



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**Restricción proteínica en la rata madre gestante:  
consecuencias en la anatomía y el metabolismo de la  
progenie que en su etapa adulta consume cantidades  
elevadas de carbohidratos.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

**ELIUT PÉREZ SÁNCHEZ**

Co-directores

Dr. Jorge Rodríguez Antolín  
Dra. Elena Zambrano González

Comité tutorial

Dra. Margarita Martínez Gómez  
Dra. Estela Cuevas Romero  
Dra. Leticia Nicolás Toledo  
Dr. Francisco Castelán

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2011





Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**Restricción proteínica en la rata madre gestante:  
consecuencias en la anatomía y el metabolismo de la  
progenie que en su etapa adulta consume cantidades  
elevadas de carbohidratos**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

**ELIUT PÉREZ SÁNCHEZ**

Co-directores

Dr. Jorge Rodríguez Antolín  
Dra. Elena Zambrano González

Comité tutorial

Dra. Margarita Martínez Gómez  
Dra. Estela Cuevas Romero  
Dra. Leticia Nicolás Toledo  
Dr. Francisco Castelán

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2011



Maestría en Ciencias Biológicas

COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E

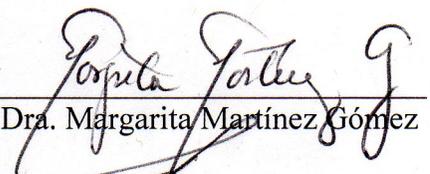
Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **ELIUT PÉREZ SÁNCHEZ** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Restricción proteínica en la rata madre gestante: consecuencias en la anatomía y el metabolismo de la progenie que en su etapa adulta consume cantidades elevadas de carbohidratos”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., ENERO 5 DE 2011



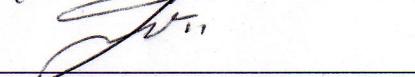
Dr. Jorge Rodríguez Antolín



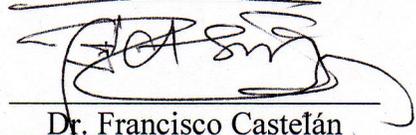
Dra. Margarita Martínez Gómez



Dra. Estela Cuevas Romero



Dra. Leticia Nicolás Toledo



Dr. Francisco Castefán



## **Agradecimientos**

Esta investigación fue realizada bajo la dirección de los Drs. Jorge Rodríguez Antolín y Elena Zambrano González en las inmediaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se contó con la tutoría de los Drs. Margarita Martínez Gómez, Estela Cuevas Romero, Leticia Nicolás Toledo, Francisco Castelán y Alfonso Alexander Aguilera. También se contó con la asesoría del Dr. Arturo Estrada Torres y de la Mtra. Margarita Cervantes Rodríguez.

Un reconocimiento especial al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por su apoyo en la obtención de la dieta para el tratamiento de las ratas.

A la maestría en ciencias biológicas por el programa tan amplio que ofrece a los aspirantes y por el apoyo del mismo para la realización del proyecto aquí presentado.

Al apoyo recibido de los proyectos del PAPIIT1N228110-MMG; CONACYT 105882-MMG y a la beca del CONACyT No. 21814-EPS para la realización del proyecto de tesis.

## **Agradezco extensamente**

A mis padres Macaria Sánchez Briones y Job Pérez Sánchez por los consejos invaluable y el apoyo moral que me han dado a lo largo de mi vida, pero sobre todo porque me han aguantado mi mal genio durante muchos años. Los quiero mucho.

A mis hermanas Areli y Elizabeth que en algunos momentos difíciles me dieron palabras de aliento que me reanimaron.

A mi maestra Margarita Cervantes Rodríguez que trabajamos juntos dos años y que compartimos situaciones similares en los exámenes tutorales, por los momentos de discusión que enriquecían nuestros trabajos y sobre todo por la amistad que ahí se forjó. Gracias maestra le tengo un aprecio enorme.

A Verónica García Villamar, que me brindó su compañía, cariño y amistad. Porque estuvo conmigo en momentos difíciles para apoyarme. Pero sobre todo gracias por los momentos llenos de alegría que compartimos estos dos años y que espero seguir compartiendo contigo.

A mis tutores los Drs. Jorge Rodríguez Antolín y Elena Zambrano González que a pesar de las exigencias para la realización de la tesis, se conformó una amistad. Gracias por el apoyo y su compromiso en el desarrollo de este trabajo.

A las personas que me asesoraron cuando había momentos de incertidumbre los Drs. Margarita Martínez, Francisco Castelán, Estela Cuevas, Leticia Nicolás y Arturo Estrada. De igual manera a los maestros Iván Bravo y Nicté Xelhuantzi.

A mis compañeros y amigos Adrian, Yadira e Irving que me apoyaron en la realización del trabajo. Muchas gracias por su tiempo y disposición para trabajar.

A mis amigos Alberto, José, Andrés, Johnny, Erendira y Kenia. Por los momentos de esparcimiento.

## RESUMEN

Estudios epidemiológicos en seres humanos han correlacionado trastornos metabólicos como la obesidad, la hipertensión, la diabetes *mellitus* y los problemas cardiovasculares con la calidad de la alimentación en diferentes etapas de la vida. En animales de experimentación se ha mostrado que crías cuyas madres fueron alimentadas durante la gestación con una dieta baja en proteínas y que en la vida adulta consumieron una dieta alta en lípidos presentan concentraciones plasmáticas altas de colesterol y triglicéridos, la aparición de ateromas y disminución en la expresión de RNAm de la enzima superóxido dismutasa, enzima que participa en el control de radicales libres, hecho que evidencia una relación entre enfermedades metabólicas y producción de estrés oxidativo. Otro grupo, utilizando un modelo semejante, ha mencionado que la restricción proteínica gestacional en la madre y el consumo elevado de carbohidratos en la vida adulta no provocan efectos metabólicos severos en la progenie. El hígado es el órgano central de los procesos metabólicos y el tejido adiposo es el sitio donde se almacenan lípidos para ser usados como sustrato para la obtención de energía. Ambos tejidos juegan un papel fundamental en la maquinaria metabólica. El objetivo de esta tesis fue comprobar si en una misma progenie, la combinación de restricción proteínica gestacional materna y el consumo de agua azucarada en la vida adulta potencian las alteraciones histológicas del hígado, del tejido adiposo e indicadores bioquímicos metabólicos, incluida la producción incrementada de estrés oxidativo. Se evaluó en ratas adultas de cinco meses de edad el área total de hepatocitos y adipocitos, la presencia de esteatosis hepática, el daño oxidativo hepático (3-nitrotirosina) y las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y colesterol de lipoproteínas de alta densidad. Las ratas fueron alimentadas con dieta control (20% de proteína) ó dieta restringida (10% de proteína) durante la gestación, posteriormente la progenie, de tres meses de edad, de tales ratas formaron cuatro subgrupos: progenie de ratas con dieta control (C), progenie de ratas con dieta restringida (R), progenie de ratas con dieta control más agua azucarada al 5 % (CA) y progenie de ratas con dieta restringida más agua azucarada al 5 % (RA). En el hígado encontramos un aumento del área total de los hepatocitos por efecto del consumo elevado de carbohidratos ( $P < 0.05$ ). En cuanto al tejido adiposo, en ningún grupo encontramos cambios estadísticamente significativos en el tamaño de las células. En el hígado el porcentaje de área inmunorreactiva a la 3-

nitrotirosina aumenta por efecto de la restricción de proteína en la dieta materna ( $P < 0.001$ ) y por efecto de la dieta alta en carbohidratos ( $P < 0.05$ ). También encontramos la presencia de esteatosis hepática en los grupos CA y RA. La concentración plasmática de glucosa y colesterol no se modifica en ninguno de los cuatro grupos. La concentración plasmática de triglicéridos aumenta por efecto del consumo elevado de carbohidratos ( $P < 0.05$ ). La concentración plasmática de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) en el plasma disminuye por efecto de la dieta materna ( $P < 0.001$ ). Con lo anterior podemos concluir que la combinación de restricción proteínica gestacional en la madre y el consumo de agua azucarada en la vida adulta de la progenie provocan en el hígado alteraciones histológicas y aumenta la inmunorreactividad contra la 3-nitrotirosina, del mismo modo provoca alteraciones bioquímicas, pero sin ser más drásticas que la progenie que provienen de ratas sometidas a restricción de proteínas durante la gestación ó ratas que en la vida adulta son alimentadas con una dieta alta en carbohidratos.

## CONTENIDO

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | INTRODUCCIÓN.....   | 3  |
| 1.1    | Efecto de la malnutrición en la vida adulta en humanos.....   | 3  |
| 1.2    | Efecto a corto y largo plazo de la malnutrición en etapas tempranas del crecimiento en humanos..... | 4  |
| 1.3    | Efecto de la restricción proteínica en la rata .....  | 5  |
| 2.     | ANTECEDENTES .....  | 8  |
| 1.4    | Efecto de la restricción proteínica gestacional en la histología de hígado de rata.....             | 8  |
| 1.5    | Efecto de la restricción proteínica gestacional sobre la insulina e hígado .....                    | 8  |
| 1.6    | Efecto de la restricción proteínica gestacional sobre el tejido adiposo.....                        | 10 |
| 1.7    | Dieta postnatal.....  | 10 |
| 1.8    | Combinación de la restricción proteínica gestacional y alteraciones en la dieta postnatal ..        | 11 |
| 1.9    | Alteraciones metabólicas y estrés oxidativo.....  | 11 |
| 3.     | JUSTIFICACIÓN.....  | 13 |
| 4.     | HIPÓTESIS.....  | 15 |
| 5.     | OBJETIVOS .....   | 16 |
| 6.     | MATERIAL Y MÉTODOS .....  | 17 |
| 1.10   | Mantenimiento de los animales.....  | 17 |
| 1.11   | Grupos experimentales .....   | 17 |
| 1.12   | Obtención y análisis histológicos del tejido hepático y adiposo.....                                | 18 |
| 1.13   | Determinación de daño oxidativo (3-nitrotirosina) .....   | 20 |
| 1.14   | Obtención de muestras sanguíneas y determinaciones bioquímicas.....                                 | 20 |
| 1.15   | Diseño y análisis estadístico .....   | 21 |
| 1.16   | Análisis de imagen.....   | 22 |
| 7.     | RESULTADOS .....  | 23 |
| 1.17   | Efecto de la restricción de proteínas sobre el peso corporal en la rata gestante .....              | 23 |
| 1.18   | Medidas morfométricas en las crías al nacimiento .....  | 25 |
| 1.19   | Crecimiento de las crías .....  | 25 |
| 1.20   | Consumo elevado de carbohidratos .....  | 28 |
| 1.20.1 | Peso corporal, consumo de alimento, agua, carbohidratos y calorías totales .....                    | 28 |
| 1.21   | Peso y características histológicas del hígado y tejido adiposo .....                               | 28 |
| 1.21.1 | Peso del hígado .....   | 28 |
| 1.21.2 | Área del citoplasma de los hepatocitos .....  | 28 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.21.3 | Inmunorreactividad anti 3-nitrotirosina en cortes de hígado.....  | 33 |
| 1.21.4 | Área de las células del tejido adiposo .....  | 35 |
| 1.22   | Parámetros bioquímicos al sacrificio .....  | 37 |
| 1.22.1 | Glucosa .....   | 37 |
| 1.22.2 | Triglicéridos .....   | 37 |
| 1.22.3 | Colesterol .....  | 37 |
| 1.22.4 | Colesterol-HDL.....   | 37 |
| 8.     | DISCUSIÓN.....  | 40 |
| 1.23   | Efecto de la restricción proteínica en la rata gestante .....   | 40 |
| 1.24   | Efecto de la restricción proteínica gestacional en la progenie .....  | 40 |
| 1.25   | Efecto de la restricción proteínica gestacional y consumo elevado de carbohidratos sobre la histología del hígado .....   | 41 |
| 1.26   | Efecto de la restricción proteínica gestacional y consumo elevado de carbohidratos sobre el tejido adiposo.....           | 42 |
| 1.27   | Efecto de la restricción proteínica gestacional y consumo elevado de carbohidratos sobre el daño oxidativo en hígado..... | 43 |
| 1.28   | Efecto de la restricción proteínica gestacional y consumo elevado de carbohidratos sobre el metabolismo .....             | 44 |
| 1.28.1 | Metabolismo de glucosa .....  | 44 |
| 1.28.2 | Metabolismo de triglicéridos .....  | 46 |
| 1.28.3 | Metabolismo de colesterol .....   | 46 |
| 1.28.4 | Metabolismo de colesterol de lipoproteínas de alta densidad.....  | 47 |
| 9.     | CONCLUSIÓN .....  | 48 |
| 10.    | REFERENCIAS.....  | 49 |
| 11.    | GLOSARIO.....   | 55 |
| 12.    | ANEXOS .....  | 56 |
| 1.29   | Anexo 1. Deshidratación del tejido hepático .....   | 56 |
| 1.30   | Anexo 2. Deshidratación del tejido adiposo .....  | 57 |
| 1.31   | Anexo 3. Tinción de hematoxilina-eosina .....   | 58 |
| 1.32   | Anexo 4. Desparafinación e hidratación de los cortes para inmunohistoquímica .....  | 59 |
| 13.    | PUBLICACIONES.....  | 60 |

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Efecto de la malnutrición en la vida adulta en humanos

En seres humanos las enfermedades metabólicas, cirrosis hepática, diabetes *mellitus*, y las que se derivan a partir de ellas como las patologías cardiovasculares, han sido relacionados con la alimentación y con el proceso que implica la nutrición. Tales trastornos son la principal causa de mortalidad en México (Stevens y cols. 2008). La cantidad de personas con trastornos metabólicos se ha incrementado drásticamente durante las últimas décadas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) las ha considerado como un problema de salud pública. En el mundo se estima que más de un billón de personas presenta trastornos metabólicos, 300 millones de los cuales se consideran clínicamente obesos (OMS 2000). En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 reportó que el sobrepeso y la obesidad son problemas que afectan a más del 70% de la población mayor de 20 años (Cuevas y cols. 2007). Pero también el síndrome metabólico, definido según el criterio de Adult Treatment Panel III (tabla 1, Kahn y cols. 2005), es considerado como un padecimiento frecuente en México (Aguilar-Salinas y cols. 2004).

|                                  | Hombres       | Mujeres       |
|----------------------------------|---------------|---------------|
| <b>Circunferencia de cintura</b> | >102 cm       | >88 cm        |
| <b>Triglicéridos séricos</b>     | >1.7 mmol/L   | >1.7 mmol/L   |
| <b>Presión sanguínea</b>         | > 130/85 mmHg | > 130/85 mmHg |
| <b>Colesterol-HDL</b>            | <1.0 mmol/L   | <1.3 mmol/L   |
| <b>Glucosa sérica</b>            | >6.1 mmol/L   | >6.1 mmol/L   |

**Tabla 1.** Definición del síndrome metabólico para ambos sexos en seres humanos por el Adult Treatment Panel III.

La etiología de los diferentes trastornos metabólicos como obesidad, hipertensión y problemas cardiovasculares es multifactorial (Ferranti y Mozaffarian 2008). Los desajustes del metabolismo son producto de las calorías consumidas y las gastadas. Los determinantes ambientales causantes del desequilibrio de energía, incluyen factores que incrementan el consumo calórico como el aumento en el tamaño de las raciones, el consumo de bebidas azucaradas, carbohidratos refinados, sedentarismo, (Taheri y cols. 2004) y consumo de grasas saturadas (Kavanagh y cols. 2007).

## **1.2 Efecto a corto y largo plazo de la malnutrición en etapas tempranas del crecimiento en humanos**

Los individuos con retraso de crecimiento intrauterino y que no muestran una recuperación del peso o talla durante el primer año de vida, son más propensos a padecer alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Hales y cols. 1991) en la vida adulta. Esta propensión incrementa cuando existe obesidad (Barker y cols. 1993). Esto sugiere que la asociación de retraso de crecimiento intrauterino y obesidad postnatal tienen efectos aditivos para el desarrollo de diabetes tipo 2, hipertrigliceridemia e hipertensión arterial, determinados tanto por el medio ambiente como por el genotipo<sup>1</sup> de los individuos (Hales y cols. 1991, Barker y cols. 1993).

El estado nutricional deficiente durante la etapa fetal y el primer año de la vida parecen jugar un papel importante para el desarrollo de alteraciones a largo plazo como la diabetes, debido a que el feto y el lactante mal nutridos deben desarrollar una serie de estrategias metabólicas, cuya característica en común es la presencia de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en los tejidos periféricos, con la finalidad de aumentar sus oportunidades de sobrevivir. En la vida intrauterina se produce la primera modificación funcional, que afecta en mayor medida a órganos como hígado, páncreas y músculo estriado mientras uno de los menos afectados es el cerebro (Desai y cols. 1996). A partir del nacimiento se observa un segundo cambio, al desarrollar un fenotipo<sup>2</sup> que requiere menor cantidad de nutrientes y calorías, además presenta niveles plasmáticos elevados de insulina, cortisol y catecolaminas,

---

<sup>1</sup> Remitirse al glosario

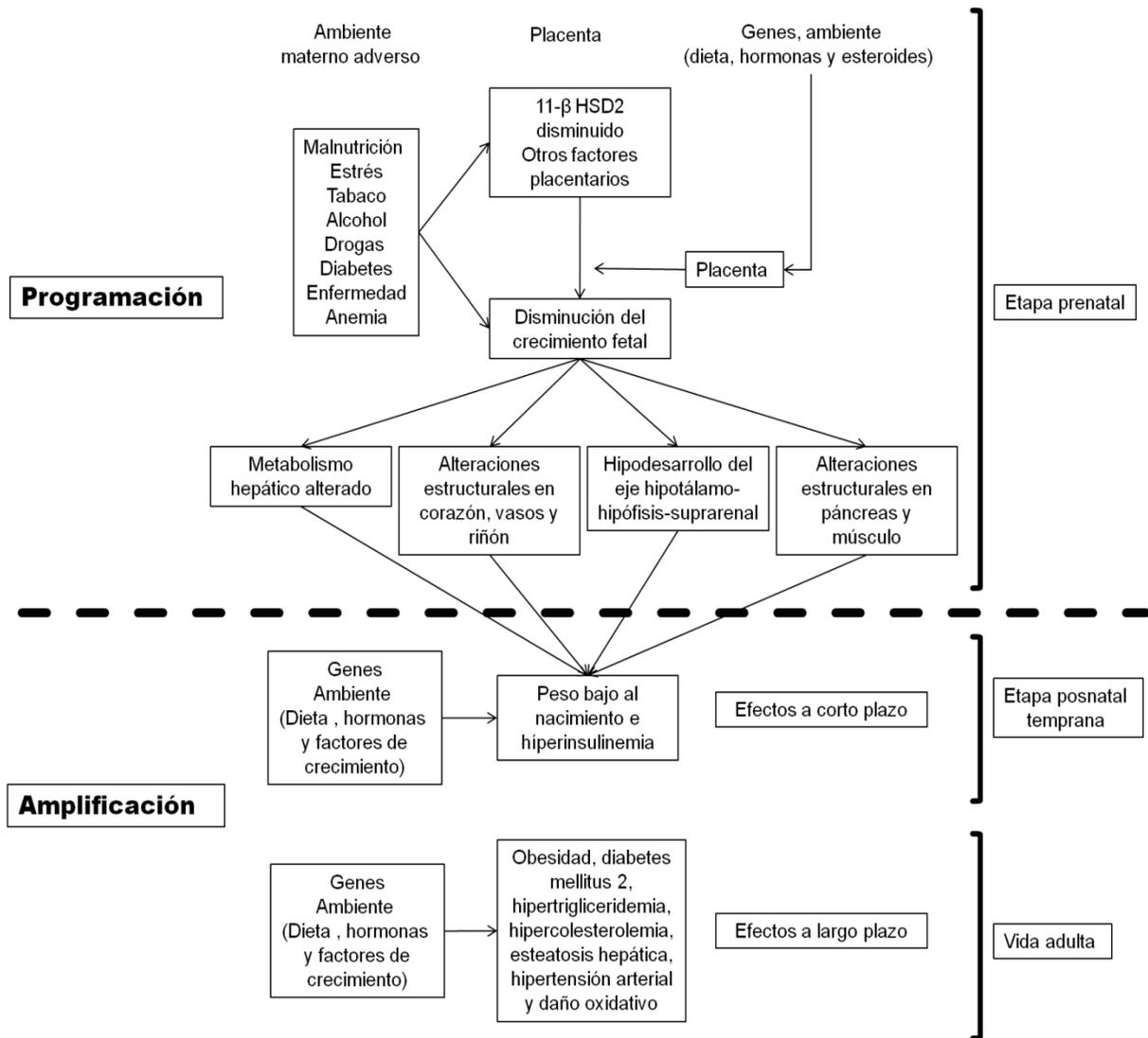
<sup>2</sup> Remitirse al glosario

lo que le permite asegurar la sobrevivencia, si la nutrición postnatal es deficiente. Sin embargo, cuando estos individuos son sometidos a una sobre alimentación crónica y aumentan de peso corporal, estas modificaciones tienen un efecto perjudicial para la salud, a este concepto se le llama la hipótesis del fenotipo ahorrador (Hales y Barker 2001). En general, las enfermedades cardiovasculares y metabólicas más comunes en nuestra sociedad (hipertensión, enfermedad coronaria, diabetes *mellitus* tipo II y dislipidemias) están causadas por factores de riesgo exógenos, asociados a determinados estilos de vida (tabaquismo, sedentarismo, aumento en el consumo calórico y de grasas saturadas) que actúan sobre un individuo genéticamente susceptible. La hipótesis de los orígenes en el desarrollo de la salud y la enfermedad menciona el impacto de las condiciones de vida intrauterina sobre la aparición de tales enfermedades en la vida adulta (Harrap 1994, Rey y cols. 1994, Langley-Evans 2006). Las tres etapas de la hipótesis antes mencionada se muestran en la figura 1. La primera se caracteriza por una malnutrición fetal donde se desencadenan cambios estructurales y funcionales en diferentes órganos y sistemas, en la segunda se encuentran cambios bioquímicos y clínicos, que constituyen variables intermedias en la aparición de enfermedades metabólicas y cardiovasculares y en la tercera la presencia de dichas enfermedades. Además hay que resaltar dos momentos del proceso: programación y amplificación. El concepto de programación se ha definido como la respuesta permanente de un organismo a un estímulo o agresión en un período crítico del desarrollo que tiene significado a largo plazo (Langley-Evans 2004). En relación con la amplificación, algunas de las variables como por ejemplo la presión arterial donde las diferencias observadas durante la infancia, son menores que las de la edad adulta, lo anterior condujo a postular que los procesos iniciados durante la gestación se amplifican a lo largo de la vida (Durán 2004).

### **1.3 Efecto de la restricción proteínica en la rata**

En crías de rata, la deficiencia de proteínas en la dieta materna durante la gestación y/o la lactancia, induce adaptaciones anatómicas y fisiológicas que le permiten sobrevivir en condiciones de deficiencias nutricionales (Miñana-Solis y Escobar 2007, Miñana-Solis y Escobar 2008, Gonçalves y cols. 2009). En la rata gestante la alimentación con una dieta isocalórica y baja en proteínas es uno de los modelos más estudiados de restricción temprana

del desarrollo. En general induce bajo peso corporal al nacimiento, alteraciones del metabolismo de carbohidratos, lípidos y la aparición de hipertensión, además se ha asociado con el incremento de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares en la vida adulta (Langley y cols. 1994, Zambrano y cols. 2006, Rodford y cols. 2008). En ratas, las alteraciones metabólicas que desencadena esta dieta muestran similitudes con los humanos para las alteraciones metabólicas durante la vida adulta (Bertram y Hanson 2001).



**Figura 1.** Esquema que muestra las posibles interacciones entre factores maternos y genéticos que actuarían sobre el crecimiento fetal y modificarían la respuesta de la descendencia en la vida adulta (modificado de Seckl 1998).

## **2. ANTECEDENTES**

### **1.4 Efecto de la restricción proteínica gestacional en la histología de hígado de rata**

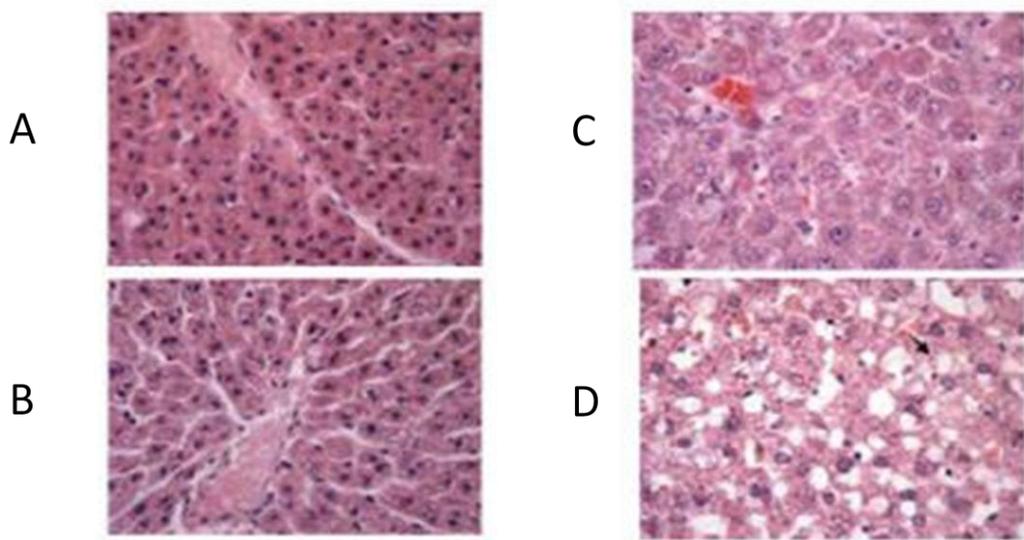
El hígado está organizado en placas de hepatocitos localizados en un esqueleto de células de apoyo, denominadas células retículo-endoteliales, las placas de células están separadas entre sí por espacios vasculares denominados sinusoides. Los hepatocitos tienen una disposición alrededor de la vena central para dar forma al lobulillo clásico que está delimitado principalmente en la rata por la triada porta que consiste en la vénula porta, arteriola hepática y canalículo biliar (Tung y cols. 2007).

El hígado, entre otros, es uno de los órganos que tienen una actividad metabólica importante, por lo que se vuelve de relevancia estudiar la histología hepática. Erhuma y su grupo realizaron un estudio para evaluar el efecto de la restricción proteínica gestacional sobre la histología hepática de la progenie, las ratas de tal estudio presentaron acumulación de grasa en el hígado (Erhuma y cols. 2007). En la figura 2 se muestran cortes histológicos del tejido hepático de ratas de 18 meses de edad, cuyas madres fueron sometidas a restricción proteínica gestacional, se observan depósitos de lípidos en forma de vacuolas en el parénquima hepático, testigo de una esteatosis (Erhuma y cols. 2007).

### **1.5 Efecto de la restricción proteínica gestacional sobre la insulina e hígado**

En las crías de rata provenientes de madres sometidas a restricción de proteínas durante el periodo de gestación, en el día uno después del parto, hay una disminución del peso del páncreas, menor porcentaje en densidad y masa de células beta y disminución en el área de las células, las alteraciones anteriores se mantienen hasta el día 21 de lactancia, lo cual podría indicar que las alteraciones son irreversibles y se mantienen hasta la vida adulta (Garofano y cols. 1997). Se ha mostrado que a los 110 días ratas machos que provienen de ratas gestantes con restricción de proteína presentan resistencia a la insulina (Zambrano y cols 2006). El hígado también es un órgano que se afecta por la acción de la insulina. La resistencia a la

insulina<sup>3</sup> es el principal factor de riesgo que promueve la esteatosis hepática no alcohólica<sup>4</sup>. Lo anterior ocurre con o sin la presencia de obesidad. La esteatosis hepática no alcohólica es causada por la acumulación crónica de lípidos en el hepatocito, en última instancia, puede dar lugar a la inflamación y cicatrización con potencial para padecer cirrosis<sup>5</sup> e insuficiencia hepática (Bugianesi y cols. 2005; Erhuma y cols. 2007).



**Figura 2.** Evidencia de la esteatosis hepática en ratas, cuyas madres fueron expuestas a una dieta baja en proteínas. Tinción de hematoxilina y eosina. A-B muestra cortes de ratas de 1 mes de edad (A-control, B-restringido), C-D muestra cortes de ratas de 18 meses de edad (C-control, D-restringido). CV-vena central (Imagen de Erhuma y cols. 2007).

---

<sup>3</sup> Remitirse al glosario

<sup>4</sup> Remitirse al glosario

<sup>5</sup> Remitirse al glosario

## **1.6 Efecto de la restricción proteínica gestacional sobre el tejido adiposo**

En condiciones normales el exceso de glucosa en el torrente circulatorio es captado por el hígado, donde es transformado en triglicéridos, y por medio de la acción de la insulina se almacenan en las células del tejido adiposo. Las células del tejido adiposo gonadal de ratas de tres meses de edad, provenientes de madres sometidas a restricción proteínica gestacional, muestran mayor captación de glucosa en estímulo a la insulina lo que puede indicar un aumento en el número de receptores a insulina (Ozanne y Hales 1999). La insulina es uno de los principales inhibidores de la movilización de ácidos grasos por lo que promueve su almacenamiento en los adipocitos, lo anterior favorece la hipertrofia de estas células (Kahn y Flier 2000).

El tejido adiposo también es el encargado de la producción de leptina. Los niveles de esta hormona son alterados en las crías cuando hay restricción de proteína en la madre durante la gestación. Las madres sometidas a restricción de proteína del 10% durante la etapa gestacional provoca en las crías machos un aumento en las concentraciones séricas de leptina a los 110 días (Zambrano y cols. 2006).

## **1.7 Dieta postnatal**

Una mala disponibilidad de nutrientes puede afectar el desarrollo de los tejidos fetales durante los períodos críticos del desarrollo. La dieta en etapas posteriores al nacimiento forma parte de los factores ambientales para el desarrollo de las alteraciones metabólicas. En ratas macho recién destetados, la ingesta de agua azucarada al 30% durante 18 y/o 21 semanas induce alteraciones como el sobrepeso, la adiposidad central, la hipertensión, la intolerancia a la glucosa y las dislipidemias (combinación de bajas concentraciones de C-HDL y altas concentraciones de triglicéridos y colesterol) (El Hafidi y cols. 2001, Alexander y cols. 2004).

También se han encontrado alteraciones metabólicas en ratas machos adultos que fueron alimentados con dieta alta en fructosa (60%) durante siete semanas, los machos presentaron hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión, y resistencia a la insulina (Herman y cols. 2008). En otro estudio con ratones de ocho semanas

de edad fueron que alimentados con una dieta alta en lípidos (71%) durante 16 semanas, presentaron alto contenido de triglicéridos en hígado, mayor acumulación de micro y macro vesículas de grasa, así como mayor cantidad de 3-nitrotirosina que es un indicador del daño oxidativo a proteínas. Por lo que se considera un modelo para desarrollar esteatosis hepática no alcohólica, con presencia de daño oxidativo en proteínas (Mantena y cols. 2009). Con lo anterior se puede decir que la dieta prenatal y postnatal son importantes y pueden determinar la aparición de las alteraciones metabólicas.

### **1.8 Combinación de la restricción proteínica gestacional y alteraciones en la dieta postnatal**

La combinación de la restricción de proteínas en la madre durante la etapa gestacional y un consumo elevado de lípidos en la progenie durante 10 semanas provoca mayor ganancia de peso corporal, hiperinsulinemia, disminuye el consumo del alimento y el peso del hígado (Erhuma y cols. 2007), aumento de la presión arterial y una disminución en el número de nefronas en el riñón (Harrison y Langlye-Evans 2009). Finalmente en ratones la combinación de la restricción de proteínas en la madre durante la etapa gestacional y un consumo elevado en colesterol en la progenie aumenta la concentración de triglicéridos, colesterol, grasa perirenal y gonadal (Yates y cols. 2009).

### **1.9 Alteraciones metabólicas y estrés oxidativo**

El estrés oxidativo<sup>6</sup> se define como la pérdida del balance entre radicales libres y antioxidantes, a favor de los radicales libres. Un radical libre<sup>7</sup> es cualquier átomo que contenga un electrón no apareado en su último orbital, lo que le confiere una elevada reactividad capaz de oxidar a cualquier molécula (Geronikaki y Gavalas 2006).

La oxidación de varias biomoléculas se ha correlacionado cuando las ratas son expuestas a problemas de alimentación, ozono, estrés por inmovilización, endotoxemia<sup>8</sup> y ejercicio extenuante. En los casos anteriores se ha observado aumento de la oxidación de

---

<sup>6</sup> Remitirse al glosario

<sup>7</sup> Remitirse al glosario

<sup>8</sup> Remitirse al glosario

proteínas y lípidos de diferentes órganos como el cerebro, hígado, aorta, riñón, corazón y estómago de ratas. Otra causa de la oxidación de biomoléculas se le ha atribuido a las alteraciones metabólicas (El-Dwairi y cols. 1998, Bonatto y cols. 2005, Pereyra-Muñoz y cols. 2006, Sahin y Gümüslü 2007).

Como ya se menciona anteriormente se sabe que las ratas que provienen de madres con restricción de proteínas, en la vida adulta desarrollan alteraciones del metabolismo, al igual que las ratas con una dieta postnatal alta en carbohidratos. En el trabajo de Yamaguchi y cols. 2006 se muestra un modelo de alteraciones metabólicas en rata de ocho semanas de edad, hay un aumento de la 3-nitrotirosina<sup>9</sup> y la 3-clorotirosina<sup>10</sup> en el plasma sanguíneo, estos dos últimos son biomarcadores de la oxidación de proteínas por el peroxinitrito y la mieloperoxidasa<sup>11</sup>. En el modelo de alteraciones metabólicas en ratas se evaluó la cantidad de nitrotirosina en suero, se encontraron valores más altos en las ratas con síndrome metabólico vs las controles, del mismo modo la expresión de la óxido nítrico sintasa<sup>12</sup> endotelial (eNOS, enzima que cataliza la reacción para la obtención de óxido nítrico en el endotelio) se encontró en mayor cantidad, lo que sugiere el aumento de las especies reactivas del oxígeno (Yamaguchi y cols. 2006, Kagota y cols. 2009).

---

<sup>9</sup> Remitirse al glosario

<sup>10</sup> Remitirse al glosario

<sup>11</sup> Remitirse al glosario

<sup>12</sup> Remitirse al glosario

### 3. JUSTIFICACIÓN

Estudios en seres humanos han relacionado, a los trastornos metabólicos como la obesidad, hipertensión, diabetes *mellitus* y problemas cardiovasculares con la calidad de la alimentación. En humanos existen evidencias de que la malnutrición<sup>13</sup> durante la gestación se correlaciona con los trastornos metabólicos ya mencionados por medio de los estudios epidemiológicos realizados en Inglaterra y Gales (Barker y Osmond 1986). A partir de los estudios epidemiológicos anteriores se plantea la hipótesis de Barker, actualmente conocida como "hipótesis de los orígenes en el desarrollo de la salud y la enfermedad" que propone una respuesta adaptativa del feto, a una nutrición materno-fetal deficiente, para poder sobrevivir, que resulta en la afección de algunos órganos por ejemplo riñón, páncreas y corazón, lo que lleva a un metabolismo postnatal modificado.

La restricción de proteínas durante la etapa gestacional es uno de los modelos más usados para dar soporte a la teoría de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad. Las observaciones realizadas con este modelo indican que las deficiencias nutricionales que ocurren en etapas críticas del desarrollo fetal pueden tener influencias de largo alcance, a través del control ejercido por mecanismos epigenéticos<sup>14</sup> en la expresión de varios genes que participan en el control del metabolismo (Yates y cols. 2009), sobre expresándolos o silenciándolos. Recientemente se ha mostrado que crías, cuyas madres fueron alimentadas durante la gestación con una dieta baja en proteínas y que en la vida adulta consumieron una dieta rica en lípidos desarrollan ateromas, aumentan la concentración de colesterol, triglicéridos, también muestran disminución en la expresión de RNAm de la enzima superóxido dismutasa, que participa en el control de radicales libres (Erhuma y cols. 2007; Yates y cols. 2009), por lo que se ha hecho una relación entre la aparición de alteraciones metabólicas y el estrés oxidativo (Yamaguchi y cols. 2006). Lo que indica que en la rata, tales adaptaciones resultan perjudiciales si en la vida posnatal (infancia, adolescencia y adultez) la alimentación se vuelve abundante, por ejemplo en grasas (Langley-Evans 2006; Erhuma y cols. 2007)

---

<sup>13</sup> Remitirse al glosario

<sup>14</sup> Remitirse al glosario

Sin embargo la dieta postnatal, por si sola, rica en carbohidratos también tiene efectos deletéreos en el metabolismo como por ejemplo: intolerancia a la glucosa, aumento de colesterol, triglicéridos, e insulina, disminución de C-HDL, (colesterol en lipoproteínas de alta densidad) (El Hafidi y cols. 2000; Alexander y cols. 2004; Herman y cols. 2008).

Sin embargo, aún se desconoce si las crías de ratas, provenientes de madres que durante la gestación fueron sometidas a restricción proteínica, son más vulnerables a alteraciones histológicas en hígado, al igual que alteraciones metabólicas cuando son sometidas en la vida adulta al consumo elevado de carbohidratos. Es por esto, que se hace necesario indagar los efectos que tienen ambas manipulaciones en el órgano central de los procesos metabólicos (el hígado) y el tejido donde se almacena lípidos para ser usados como sustrato para la obtención de energía el (tejido adiposo).

#### **4. HIPÓTESIS**

En una misma progenie, la combinación de restricción proteínica gestacional materna y el consumo de agua azucarada en la vida adulta potencian las alteraciones histológicas del hígado, del tejido adiposo e indicadores bioquímicos metabólicos, incluida la producción incrementada de estrés oxidativo.

## **5. OBJETIVOS**

1. Evaluar en la progenie adulta los efectos generados por la restricción proteínica gestacional materna.
2. Evaluar en ratas adultas los efectos generados por el consumo de agua azucarada.
3. Evaluar en la progenie adulta la combinación de ambos tratamientos verificando si el efecto se potencia o incrementa.
4. Evaluar el daño en las ratas adultas determinando el área total de hepatocitos y adipocitos, la presencia de esteatosis hepática, el daño oxidativo hepático (3-nitrotirosina), y las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos y colesterol de lipoproteínas de alta densidad.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.10 Mantenimiento de los animales

Se utilizaron 20 ratas hembras adultas de la cepa Wistar de tres meses de edad. Fueron mantenidas en condiciones de bioterio, con un fotoperiodo de 12/12 horas, con ciclo luz-oscuridad invertido y temperatura de  $20\pm 2$  °C, con alimento y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a la regulación establecida en el Manual de Seguridad en el trabajo de laboratorio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta y en la Norma Oficial Mexicana en el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio NOM-062-ZOO-1999. El protocolo de investigación fue revisado y aprobado por el comité de Bioética del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta.

### 1.11 Grupos experimentales

**Control.** Ratas vírgenes que fueron alimentadas (con una dieta proteínica al 20%) de manera *ad libitum* hasta los cinco meses de edad.

**Restricción proteínica gestacional.** Ratas adultas que fueron alimentadas durante la gestación de manera *ad libitum* con dieta isocalórica reducida en proteínas (10%, tabla 2). El día del apareamiento se consideró como el día cero de gestación e inició la restricción proteínica intrauterina. A partir del día uno de gestación, se midió el consumo de alimento diario y el peso corporal. Después del parto, las camadas fueron ajustadas a 10 crías y a las madres, que fueron lactantes se les proporcionó alimento *ad libitum* Chow 5001 de Purina. El peso corporal y el consumo de alimento fueron monitoreados semanalmente desde el nacimiento. A la edad de 12 semanas, las crías de ambos grupos fueron divididas en dos subgrupos: a uno se le proporcionó agua simple para beber y al otro agua azucarada al 5%, ver diseño experimental (figura 3).

**Consumo elevado de carbohidratos en la etapa adulta.** De cada camada se tomaron dos ratas macho, a una se les proporcionó agua simple y a la otra agua azucarada al 5%, tal manipulación se realizó a partir de los tres meses y hasta los cinco meses de edad. En esta

etapa, se midió semanalmente el peso corporal, consumo de alimento y agua, ver diseño experimental (figura 3).

### **1.12 Obtención y análisis histológicos del tejido hepático y adiposo**

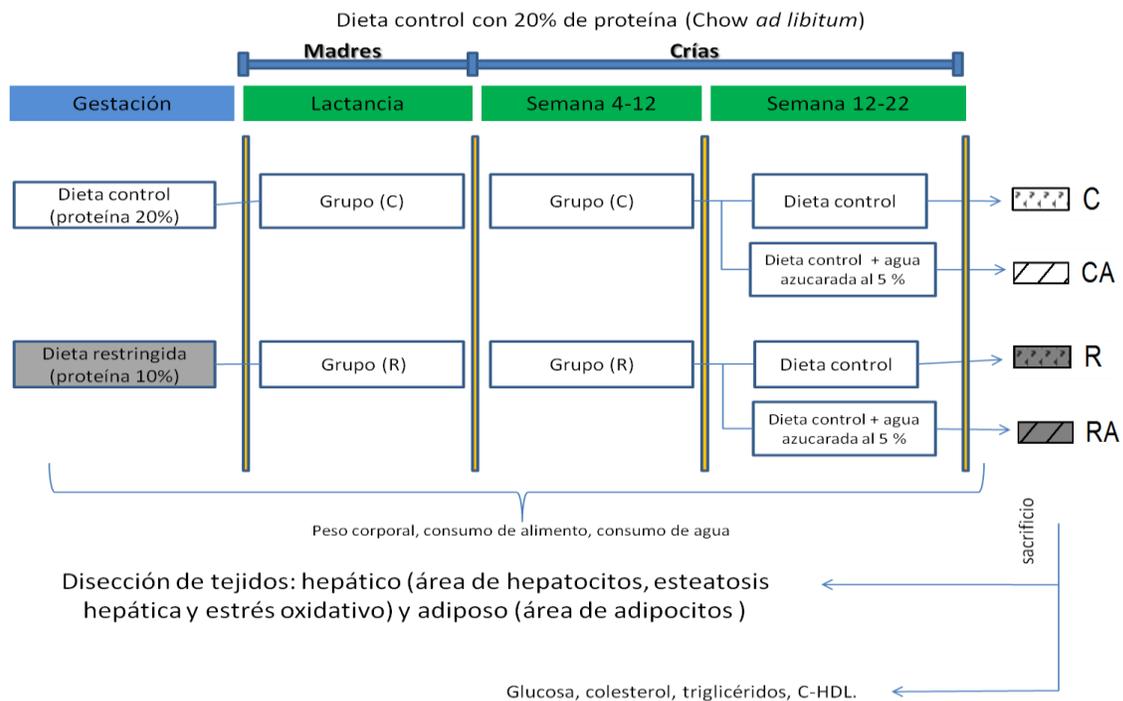
El tejido hepático se procesó en primera instancia con formaldehído al 10%, mínimo por 24 h. Posteriormente, el tejido se deshidrató con alcohol etílico en concentraciones ascendentes desde 60, 80, 96 y 100%, aclaró en xileno y se incluyó en paraplast X-tra. Se obtuvieron cortes histológicos transversales (ocho de cada animal) con un micrótopo de siete  $\mu\text{m}$  de espesor, los cuales se colocaron en dos portaobjetos, cuatro cortes por laminilla. Una laminilla fue teñida con hematoxilina-eosina. La otra se utilizó para la determinación de 3-nitrotirosina (inmunohistoquímica).

De los cortes teñidos con hematoxilina-eosina analizamos área nuclear y citoplasmática de los hepatocitos, para ello se tomaron de cada lobulillo microfotografías a 1000 aumentos totales, como referencia se consideró la vena central del lobulillo (un campo derecho y otro izquierdo).

El tejido adiposo se procesó de la misma forma en que se procesó el tejido hepático. Los cortes histológicos del tejido adiposo únicamente fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Para la descripción histológica de los cortes histológicos teñidos se procedió a tomar microfotografías a 400 aumentos totales para seleccionar seis campos al azar de cada rata y en ellos medir el área de los adipocitos.

| Ingredientes        | Dieta normal en proteína | Dieta reducida en proteína |
|---------------------|--------------------------|----------------------------|
|                     | (NP)<br>(%)              | (RP)<br>(%)                |
| Caseína             | 20                       | 10                         |
| Cisteína            | 0.3                      | 0.15                       |
| Colina              | 0.165                    | 0.165                      |
| Mezcla de vitaminas | 1                        | 1                          |
| Mezcla de minerales | 3.5                      | 3.5                        |
| Celulosa            | 5                        | 5                          |
| Aceite de maíz      | 5                        | 5                          |
| Carbohidratos       |                          |                            |
| Almidón de maíz     | 31.76                    | 37.34                      |
| Dextrosa            | 31.76                    | 37.34                      |
| Kcal/g de dieta     | 4                        | 4                          |

**Tabla 2.** Composición de las dietas con que fueron alimentadas las ratas durante la gestación (Zambrano 2005). La dieta fue proporcionada por la Dra. Elena Zambrano González del departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.



**Figura 3.** Diseño experimental. Grupo control (C n=6), grupo control con azúcar (CA n=6), grupo restringido (R n=7), grupo restringido con azúcar (RA n=7).

### **1.13 Determinación de daño oxidativo (3-nitrotirosina)**

Se usaron 4 cortes histológicos del tejido hepático los cuales fueron sometidos al siguiente protocolo: el primer paso fue la desparafinación e hidratación de los tejidos. Posteriormente, se destaparon los antígenos con citrato de sodio 10 mM pH 6 durante 72 h, transcurrido el tiempo se incubaron en el horno de microondas durante 5 minutos a potencia 10, inmediatamente se realizó una serie de tres lavados de 10 minutos cada uno con buffer de fosfatos salina 100 mM pH 7.4 (PBS). Se bloquearon las peroxidasas endógenas con una solución de peróxido de hidrogeno al 3% durante 30 minutos y se volvieron a realizar dos lavados con PBS de 10 min cada uno y un lavado con PBS-tritón X-100 al 0.3%. Luego se bloquearon las uniones inespecíficas con suero de cabra al 5% en PBS-tritón al 0.3% durante una hora a temperatura ambiente, al concluir el tiempo se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS-tritón al 0.3% para después dejar incubando toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario purificado de ratón monoclonal IgG anti 3-Nitrotirosina (MILLIPORE, MAB5404) a una dilución de 1:200 en PBS-tritón al 0.3%. Al día siguiente se realizó una serie de tres lavados con PBS-tritón al 0.3% por 10 min cada uno y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario del kit (starr trek universal HRP detection, fabricante). Posteriormente, se hicieron dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS-tritón al 0.3% y un lavado con PBS, después se aplicó la avidina e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se realizaron dos de lavados de 10 minutos con PBS y se aplicó la diaminobencidina para revelar la ubicación de la 3-nitrotirosina. Se realizó una serie de seis lavados con PBS. La contratinción se realizó con violeta de cresilo. De los cortes histológicos se tomaron microfotografías a 400 aumentos totales, tomando siempre como referencia el conducto central de los lobulillos.

### **1.14 Obtención de muestras sanguíneas y determinaciones bioquímicas**

Previo al sacrificio, y habiendo cumplido un ayuno de cuatro horas, a cada rata se le midió la glucosa sérica con un analizador Accutrend GCT, Roche Diagnostics. Inmediatamente después los animales fueron decapitados y se colectaron dos tubos (13x100) con sangre total, misma que fue centrifugada para recolectar el suero sanguíneo en el cual se determinaron las

concentraciones de colesterol, colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL), triglicéridos.

Para la determinación de colesterol se utilizó el método enzimático combinado de colesterol oxidasa y colesterol esterasa. Según el procedimiento No. 1010 de Stanbio Colesterol liquicolor (LICON Laboratorios). En tubos eppendorf se pipetearon cinco  $\mu\text{l}$  de la muestra con 500  $\mu\text{l}$  de reactivo enzimático líquido (cat No. 1011). Se agitaron en un vortex y se dejaron reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la lectura en un fotómetro a 492 nm.

Para la determinación de C-HDL, primero se precipitaron las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL, VLDL respectivamente) por medio del reactivo de cloruro de magnesio/dextran sulfato. Para esto se pipetearon 125  $\mu\text{l}$  de muestra y 12.5  $\mu\text{l}$  de reactivo precipitante. Se agitó con vortex y se dejó estabilizar a temperatura ambiente por cinco minutos. Posteriormente se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos. Luego se pipetearon 2.5  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y 500  $\mu\text{l}$  del mismo reactivo que se utilizó para determinación de colesterol total. Se agitaron en un vortex y se dejaron reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la lectura en un fotómetro a 492 nm.

Para la determinación de triglicéridos se utilizó un método colorimétrico enzimático (glicerolfostato oxidasa). Según el procedimiento No. 2100 de Stanbio Triglicéridos liquicolor (LICON Laboratorios). Se preparó previamente el reactivo (cat No. 2101), por cada 50 ml de este, se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de activador (cat No. 2102), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de utilizarlo. Se pipetearon en tubos eppendorf cinco  $\mu\text{l}$  de muestra y 500  $\mu\text{l}$  de reactivo. Se agitaron en un vortex y se dejaron reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 500 nm.

### **1.15 Diseño y análisis estadístico**

Para comparar los grupos utilizamos una ANOVA bifactorial mixta, solo se consideraron los efectos de cada factor que son los que se indican el pie de la figura, consideramos como variable completamente aleatorizada la dieta materna (restricción de proteínas en la gestación) y como variable dependiente el consumo elevado de carbohidratos. También se utilizó una  $t$  de

Student dependiendo el caso, para ambas pruebas se considero el valor de alfa = 0.05. Los datos se presentan como  $\text{media} \pm \text{ee}$ .

### **1.16 Análisis de imagen**

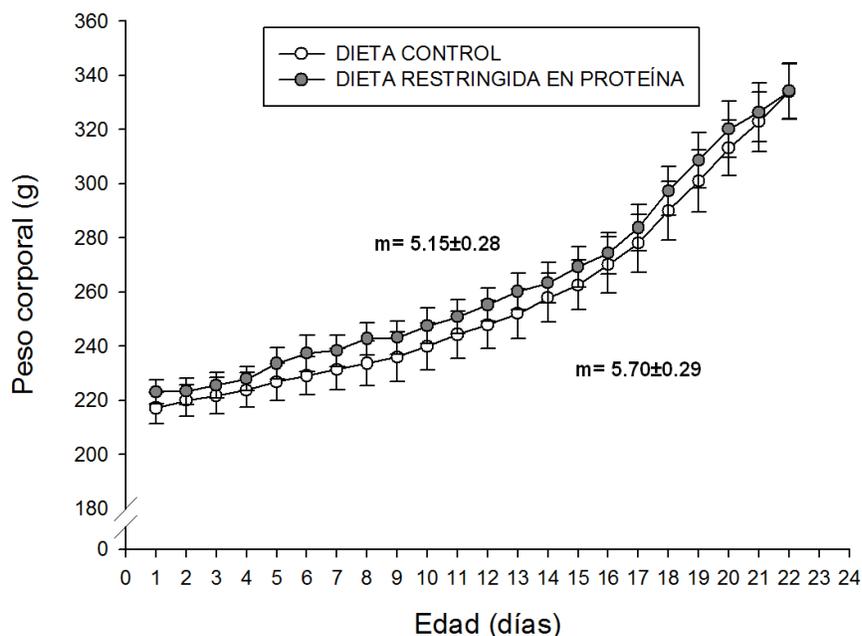
El análisis de las fotografías de los tejidos se realizó con la ayuda de un analizador de Imágenes AxioVision REL 4.6 (Zeiss Inc 2007) las fotografías fueron tomadas con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega píxeles montada en un microscopio óptico Zeiss Imager A.1.

## **7. RESULTADOS**

### **1.17 Efecto de la restricción de proteínas sobre el peso corporal en la rata gestante**

El peso corporal de las madres con dieta control al inicio de la gestación fue de  $217.1 \pm 5.2$  g y para las restringidas en proteína de  $223.1 \pm 4.8$  g, sin presentar diferencias estadísticamente significativas, durante este periodo se evaluó el peso corporal diario de las ratas, se obtuvieron las pendientes de la curva de crecimiento de las ratas control con una  $m = 5.7 \pm 0.2$  y de las ratas restringidas tuvieron una  $m = 5.1 \pm 0.2$ , sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre grupos (figura 4).

Para el consumo de alimento y energía de las ratas durante el periodo de gestación los días 1, 7, 14 y 21 no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre grupos, pero en el consumo de proteínas se encontraron diferencias estadísticamente significativas de las ratas restringidas comparadas con su control ( $P < 0.05$ , tabla 3.)



**Figura 4.** Peso corporal de las ratas gestantes. Se muestra media $\pm$ e.e. No se encontraron diferencias significativas entre el valor de la pendiente de ambas curvas,  $P > 0.05$  *t* de Student, ( $m$  = pendiente de la curva, dieta control  $n = 6$ , dieta restringida en proteína  $n = 7$ ).

| VARIABLE  |              | DÍA 1                      | DÍA 7                      | DÍA 14                     | DÍA 21                     |
|---|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| CONSUMO DE ALIMENTO (g/ 100 g de peso corporal) | Control      | 13.1 $\pm$ 1.7             | 10.3 $\pm$ 0.6             | 10.7 $\pm$ 0.9             | 5.3 $\pm$ 0.7              |
|   | Restringidas | 13.2 $\pm$ 1.6             | 9.7 $\pm$ 0.6              | 10.1 $\pm$ 0.8             | 7.0 $\pm$ 0.7              |
| CONSUMO DE ENERGÍA (Kcals/día)                  | Control      | 113.3 $\pm$ 16.4           | 95.5 $\pm$ 6.8             | 110.2 $\pm$ 10.0           | 72.0 $\pm$ 10.0            |
|   | Restringidas | 119.5 $\pm$ 15.2           | 92.5 $\pm$ 6.3             | 107.1 $\pm$ 9.3            | 93.8 $\pm$ 9.3             |
| CONSUMO DE PROTEÍNA (g/día)                     | Control      | 5.7 $\pm$ 0.5              | 4.8 $\pm$ 0.3              | 5.5 $\pm$ 0.3              | 3.6 $\pm$ 0.3              |
|   | Restringidas | 2.9 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup> | 2.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> | 2.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup> | 2.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup> |

**Tabla 3.** Consumo de alimento, energía y proteína de las ratas gestantes al día 1, 7, 14 y 21 de gestación. Se muestra la media $\pm$ e.e. <sup>a</sup> Diferencias estadísticamente significativas comparado con su control en el mismo día  $P < 0.05$  *t* de Student, control ( $n = 6$ ) y restringidas ( $n = 7$ ).

### **1.18 Medidas morfométricas en las crías al nacimiento**

Las medidas morfométricas, obtenidas un día después del nacimiento: peso corporal, talla, diámetro cefálico, diámetro abdominal y distancia ano-genital, no presentan diferencias significativas en ninguno de los casos, comparados con el control (tabla 4).

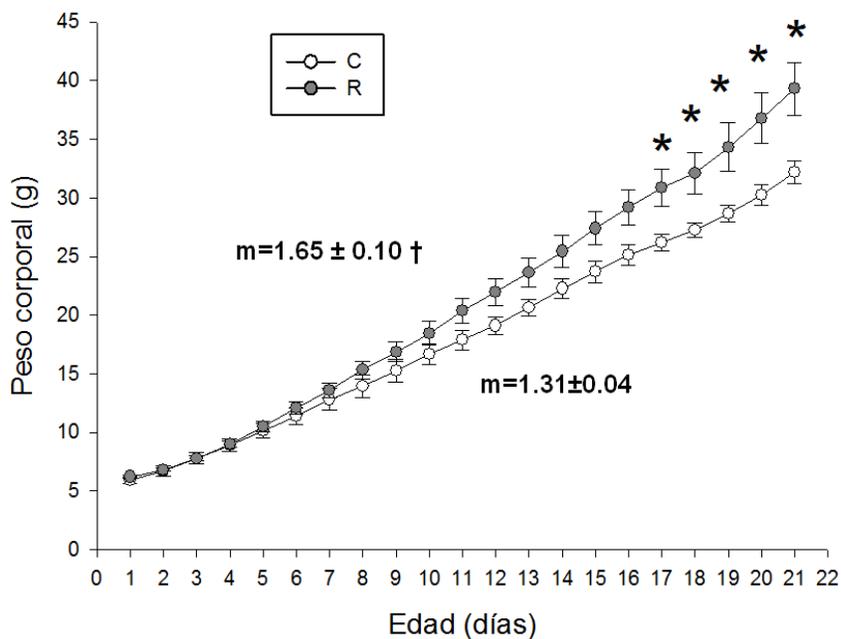
### **1.19 Crecimiento de las crías**

El peso corporal de las crías se midió durante todo el periodo de lactancia, en el día uno las crías de madres control tuvieron un peso corporal de  $5.90 \pm 0.18$  g y las crías de madres restringidas de  $6.09 \pm 0.17$  g, no hay diferencias significativas, sin embargo del día 17 hasta el día 21 de lactancia se observan diferencias estadísticamente significativas de las crías de madres restringidas vs las crías de madres control ( $P < 0.05$ ). De manera más general al comparar la pendiente (m) de la curva de crecimiento de las crías que provienen de madres restringidas ( $m = 1.65 \pm 0.1$ ) es mayor que la de las crías provenientes de madres control ( $m = 1.31 \pm 0.04$ ,  $P < 0.05$ , figura 5).

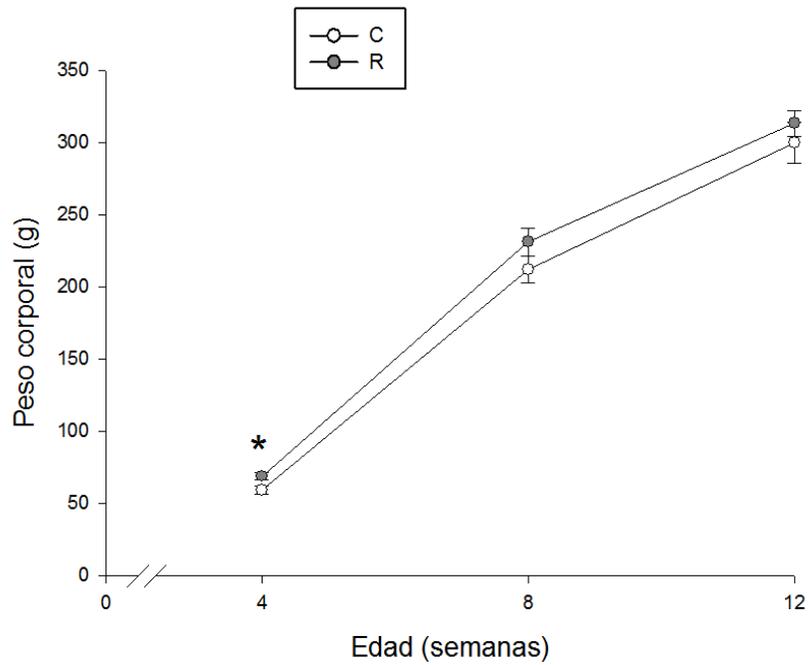
El peso corporal de las crías que provienen de madres restringidas de proteína ( $68.5 \pm 2.5$  g) en la semana cuatro es mayor en comparación con las crías provenientes de madres control ( $59.1 \pm 2.7$  g,  $P < 0.05$ ), en las semanas posteriores ya no hay diferencia de peso corporal entre ambos grupos (figura 6). El consumo de alimento de las crías provenientes de madres restringidas no fue diferente de las crías provenientes de madres control en las semanas 4, 8 y 12 (figura 7).

|  | Control   | Restringidas | p   |
|--|-----------|--------------|-----|
| Peso corporal (g)                      | 6 ±0.1    | 6 ±0.1       | 0.2 |
| Talla (mm)                             | 49.5 ±0.1 | 48 ±0.1      | 0.3 |
| Diam cefálico (mm)                     | 11 ±0.1   | 11 ±0.1      | 0.5 |
| Diam abdominal (mm)                    | 15 ±0.2   | 15 ±0.3      | 0.2 |
| Relación diam cefálico: diam abdominal | 0.7 ±0.1  | 0.7 ± 0.1    | 0.2 |
| Dist. ano-genital(mm)                  | 4.5 ±0.1  | 4.5 ± 0.1    | 0.7 |
| Dist ano-genital (mm g <sup>-1</sup> ) | 0.8 ±0.1  | 0.7 ±0.1     | 0.6 |

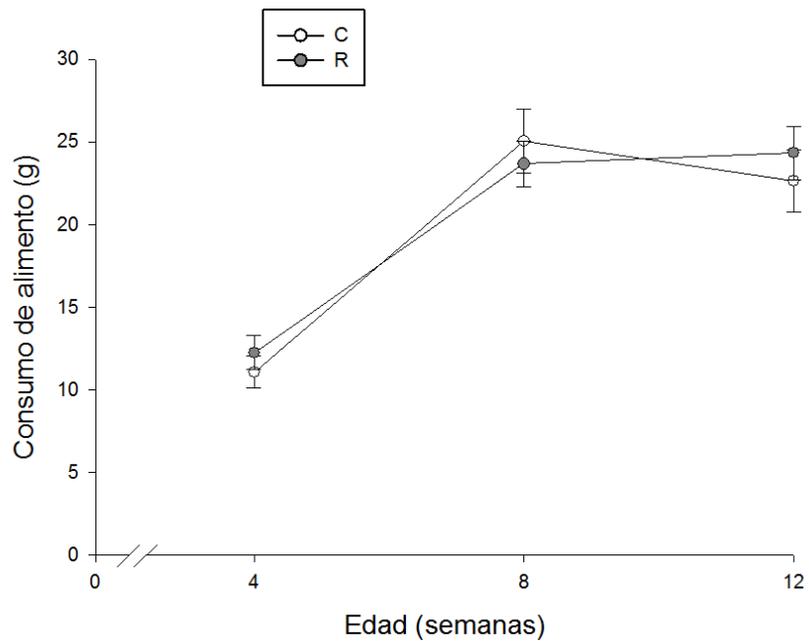
**Tabla 4.** Medidas morfométricas de las ratas crías al nacimiento. Se muestra la media±e.e. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, el valor de P se muestra en la tabla t de Student. Control (n=6) y restringido (n=7).



**Figura 5.** Peso corporal de la progenie, machos restringidos y control durante la lactancia. Se muestra la media±e.e. \*Diferencias significativas del día 17 al día 21 comparado con su control P<0.05 t de Student, †diferencias en la comparación de la pendiente (m) comparado con su control P<0.05 t de Student. Control (C n=6) y restringidas (R n= 7).



**Figura 6** Peso corporal después del destete (semana 4, 8 y 12). Se muestra la media±e.e. \*Diferencias significativas del grupo restringido comparado con su control en la semana cuatro  $P < 0.05$  *t* de Student. Control (C n=6) y restringido (R n=7).



**Figura 7** Consumo de alimento después del destete (semana 4, 8 y 12). Se muestra la media±e.e. No hay diferencias significativas entre grupos. Control (C n=6) y restringido (R n=7).

## **1.20 Consumo elevado de carbohidratos**

### **1.20.1 Peso corporal, consumo de alimento, agua, carbohidratos y calorías totales**

El peso corporal no se encontró afectado en la semana 22. El consumo de alimento en el grupo C fue de  $7.0 \pm 0.2$  g, en el grupo R fue de  $8.0 \pm 0.4$ , en el grupo CA fue de  $4.9 \pm 0.2$  g y en el grupo RA fue de  $5.7 \pm 0.4$  g por cada 100 g de peso corporal respectivamente, el consumo de alimento disminuye por efecto de la dieta materna y el consumo elevado de carbohidratos (tabla 5).

El consumo de agua en el grupo C fue de  $15 \pm 3$  mL, en el grupo R fue de  $14 \pm 2$  mL en el grupo CA fue de  $36 \pm 3$  mL y en el grupo RA fue de  $26 \pm 2$  mL por cada 100 g de peso corporal respectivamente, por lo que los grupos con la dieta alta en carbohidratos beben más agua. La ingesta de carbohidratos en el grupo C fue de  $2.8 \pm 0.1$  g, el grupo R fue de  $3.1 \pm 0.1$  g, en el grupo CA fue de  $3.8 \pm 0.1$  g y en el grupo RA fue de  $3.7 \pm 0.1$  g por cada 100 g de peso corporal respectivamente, por lo que los grupos adicionados con sacarosa en el agua tienen un consumo mayor de carbohidratos. Sin embargo el consumo de calorías no se modifica (tabla 5).

## **1.21 Peso y características histológicas del hígado y tejido adiposo**

### **1.21.1 Peso del hígado**

El peso del hígado del grupo C fue de  $12.4 \pm 0.5$  g, del grupo R fue de  $12.9 \pm 0.5$  g, del grupo CA fue de  $13.4 \pm 0.5$  g y en el grupo RA fue de  $13.2 \pm 0.5$  g. Sin diferencias significativas entre grupos (figura 8).

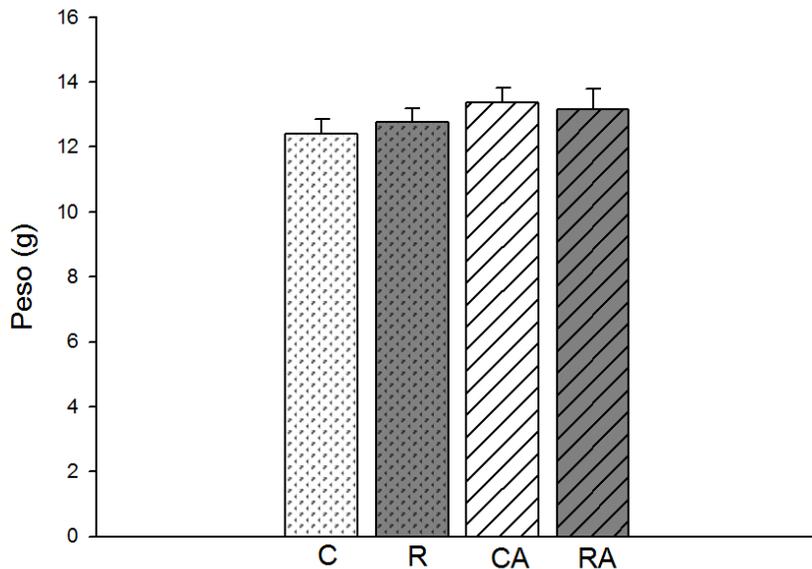
### **1.21.2 Área del citoplasma de los hepatocitos**

El área del citoplasma de los hepatocitos del grupo C fue de  $1933.9 \pm 11.1 \mu\text{m}^2$ , del grupo R fue de  $198.2 \pm 10.3 \mu\text{m}^2$ , del grupo CA fue de  $235.2 \pm 11.1 \mu\text{m}^2$  y del grupo RA fue de  $205.9 \pm 10.3 \mu\text{m}^2$ . El análisis estadístico muestra un aumento en el área del citoplasma de hepatocitos por efecto del consumo elevado de carbohidratos ( $P < 0.05$ , figura 9).

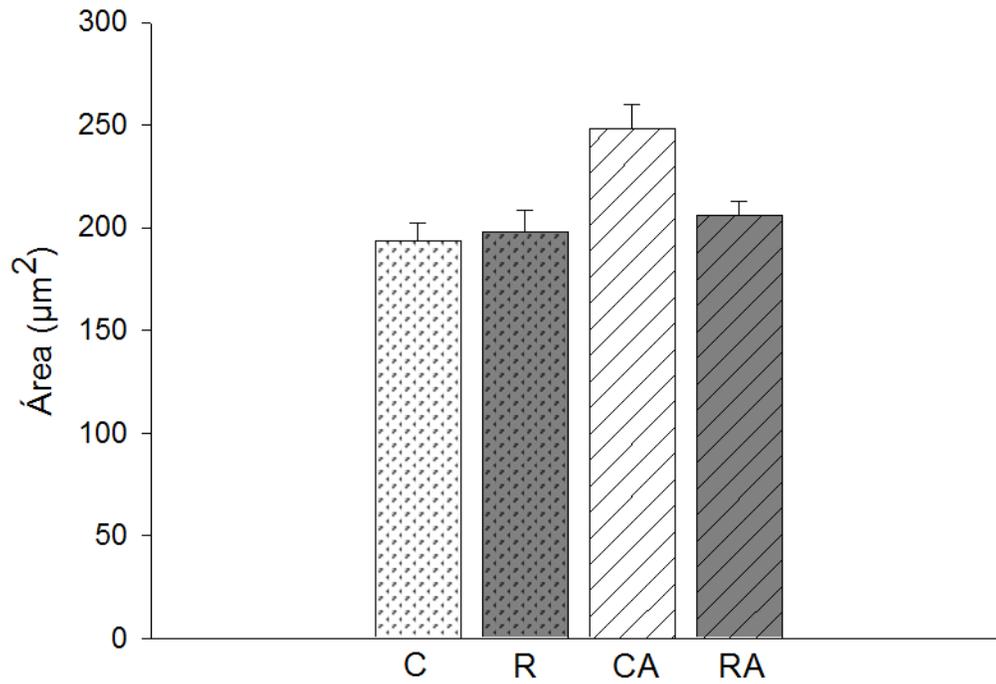
En la figura 10 se aprecian las microfotografías de los cortes histológicos del tejido hepático, se puede observar que en el citoplasma de los hepatocitos de los grupos CA y RA hay acumulación lipídica, lo cual es evidencia de estatois hepática, lo que se observa en las microfotografías es un panorama general de lo que apreciamos en las mayoría de los tejidos de los cuatro grupos, en el grupo CA las acumulaciones lipídicas están más agrupadas en áreas más pequeñas del corte histológico por lo que en el campo observamos mayor cantidad de inclusiones lipídicas y en los cortes del grupo RA las inclusiones lipídicas se diseminan en una área mayor del corte histológico por lo que se aprecia con menor cantidad en un campo.

| Grupos  | Peso corporal (g) | Consumo de alimento (g) | Consumo de agua (mL) | Consumo de carbohidratos (mL) | Calorías totales |
|---|-------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------------|------------------|
| Control   | 400.5±15          | 7 ±0.2                  | 15 ±3                | 2.8 ±0.1                      | 19±1             |
| Restringido   | 412.8 ±14         | 8 ±0.4                  | 14 ±2                | 3.1±0.1                       | 20±1             |
| Control con azúcar  | 398.4±15          | 5±0.2                   | 36 ±3                | 3.8±0.1                       | 21±1             |
| Restringido con azúcar  | 422.7±14          | 6 ± 0.4                 | 26 ±2                | 3.7±0.1                       | 21±1             |
| P para efecto de la dieta materna   | NS                | P<0.05                  | NS                   | NS                            | NS               |
| P para efecto del consumo elevado de carbohidratos                        | NS                | P<0.0001                | P<0.0001             | P<0.0001                      | NS               |
| P para la interacción de dieta materna * consumo elevado de carbohidratos | NS                | NS                      | NS                   | NS                            | NS               |

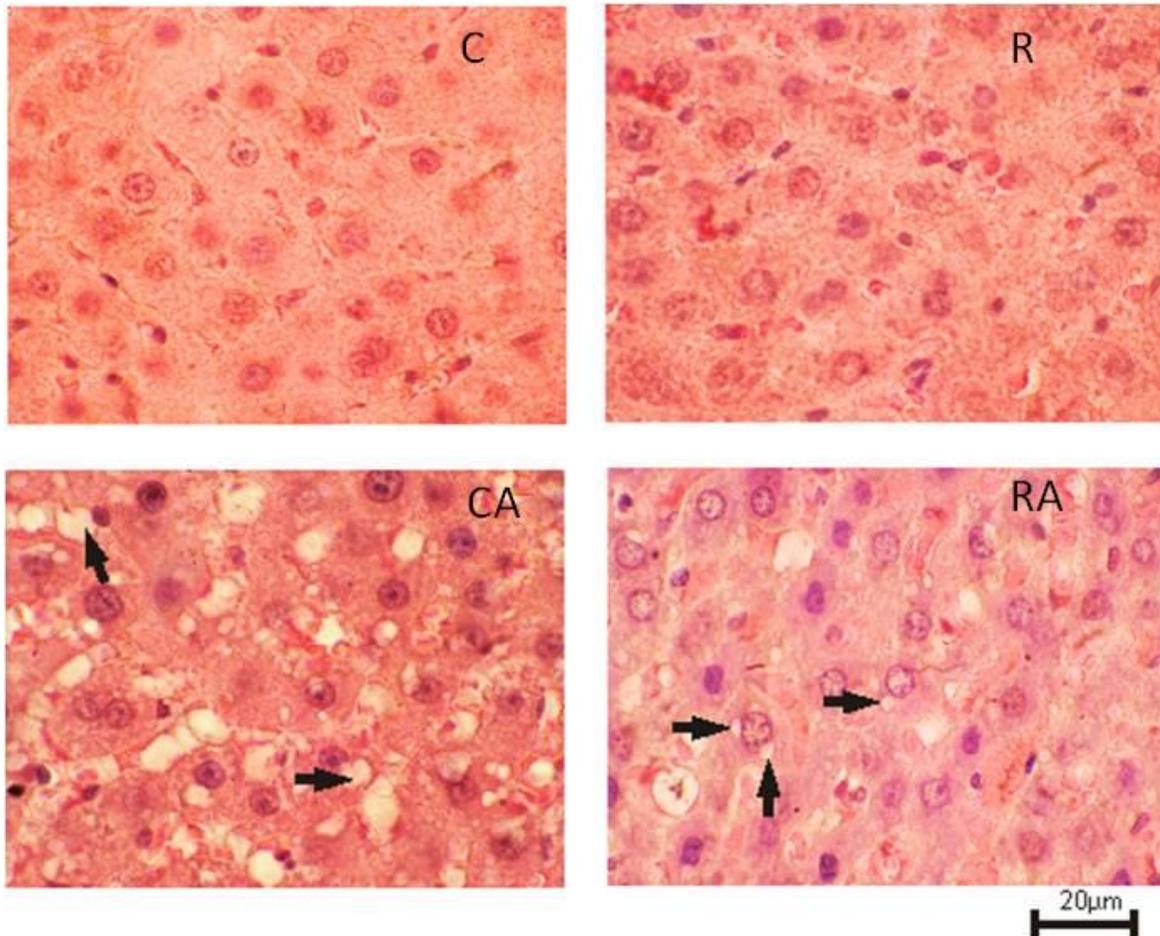
**Tabla 5.** Peso corporal, ingesta de alimento, agua, carbohidratos y calorías durante el consumo elevado de carbohidratos. Se muestra la media ± e.e. Para el caso de consumo de alimento, agua, carbohidratos y calorías están ajustados por día por cada 100 g de peso corporal. Los efectos de los factores se muestran en la tabla, indicando el valor de P para el efecto que corresponda. ANOVA de dos vías  $F_{(3,25)}=15.78$ ,  $P<0.0001$ . Control (n=6) y restringido (n=7).



**Figura 8.** Peso del hígado. Se muestra la media ± e.e. No hay diferencias significativas entre grupos, ANOVA de dos vías  $F_{(3,25)}=0.64$ ,  $P=0.59$ . Subgrupos control (C n=6), restringido (R n=7), control con azúcar (CA n=6), restringido con azúcar (RA n=7).



**Figura 9.** Área del citoplasma de los hepatocitos. Se muestra la media  $\pm$  e.e. El área de los hepatocitos aumenta por efecto del consumo elevado de carbohidratos, ANOVA de dos vías  $F_{(3,25)}=2.83$ ,  $p=0.03$ . Subgrupos control (C  $n=6$ ), restringido (R  $n=7$ ), control con azúcar (CA  $n=6$ ), restringido con azúcar (RA  $n=7$ ).

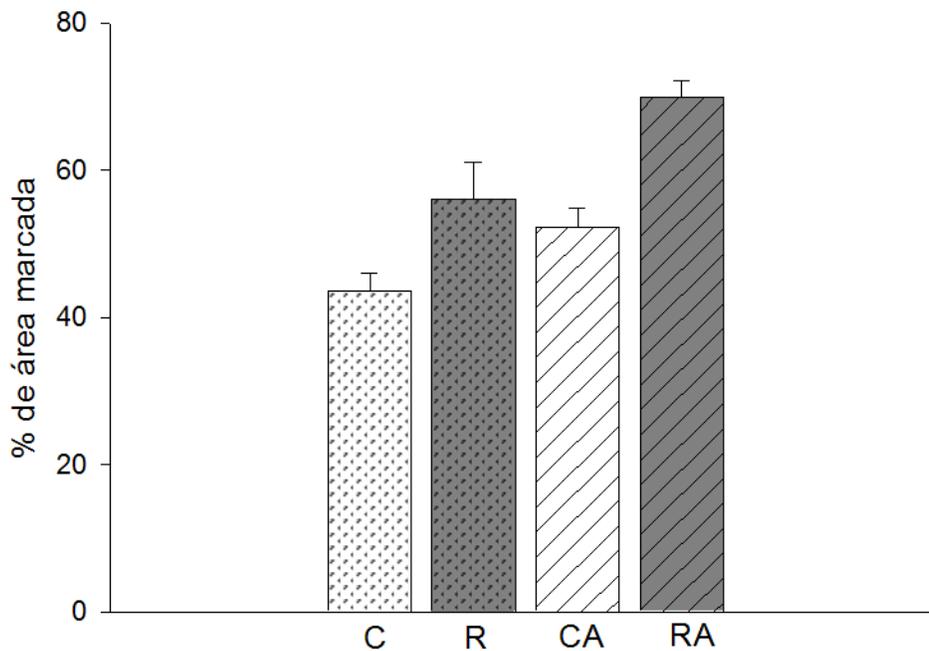


**Figura 10.** Microfotografías de los cortes de tejido hepático. Las flechas indican las vacuolas de grasa acumuladas en el citoplasma de los hepatocitos (esteatosis hepática).

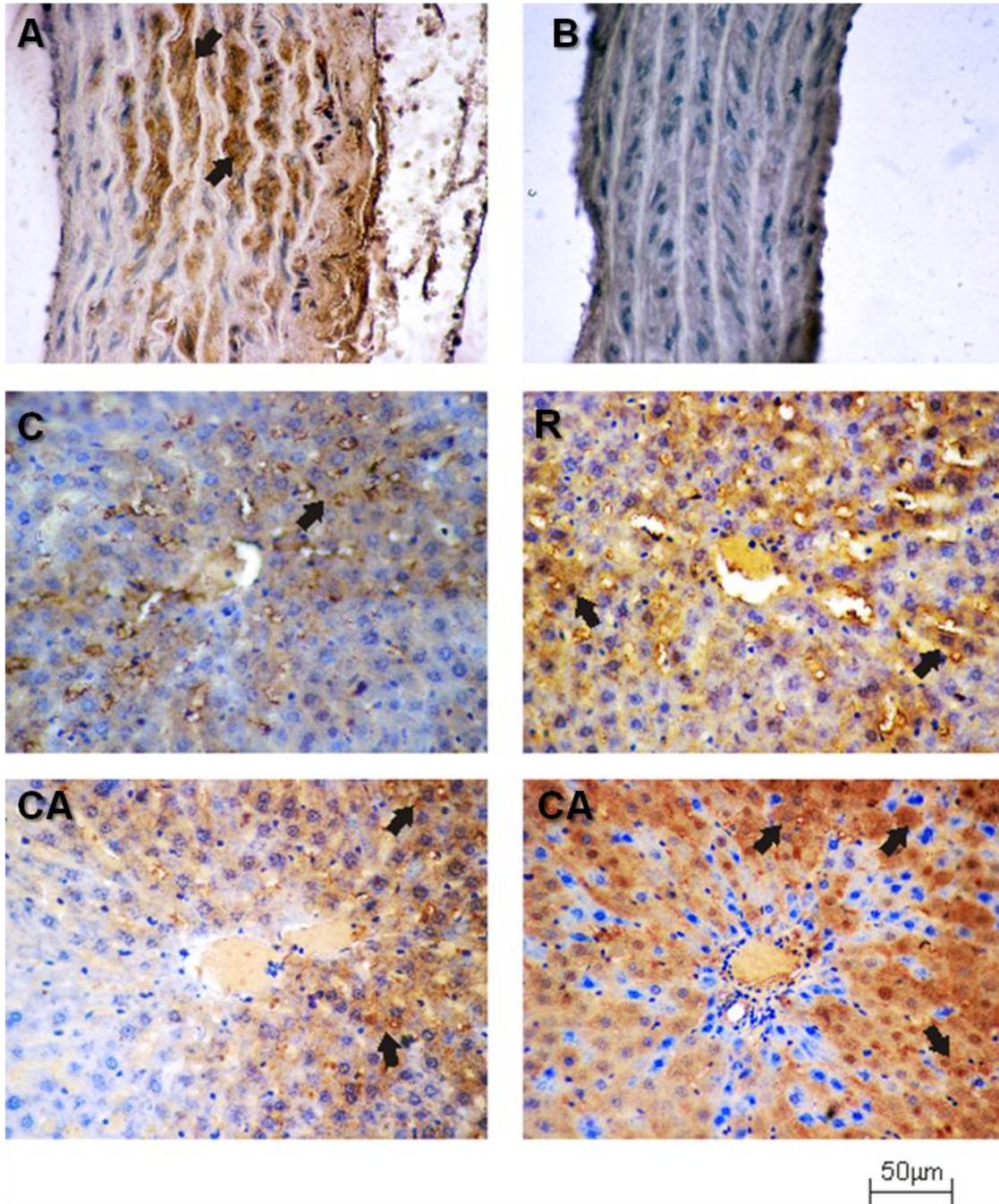
### 1.21.3 Inmunorreactividad anti 3-nitrotirosina en cortes de hígado

El porcentaje de área marcada con 3-nitrotirosina del grupo C fue de  $43.6 \pm 2.1$  %, del grupo R fue de  $60.0 \pm 5.0$  %, del grupo CA fue de  $52.3 \pm 2.6$  %, y para el grupo RA fue de  $69.8 \pm 2.3$  %. El porcentaje del área marcada con 3-nitrotirosina aumenta por efecto de la dieta materna ( $P < 0.001$ ) y por efecto de la dieta alta en carbohidratos ( $P < 0.05$ ; figura 11).

En la figura 12 podemos apreciar las microfotografías de la inmunohistoquímica contra la 3-nitrotirosina, evidenciada por el color marrón que es señalado por las flechas. En el control positivo (A) podemos observar como es el marcaje contra la 3-nitrotirosina, a diferencia del control negativo (B) donde no se aprecia el color marrón. En las microfotografías el grupo control (C) se observa una menor área con el color marrón en comparación con el grupo restringido (R), control con azúcar (CA) y restringido con azúcar (RA).



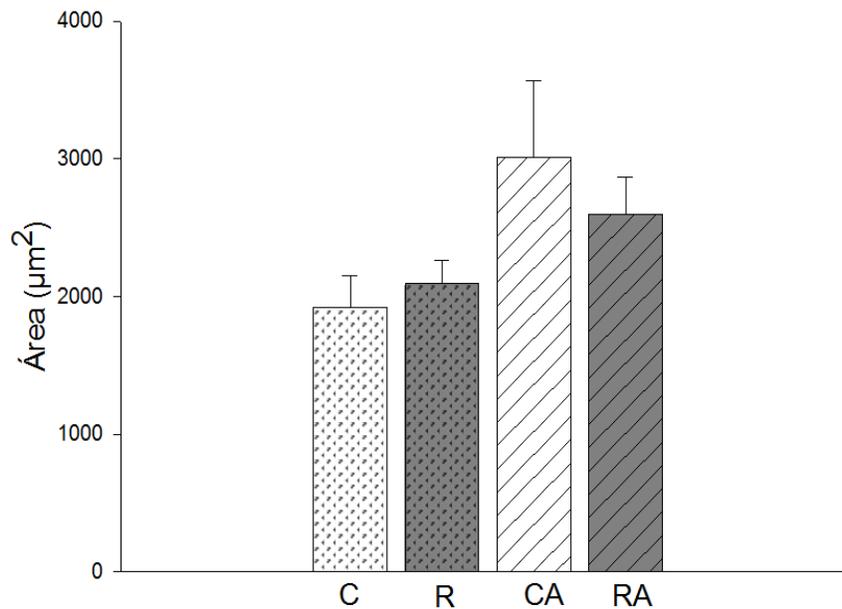
**Figura 11.** Inmunorreactividad anti 3-nitrotirosina en cortes de hígado. Se muestra la media  $\pm$  e.e. El porcentaje de área marcada aumenta por efecto del consumo elevado de carbohidratos ( $P < 0.05$ ) y por efecto de la dieta materna ( $P < 0.001$ ), ANOVA de dos vías  $F_{(3,25)}=10.60$ ,  $P=0.0002$ . Subgrupos control (C n=6), restringido (R n=7), control con azúcar (CA n=6), restringido con azúcar (RA n=7).



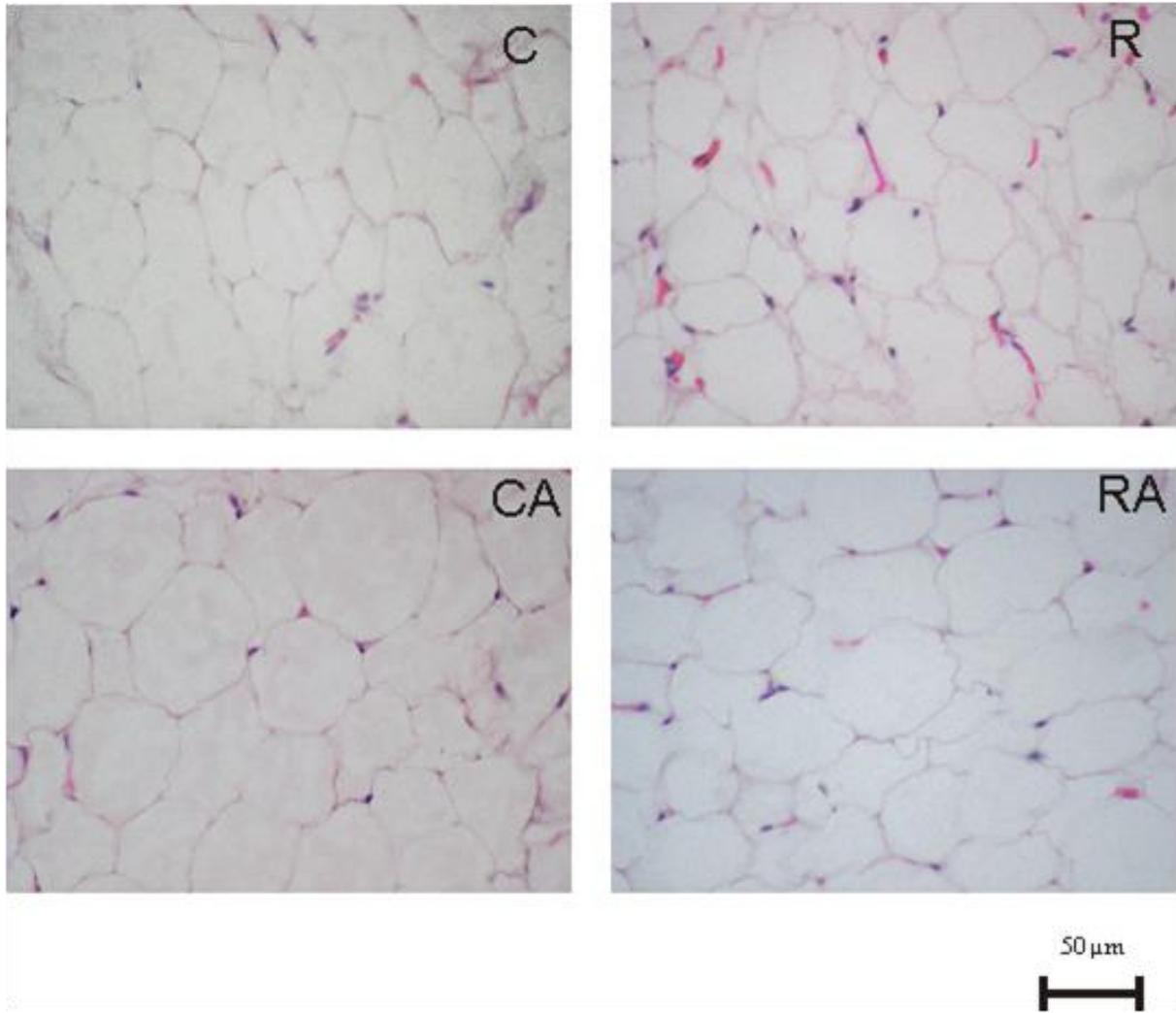
**Figura 12.** Microfotografías de la inmunohistoquímica contra la 3-nitrotirosina. Control positivo en aorta de rata (A), control negativo en aorta de rata (B), subgrupos control (C), restringido(R), control con azúcar (CA) y restringido con azúcar (RA). Las flechas señalan la 3-nitrotirosina, identificada por el color marrón.

#### 1.21.4 Área de las células del tejido adiposo

El área de los adipocitos del área gonadal del grupo C fue de  $1722 \pm 229 \mu\text{m}^2$ , del grupo R fue de  $2079 \pm 171 \mu\text{m}^2$ , del grupo CA fue de  $2817 \pm 636 \mu\text{m}^2$  y del grupo RA fue de  $2512 \pm 315 \mu\text{m}^2$ . No se encontraron diferencias significativas entre grupos (figura 13). En la figura 14 se aprecian las microfotografías de los adipocitos del tejido adiposo gonadal. Se observa que en el grupo CA hay adipocitos con mayor área que en los otros grupos, pero también se observan adipocitos con un tamaño similar a los del grupo C, R y RA.



**Figura 13.** Área de las células del tejido adiposo gonadal. Se muestra la media  $\pm$  e.e. No hay diferencias entre grupos, ANOVA de dos vías  $F_{(3,25)}=2.82$ ,  $P=0.062$ . Subgrupos control (C n=6), restringido (R n=7), control con azúcar (CA n=6), restringido con azúcar (RA n=7).



**Figura 14.** Microfotografías de los cortes histológicos del tejido adiposo gonadal de la rata macho. Control (C), restringido (R), control con azúcar (CA) y restringido con azúcar (RA).

## **1.22 Parámetros bioquímicos al sacrificio**

### 1.22.1 Glucosa

La concentración de glucosa en el grupo C fue de  $127.9 \pm 3.0$  mg/dL, del grupo R fue de  $121.5 \pm 1.6$  mg/dL, del grupo CA fue de  $121.5 \pm 3.8$  mg/dL y del grupo RA fue de  $122.0 \pm 3.1$  mg/dL. No se encontraron diferencias significativas entre grupos (figura 15).

### 1.22.2 Triglicéridos

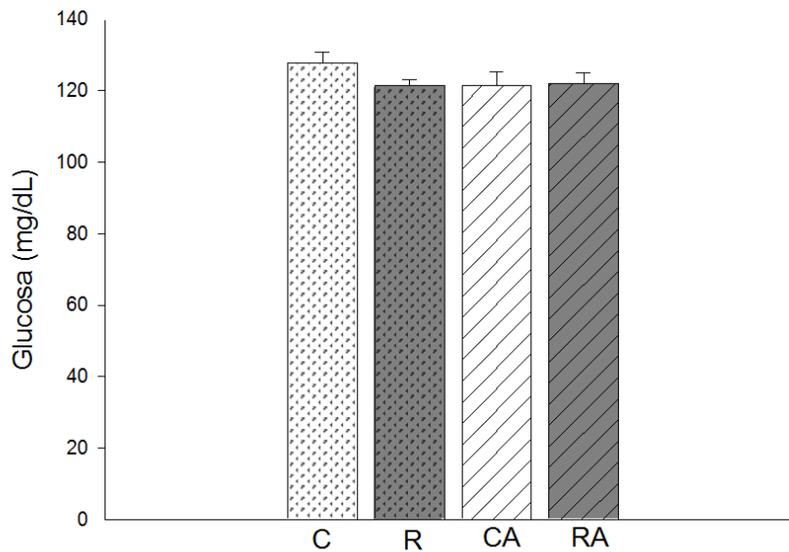
La concentración de triglicéridos en el grupo C fue de  $59.3 \pm 10.5$  mg/dL, del grupo R fue de  $51.1 \pm 5.1$  mg/dL, del grupo CA fue de  $85.8 \pm 16.2$  mg/dL y del grupo RA fue de  $170.1 \pm 5.5$  mg/dL. La concentración de triglicéridos en sangre aumenta por efecto del consumo elevado de carbohidratos ( $P < 0.05$ ; figura 16).

### 1.22.3 Colesterol

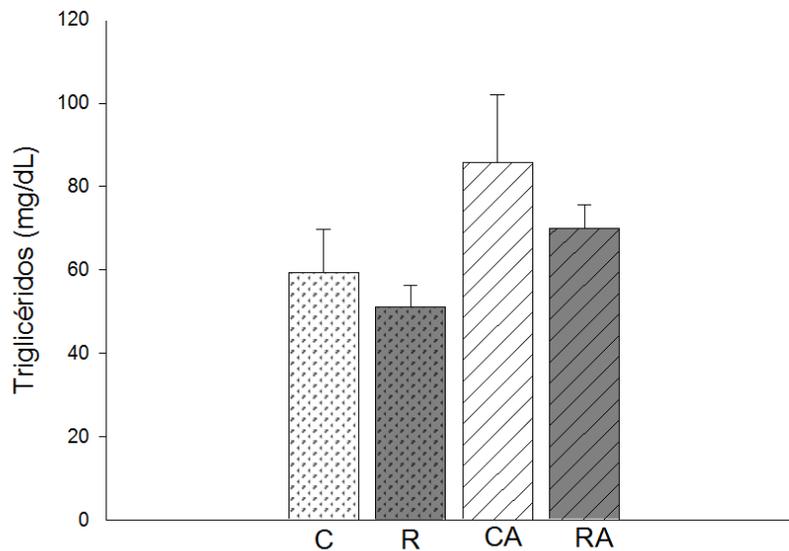
La concentración de colesterol en el grupo C fue de  $71.2 \pm 6.1$  mg/dL, del grupo R  $61.4 \pm 5.4$  mg/dL, del grupo CA fue de  $71.6 \pm 6.2$  mg/dL y del grupo RA fue de  $69.6 \pm 3.8$  mg/dL. No se encontraron diferencias significativas entre grupos (figura 17).

### 1.22.4 Colesterol-HDL

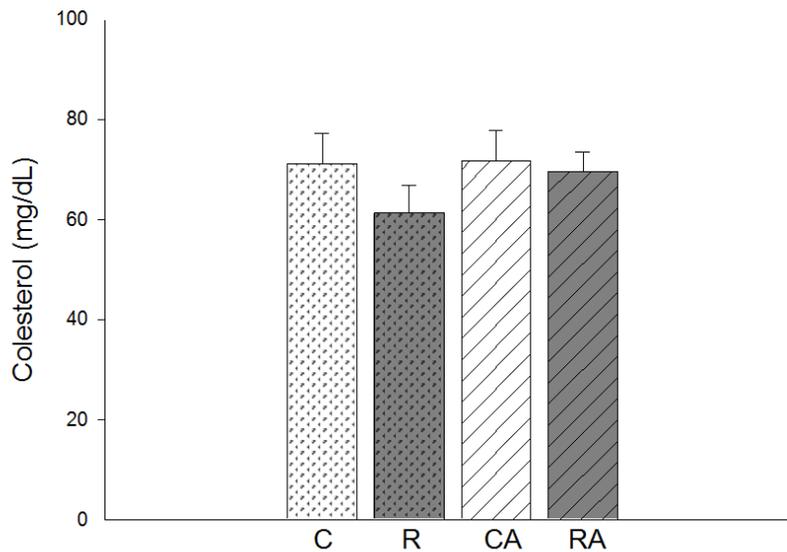
La concentración de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) en el grupo C fue de  $44.9 \pm 3.4$  mg/dL, del grupo R fue de  $32.3 \pm 2.4$  mg/dL, del grupo CA fue de  $49.3 \pm 4.2$  mg/dL y del grupo RA fue de  $37.2 \pm 2.3$  mg/dL. La concentración de C-HDL en sangre disminuye por efecto de la dieta materna ( $P < 0.001$ ; figura 18).



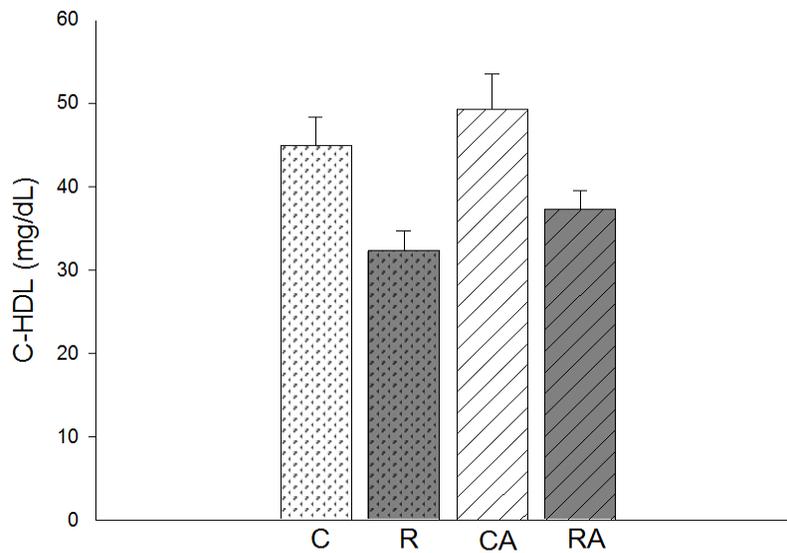
**Figura 15.** Concentración de glucosa previa al sacrificio. Se muestra la media  $\pm$  e.e. No hay diferencias entre grupos, ANOVA de dos vías  $F_{(3,23)}=1.008$ ,  $P=0.40$ . Subgrupos control (C n=6), restringido (R n=7), control con azúcar (CA n=6), restringido con azúcar (RA n=7).



**Figura 16.** Concentración de triglicéridos séricos. Se muestra la media  $\pm$  e.e. La concentración de triglicéridos aumenta por efecto del consumo elevado de carbohidratos ( $P<0.05$ ), ANOVA de dos vías  $F_{(3,23)}=3.93$ ,  $P=0.02$ . Subgrupos control (C n=6), restringido (R n=7), control con azúcar (CA n=6), restringido con azúcar (RA n=7).



**Figura 17.** Concentración de colesterol sérico. Se muestra la media  $\pm$  e.e. No hay diferencias entre grupos, ANOVA de dos vías  $F_{(3,23)}=1.36$ ,  $P=0.28$ . Subgrupos control (C n=6), restringido (R n=7), control con azúcar (CA n=6), restringido con azúcar (RA n=7).



**Figura 18.** Colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL). Se muestra la media  $\pm$  e.e. La concentración de C-HDL disminuye por efecto de la dieta materna ( $P<0.001$ ), ANOVA de dos vías  $F_{(3,25)}=6.11$ ,  $P=0.004$ . Subgrupos control (C n=6), restringido (R n=7), control con azúcar (CA n=6), restringido con azúcar (RA n=7).

## **8. DISCUSIÓN**

En este estudio se han abordado los efectos sobre el hígado, tejido adiposo y parámetros bioquímicos metabólicos que tiene la combinación de restricción de proteínas en la madre y consumo elevado de carbohidratos en la progenie. Uno de los protocolos más estudiados en la rata, para estudiar trastornos metabólicos en la edad adulta es la restricción de proteína durante la gestación.

### **1.23 Efecto de la restricción proteínica en la rata gestante**

El contenido de proteína normal en la dieta de la rata representa aproximadamente el 20 % de toda la composición. En este trabajo se realizó restricción de proteína del 50 % total en la dieta. Con la restricción de proteína del 50 % durante la etapa de la gestación no observamos cambios en el peso corporal de las ratas gestantes, lo que concuerda con los resultados obtenidos de consumo de alimento donde no hubo diferencia. Lo anterior indica que el peso corporal de la madre no se ve modificado por la restricción de proteína al 50 % en la dieta durante los 21 días de gestación, sin embargo el peso corporal no indica cuál es la composición corporal de la rata gestante, hasta la fecha se desconoce la composición corporal de las ratas sometidas a 50 % de restricción de proteínas durante la gestación. No obstante en un trabajo donde se evaluó la composición corporal de machos adultos con 50 % de proteína en la dieta no muestra cambios en la cantidad de proteínas, lípidos y cenizas que componen las carcasas (Du y cols. 1999). Lo cual sugiere que algo similar sucedió en nuestros animales. Por lo que es necesario determinar el estado de composición corporal de las ratas gestantes con esta cantidad de proteína en la dieta.

### **1.24 Efecto de la restricción proteínica gestacional en la progenie**

En los estudios epidemiológicos se relacionó la disminución del crecimiento fetal con las alteraciones metabólicas en la vida adulta entre otras esta un aumento en la presión sanguínea (Barker y cols. 1990), aumento de colesterol total, disminución de lipoproteínas de baja densidad (Barker y cols. 1993) e intolerancia a la glucosa (McCance y cols. 1994).

En este trabajo se evaluaron los indicadores de crecimiento fetal de la rata al momento del nacimiento. En la comparación de estos indicadores no encontramos diferencias significativas del grupo restringido comparado con el control, por lo que no hay evidencia de la restricción del crecimiento fetal. Dichos indicadores son: peso corporal, talla, diámetro cefálico y diámetro abdominal, por lo anterior nuestros resultados difieren de otros trabajos donde disminuye el peso corporal al momento del nacimiento con restricción de proteínas del 50 % (Guzmán y cols. 2006), 55 % (Langley-Evans 2000) y 60 % (Qasem y cols. 2010). Sin embargo también existe evidencia en estudios experimentales donde no se ha encontrado diferencia en el peso corporal de las ratas sometidas a restricción de proteína (Brawley y cols. 2003; Harrison y Langley-Evans 2009), lo cual sugieren una asociación directa entre la restricción de proteínas durante la gestación y las enfermedades en la vida adulta y que no siempre depende del peso al momento del nacimiento (Langley-Evans 2006).

### **1.25 Efecto de la restricción proteínica gestacional y consumo elevado de carbohidratos sobre la histología del hígado**

La fuente para la síntesis *novo de* triglicéridos son los carbohidratos, esta síntesis se lleva a cabo en su mayoría en el citoplasma de los hepatocitos (Schumm 1989, Nelson y Cox 2001) en este trabajo se evaluaron cambios en el tamaño de los hepatocitos, encontramos un cambio de tamaño por efecto del consumo elevado de carbohidratos, hasta la fecha no hay trabajos que evalúen el tamaño de los hepatocito en función a la restricción proteínica materna o al elevado consumo de carbohidratos. Nosotros encontramos acumulación de grasa en el citoplasma de los hepatocitos del grupo CA y RA lo que nos hace sugerir que el aumento en el tamaño de los hepatocitos puede ser por la acumulación de micro vesículas de grasa y ser un estadio temprano de esteatosis hepática, debido al aumento en la síntesis de triglicéridos y liberación de los mismos por el hígado, ya que el aumento de la síntesis y liberación está marcado por el aumento de los mismos en sangre (Herzberg y Rogerson 1988). Lo anterior nos indica que el 5 % de sacarosa en el hígado es suficiente para la aparición de esteatosis hepática.

Otro factor que contribuye a la acumulación de grasa hepática es la resistencia a la insulina (Postic y Girard 2008, Trauner y cols. 2010). La resistencia a la insulina es comúnmente evaluada por el *Homeostasis Model Assessment (HOMA)*, que es una técnica para evaluar la función de las células beta pancreáticas y la liberación de glucosa en el hígado por medio de la relación entre glucosa e insulina en un estado basal (Wallace y cols. 2004). Por otro lado puede haber una resistencia hepática a la insulina sin que haya resistencia a la insulina en tejidos periféricos (Kim y cols. 2001), lo cual no puede ser evaluado por el HOMA. Debido a la incertidumbre acerca del por qué el aumento de tamaño de los hepatocitos de las ratas con agua azucarada, en un trabajo doctoral realizado de manera paralela a este, se evalúa la cantidad de grasa acumulada en las células hepáticas para confirmar nuestra sugerencia del posible aumento del área de los hepatocitos.

### **1.26 Efecto de la restricción proteínica gestacional y consumo elevado de carbohidratos sobre el tejido adiposo**

El tejido adiposo constituye una de las reservas de energía del organismo, el principal componente de las células del tejido adiposo son triglicéridos, estos últimos son hidrolizados por medio de la enzima lipasa que los separa en sus compuestos básicos, tres ácidos grasos y un glicerol, que son excretados de estas células al torrente sanguíneo y transportadas a las células de otros tejidos con el fin de obtener energía proveniente de los lípidos (Schumm 1998, Nelson y Cox 2001) como ya se mencionó los ácidos grasos y triglicéridos, pueden ser formados en el hígado a partir de carbohidratos, excretados al torrente sanguíneo y transportado para su uso en otros tejidos o almacenarlos en como reserva energética en las células del tejido adiposo. En este trabajo se determinó el tamaño de las células del tejido adiposo, los resultados indican que no hay aumento en el tamaño de las células del tejido. El almacenamiento de triglicéridos en estas células provoca una hipertrofia (Postic y Girard 2008). En este trabajo no se encontró efecto de los factores sobre el tejido adiposo. Sin embargo en la gráfica existe una tendencia donde las células del tejido adiposo de los animales CA y RA sean más grandes.

El tejido adiposo es un órgano endocrino activo que secreta moléculas comúnmente referidas como adipocinas, que incluyen varias citoquinas, entre ellas la leptina. La leptina es una hormona peptídica codificada por el gen *ob* que es producida y secretada por las células del tejido adiposo blanco. Se ve involucrado en diversas funciones entre otras, el control de la ingesta de alimento y gasto de energía, (Margetic y cols. 2002), existe evidencia que la restricción de proteínas (Zambrano y cols. 2006) al igual que el consumo elevado de sacarosa (Selenscig y cols. 2010) aumenta la concentración de leptina en la edad adulta de las ratas. Por lo que se hace necesario indagar sobre los efectos que tiene esta manipulación sobre las concentraciones séricas de leptina, debido a la información escasa.

### **1.27 Efecto de la restricción proteínica gestacional y consumo elevado de carbohidratos sobre el daño oxidativo en hígado**

Actualmente se ha hecho una estrecha relación entre las enfermedades metabólicas y la aparición de estrés y daño oxidativo. Existe evidencia de que ratas con alteraciones metabólicas tienen padecen de estrés oxidativo y nitrativo (Yamaguchi y cols. 2006)

Uno de los factores que contribuye a la aparición de estrés oxidativo es la restricción de proteínas ya que se ha propuesto una asociación entre actividad de las enzimas y el daño oxidativo (Langley-Evans y Sculley 2005) lo cual concuerda con nuestros resultados, por que encontramos un porcentaje de área inmunorreactiva contra la 3-nitrotirosina en hígado por efecto de la dieta prenatal y el consumo elevado de carbohidratos. Nuestros hallazgos refuerzan los resultados encontrados por otros autores debido a la restricción de proteínas. El fenómeno anterior ocurre cuándo disminuye la cantidad de enzimas antioxidantes y aumentan las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que causan la oxidación y nitración de proteínas, lípidos, ADN y carbohidratos, el estado anterior se conoce como estrés oxidativo.

Hasta la fecha no se han encontrado los mecanismos por medio de los cuales las alteraciones metabólicas influyen en un incremento en la nitración de proteínas y en general del estrés oxidativo, sin embargo las relaciones de un aumento en la nitración de proteína en el hígado ha sido propuesto por el exceso en la liberación de ácidos grasos por la mitocondria, lo cual eleva el consumo de oxígeno por la beta oxidación y la cadena transportadora de

electrones. Por consiguiente la reducción univalente del oxígeno da como resultado intermediarios de la reducción, uno de ellos es el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), que al unirse con el óxido nítrico (NO) forman el radical peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot -}$ ), que es el principal radical para nitrar proteínas (Mantena y cols 2009).

## **1.28 Efecto de la restricción proteínica gestacional y consumo elevado de carbohidratos sobre el metabolismo**

### 1.28.1 Metabolismo de glucosa

La concentración de glucosa en sangre de los cuatro grupos (C, R, CA, RA) no muestra diferencias entre ellos al momento del sacrificio, lo cual nos sugiere que no hay alteración del metabolismo de carbohidratos en ratas que provienen de madres con restricción de proteína durante la gestación y que en la vida adulta ingieren una cantidad elevada de carbohidratos.

En otros trabajos, de ratas que provienen de madres sometidas a restricción de proteínas durante la gestación, muestran la alteración del metabolismo de carbohidratos a los nueve meses de edad. En estas ratas se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa, en los primeros diez minutos después de la carga de glucosa el grupo restringido es diferente del control, pero no las mediciones posteriores (Langley y cols. 1994). Sin embargo las alteraciones del metabolismo de carbohidratos son más evidentes cuando las ratas que provienen de madres con restricción de proteína son valoradas en la vejez (Petry y cols. 2001, Fernandez-Twinn y cols. 2005).

La concentración de la glucosa es regulada por la insulina, esta es una hormona secretada por el páncreas endocrino. La glucosa estimula la secreción de insulina por el páncreas y en consecuencia se mantienen las concentraciones de glucosa normales. En otros trabajos el peso del páncreas y el contenido total de insulina en el mismo disminuye por la restricción proteínica, lo cual nos indica que para la evolución de las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos es necesario indagar en la histología pancreática, realizar pruebas de tolerancia a la glucosa e insulina y no solo evaluar la concentración basal de la glucosa (Latorraca y cols. 1998). Se ha mostrado que en ratas que provienen de madres

sometidas a restricción de proteína más severa durante la gestación, disminuye la concentración de glucosa. Lo anterior sugiere que en el grupo restringido hay una mayor sensibilidad a la insulina (Latorraca y cols. 1998), lo anterior puede explicar el porqué no se modifica la concentración de glucosa en nuestros grupos.

En ratas adultas, con un consumo elevado de carbohidratos, aumenta la concentración de glucosa, insulina (Alexander y cols. 2004, Herman y cols. 2008) e índice de resistencia a la insulina (Jong-Yeon y cols. 1999, Gou-Chun y cols. 2010). Sin embargo para este trabajo no se realizó una medición de insulina. Los hallazgos en este trabajo fueron que la concentración de glucosa no se ve afectada por la restricción de proteína en la dieta materna ni por la dieta alta en carbohidratos en la vida adulta de la progenie. Nuestro modelo tiene diferencias en comparación con otros trabajos realizados como por ejemplo el tiempo de exposición a la dieta alta en carbohidratos, existen reportes que el tratamiento inicia en el destete y terminan a las 21 semanas de edad y a una concentración de sacarosa en el agua del 30 %. En nuestro modelo la exposición a la dieta alta en carbohidratos es de sólo 10 semanas e inicia en la vida adulta de las ratas (3 meses de edad) y la concentración de sacarosa en el agua es del 5 %. Una de las razones del por qué no aumentamos la concentración de sacarosa en el agua es porque en nuestro laboratorio probamos diferentes concentraciones de sacarosa en el agua (5, 15 y 30 %) y observamos que entre mayor es la concentración de sacarosa menor es el consumo de alimento (datos no mostrados), lo cual causaría una confusión en los resultados obtenidos por que al disminuir el consumo del alimento disminuye el consumo de lípidos y proteínas por lo que los datos obtenidos serían una combinación de la restricción de proteína materna, disminución del consumo de macronutrientes y el consumo elevado de carbohidratos. Lo anterior puede ser una explicación del por qué el consumo elevado de carbohidratos en la vida adulta no alteró la concentración de glucosa sérica.

Por lo anterior podemos decir, que con este modelo, se debe realizar un trabajo donde se considere la histología del páncreas, pruebas de tolerancia a la glucosa e insulina para verificar o en su caso evidenciar alteraciones tempranas en que puedan afectar el metabolismo de los carbohidratos.

### 1.28.2 Metabolismo de triglicéridos

En este trabajo la concentración de triglicéridos en las ratas no se ve modificado por efecto de la restricción de proteína que tuvieron las madres durante el periodo de gestación. Sin embargo los resultados obtenidos indican un aumento en la concentración de triglicéridos por efecto de la dieta alta en carbohidratos, lo que nos indica que la restricción proteínica gestacional no tiene efecto sobre las concentraciones de triglicéridos en esta etapa de la vida de la rata, sin embargo Erhuma y cols. En el 2007 indican un aumento de triglicéridos en el plasma y en el hígado por efecto de la restricción de proteína durante el periodo de gestación en animales de 18 meses de edad. Los hallazgos de este trabajo en la concentración de triglicéridos concuerdan con trabajos realizados en ratas con elevado consumo de carbohidratos (sacarosa, El Hafidi y cols. 2000, Alexander y cols. 2004), donde las concentraciones de triglicéridos en sangre se encuentran elevadas. Lo anterior se puede explicar por el consumo excesivo de carbohidratos, el exceso de este micronutriente es sintetizado en el hígado a triglicéridos para ser almacenado en el tejido adiposo como una reserva energética.

### 1.28.3 Metabolismo de colesterol

El aumento del colesterol en sangre está condicionado por la ingesta de este en la dieta y por la fuente endógena, esta última tiene lugar en el citoplasma de los hepatocitos, a partir de mevalonato que se forma por tres unidades de acetil coenzima A (acetil-CoA). La fuente principal de la acetil-CoA son las vías de la glicolisis a partir del piruvato y la beta oxidación (Schumm 1998, Nelson y Cox 2001). Al momento del sacrificio cuando evaluamos las concentraciones de colesterol en sangre no encontramos efecto de los factores sobre las concentraciones de colesterol, una sugerencia metodológica para trabajos posteriores es evaluar la cantidad y actividad de las enzimas que controla la síntesis de colesterol como la  $\beta$ -hydroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA reductasa, acil CoA colesterol aciltransferasa y la 7  $\alpha$ -hidroxilasa, ya que Nai-Wen y cols. en el 2005 demuestran que la acil CoA colesterol aciltransferasa y la 7  $\alpha$ -hidroxilasa aumentan su actividad, mientras la  $\beta$ -hydroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA reductasa disminuye la actividad (Nai-Wen y cols. 2005). Lo anterior es una condicionante para la desregulación de las concentraciones de colesterol en el plasma.

#### 1.28.4 Metabolismo de colesterol de lipoproteínas de alta densidad

En la concentración de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) encontramos disminuidas las concentraciones plasmáticas por efecto de la dieta materna restringida en proteínas. El hecho anterior contrasta con los resultados obtenidos por un consumo elevado de carbohidratos ya que disminuye la concentración de C-HDL (Alexander y cols. 2004). Sin embargo la disminución en la concentración de C-HDL, se sugiere que hay riesgo aterosclerótico, ya que por ejemplo en humanos se ha reportado que la disminución de C-HDL es un marcador de riesgo para enfermedades cardiovasculares (Barter y cols. 2007).

## **9. CONCLUSIÓN**

Con este trabajo concluimos que la combinación de restricción proteínica gestacional en la madre y el consumo de agua azucarada en la vida adulta de la progenie provocan en el hígado alteraciones histológicas y aumenta la inmunorreactividad contra la 3-nitrotirosina, del mismo modo provoca alteraciones bioquímicas, pero sin ser más drásticas que la progenie que provienen de ratas sometidas a restricción de proteínas durante la gestación ó ratas que en la vida adulta son alimentadas con una dieta alta en carbohidratos.

## 10.REFERENCIAS

- Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, Valles V, Ríos-Torres JM, Franco A, Olaiz G, Rull JA, Sepúlveda J. 2004. High Prevalence of Metabolic Syndrome in Mexico. *Archives of Medical Research*. 35: 76–8.
- Alexander A, Hernández G, Lara M, Angulo O, Oliart R. 2004. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-  $\alpha$  in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *Journal of Nutrition and Biochemistry*. 15:350-357.
- Barker DJ y Osmond C. 1986. Infant mortality, childhood, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 10: 1077-1081. (Solo abstract)
- Barker DJP, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. 1990. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *British Medical Journal*. 301: 259-62.
- Barker DJP, Martyn CN, Osmond C, Hales CN, Fall CHD. 1993. Growth *in utero* and serum cholesterol concentrations in adult life. *British Medical Journal*. 307: 1524-1527.
- Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grady SM, Kastelein JJ; Bittner V, Jean-charles F. 2007. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *The New England Journal of Medicine*. 357:1301-1310.
- Bertram CE y Hanson AM. 2001. Animal models and programming of the metabolic syndrome. *British Medical Bulletin*. 60: 103-121.
- Bonato F, Polydoro M, Éverton AM, Conte FM, Dal-Pizzol F, Nanci RL, Onofre SD, Luiz PM, Fonseca MJ. 2005. Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Research*. 1042: 17-22.
- Brawley L, Itoh S, Torrens C, Barker A, Bertram C, Poston L, Hanson M. 2003. Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. *International Pediatric Research Foundation, Inc*. 54: 83-90.
- Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. 2005. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*. 42: 987-1000.
- Cox MM y Nelson DL. 2001. Glycolysis, gluconeogenesis and the pentose phosphate pathway. En: Principles of Biochemistry, Lehninger. Editorial Omega. pp. 521-533.
- Cox MM y Nelson DL. 2001. Lipid biosynthesis. En: Principles of Biochemistry, Lehninger. Editorial Omega. pp. 631-642.
- Cuevas L, Rivera J, Shama T, González T, Moreno L, Ávila M. 2007. Estado Nutricio “En” Resultados de Nutrición de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Primera edición. Instituto Nacional de Salud Pública. México DF.
- Desai M, Crowther NJ, Lucas A, Hales N. 1996. Organ-selective growth in the offspring of protein restricted mothers. *British Journal of Nutrition*. 76: 591-603.

- Du F, Higginbotham D, White D. 1999. Food intake energy balance and serum leptin concentration in rats fed low-protein diets. *Biochemical and Molecular Action of Nutrients*. 13: 225.
- Durán P. 2004. Nutrición temprana y enfermedades en la edad adulta: acerca de la “hipótesis de Barker”. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 102: 1-14.
- El Hafidi M, Cuellar A, Ramírez J, Baños G. 2001. Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal  $\Delta 9$  and  $\Delta 5$ -desaturase activities. *Journal of Nutrition and Biochemistry* 12: 396-403.
- El Hafidi M, Valdez R, Baños G. 2000. Possible relationship between altered fatty acid composition of serum platelets, and aortaand hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clinical and Experimental Hypertension*. 22: 99-108.
- El-Dwairi A, Comtois Guo Y, Hussain SN. 1998. Endotoxin-induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthases. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 274: 770-779.
- Erhuma A, Salter AM, Sculley DV, Langley-Evans SC, Bennett A. 2007. Prenatal exposure to a low protein diet programmes disordered regulation of lipid metabolism in the ageing rat. *American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism*. 292: 1702–1714.
- Fernandez-Twinn DS, Watman A, Ekizoglou S, Martin MS, Hales CN, Ozanne SE. 2005. Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin-signaling protein expression in 21-mo-old female rat offspring. *The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 288: R368–R373.
- Ferranti D y Mozaffarian D. 2008. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clinical Chemistry*. 54: 945-955.
- Garofano A, Czernichow P, Bréant B. 1997 In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetology*. 40: 1231–1234.
- Geronikaki AA, Gavalas MA. 2006. Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-Inflammatory activity. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*. 9: 425-442.
- Gonçalves LA, Boldrini SC, Capote TSO, Binotti CB, Azeredo RA, Martini DT, Rosenberg B, Bautz WG, Liberti EA. 2009. Structural and ultra-structural features of the first mandibular molars of young rats submitted to pre and postnatal protein deficiencies. *The Open Dentistry Journal*. 3: 125-13.
- Gou-Chun C, Chun-Yin H, Mei-Yu C, Chi-Hua C, Shiow-Wen C, Ching-jang H, Pei-Min C. 2010. Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and a sucrose-containing beverage intake, alone or in combination, on inducing metabolic syndrome in Wistar rats and C57BL/6J mice. *Metabolism Clinical and Experimental*. En prensa.
- Guzmán C, Cabrera R, Cárdenas M, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. 2006. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive

- function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *Journal of Physiology*. 572: 97-108.
- Hales CN y Barker DJP. 2001. The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin*. 60: 5-20.
- Hales CN, Barker DJP, Clark PMS, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. 1991. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *British Medical Journal*. 303: 1019-22.
- Harrap SB. 1994. Public health, cardiovascular disease and molecular biology. *Kidney International*. 46: 1546-1549.
- Harrison M y Langley-Evans. 2009. Intergenerational programming of impaired nephrogenesis and hypertension in rats following maternal protein restriction during pregnancy. *British Journal of Nutrition*. 101: 1020–1030.
- Herman M, Kamari Y, Grossman E, Yeager G, Peleg E, Shabtay Z, Shamiss A, Sharabi Y. 2008. Metabolic syndrome: Comparison of the two commonly used animal models. *American Journal of Hypertension*. 21: 1018-1022.
- Herzberg G, Rogerson M. 1988. Hepatic fatty acid synthesis and triglyceride secretion in rats fed fructose- or glucose-based diets containing corn oil, tallow or marine oil. *Journal of Nutrition*. 118: 1061-1067.
- Jong-Yeon K, Nolte LA, Hansen PA, Dong-Ho H, Kaeana K, Holloszy JO. 1999. Insulin resistance of muscle glucose transport in male and female rats fed a high-sucrose diet. *The American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 276: 665-672.
- Kagota S, Tada Y, Nejime N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. 2009. Chronic production of peroxynitrite in the vascular wall impairs vasorelaxation function in SHR/NDmcr-cp rats, an animal model of metabolic syndrome. *Journal of Pharmacology Science*. 109:556-564.
- Kahn BB y Flier SJ. 2000. Obesity and insulin resistance. *The journal of clinical investigation*. 106: 473-481.
- Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. 2005. The metabolic syndrome: Time for a critical appraisal. *Diabetologia* 48:1684-1699.
- Kavanagh K, Jones KL, Sawyer J, Kelley K, Carr JJ, Wagner JD, Rudel LL. 2007. Trans fat diet induces abdominal obesity and changes in insulin sensitivity in monkeys. *Obesity*. 15: 1675-1684.
- Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaer M, Lutz EP, Kakos Y, Velez Carrasco W, Goldber IJ, Breslow JL, Shulman GI. 2001. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 7522–7527.

- Langley SC, Richard F, Browne, Alan AJ. 1994. Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in *utero*. *Comparative Biochemistry Physiology*. 109a: 223-229.
- Langley-Evans SC. 2000. Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 51:11-17.
- Langley-Evans SC. 2004. Fetal programming of adult disease: an overview. En fetal nutrition and adult disease programming of chronic disease thought fetal exposure to undernutrition. Editorial CABI Publishing. pp 2.
- Langley-Evans SC y Sculley V. 2005. Programming of hepatic antioxidant capacity and oxidative injury in the ageing rat. *Mechanisms of Ageing and Development*. 126: 804-812.
- Langley-Evans SC. 2006. Developmental programming of health and disease. *Proceedings of the Nutrition Society*. 65: 97-105.
- Latorraca MQ, Carneiro EM, Boschero AC, Mello MAR. 1998. Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. *British Journal of Nutrition*. 80: 291-297.
- Mantena S, Vaughn D, Andringa K, Eccleston H, King A, Abrams G, Doeller J, Kraus D, Darley-Usmar V, Bailey S. 2009. High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function *in vivo*. *Biochemistry Journal*. 417: 183-193.
- Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. 2002. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International Journal of Obesity*. 26: 1407-1433.
- McCance DR, Pettitt DJ, Hanson LR, Jacobsson TL, Knowler WC, Bennett HP. 1994. Birth weight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype?. *British Medical Journal*. 308: 942-942.
- Miñana-Solis MC y Carolina E. 2007. Increased susceptibility to metabolic alterations in Young adult females exposed to early malnutrition. *International Journal of Biological Science*. 3: 12-19.
- Miñana-Solis MC y Escobar C. 2008. Post-weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term metabolic impairment, in contrast to earlier and later periods. *International Journal of Biological Science*. 4: 422-432.
- Nai-Wen CT, Chen-Ten W, Fei-Na C, Po-Chao H. 2005. Effect of dietary ratios of fatty acids on cholesterol metabolism in rats and on low-density lipoprotein uptake in hepatocytes. *Nutrition Research*. 25: 781-790.
- Ozanne ES y Hales N. 1999. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*. 58: 615-619.

- Pereyra-Muñoz N, Rugerio-Vargas C, Angoa-Pérez, Borgonio-Pérez, Rivas-Arancibia S. 2006. Oxidative damage in substantia nigra and striatum of rats chronically exposed to ozone. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 31: 114-123.
- Petry CJ, Ozanne SE, Hales CN. 2001. Programming of intermediary metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 185: 81-91.
- Postic C y Girard J. 2008. Contribution of the novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lesson from genetically engineered mice. *Science in Medicine*. 118: 829-838.
- Qasem RJ, Cherala G, D'mello AP. 2010. Maternal protein restriction during pregnancy and lactation in rats imprints long-term reduction in hepatic lipid content selectively in the male offspring. *Nutrition Research*. 30: 410-417.
- Rey J, Bresson JL, Abadie V. 1994. Nutrition, a model of interaction between genetic and environmental factors. *Archives de Pédiatrie*. 1: 5-10.
- Rodford L, Torrens C, Siow C, Mann E, Hanson A, Clough F. 2008. Endothelial dysfunction and reduced antioxidant protection in an animal model of the developmental origins of cardiovascular disease. *Journal of Physiology*. 586: 4709-4720.
- Sahin S, Gümüslü S. 2007. Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Comparative Biochemistry Physiology part*. 144: 342-347.
- Schumm DE. 1989. Degradación de lípidos: Vías centrales. En: principios de bioquímica. Editorial. El Manual Moderno. México DF. pp. 260-309.
- Schumm DE. 1989. Metabolismo de Los carbohidratos: Vías centrales. En: principios de bioquímica. Editorial. El Manual Moderno. México DF. pp. 187-259.
- Seckl JR. 1998. Physiologic programming of the fetus. *Clinical Perinatology*. 25: 939-962.
- Selenscig D, Rassi A, Chicco A, Lombardo YB. 2010. Increased leptin storage with altered leptin secretion from adipocytes of rats with sucrose-induced dyslipidemia and insulin resistance: effect of dietary fish oil. *Metabolism Clinical and Experimental*. 59: 787-795.
- Stevens G, Dias R, Thomas J, Rivera J, Carvalho N, Barquera S, Hill K, Ezzati M. 2008. Characterizing the epidemiological transition in Mexico: national and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. *PLoS Medicine*. 5: 900-0910.
- Taheri S, Lin L, Austin D, Young T, Mignot E. 2004. Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Medicine*. 1:e62.
- Trauner M, Arrese M, Wagner M. 2010. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1801: 299-310.

- Tung T, Nguyero MD, Vishwanath MD. 2007. Enfermedad hepática. En: Fisiopatología médica: introducción a la medicina clínica. McPhee SJ y Ganong WF (eds) Editorial. El Manual Moderno. Mexico Df. pp 389-391.
- Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. 2004. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*.27: 1487-1495.
- Yamaguchi Y, Yoshikawa N, Kagota S, Nakamura K, Haginaga J, Kunitomo M. 2006. Elevated circulating levels of markers of oxidative nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. *Nitric Oxide* 75: 380-386.
- Yates Z, Tarling J, Langley-Evans S, Salter M. 2009. Maternal undernutrition programmes atherosclerosis in the apo E\*3 leiden mouse. *British Journal of Nutrition*. 10 :1185-1194.
- Zambrano E, Bautista CJ, Deas M, Martínez-Samayoá PM, González-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz PW. 2006. A Low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex-and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *Journal of Physiology*. 571: 221-230.
- Zambrano E, Rodríguez-González GL, Guzmán C, Garcia-Becerra, Boeck L, Díaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW. 2005. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *Journal of Physiology*. 15: 275-284.

## 11.GLOSARIO

1. **Genotipo:** Conjunto de los genes de un individuo, incluida su composición alélica.
2. **Fenotipo:** es la expresión del genotipo en un determinado ambiente.
3. **Resistencia a la insulina:** Hiperinsulinemia compensatoria para mantener las concentraciones de glucosa normal.
4. **Esteatosis hepática no alcohólica:** Acumulación de grasa en el citoplasma de los hepatocitos por una etiología diferente al consumo de alcohol.
5. **Cirrosis hepática:** Reemplazo del parénquima del hígado, por un tejido fibroso.
6. **Estrés oxidativo:** desbalance entre los radicales libres y antioxidantes a favor de los radicales libres.
7. **Radical libre:** Molécula que en el último orbital tiene un electrón desapareado lo cual le confiere una alta reactividad.
8. **Endotoxemia:** Presencia de una endotoxina en la sangre, producida por una bacteria, compuesta por lípidos y polisacáridos.
9. **3-nitrotirosina:** Producto de la nitración de los restos de tirosina.
10. **3-clorotirosina:** Producto de la cloración de los restos de tirosina.
11. **Mieloperoxidasa:** es una enzima peroxidasa, produce ácido hipocloroso (HOCl) a partir de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y anión cloro ( $Cl^-$ ).
12. **Óxido nítrico sintasa:** son un grupo de enzimas responsables de transformar la L-arginina en óxido nítrico (NO) en una catálisis orgánica de oxidorreducción, sin gasto de energía.
13. **Malnutrición:** cualquier alteración nutricional tanto por exceso, por deficiencias o desequilibrio.
14. **Epigenético:** factores no genéticos que intervienen en la determinación de la ontogenia.

## 12.ANEXOS

### 1.29 Anexo 1. Deshidratación del tejido hepático

1. Después de la disección, mantener el tejido en formalina neutra al 10 % al menos 24 horas.
2. Sacar el tejido de la formalina y cortarlo de acuerdo a la porción que se va a deshidratar.
3. Realizar la deshidratación de acuerdo a la lista siguiente, cuidando de que la solución cubra ligeramente el tejido y mantener en agitación.

| No de solución. | Solución y concentración | Tiempo en minutos |
|-----------------|--------------------------|-------------------|
| 1               | Etanol 60 %              | 15 min            |
| 2               | Etanol 70 %              | 20 min            |
| 3               | Etanol 80 %              | 20 min            |
| 4               | Etanol 80 %              | 30 min            |
| 5               | Etanol 96 %              | 30 min            |
| 6               | Etanol 96 %              | 30 min            |
| 7               | Etanol 100 %             | 30 min            |
| 8               | Etanol 100 %             | 30 min            |
| 9               | Etanol 100% - Xileno     | 30 min            |
| 10              | Xileno                   | 30 min            |
| 11              | Xileno                   | 30 min            |

4. Posteriormente se colocan en paraplast X-tra (McCormick) por 30 min.
5. Se realiza otro cambio de paraplast X-tra (McCormick) y se deja por 4 horas.
6. Incluir los tejidos con paraplast limpio y dejar que solidifiquen.

NOTA: Previamente poner a licuar el paraplast en el horno a una temperatura máxima de 56 °C

### 1.30 Anexo 2. Deshidratación del tejido adiposo

1. Después de la disección, mantener el tejido en formalina neutra al 10 % al menos 24 horas.
2. Sacar el tejido de la formalina y cortarlo de acuerdo a la porción que se va a deshidratar.
3. Realizar la deshidratación de acuerdo a la lista siguiente, cuidando de que la solución cubra ligeramente el tejido y mantener en agitación.

| No de solución | Solución            | Tiempo |
|----------------|---------------------|--------|
| 1              | Etanol 70 %         | 30 min |
| 2              | Etanol 80 %         | 30 min |
| 3              | Etanol 96 %         | 60 min |
| 4              | Etanol 100 %        | 60 min |
| 5              | Etanol 100 %:Xileno | 30 min |
| 6              | Xileno              | 30 min |
| 7              | Xileno              | 30 min |

4. Posteriormente se colocan en paraplast Plus (McCormick) por 60 min.
5. Se realiza otro cambio de paraplast Plus (McCormick) y se deja por 8 horas.
6. Incluir los tejidos con paraplast limpio y dejar que solidifiquen.

NOTA: Previamente poner a licuar el paraplast en el horno a una temperatura máxima de 56 °C

### 1.31 Anexo 3. Tinción de hematoxilina-eosina

Después de obtener los cortes en el micrótopo se dejan secar mínimo por 24 h, posteriormente se tiñen con los siguientes tiempos en las diferentes soluciones.

| <b>Pasos</b>          | <b>No.</b> | <b>soluciones</b>      | <b>tiempo</b> |
|-----------------------|------------|------------------------|---------------|
| <b>Desparafinar</b>   | 1          | Xileno                 | 5 min         |
|                       | 2          | Xileno                 | 5 min         |
|                       | 3          | Etanol 100% : Xileno   | 5 min         |
| <b>Hidratación</b>    | 4          | Etanol 100 %           | 5 min         |
|                       | 5          | Etanol 100 %           | 5 min         |
|                       | 6          | Etanol 96 %            | 3 min         |
|                       | 7          | Etanol 80 %            | 3min          |
|                       | 8          | Etanol 60 %            | 3 min         |
|                       | 9          | Agua destilada         | 3min          |
| <b>Contraste</b>      | 10         | Hematoxilina de Harris | 40 min        |
|                       | 11         | Agua corriente         | 40 seg        |
|                       | 12         | Etanol acido           | 40 seg        |
|                       | 13         | Agua destilada         | 40 seg        |
| <b>Azulamiento</b>    | 14         | Etanol amoniacal       | 11 min        |
|                       | 15         | Agua destilada         | 40 seg        |
|                       | 16         | Eosina                 | 11 min        |
|                       | 17         | Agua destilada         | 40 seg        |
| <b>Deshidratación</b> | 18         | Etanol 96 %            | 40 seg        |
|                       | 19         | Etanol 96 %            | 40 seg        |
|                       | 20         | Etanol 100 %           | 30 seg        |
|                       | 21         | Etanol 100 %           | 30 seg        |
|                       | 22         | Etanol 100% : Xileno   | 10 seg        |
|                       | 23         | Xileno                 | 10 seg        |
|                       | 24         | Xileno                 | 10 seg        |

Finalmente sin dejarlos expuestos al ambiente, los portaobjetos se montan con Cytoseal TM 60 y se dejan secar.

### 1.32 Anexo 4. Desparafinación e hidratación de los cortes para inmunohistoquímica

Seleccionar los cortes que se van a desparafinar, cuidando que no estén rotos o doblados y seguir los tiempos siguientes.

|              | <b>SOLUCIONES</b>    | <b>TIEMPO</b> |
|--------------|----------------------|---------------|
| DESPARAFINAR | Xileno 1             | 5 min         |
|              | Xileno 2             | 5 min         |
|              | Etanol 100% : Xileno | 5 min         |
|              | Etanol 100%          | 10 min        |
|              | Etanol 96%           | 3 min         |
|              | Etanol 80%           | 3 min         |
|              | Etanol 60%           | 3 min         |
|              | Agua destilada       | 3 min         |

### DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE DE LOS TEJIDOS PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

1. Realizar una contra tinción con violeta de cresilo para teñir los núcleos de las células, colocar el colorante sobre el tejido por 10 min.
2. Realizar el deshidratado de los cortes con las soluciones y tiempo indicados en el sig cuadro.

|             | <b>SOLUCIONES</b>    | <b>TIEMPO</b> |
|-------------|----------------------|---------------|
| DESHIDRATAR | Etanol 60%           | 40 seg.       |
|             | Etanol 80%           | 40 seg.       |
|             | Etanol 96%           | 40 seg.       |
|             | Etanol 100%          | 40 seg.       |
|             | Etanol 100% : Xileno | 40 seg.       |
|             | Xileno               | 40 seg.       |

Después que pasaron por las soluciones se montan los tejidos con Cytoseal TM 60 y se dejan secar.

## 13.PUBLICACIONES

Treceavo Curso Bases Biológicas de la Conducta  
SESIÓN DE CARTELES

### Restricción Dietética en Rata Hembra Adulta: Evaluación del Estrés Oxidativo en el Músculo Pubococcígeo

Eliut Pérez Sánchez<sup>1</sup>, Margarita Martínez-Gómez<sup>2</sup>, Margarita Cervantes<sup>3</sup>,  
Daniel Méndez<sup>3</sup> y Jorge Rodríguez-Antolín<sup>4</sup>.

1. Maestría en Ciencias Biológicas, UAT (México); 2. Unidad Periférica Tlaxcala de Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (México); 3. Licenciatura en Nutrición, UAT. 4. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UAT.

La conducta alimentaria es vital para el buen funcionamiento de órganos y tejidos de un organismo. Dietas deficientes por la restricción de alimentos se han correlacionado con la aparición de estrés oxidativo. El estrés oxidativo se define como la ruptura del equilibrio entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas. El estrés oxidativo se ha medido en diferentes tejidos: cerebro, pulmón, hígado, páncreas y musculatura estriada. En la musculatura estriada se ha evaluado el estrés oxidativo en respuesta al ejercicio mediante la cuantificación de los grupos carbonilos, pero ningún estudio lo ha valorado en respuesta a la desnutrición.

En general, el músculo estriado de la rata se ha descrito como un tejido sensible a la malnutrición, cuando hay una deficiencia de proteínas en la dieta tal musculatura muestra agotamiento en su actividad contráctil, modificación en las fases de crecimiento y en la diferenciación de los tipos de fibras musculares. Se ha reportado que la dieta hipoproteica durante la miogénesis altera la frecuencia de los tipos de fibras musculares.<sup>9</sup> de octubre de 2008

En mujeres y conejas se ha encontrado que la composición de la musculatura estriada pélvica se ve alterada en relación a la multiparidad y al envejecimiento. En la rata hembra, el músculo pubococcígeo (mPC) forma parte del piso pélvico.



CARTEL 32

Ciudad de Tlaxcala, México, 17 de octubre de 2008



Cartel

Viernes 16 de octubre

## Cartel 34

Alteraciones metabólicas y producción de estrés oxidativo por restricción proteínica gestacional y administración de agua azucarada en la vida adulta de la rata

*Eliut Pérez Sánchez, Elena Zambrano, Margarita Martínez-Gómez, Estela Cuevas, Francisco Castelán, Leticia Nicolás y Jorge Rodríguez Antolín.*

Maestría en Ciencias Biológicas, UAT, Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UAT, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

La conducta alimentaria es vital para el buen funcionamiento de los organismos. En roedores, una dieta deficiente en proteínas durante la etapa gestacional se ha correlacionado con diferentes alteraciones metabólicas. Tales alteraciones predisponen a desarrollar en la vida adulta problemas como obesidad, hipertensión, trastornos del metabolismo de carbohidratos, lípidos y leptina, resistencia a la insulina, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. En seres humanos las alteraciones anteriores caracterizan al síndrome metabólico. En ratas a las que se les ha administrado agua azucarada al 30% por 25 semanas les aparecen alteraciones en los indicadores del síndrome metabólico. Por otro lado, hay evidencia sobre la producción de especies



Cartel

Viernes 16 de octubre

reactivas de oxígeno cuando se alteran algunos de los indicadores del síndrome metabólico. Los tejidos donde se ha encontrado estrés oxidativo son el hígado, la aorta, el riñón y el cerebro.

En general, cuadros de restricción dietética (malnutrición y/o desnutrición) en las etapas gestacional o posnatal se asocia con desordenes metabólicos en la vida adulta. Sin embargo, en estos mismos cuadros de restricción de alimentos, no se ha estudiado la producción estrés oxidativo. Lo cual sería importante desde el punto de vista funcional, por ejemplo, para clarificar los mecanismos de los diferentes desordenes metabólicos y oxidativos que encontremos y tal vez más importante, sirva para implementar acciones o hábitos en pro de la salud de niños y adultos.

El objetivo del presente trabajo es determinar la relación de la restricción proteínica gestacional y la administración de agua azucarada en la vida adulta con la aparición de indicadores metabólicos y estrés oxidativo en la rata. Se utilizarán ratas jóvenes de la cepa Wistar de tres meses que formarán dos grupos: (A) 10 hembras jóvenes adultas alimentadas durante la gestación de manera *ad libitum* con una dieta normal en proteína (20%). (B) 10 hembras jóvenes adultas alimentadas durante la gestación de manera *ad libitum* con una dieta baja en proteína (10%). Después del parto las camadas serán ajustadas a 10 crías y se les proporcionará a los dos grupos experimentales durante la lactancia (mamás) y después del destete (crías) alimento *ad libitum* Chow 5001 de Purina. A partir de la semana 12 de edad, las crías se dividirán en subgrupos. Dos grupos con agua para beber sin azúcar y dos grupos que beberán agua con 5 % de azúcar. En los todos los grupos experimentales se determinarán las concentraciones de glucosa, colesterol, triglicéridos, colesterol-HDL, leptina, insulina y corticosterona. En la aorta y el



Cartel

Viernes 16 de octubre

Además, en el futuro, cuando ya se haya terminado el análisis de los datos, se analizará la producción de 3-nitrotirosina, indicador ampliamente utilizado para determinar la producción de estrés oxidativo.

Resultados preliminares. Los datos preliminares con los que contamos no son contundentes para demostrar un efecto de la restricción proteínica en cuanto a indicadores metabólicos y estrés oxidativo. Sin embargo, tenemos, del primer lote de animales experimentales, tejidos y sueros sanguíneos donde analizaremos las variables mencionadas en la metodología. Los datos con los que contamos son los siguientes: el peso corporal de las hembras sometidas a restricción al nacimiento fue de 5.91 g vs 5.93 g de los controles. El peso de los machos fue de 6.24 g y de los controles de 5.91 g. Tanto hembras como machos tuvieron la tendencia a ganar peso durante el periodo de lactancia, donde el peso a los 21 días para las hembras fue de 38.35 g y 30.38 g para los controles. Para el caso de los machos el peso a los 21 días fue de 39.47 g vs 32.31 g de los controles. Por otro lado, el peso corporal de las ratas que consumieron agua azucarada y que tuvieron madres con restricción son las de mayor peso en comparación con las ratas normoproteicas que no tomaron agua azucarada. Por otro lado, las ratas hijas de madres restringidas y sin consumo de agua azucarada tienen la tendencia a consumir más alimento que las ratas controles sin agua azucarada lo que podría dar indicios de hiperfagia.

Cuando no se cubren los requerimientos nutricionales mínimo necesarios a través de la dieta se deteriora el estado nutricional promoviendo la aparición de cuadros clínicos severos como serían problemas de desnutrición y/o malnutrición. El presente trabajo nos ayudará a correlacionar el desarrollo biológico de un individuo con las condiciones nutricionales durante la gestación y de la cantidad de carbohidratos que se ingieren en la vida adulta.

## RESTRICCIÓN PROTEÍICA INTRAUTERINA Y CONSUMO ELEVADO DE CARBOHIDRATOS EN LA VIDA ADULTA: VALORACIÓN DE INDICADORES METABÓLICOS HEPÁTICOS EN LA RATA.

Pérez-Sánchez E<sup>1</sup>, Zambrano-González E<sup>2</sup>, Cuevas-Romero E<sup>3</sup>, Martínez-Gómez M<sup>4</sup>, Rodríguez-Antolín J<sup>3</sup>.

1. Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. 2. Depto. Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 3. Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala. 4. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Trastornos metabólicos como la obesidad, la diabetes mellitus, la hipertrigliceridemia y la hipercolesterolemia, entre otros se caracterizan por producir una serie de alteraciones metabólicas en órganos como el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo. Por un lado, diversos estudios han propuesto que la dieta materna durante la gestación es determinante para los probables trastornos metabólicos a corto y largo plazo. Por otro lado, se ha mostrado que en la vida adulta uno de los factores que influyen en la aparición de alteraciones metabólicas es el consumo elevado de carbohidratos (particularmente sacarosa). Pocos estudios han indagado los efectos de combinar la restricción proteínica intrauterina con el consumo elevado de ácidos grasos o carbohidratos en la vida adulta sobre diferentes indicadores metabólicos. El objetivo de este trabajo es valorar diferentes indicadores metabólicos hepáticos en la primera progenie de ratas sometidas a restricción proteínica gestacional y el posterior consumo de agua azucarada en la vida adulta. Para cumplir con este objetivo contamos con dos grupos experimentales de ratas preñadas que fueron alimentadas con dieta control y ratas preñadas restringidas proteínicamente (50% del control). Durante la lactancia ambos grupos fueron alimentados con dieta control. Las crías fueron destetadas al día 21 y alimentadas con dieta control hasta que cumplieron 12 semanas de edad y se subdividieron en cuatro subgrupos, a los cuales se les proporciono agua sin azúcar y con azúcar al 5 % durante 10 semanas: ratas control (**C**), ratas restringidas (**R**), ratas control con agua azucarada (**CA**) y ratas restringidas con agua azucarada (**RA**). Al día del sacrificio se colectó sangre para medir parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad, insulina y leptina). Posteriormente se disecó el hígado para fijarlo en formalina neutra al 10 %, el cual fue procesado histológicamente y embebido en paraplast X-tra con el fin de obtener cortes de 7 $\mu$  de espesor. Tales cortes fueron destinados en series alternadas unos para teñirse con hematoxilina-eosina y otros se utilizaron para la identificación de proteínas oxidadas por medio de la detección de la 3-nitrotirosina (inmunohistoquímica). Resultados preliminares indican que los machos CA presentan mayor concentración de triglicéridos con respecto a los machos C, R y RA. En lo que respecta a la histología hepática la tinción de hematoxilina-eosina muestra que las ratas del grupo RA tienen menor número de núcleos y mayor área nuclear; también en este grupo el área citoplasmática parece ser mayor. En cuanto a la determinación contra la 3-nitrotirosina se observa un mayor marcaje en los cortes histológicos de ratas R y RA. El presente trabajo estudia los mecanismos que disparan la malnutrición durante el embarazo y la vida adulta sobre el metabolismo hepático, ello ayudará al entendimiento de patologías como la obesidad, el estrés oxidativo y la esteatosis hepática.

Financiamiento: PAPIIT1N228110-MMG; CONACYT 105882-MMG, 21814-EPS.