \mu\text{m}^2$. Estos rangos fueron obtenidos a partir de los datos del área transversal de los hepatocitos periportales de los grupos experimentales. Se aplicó la prueba estadística ANOVA de dos vías para cada rango obteniendo los siguientes resultados: en el rango $<160 \mu\text{m}^2$ mostraron cambios tanto por el factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 10.15$, $P=0.0009$), por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 26.11$, $P<0.0001$) y por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 17.84$, $P=0.0004$), la prueba de posthoc de Bonferroni muestra diferencias significativas entre los grupos MS-CS vs MS-CA, MS-CS vs MA-CS y MS-CS vs MA-CA **** $P<0.0001$ (**Figura 18 B**). Los rangos de $160\text{-}259 \mu\text{m}^2$ no mostraron cambios significativos por el factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 0.1137$, $P=0.7395$), ni por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 0.7006$, $P=0.4125$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 1.761$, $P=0.1995$) (**Figura 18 C**). El rango $>260 \mu\text{m}^2$ no muestra cambios significativos por la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 1.789$, $P=0.1961$), pero si en relación con la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 4.466$, $P=0.0473$) y por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 5.384$, $P=0.0310$), la prueba pos hoc de Bonferroni muestra diferencias significativas entre los grupos MS-CS vs MS-CA * $P<0.05$ (**Figura 18 D**). Se observó que en el rango de áreas transversales periportales menores a $160 \mu\text{m}^2$, el grupo control predominó significativamente a diferencia de los grupos experimentales. En el rango de áreas transversales periportales mayores a $260 \mu\text{m}^2$, se encontró una mayor cantidad de hepatocitos de los grupos que en alguna etapa de su vida o en ambas tuvieron el consumo de agua azucarada en comparación de los hepatocitos del grupo MS-CS (**Figura 18 B, C, D**).

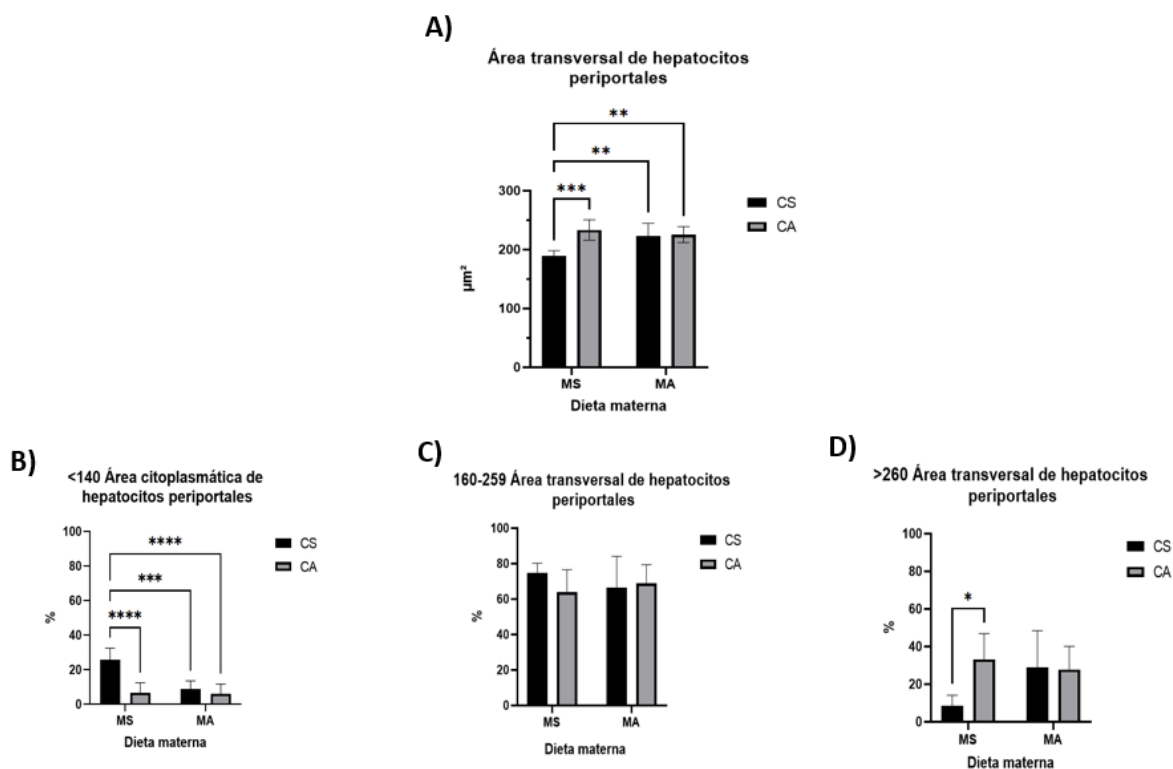


Figura 18. Área transversal de hepatocitos en la zona periportal. Se muestra la media \pm e.e. Diferencias significativas. ANOVA de dos vías y posthoc de Bonferroni **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. Madre simple- Cría simple (MS-CS), Madre simple-Cría azúcar (MS-CA), Madre azúcar-Cría simple (MA-CS), Madre azúcar-Cría-azúcar (MA-CA) $n = 6$ /grupo.

Área citoplasmática

Se observan diferencias significativas tanto por el factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 4.694$, $P = 0.0425$), por el factor de la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 11.74$ $P = 0.0027$) y por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 7.578$, $P = 0.0123$), mostrando un aumento significativo en el área citoplasmática periportal de los grupos expuestos al consumo de azúcar durante la gestación, la vida posnatal o en ambas. Se realizó la prueba posthoc de Bonferroni y se encontraron diferencias significativas entre los grupos (MS-CS vs MA-CS * $P < 0.05$, MS-CS vs MS-CA, MS-CS vs MA-CA ** $P < 0.01$) (Figura 19 A).

Se realizaron histogramas de distribución basados en el tamaño del área citoplasmática de los hepatocitos periportales para identificar cambios en su distribución de los distintos grupos experimentales. Los rangos considerados abarcaron de 60 a 400 μm^2 , divididos en 3 categorías: $<140 \mu\text{m}^2$, de $140\text{-}219 \mu\text{m}^2$ y $>220 \mu\text{m}^2$. Estos rangos se establecieron a partir de los datos del área citoplasmática de los hepatocitos periportales de los grupos experimentales. Se aplicó la prueba estadística ANOVA de dos vías para cada rango obteniendo los siguientes resultados: En el rango $<140 \mu\text{m}^2$ muestran cambios tanto por el factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 13.67$, $P=0.0014$), por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 13.67$, $P=0.0002$) y por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 12.06$, $P=0.0024$), la prueba de pos hoc de Bonferroni muestra diferencias significativas en los grupos MS-CS vs MS-CA, MS-CS vs MA-CA **** $P=<0.0001$, MS-CS vs MA-CS *** $P=<0.001$ (**Figura 19 B**). Los rangos de $140\text{-}219 \mu\text{m}^2$ no muestran diferencias significativas en la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 2.211$, $P=0.1527$), por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 3.196$, $P=0.0890$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 0.2603$, $P=0.6155$) (**Figura 19 C**). El rango $>220 \mu\text{m}^2$ no muestra cambios significativos por la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 0.2815$, $P=0.6015$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 1.419$, $P=0.2475$), pero sí por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 12.19$, $P=0.0023$), la prueba posthoc de Bonferroni muestra diferencias significativas entre los grupos MS-CS vs MS-CA * $P=<0.05$ (**Figura 19 D**). Se observó que en el rango de áreas citoplasmáticas menores a $140 \mu\text{m}^2$, el grupo control predominó significativamente, a diferencia de los grupos experimentales que se presentaban en menor cantidad. En el rango de áreas citoplasmáticas de $>220 \mu\text{m}^2$, se encontró un mayor porcentaje de hepatocitos en los grupos experimentales y una menor representación de hepatocitos del grupo MS-CS (**Figura 19 B-D**).

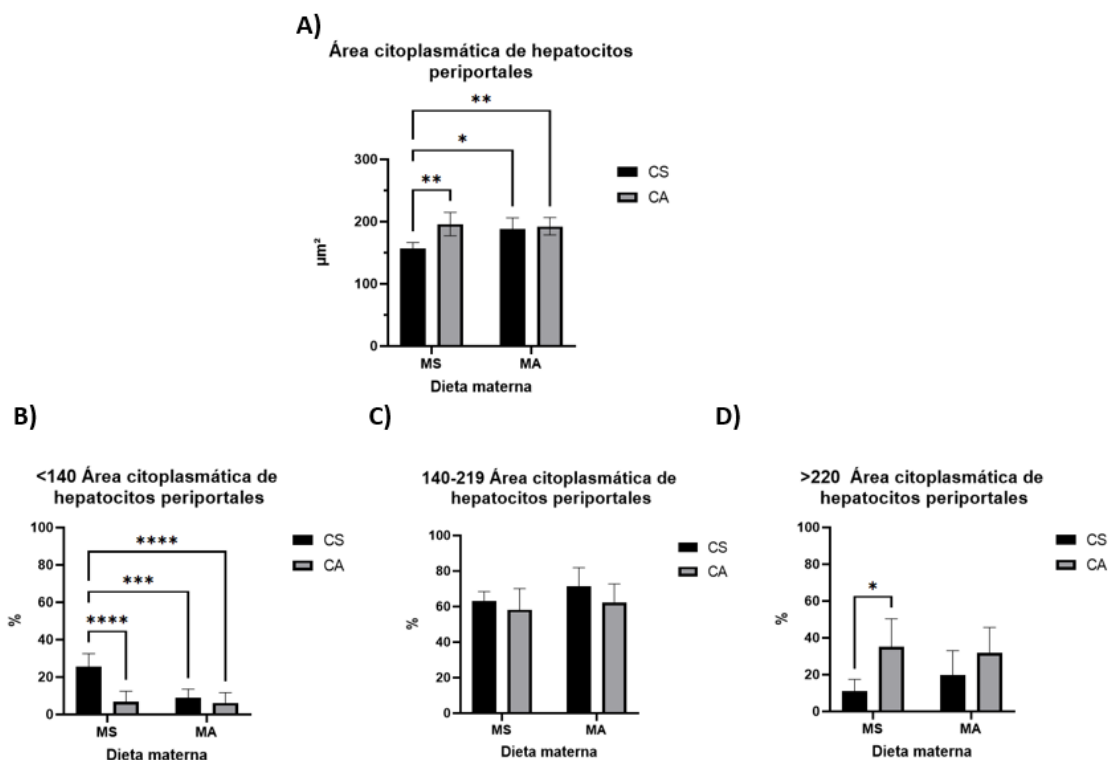


Figura 19. Área citoplasmática de hepatocitos en la zona periportal. Se muestra la media \pm e.e. Diferencias significativas. ANOVA de dos vías y posthoc de Bonferroni **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. Madre simple- Cría simple (MS-CS), Madre simple-Cría azúcar (MS-CA), Madre azúcar-Cría simple (MA-CS), Madre azúcar-Cría-azúcar (MA-CA) $n=6$ /grupo.

Área nuclear

No se encontraron diferencias significativas en relación con el factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 0.1328$, $P=0.7193$), ni por el factor de la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 0.8008$, $P=0.3815$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 2.507$, $P=0.1290$) (**Figura 20 A**).

Se realizaron histogramas de distribución basados en el tamaño del área nuclear de los hepatocitos para identificar cambios su distribución de los diferentes grupos experimentales. Los rangos considerados abarcaron de 10 a 85 μm^2 , divididos en 3 categorías: $<20 \mu\text{m}^2$, de 20-44 μm^2 y $>45 \mu\text{m}^2$. Estos rangos se establecieron a partir de los datos del área nuclear de los hepatocitos periportales de los grupos experimentales. Se aplicó la prueba estadística ANOVA de dos vías para cada rango obteniendo los siguientes resultados:

En el rango $<20 \mu\text{m}^2$ no se observaron cambios significativos por el efecto de la dieta

materna ($F_{(1, 20)} = 0.5400$, $P=0.4710$), la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 1.100$, $P=0.3068$) ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 0.326$, $P=0.8585$) (**Figura 20 B**). En los rangos de 25-44 μm^2 tampoco se encontraron diferencias significativas debido a la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 0.00087$, $P=0.9767$), la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 2853$, $P=0.5991$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 3.918$, $P=0.0617$) (**Figura 20 C**). El rango $>45 \mu\text{m}^2$ no hubo cambios significativos por el efecto de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 0.3947$, $P=0.7575$), la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 0.5887$, $P=0.4476$) ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 1.999$, $P=0.1301$), (**Figura 20 D**).

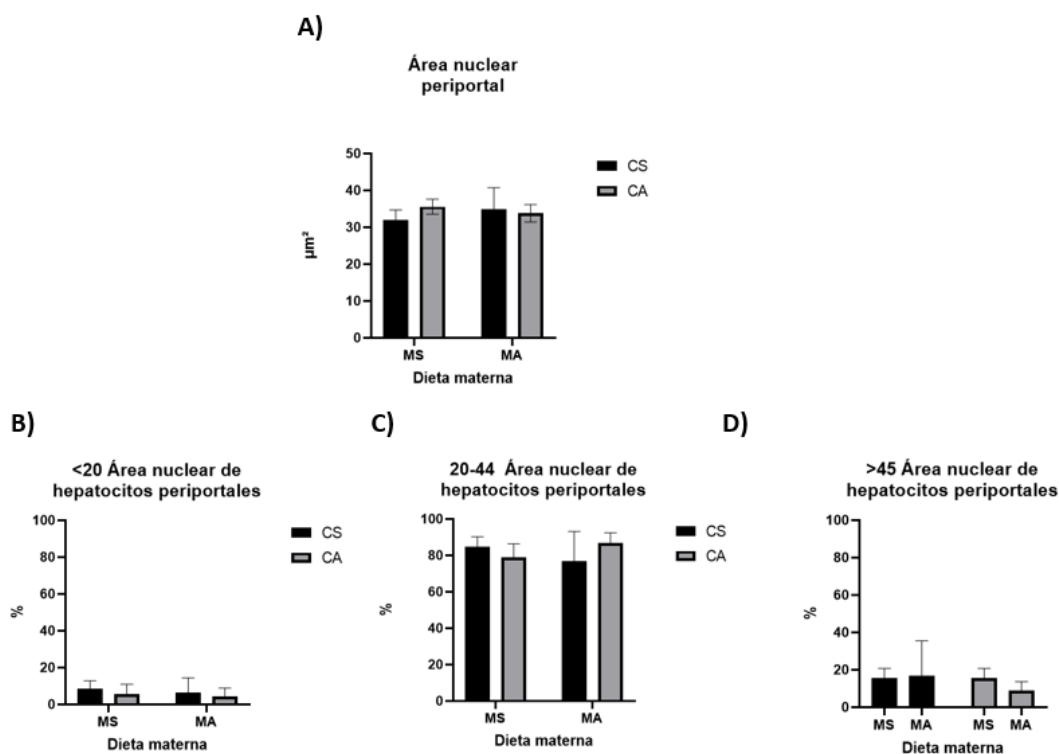


Figura 20. Área nuclear de hepatocitos en la zona periportal. Se muestra la media \pm e.e. No hay diferencias significativas $P>0.05$ ANOVA de dos vías, posthoc de Bonferroni. Madre simple- Cría simple (MS-CS), Madre simple-Cría azúcar (MS-CA), Madre azúcar-Cría simple (MA-CS), Madre azúcar-Cría-azúcar (MA-CA) $n=6/\text{grupo}$.

Hepatocitos binucleados

Se observan diferencias significativas por el factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 9.358$, $P=0.0062$), pero no por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 1.270$, $P=0.2731$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 1.095$, $P=0.3078$). Se muestra un incremento en el número de

hepatocitos binucleados en los grupos de críos de madres expuestas al consumo de azúcar durante la gestación y la lactancia en comparación con el grupo control. Pero no existe diferencias por el factor de la dieta posnatal. Se realizó la prueba posthoc de Bonferroni y se encontraron diferencias significativas entre los grupos (MS-CS vs MA-CA y MS-CA vs MA-CA *P <0.05) (**Figura 21 A**).

Células inmunes

Se muestran diferencias significativas por el factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 16.54$, $P=0.0006$), por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 6.375$, $P=0.0201$) y por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 20)} = 13.27$, $P=0.0016$). Se observa un aumento en los grupos que tuvieron un consumo de sacarosa durante la etapa prenatal, posnatal o en ambas, en comparación con el grupo MS-CS. Se realizó la prueba posthoc de Bonferroni y se encontraron diferencias significativas entre los grupos: (MS-CS vs MS-CA **P <0.01, MS-CS vs MA-CS y MS-CS vs MA-CA ***P=0.001) (**Figura 21 B**).

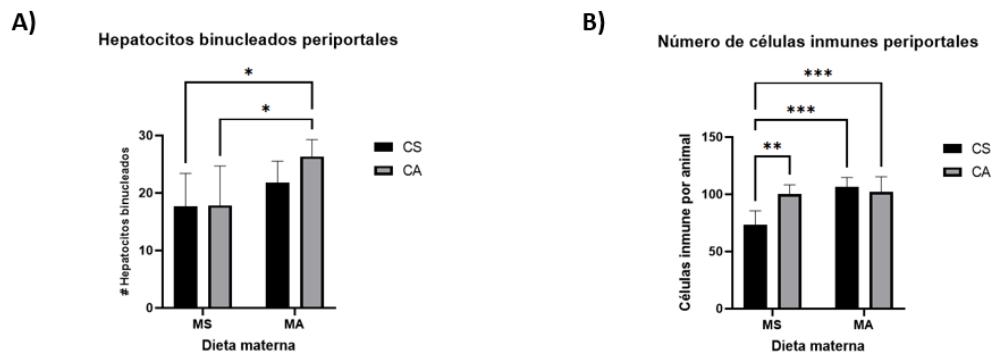
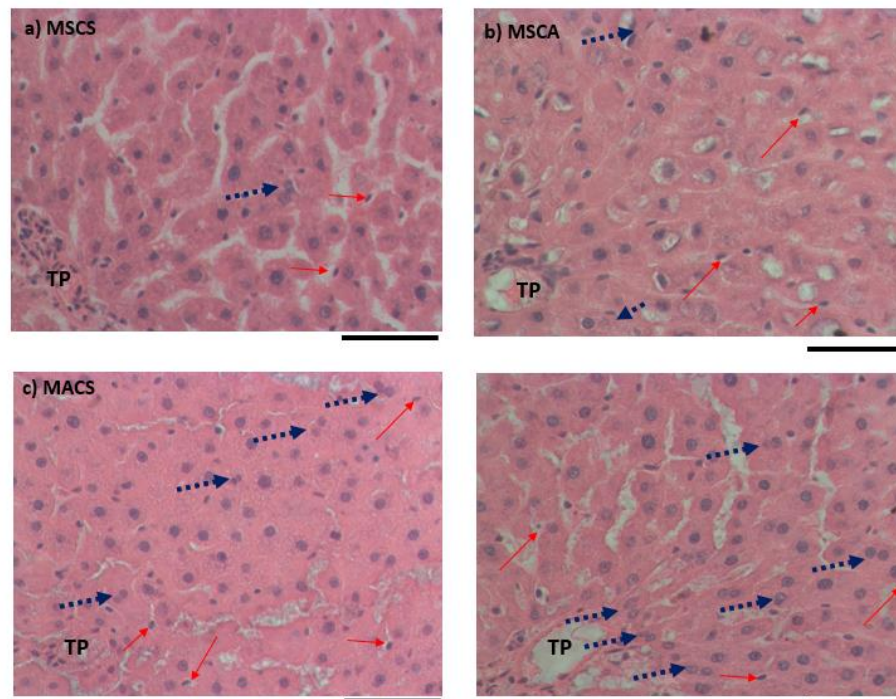


Figura 21. Número de hepatocitos binucleados y células inmunes en la zona periportal. Se muestran zonas periportales de los 4 grupos experimentales, (flechas punteadas) hepatocitos binucleados, (flechas rojas) células inmunes (Kupffer), TP (triada portal), Barra equivale a 50 μ m. En la gráfica se muestra la media \pm e.e. ANOVA de dos vías seguida de posthoc de Bonferroni * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Madre simple- Cría simple (MS-CS), Madre simple-Cría Sacarosa (MS-CA), Madre sacarosa-Cría simple (MA-CS), Madre sacarosa-Cría-Sacarosa (MA-CA) $n=6$ /grupo.

8.3 Número de mastocitos

Se observan cambios significativos por la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 7.450$, $P=0.0129$), por la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 14.60$, $P=0.0011$), pero no por la interacción ($F_{(1, 20)} = 1.623$, $P=0.2173$). Se muestra un incremento en el número de mastocitos en los grupos que durante la etapa prenatal y posnatal tuvieron un consumo de sacarosa. La prueba de posthoc Bonferroni muestra diferencias significativas entre el grupo MS-CS vs MACA *** $P=0.001$ (Figura 23).

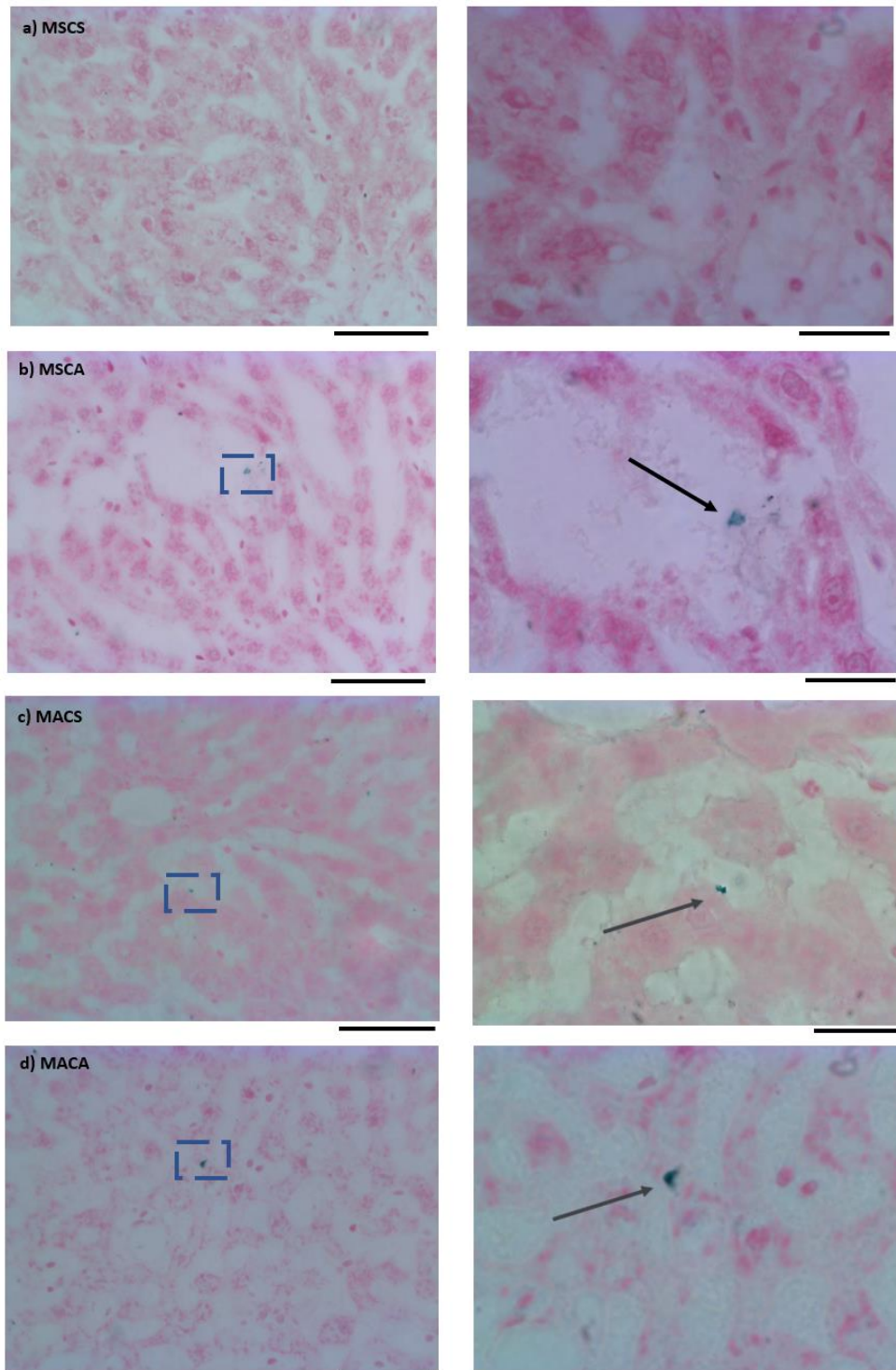


Figura 22. Cortes histológicos del hígado de los diferentes grupos experimentales teñidos con azul de alcian. Las líneas punteadas indican la presencia de mastocitos en el tejido hepático (40x). A la derecha, se presentan aumentos adicionales de los recuadros punteados (flecha negra) mastocitos, proporcionando una vista ampliada (100x). Barra equivalente a 50 y 20 μm respectivamente.

Número de mastocitos en hígado

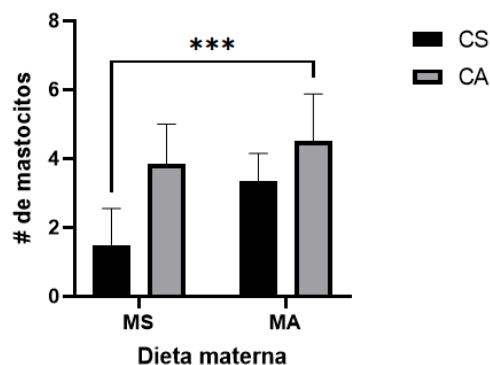


Figura 23. Número de mastocitos. Se muestra la media \pm e.e. ANOVA de dos vías y posthoc de Bonferroni ***P=0.001. Madre simple- Cría simple (MS-CS), Madre simple-Cría azúcar (MS-CA), Madre azúcar-Cría simple (MA-CS), Madre azúcar-Cría-azúcar (MA-CA) n=6/grupo.

8.4 Colágeno

En el estudio ciego realizado en las fotografías tomadas de la zona pericentral para evaluar la cantidad de colágeno en el tejido hepático, de acuerdo con los promedios obtenidos se evidencia que el grupo MA-CA tiene poca presencia de colágeno (1= poco) a diferencia del resto de los grupos, que no muestran la presencia de fibras de colágeno. Este hallazgo sugiere una posible diferenciación en la deposición de colágeno en este grupo.

A continuación, se presenta una la tabla con los promedios obtenidos de cada grupo experimental de la tinción tricrómica de Masson:

Tabla 1. Escalas de presencia de fibras de colágeno en la zona pericentral de los diferentes grupos experimentales.

	CENTRAL			
	MS-CS	MS-CA	MA-CS	MA-CA
0 Nada	46/48	43/48	42/48	19/48
1 Poco	2/48	4/48	5/48	24/48
2 Moderado	0/48	1/48	1/48	4/48
3 Abundante	0/48	0/48	0/48	1/48
Promedio	0	0	0	1

El siguiente panel de fotografías muestra la presencia de fibras de colágeno en los diferentes grupos experimentales. En los grupos MS-CS, MS-CA y MA-CS, las fibras de colágeno se observan únicamente alrededor de las venas centrales, lo cual se considera una disposición normal. Sin embargo, en el grupo MA-CA, se observó colágeno también entre los hepatocitos, lo que podría indicar el inicio de un proceso de fibrosis.

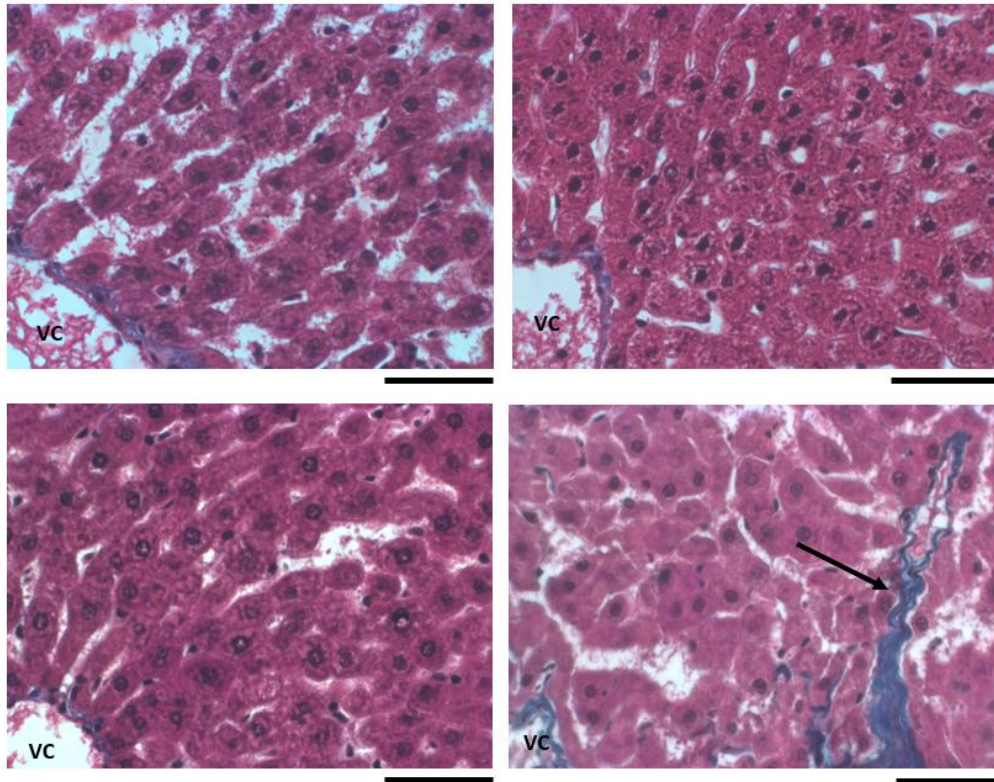


Figura 24. Cortes histológicos de la zona pericentral del hígado de los grupos experimentales, teñidas con la tinción Tricrómica de Masson, tomadas a 40x. Vena central (VC), fibras de colágeno señaladas con flechas negras. Barra equivale a 50 μ m.

En los resultados de la presencia de colágeno de la zona periportal son similares a la zona pericentral, los promedios obtenidos indican que el grupo MA-CA presenta una baja presencia de colágeno (1=poco), mientras que en los demás grupos no se detectaron fibras de colágeno.

A continuación, se presenta una tabla con los promedios obtenidos de cada grupo experimental mediante la tinción tricrómica de Masson.

Tabla 2. Escalas de presencia de fibras de colágeno en la zona periportal de los diferentes grupos experimentales.

CENTRAL				
	MS-CS	MS-CA	MA-CS	MA-CA
0 Nada	45/48	45/48	43/48	27/48
1 Poco	3/48	2/48	4/48	18/48
2 Moderado	0/48	1/48	1/48	3/48
3 Abundante	0/48	0/48	0/48	0/48
Promedio	0	0	0	1

Se muestra un panel de fotografías de los diferentes grupos experimentales, teñidos con tricrómica de Masson, los grupos MS-CS, MS-CA y MA-CS muestran la presencia de fibras de colágeno alrededor de las triadas portales, lo cual es un hallazgo normal. Sin embargo, en el grupo MA-CA, se observan fibras de colágeno entre los hepatocitos, lo que no se presenta en los demás grupos.

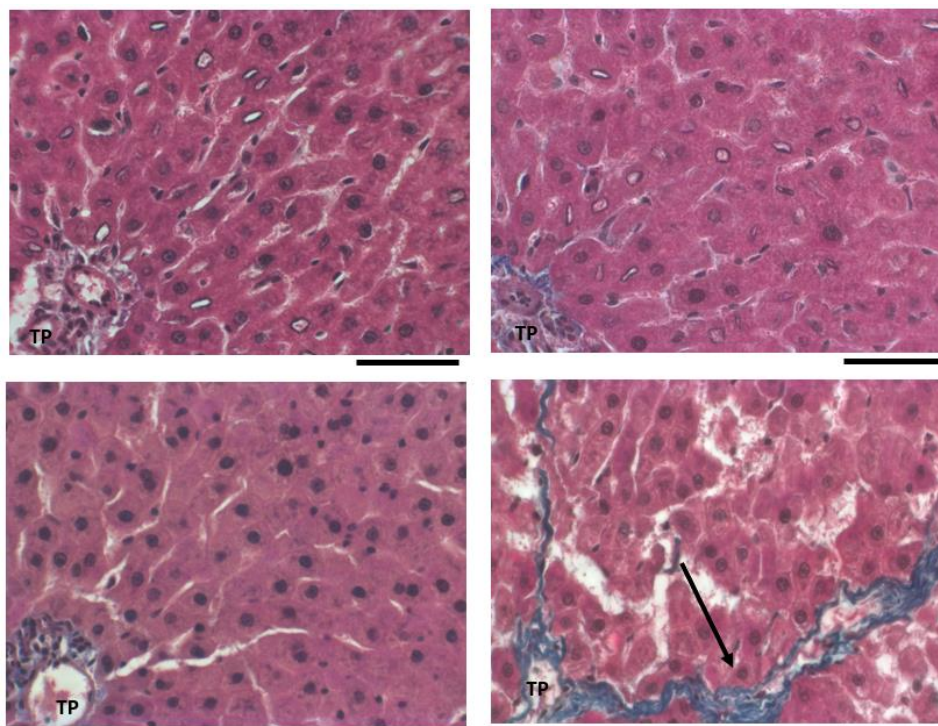


Figura 25. Cortes histológicos de la zona periportal del hígado de los grupos experimentales, teñidas con la tinción Tricrómica de Masson tomadas a 40x. Triada portal (TP), fibras de colágeno señaladas con flechas negras. Barra equivale a 50 µm.

8.5 Presencia de glucógeno

Zona pericentral

En el estudio ciego realizado con las fotografías teñidas con ácido peryódico de Shift (PAS) de los diferentes grupos experimentales, se calculó un promedio basado en los valores asignado a cada fotografía (48 fotografías por grupo). De acuerdo con los promedios obtenidos, el grupo MA-CA mostró una escala de 3 (abundante presencia de gránulos de glucógeno), evidenciando visualmente una mayor presencia de glucógeno en la zona pericentral en comparación con los otros grupos. Los grupos MS-CA y MA-CS presentaron una escala de 2 (moderada presencia de gránulos de glucógeno, mientras que el grupo control obtuvo una escala de 1 (poca presencia de gránulos de glucógeno) (Tabla 3).

Estos resultados se interpretan de manera cualitativa, proporcionando una perspectiva inicial con una muestra de n=3 animales. Estos hallazgos sugieren diferencias en la presencia de glucógeno entre los grupos experimentales. A continuación, se muestra un cuadro descriptivo con las escalas utilizadas conjuntamente con las observaciones de los participantes.

Tabla 3. Escalas de presencia de gránulos de glucógeno en la zona pericentral de los diferentes grupos experimentales.

CENTRAL				
	MS-CS	MS-CA	MA-CS	MA-CA
0 Nada	3/24	0/24	0/24	0/24
1 Poco	18/24	5/24	4/24	0/24
2 Moderado	3/24	16/24	10/24	11/24
3 Abundante	0/24	3/24	10/24	13/24
Promedio	1	2	2	3

La presencia de gránulos de glucógeno dentro del citoplasma se observa en las siguientes fotografías representativas de los grupos experimentales de la zona pericentral del hígado teñidas con ácido peryódico de Shift (PAS) (**Figura 26**). A la derecha de cada fotografía se puede observar la vena central, en el grupo control (MS-CS), se nota una escasa presencia de gránulos de glucógeno en el citoplasma de muy pocos hepatocitos, se pueden apreciar alguno

cordones hepáticos y sinusoides. En el grupo MS-CA se observan gránulos de glucógeno presentes a la periferia de los hepatocitos los cuales recubren una parte del citoplasma, el grupo MA-CS muestran una cantidad moderada de hepatocitos cubiertos por gránulos de glucógeno en su totalidad y, por último, el grupo MA-CA denota una mayor cantidad de hepatocitos cubiertos en su totalidad incluidos los núcleos de los hepatocitos por este polisacárido, además de que la coloración es más intensa. Esta diferencia muestra que el consumo de agua azucarada durante la etapa prenatal y posnatal favorecen en la acumulación de glucógeno.

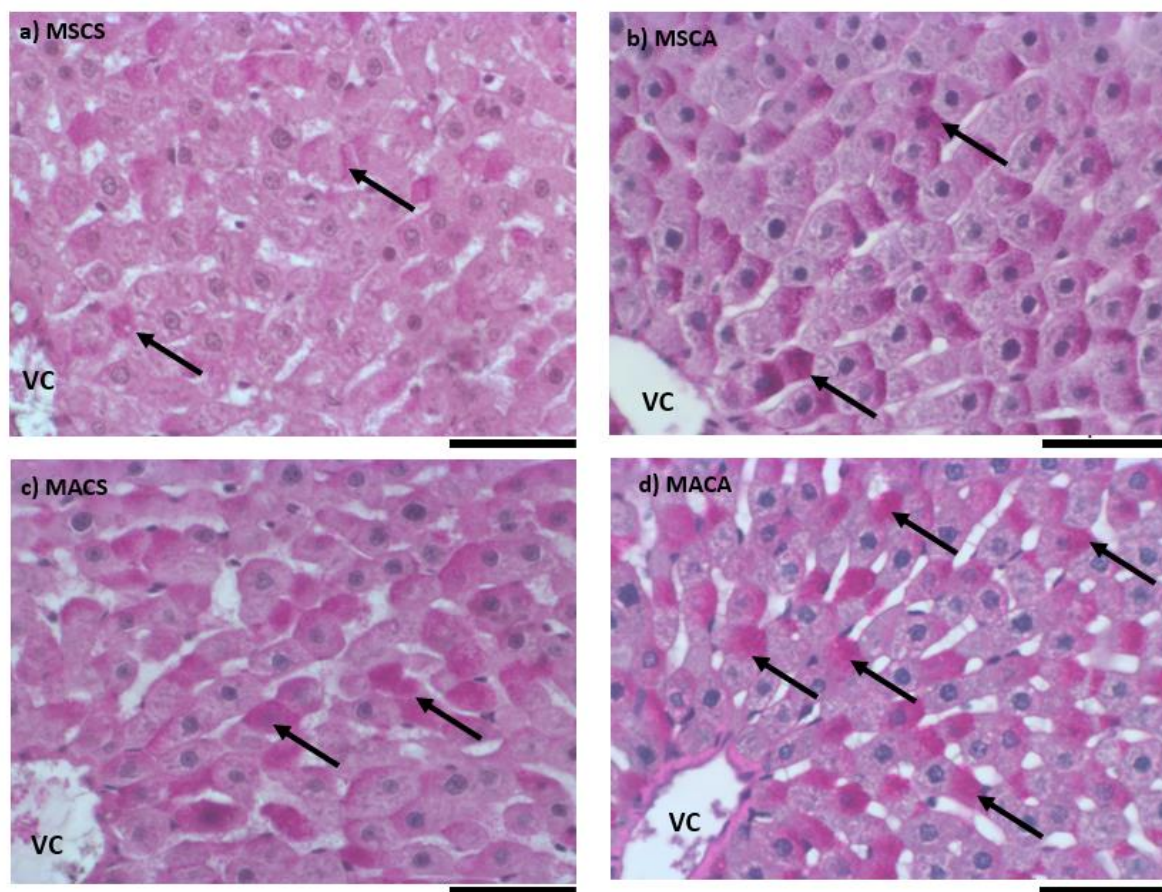


Figura 26. Cortes histológicos del hígado de la zona pericentral de los grupos experimentales tomadas a 40x teñidos con PAS. Vena central (VC), hepatocitos con gránulos de glucógeno (flechas negras). Barra equivale a 50 μ m.

Zona periportal

El análisis de la zona periportal muestra que los grupos MS-CA, MA-CS y MA-CA tienen un promedio de 2 (moderada presencia de glucógeno), mientras que el grupo control obtuvo un promedio de 1 (poca presencia de glucógeno) (Tabla 4). Estos resultados sugieren que el consumo de sacarosa en alguna etapa de la vida aumenta ligeramente la cantidad de glucógeno en la zona periportal en comparación con el grupo control. A continuación, se muestra un cuadro descriptivo con las escalas utilizadas conjuntamente con las observaciones de los participantes.

Tabla 4. Escalas de presencia de gránulos de glucógeno en la zona periportal de los diferentes grupos experimentales.

PORTAL				
	MS-CS	MS-CA	MA-CS	MA-CA
0 Nada	5/24	0/24	0/24	0/24
1 Poco	16/24	3/24	10/24	14/24
2 Moderado	3/24	12/24	9/24	8/24
3 Mucho	0/24	9/24	5/24	2/24
Promedio	1	2	2	2

En las siguientes fotografías representativas de la zona periportal del hígado proveniente de los diferentes grupos experimentales se observan los gránulos de glucógeno dentro del citoplasma de los hepatocitos teñidos con ácido peryódico de shift (PAS) (**Figura 27**). La zona periportal del acino hepático no se encarga del almacenamiento de glucógeno, sin embargo, existen diferencias visibles en la cantidad de gránulos de glucógeno entre el grupo MS-CS y los grupos experimentales. El grupo control muestra una mínima cantidad de gránulos de glucógeno en muy pocos hepatocitos de la zona periportal, además de que su coloración es muy tenue; por otro lado, los grupos experimentales MS-CA, MA-CS y MA-CA denotan una moderada cantidad de hepatocitos con gránulos de glucógeno los cuales se encuentran únicamente a la periferia de los hepatocitos sin recubrir por completo a las células.

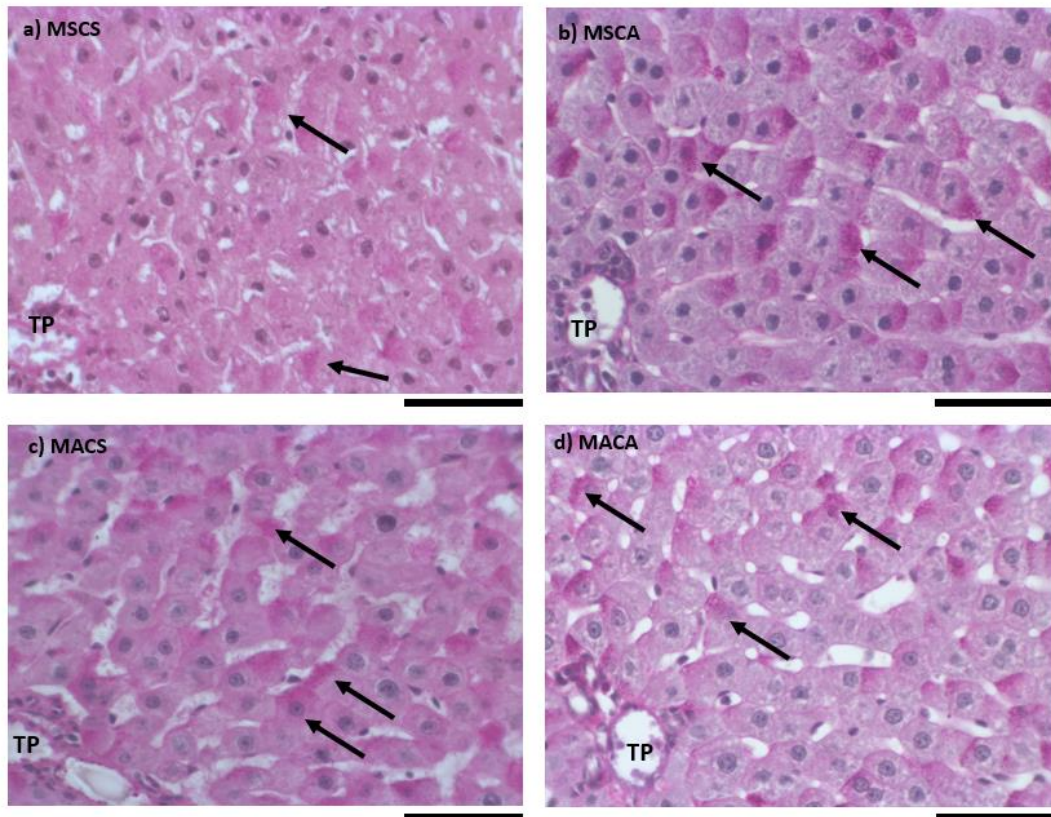


Figura 27. Cortes histológicos del hígado de la zona periportal de los grupos experimentales tomadas a 40x teñidos con Ácido periódico de Shift (PAS). Triada portal (TP), hepatocitos con gránulos de glucógeno (flechas negras). Barra equivale a 50 μ m.

8.6 Triglicéridos séricos

No se muestran diferencias significativas en los triglicéridos séricos debido al factor de la dieta posnatal ($F_{(1, 20)} = 3.785$, $P=0.0659$). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas debido al factor de la dieta materna ($F_{(1, 20)} = 6.843$, $P=0.0166$) y por la interacción entre ambos factores ($F_{(1, 20)} = 6.040$, $P=0.0232$). La prueba de pos hoc de Bonferroni mostró diferencias significativas entre los grupos (MS-CS vs MS-CA, MS-CA VS MA-CS Y MA-CS VS MA-CA $P<0.05$) (**Figura 28**).

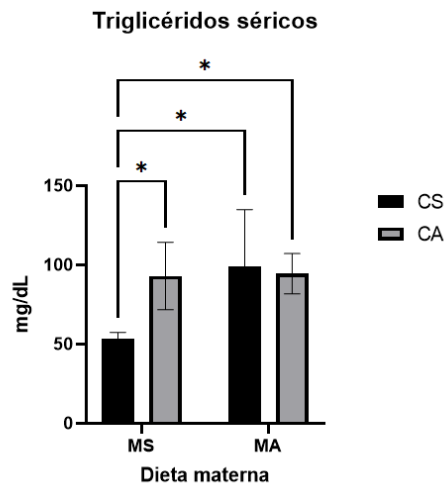


Figura 28. Análisis de triglicéridos séricos. Se muestra la media \pm e.e. ANOVA de dos vías seguida de pos-hoc de Bonferroni * $P < 0.05$. Madre simple- Cría simple (MS-CS), Madre simple-Cría azúcar (MS-CA), Madre azúcar-Cría simple (MA-CS), Madre azúcar-Cría-azúcar (MA-CA) $n = 6$ /grupo.

8.7 Estrés oxidativo

Sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS)

El análisis de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico reveló diferencias significativas relacionadas con la dieta materna ($F_{(1, 16)} = 431.6$, $P < 0.0001$), indicando un incremento en los grupos de críos de madres expuestas al consumo de azúcar durante la gestación y la lactancia a diferencia del grupo control. Por otro lado, el factor de la dieta posnatal no mostró cambios estadísticamente relevantes ($F_{(1, 16)} = 3.501$, $P = 0.0797$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 16)} = 0.04596$, $P = 0.8330$). Se realizó la prueba posthoc de Bonferroni para la comparación entre grupos, mostrando diferencias significativas entre los grupos (MS-CS vs MA-CS, MS-CS vs MA-CA, MS-CA vs MA-CS y MS-CA vs MA-CA **** $P < 0.0001$) (Figura 29 A).

Catalasas

Se observan diferencias significativas debido al efecto de la dieta materna ($F_{(1, 16)} = 30.39$; $P < 0.0001$), mostrando un incremento en la actividad de catalasas en los grupos de críos de madres expuestas al consumo de azúcar durante gestación y la lactancia. El factor de la dieta posnatal no mostró cambios estadísticamente significativos ($F_{(1, 16)} = 2.332$; $P = 0.1463$), ni la interacción de ambos factores ($F_{(1, 16)} = 2.026$, $P = 0.1738$). Se realizó la prueba posthoc de

Bonferroni para la comparación entre grupos, mostrando diferencias significativas entre los grupos (MS-CS vs MA-CA y MS-CA vs MA-CA ***P=0.001) (**Figura 29 B**).

Superóxido dismutasa (SOD)

Se encontraron cambios significativos por el factor de la dieta materna ($F_{(1, 16)}=316.2$; $P<0.0001$), mostrando un aumento de la actividad de superóxido dismutasa de los grupos de críos de madres expuestas al consumo de sacarosa durante la vida prenatal a diferencia del grupo control. El factor de la dieta posnatal no mostró cambios estadísticamente significativos ($F_{(1, 16)}=0.05280$; $P=0.8212$), ni por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 16)}=0.0004183$, $P=0.9839$). Se realizó la prueba posthoc de Bonferroni para la comparación entre grupos, mostrando diferencias significativas entre los grupos (MS-CS vs MA-CS y MS-CS vs MA-CA, MS-CA VS MA-CS Y MS-CA VS MA-CA ****P <0.0001) (**Figura 29 C**).

Glutación

Se observan diferencias significativas por el factor de la dieta materna ($F_{(1, 16)}=431.6$; $P<0.0001$), mostrando un incremento en la actividad de glutación en los grupos de críos de madres que estuvieron expuestas al consumo de agua azucarada durante la vida prenatal en comparación con el grupo de madres simple. No se observaron cambios estadísticamente significativos debido a la dieta posnatal ($F_{(1, 16)}=3.501$; $P=0.0797$), ni por la interacción entre ambos factores ($F_{(1, 16)}=0.04600$; $P=0.8329$). La prueba posthoc de Bonferroni reveló diferencias significativas entre los grupos (MS-CS vs MA-CS y MS-CS vs MA-CA, MS-CA VS MA-CS Y MS-CA VS MA-CA ****P <0.0001) (**Figura 29 D**).

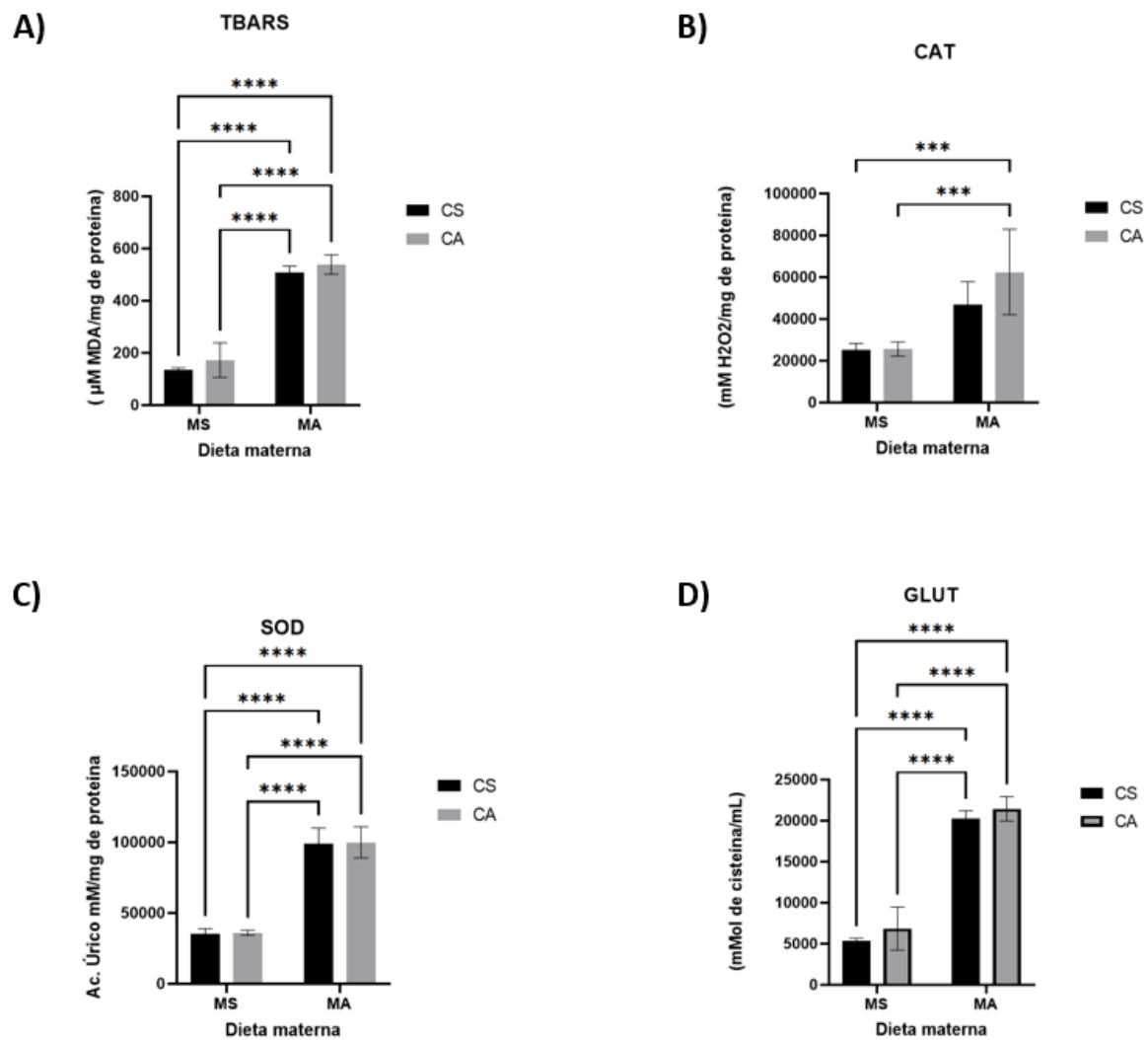


Figura 29. Análisis de estrés oxidativo en hígado. Se muestra la media \pm e.e. ANOVA de dos vías seguida de posthoc de Bonferroni ****P <0.0001, ***P<0.001. Madre simple- Cría simple (MS-CS), Madre simple-Cría azúcar (MS-CA), Madre azúcar-Cría simple (MA-CS), Madre azúcar-Cría-azúcar (MA-CA) n=5/grupo.

9. DISCUSIÓN

Las ventanas críticas del desarrollo, caracterizadas por la exposición temprana a la sacarosa, desencadenan modificaciones en el hígado de la progenie. Además, la continuidad de este consumo durante la vida posnatal profundiza estas alteraciones, lo que refleja cambios significativos en la histología hepática, así como cambios bioquímicos.

La cuantificación de triglicéridos séricos mostró cambios significativos entre los grupos experimentales de los críos. Estudios previos han demostrado que las dietas altas en carbohidratos y lípidos pueden incrementar los valores de triglicéridos en suero (Poudyal y cols. 2012), lo cual indica un impacto metabólico asociado al consumo de sacarosa. Sin embargo, el peso del hígado no mostró variaciones significativas debido al consumo de azúcar durante la etapa prenatal, posnatal o en ambas, pero la histología hepática si se vio modificada. La dieta materna es un factor ambiental que tiene un impacto directo en el desarrollo del hígado del feto y del recién nacido. Durante el embarazo, la dieta materna suministra los nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo del feto. La calidad y cantidad de los nutrientes ingeridos por la madre pueden influir en la programación metabólica del feto, afectando su salud a largo plazo (Li y cols. 2015). Estudios han demostrado que tanto la sobrealimentación como la desnutrición materna durante el embarazo confieren una mayor susceptibilidad al desarrollo de EHGNA. Algunos estudios en animales han confirmado que la descendencia de madres alimentadas con una dieta alta en grasas tiene un aumento en la masa corporal y la adiposidad, la descendencia de estas madres mostró acumulación de triglicéridos hepáticos y gotas de lípidos en el hígado, los cuales son indicativos de esteatosis hepática, sin embargo, estos efectos no siempre persisten hasta la vida adulta, sugiriendo una influencia crítica del entorno posnatal (Lynch y cols. 2017). Por otro lado, se ha demostrado que la combinación de una dieta alta en grasas durante la gestación con una dieta similar en la etapa posnatal puede incrementar la severidad de la esteatosis hepática y promover la progresión a esteatohepatitis, incluyendo fibrosis (Bruce y cols. 2009). Nuestros animales experimentales mostraron cambios significativos en la histología hepática, la presencia de colágeno, glucógeno y células inmunes, las cuales fueron analizadas en la zona pericentral y periportal del acino hepático; así como en la cuantificación de mastocitos y expresión de marcadores de estrés oxidativo, modificados por ambas dietas, ya que los efectos pueden ser acumulativos y persistentes a lo largo de la vida.

En la zona pericentral, se evidenció un incremento en el área transversal de las células hepáticas en los grupos que, durante la etapa gestacional, posnatal o en ambas, tuvieron un consumo de agua azucarada. Las funciones de los hepatocitos de la zona pericentral se encargan principalmente del almacenamiento de glucógeno y de lípidos (Cunningham y cols. 2021); se conoce que una mayor disponibilidad de carbohidratos en el organismo puede desencadenar un incremento en la síntesis de *novo*, ya que los carbohidratos son una fuente indispensable para la producción de triglicéridos (Softic y cols. 2016). Esta síntesis es llevada a cabo en el citoplasma de los hepatocitos, por ello es probable que los animales que consumieron sacarosa hayan mostrado este incremento. Nicolas en el 2017 demostró que, en crías de ratas con desnutrición proteica, el consumo de agua azucarada durante la etapa posnatal provocó un aumento en el área transversal de los hepatocitos, observándose este efecto tanto en hembras como en machos (Nicolas y cols. 2017). En nuestro estudio los grupos experimentales evidenciaron un mayor porcentaje de hepatocitos en los rangos $> 260 \mu\text{m}$, se conoce que un aumento en el tamaño de los hepatocitos en la zona pericentral no se debe únicamente a una mayor actividad metabólica, también puede ser una respuesta a la regeneración hepática debido a un daño o alguna lesión (Ríos-López y cols. 2020). Los hepatocitos pericentrales expresan Axina 2 y el factor transcripcional Tbx3, los cuales son indispensables para el crecimiento celular, la diferenciación y la proliferación celular (Wang y cols. 2015).

En el citoplasma de los hepatocitos de los animales de estudio se observan micro y macro vesículas de grasa, lo cual podría ser un estadio de la EHGNA, debido al incremento de la síntesis de triglicéridos por una mayor disponibilidad de azúcares en el hígado, un estudio en ratones alimentados durante la etapa prenatal y posnatal con una dieta obesogénica (alta en grasas y azúcares simples) mostraron un incremento de vesículas de grasas, las crías provenientes de madres con la dieta obesogénica exacerbaban aún más el daño a nivel histológico (Mouralidarane y cols. 2013), en el estudio de Bayol (2010) también evidencia que el grupo procedente de una dieta prenatal y posnatal de “*junk food*” tiene un mayor daño a nivel histológico por la presencia de vesículas de grasa dentro del citoplasma de los hepatocitos, sin embargo, ambos estudios no se centran únicamente en la zona pericentral, pero el daño del aumento de las vesículas de grasa se puede observar en ambas zonas del acino hepático. Por otro lado, una mayor disponibilidad de glucosa en el hígado podría conducir a un incremento en la

producción de glucógeno, el cual también es acumulado en el citoplasma, y para poder ser almacenado se necesita un mayor volumen (Adeva-Andany y cols. 2016a, b), esto coincide con los hallazgos obtenidos en la evaluación cualitativa del glucógeno.

El área nuclear de los hepatocitos exhibe un aumento de tamaño en los grupos experimentales. Hasta el momento no existe un estudio que haya relacionado el aumento del área nuclear con un modelo de malnutrición prenatal y posnatal por consumo de sacarosa. Este incremento podría ser un efecto de la acumulación de lípidos, lo que puede inducir estrés oxidativo (vinculado con los parámetros medidos de TBARS y glutatión, que más adelante se describen) en los hepatocitos. El estrés oxidativo puede alterar la función de ciertas proteínas nucleares y la estructura del núcleo (Kurt y cols. 2012). El aumento del tamaño del núcleo puede estar asociado con alteraciones en la regulación del ciclo celular. En la EHGNA se han reportado cambios en la expresión de genes que regulan el ciclo celular impactando tanto la proliferación como el tamaño de las células (poliploidía) (Caldez y cols. 2020). La poliploidía se asocia a procesos de senescencia celular, lo que compromete la capacidad de los hepatocitos para proliferar y afecta su función metabólica (Ríos-López y cols. 2020).

Los mecanismos epigenéticos son fundamentales en la activación y regulación continua de la respuesta inmune frente a la inflamación. Factores ambientales como la dieta pueden provocar modificaciones que influyen en la expresión de genes vinculados con la inmunidad y el metabolismo (Campisano y cols. 2019). Mouralidarane (2017) evidenció que una dieta obesogénica durante la etapa prenatal y posnatal incrementaba el número de células de Kupffer, así como una reducción en las células T y un aumento en los niveles de interleucina 12 y 18 lo cual repercutió en la función del sistema inmunitario innato. En nuestro estudio, observamos un incremento general en la cantidad de células inmunes en ambas zonas, lo que coincide con la evidencia de Mouralidarane (2017). Un incremento en el número de células inmunes está ligado con procesos inflamatorios (Asrih y cols. 2013). Lo cual se correlaciona con una mayor cantidad de mastocitos en esos grupos. Kennedy (2021), realizó una investigación en ratones alimentados con una dieta occidental (alta en grasas y azúcares), y hallaron que los mastocitos están relacionados con la generación de esteatosis micro y macro vesicular, así como la senescencia biliar, la inflamación y en la progresión a fibrosis en el hígado (Huang y cols. 2022, Weiskirchen y cols. 2019), este estudio se correlaciona con los resultados obtenidos en el grupo MA-CA los

cuales tienen una mayor presencia de células inmunes en la zona pericentral y en la zona periportal, así como un mayor número de mastocitos que en relación podrían estar provocando la aparición de una mayor cantidad de fibras de colágeno a diferencia del resto de los grupos experimentales.

Los resultados de las áreas transversal y citoplasmática de la zona periportal se relacionan con los obtenidos en la zona pericentral. Ambas zonas muestran un incremento en los mismos grupos, lo cual sugiere que los efectos provocados por la ingesta de agua azucarada en las diferentes etapas de vida son similares en ambas regiones del hígado. Aunque, la zona pericentral se encarga del almacenamiento de grasas, la zona periportal también se muestra afectada, ya que un incremento en la producción de ácidos grasos libres en respuesta a un cambio en el metabolismo de los carbohidratos, producirían un incremento en la cantidad de grasas a nivel hepático (Vancells y cols. 2021), los cuales serían almacenados no solo en la zona pericentral, sino también en la zona periportal que se evidencia en las vesículas de grasa observadas en la histología, de igual forma este incremento podría deberse a un aumento en el almacenamiento de glucógeno, ya que los hepatocitos de la zona periportal se encargan de la síntesis de glucógeno (Softic y cols. 2016; Adeva-Andany y cols. 2016a).

Los hepatocitos periportales son más pequeños que los de la zona pericentral, sin embargo, los grupos experimentales se encontraron en rangos mayores a 260 μm similares a los de la zona pericentral, esto podría estar relacionado con la proliferación celular, Wang y cols (2017) investigaron acerca de la poliploidización de los hepatocitos y mencionan que un incremento en la poliploidización de los hepatocitos modificando su tamaño y, esto podría deberse a un aumento de la proliferación celular debido a una lesión hepática, la cual inicia en la zona periportal y que se puede extender a la zona pericentral. La poliploidización se refiere al incremento del número de cromosomas dentro del núcleo de los hepatocitos, estos pueden ser mono o binucleados (Wang y cols. 2017). El número de hepatocitos binucleados en la zona periportal es mayor en los grupos provenientes de madre azúcar (MA-CS y MA-CA) a diferencia de los grupos de madre simple, este incremento también podría deberse a la proliferación celular (Wilkinson & Duncan. 2021, Wang y cols. 2017).

El análisis cualitativo de glucógeno muestra un mayor almacenamiento en el grupo MA-CA. De acuerdo con la zonación hepática, los hepatocitos de la zona pericentral son los

encargados del almacenamiento de carbohidratos en forma de glucógeno como reserva de energía (Adeva-Andany y cols. 2016a), al haber una mayor disponibilidad de azúcar en el organismo durante un tiempo prolongado (etapa prenatal y posnatal) se evidencia un aumento en el almacenamiento de este polisacárido. La acumulación de glucógeno dentro de los hepatocitos puede manifestarse en enfermedades que presentan una desregulación del metabolismo de carbohidratos, como la diabetes mellitus y la EHGNA (Soon y cols. 2023).

En el caso de la EHGNA, los hepatocitos que se encargan del almacenamiento de glucógeno se encuentran en la zona pericentral, pero también se pueden prolongar a la zona periportal, estos hallazgos son corroborados con el aumento del área citoplasmática de los diferentes grupos experimentales. La tinción de PAS muestra un incremento en el almacenamiento de glucógeno en los hepatocitos de ambas zonas, pero en menor cantidad en la zona periportal. En estudios con ratas alimentadas con dietas ricas en grasa y fructuosa durante 2 y 4 meses, se observó un incremento en la conversión de glucosa a glucógeno, lo que indica que el hígado elimina la glucosa de la vena porta tras la ingesta de alimentos mediante el transportador de glucosa tipo 2 (GLUT 2) y la glucogénesis (Koo y cols. 2008). El aumento de glucógeno se debe a una alteración en el metabolismo de los carbohidratos, pero también puede representar un mecanismo protector contra la acumulación de grasa en el hígado y contra la hiperglucemia (Lozano y cols. 2016). Sería adecuado realizar un análisis cuantitativo para determinar la cantidad exacta de glucógeno hepático y así poder confirmar los hallazgos que se obtuvieron de forma cualitativa mediante la tinción de PAS.

Los hepatocitos tienen un complejo sistema de defensas antioxidantes, tanto enzimáticas como no enzimáticas, destinadas a eliminar o neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS). A pesar de estas defensas, la acumulación excesiva de ROS puede superar la capacidad antioxidante del hepatocito, resultando en estrés oxidativo, daño celular hepático y eventualmente la muerte celular (Lozano y cols. 2016). En nuestro estudio se evaluó un marcador de estrés oxidativo TBARS y 3 enzimas antioxidantes (SOD, Catalasa y Glutación). Los grupos que mostraron un incremento en estos 4 parámetros fueron los grupos descendientes de madres azúcar.

El inicio de un estado redox alterado inicia con el aumento de ácidos grasos en los hepatocitos, este exceso aumenta la β -oxidación mitocondrial, lo que incrementa la producción de ROS que altera el equilibrio antioxidante y desencadena lipotoxicidad en el hígado (Ma y cols. 2021, Arroyave-Ospina y cols. 2021). Al haber una mayor producción de ácidos grasos estos serán almacenados en el citoplasma de los hepatocitos, lo cual es evidenciado en las vesículas de grasas observadas en la histología de los grupos experimentales (MS-CA, MA-CS Y MA-CA).

Las enzimas antioxidantes como SOD, catalasas y glutatión tienen la función de neutralizar las ROS y se ha demostrado que su inducción y actividad aumentan el daño hepático y al estrés oxidativo. Los resultados obtenidos indican que una dieta prenatal de agua azucarada induce respuesta al estrés oxidativo hepático que sigue hasta la adultez, aun revirtiendo la dieta (MA-CS). El modelo de Bayol muestra que existe un aumento en enzimas antioxidantes (SOD 1, SOD 2, catalasas y glutatión peroxidasa 1); sin embargo, no hay evidencia de un proceso inflamatorio, pero sí de un incremento en la concentración de fibras de colágeno, en especial en el grupo crónico (“*junk food*”). Un modelo de una dieta alta en grasas y fructuosa muestra un incremento de estrés oxidativo, destacando que éste induce la esteatosis hepática, así como periodos cortos de hiperglucemia se relacionan con estrés oxidativo (2 meses de la dieta). Mientras que una dieta alta en fructuosa por el mismo tiempo no se relacionaba con esteatosis ni con estrés oxidativo (Lozano y cols. 2016).

Sin embargo, un aumento en el tiempo de la dieta alta en grasas y fructuosa durante 8 meses mostró que el estrés oxidativo es importante para estimulación de la producción de colágeno tipo 1 por las células estrelladas hepáticas. Por ende, el estrés oxidativo es crucial en las etapas iniciales de la esteatosis, así como su progresión en la EHGNA (Takaki y cols. 2013), ya que un aumento en ROS puede causar daño celular y promover la inflamación. Este ambiente proinflamatorio activa las células estrelladas hepáticas, las cuales se transforman en miofibroblastos productores de colágeno contribuyendo a la fibrosis (Ma y cols. 2022). En los resultados de estrés oxidativo de los grupos analizados, el grupo MA-CA mostro un aumento en TBARS y en las enzimas antioxidantes, este grupo también exhibe a nivel histológico un incremento en las fibras de colágeno presentes en el hígado.

El modelo de malnutrición utilizado, basado en el consumo de agua azucarada al 5% implica una proporción baja de carbohidratos en la dieta. Sin embargo, por los resultados obtenidos se puede observar que un consumo de sacarosa durante ambas etapas (prenatal y posnatal) tiene un efecto significativo tanto en la histología hepática, la inflamación, la aparición de estrés oxidativo, así como el inicio de fibrosis. Estos hallazgos sugieren que incluso niveles relativamente bajos de sacarosa en la dieta pueden tener consecuencias perjudiciales a largo plazo en la salud hepática, especialmente cuando se consumen durante los periodos críticos del desarrollo.

10. CONCLUSIÓN

El aumento en los niveles de triglicéridos séricos, en conjunto al incremento del área transversal de los hepatocitos, indica una mayor síntesis y acumulación de lípidos, así como un aumento en el almacenamiento de glucógeno. Estos cambios, junto con el estrés oxidativo y signos de inflamación, sugieren un desequilibrio en el estado redox que podría favorecer el avance de enfermedades hepáticas, incluida la fibrosis. Esto evidencia que el consumo de sacarosa durante la etapa de gestación y lactancia, incluso en cantidades bajas, tiene efectos negativos a largo plazo en la salud hepática de la descendencia, elevando el riesgo de desarrollar EHGNA. Este riesgo se ve exacerbado si el consumo de sacarosa continúa durante la vida posnatal. Esto demuestra la importancia de implementar intervenciones nutricionales tempranas para prevenir la progresión de la EHGNA y poder mejorar la salud a futuro.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar el estado metabólico y hepático de las madres: Realizar un estudio complementario para analizar el efecto de la ingesta de sacarosa en las madres durante la gestación y lactancia. Incluiría análisis histológicos, bioquímicos y moleculares del hígado de las madres, para entender como la dieta afecta no solo a la descendencia, sino también al organismo materno.
- Evaluar el efecto del consumo de sacarosa en hembras, considerando que los estrógenos tienen un efecto protector, permitirá entender como la programación fetal influye en la producción y protección de estas hormonas, y su impacto en la predisposición a la EHGNA.
- Evaluación del perfil lipídico y metabólico entre machos y hembras, permitiría conocer si hay diferencias en la forma en que ambos sexos metabolizan los carbohidratos y si esto puede influir en la progresión de EHGNA.

12. REFERENCIAS

1. Adeva-Andany MM, González-Lucán M, Donapetry-García C, Fernández-Fernández C & Ameneiros-Rodríguez E. 2016a. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clinical* 5: 85–100.
2. Adeva-Andany MM, Pérez-Felpete N, Fernández-Fernández C, Donapetry-García C & Pazos-García C. 2016b. Liver glucose metabolism in humans. *Bioscience reports* 36(6): e00416.
3. Arroyave-Ospina JC, Wu Z, Geng Y & Moshage H. 2021. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Prevention and Therapy. *Antioxidants (Basel Switzerland)* 10(2): 174.
4. Asrih M & Jornayvaz FR. 2013. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *The Journal of endocrinology* 218(3): R25–R36.
5. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D & Wadsworth ME. 1989. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ (Clinical research ed)* 298: 564–567.
6. Bayol SA, Simbi BH, Fowkes R & Stickland NC. 2010. A maternal "junk food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic Fatty liver disease in rat offspring. *Endocrinology* 151(4): 1451–1461.
7. Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M & Canbay A. 2012. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of hepatology* 56(4): 952–964.
8. Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC, Bateman AC, Clough GF, Poston L, Hanson MA, McConnell JM & Byrne CD. 2009. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology (Baltimore Md.)* 50(6): 1796–1808.
9. Brunt EM, Wong VWS, Nobili V. 2015. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Reviews. Disease primers* 1: 15080.

10. Buzzetti E, Pinzani M & Tsochatzis EA. 2016. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental* 65(8): 1038–1048.
11. Byrne D & Targher G. 2015. NAFLD: a multisystem disease. *Journal of hepatology* 62(1 Suppl): S47–S64.
12. Caldez MJ, Bjorklund M & Kaldis P. 2020. Cell cycle regulation in NAFLD: when imbalanced metabolism limits cell division. *Hepatology international* 14(4): 463–474.
13. Campisano S, La Colla A, Echarte SM & Chisari AN. 2019. Interplay between early-life malnutrition epigenetic modulation of the immune function and liver diseases. *Nutrition research reviews* 32(1): 128–145
14. Campisano SE, Echarte SM, Podaza E & Chisari AN. 2017. Protein malnutrition during fetal programming induces fatty liver in adult male offspring rats. *Journal of physiology and biochemistry* 73(2): 275–285.
15. Chaudhary P, Janmeda P, Docea AO, Yeskaliyeva B, Abdull Razis A F, Modu B, Calina, D & Sharifi-Rad J. 2023. Oxidative stress free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Frontiers in chemistry* 11: 1158198.
16. Córdoba Sosa G, Nicolás Toledo L, Cervantes Rodríguez M, Xelhuantzi Arreguin N, Arteaga Castañeda ML, Zambrano E, Cuevas Romero E & Rodríguez Antolín J. 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* 10:1092235.
17. Corona Quintanilla DL, Velázquez Orozco V, Xicohténcatl Rugerio I, Lara García O, Cuevas E, Martínez Gómez M, Toledo LN & Rodríguez Antolín J. 2022. 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.
18. Cunningham RP & Porat-Shliom N. 2021. Liver Zonation - Revisiting Old Questions with New Technologies. *Frontiers in physiology* 12: 732929.
19. Dávila-Santacruz S, Corona-Quintanilla DL, Velázquez-Orozco V, Martínez-Gómez M, Castelán, F, Cuevas-Romero E, Barrales-Fuentes B, Nicolás-Toledo L & Rodríguez-

- Antolín J. 2024. Sucrose consumption modifies the urethro-genital reflex and histological organization of the bulbospongiosus muscle in the male rat. *Physiology & behavior* 273: 114391.
20. Dvorkin MA, Cardinali DP y Iermoli RH. 2010. Bases fisiológicas de la práctica médica. 1° Edición. Editorial Panamericana.
21. Fonseca González Z, Quesada Font AJ, Meireles Ochoa MY, Cabrera Rodríguez E & Boada Estrada AM. 2020. La malnutrición; problema de salud pública de escala mundial. *Multimed* 24(1): 237-246.
22. Fortoul Van der Goes TI. 2010. Histología y biología celular. Editorial McGrawHill.
23. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M & Sanyal AJ. 2018. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature medicine* 24(7): 908–922.
24. Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM & Herman MA. 2018. Fructose metabolism and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation* 128(2): 545–555.
25. Heyens LJM, Busschots D, Koek GH, Robaey G & Francque S. 2021. Liver Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: From Liver Biopsy to Non-invasive Biomarkers in Diagnosis and Treatment. *Frontiers in medicine* 8: 615978.
26. Huang S, Wu H, Luo F, Zhang B, Li T, Yang Z, Ren B, Yin W, Wu D & Tai S. 2022. Exploring the role of mast cells in the progression of liver disease. *Frontiers in physiology* 13: 964887.
27. Jarido V, Kennedy L, Hargrove L, Demieville J, Thomson J, Stephenson K & Francis H. 2017. The emerging role of mast cells in liver disease. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 313(2): G89–G101.
28. Kennedy L, Meadows V, Sybenga A, Demieville J, Chen L, Hargrove L, Ekser B, Dar W, Ceci L, Kundu D, Kyritsi K, Pham L, Zhou T, Glaser S, Meng F, Alpini Gn & Francis H. 2021. Mast Cells Promote Nonalcoholic Fatty Liver Disease Phenotypes and Microvesicular Steatosis in Mice Fed a Western Diet. *Hepatology (Baltimore Md)* 74(1): 164–182.
29. Koo HY, Wallig MA, Chung BH, Nara TY, Cho BH & Nakamura MT. 2008. Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver. *Biochimica et biophysica acta* 1782(5): 341–348.

30. Krishna M. 2014. Anatomía microscópica del hígado. *Clinical liver disease* 2 Suppl 5: 109–112.
31. Kubes P & Jenne C. 2018. Immune Responses in the Liver. *Annual review of immunology* 36: 247–277
32. Kurt Hulyam, Ozbayer Cansu, Degirmenci Irfan, Ustuner Mehmet, Ozden Hilmi, Civi Kismet & Gunes Hasan. 2012. Comparative therapeutic potentials of acarbose and a formulated herbal extract on type 2 diabetic rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 6(29): 2194-2204.
33. Langley-Evans S. C. 2006. Developmental programming of health and disease. *The Proceedings of the Nutrition Society* 65(1): 97–105.
34. LeCluyse EL, Witek RP, Andersen ME & Powers MJ. 2012. Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Critical reviews in toxicology* 42(6): 501–548.
35. Li M, Reynolds CM, Segovia SA, Gray C & Vickers MH. 2015. Developmental Programming of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Effect of Early Life Nutrition on Susceptibility and Disease Severity in Later Life. *BioMed research international* 2015: 437107.
36. Lozano I, Van der Werf R, Bietiger W, Seyfritz E, Peronet C, Pinget M, Jeandidier N, Maillard E, Marchioni E, Sigrist S & Dal S. 2016. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk hepatic and vascular complications. *Nutrition & metabolism* 13, 15.
37. Lynch C, Chan CS & Drake AJ. 2017. Early life programming and the risk of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of developmental origins of health and disease* 8(3): 263–272.
38. Ma Y, Lee G, Heo SY & Roh YS. 2021. Oxidative Stress Is a Key Modulator in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Antioxidants (Basel Switzerland)* 11(1): 91.
39. Malik VS & Hu FB. 2022. The role of sugar-sweetened beverages in the global epidemics of obesity and chronic diseases. *Nature reviews. Endocrinology* 18(4): 205–218.

40. Martins PN & Neuhaus P. 2007. Surgical anatomy of the liver hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver* 27(3): 384–392.
41. Mataix J. 2009. *Tratado de nutrición y alimentación*. Primera edición. Océano. Barcelona España 2: 982-85.
42. McCurdy CE, Bishop JM, Williams SM, Grayson BE, Smith MS, Friedman JE & Grove KL. 2009. Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *The Journal of clinical investigation* 119(2): 323–335.
43. Modi N, Murgasova D, Ruager-Martin R, Thomas EL, Hyde MJ, Gale C, Santhakumaran S, Doré CJ, Alavi A & Bell JD. 2011. The influence of maternal body mass index on infant adiposity and hepatic lipid content. *Pediatric research* 70(3): 287–291.
44. Mouralidarane A, Soeda J, Visconti-Pugmire C, Samuelsson AM, Pombo J, Maragkoudaki X, Butt A, Saraswati R, Novelli M, Fusai G, Poston L, Taylor PD & Oben, JA. 2013. Maternal obesity programs offspring nonalcoholic fatty liver disease by innate immune dysfunction in mice. *Hepatology (Baltimore Md)* 58(1): 128–138.
45. Nicolás Toledo L, Cervantes-Rodríguez M, Cuevas-Romero E, Corona-Quintanilla D, Pérez-Sánchez E, Zambrano E, Rodríguez-Antolín J. 2018. 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.
46. Parthasarathy G, Revelo X & Malhi H. 2020. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. *Hepatology communications* 4(4): 478–492.
47. Poudyal H, Panchal SK, Ward LC, Waanders J & Brown L. 2012. Chronic high-carbohydrate high-fat feeding in rats induces reversible metabolic cardiovascular and liver changes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 302(12): E1472–E1482.
48. Ramírez Vélez R. 2012. In utero fetal programming and its impact on health in adulthood. *Endocrinología y Nutrición* 59: 383-393.
49. Ríos-López DG, Aranda-López Y, Sosa-Garrocho M & Macías-Silva M. 2020. La

- plasticidad del hepatocito y su relevancia en la fisiología y la patología hepática. TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas 23.
50. Sibulesky L. 2013. Anatomía normal del hígado. *Clinical Liver Disease* 2(Suppl 4): S61Š–S63Š.
 51. Softic S, Cohen DE & Kahn CR. 2016. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Digestive diseases and sciences* 61(5): 1282–1293.
 52. Soon GST & Torbenson M. 2023. The Liver and Glycogen: In Sickness and in Health. *International journal of molecular sciences* 24(7): 6133.
 53. Stanhope KL. 2016. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 53(1): 52–67.
 54. Takaki A, Kawai D & Yamamoto K. 2013. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *International journal of molecular sciences* 14(10): 20704–20728.
 55. Tanaka M, Itoh T, Tanimizu N & Miyajima A. 2011. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *Journal of biochemistry* 149(3): 231–239.
 56. Tilg H, Adolph TE & Moschen AR. 2021. Multiple Parallel Hits Hypothesis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Revisited After a Decade. *Hepatology (Baltimore Md.)* 73(2): 833–842.
 57. Trefts E, Gannon M & Wasserman DH. 2017. The liver. *Current biology: CB* 27(21): 1147–1151.
 58. Vancells Lujan P, Viñas Esmel E & Sacanella Meseguer E. 2021. Overview of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and the Role of Sugary Food Consumption and Other Dietary Components in Its Development. *Nutrients* 13(5): 1442.
 59. Wang B, Zhao L, Fish M, Logan CY & Nusse R. 2015. Self-renewing diploid Axin2(+) cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature* 524(7564): 180–185.
 60. Wang MJ, Chen F, Lau JTY & Hu YP. 2017. Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes. *Cell death & disease* 8(5): e2805.
 61. Weiskirchen R, Meurer SK, Liedtke C & Huber M. 2019. Mast Cells in Liver Fibrogenesis *Cells* 8(11): 1429.
 62. Welsch U y Sobotta J. 2009. *Histología*. Editorial Médica Panamericana.

63. Wilkinson PD & Duncan AW. 2021. Differential Roles for Diploid and Polyploid Hepatocytes in Acute and Chronic Liver Injury. *Seminars in liver disease* 41(1): 42–49.
64. Woerle HJ, Meyer C, Dostou JM, Gosmanov NR, Islam N, Popa E, Wittlin SD, Welle SL & Gerich JE. 2003. Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 284(4): E716–E725.
65. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, Ahmed A. 2015. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology* 148: 547–555.
66. Yang ZH, Miyahara H, Takeo J & Katayama M. 2012. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetology & metabolic syndrome* 4(1): 32.
67. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L & Wymer M. 2016. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence and outcomes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 64(1): 73–84.
68. Yracheta JM, Alfonso J, Lanaspá MA, Roncal-Jimenez C, Johnson SB, Sánchez-Lozada LG & Johnson RJ. 2015. Hispanic Americans living in the United States and their risk for obesity, diabetes and kidney disease: Genetic and environmental considerations. *Postgraduate medicine* 127(5): 503–510.
69. Zhang L, Wang X, Cueto R, Effi C, Zhang Y, Tan H, Qin X, Ji Y, Yang X & Wang H. 2019. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox biology* 26: 101284.

13. ANEXOS

1 Protocolo de deshidratación de hígado

No. De solución	Solución y concentración	Tiempo en minutos
1	OH 70%	20 min
2	OH 80%	20 min
3	OH 80%	30 min
4	OH 96%	30 min
5	OH 96 %	30 min
6	OH 100%	30 min
7	OH 100%	25 min
8	OH 100%- Xileno	30 min
9	Xileno I	25 min
10	Xileno II	25 min
11	Paraplast X-tra I Sucio	30 min
12	Paraplast X-tra II Limpio	60 min
13	Paraplast X-tra II limpio	180 min (con un cambio de paraplast a los 90 min)

2 Tinción de hematoxilina y eosina

PROCEDIMIENTO	REACTIVO	TIEMPO
Desparafinar	Xileno	5 min
	Xileno	5 min
	Xileno- etanol	5 min
Hidratar	Etanol 100%	5 min
	Etanol 100 %	5 min
	Etanol 96 %	3 min
	Etanol 80 %	3 min
	Etanol 60%	3 min
	Agua Destilada	3 min
Colorante básico	Hematoxilina de Harris	14 min
	Agua corriente	40 seg
Contraste	Etanol ácido	40 seg
	Agua destilada	40 seg
Azuleamiento	Etanol amoniacal	3 min
Colorante ácido	Eosina	3 min
	Agua destilada	40 seg
Deshidratación	Etanol 96 %	40 seg
	Etanol 96%	40 seg
	Etanol 100%	30 seg
	Etanol 100 %	30 seg
	Etanol- xileno	10 seg
	Xileno	10 seg
	Xileno	10 seg
Montaje	Cytoseal TM 60	

3 Tinción azul de alcian

PROCEDIMIENTO	REACTIVO	TIEMPO
Desparafinar	Xileno	5 min
	Xileno	5 min
	Xileno- etanol	5 min
Hidratar	Etanol 100%	5 min
	Etanol 100 %	5 min
	Etanol 96 %	3 min
	Etanol 80 %	3 min
	Etanol 60%	3 min
	Agua Destilada	3 min
Colorante	Ácido acético glacial al 3%	3 min
	Azul de alcian	2 horas
	Agua destilada	3 lavados
Contraste	Rojo neutro	20 minutos
	Agua corriente	3 lavados
Deshidratar	Etanol 96%	40 seg
	Etanol 100%	30 seg
	Etanol 100 %	30 seg
	Etanol- xileno	10 seg
	Xileno	10 seg
	Xileno	10 seg
Montaje	Cytoseal TM 60	

4 Tinción tricrómica de Masson

Desparafinar	Xileno	5 min
	Xileno	5 min
	Xileno-etanol	5 min
Hidratación	Etanol 100%	5 min
	Etanol 100%	5 min
	Etanol 96%	3 min
	Etanol 80%	3 min
	Etanol 60%	3 min
	Agua destilada	3 min
Mordente	Fijador de Bouin	12 hrs
	Agua corriente	15-20 min
	Hematoxilina de Weigert	11 min
	Agua corriente	40 seg
	Agua destilada	40 seg
Azulamiento	Amoniaco al 1%	2 min
	Agua corriente	40 seg
	Biebrich Scarlet-Fushina ácida	4 min
	Agua corriente	40 seg
Contraste	Ac. Fosfomolibdico:Ac. Fosfotungstico	4 min
	Azul de anilina	3 min
Contraste	Ac. Acetico glacial al 1%	3 min
	Agua corriente	40 seg
	Etanol 96%	40 seg
	Etanol 96%	30 seg
	Etanol 100%	30 seg

Deshidratación	Etanol 100%	30 seg
	Etanol:Xilol	10 seg
	Xileno	10 seg
	Xileno	10 seg
Montaje	Cytoseal TM 60	

5 Tinción de PAS

PROCEDIMIENTO	REACTIVO	TIEMPO
Desparafinar	Xileno	5 min
	Xileno	5 min
	Xileno- etanol	5 min
Hidratar	Etanol 100%	5 min
	Etanol 100 %	5 min
	Etanol 96 %	3 min
	Etanol 80 %	3 min
	Etanol 60%	3 min
	Agua Destilada	3 min
Oxidación	Ácido periódico	30 min
	Agua corriente	40 seg
	Reactivo de Schiff	36 min
	Agua corriente tibia	Hasta que cambie de color
	Hematoxilina de Harris	11 minutos
	Agua destilada	40 seg
Deshidratación	Etanol 96 %	40 seg
	Etanol 96%	40 seg
	Etanol 100%	30 seg
	Etanol 100 %	30 seg
	Etanol- xileno	10 seg
	Xileno	10 seg
Montaje	Xileno	10 seg
	Cytoseal TM 60	