



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta**

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

**Efecto de la restricción proteínica gestacional y el consumo  
de agua azucarada en la progenie adulta sobre  
la histología del páncreas**

**T E S I S**

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

Aldo Cerón Torres

Codirectores

Dr. Jorge Rodríguez Antolín  
Dra. Elena Zambrano González

Tlaxcala, Tlax.

Julio, 2015



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta**

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto de la restricción proteínica gestacional y el consumo  
de agua azucarada en la progenie adulta sobre  
la histología del páncreas

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Aldo Cerón Torres

*Comité Tutorial*

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Dra. Elena Zambrano González

Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez

Dra. Estela Cuevas Romero

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tlaxcala, Tlax.

Julio, 2015

## **Agradecimientos**

Este trabajo de investigación fue realizado en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta en la Universidad Autónoma de Tlaxcala y en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Se agradece las becas CONACYT 261956-ACT; CACyPI-UATx-2014-ACT para la realización de la presente tesis.

Este trabajo se realizo bajo la Codirección del Drs. Jorge Rodríguez Antolín y Elena Zambrano Gonzáles. Se contó con la tutoría del Dras. Leticia Nicolás Toledo, Lidya Sumiko Morimoto Martínez, Estela Cuevas Romero, Margarita Cervantes Rodríguez y María de Lourdes Arteaga Castañeda.



Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



COORDINACIÓN 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 **Aldo Cerón Torres** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es Cuyo proyecto se titula **“Efecto de la restricción proteínica gestacional y el consumo de agua azucarada en la progenie adulta sobre la histología del páncreas”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., JULIO 26 DE 2014

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO

  
\_\_\_\_\_  
DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO

  
\_\_\_\_\_  
DRA. LIDYA SUMIKO MORIMOTO

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

  
\_\_\_\_\_  
DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:  
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: [posgradoctbcuat@gmail.com](mailto:posgradoctbcuat@gmail.com)  
Tlaxcala, Tlax.

## **Agradecimientos a título personal**

Agradezco a Dios en primer lugar por permitirme llegar hasta este momento, a mi madre Elena Torres Lara por todos sus consejos y el gran ejemplo que es para todos sus hijos, a mi padre Fausto Cerón Lima por la vida que medio, a mis hermanos Edgar, Iván e Isaí Cerón Torres por su constante apoyo, a mis hijas Yadhira y Luz Helena Cerón López por ser la columna de mi vida y cordura de mis pensamientos, a Cecilia Estaban López por su permanecía y apoyo.

Un agradecimiento sincero a Dr. Jorge Rodríguez Antolín por todo su apoyo y comprensión, a la Dra Margarita Cervantes Rodríguez por hacerme claras todas mis dudas en esos momentos de desesperación, mil gracias.

A la Dra. Leticia Nicolás Toledo por sus observaciones y comentarios, por el tiempo dedicado a mi formación. Al Dr. Daniel Méndez Iturbide le agradezco el enfoque que le dio a mi vida, porque gracias a eso logre esta meta propuesta.

Gracias a todos mis compañeros que me acompañaron en este proyecto, particularmente a Irving Xicoténcatl Rugerio y Verónica Velázquez Orozco.

Por último, Stephen Hawking menciona debemos intentar comprender el comienzo del universo a partir de bases científicas, puede que sea una tarea más allá de nuestras capacidades, pero al menos deberíamos intentarlo.

## Resumen

El páncreas, es uno de los órganos encargados de regular los procesos metabólicos en los mamíferos. Se encarga de secretar enzimas digestivas hacia el duodeno, que son importantes en la digestión y absorción de carbohidratos, lípidos y proteínas. Además secreta hormonas que son necesarias para metabolizar la glucosa, la insulina y el glucagón. Estas hormonas son secretadas por los islotes de Langerhans (Las células  $\alpha$  secretan glucagón, las  $\beta$  secretan insulina). Menor tamaño de los islotes pancreáticos, menor número de células  $\beta$  y menor concentración de insulina sérica se ha correlacionado con la restricción de proteínas en la dieta de la madre gestante y en las crías al nacimiento. Por otro lado, en animales adultos se ha mostrado que el consumo de agua azucarada en diferentes concentraciones (desde 5 hasta 30%) se correlacionado con concentraciones séricas elevadas de colesterol, triglicéridos y resistencia a la insulina. Ello podría implicar que para el desarrollo de enfermedades metabólicas, además de la predisposición genética, también de debe considerar la exposición a diferentes factores epigenéticos.

El objetivo de la presente tesis fue determinar la correlación de combinar una restricción proteínica gestacional en la madre y el consumo de agua azucarada en la progenie adulta con la modificación del arreglo histológico del páncreas.

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar ( $n=12$ ), divididas en dos grupos, unas que fueron alimentadas con una dieta control (20 g de proteína/100 g de alimento); y otro con una dieta restringida (10 g de proteína/ 100 g de alimento), dicha manipulación se realizó en ambos grupos durante la gestación (21 días), posteriormente se alimentaron con una dieta estándar control (chow Purina 5001). Las ratas crías durante los primeros tres meses fueron alimentadas con una dieta estándar y agua *ad libitum*. A partir de los tres meses se separaron en cuatro subgrupos, donde algunos subgrupos consumieron agua azucarada al 5%, quedando distribuidas de la siguiente manera: progenie de ratas con dieta control más agua simple (C), progenie de ratas con dieta restringida más agua simple (R), progenie de ratas con dieta control más agua azucarada al 5% (C/A) y progenie de ratas con dieta restringida más agua

azucarada al 5% (R/A). Se registró el peso corporal durante todo el estudio, al sacrificio de los animales se removió el páncreas y se pesó. Posteriormente, el páncreas fue fijado en formaldehído al 4%, deshidratado en alcoholes ascendentes, aclarado en xileno e incluido en paraplast X-tra. Los cortes histológicos de 7  $\mu\text{m}$  fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina para analizar área de los islotes pancreáticos, evaluar la frecuencia del área de los islotes pancreáticos, evaluar la distribución de frecuencias de los islotes pancreáticos, cuantificar el número de islotes pancreáticos totales y cuantificar el número de núcleos totales. Las medidas morfométricas de la progenie un día después del nacimiento se analizaron por medio de una prueba de *t*-Student ( $P < 0,05$ ). Una ANOVA de dos vías se utilizó para un análisis mixto bifactorial, donde se consideró el consumo de agua azucarada como factor de medidas repetidas y la restricción proteínica gestacional como un factor completamente aleatorizado. Se encontró que el peso corporal fue similar entre hembras y machos al nacimiento. La distancia anogenital tanto en hembras como en machos fue mayor en las crías adultas de madres restringidas. **En hembras**, el número de islotes pancreáticos fue menor en el grupo RA, así como una disminución en el número de células dentro de los islotes pancreáticos, aunque en los grupos CA y R también se encontraron menos células dentro de los islotes pancreáticos, el efecto fue mayor cuando las crías adultas de madres restringidas ingieren agua azucarada. La restricción gestacional se correlacionó con el aumento de islotes pancreáticos pequeños y la disminución de islotes pancreáticos grandes; el consumo de agua azucarada se correlacionó con el aumento de islotes pancreáticos grandes y la interacción de ambos factores se correlacionó con la disminución de islotes pancreáticos pequeños. **En machos**, se encontró un aumento en el número de células dentro de los islotes pancreáticos de crías adultas en el grupo CA, sin embargo hubo una disminución en el número de células en las crías adultas de madres restringidas. Los efectos de la restricción gestacional y el consumo de agua azucarada fueron diferentes entre sexos, el efecto es mayor en el páncreas de las crías adultas hembras *versus* el de los machos. La restricción se correlacionó con la disminución de islotes pancreáticos grandes, el consumo de agua azucarada se correlacionó con el aumento de islotes pancreáticos grandes y la interacción de ambos factores se correlacionó con el aumento de islotes pancreáticos medianos y la disminución de islotes pancreáticos grandes. Los hallazgos indican que las modificaciones histológicas encontradas en los islotes pancreáticos de

Langerhans se correlacionan con la dieta materna, baja en proteínas, y con el consumo de agua azucarada en la vida adulta de la progenie, predisponiendo con ello, como lo cita la literatura, al desarrollo de enfermedades metabólicas crónicas degenerativas.



## ÍNDICE

1. Introducción.....	11
• <b>1.1 Páncreas.....</b>	<b>11</b>
• <b>1.2 Desarrollo del páncreas.....</b>	<b>11</b>
• <b>1.3 Biosíntesis de insulina.....</b>	<b>14</b>
• <b>1.4 Regulación de la síntesis de insulina .....</b>	<b>15</b>
• <b>1.5 Consumo de dietas bajas en proteínas.....</b>	<b>18</b>
• <b>1.6 Consumo de bebidas azucaradas.....</b>	<b>20</b>
2. Antecedentes.....	22
• <b>2.1 La nutrición durante la gestación .....</b>	<b>22</b>
• <b>2.2 Restricción proteínica gestacional y su efecto en la progenie.....</b>	<b>23</b>
• <b>2.3 Efecto del consumo de agua azucarada .....</b>	<b>25</b>
• <b>2.4 Efecto de la interacción de ambos factores de riesgo .....</b>	<b>26</b>
• <b>2.5 La rata como modelo de estudio.....</b>	<b>27</b>
3. Justificación .....	28
4. Hipótesis .....	29
5. Objetivos.....	29
• <b>5.1 General .....</b>	<b>29</b>
• <b>5.2 Específicos .....</b>	<b>30</b>
6. Material y Métodos.....	30

• 6.1 Grupos experimentales de las madres .....	30
• 6.2 Grupos experimentales de las crías.....	31
• 6.3 Obtención del páncreas .....	32
7. Resultados.....	34
• 7.1 Características morfométricas de la progenie al nacimiento .....	34
• 7.2 Resultados en hembras.....	35
• 7.2.1 Número de islotes de Langerhans .....	35
• 7.2.2 Proporción de islotes .....	35
• 7.2.3 Área de los islotes.....	37
• 7.2.4 Número de núcleos dentro de los islotes de Langerhans.....	38
• 7.3 Resultados en machos.....	39
• 7.3.1 Número de islotes de Langerhans .....	39
• 7.3.2 Proporción de islotes .....	39
• 7.3.3 Área de los islotes.....	41
• 7.3.4 Número de núcleos dentro de los islotes de Langerhans.....	42
8. Discusión .....	43
9. Conclusión .....	46
10. Perspectivas .....	47

## 1. Introducción

- **1.1 Páncreas**

El páncreas, se ubica en la parte dorsal al estómago, situado entre el duodeno y bazo. Consta de cabeza, cuerpo y cola. La cabeza es la porción expandida de la glándula cerca de la curva del duodeno; el cuerpo pasa por encima de la aorta y el riñón izquierdo y la cola es la extremidad izquierda del páncreas la cual cruza el riñón izquierdo. Las secreciones pancreáticas pasan a pequeños conductos, que se unen para formar dos conductos que vacían las secreciones en el intestino delgado. El conducto mayor pancreático o de Wirsung se une al colédoco del hígado y la vesícula biliar, con el cual entra al duodeno en la ampolla de Vater. El conducto menor pancreático, es el de Santorini, se vacía en el duodeno en sentido proximal a la ampolla de Vater (Tortora y Reynolds **2000**). El páncreas desempeña una función crucial en el mantenimiento de la homeostasis nutricional, a través de la síntesis, secreción de enzimas y hormonas (Collombat y cols. **2006**), siendo esta una glándula endocrina y exocrina, regula procesos metabólicos, tiene dos funciones principales: la porción exocrina le corresponde el tejido acinar que secreta enzimas digestivas hacia el estómago y la porción endocrina al tejido celular de los islotes de Langerhans que está constituido por células  $\alpha$  que secretan glucagón, las células  $\beta$  secretan insulina y células  $\delta$  secretan somatostatina, siendo estas hormonas necesarias para metabolizar la glucosa (Morimoto y cols. **2010**).

- **1.2 Desarrollo del páncreas**

El páncreas se deriva a partir de dos piezas de epitelio dorsal y ventral, que brotan del intestino anterior y medio (Bouwens y cols. **2005**). El páncreas se desarrolla a partir evaginaciones del epitelio intestinal, ambos linajes celulares (exocrino y endocrino) se diferencian de precursores epiteliales comunes del páncreas. En roedores, esto es perceptible, morfológicamente en el día embrionario 8.5-9, estimulando la formación de brotes pancreáticos: dorsal y ventral.

La primera señal de especificación en la porción de intestino que dará lugar a estos brotes, es la represión de genes de la familia hedgehog (Shh y IHH) mediada por el factor de transcripción PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox gene 1). La interacción entre el endodermo pancreático y una serie de distintas poblaciones de células mesodérmicas proporciona señales inductivas que controlan estos eventos iniciales en el desarrollo del páncreas. Dorsalmente, la interacción del endodermo, la aorta y la notocorda, estimulan la liberación de polipéptidos, incluyendo FGF2 y activina- $\beta$ . Estos factores van a reprimir la expresión de Shh en el endodermo dorsal (Hebrok y cols. **1998**). Sin embargo, la notocorda no es la única fuente de señales mesenquimales. Por ejemplo, los factores secretados a partir de la aorta dorsal también parecen ser necesarios. Los primeros eventos morfológicos para la formación del páncreas parecen estar filogenéticamente conservada entre los mamíferos (Piper y cols. **2004**).

Contrario a lo anterior, la parte del intestino anterior ventral, se desarrolla cerca al septo transversal y el mesodermo cardiogénico que se convierten en páncreas (Deutsch y cols. 2001; Rossi y cols. **2001**). Posteriormente, se condensa el mesénquima alrededor del endodermo y las yemas epiteliales se agrandan. Por el día 10.5, el epitelio parcialmente diferenciado de los dos brotes se somete a morfogénesis de ramificación en árboles ductales que por el día 12.5 dan como resultado la formación de dos páncreas primitivos (primera transición del desarrollo). Entre el día 13 y 14, la parte ventral se fusiona con la yema dorsal, que acompaña la rotación del intestino y estómago. Durante el día 14.5 al 15.5, el páncreas exocrino se diferencia del epitelio ductal, y en el día 15.5 los acinos son claramente evidentes. Las células endocrinas, ya se distinguen en el día 12.5, visto en el epitelio ductal (segunda transición del desarrollo). En el día 16, las células endocrinas comienzan a organizarse y formar islotes. Justo antes del nacimiento, en el día 19, los islotes pancreáticos están completamente formados y se someten a la remodelación y maduración adicional durante las primeras 3-4 semanas después del nacimiento (tercera transición del desarrollo).

Además de estas señales extrínsecas, los primeros determinantes intrínsecos de linaje también son esenciales en la organogénesis pancreática. Por ejemplo, Foxa1 y Foxa2 son los factores de transcripción esenciales necesarios para la expresión de PDX-1. En efecto, la

regulación de la expresión de PDX-1 por Foxa1 y Foxa2 es un evento temprano clave que controla la expansión y la diferenciación del epitelio intestinal en el páncreas (Gao y cols. **2008**). El desarrollo del páncreas comienza a partir de un grupo de células precursoras comunes que se convierten progresivamente en los linajes endocrino y/o exocrino, bajo el control de una red de factores de transcripción operan en una manera jerárquica. De tal manera que, la secuencia temporal precisa de la expresión de estos factores de transcripción durante el desarrollo pancreático está notablemente organizada. Histológicamente el páncreas está cubierto por una capa de tejido conectivo, rico en células mesoteliales, con finos tabiques que dividen a la glándula en lóbulos. Las células de los islotes están delimitadas en forma incompleta por una capa delgada de tejido conectivo reticular que se continúa en el interior de los islotes en escasa cantidad (Ross y cols. **1997**).

La parte de tejido exocrino compone casi el 99% de la glándula, están dispuestos en grupos llamados acinos, los cuales están implicados en la síntesis y secreción de varias enzimas digestivas, que se transportan por un sistema de conductos al duodeno. La parte endocrina se compone de células llamados Islotes de Langerhans que se encuentran dispersos en la glándula pancreática, representan alrededor del 1-2% del peso de la glándula, recibe del 5 al 15% del flujo sanguíneo, lo que indica la enorme vascularización del componente endocrino. Cada islote de Langerhans tiene 2 componentes principales:

- Cordones anastomosados de las células  $\alpha$ , células  $\beta$ , células  $\delta$  y células PP; cada una secreta una hormona única.
- Un componente vascular, el sistema porta insuloacinar, que comprende una arteriola aferente que da origen a una red capilar revestida por células endoteliales fenestradas. Las vénulas que salen de los islotes de Langerhans aportan sangre a los acinos pancreáticos adyacentes. Este sistema porta permite la acción local de hormonas en el páncreas exocrino.

Microscópicamente dentro del islote se distinguen cuatro tipos de células:

- Células  $\alpha$  (alfa): representan alrededor del 20% de las células, secretan glucagón y están reguladas principalmente por la concentración de glucosa en sangre, de tal modo que, cuando disminuye la glucemia se estimula la liberación de ésta hormona, mientras que la glucemia elevada la inhibe.
- Células  $\beta$  (beta): representan el 70% de las células, secretan insulina, la cual estimula los procesos metabólicos del músculo, hígado y tejido adiposo, dado que favorece la síntesis de glucógeno, proteínas y ácidos grasos. También la secreción de insulina depende de la concentración de la glucosa en sangre, por lo que la glucemia elevada favorece la liberación de insulina, mientras que la glucemia normal o disminuida reducen la secreción de ésta.
- Células  $\delta$  (delta): representan el 5-10% de las células, secretan somatostatina, la cual tiene acción paracrina, dado que inhibe la secreción de las células alfa y beta.
- Células PP: representan alrededor del 2% de las células, secretan polipéptido pancreático, tiene acciones digestivas como estimular la secreción de enzimas gástricas e intestinales para inhibir la motilidad intestinal (Geneser **2003**).

- **1.3 Biosíntesis de insulina**

Las células  $\beta$  producen insulina, el cual es un péptido de 6kd, está formada por dos cadenas polipeptídicas: cadena **A**, formada por 21 aminoácidos y cadena **B** constituida por 30 aminoácidos, estas dos cadenas están conectadas por dos puentes de disulfuro intermoleculares entre el aminoácidos 7 de cada una de las cadenas y el 20 de la cadena A con el 19 de la cadena B, y un enlace intramolecular en la cadena A, entre los aminoácidos 6 y 11 (Morimoto **2000**). La biosíntesis de la insulina se inicia en el retículo endoplásmico rugoso en la célula  $\beta$  pancreática, donde se sintetiza un precursor de mayor tamaño y cadena única, denominado preproinsulina, que consta de una única cadena de 110 aminoácidos, este se codifica en el gen localizado en el brazo corto del cromosoma 11. Inmediatamente después, la preproinsulina se

transforma en proinsulina (9kd, 86 aminoácidos) en la que ya existen puentes disulfuro y péptido C, los cuales conectan las cadenas A y B de la insulina. Algunos minutos más tarde abandona el retículo en microvesículas y se transfieren al aparato de Golgi, donde se lleva a cabo el almacenamiento en los gránulos todavía inmaduros. Es aquí, en donde comienza la conversión de proinsulina a insulina. A este nivel actúan las endopéptidasas dependientes de calcio denominadas PC2 y PC3. Las PC2 rompen selectivamente la unión de la cadena A con el péptido C, mientras que la PC3 actúa sobre la rotura de la cadena B, aunque también puede romper la unión del péptido C a la cadena A (Abraham **2008**).

- **1.4 Regulación de la síntesis de insulina**

La regulación de la secreción de insulina implica eventos no solamente a nivel genético, sino que también intervienen eventos de conductancia iónica, segundos mensajeros y de tipo metabólico (Morimoto **2000**). Con respecto a aspectos genéticos, el gen de la insulina se expresa en el núcleo de las células  $\beta$  pancreática regulado por los factores de transcripción Pax 6 y Pax 4. El estímulo que desencadena la secreción de insulina es la glucosa (Figura 1), sin embargo, otros nutrientes, como aminoácidos, ácidos grasos y cuerpos cetónicos, contribuyen a su liberación, sin olvidar la modulación producida por hormonas gastrointestinales, pancreáticas y neurotransmisores adrenérgicos y colinérgicos (Sharma y cols. **1995**; Wang y cols. **1997**). El aumento de la glucemia estimula la liberación de insulina y péptido C almacenados en gránulos de secreción (figura 2). La glucosa es captada por las proteínas transportadoras de glucosa independiente de insulina (GLUT 2) y el (GLUT 4) (Lorenzo y cols. **2008**; Jácome **2005**), que permite la entrada rápida de glucosa. En el interior de la célula  $\beta$ , la glucosa se fosforila a glucosa 6 fosfato mediante la enzima glucocinasa, cuya finalidad es la producción de adenosín trifosfato en la mitocondria. El incremento de adenosín trifosfato/adenosín difosfato induce el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ), de forma que el potasio se acumula en el interior de la célula, lo que produce la despolarización de la membrana celular y provoca la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (tipo L); como consecuencia entra dicho catión en la célula, a través

del gradiente electroquímico provocando que los gránulos de insulina se unan a la pared de la membrana de la célula  $\beta$  para su secreción, conocida como exocitosis (Henquin **2004**).

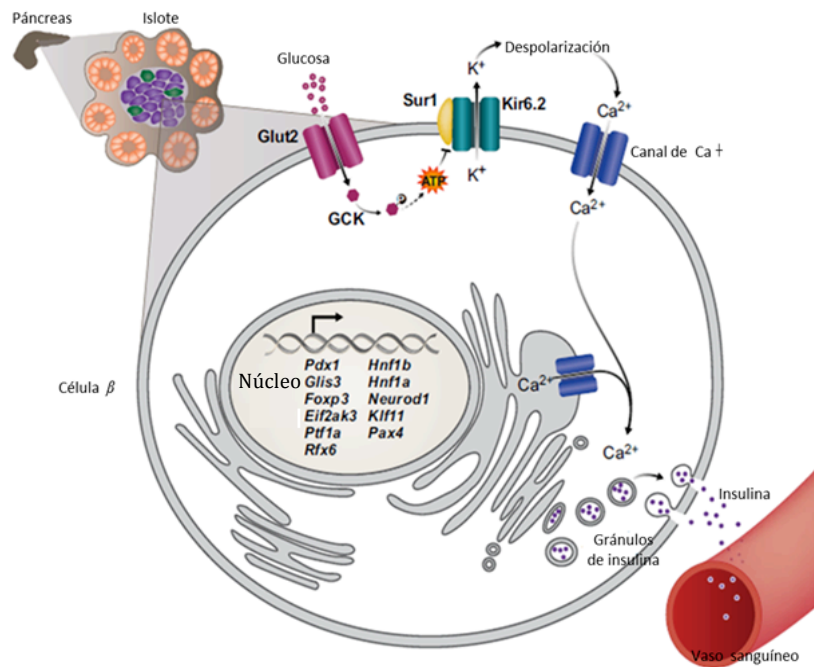


Figura 1. Las células  $\beta$  responden a los crecientes niveles de glucosa a través del aumento en la secreción de insulina (Tomado de Pagliuca y Melton **2013**).

La duración y extensión de las señales inducidas por acción de la insulina son altamente reguladas para promover el adecuado funcionamiento metabólico, el balance energético y el mantenimiento del peso corporal. Una vez que la insulina interacciona con su receptor, se inicia el encendido de cascadas de señalización que dependen de un orquestado número de interacciones proteicas. Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K; Figura 2) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas; Figura 3).



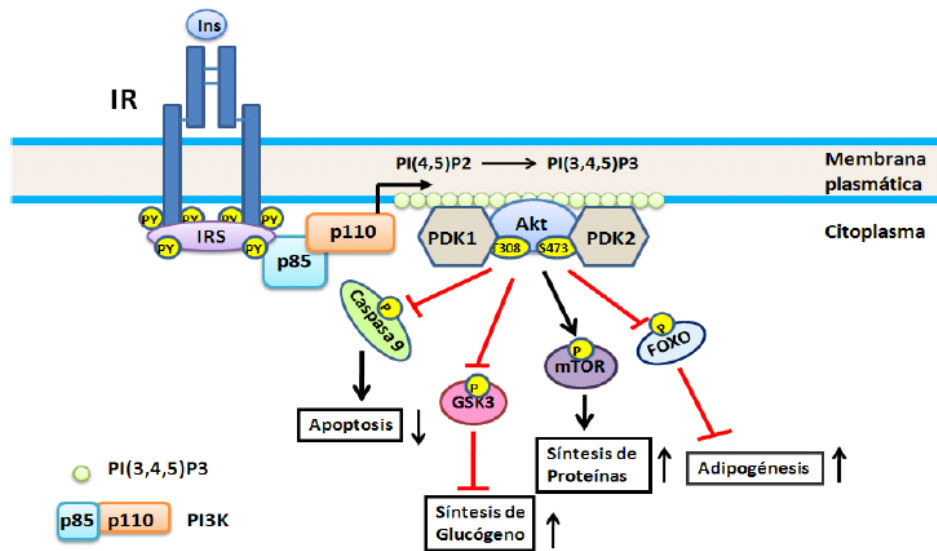


Figura 2. Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina. Esta vía representa el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo. (Olivares y Arellano **2008**)

Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de efectos mitogénicos. El control de las acciones de la insulina se lleva a cabo gracias a mecanismos muy finos de autorregulación (desensibilización homóloga), en donde enzimas de la misma vía que fueron activadas por acción de la insulina inhiben la actividad de proteínas claves de la señalización, como lo son el receptor de insulina o sus sustratos del receptor de insulina. Alternativamente, señales de vías no relacionadas con la de la insulina pueden inhibir su señalización a través de mecanismos de desensibilización heteróloga. De esta forma, tanto el receptor de insulina como su principal sustrato, el sustrato del receptor de insulina, se encuentran sujetos a una combinación de mecanismos de desensibilización homóloga y heteróloga (Olivares y Arellano **2008**). Dichos

mecanismos juegan un papel fundamental en la regulación del metabolismo de los alimentos que consumimos en la dieta diaria.

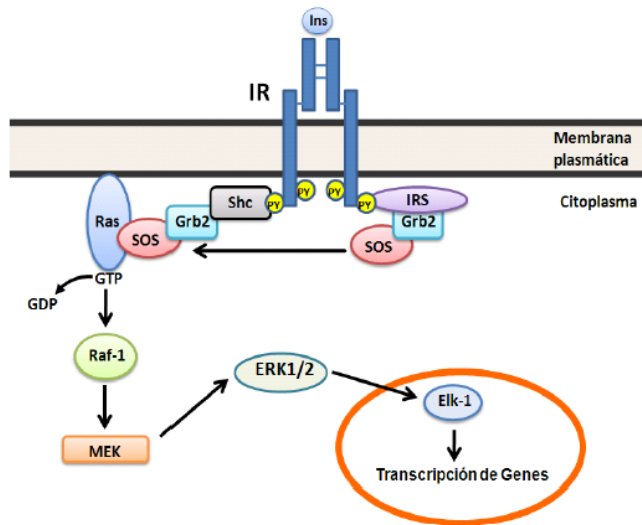


Figura 3. Activación de la vía de la PI3K/Akt por la insulina. Esta vía representa el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo. (Olivares y Arellano **2008**)

- **1.5 Consumo de dietas bajas en proteínas**

La conducta alimentaria de los seres humanos está condicionada por factores fisiológicos, sociales e incluso culturales. Los cambios en los estilos de vida favorecen el sedentarismo y los malos hábitos de alimentación, entre ellos, una dieta monótona, desequilibrada, bajo consumo de fibra, bajo consumo de proteínas, alto consumo de bebidas azucaradas como refrescos, jugos y jarabes industrializados (Osorio y cols. **2002**). La alimentación incluye la disponibilidad, selección, preferencias y la ingestión de alimentos, la cual se acompaña de un proceso involuntario llamado nutrición, el cual se encarga de transformar los alimentos en energía que será ocupada por el organismo en diversas funciones. La nutrición se define como la ingesta de alimentos en relación con las necesidades dietéticas del organismo, sin embargo, si esta relación se ve alterada, el organismo puede padecer malnutrición, la cual se caracteriza

por una ingesta inadecuada de alimento, ya sea insuficiente o por exceso en relación del gasto energético (Mataix **2009**). Estudios de laboratorio y epidemiológicos han demostrado que los ambientes adverso desde el vientre materno y durante la vida neonatal temprana altera el desarrollo y predisponen al individuo a problemas de salud de por vida (Petrik y cols. **1999**; Nathanielsz **2006**; Miñana-Solís y Escobar **2008**; Chamson-Reig y cols. **2009**), lo que podría estar relacionado con una resistencia a la insulina en etapas posteriores (Fernandez-Twinn y cols. **2004**).

El concepto de programación fetal se originó de los datos epidemiológicos en humanos, que relacionan un estado nutricional deficiente durante la gestación, el bajo peso al nacimiento con una predisposición a padecer alteraciones metabólicas en la vida adulta como: sobrepeso y enfermedades cardiorrespiratorias (Barker y cols. **2002**). La programación fetal, es la respuesta a un desafío específico del organismo durante una ventana crítica del desarrollo en el tiempo que altera la trayectoria del desarrollo cualitativo y cuantitativo (Nathanielsz y cols. **2007**).

Estudios epidemiológicos en humanos, han demostrado que la desnutrición materna por una deficiencia de los nutrientes ocasiona en el feto limitaciones en el desarrollo físico, cognitivo, reproductivo, metabólico y patologías conocidas como Kwarshiorkor y Marasmo (Grantham **1995**). Algunos estudios epidemiológicos muestran que hay una relación entre el tipo de ambiente intrauterino y los riesgos para desarrollar alteraciones del metabolismo (Smith y Ozanne **2006**). En la actualidad, a esto se le conoce como "hipótesis de los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad" que propone una respuesta adaptativa del feto, a una nutrición materno-fetal precaria. Aunado a esto diversas investigaciones han relacionado la restricción de nutrientes pre y postnatal a la resistencia a la insulina del adulto, diabetes mellitus tipo 2, obesidad, hipertensión y la enfermedad arterial coronaria en humanos (Barker y cols. **1993**).

En modelos animales, se ha expuesto al feto o al recién nacido a diferentes protocolos de malnutrición, por ejemplo: La restricción proteínica durante la gestación, con dieta con el 10 %, no modifica el peso al nacimiento de las crías. Sin embargo en machos reportan alteraciones en el desarrollo sexual, reproductivo, endocrino y metabólicos, como resistencia a la insulina, aumento en las concentraciones séricas de triglicéridos, y colesterol (Zambrano y cols. **2005a**; **2005b**; **2006**; Bautista **2008**). También se reportan cuadros de resistencia a la leptina en machos de

tres meses de edad, la hiperleptinemia está presente en estadios tempranos de la obesidad, ya que es secretada en el tejido adiposo (Zambrano y cols. **2006**; Attie y Scherer **2009**). La restricción de proteínas predispone a la descendencia adulta a padecer intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. David Barker señala que ciertas estructuras y funciones de los órganos realizan una programación durante la vida embrionaria y fetal que determina los puntos de referencia que regularán las respuestas fisiológicas y metabólicas en la etapa adulta. El efecto a corto plazo de la programación permite la supervivencia del feto, mientras que a largo plazo predispone a enfermedades en la vida adulta. Estudios han demostrado que la modificación de las dietas pre y postnatales afectan órganos y tejidos, indicando adaptaciones es en la vida posnatal (Erhuma y cols. **2007**).

Se ha demostrado en ratas, que la restricción de proteínas durante el embarazo y la lactancia, altera el desarrollo pancreático normal de las crías, lo cual puede contribuir a la homeostasis de la glucosa en la edad adulta (Wilson y cols. **1997**). La privación nutricional durante este período crítico de desarrollo puede causar alteraciones, que no sólo afectan a su generación, si no el fenotipo de las generaciones futuras (Vickers. **2014**). Esta hipótesis se divide en tres etapas, la primera consiste en 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 el desarrollo o aparición de diferentes trastornos metabólicos (Seckl **1998**).

El efecto general de estos cambios en el metabolismo tiene como objetivo mejorar la capacidad de almacenar y utilizar la energía para el mantenimiento y funcionamiento del organismo, por la deficiencia en la alimentación en su vida intrauterina, sin embargo en un ambiente adecuado, esta programación puede ser no beneficiosa ya que el individuo está acostumbrado a realzar sus funciones con pocos recursos alimentarios.

- **1.6 Consumo de bebidas azucaradas**

En seres humanos el consumo de bebidas azucaradas en la dieta ha aumentado de manera significativa, dicho consumo excesivo se ha asociado con el riesgo de padecer sobrepeso, *diabetes mellitus* y enfermedades cardiometabólicas (Bray **2010**). En jóvenes, se

han demostrado que el consumo de bebidas azucaradas, aumentan los indicadores de adiposidad y la prevalencia de la obesidad además se ha encontrado aumento en el Índice de Masa Corporal (IMC) en estudios a corto y a largo plazo (Jimenez y cols. **2013**). La ingesta de azúcares, en las cantidades consumidas habitualmente en países desarrollados es de 48 millones de toneladas anuales y subdesarrollados es de 100 millones de toneladas, se ha relacionado con la obesidad y por tanto, indirectamente, con las enfermedades asociadas a la obesidad, se ha planteado que las dietas con elevada respuesta glucémica, incluido el consumo frecuente de azúcares y por consiguiente hiperinsulinemia, podrían estar implicadas en la etiología de algunos tipos de cáncer. En otros estudios en humanos con dietas de alto índice glucémico, ingesta total de carbohidratos o sacarosa, se ha mostrado una asociación entre el riesgo de cáncer de páncreas, observando un mayor riesgo asociado con la ingesta de fructosa (Aranceta y Pérez. **2013**). Otros estudios han confirmado que los individuos que consumen el 25% de su energía en forma de fructosa tenían mayor adiposidad visceral que los individuos diabéticos obesos que consumen el 25% de su energía en forma de glucosa. (Aydin y cols. **2014**).

Estudios en ratas macho de la cepa Wistar que fueron expuestos a una dieta de sacarosa del 60% al 70 % kcal durante 8 semanas, mostrando en primera instancia resistencia a la insulina en el hígado que en el músculo. (Ghafoorunissa y cols. **2005**). En otro estudio en ratas macho de la cepa Wistar la administración de una dieta en sacarosa al 30% en el agua durante 21 semanas, produjo hipertensión arterial, obesidad, acumulación de grasa abdominal y epididimal, además aumento en los lípidos en suero totales, triglicéridos, lípidos de baja densidad, colesterol total, insulina y ácidos grasos libres (Alexander y cols. **2004**). En un modelo en ratas de la cepa Wistar de *diabetes mellitus* espontánea no dependiente de la insulina, se caracteriza por la pérdida progresiva de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos con fibrosis. Se demostró los efectos de una dieta en sacarosa a el 30 % durante 6 semanas, donde se indujo hiperglucemia severa, comparando con ratas no tratadas, indicando que la alimentación con sacarosa promueve la apoptosis de las células  $\beta$  en ratas en el modelo de animales de *diabetes mellitus* espontánea a través de un aumento del estrés oxidativo, sin alterar la actividad proliferativa (Koyama y cols. **1998**). Por ello, estamos interesados en

Comprobar si el efecto de la restricción proteínica gestacional y el consumo de agua azucarada en la progenie adulta, modifica la histología del páncreas.

## **2. Antecedentes**

### **• 2.1 La nutrición durante la gestación**

Una forma de evaluar el desarrollo del individuo durante la gestación, es considerar la nutrición materna durante el embarazo y el peso al nacimiento del individuo. Si bien es cierto, que el desarrollo del feto tiene determinantes genéticos, el crecimiento fetal muestra fuerte relación con una amplia variedad de factores epigenéticos dependientes del estado nutricional. Una pobre dieta materna, escasas reservas nutricionales en la madre, un inadecuado flujo sanguíneo uterino (incluye defectos en la permeabilidad de nutrientes a través de la placenta) y la influencia hormonal materna repercuten negativamente en la talla y el peso al nacimiento y en una mayor probabilidad de enfermedades en la vida adulta (Godfrey y Barker **2000**, Moreno y Dalmau **2001**).

En humanos una disminución de la ingestión materna o de la capacidad de absorción puede causar un crecimiento fetal menor (Ceesay y cols. **1997**). Por ejemplo, los hijos nacidos de madres holandesas, sometidas a una ingestión muy reducida (400-800 kcal/día), durante el tercer trimestre de embarazo durante la Segunda Guerra Mundial, presentaban bajo peso al nacimiento. Esos niños tenían en la edad adulta una menor tolerancia a la glucosa y una mayor resistencia insulínica (Ravelli y cols. **1998**).

La malnutrición durante la gestación puede producir defectos persistentes, como la reducción del número de células de los tejidos, la modificación estructural de los órganos, la selección de ciertos clones de células y la modificación en el ajuste de ejes hormonales clave. El impacto a largo plazo dependerá del estadio en el que se produzca la malnutrición, de su duración e intensidad. Cada órgano y tejido tiene un periodo crítico o sensible, de mayor replicación celular, durante el cual se verá más afectados (Becerra **1999**).

La falta o el inadecuado desarrollo del lecho vascular de la placenta produce una merma en la circulación placentaria que, a su vez, origina fenómenos de trombosis e infartos que, condicionan una reducción en la masa de tejido placentario funcionando como consecuencia final se tiene un aporte disminuido de oxígeno y nutrientes al feto y un retraso del crecimiento intrauterino (Kingdom y Kaufmann **1997**). Sin embargo, otros autores señalan que en situaciones de déficit de aporte nutritivo a la madre se encuentran placentas incrementadas de tamaño: madres anémicas durante el embarazo (Godfrey y cols. **1991**), aumento de ejercicio o en las que viven en grandes altitudes (Mayhew y cols. **1990**).

- **2.2 Restricción proteínica gestacional y su efecto en la progenie**

Las proteínas son un constituyente esencial en la dieta para el bienestar del individuo (Zuñiga y cols. **2003**), la mala calidad de la nutrición durante el desarrollo fetal, se asocia con resultados adversos para la salud en la vida adulta. Los estudios epidemiológicos sugieren que, los marcadores de la desnutrición fetal son predictivos de riesgo de síndrome metabólico y la enfermedad cardíaca coronaria (Yates y cols. **2009**). Un estudio con ratas de la cepa Wistar con restricción de alimentos al 50%, presenta una disminución del peso del páncreas, afecta la densidad y masa de células  $\beta$ , además disminución en el área estas células, la nutrición en el desarrollo del páncreas endocrino en ratas con restricción de alimentos del 50% desde el día 15 de gestación hasta el parto, concluye que la diferenciación en el páncreas puede ser alterada en etapas fetales mientras la proliferación podría verse afectada después del destete. (Garofano y cols. **1997**). Por consiguiente, estos resultados sugieren que la malnutrición en el útero perjudica la capacidad del feto, lo que lleva a alteraciones irreversibles en el desarrollo de las células  $\beta$  que no puede ser compensada por una alimentación normal postnatal. (Garofano y cols. **1997**). Aunque existen antecedentes donde se sugiere que a los 18 meses de edad, se presenta un cambio brusco en el perfil metabólico con hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina en la restricción gestacional programada (Harrison y Langley-Evans **2009**).

También han observado que una dieta baja en proteínas durante la gestación, ocasiona cambios morfológicos en el páncreas, ocasionando una disminución en el área de los islotes, así como en el número de islotes y la resistencia a la insulina en la progenie (Chamson-Reig y cols. **2009**). En otro estudio, en la progenie adulta con restricción de proteína durante la

gestación, la masa de células  $\beta$  se reduce en los machos (Theys y cols. **2009**). En ratas de la cepa Wistar con restricción de proteínas de la dieta a 8% durante toda la gestación, se observa un peso reducido del páncreas en la descendencia al nacer, con una reducción de la masa de células  $\beta$ , el tamaño de los islotes, disminución en la tasa de replicación de las células  $\beta$ , pero un aumento de la apoptosis, estos hallazgos muestran que la dieta baja en proteínas, modifica los ciclos de replicación y la apoptosis de las células  $\beta$ , una expresión pancreática reducida de IGF-II, puede contribuir a la tasa más baja de  $\beta$  proliferación celular y el aumento de la apoptosis, visto en el feto y el recién nacido después de la dieta baja en proteínas (Petrik y cols. **1999**). En otro trabajo realizado en ratas de la cepa Wistar, también con dieta baja en proteínas al 8 % en ambos géneros pero en diferentes etapas del desarrollo, se ha observado un decremento en el número de los islotes; grandes, medianos y pequeños consecuentemente a la media del área del islote y en la media del número de las células  $\beta$  están reducidas, así como la presencia resistencia a la insulina (Chamson-Reig y cols. **2008**). En ratas la restricción proteínica gestacional al 6%, la progenie presenta bajo peso corporal al nacer pero ganancia de peso en el posdestete, y además presentan mayor resistencia a la insulina (Miñana y Escobar **2007**). Esto nos puede indicar que el páncreas está afectado durante la etapa prenatal y postnatal. Las dietas a lo largo del embarazo pueden tener consecuencias en el desarrollo del producto en etapas postnatales, la acumulación de pruebas ha demostrado que la desnutrición materna aumenta el riesgo de enfermedad metabólica en la progenie adulta. La restricción proteínica temprana altera la tolerancia a la glucosa, que puede proporcionar una explicación celular para el desarrollo de la *diabetes mellitus* tipo 2 más adelante en la vida (Theys y cols. **2009; 2010**). Se ha demostrado que en ratas de la cepa Wistar, que la restricción proteínica gestacional provoca un aumento de la secreción de insulina, dejando sin reservas a los islotes pancreáticos, otros estudios en ratas de la cepa Wistar hembras con restricción proteínica gestacional, han demostrado que la pérdida de la secreción de insulina estimulada por la glucosa es asociada al envejecimiento siendo más notoria en la historia de la dieta materna, además la insulina estimulada por la glucosa es más alta en hembras que en machos (Morimoto y cols. **2011; 2012**). La restricción proteínica materna, ya sea durante el embarazo o lactancia altera el crecimiento postnatal, estimulación del apetito, la fisiología de la leptina, triglicéridos y las concentraciones de colesterol, modificando el metabolismo de la glucosa y



resistencia a la insulina en una ventana crítica del crecimiento. Además la restricción proteica materna retrasa la maduración sexual en las ratas macho, algunos de los efectos emergen en la vida adulta (Zambrano y cols. **2005; 2006**).

- **2.3 Efecto del consumo de agua azucarada**

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. Existen estudios en ratas de la cepa Wistar, donde se ha trabajado con consumo de sacarosa, han observado acumulación de grasa visceral, un aumento en las concentraciones de insulina, triglicéridos y presión arterial (El Hafidi y cols. **2001**), en un trabajo similar con consumo de sacarosa, se observó la presencia de hipertensión arterial, obesidad, acumulación de grasa abdominal y epididimal, aumento en triglicéridos, lípidos de baja densidad, colesterol total, insulina y ácidos grasos libres (Alexander y cols. **2004**). Aunque se observa, que el consumo de sacarosa diluida en el agua afecta algunos parámetros metabólicos es importante tomar en cuenta el tiempo que la rata consume una determinada dieta. Por lo tanto, la relación que existe entre las dietas, modifican los procesos metabólicos en la progenie de manera perjudicial o eficiente dependiendo el tipo de dieta y la etapa de su intervención. Se han encontrado en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, que ingieren jarabe de maíz de alta fructosa, induce ganancia de peso corporal comparado con las ratas que consumieron sacarosa a pesar de que, ingieren la misma cantidad de calorías totales, el consumo calórico por la dieta con jarabe de maíz de alta fructosa es menor que el de la sacarosa. Este incremento en el peso corporal con fructosa fue acompañado por aumento de tejido adiposo, en particular en la región abdominal, y eleva las concentraciones circulantes de triglicéridos (Bocarsly y cols. **2010**). El consumo de sacarosa impacta en el peso corporal en menor proporción que la fructosa, sin embargo persiste la ganancia de peso.

En ratas, las dietas ricas en carbohidratos (por ejemplo sacarosa o fructosa) inducen dislipidemias (aumento del triglicérido del plasma y de los niveles de ácidos grasos libres), el adiposito visceral, y la insensibilidad de la insulina en varios tejidos incluyendo el músculo esquelético (D' Alessandro y cols. **2000**). Resulta interesante saber que en humanos, el

consumo de azúcares refinados como la sacarosa y fructosa se ha incrementado en las décadas pasadas, especialmente en niños parece desempeñar un papel importante en el desarrollo de la obesidad (Bray y cols. **2004**). El ambiente metabólico que acompaña a la dislipidemias que se desarrolla en las ratas alimentadas con una dieta rica en sacarosa depende de la cantidad de carbohidrato y de la duración en la que se administra la dieta (Gutmann y cols. **1987**).

- **2.4 Efecto de la interacción de ambos factores de riesgo**

Las dietas pre y postnatales, modifican los procesos metabólicos. La restricción de proteínas en la madre durante la etapa gestacional y el 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**). Las interacciones de las dietas prenatales en etapas muy tempranas de la vida, participan en la etiología de la enfermedad, indicado problemas alimentarios en las etapas posteriores. La desnutrición durante la vida fetal, puede determinar el riesgo de desarrollar aterosclerosis en la edad adulta, estos estudio proporcionan antecedentes a la hipótesis de los orígenes de la salud y la enfermedad. Los efectos de la restricción de proteínas en la madre durante la etapa gestacional y el consumo elevado de colesterol en la progenie, aumenta la concentración de triglicéridos, grasa perineal y gonadal (Yates y cols. **2009**). En el trabajo de Cervantes y cols, se observó que la restricción de proteína gestacional y el posterior consumo de agua azucarada de la semana 12 a la 16 por parte de los críos adultos modifica la insulina, elevándola en ambos sexos, sin embargo la glucosa no presenta cambios, lo cual sugiere lo importante que es para el organismo mantener una normogluemia a expensas de otros cambios como la síntesis de *novo* de triglicéridos y colesterol. Tanto los triglicéridos como el colesterol fueron modificados por el consumo de agua azucarada en ambos sexos, independientemente de la dieta materna, el efecto del agua azucarada ocasionó un aumento en triglicéridos y colesterol, ya que la sacarosa en especial su contenido de fructosa, es una fuente importante de la síntesis de *novo* de triglicéridos y de colesterol (Cervantes y cols. **2014**).

- **2.5 La rata como modelo de estudio**

A nivel de investigación, los estudios realizados en humanos sólo permiten realizar correlación de variables y muy pocos abordan el análisis de los mecanismos fisiológicos e histológicos involucrados en algún padecimiento. Por ello, se ha recurrido al uso de animales de laboratorio para investigar mecanismos de acción de alguna sustancia, efectos tóxicos, benéficos de medicamentos, observar síntomas y signos producidos por alguna enfermedad, alteraciones histológicas de órganos o tejidos producidas por algún padecimiento, etc.

De manera que en los animales de laboratorio (considerados modelos animales para estudiar “algo”) es posible inducir alguna patología mediante tratamiento farmacológico, o de manera natural si una enfermedad aparece de manera fortuita en un animal, es exacerbada mediante manipulación genética o cruzamiento entre miembros enfermos (National Research 2004).

### 3. Justificación

La malnutrición en seres humanos durante la gestación, afecta el peso al nacer y se asocia con trastornos metabólicos en la vida adulta, (Barker y Osmond **1986**; Barker **1994**). A partir de estos estudios epidemiológicos se plantea la "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 precaria. El efecto de la programación a corto plazo permite la supervivencia del feto, mientras que a largo plazo predispone a enfermedades en la vida adulta. Existen asociaciones que son independientes de los cambios en las tasas de crecimiento del feto, los estudios experimentales en los que se ha evaluado la restricción y exceso de nutrientes en la gestación proporciona pistas sobre los mecanismos que vinculan la nutrición fetal a cambios fisiológicos permanentes que promueven las enfermedades (Langley-Evans y Sculley **2006**). Otras investigaciones también en humanos han relacionado la restricción de nutrientes pre y postnatal a la resistencia a la insulina del adulto, diabetes *mellitus* tipo 2 (Barker **1993**). Un modelo de rata establecido de restricción de proteínas, durante la gestación y la lactancia, altera el desarrollo pancreático normal que en última instancia puede contribuir a la homeostasis de la glucosa (Wilson y Hughes **1997**). La restricción proteínica materna, ya sea durante la gestación o lactancia altera el crecimiento postnatal modificando el metabolismo de la glucosa y resistencia a la insulina (Zambrano y cols. **2005**; **2006**). En ratas de la cepa Wistar con restricción proteínica gestacional presentan un aumento de la secreción de insulina (Morimoto y cols. **2011**; **2012**). Estudios con restricción en proteínas, se ha observado un decremento en el número de los islotes; grandes, medianos y pequeños consecuentemente a la media del área del islote y la media del número de las células  $\beta$  están reducidas, así como la presencia de resistencia a la insulina (Chamson-Reig y cols. **2008**).

En seres humanos estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de dietas con un alto contenido en grasas y azúcares favorecen el desarrollo de los problemas actuales de sobrepeso y obesidad (Barquera y cols. **2012**), en otros estudios el consumo de bebidas azucaradas en la dieta se ha asociado con el riesgo de padecer sobrepeso, diabetes *mellitus* y enfermedades cardiometabólicas (Bray **2010**). En ratas, el consumo de bebidas azucaradas

promueve apoptosis de células  $\beta$ , pérdida progresiva de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos y aumento en la insulina (Koyama y cols. **1998**; El Hafidi y cols. **2001**; Alexander y cols. **2004**; Herman y cols. **2008**).

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 del páncreas cuando son sometidas en la vida adulta al consumo elevado de carbohidratos.

Debido a que el páncreas contribuye a la metabolización de los alimentos regulando la homeostasis de la glucosa. Proponemos que una malnutrición proteínica gestacional predispone al descendiente a padecer alteraciones (histológicas/funcionales/metabólicas) relacionadas con el páncreas, y que el consumo de bebidas azucaradas en la vida adulta puede producir un efecto sumatorio en dichas modificaciones histológicas del páncreas.

#### **4. Hipótesis**

El consumo de la restricción proteínica gestacional en la madre sumado al consumo de agua azucarada en la progenie adulta se correlaciona con modificaciones en el arreglo histológico del páncreas.

#### **5. Objetivos**

- **5.1 General**

Determinar si la combinación de la restricción proteínica gestacional y el consumo de agua azucarada en la progenie adulta se correlaciona con la modificación del arreglo histológico del páncreas.

- **5.2 Específicos**

- Evaluar el área de los islotes pancreáticos
- Evaluar la frecuencia del área de los islotes pancreáticos
- Evaluar la distribución de frecuencias de los islotes pancreáticos
- Evaluar el número de islotes pancreáticos totales
- Evaluar el número de núcleos totales

## **6. Material y Métodos**

Se utilizaron 20 ratas hembras vírgenes de la cepa Wistar de tres meses de edad manejadas en condiciones de bioterio a una temperatura de  $20\pm 2$  °C, con un ciclo de luz-oscuridad invertido de 12/12hrs.

- **6.1 Grupos experimentales de las madres**

El día del apareamiento es considerado el día 0 de gestación. A partir del día uno de gestación, se midió el consumo de alimento y el peso corporal diario. Las ratas fueron divididas en dos grupos:

Control, ratas alimentadas con una dieta Chow 5001 de Purina (20% de proteína) y agua simple de manera *ad libitum*.

Restricción proteínica gestacional, ratas adultas alimentadas durante los 21 días de gestación de manera *ad libitum* con una dieta isocalórica reducida en proteínas (10% de proteína) (Tabla 1).

Ingredientes	Dieta normal en proteína (%)	Dieta reducida en proteína (%)
Caseína	20	10
Cisteína	0.3	0.15

Colina	0.165	0.165
Mezcla de vitaminas	1	1
Mezcla de minerales	5	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 1.- Composición de las dos dietas isocalóricas con las que se alimentaron a las ratas durante la gestación.

## • **6.2 Grupos experimentales de las crías**

Después del parto, las camadas se ajustaron a 10 críos para estandarizar la demanda alimenticia durante la lactancia. La proporción de machos y hembras fue 1:1 en lo posible. Las crías al nacimiento fueron pesadas en una balanza Ohaus de 0-500 g y la talla, circunferencia cefálica, abdominal y la distancia ano-genital se tomaron con un Vernier digital Mitutoyo 700-113-10.

A las madres de ambas dietas maternas durante la lactancia se les proporcionó alimento Chow 5001 de Purina *ad libitum*. Las crías de ambos grupos fueron alimentados con la dieta Chow 5001 de Purina, después del destete y a lo largo de todo el estudio. El peso corporal y el consumo de alimento fueron monitoreados diariamente durante la lactancia y después al destete, semanalmente. Al destete, se formaron grupos de crías por sexo. A la semana 12 de edad se eligieron a dos ratas del mismo sexo, de cada camada, se les proporcionó una solución de agua con azúcar comercial al 5% todos los días, durante 10 semanas. En este tiempo se

monitoreó el consumo de alimento, de agua y peso corporal y al final se calculó consumo de energía total y lo aportado por el alimento y el agua.

Crías adultas de 22 semanas de edad sin agua azucarada, cuyas madres tuvieron una dieta control (C, n= 6).

Crías adultas de 22 semanas de edad con agua azucarada (5%), cuyas madres tuvieron una dieta control (CA, n=6).

Crías adultas de 22 semanas de edad sin agua azucarada, cuyas madres tuvieron una dieta baja en proteínas (R, n=6).

Crías adultas de 22 semanas de edad con agua azucarada (5%), cuyas madres tuvieron una dieta baja en proteínas (RA, n=6).

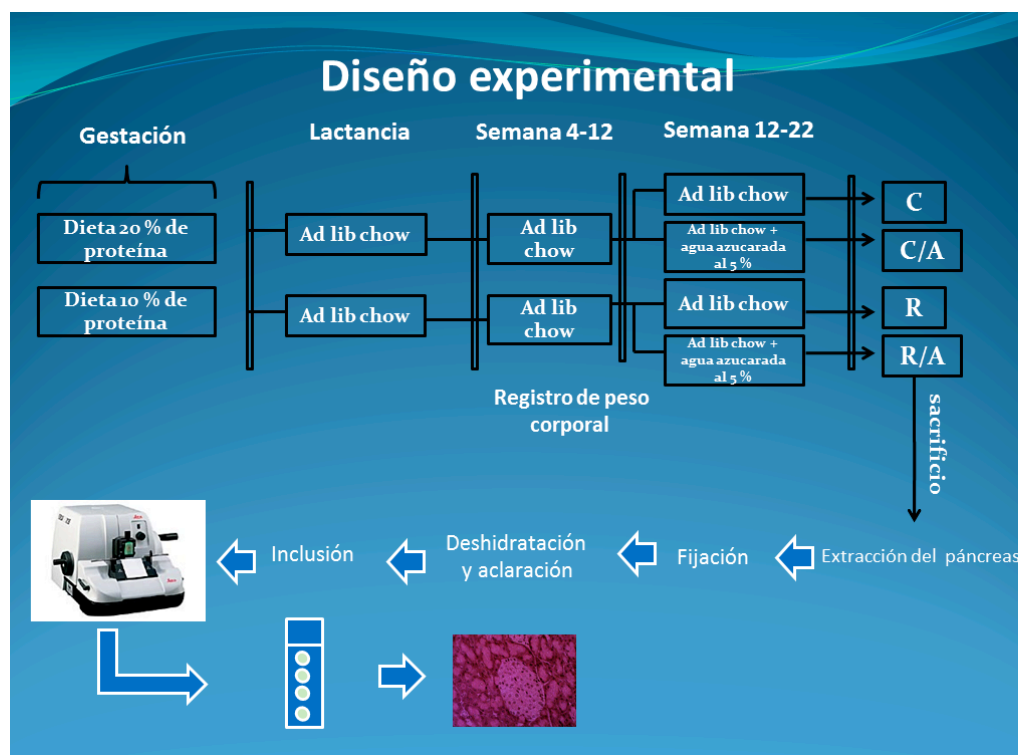


Figura 4. Diseño experimental

### • 6.3 Obtención del páncreas

Se realizó una incisión sobre la línea media de la piel abdominal para poder remover cuidadosamente el páncreas, inmediatamente fue pesado y fijado en formaldehído al 4%.



Después, el tejido fue deshidratado con alcohol etílico en concentraciones ascendentes (70, 80, 96 y 100%), aclarado en xileno e incluido en paraplast X-tra para obtener cortes transversales de 7 µm en un micrótomo. Los cortes fueron recolectados en portaobjetos y teñidos con hematoxilina eosina, para determinar el área de los islotes pancreáticos. Del páncreas, se realizó un barrido histológico, para determinar el número de cortes a analizar. El análisis se realizó con la ayuda de un analizador de Imágenes AxioVision REL 4.6 (Zeiss Inc 2007) en fotografías tomadas con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega píxeles montada en un microscopio óptico Zeiss Imager A.1 (a 200 y 400 aumentos totales).

#### **6.4 Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados por una ANOVA de dos vías se construyó un modelo de análisis mixto bifactorial, donde se considera el consumo de agua azucarada como factor de medidas repetidas y la restricción proteínica gestacional como un factor completamente aleatorizado. Se utilizaron dos animales de cada camada y de cada sexo, por lo que fueron promediados para considerar la media como dato de la camada. Cabe recalcar que el número de individuos fue estandarizado a 10 miembros por camada para evitar que esto fuera un factor que interfiriera en análisis posteriores. El análisis se realizó por separado para hembras y machos.

El análisis de distribución de frecuencias, índice de frecuencia acumulada y área bajo la curva se realizó mediante el paquete estadístico del programa GraphPad Prism para Windows versión cinco, ahí se evaluó el tamaño de los islotes de Langerhans por tamaño, en islotes Los datos fueron analizados con una ANOVA de dos vías con una corrección de Bonferroni y una prueba de Fisher's para la distribución de frecuencias.

## 7. Resultados

### • 7.1 Características morfométricas de la progenie al nacimiento

El número de individuos por camada fue similar para ambas dietas: control  $11.3 \pm 0.6$  y restringido  $11.01 \pm 0.6$  ( $p=0.8$ ).

Las medidas morfométricas fueron comparadas con una prueba de t de Student, sin encontrar diferencia significativa en el peso corporal, talla, ni en el diámetro abdominal ni cefálico. La distancia ano genital fue mayor en hembras y machos de las crías del grupo restringido comparado con su control, como se indica en la tabla 2.

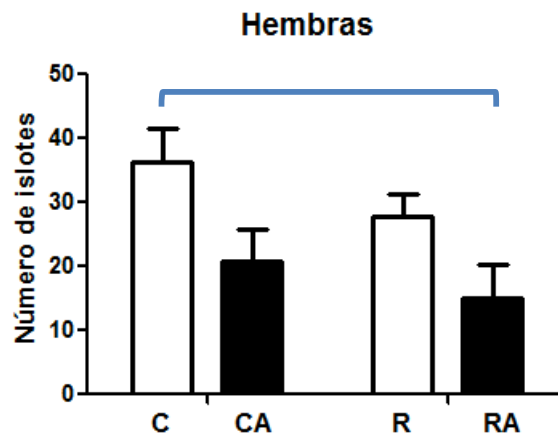
		Control	Restringido
Peso corporal (g)	Hembras	$5.8 \pm 0.2$	$5.6 \pm 0.2$
	Machos	$6.0 \pm 0.2$	$6.1 \pm 0.2$
Talla (mm)	Hembras	$48.1 \pm 0.8$	$45.8 \pm 0.9$
	Machos	$49.4 \pm 0.8$	$47 \pm 0.9$
Diámetro cefálico (mm)	Hembras	$11.1 \pm 0.1$	$10.7 \pm 0.2$
	Machos	$11.2 \pm 0.2$	$10.8 \pm 0.2$
Diámetro abdominal (mm)	Hembras	$13.8 \pm 0.5$	$13.1 \pm 0.5$
	Machos	$14.1 \pm 0.4$	$13.4 \pm 0.5$
Relación diámetro cefálico: diámetro abdominal	Hembras	$0.81 \pm 0.03$	$0.83 \pm 0.04$
	Machos	$0.80 \pm 0.03$	$0.82 \pm 0.04$
Distancia ano-genital (mm)	Hembras	$2.3 \pm 0.05$	$2.6 \pm 0.06^*$
	Machos	$4.4 \pm 0.06$	$4.8 \pm 0.07^*$
Distancia ano-genital (mm/ g <sup>-1</sup> )	Hembras	$0.42 \pm 0.02$	$0.46 \pm 0.02$
	Machos	$0.74 \pm 0.02$	$0.75 \pm 0.02$

Tabla 2.- Peso al nacimiento y medidas morfométricas de crías de ratas alimentadas con la dieta control (C, 20% de proteína) o dieta restringida (R, 10 % de proteína) durante la gestación. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M.) de 11 camadas para cada grupo. Para la comparación de grupos se utilizó una prueba de t de Student. \*  $p < 0.05$  vs Control.

- **7.2 Resultados en hembras**

- **7.2.1 Número de islotes de Langerhans**

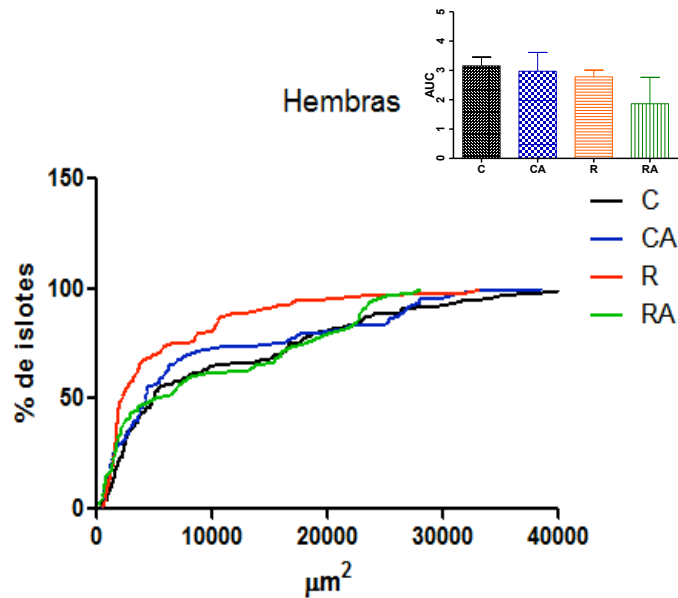
Cuando se contabilizó el número de células que se encontraron dentro de los islotes en las crías adultas del grupo C, el número fue de  $36.25 \pm 5.25$ , y en las crías adultas del grupo CA fue de  $20.75 \pm 4.95$  islotes. Mientras que, en las crías adultas del grupo R se contabilizaron  $27.75 \pm 3.47$  islotes y en las crías adultas RA el número de islotes fue de  $15.00 \pm 5.37$ , mostrando diferencias significativas entre los grupos C vs RA, en la semana 22 de edad ( $*p < 0.05$ ; Figura 5).



**Figura 5.** Número de islotes de Langerhans por campo en el páncreas en cada condición. Se muestra la media  $\pm$  e.e. encontró una diferencia significativa en el número de islotes en el grupo C vs RA ( $*p < 0.05$ ) ANOVA de dos vías, Bonferroni post hoc, n=6.

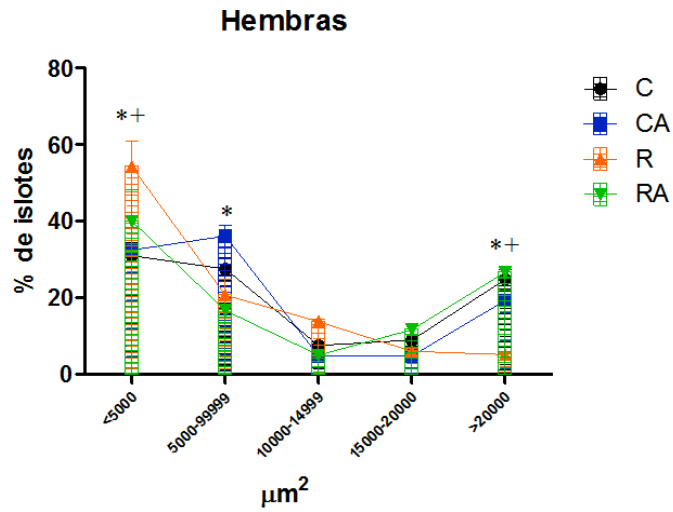
- **7.2.2 Proporción de islotes**

En la figura 6, se muestra el porcentaje de islotes, el índice de frecuencia acumulada y el área bajo la curva, no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales en la semana 22 de edad ( $p > 0.05$ ).



**Figura 6.** El área bajo la curva (AUC) se presenta como media  $\pm$  e.e. se analizó por medio de ANOVA de una vía, pos hoc Tukey no se muestran diferencias.

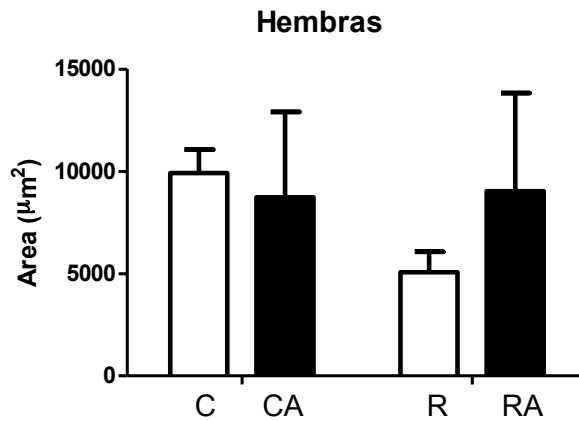
La proporción de islotes pequeños aumentó en el grupo R y por el contrario se observó una disminución en el grupo RA. Los islotes grandes disminuyeron en el grupo R pero aumentaron en el grupo RA. El efecto de ambos factores en el grupo RA fue significativamente diferente en comparación con el grupo CA. Así mismo, se muestra una diferencia significativa entre los grupos CA y RA. Resultados similares se encontraron entre los grupos R vs RA. Es decir, se observa que la restricción proteínica gestacional y el consumo de agua azucarada en la semana 22 de edad afectó más el porcentaje de islotes ( $p < 0.05$ ; Figura 7).



**Figura 7.** Se encontró diferencia mediante la ANOVA de dos vías,  $n=6$ ,  $*p < 0.05$  C vs R, CA vs RA,  $+p < 0.05$  R vs RA.

• **7.2.3 Área de los islotes**

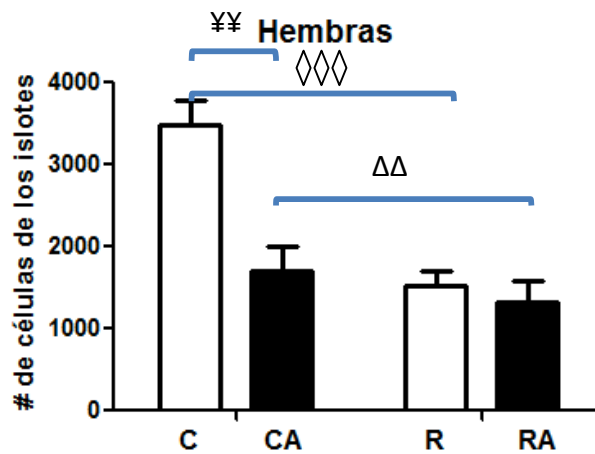
Con respecto al área de los islotes de acuerdo a su tamaño, en las crías adultas del grupo C fue de  $9919.77 \pm 1146.76$  y en el grupo CA fue de  $8727.55 \pm 4281.31$ . En el grupo R fue de  $5068.35 \pm 997.38$ , mientras que en el grupo RA fue de  $9037.34 \pm 4796.03$ . No se encontraron diferencias entre grupos en hembras a la semana 22 de edad. (Figura 8).



**Figura 8.** No se encontró diferencia mediante la ANOVA de dos vías,  $n=6$  en todos los grupos ( $p > 0.05$ ).

- **7.2.4 Número de núcleos dentro de los islotes de Langerhans**

Cuando se contabilizó el número de células que se encontraron dentro de los islotes en las crías adultas del grupo C se encontraron  $3477.00 \pm 762.50$  células, para el grupo CA fue de  $1695.00 \pm 745.00$  células, 50% menos células comparado al grupo C. Mientras que, para el grupo R se encontraron  $1516.00 \pm 470.80$  células, también se observa una reducción del 50% de células comparado con el grupo C y para el grupo RA fue de  $1319.00 \pm 653.60$  células, la reducción de células fue mucho mayor en el grupo RA, comparado con el grupo CA, es decir fue mayor el efecto en la combinación de los dos factores, encontrando una diferencia significativa entre los grupos C vs CA, C vs R, CA vs RA, en las hembras a la semana 22 de edad. (Figura 9).

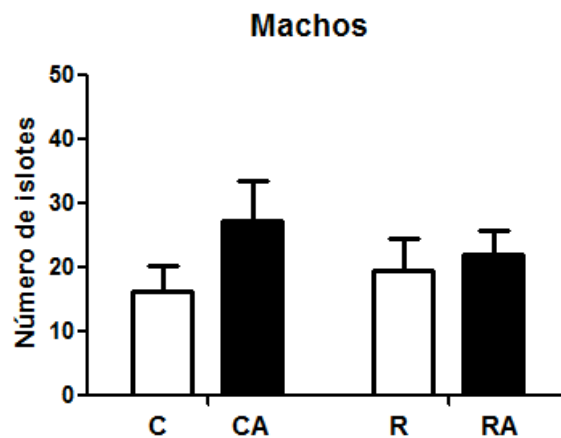


**Figura 9.** Número de células de los islotes de Langerhans en ratas hembras. Se muestra media±e.e. Se encontró diferencias significativas entre el grupo C vs R (  $\diamond\diamond\diamond p= 0.001$ ), C vs CA (  $\yen\yen p= 0.01$ ), CA vs RA (  $\Delta\Delta p=0.01$ ) ANOVA de dos vías, Bonferroni post hoc, n=6.

- **7.3 Resultados en machos**

- **7.3.1 Número de islotes de Langerhans**

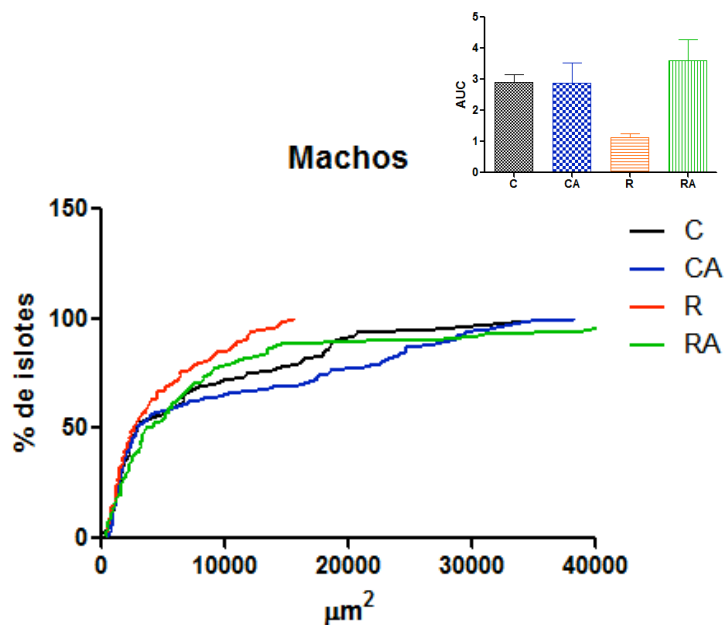
Cuando se contabilizó el número de células que se encontraron en los islotes en las crías adultas del grupo C, el número fue de  $16.50 \pm 4.13$  y en las crías adultas del grupo CA fue de  $28.5 \pm 6.19$  islotes. Mientras que, en las crías adultas del grupo R se contabilizaron  $19.50 \pm 5.07$  islotes y en las crías adultas RA el número de islotes fue de  $22.00 \pm 3.78$ . No se encontraron diferencias entre los grupos en los machos a la semana 22 de edad (Figura 10).



**Figura 10.** Número de islotes de Langerhans por campo en el páncreas por cada condición. Se muestra la media  $\pm$  e.e. No se encontró diferencia en el número de islotes entre los grupos. ANOVA de dos vías, Bonferroni post hoc. n=6.

- **7.3.2 Proporción de islotes**

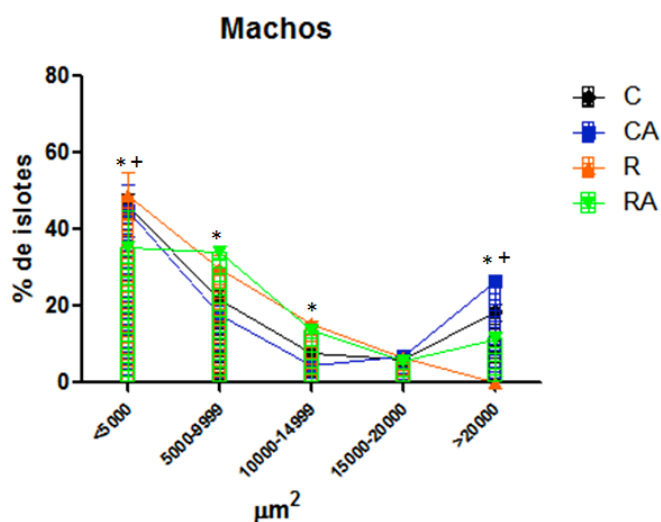
En la figura 6, se muestra el porcentaje de islotes, el índice de frecuencia acumulada y el área bajo la curva, no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales en la semana 22 de edad ( $p > 0.05$ ; Figura 11).



**Figura 11.** El área bajo la curva (AUC) se presenta como media  $\pm$  e.e. se analizó por medio de ANOVA de una vía, pos hoc Tukey no se muestran diferencias.

En los machos la proporción de islotes medianos aumentó en el grupo RA, mientras los islotes grandes disminuyeron en el grupo R, RA y CA. El efecto de ambos factores en el grupo RA fue significativamente diferente en comparación con el grupo CA. Así mismo, se muestra una diferencia significativa entre los grupos C y CA. Resultados similares se encontraron entre los grupos R vs RA. Es decir, se observa que la restricción proteínica gestacional y el consumo de agua azucarada en la semana 22 de edad afectó más el porcentaje de islotes ( $p < 0.05$ ; Figura 12).

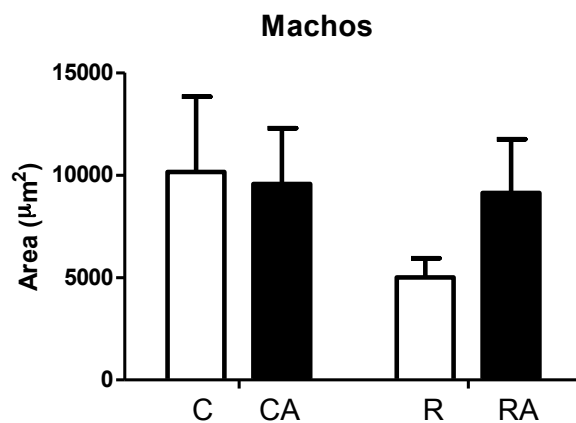




**Figura 12.** Se encontró diferencia mediante la ANOVA de dos vías,  $n=6$ ,  $*p<0.05$  C vs R, CA vs RA,  $+p<0.05$  C vs CA, R vs RA.

### • 7.3.3 Área de los islotes

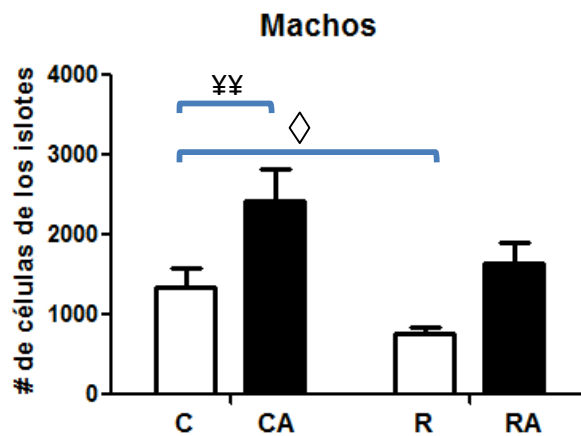
Con respecto al área de los islotes de acuerdo a su tamaño, en las crías adultas del grupo C fue de  $10157.98 \pm 3669.56$  y en el grupo CA fue de  $5011.01 \pm 932.59$ . En el grupo R fue de  $9570.89 \pm 2717.15$  mientras que en el grupo RA fue de  $9131.83 \pm 2619.44$ . No se encontraron diferencias entre grupos en machos a la semana 22 de edad. (Figura 13).



**Figura 13.** No se encontró diferencia mediante la ANOVA de dos vías,  $n=6$  ( $p>0.05$ ).

- **7.3.4 Número de núcleos dentro de los islotes de Langerhans**

Cuando se contabilizó el número de células que se encontraron dentro de los islotes en las crías adultas del grupo C, se encontraron  $1340.00 \pm 601.70$  células, para el grupo CA fue de  $2426.00 \pm 978.20$  células, se puede observar un aumento aproximadamente del 50% en el número de células dentro de los islotes en el grupo CA en comparación al grupo C. Por el contrario, en el grupo R se observa una disminución de células que se encuentran dentro de los islotes ( $763.50 \pm 204.40$ ) comparado con el grupo C. Para el grupo RA fue de  $1643.00 \pm 647.70$  células: Encontrando diferencias significativas entre los grupos C vs CA y C vs R, en los machos a la semana 22 de edad. (Figura 14).



**Figura 14.** Número de células de los islotes de Langerhans en ratas machos. Se muestra media±e.e. Se encontró una diferencia significativa entre los grupo C vs CA (¥¥  $p < 0.01$ ) y C vs R (◇  $p < 0.05$ ) ANOVA de dos vías, Bonferroni post hoc, n=6.

## 8. Discusión

Evidencia epidemiológica apoyan que la malnutrición intrauterina y el alto consumo de bebidas endulzadas, se relacionan con el crecimiento en la prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles (Barker y cols. **1986**, Assy y cols. **2008**, Deshmukh y cols. **2009**). La combinación de ambos factores podría estar relacionada con el incremento epidemiológico del sobrepeso y obesidad y sus consecuencias metabólicas.

Factores pre y/o posnatales, sobre todo relacionados con la alimentación, se han evaluado en modelos experimentales para conocer el impacto que tienen en el desarrollo de enfermedades metabólicas de la progenie. En el estudio de los orígenes fetales del desarrollo de la salud y la enfermedad se utilizan modelos de malnutrición, la restricción de proteínas en la dieta materna es una de ellas (Nathanielsz **2006**). La malnutrición proteínica se ha relacionado con la aparición de hipertensión, dislipidemias y resistencia a la insulina en la progenie adulta (Ozanne y Hales **2004**, Miñana-Solís y Escobar **2007**, Harrison y Langley-Evans **2009**).

El peso al nacimiento no presentó diferencias entre los grupos por la dieta materna, tal como lo reporta el grupo de Erhuma en el **2007**. Sin embargo, las crías adultas tanto hembras como machos presentaron un aumento en la distancia anogenital, estos datos son contrarios a lo reportado recientemente, en donde se muestra que la distancia anogenital disminuye en la cría adulta macho por la restricción de proteína durante la gestación (Pinho y cols. **2014**).

El consumo de agua azucarada en ratas adultas nacidas de madres con restricción proteínica gestacional mostró cambios histológicos en el páncreas en relación a la distribución de frecuencias de los islotes.

En el caso de las hembras el tamaño de la proporción de islotes pequeños aumentó en el grupo R, sin embargo, una disminución fue observada en el grupo RA. Los islotes grandes disminuyeron en el grupo R, mientras un aumento fue encontrado en el grupo RA. Por lo tanto, la restricción promueve el aumento de islotes pequeños y disminución de islotes grandes. También se encontró que el consumo de agua azucarada RA promueve el aumento de islotes grandes y la interacción de ambos factores promueve la disminución de islotes pequeños. En el número de islotes de Langerhans disminuyó mucho más en el grupo RA, así

como el número de células dentro de los islotes de Langerhans, aunque también se mostró una disminución en el CA y R.

En el caso de los machos la proporción de islotes medianos aumentó en el grupo RA y los islotes grandes disminuyeron en los grupos R, RA, y CA. La restricción de proteínas en la vida gestacional promueve la disminución de islotes grandes, el consumo de agua azucarada RA promueve el aumento de islotes grandes y la interacción de ambos factores promueve el aumento de islotes medianos y la disminución de islotes grandes. En el número de células de los islotes de Langerhans se encontró un aumento por el consumo de agua azucarada y una disminución por la restricción de proteínas. Estudios realizados en hamsters durante el inicio de edad adulta, observan que el consumo de sacarosa en un periodo de tiempo corto aumenta el número de islotes pancreáticos así como la tasa de replicación de células  $\beta$ , permitiendo la liberación adecuada de insulina y mejorando la sensibilidad a glucosa (Del Zotto y cols. **1999**). Lo que sugiere que el páncreas tiene la capacidad de proliferar en esta etapa temprana para mantener el equilibrio de la glucosa (Ninov y cols. **2013**). Cabe mencionar que la regulación de los islotes pancreáticos depende de diversos factores, como son: cambios en la conformación de células  $\alpha$  y  $\beta$ , el tamaño celular y la tasa de proliferación y apoptosis celular, entre otros, por lo tanto, el balance entre estos elementos determina si la proporción endocrina aumenta, se mantiene estable o disminuye (Inuwa y El Mardi **2005**). Esto nos sugiere que probablemente no encontramos muchos cambios a nivel histológico en el páncreas, debido a que la ingesta de sacarosa en cantidad pequeña, no fue suficiente para potenciar los efectos de la restricción de proteína materna, porque el páncreas aún tiene tiempo de completar la etapa de maduración, y entonces poder modificar a nivel molecular la transcripción de algunos genes como el PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox gene 1, Ngn3 (neurogenina 3), FoxO1, MafA, Pax4, entre otros, los cuales están involucrados en la síntesis de insulina y la formación de nuevos islotes pancreáticos (Kitamura y cols. **2002**; Okamoto y cols. **2006**; Zhou y cols. **2008**; Collombat y cols. **2009**; Aguayo-Mazzucato y cols. **2013**; Van de Casteele y cols. **2013**).

Diversos mecanismos podrían explicar los efectos de ambos factores, la síntesis de insulina, se inicia principalmente con la respuesta a altas concentraciones de glucosa

sanguínea interactuando con su receptor, por lo que se enciende la cascada de señalización que dependen de un orquestado número de interacciones proteicas. Si estas vías se ven afectadas en alguna ventana crítica de desarrollo, entonces tendrán repercusiones futuras, dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas), ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de efectos mitogénicos (Olivares y Arellano **2008**). Por lo que, un mayor o menor número de islotes pueden estar regulando la secreción, así como el número de células  $\beta$  pancreáticas. Además la regulación de la secreción de insulina implica eventos no solamente a nivel genético, sino que también intervienen eventos de conductancia iónica, segundos mensajeros y de tipo de metabólico (Morimoto **2000**). En apoyo a esto, se ha publicado que la restricción de proteínas durante la gestación en la rata modifica el área de los islotes pancreáticos y el contenido de la proteína fosfatidilinositol 3-kinasa, la cual está involucrada en el crecimiento y proliferación de las células  $\beta$  (Salvatierra y cols. **2015**). Es posible que estas modificaciones histológicas que observamos en el páncreas altere las vías de señalización entre la proteína kinasa dependiente del AMPc (PKA) y la proteína kinasa C dependiente de calcio PKC; Lippo y cols. **2015**. Es claro, que factores ambientales tempranos, influya en la función del páncreas, pero poco se ha estudiado como la predisposición en las crías puede ser modificada por varios factores posnatales. Entre ellos el consumo elevado de carbohidratos.

En resumen, la mala alimentación, como es el consumo de bebidas que contienen altas concentraciones de carbohidratos, puede favorecer que se “expresen” o se “acentúen” los efectos que se programan por condiciones adversas maternas durante la gestación, por ejemplo, por el consumo de una dieta baja en proteínas. Nosotros esperábamos que la interacción de ambos factores acentuara de forma concisa, potencializando los cambios morfológicas en el páncreas en los islotes de Langerhans en este modelo, se presentó una hiperinsulinemia como un método compensatorio para mantener los niveles glucémicos normales.

## **9. Conclusión**

Las modificaciones histológicas encontradas en los islotes de Langerhans en el páncreas por efecto de la dieta materna y por el agua azucarada sugieren la predisposición de desarrollar enfermedades crónicas degenerativas, la etapa gestacional y lactación son considerados periodos críticos del desarrollo. No fueron tan drásticos los resultados con la combinación de las dos dietas, lo que sugiere que esta glándula tiene la capacidad de modular su estructura ante un reto en la vida adulta. Más estudios son necesarios para evaluar el tejido pancreático.

## **10. Perspectivas**

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, proponemos realizar más estudios entorno a la restricción proteínica gestacional aunado a un reto en la vida adulta de la descendencia, debido a que tanto la restricción proteínica gestacional y el consumo de agua azucarada en la vida adulta de la progenie, no fueron tan drásticos como en otros protocolos, por ello, esperamos que en próximas investigaciones con otros enfoques metodológicos, por ejemplo de biología molecular, se analicen con más detalle el probable efecto sumatorio de ambos protocolos experimentales. Creemos necesario realizar algunas pruebas de inmunostquímica para evaluar daño oxidativo, así como otras pruebas para cuantificar la cantidad de insulina secretada de acuerdo al tamaño del islote pancreático.

## 11. Referencias

Abraham LK. **2008**. Histología y Biología celular. Editorial: *Elsevier Mosby*, 2da edición.

Attie A, Scherer P. **2009**. Adipocyte metabolism and obesity. *Journal Lipid Res* 59(supplement 1): S395-S399.

Aguayo-Mazzucato C, Zavacki A.M, Marinelarena A, Hollister-Lock J, El Khattabi I, Marsili A, Weir G.C, Sharma A, Larsen P.R, Bonner-Weir S. **2013**. Thyroid hormone promotes postnatal rat pancreatic  $\beta$ -cell development and glucose-responsive insulin secretion through MAFA. *Diabetes*. 62(5):1569-1580.

Alexander A, Hernández D, Lara B, Angulo G, Oliart R. **2004**. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor in rats with sucrose induced metabolic syndrome. *Journal of Nutritional Biochemistry* 15: 350-357.

Aranceta B, Pérez R. **2013**. Relación entre el consumo de sacarosa y cáncer: una revisión de la evidencia. *Nutrición Hospitalaria*. 28: 95-105.

Assy N, Nasser G, Kamayse I, Nseir W, Beniashvili Z, Djibre A, Grosovski M. **2008**. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 22:811-816.

Aydin S, Aksoy A, Kalayci M, Yilmaz M, Kuloglu T, Cital C, Catak Z. **2014**. Today's and yesterday's of pathophysiology: Biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Review Nutrition*. 30:1-9.

Bautista CJ, Boeck L, Larrea F, et al. **2008**. Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatr Res* 63, 358–363.

Barquera S, Campos-Nonato I, Rojas R, Rivera J. **2012**. Obesidad en México: epidemiología y políticas de salud para su control y prevención. *Gaceta médica de México*. 146:397-307.

Barker DJ. **1994**. Program in the baby. Mothers, babies, disease in late life. *London British Medical Journal Publishing Grup*. 14-36.

Barker DJ, Osmond C. **1986**. Infant mortality, childhood, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 10:1077-1081.

Barker DJ. **1993**. Program in the baby. Mothers, babies, disease in late life. *British Medical Journal*. 1:14-36.

Barker D, Eriksson J, Forsen T, Osmond C. **2002**. Fetal origins of adult disease: Strength of effects and biological basis. *International Journal Epidemiology*. 31:1235-1239.



Bray A, Nielsen J y Popkin M. **2004**. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *American Journal Clinical Nutrition* 4:537-543.

Bray GA. **2010**. Soft drink **consumption** and **obesity**: it is all about **fructose**. *Curr Opin Lipidol*. 21(1):51-7.

Becerra A. **1999**. Malnutrición fetal y enfermedad metabólica en la vida adulta. *Nutrition and Obesity* 5: 243-251.

Bocarsly M, Powell E, Avena N, Hoebel B. **2010**. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 97:101-106.

Bouwens L, Rooman I. **2005**. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiology Review* 85:1255-1270.

Bray G. **2010**. Soft drink consumption and obesity: it is all about fructose. *Current Opinion in Lipidologia* 1: 51-57.

Ceesay S, Prentice A, Cole T, Foord F, Weaver L, Postkitt E y Whitehead G. **1997**. Effects on birth weight and perinatal mortality of maternal dietary supplements in rural Gambia: 5 year randomized controlled trial. *British Medical Journal*. 315:786-790.

Cervantes-Rodríguez M, Martínez-Gómez M, Cuevas E, Nicolás L, Castelán F, Nathanielsz P W, Zambrano E, Rodríguez-Antolín J. **2014**. Sugared water consumption by adult offspring of mothers fed a protein-restricted diet during pregnancy results in increased offspring adiposity: the second hit effect. *British Journal of Nutrition*. 14:1-9.

Chamson-Reig A, Thyssen S, Hill D, Arany E. **2009**. Exposure of the pregnant rat to low protein diet causes impaired glucose homeostasis in the young adult offspring by different mechanisms in males and females. *Experimental Biology and Medicine*. 234:1425-1436.

Chamson-Reig A, Thyssen S, Arany E, Hill D. **2008**. Altered pancreatic morphology in the offspring of pregnant rats given reduced dietary protein is time and gender specific. *Journal of Endocrinology*. 191:83-92.

Collombat P, Hecksher-Sørensen J, Serup P, Mansouri A. **2006**. Review Specifying pancreatic endocrine cell fates. *Mechanisms of Development*. 123:501-512.

Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Krull J, Berger J, Riedel D, Herrera P.L, Serup P, Mansouri A. **2009**. Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon. *Journal of Clinical Invest*.117:961-970.

- D'Alessandro M, Chicco A, Karabatas L y Lombardo Y. **2000**. Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil. *Journal Nutrition Biology*. 11: 273-280.
- Del Zotto H, Massa L, Gómez DC, Gagliardino JJ, **1999**. Changes induced by Sucrose Administration upon the Morphology and Function of Pancreatic Islet in the Normal Hamster. *DiabetesMetab Res Rev*.15:106-112.
- Deshmukh P, O'Neil C, Nicklas T, Yang S, Liu Y, Gustat J, Berenson G. **2009**. Dietary patterns associated with metabolic syndrome, sociodemographic and lifestyle factors in young adults: the Bogalusa Heart Study. *Public Health Nutrition* 12:2493-2503.
- Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J, Zaret KS. **2001**. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development*. 128: 871–881.
- 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.
- Erhuma A, Salter M, Sculley V, Langley-Evans C, Bennett A. **2007**. Prenatal exposure to a low protein diet programmes disordered regulation of lipid metabolism in the ageing rat. *American Journal Physiologi, Endocrinol metabolic*. 292:1702-1714.
- Fernandez TD, Wayman A, Ekizoglou S, Martin M, Hales CN, Ozanne S. **2004**. Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin-signaling protein expression in 21-mo-old female rat offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(2): 368-373.
- Gao N, LeLay J, Vatamaniuk MZ, Rieck S, Friedman JR, Kaestner KH. **2008**. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes Dev*. 22: 3435–3448.
- Garofano A, Czernichow P, Breánt B. **1997**. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* 40:1231-1234.
- Geneser Finn. **2003**. Histología sobre bases biomoleculares. *Editorial: Médica Panamericana*, 3ra edición.
- Ghafoorunissa, Ibrahim A, Rajkumar L, Acharya V. **2005**. Dietary (n-3) long chain polyunsaturated fatty acids prevent sucrose induced insulin resistance in rats. *Journal of the Nutrition*. 135:2634-2638.
- Grantham-Mc Gregor S. **1995**. A Review of studies of the effect of severe malnutrition on mental development. *Journal of Nutrition*. 125:2233-2238.

- Godfrey K y Barker D. **2000**. Fetal nutrition and adult disease. *America Journal Clinical of the Nutrition* 71: 1344-1352.
- Godfrey M, Redman G, Barker J, Osmond C. **1991**. The effect of maternal anemia and iron deficiency on the ratio of fetal weight: placental weight. *British Journal of Obstet Gynecol* 98: 886-891.
- Gutmann A, Basilico Z, Bernal A, Chicco A y Lombardo B. **1987**. Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose-rich diet. *Metabolic* 36: 1013-1020.
- Harrison M, 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.
- Hebrok M, Kim SK, Melton DA. **1998**. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev.*; 12: 1705-1713.
- Henquin J. **2004**. Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. *Diabetes*. 53:48-58.
- Herman M, Kamari Y, Grossman E, Yeger 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.
- Inuwa I y El Mardi A. **2005**. Correlation between volume fraction and volume weighted mean volume, and between total number and total mass of islets in post-weaning and young Wistar rats. *Journal Anatamic*. 206:185–192.
- Jácome R. **2005**. Fisiología endocrina. *Academia Nacional de Medicina*. 3ra edición.
- Jiménez C, Gómez M, Bacardí M. **2013**. Estudios aleatorizados sobre el efecto del consumo de bebidas azucaradas sobre la adiposidad en menores de 16 años; revisión sistemática *Revisión.Nutrición Hospitalaria*. 28:1797-1801.
- Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, Kido Y, Biggs W.H, Wright C.V, White M.F, Arden K.C, Accili D. **2002**. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *The Journal Clinical Investigation*. 110:1839–1847.
- Kingdom C y Kaufmann P. **1997**. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* 18: 613-621.

- Koyama M, Wada R, Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi S. **1998**. Accelerated loss of islet  $\beta$  cells in sucrose-fed goto-kakizaki rats, a genetic model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *American Journal of Pathology*. 153:537-545.
- Langley- Evans S, Sculley D **2006**. The association between birth weight and longevity in the rat is complex and modulated by maternal protein intake during fetal life. *Febs Lett* 580(17): 4150-4153.
- Lippo BR, Batista TM, de Rezende LF, Cappelli AP, Camargo RL, Branco RC, Sampaio HC, Protzek AO, Wanderley MI, Arantes VC, Corat MA, Carneiro EM, Udrisar DP, Wanderley AG, Ferreira F. **2015**. Low-protein diet disrupts the crosstalk between the PKA and PKC signaling pathways in isolated pancreatic islets. *The Journal Nutritional Biochemistry*. 26(5):556-562.
- Lorenzo F, Moreno G, Leza J, Lizasoain H, Moro S, Portolés P. **2008**. Velázquez Farmacología básica y clínica. Editorial: Médica Panamericana, 18a edición.
- Mataix VJ. **2009**. Nutrición y alimentación humana. *Editorial: Ergón*. 2da edición.
- Mayhew M, Jackson R y Haas D. **1990**. Oxygen diffusive conductances of human placentae from term pregnancies at low and high altitudes. *Placenta* 11: 493-503.
- Miñana-Solis M, Escobar C. **2008**. Post-Weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term metabolic impairment, in contrast earlier and later periods. *International Journal of Biological*. 4:422-432.
- Miñana-Solís M, Escobar C. **2007**. Increased Susceptibility to Metabolic Alterations in Young Adult Females Exposed to Early Malnutrition. *Int Biol Sci* 3: 12-19.
- Morimoto S. **2000**. Mecanismos moleculares que intervienen en la regulación de la síntesis de insulina por glucosa. *Revista del Hospital General Dr. Manuel Gea González*. 3:118-120.
- Morimoto S, Morales A, Zambrano E, Fernandez-Mejia C. **2010**. Sex steroids effects on the endocrine pancreas. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 122:107-113.
- Morimoto S, Calzada L, Sosa T, Reyes Castro L, Rodríguez González G, Morales A, Nathanielsz P, Zambrano E. **2011**. Emergence of ageing-related changes in insulin secretion by pancreatic islets of male rat offspring of mothers fed a low-protein diet. *British Journal of Nutrition*. 107:562-565.
- Morimoto S, Sosa T, Calzada L, Reyes Castro L, Díaz D, Morales A, Nathanielsz P, Zambrano E. **2012**. Developmental programming of aging of isolated pancreatic islet glucosestimulated insulin secretion in female offspring of mothers fed lowprotein diets in pregnancy and/or lactation. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 3:483-488.

Moreno V y Dalmau S. **2001**. Alteraciones en la nutrición fetal y efectos a largo plazo: ¿algo más que una hipótesis? *Acta Pediatr Esp*. 59:573-581.

Nathanielsz P. **2006**. Animal model that elucidate basic principles of the developmental origins of adults diseases. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*. 47:73-82.

Nathanielsz P, Poston P, Taylor D. **2007**. In utero exposure to maternal obesity and diabetes: Animal models that identify and characterize implications for future health. *Clinics Perinatology*. 34:515-526.

Ninov N, Hesselson D, Gut P, Zhou A, Fidelin K, Stainier DY. **2013**. Metabolic regulation of cellular plasticity in the pancreas. *Curr Biol*. 23(13):1242-1250.

Okamoto H, Hribal ML, Lin HV, Bennett WR, Ward A, Accili D. **2006**. Role of the forkhead protein FoxO1 in beta cell compensation to insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*.. 116:775-782.

Olivares R, Arellano P. **2008** Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*. 27: 9-18.

Osorio J, Weisstaub G, Castillo C. **2002**. Desarrollo de la conducta alimentaria en la infancia y sus alteraciones. *Revista Chilena de Nutrición*. 29:1-8.

Ozanne E y Hales N. **2004**. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature*, 427: 411-412.

Pagliuca F y Melton DA. **2013**. How to make a functional  $\beta$ -cell. *Development* 140:2472-2483.

Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho C, Hoet J, Hill. **1999**. A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression. *Endocrinology*. 140:4861-4873.

Pinho CF, Ribeiro MA, Rinaldi JC, Felisbino SL, Pinheiro PF, Domeniconi RF, Fochi RA, Boer PA, Scarano WR. **2014**. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. *Reproduction, Fertility Development*.; 26(7):967-973.

Piper K, Brickwood S, Turnpenny LW, Cameron IT, Ball SG, Wilson DI, Hanley NA. **2004**. Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J Endocrinol*. 181:11-23.

Ravelli A, Van der Meulen J, Michels R, Osmond C, Barker D, Hales C y Bleker O. **1998**. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 352:173-177.

Rossi J, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. **2001**. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev.* 15: 1998–2009.

Ross H. Michael, Romrell J. Lynn, Kaye I. Gordon: **1997**. Histology: a text and atlas. Editorial: Médica Panamericana, 3ra edición.

Salvatierra CS, Reis SR, Pessoa AF, Souza LM, Stoppiglia LF, Veloso RV, Reis M A, Carneiro E M, Boschero AC, Colodel EM, Arantes VC, Latorraca MQ. **2015**. Short-term low-protein diet during pregnancy alters islet area and protein content of phosphatidylinositol 3-kinase pathway in rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 87(2):1007-1018.

Seckl J **1998**. Physiologic programming of the fetus. *Clinical Perinatology.* 25:939-962.

Sharma A, Fusco-De Mane D, Henderson E, Efrat S, Stein R. **1995**. The role of the insulin control element and RIPE 3b1 activators in glucose-stimulated transcription of the insulin gene. *Mol Endocrinol.* 9:1468-1476.

Smith N, Ozanne S. **2006**. Intrauterine origins of metabolic disease. *Review Gynaecol and Perinatal Practice.* 6:211-217.

Theys N, Bouckenooghe T, Marie-Therese A, Remacle C, Reusens B. **2009**. Maternal low protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 297:1516-1525.

Theys N, Marie-Therese A, Bouckenooghe T, Reusens B, Remacle C. **2010**. Maternal malnutrition programs pancreatic islet mitochondrial dysfunction in the adult offspring. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 22:985-994.

Tortora G y Reynolds G, **2000**. Principios de Anatomía y Fisiología. Editorial: Médica Panamericana. 9na Edición.

Van de Casteele M, Leuckx G, Baeyens L, Cai Y, Yuchi Y, Coppens V, De Groef S, Eriksson M, Svensson C, Ahlgren U, Ahnfelt-Ronne J, Madsen OD, Waisman A, Dor Y, Jensen J.N, Heimberg H. **2013**. Neurogenin 3<sup>+</sup> cells contribute to  $\beta$ -cell neogenesis and proliferation in injured adult mouse pancreas. *Cell Death Dis.* 4:e523.

Vickers M H. **2014**. La programación de desarrollo y la transmisión transgeneracional de la obesidad *Ann Nutr Metab.* 64:26–34

Wang J, Shen L, Najafi H, Kolberg J, Matschinsky F, Urdea M y German M. **1997**. Regulation of insulin pre ARN splicing by glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 94:4360-65.

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.

Wilson M R y Hughes S J. **1997**. The effect of maternal protein deficiency during pregnancy and lactation on glucose tolerance and pancreatic islet function in adult rat offspring. *J. Endocrinol.*, 154:177-180.

Zambrano E, Rodríguez G, Guzmán C, García R, Boeck L, Diaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz P. **2005**. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *Journal of Physiology* 563:275-284.

Zambrano E, Martínez-Samayoa PM, Bautista CJ, Deás M, Guillén L, Rodríguez-González GL, Guzmán C, Larrea F, Nathanielsz PW 2005. Sex differences in transgenerational alterations of **growth** and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of **rats** fed a **low protein diet** during **pregnancy** and **lactation**. *J Physiol*. 1;566:225-236.

Zambrano E, Bautista J, Deas M, Martínez-Samayoa P, González M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz P. **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.

Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. **2008**. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 455:627–632.

Zúñiga A, Meléndez G, Pasquetti A. **2003**. Requerimientos y recomendaciones proteicas, referencias internacionales y mexicanas. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 11:73-79.