



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del consumo de sacarosa a temprana edad sobre
la concentración de insulina y la histología del
páncreas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Cristhian Neftaly Sánchez Solís

Director

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre, 2014.



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del consumo de sacarosa a temprana edad sobre
la concentración de insulina y la histología del
páncreas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Cristhian Neftaly Sánchez Solís

Director

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Comité tutorial

Dra. Estela Cuevas Romero

Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre, 2014.

Está investigación fue realizada bajo la dirección de la Dra. Leticia Nicolás Toledo en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue financiado por beca CONACyT (487305-SSCN) y beca de movilidad ECOES.



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 **Cristhian Neftaly Sánchez Solís** 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 **“Efecto del consumo de sacarosa a temprana edad sobre la concentración de insulina y la histología del páncreas”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 26 DE 2014



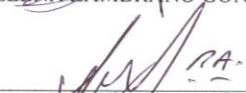
DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ



DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO



DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN



DRA. LIDYA SUMIKO MORIMOTO



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
Tlaxcala, Tlax.

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por el amplio programa que ofrece a los aspirantes y por el apoyo del mismo para la realización del proyecto aquí presentado.

A la beca CONACyT (487305-SSCN) y beca de movilidad ECOES, por haber financiado gran parte de mis estudios de posgrado.

Se contó con la tutoría de la Dra. Estela Cuevas Romero y Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez a las cuales agradezco su importante aporte y participación activa en el desarrollo de la presente tesis.

Agradecimientos

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a la directora de este proyecto la Dra. Leticia Nicolás Toledo, así como a mi comité tutorial, el cual estuvo conformado por la Dra. Estela Cuevas Romero y Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez; por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica, por su tiempo, paciencia y por permitirme trabajar en un marco de confianza y libertad fundamentales para la realización de este trabajo y para mi formación académica y personal.

Quiero agradecer de todo corazón...

A Dios, por permitirme llegar este momento tan especial en mi vida y haberme puesto en mi camino, en estos años de estudio, a las personas indicadas y estar en cada paso que doy.

A la familia Sánchez Solís, Sampedro Padilla y Marín Rojas, por su apoyarme incondicionalmente en momentos difíciles durante estos años, por sus consejos, comprensión, y ayudarme a que este momento pueda hacerse realidad.

Hay una gran cantidad de personas que han contribuido directamente e indirectamente, que sin querer y tal vez sin imaginármelo han ayudado de una u otra forma en este trabajo importante de mi vida personal, profesional y sentimental: Gamaliel Contreras, Mario Cruz, Maribel Huerta, Ma. De los Ángeles Carrasco, Verónica García, Adrián Lara, Octavio Sánchez, Esther Pérez, Julia de Guadalupe Rodríguez, Omar Oscar Escobar, Martín Eduardo Aguilar, muchas gracias por estar conmigo en todo este tiempo donde he vivido momentos felices y tristes, gracias por ser mis amigos y recuerden que siempre los llevaré en mi corazón.

A mis compañeras del laboratorio de inmunocistoquímica y endocrinología del CTBC, UAT, así como a mis compañeras del laboratorio del Departamento de Biología de la Reproducción, laboratorio II del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por toda la paciencia y su valioso tiempo, conocimientos que me sirvieron de gran ayuda para la elaboración de este proyecto importante para mí.

RESUMEN

El consumo elevado de carbohidratos en la dieta, se ha correlacionado con la presencia de obesidad infantil en los humanos, predisponiendo con ello a padecer trastornos metabólicos. En el páncreas de la rata, la etapa posdestete representa un periodo crítico en su ontogenia, debido a que aún está en desarrollo. Lo que hace que sea un órgano susceptible a modificarse por la dieta, afectado su función y organización histológica. Este estudio se realizó para evaluar las concentraciones de glucosa e insulina y cambios en la organización histológica de la rata macho, en un modelo de consumo de sacarosa al 30% posterior al destete. Se utilizaron ratas machos Wistar de 21 días de edad. Se les proporcionó agua con sacarosa al 30%: el grupo experimental 1 consumió agua con sacarosa durante un mes, el grupo experimental 2 consumió agua con sacarosa durante dos meses, cada uno con sus animales control (n=6). Se registró diariamente el peso corporal, consumo de alimento y agua. Al sacrificio se obtuvo la sangre para la medición de concentraciones de glucosa e insulina. Se extrajo el páncreas, se pesó y fue seccionado en cabeza, cuerpo y cola. La porción de la cola del páncreas fue fijado en Bouin, deshidratado en alcoholes de forma ascendente, aclarado en xilol e incluido en Paraplast. Unos cortes histológicos de 7µm fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina y en otros se realizó la inmunohistoquímica para la detección de células beta. Los resultados fueron analizados con *t*-Student, prueba de *U* Mann-Whitney e histograma prueba de Fisher's. Encontramos que las concentraciones de glucosa e insulina y el peso del páncreas fueron similares en ambos grupos experimentales comparados cada uno con su grupo control. En los cortes histológicos de los animales azucarados del grupo experimental 1 se encontró un aumento en el número de células dentro de los islotes chicos, mientras que en el número de células dentro de islotes medianos y grandes, así como en el porcentaje de células beta fueron similares entre grupos. Con respecto a los cortes histológicos del grupo experimental 2, encontramos que el número de células dentro de los islotes chicos, medianos y grandes fueron similares entre grupos, así como el porcentaje de células beta dentro de los islotes de Langerhans. Los resultados muestran que el consumo de sacarosa durante un mes posterior al destete tiene la capacidad de modificar la estructura de los islotes chicos, probablemente para mantener la función adecuada ante una malnutrición.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	12
1.1.1	Desarrollo del páncreas	16
1.1.2	Insulina.....	19
1.1.3	Biosíntesis de insulina.....	20
1.1.4	Regulación de la síntesis de insulina.....	20
2	ANTECEDENTES.....	23
2.1	Modelos animales.....	23
2.1.1	Dietas ricas en carbohidratos.....	23
3	JUSTIFICACIÓN.....	27
4	HIPÓTESIS.....	28
5	OBJETIVOS	28
5.1	Objetivo general	28
5.2	Objetivos específicos.....	28
6	MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
6.1	Manejo de los animales	29
6.2	Diseño experimental.....	29
6.3	Protocolo de la dieta.....	30
6.4	Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas por el agua.....	30
6.5	Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas en el alimento	31
6.6	Obtención de muestras sanguíneas y páncreas.....	31
6.7	Análisis histológico del páncreas	31
6.8	Inmunohistoquímica para la detección de células β	34
6.9	Análisis estadístico.....	36

7	RESULTADOS	37
7.1	GRUPO EXPERIMENTAL 1	37
7.1.1	Peso corporal, ingesta de alimento, agua y calorías totales.....	37
7.2	Parámetros bioquímicos	38
7.2.1	Glucosa e insulina	38
7.3	Peso de tejido adiposo	38
7.4	Peso y características histológicas del páncreas.....	39
7.4.1	Peso del páncreas	39
7.4.2	Histología del páncreas	40
7.4.3	Área de los islotes	42
7.4.4	Número de células dentro de los islotes	42
7.4.5	Células β	43
7.5	GRUPO EXPERIMENTAL 2.....	45
7.5.1	Peso corporal, ingesta de alimento, agua y calorías totales.....	45
7.6	Parámetros bioquímicos	46
7.6.1	Glucosa.....	46
7.7	Peso de tejido adiposo	46
7.8	Peso y características histológicas del páncreas.....	48
7.8.1	Peso del páncreas	48
7.8.2	Histología del páncreas	48
7.8.3	Área de los islotes	50
7.8.4	Número de células dentro de los islotes	50
7.8.5	Células β	51
8	DISCUSIÓN	53

9	CONCLUSIONES	58
10	PERSPECTIVAS	59
11	REFERENCIAS	60
12	GLOSARIO.....	70
13	ANEXOS.....	71
13.1	Deshidratación del tejido pancreático	71
13.2	Tinción de hematoxilina-eosina	72

1 INTRODUCCIÓN

La alimentación refleja la interacción dinámica entre el estado fisiológico de un organismo y sus condiciones ambientales. Cuando fallan los sistemas endógenos de control, se pueden generar trastornos metabólicos (Mataix 2009). Los trastornos metabólicos resultan de la combinación de varios factores ambientales, genéticos y sociales; influenciados por el consumo de comida en exceso y la reducción en el gasto de energía (London y cols. 2007; Ando y Fujita 2009; Nseir y cols. 2010). En particular el consumo elevado de carbohidratos en la dieta, se ha mostrado que provoca un aumento de tejido adiposo (Vizmanos y cols. 2006) y la manifestación de alteraciones metabólicas (diabetes tipo II, hipertensión, metabolismo anormal de lípidos y carbohidratos, enfermedad cardiovascular) (Jiménez-Cruz y cols. 2009).

En seres humanos, estudios epidemiológicos correlacionan la presencia de obesidad infantil con el consumo elevado de azúcares refinados (sacarosa y fructosa) y grasas a edades tempranas que conllevan a diversas alteraciones relacionadas con la presencia de síndrome metabólico (Rojas y cols. 2008). Lo que indica que el consumo regular de bebidas endulzadas con azúcar, especialmente entre las comidas, pueden poner a los niños en mayor riesgo de obesidad en la infancia, debido a que existe una asociación positiva entre el consumo de bebidas endulzadas con azúcar y el peso corporal entre los niños en edad preescolar (Dubois y cols. 2007).

En México existen dos características importantes relacionadas con la ingesta de bebidas calóricas, en primer lugar el consumo de refrescos o bebidas ricas en azúcares refinados ha incrementado, reportándose en algunos casos el consumo promedio de cuatro a cinco refrescos al día en niños y adultos (Ponce y cols. 2010). En segundo lugar, los principales tipos de bebidas que contribuye con el mayor aporte energético son: refrescos, bebidas y jugos elaborados y leche entera (Barquera y Tovar-Guzman 2003). Algunos trabajos reportan que México se ha convertido en el mayor consumidor de refrescos en el mundo, rebasando a los Estados Unidos con un consumo mayor a los 163 litros por persona al año (Deichert y cols. 2006; Euromonitor I 2011; Chaloupka y cols. 2011).

De tal manera que, los nutrientes de la dieta tienen una gran influencia sobre parámetros metabólicos (intolerancia a la glucosa, niveles bajos de HDL, niveles altos de triglicéridos y colesterol, aumento de la presión arterial) y hormonales (aumento en los niveles de insulina y leptina) (El Hafidi y cols. 1997, 2000, 2001, 2004, 2006; Alexander y cols. 2004; Pérez-Torres y cols. 2009).

La dieta alta en carbohidratos afecta a diferentes órganos y glándulas, por ejemplo, en ratas Sprague-Dawley adultas alimentadas con fructosa al 60%, se ha reportado un aumento en el tamaño de los riñones, además existe la presencia de esclerosis glomerular, atrofia y dilatación tubular, e infiltración celular (Rahmoune y cols. 2005). Un trabajo reciente, realizado en la rata macho Sprague-Dawley ha reportado que el consumo de agua con fructosa al 20% después del destete durante 8 semanas ocasiona un aumento de la presión arterial sistólica, hiperinsulinemia y un aumento en la vasoconstricción renal (Mohammed y cols. 2010). El hígado también es afectado cuando las ratas Wistar, consumen agua azucarada al 5% en edad adulta y 30% a temprana edad, durante tres meses, presentado esteatosis hepática y niveles altos de triglicéridos sanguíneos (Pérez-Sánchez 2011; Corona-Pérez 2013). En nuestro laboratorio se ha mostrado en la rata macho Wistar que el consumo de sacarosa al 30% desde temprana edad, durante tres meses, provoca una disminución en el grosor y número de las células de la zona fascicular y un aumento en el grosor de la zona reticular de la corteza y fibrosis en la médula de la glándula adrenal, además de un aumento en la cantidad de tejido adiposo (Díaz-Aguila 2012).

Con respecto al páncreas endocrino durante el periodo de lactancia se ha mostrado que presenta modificaciones estructurales que modulan su capacidad para sintetizar insulina (Kaung 1994). En este mismo contexto, en la etapa de lactancia se ha detectado un aumento en los niveles glucosa e insulina, esta condición fue asociada con un incremento en las células β y alfa pancreáticas. Sin embargo, en el día 28 de edad observan una disminución de glucosa e insulina (Aguayo-Mazzucato y cols. 2006). Estudios en ratas han correlacionado el consumo elevado de carbohidratos con las concentraciones de insulina, los cuales evidencian la modificación estructural y funcional del páncreas durante el periodo de lactancia (Kaung 1994), por lo que parece estar relacionado a la edad y la dieta, lo que sugiere que este periodo puede ser crítico para determinar la fisiología de este órgano en edad adulta (Aguayo-Mazzucato y cols. 2006).

Aportaciones recientes a este respecto, dirigen el estudio a analizar la proliferación y diferenciación celular. Debido a que se ha visto, que el aumento en la ingesta de nutrientes, provoca un aumento en el número de células β , así como su proliferación y/o diferenciación a partir de células progenitoras de conductos pancreáticos (Ninov y cols. 2013).

1.1 PÁNCREAS

El páncreas es una glándula retroperitoneal, situada 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; este conducto 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).

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, las células que lo constituyen están dispuestas 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 agregados celulares 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 α , células β , células δ 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 α (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 β (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 δ (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).

1.1.1 Desarrollo del páncreas

El páncreas se desarrolla a partir evaginaciones del epitelio intestinal, ambos linajes celulares (exocrino y endocrino) se diferencian de precursores epiteliales comunes. En roedores, esto es perceptible, morfológicamente en el día embrionario 8.5-9, estimulando la formación de brotes pancreáticos: dorsal y ventral (figura 1).

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- β . 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. Varios factores se expresan en diferentes ventanas de desarrollo durante el proceso de diferenciación, realizando más de una función.

PDX-1 es un factor de transcripción clave de desarrollo del páncreas y la diferenciación de células β . Las células que expresan PDX-1 entre el día 9.5 y 11.5 dan lugar a los conductos pancreáticos, células acinares e islotes de Langerhans. Más tarde en el desarrollo, así como en el páncreas adulto, PDX-1 es un factor de regulación para la expresión transcripcional de varios genes incluyendo los genes de insulina y la somatostatina (Habener y cols. 2005; Murtaugh y cols. 2007).

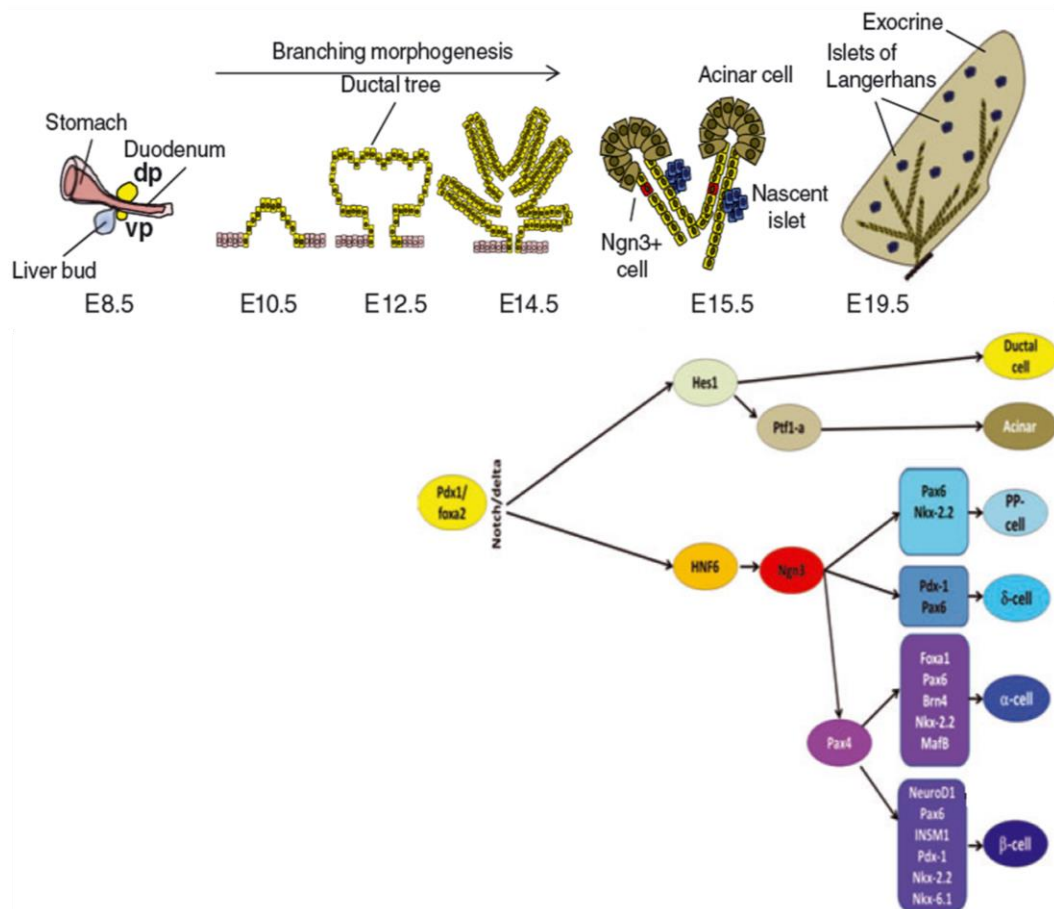


Figura 1. Organogénesis del páncreas en roedores. **Arriba.** La fase primaria de la organogénesis del páncreas es la gemación de la región del intestino medio anterior del endodermo. Entre el día embrionario 8.5 y 9 (E8.5 y 9) regiones específicas comienzan a evaginarse para formar el brote ventral (vp) y brote dorsal (dp). Por el día embrionario 10.5 (E10.5), el epitelio parcialmente diferenciado se ramifica y se expande formando el sistema

ductual. En el día embrionario 15.5 (E15.5) inicia la neogénesis de células acinares, así como su expansión. En el día embrionario 16 (E16), las células endocrinas comienzan a organizarse y formar islotes. Por el día embrionario 19.5 (E19.5), el páncreas está casi completamente desarrollado, contiene los diferentes tipos de células endocrinas organizadas en islotes. **Abajo.** La especificación exocrina-endocrina está controlada por el sistema de señalización de Notch/Hes. La supresión de Ngn3 determina el destino ductual y acinar. La diferenciación de células endocrinas se basa en la expresión sucesiva de distintos factores de transcripción, algunos se muestran en la figura. (Modificado de Dumortier y Van Obberghen 2012).

La especificación de las células endocrinas durante el desarrollo del endodermo pancreático es dependiente de la señalización apropiada de Notch y la expresión del factor de transcripción pro-endocrina de neurogenina 3 (Ngn3). En el desarrollo del páncreas, el factor de transcripción hepático nuclear 6 (HNF6) activa directamente el factor de transcripción pro-endocrino de Ngn3, mientras Hes1 inhibe su transcripción (Jacquemin y cols. 2000, Pierreux y cols. 2006). HNF6 y Ngn3, ambos, son esenciales para la diferenciación endocrina y HNF6 también es necesario para el desarrollo embrionario del conducto (Jacquemin y cols. 2000; Pierreux y cols. 2006; Zhang y cols. 2009).

En ratones, las células que expresan Ngn3 son detectadas durante el desarrollo del epitelio pancreático alrededor del día 9.5, su mayor expresión es durante el día 15.5, lo cual se relaciona con mayor génesis de células endocrinas que dan lugar a los cinco tipos celulares, reduciendo su expresión al nacimiento y durante el páncreas adulto (Gradwohl y cols. 2000; Gu y cols. 2002). Concomitante a esto, un nuevo grupo de genes se activan. Además de NeuroD1/Beta2 y factor de transcripción asociado a insulinoma-1 (INSM1), que son blancos directos de Ngn3 (Mellitzer y cols. 2006), PDX-1, junto con Pax-4, Nkx-2.2, Nkx-6.1 y Pax-6, representan un componente, que regula la expresión de los genes expresados en las células β durante el desarrollo (Cerf 2006).

1.1.2 Insulina

Una vez que la insulina es sintetizada y secretada al torrente circulatorio, se distribuye a los diferentes tejidos diana. A nivel hepático, la insulina favorece la utilización de glucosa, estimulando la glucólisis y reduciendo la gluconeogénesis, lo que determina una disminución en la producción hepática de glucosa. Así mismo, estimula la síntesis de proteínas y lípidos e inhibe la formación de cuerpos cetónicos. En el tejido adiposo, estimula la captación y utilización de glucosa por el adipocito. Estimula la lipoproteína lipasa, inhibe la lipólisis y

aumenta la síntesis de triglicéridos, favoreciendo la acumulación de grasa en los adipocitos (Jácome 2005). La regulación de glucemia se encuentra principalmente bajo control hormonal, siendo la insulina y el glucagón las principales hormonas responsables; aunque la adrenalina, los glucocorticoides, la hormona de crecimiento y las hormonas tiroideas afectan también al metabolismo de los glúcidos (Martín 2006).

1.1.3 Biosíntesis de insulina

Las células β 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 β 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 ruptura de la cadena B, aunque también puede romper la unión del péptido C a la cadena A (Abraham 2008).

1.1.4 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 β pancreáticas regulado por los factores de transcripción Pax 6 y Pax 4. El principal estímulo que desencadena la secreción de insulina es la glucosa (figura 2), sin embargo, otros nutrientes, como aminoácidos, ácidos grasos y cuerpos cetónicos, también 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. La glucosa es captada mediante las proteínas transportadoras de glucosa independiente de insulina (GLUT 2) (Lorenzo y cols. 2008; Jácome 2005), que permite la entrada rápida de glucosa. En el interior de la célula β , la glucosa se fosforila a glucosa 6 fosfato mediante la enzima glucoquinasa y hexoquinasa, 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 lo que provoca que los gránulos de insulina se unan a la pared de la membrana de la célula β para su secreción, lo que se conoce como excitocitosis (Henquin 2004) (figura 2).

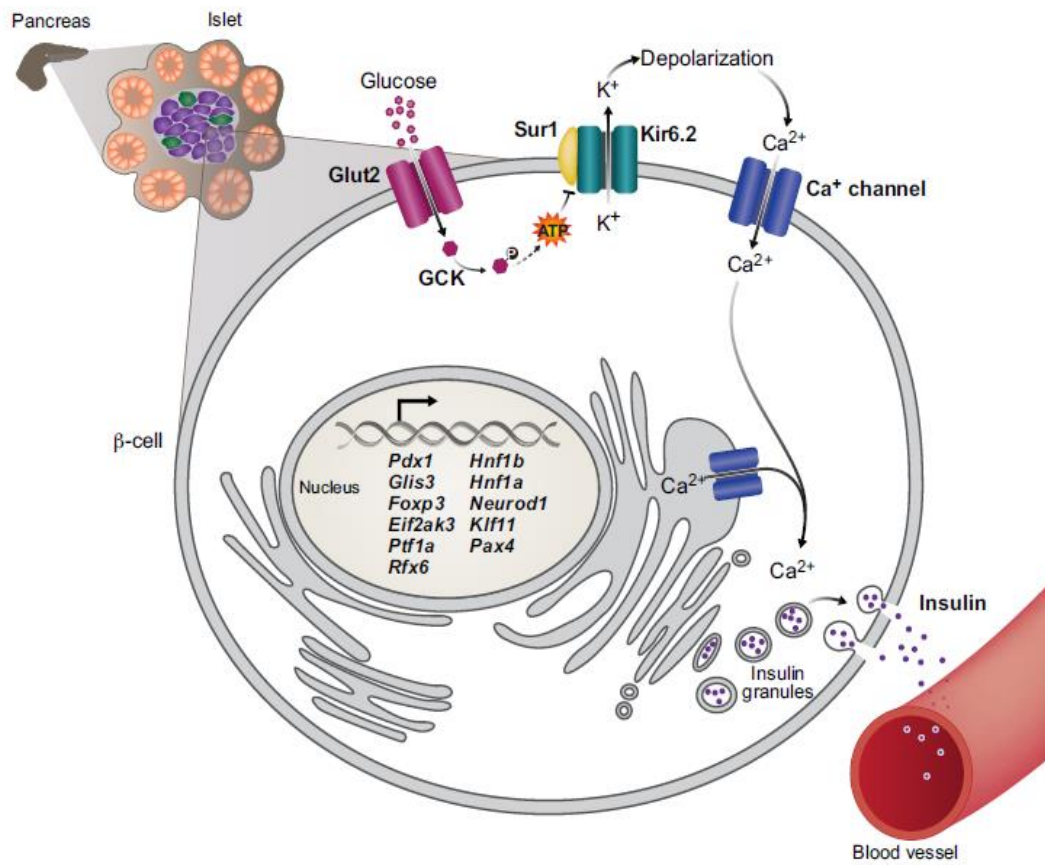


Figura 2. Las células β responden a los crecientes niveles de glucosa a través del aumento en la secreción de insulina (Tomado de Pagliuca y Melton 2013).

2 ANTECEDENTES

Estudios epidemiológicos en humanos y en modelos animales indican que tanto la cantidad como la calidad de la nutrición durante los periodos críticos del desarrollo temprano (fetal y neonatal) tienen consecuencias de por vida, sufriendo adaptaciones desde edad temprana hasta la edad adulta (Lucas 1998). Estas respuestas adaptativas se producen a nivel celular, bioquímico y molecular (Waterland y Garza 1999). Durante el periodo prenatal y postnatal, la ontogenia de los islotes pancreáticos constituyen un periodo de vulnerabilidad ante un estímulo nutricional (Bramblett y cols. 2000).

2.1 Modelos animales

2.1.1 Dietas ricas en carbohidratos

El desarrollo posnatal temprano de los órganos es un periodo crítico de importancia, ya que, pueden presentar cambios estructurales y funcionales cuando está expuesto a ciertos cambios ambientales, como son los nutricionales, ya que estos pueden tener consecuencias durante el transcurso de la vida (Lucas 1998). A este respecto, Aguayo-Mazzucato y cols. (2006) observaron que el desarrollo normal del páncreas de la rata, durante la lactancia, representa un periodo crítico importante. Ellos utilizaron crías machos Wistar alimentados por sus madres durante la lactancia y observaron un estado fisiológico caracterizado por hiperglucemia e hiperinsulinemia, esta condición que se asoció con un aumento en el número de células β , falta de respuesta a altas concentraciones de glucosa, así como un aumento en el número de células α .

Otro estudio en donde utilizaron crías de rata Sprague-Dawley con crianza artificial, con una fórmula láctea que contenía 56% de carbohidratos desde el día 4 de edad hasta el día 12 de edad, mostraron un aumento de insulina y glucagon, así como en la actividad enzimática de glucoquinasa, hexoquinasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa comparado con las crías amamantadas por sus madres. Estas observaciones sugieren que una modificación en la dieta, durante el periodo de lactancia, tiene una influencia sobre la función pancreática en estas crías, teniendo consecuencias en la edad adulta (Aalinkeel y cols. 1999; 2001). Otro grupo de investigadores utilizando este mismo

modelo, observaron en el día 12 de edad, hiperinsulinemia, aumento en la actividad hexoquinasa, niveles plasmáticos de péptido similar al glucagon-1 (GLP-1) y de su propio receptor, aumento en los niveles de ARNm de adenilato ciclasa tipo VI, así como en la actividad de las proteínas quinasas A y C; y de calmodulina quinasa tipo II, también observaron cambios significativos en el tamaño y el número de los islotes pancreáticos, teniendo en cuenta que los niveles de ARNm de PDX-1 aumentaron. Lo que sugiere que éstas adaptaciones moleculares, a edad temprana, pueden alterar la estructura a nivel celular y modificar la capacidad secretora de insulina en los islotes de los animales tratados (Srinivasan y cols. 2001; 2003).

Vadlamudi y cols. (1993), trabajaron con crías macho Sprague Dawley que fueron alimentados con una fórmula alta en sacarosa (56%) y alta en grasa (68%) durante el periodo de lactancia, posteriormente fueron destetados y alimentados con una dieta estándar durante los siguientes cien días. Ellos observaron que en las ratas alimentadas con sacarosa, aumenta la concentración de insulina en plasma y el contenido de insulina en los islotes comparado con los grupos control y los que consumieron una dieta alta en grasa. Además, se asoció con la presencia de hipertrofia en las células β del páncreas y al desarrollo de obesidad en la vida adulta, esto se corroboró debido a que en el día 54 el grupo experimental empezó a aumentar su peso corporal comparado con el grupo control.

Ferreira y cols. (2010), han demostrado que la hiperglucemia y la resistencia a la insulina que desarrollan las ratas alimentadas con una dieta alta en carbohidratos dependen tanto de la cantidad como del tiempo en que se consume la dieta. Ellos trabajaron con ratas macho Wistar de dos meses de edad, los cuales fueron alimentados con una dieta alta en sacarosa al 62.5% durante un periodo de 3 y 30 semanas. Encontrando a las 3 semanas concentraciones normales de glucosa, hiperinsulinemia y aumento en la expresión de la enzima glucoquinasa, sin cambios en la actividad de glucoquinasa y hexoquinasa, dado que las concentraciones de glucosa son normales. A las 30 semanas se observa una disminución tanto en la actividad como en la expresión de glucoquinasa acompañada con alteraciones en la oxidación de la glucosa; un aumento en los niveles de ácidos grasos libres y la expresión de proteínas UCP2 dentro de la célula beta, así como la acumulación de triglicéridos.

Sugiriendo que la administración de dietas altas en sacarosa altera la secreción de insulina a través de diferentes mecanismos dependiendo del tiempo de consumo de la dieta. En una fase temprana, aumenta la expresión de glucoquinasa y ácidos grasos, los cuales inducen la expresión de PPAR γ ; mientras que, en una fase avanzada, la glucolipototoxicidad parece ser el mecanismo celular que contribuye a la disfunción progresiva de las células β .

En rata macho Wistar de 3 meses de edad, alimentadas con una dieta alta en sacarosa (63%) durante 30 semanas, se observó un aumento en la ganancia de peso corporal, hipertrigliceridemia, hiperglucemia, las concentraciones de insulina se mantuvieron sin cambios y fue incapaz de compensar el aumento de las demandas de los cambios metabólicos. Histológicamente, mostraron un aumento en el número de islotes pancreáticos por unidad de área y área de las células β , debido a que estas presentaban hipertrofia, también mostraron que la tasa de replicación en las células β aumentó 6.8 veces comparado con el grupo control, por lo cual, el número de células apoptóticas eran escasas en el tejido endocrino (Lombardo y cols. 1996; Del Zotto y cols. 2002). En este mismo contexto, Del Zotto y cols. (2004), administro una dieta alta en sacarosa (63%) a ratas machos Wistar de 3 meses de edad durante un periodo de 6 y 12 semanas, mostraron que el grupo que consumió sacarosa durante 6 semanas presentó un aumento en el peso corporal, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, normoinsulinemia. El número de islotes por unidad de área aumentó, así como la tasa de replicación de las células β , las cuales se encontraban hipertrofiadas. Por otro lado, el número de células apoptóticas fue tres veces menor comparado con el grupo control, mientras que el grupo que consumió sacarosa durante 12 semanas, mostró una disminución en el número de islotes y células β , por lo cual, la tasa de proliferación se vio afectada, mientras que la tasa de apoptosis incrementó, sugiriendo que el consumo de sacarosa durante un periodo largo, produce que las ratas sean incapaces de desarrollar cambios morfológicos y funcionales suficientes para mantener los niveles de glucosa y triglicéridos normales.

En el hamsters al destete, el consumo de sacarosa al 10% durante 5 y 21 semanas, produce un aumento en la concentración de insulina en plasma y el contenido de insulina en los islotes en ambos grupos; sin embargo, a nivel morfológico sólo existen diferencias significativas en el grupo de 5 semanas en comparación al grupo de 21 semanas, presentando

mayor número de islotes y células β , también se observó que la tasa de proliferación de las células β fue 10 veces más alto en el grupo experimental de 5 semanas que en el control, los niveles de glucosa no mostraron diferencias significativas entre grupos (Del Zotto y cols. 1999; Massa y cols. 2001).

El consumo de dietas ricas en carbohidratos al destete se ha relacionado con la prevalencia de trastornos metabólicos en animales de experimentación. Varios estudios realizados en la rata macho Wistar, han reportado que el consumo de agua azucarada al 30% después del destete durante 18-21 semanas ocasiona aumento de tejido adiposo visceral, hipertensión, intolerancia a la glucosa, dislipidemia (combinación de bajas concentraciones de colesterol de alta densidad con altas concentraciones de triglicéridos y colesterol) (El Hafidi y cols. 2001; Alexander y cols. 2004; Pérez-Torres y cols. 2009), aumento en los niveles de insulina, triglicéridos y presión arterial (El Hafidi y cols. 1997; 2000; 2004; 2006). Otro estudio realizado en la rata Sprague Dawley de 12 semanas de edad, que fueron alimentadas con sacarosa durante siete semanas presentaron modificaciones en la presión arterial, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Oron-Herman y cols. 2008).

3 JUSTIFICACIÓN

Estudios epidemiológicos correlacionan la presencia de obesidad infantil con el consumo elevado de azúcares refinados (sacarosa y fructosa) y grasas a edades tempranas. Conforme transcurre el tiempo, estos excesos llevan a la aparición de diversas alteraciones metabólicas (Rojas y cols. 2008). Estas alteraciones se ven influenciadas por factores como la cantidad de nutrientes en la dieta, la duración de la exposición a la dieta y el estilo de vida (actividad física).

Estudios en ratas han correlacionado el consumo elevado de carbohidratos con las concentraciones de insulina, los cuales evidencian la modificación estructural y funcional del páncreas durante el periodo de lactancia (Kaung 1994). Además en la rata, la etapa posdestete representa un periodo crítico en la ontogenia del páncreas porque aún está en desarrollo. Lo que hace que sea un órgano susceptible a modificarse por la dieta, afectando su función y organización histológica (Bramblett y cols. 2000).

Cabe resaltar, que la disponibilidad de nutrientes en exceso, estimula la proliferación de células β y/o diferenciación a partir de células progenitoras de conductos pancreáticos (Ninov y cols. 2013). Sin embargo, aún no se han realizado trabajos en donde se evalúen los cambios histológicos y fisiológicos del páncreas, ante el cambio de una dieta alta en grasa proveniente de la leche materna a una dieta alta en carbohidratos posterior al destete durante los dos primeros meses.

4 HIPÓTESIS

El consumo elevado de sacarosa al destete aumenta las concentraciones de glucosa e insulina y provoca alteraciones histológicas del páncreas de la rata macho

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar sí el consumo elevado de sacarosa al destete aumenta las concentraciones de glucosa e insulina y provoca alteraciones histológicas del páncreas de la rata macho

5.2 Objetivos específicos

- Determinar las concentraciones de glucosa e insulina
- Determinar el área de los islotes pancreáticos
- Determinar el número de células dentro de los islotes
- Determinar el porcentaje de células secretoras de insulina

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Manejo de los animales

Se utilizaron 24 ratas machos de la cepa Wistar de 21 días de edad. Al día del destete se tomaron las ratas machos procedentes de madres diferentes. Las ratas se colocaron en jaulas independientes mantenidas en condiciones de bioterio, con un fotoperíodo de 12/12 hrs, con ciclo luz-oscuridad invertido y temperatura de 20 ± 2 °C. Las ratas se dividieron en dos grupos experimentales: El grupo experimental 1, consumió agua con sacarosa por un mes, el grupo experimental 2, consumió agua con sacarosa por dos meses, cada grupo con su respectivo grupo control, n=6. Ver diseño experimental (figura 3).

6.2 Diseño experimental

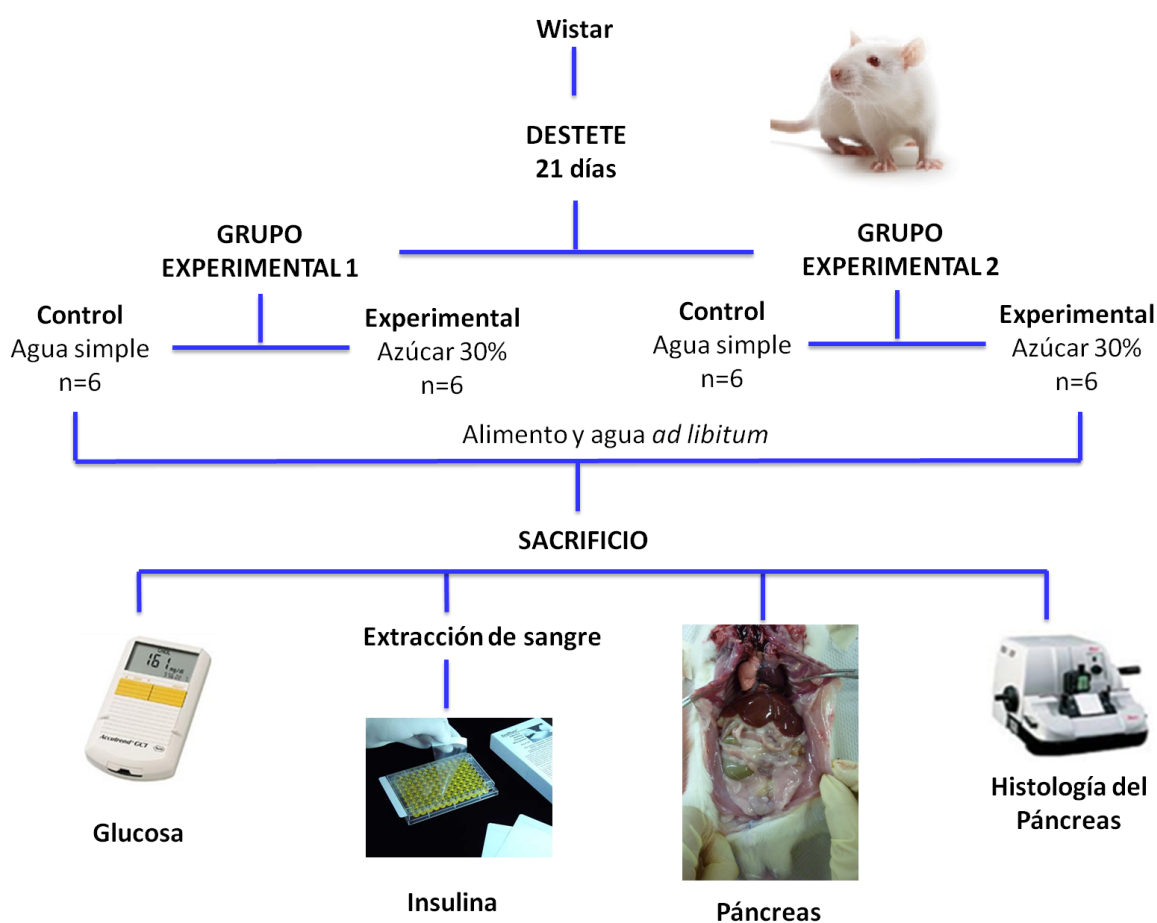


Figura 3. Diseño experimental. Grupo control (C n=6), grupo experimental (A30 n=6).

6.3 Protocolo de la dieta

Todas las ratas fueron alimentadas con dieta normal Chow 5001 de Purina (tabla 1). Los grupos experimentales recibieron 30% de sacarosa estándar comercial en el agua que consumieron, las ratas del grupo control consumieron agua simple. El consumo de alimento y agua fue *ad libitum*. Durante el periodo de tratamiento, se realizó un registro diario del peso corporal, consumo de alimento y agua. El consumo de alimento y agua fue medido colocando una cantidad conocida en cada jaula obteniendo la cantidad remanente 24 horas después.

Nutrimento	Porcentaje (%)	Kcal
Proteínas	29	98.6
Lípidos	13	44.2
Carbohidratos	58	197.2
Total	100	340

Tabla 1. Aporte calórico y nutrimental por cada 100 gramos de dieta Chow 5001 de Purina.

6.4 Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas por el agua

Para la obtención de kcal por agua se realizó lo siguiente:

- 1.- Se obtuvo la ingesta de agua por semana de vida de cada individuo.
- 2.- Posteriormente todas las ingestas se promediaron para obtener los mililitros consumidos por grupo por semana.
- 3.- Estos mililitros se multiplican por 30 gramos de azúcar y se dividen entre 100 mililitros de agua para obtener los gramos de azúcar consumidos.
- 4.- Estos gramos se multiplican por 4 que son las kcal que nos proporciona un gramo de azúcar para obtener las kcal consumidas por el agua.

6.5 Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas en el alimento

Para la obtención de kcal consumidas por el alimento

- 1.- Se obtuvo la ingesta de alimento por semana de vida de cada individuo.
- 2.- Posteriormente todas las ingestas se promediaron para obtener los gramos consumidos por grupo por semana.
- 3.- Estos gramos se multiplican por 3.4 que son las kcal que nos proporciona 1 gramo de alimento Chow 5001.

6.6 Obtención de muestras sanguíneas y páncreas

Al término del tratamiento, previo al sacrificio, las ratas de ambos grupos fueron dejadas en ayuno, para lo cual se les retiró el alimento a las ocho de la noche. A las ratas A30 se les retiró el agua azucarada, colocándoles agua simple para cumplir un ayuno de doce horas, al día siguiente, a las ocho de la mañana, a cada rata se le midió la glucosa sérica con un analizador Accutrend GCT, Roche Diagnostics. Inmediatamente después, tanto las ratas controles como las experimentales, fueron sacrificadas por decapitación para coleccionar dos tubos (13 x 100mm) de sangre. La sangre se dejó reposar en baño maría durante 15 minutos, después se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos. El suero se separó para hacer alícuotas de 300µl de suero las cuales se conservaron en congelación a -30°C. Posteriormente se utilizó una alícuota para determinar las concentraciones sanguíneas de insulina por el método de ELISA. La rata decapitada inmediatamente se colocó en posición supina¹, se realizó una incisión longitudinal sobre la línea media ventral, desde la cavidad abdominal hasta el dorsal del pene. El páncreas fue extraído, pesado y seccionado en cabeza, cuerpo y cola.

6.7 Análisis histológico del páncreas

La cola del páncreas fue procesada en Bouin² durante 24 hrs. Posteriormente, el tejido se deshidrató con alcohol etílico en concentraciones ascendentes (70, 80, 96 y 100%), aclarado

en xileno para infiltrarlo e incluirlo en Paraplast Plus. Se obtuvieron cortes longitudinales de siete μm de espesor con un microtomo. Posteriormente, la séptima laminilla de cada animal, se tiñó con hematoxilina eosina, se tomaron fotomicrofotografías con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega píxeles montada en un microscopio óptico ZeissImager A.1 (a 4,10 y 40 aumentos y con un analizador de Adobe Photoshop CS e Imágenes AxioVision REL 4.8 (ZeissInc 2007)) se realizaron reconstrucciones de los cortes (figura 4) para muestrear aleatoriamente, identificando un promedio de 25 ± 1 islotes de Langerhans por animal, a los cuales, se les determinó el área y la cantidad de células dentro del islote, de acuerdo con su área (figura 5A, B). Cabe mencionar que los islotes se clasificaron de acuerdo con su área; en chicos ($<3000\mu\text{m}^2$), medianos ($3001-9000\mu\text{m}^2$) y grandes ($>9001\mu\text{m}^2$).

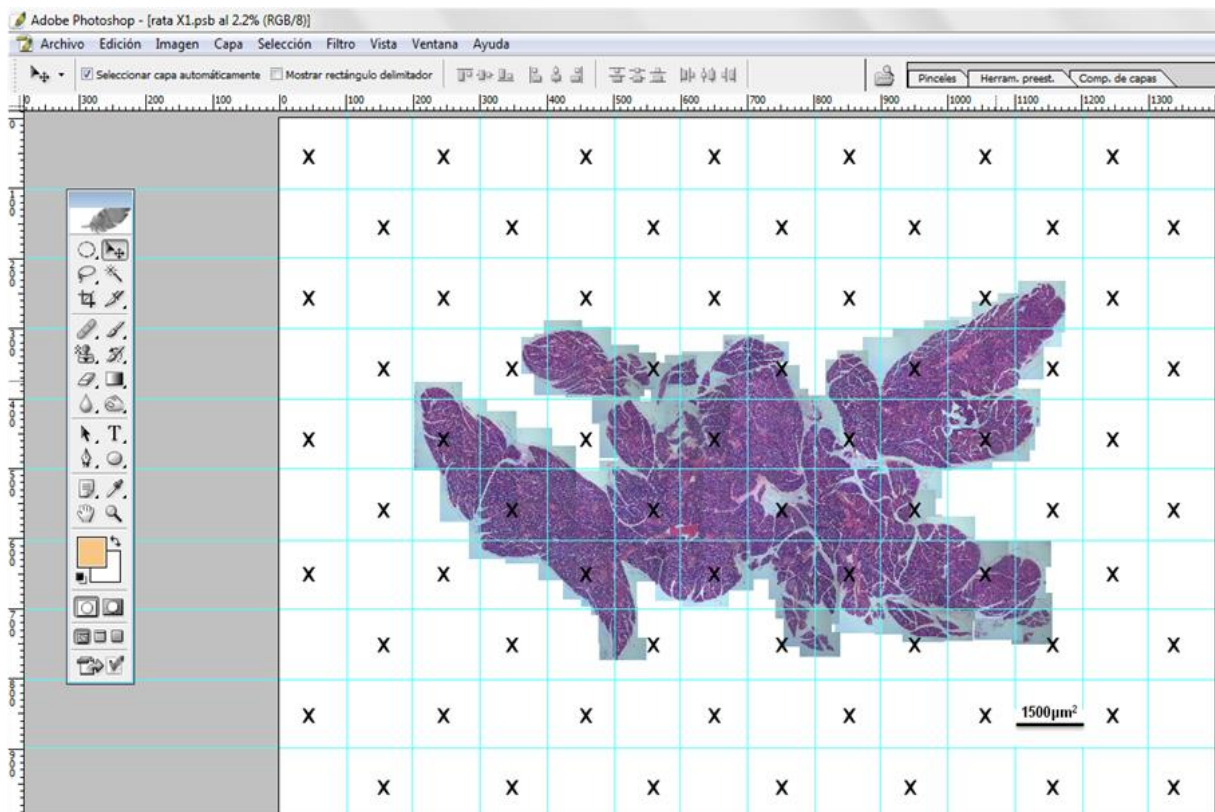


Figura 4. Adobe Photoshop CS y la cuadrícula. Fotomicrofotografías de las reconstrucciones de los cortes histológicos del páncreas con tinción de Hematoxilina-Eosina (10x).

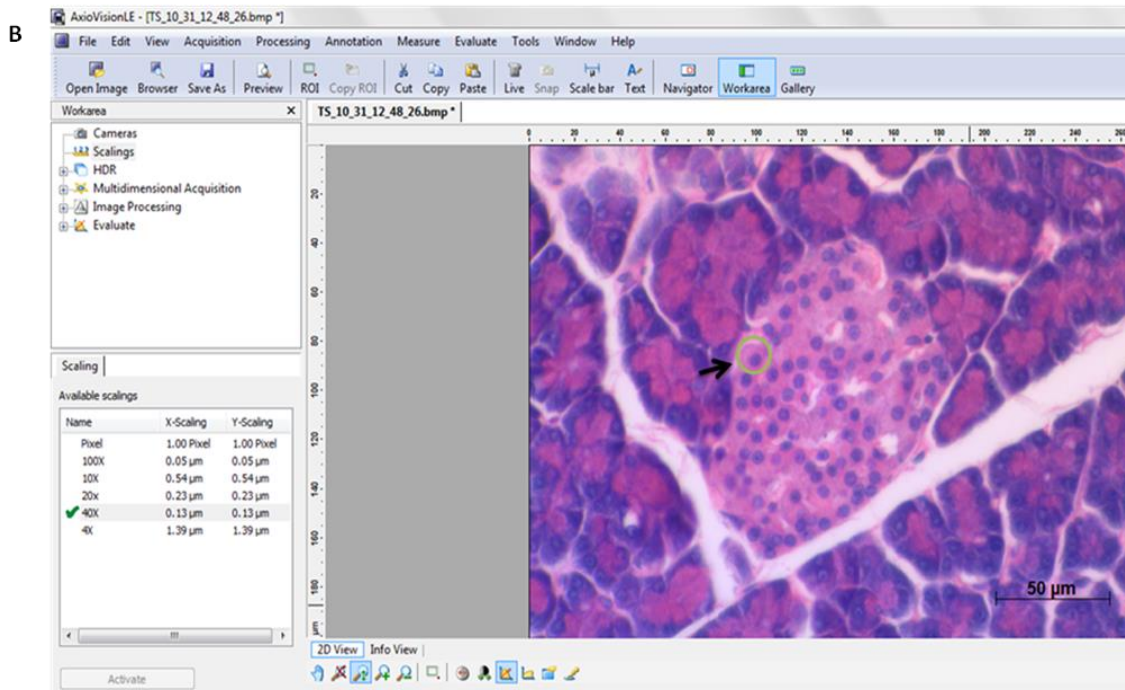
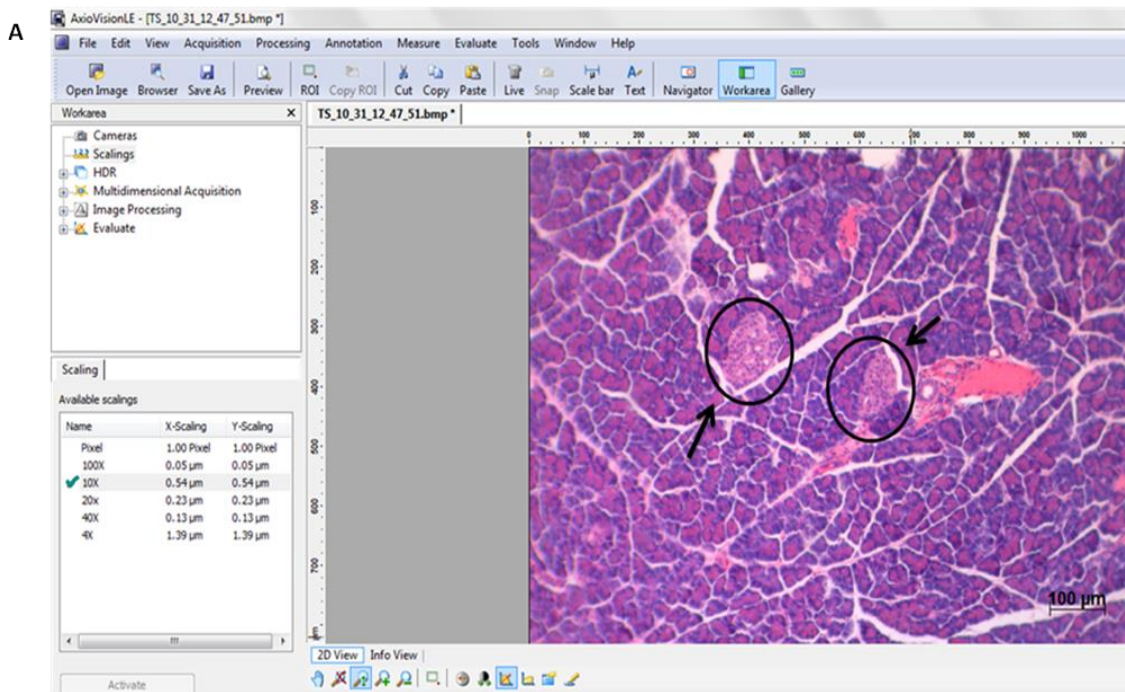


Figura 5. A) Imagen de AxioVision REL 4.8. Fotomicrofotografía de cortes histológicos del páncreas con tinción de Hematoxilina-Eosina (10x), las flechas negras indican la ubicación del Islote. **B)** Fotomicrofotografía del islote con tinción de Hematoxilina-Eosina (40x), las flechas negras indican las células de los islotes.

6.8 Inmunohistoquímica para la detección de células β

La octava laminilla se utilizó para la realización de inmunohistoquímica para la detección de células β . Los cortes fueron desparafinados y rehidratados, posteriormente, se utilizó peróxido de hidrógeno al 3% (para inhibir las peroxidases endógenas), se realizaron lavados con PBS y se incubaron con suero fetal bovino (1:10) durante una hora a temperatura ambiente. Después, se secó el excedente de suero de las laminillas y fueron cubiertas con anticuerpo primario (Rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz, 1:100) e incubadas durante la noche en una cámara húmeda a 4°C. Trascurrido ese tiempo se lavaron con PBS y se secaron para la adición del anticuerpo secundario (Mouse anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz, 1:200), dejándolo incubar en un periodo de 2h en la cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego, se lavaron las laminillas con PBS y se secaron. El revelado se realizó por medio del kit de diaminobencidina, DAB (la oxidación de la DAB permite la visualización de gránulos de color pardo en citoplasma), la reacción se detuvo después de 3 minutos con agua corriente. Se aplicó el colorante de contraste Hematoxilina de Harris durante un minuto, después se lavaron las laminillas con agua corriente, se deshidrataron con etanol en forma ascendente (70, 80, 90 y 100%), se sumergió en xilol y se montaron con Entellan para ser analizadas posteriormente. Se tomaron fotomicrofotografías con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega píxeles montada en un microscopio óptico ZeissImager A.1 (a 4, 10 y 40 aumentos y con un analizador Imágenes AxioVision REL 4.8 (ZeissInc 2007)), del mismo modo, se realizaron reconstrucciones, una vez identificado los islotes a muestrear se determinó la proporción de células β de ambos grupos experimentales (figura 6).

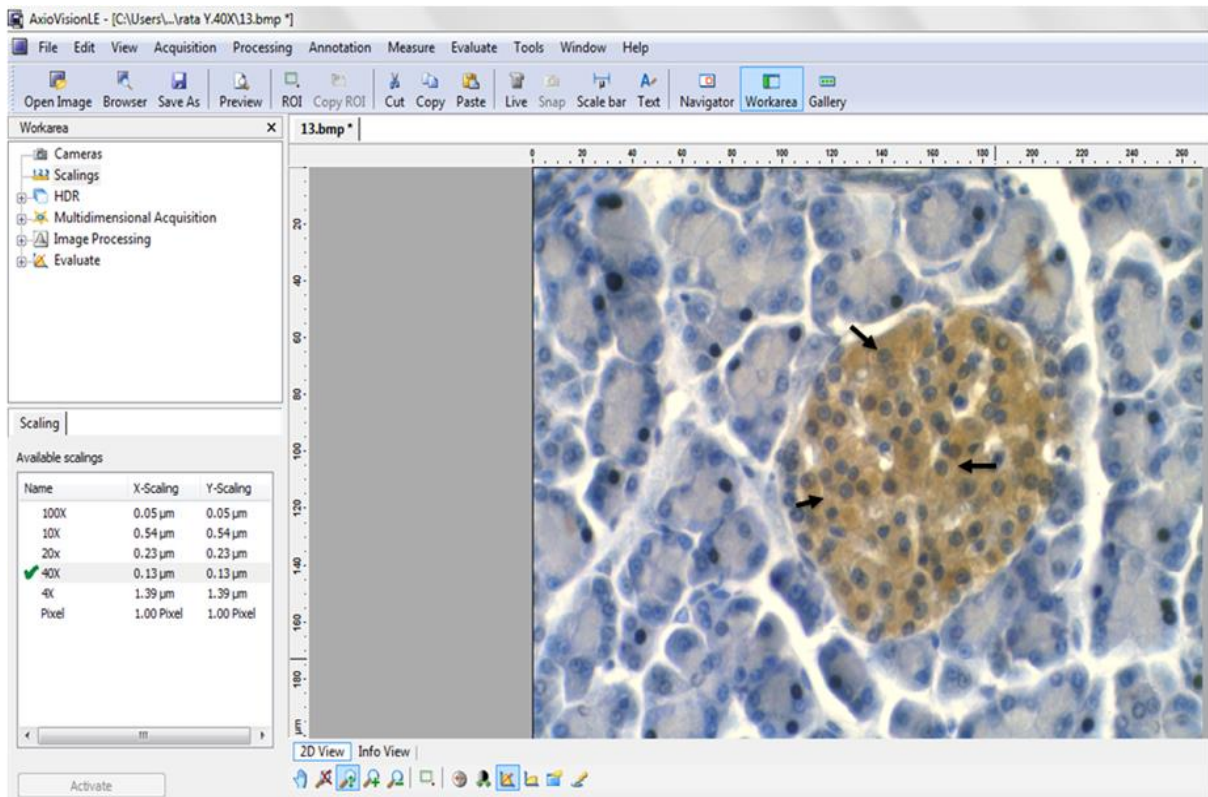


Figura 6. Imagen de AxioVision REL 4.8. Fotomicrofotografía de la inmunohistoquímica para la detección de células β en los cortes histológicos del páncreas contra-teñidos con de Hematoxilina de Harris (40x), las flechas negras indican las células secretoras de la hormona insulina.

6.9 Análisis estadístico

Los valores obtenidos se analizaron en una base de datos por medio del programa GraphPad Prisma 5.01. A través de una prueba de *t*- student no pareada, prueba de *U* Mann-Whitney e histograma prueba de Fisher's. Todos los datos muestran la media \pm e.e.

7 RESULTADOS

7.1 GRUPO EXPERIMENTAL 1

7.1.1 Peso corporal, ingesta de alimento, agua y calorías totales

El peso corporal inicial de las ratas del grupo C al destete fue de 107.5 ± 9.29 g y las ratas del grupo experimental A30, fue de 93.34 ± 13.25 g, sin presentar diferencias. Al final del experimento, las ratas del grupo C tuvieron un peso corporal de 225.5 ± 14.70 g y las ratas del grupo A30 tuvieron un peso corporal de 204.4 ± 17.96 g, sin presentar diferencias a lo largo del experimento (figura 7).

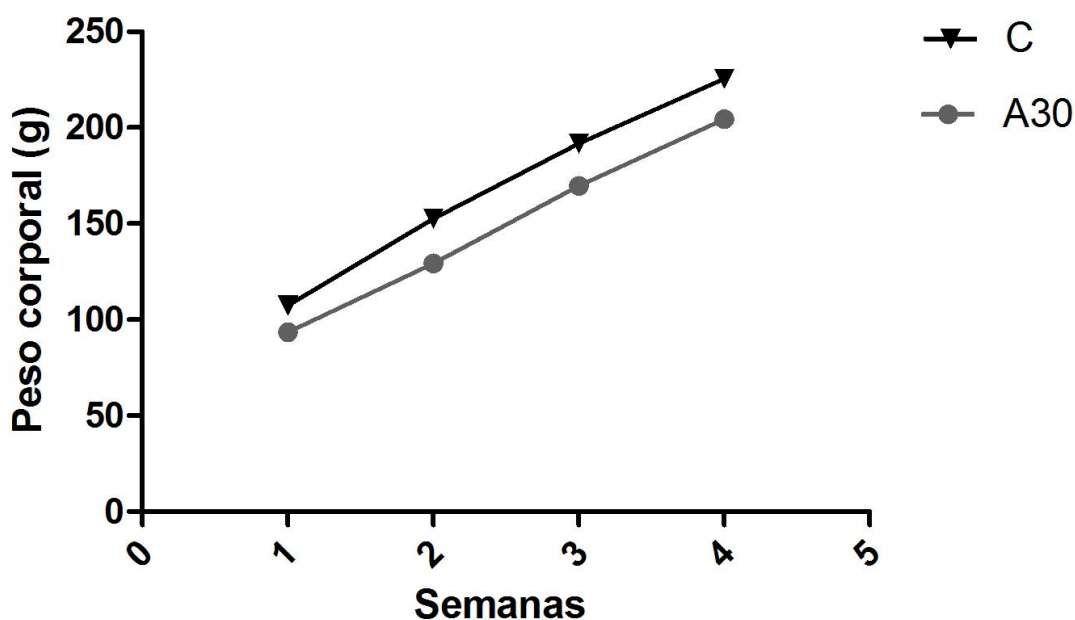


Figura 7. Peso corporal inicial y final del primer grupo experimental. Se muestra la media \pm e.e. No hay diferencia entre grupos. $p > 0.05$, *t*-Student. C (n=6) y A30 (n=6).

En cuanto al consumo de alimento al día por 100g de peso corporal en el grupo C fue de 11.11 ± 0.52 g, mientras que en el grupo A30 fue de 6.43 ± 0.57 g. El consumo de alimento disminuye un 50% en el grupo A30 a lo largo del experimento por el consumo elevado de sacarosa.

Con respecto al consumo de agua al día por 100g de peso corporal en el grupo C fue de 26.95 ± 2.11 ml y en el grupo A30 fue de 29.09 ± 1.73 ml, sin encontrar diferencias significativas (tabla 2).

La ingesta calórica al día por 100g de peso corporal en el grupo C fue de 37.78 ± 1.78 calorías y en el grupo A30 fue de 56.79 ± 3.34 calorías, siendo mayor la ingesta calórica en los animales experimentales (tabla 2).

GRUPO EXPERIMENTAL 1		
VARIABLES	Control (C)	Experimental (A30)
Ingesta de alimento (g/día/ 100g de peso corporal)	11.11 ± 0.52	$6.43 \pm 0.57^{***}$
(equivalente en kcal)	37.78 ± 1.78	$21.88 \pm 1.95^{***}$
Consumo de agua ml/ día/ 100g de peso corporal	26.95 ± 2.11	29.09 ± 1.73
(equivalente en kcal)	0	$34.91 \pm 2.08^{***}$
Kilocalorías totales (Kcal/día/100g de peso corporal)	37.78 ± 1.78	$56.79 \pm 3.34^{**}$

Tabla 2. Consumo de alimento y agua por semana, e ingesta de calorías totales. Se muestra la media \pm e.e. Diferencias estadísticamente significativas comparado con el control (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, *t*-Student). C(n=6) y A30(n=6).

7.2 Parámetros bioquímicos

7.2.1 Glucosa e insulina

La concentración de glucosa sérica en ambos grupos (C y A30) no muestra diferencias ($p = 0.2935$; tabla 3). Del mismo modo, la concentración de insulina sérica en ambos grupos (C y A30) no hay diferencias ($p = 0.8848$; tabla 3)

GRUPO EXPERIMENTAL 1		
	Control (C)	Experimental (A30)
Glucosa (mg/dl)	109.7 ± 12.58	100.2 ± 5.61
Insulina (ng/ml)	0.95 ± 0.09	0.92 ± 0.10

Tabla 3. Concentración de glucosa e insulina sérica. Se muestra la media \pm e.e. No hay diferencias entre grupos. $p > 0.05$, *t*-Student. C (n = 6) y A30(n=6).

7.3 Peso de tejido adiposo

Con respecto, a la cantidad de tejido adiposo total y visceral por 100 gramos de peso corporal, no se encontraron diferencias entre grupos ($p > 0.05$; tabla 4).

GRUPO EXPERIMENTAL 1		
Variables	Control (C)	Experimental (A30)
Tejido adiposo total (g)	2.42 ± 0.17	2.59 ± 0.32
Tejido adiposo visceral (g)	0.95 ± 0.09	0.93 ± 0.11

Tabla 4. Tejido de adiposo total y visceral. Se muestra la media ± e.e. No hay diferencias entre grupos. $p > 0.05$, *t*-Student. C (n=6) y A30(n=6).

En la figura 8, se muestran fotografías de las ratas colocadas en posición supina exponiendo el tejido adiposo visceral. Como se puede observar, la rata experimental presenta una cantidad similar de tejido adiposo visceral comparado con su control.

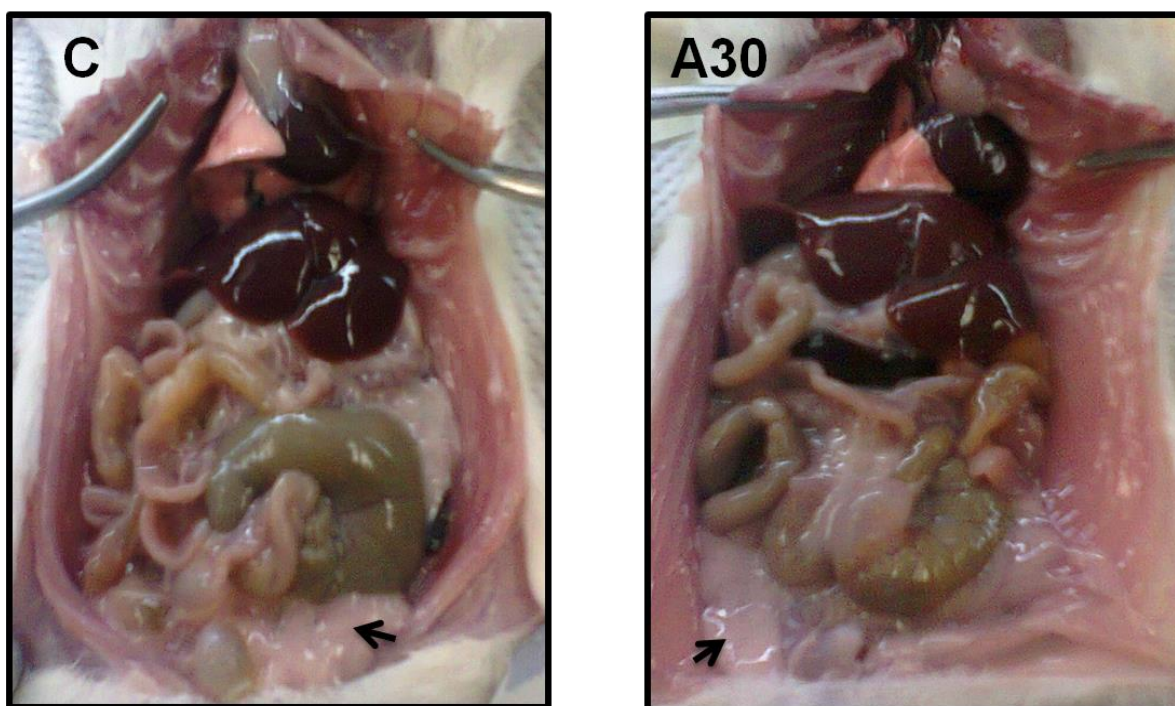


Figura 8. Las fotografías muestran el tejido adiposo visceral (flechas negras) de ambos grupos experimentales. C(n=6) y A30(n=6).

7.4 Peso y características histológicas del páncreas

7.4.1 Peso del páncreas

En cuanto al peso del páncreas por 100 gramos de peso corporal en las ratas C fue de $0.65 \pm 0.04g$ y de las ratas A30 fue de $0.60 \pm 0.04g$. No se encontraron diferencias en los grupos ($p = 0.3457$; figura 9).

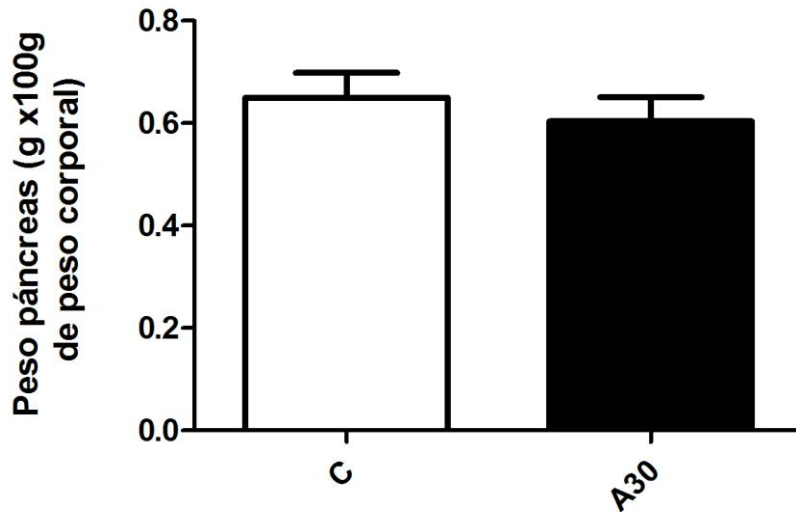


Figura 9. Peso del páncreas. Se muestra la media \pm e.e. No hay diferencias entre grupos. $p > 0.05$, *t*-Student. C(n=6) y A30(n=6).

7.4.2 Histología del páncreas

En las fotomicrofotografías de los cortes histológicos del grupo experimental uno, no se observaron diferencias a nivel morfológico entre el grupo A30 con su control. En la figura 10 podemos apreciar los distintos lóbulos que conforman el páncreas; así como la presencia de venas, arterias, el sistema de conductos, tejido acinar y conectivo, y la presencia de Islotes de Langerhans.

Con respecto, a los islotes de Langerhans se puede ver que estos se encuentran bien delimitados, presentando distintos tamaños y formas (circulares y/u ovalados). Dentro de estos se puede observar que los núcleos de los distintos tipos celulares se encuentra bien definidos; mientras, que el citoplasma celular en ambos grupos no llega a distinguirse de forma clara su delimitación (figura 11).

Grupo experimental 1

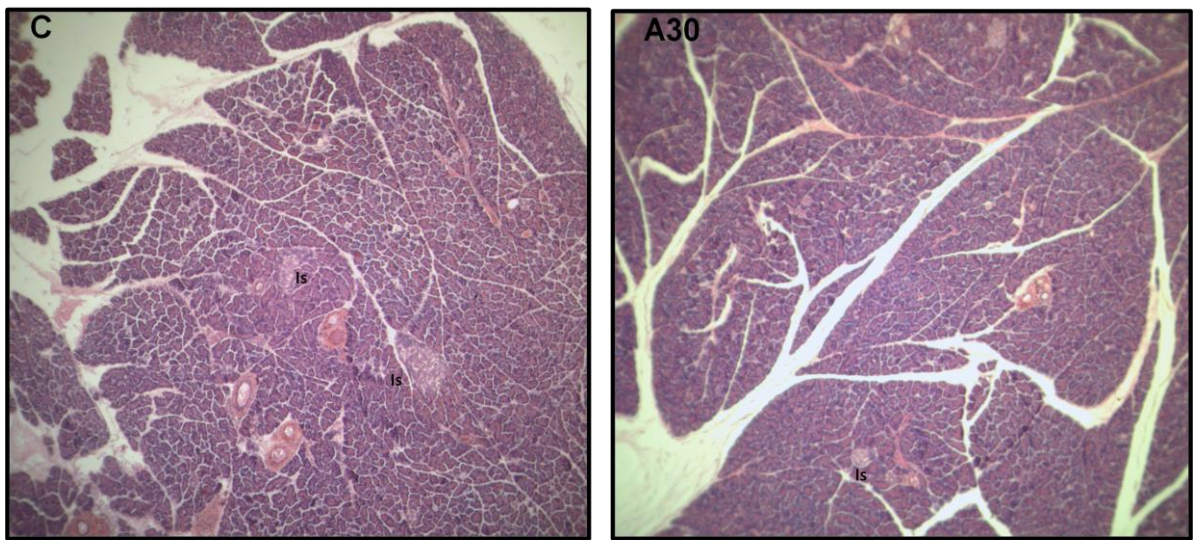


Figura 10. Fotomicrografías de cortes histológicos del páncreas del grupo experimental uno (C y A30) con tinción de Hematoxilina-Eosina (4x). Se observa la presencia de Islotes de Langerhans (Is). Las barras negras equivalen a 50 μ m. C(n =6) y A30(n=6).

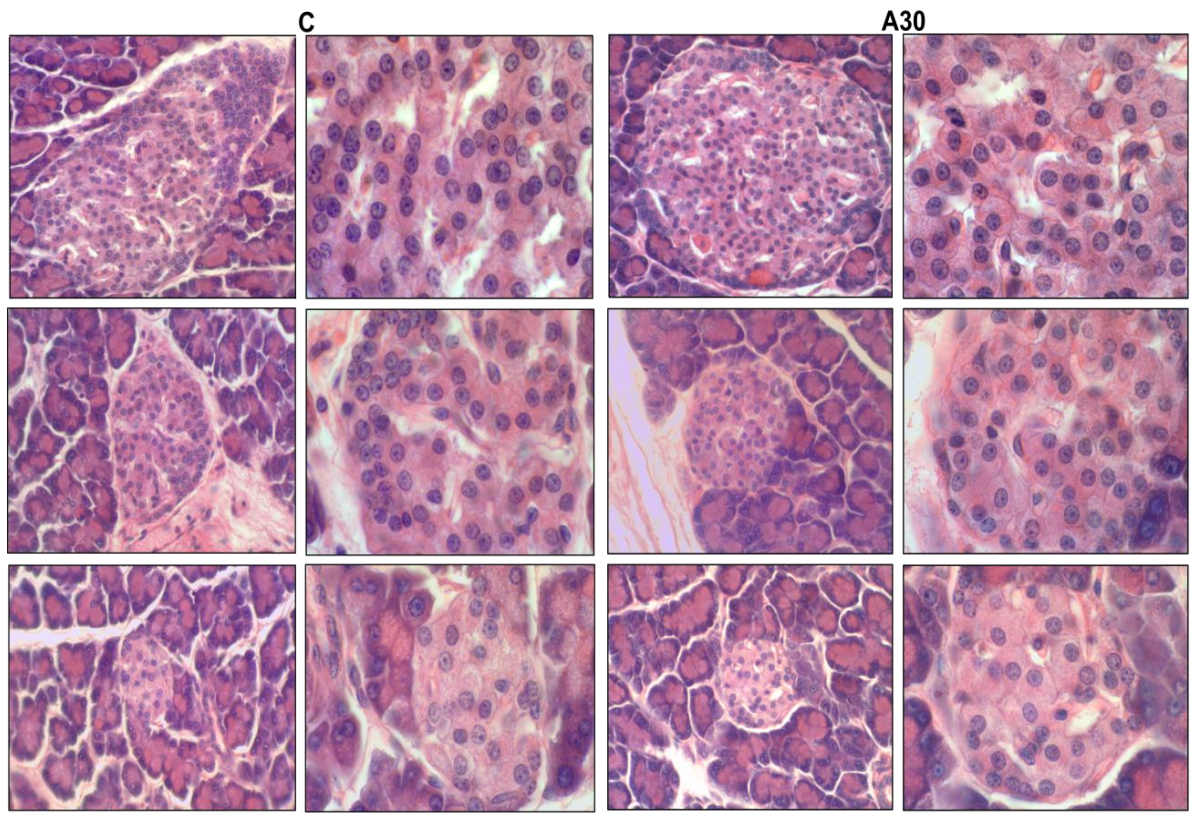


Figura 11. Fotomicrografías de los Islotes de Langerhans del grupo experimental uno (C y A30) con tinción de Hematoxilina-Eosina (40 y 100x). Las barras negras equivalen a 50 μ m. C(n =6) y A30(n=6).

7.4.3 Área de los islotes

Con respecto al porcentaje de islotes de acuerdo a su tamaño, no se encontraron diferencias entre grupos ($p > 0.05$; figura 12).

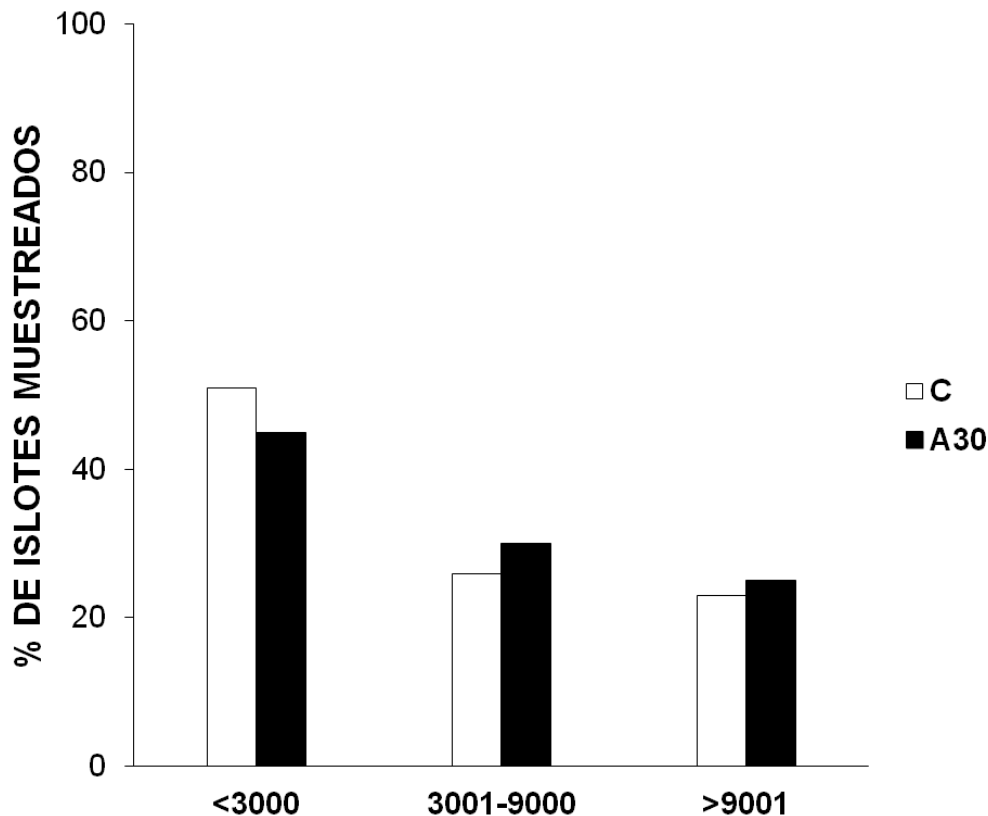


Figura 12. Área de islotes. Se muestra la media. No hay diferencias entre grupos. $p > 0.05$. Prueba de Fisher's. Control(n=6) y A30(n=6).

7.4.4 Número de células dentro de los islotes

Así mismo, cuando se contabilizó el número de células que se encontraron en los islotes seleccionados de acuerdo con su tamaño, se observó que en los islotes chicos en las ratas C fue de 13 ± 0.89 células y las ratas A30 fue de 16.17 ± 1.04 células ($p = 0.0357$; figura 13A), encontrando diferencias significativas. Mientras que en los islotes medianos en las ratas C fue de 47 ± 3.59 células y las ratas A30 fue de 49.50 ± 4.84 células ($p = 0.6712$; figura 13B), y en los islotes grades en las ratas C fue de 163.8 ± 15.55 células y las ratas A30 fue de 232.2 ± 26.46 células ($p = 0.1209$; figura 13C), sin encontrar diferencias entre grupos.

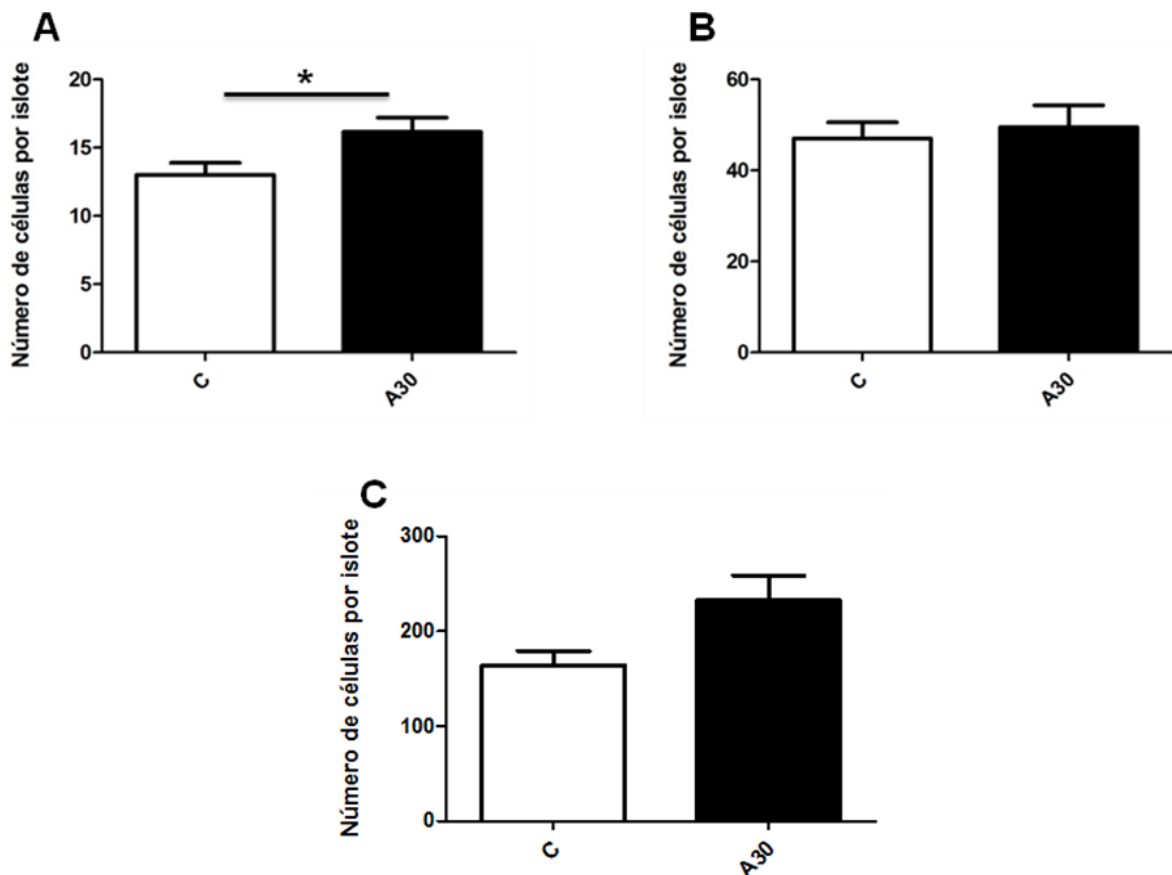


Figura 13. Distribución de número de células por tamaño de islote: chicos (A), medianos (B), grandes (C). Se muestra la media \pm e.e. Las diferencias entre grupos se representan con asteriscos * $p \leq 0.05$. Los datos fueron analizados mediante una prueba de *U Mann-Whitney* y *t-Student* Control (n =6) y A30(n=6).

7.4.5 Células β

Así mismo, se muestra el porcentaje de células β de acuerdo con el tamaño del islote, observándose que no hay diferencias en las ratas A30 comparado con su grupo control (tabla 5).

GRUPO EXPERIMENTAL 1		
Tamaño del islote	Control (C)	Experimental (A30)
< 3000 μm^2	87.26 \pm 3.30	89.40 \pm 3.15
3001-9001 μm^2	85.39 \pm 2.40	83.80 \pm 3.11
>9001 μm^2	83.34 \pm 2.20	79.24 \pm 3.66

Tabla 5. Porcentaje de células β por islote. Se muestra la media \pm e.e. No hay diferencias entre grupos. $p > 0.05$. *t-Student*. Control (n =6) y A30 (n=6).

A nivel histológico, podemos observar que las ratas A30 existe una distribución normal de las células dentro de los islotes chicos, medianos y grandes comparados con su respectivo grupo control. Notamos que las células β pancreáticas ocupan la zona central del islote, así como las células no β se sitúan en la periferia del estos (figura 14).

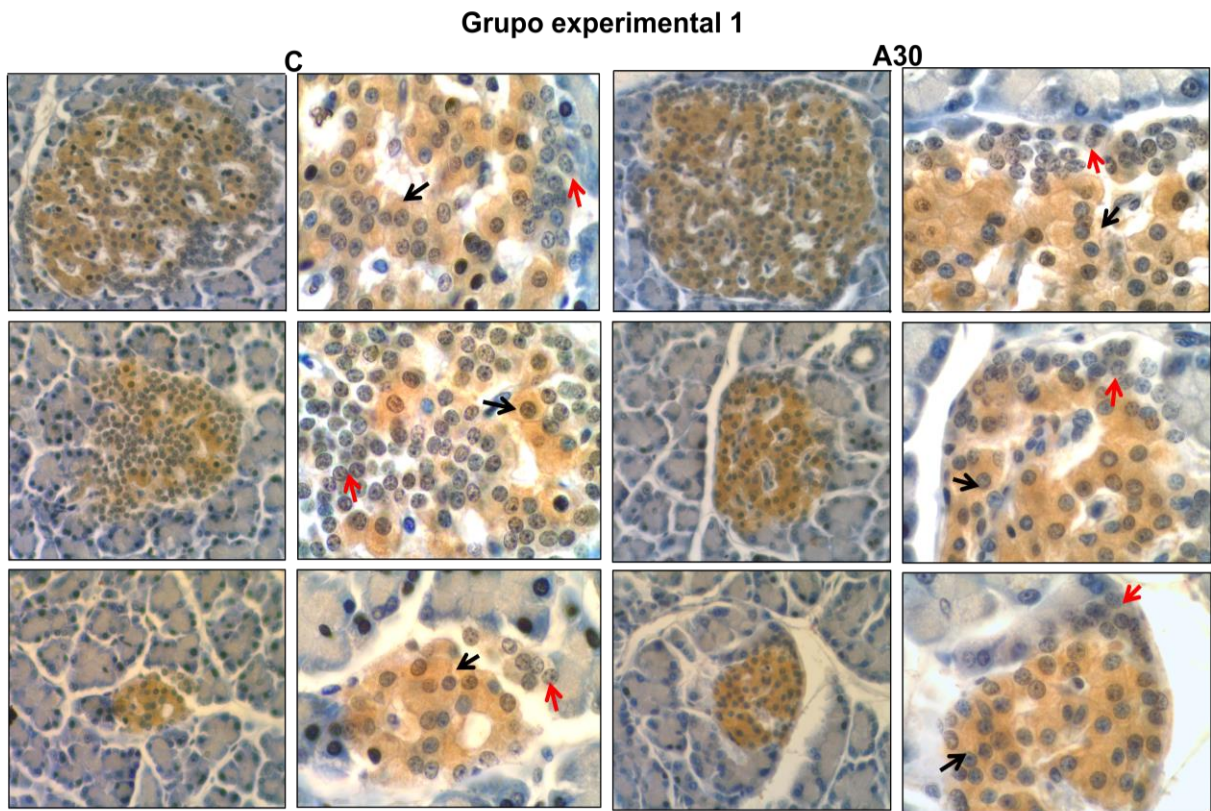


Figura 14. Fotomicrografías de inmunohistoquímicas para la detección de células β contra-teñidas con Hematoxilina de Harris. (40 y 100x). Las flechas negras indican la ubicación de células β , mientras que, las flechas rojas indican la ubicación de células no β . Las barras negras equivalen a 50 μ m. C(n =6) y A30(n=6).

7.5 GRUPO EXPERIMENTAL 2

7.5.1 Peso corporal, ingesta de alimento, agua y calorías totales

En el segundo grupo experimental, el peso corporal inicial de las ratas del grupo C al destete fue de $103.6 \pm 8.80\text{g}$ y las ratas del grupo A30, fue de $82.37 \pm 6.76\text{g}$, sin presentar diferencias. Al final del experimento, las ratas del grupo C tuvieron un peso corporal de $305.3 \pm 14.69\text{g}$ y las ratas del grupo A30 tuvieron un peso corporal de $303.8 \pm 11.69\text{g}$, sin presentar diferencias significativas a lo largo del experimento (figura 15).

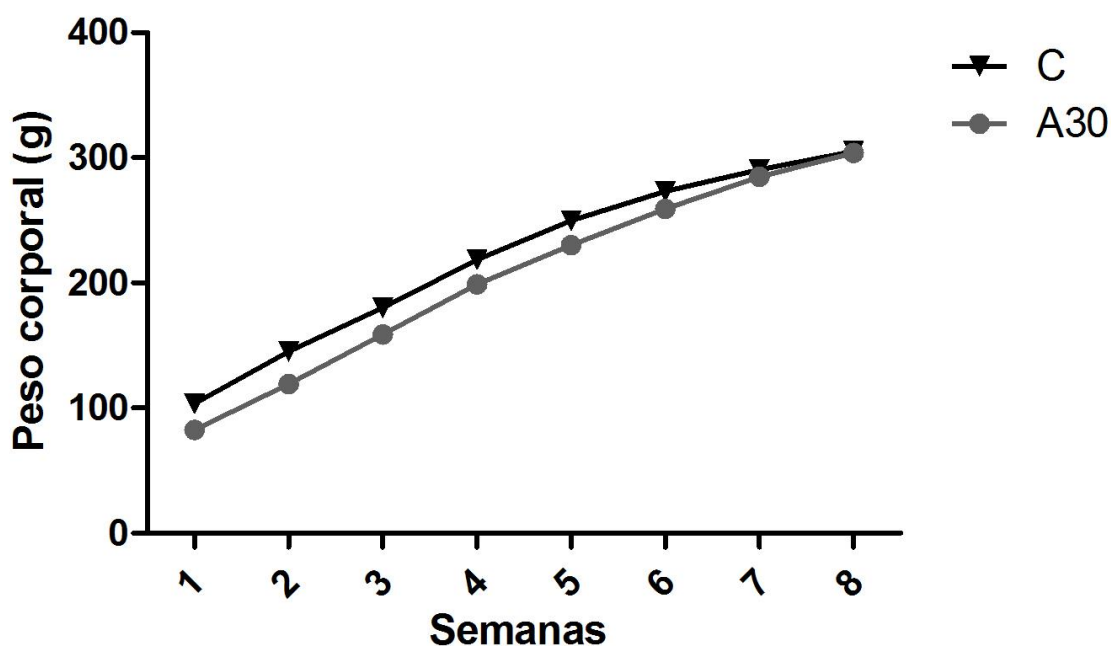


Figura 15. Peso corporal inicial y final del segundo grupo experimental. Se muestra la media \pm e.e. No hay diferencia entre grupos. $p>0.05$, t -Student. C (n=6) y A30 (n=6).

En lo que respecta al consumo de alimento al día por 100g de peso corporal en el grupo C fue de $8.95 \pm 0.24\text{g}$, mientras que en el grupo A30 fue de $4.04 \pm 0.37\text{g}$. El consumo de alimento disminuye un 50% en el grupo A30 a lo largo del experimento por el consumo elevado de sacarosa.

Con respecto al consumo de agua al día por 100g de peso corporal en el grupo C fue de $20.40 \pm 1.67\text{ml}$ y en el grupo A30 fue de $21.02 \pm 1.18\text{ml}$, sin encontrar diferencias (tabla 6).

La ingesta calórica al día por 100g de peso corporal en el grupo C fue de 30.45 ± 0.85 calorías y en el grupo A30 fue de 38.98 ± 1.88 calorías, siendo mayor la ingesta calórica en los animales experimentales (tabla 6).

GRUPO EXPERIMENTAL 2		
Variab les	Control (C)	Experimental (A30)
Ingesta de alimento (g/día/ 100g de peso corporal)	8.95 ± 0.249	$4.04 \pm 0.37^{***}$
(equivalente en kcal)	30.45 ± 0.85	$13.75 \pm 1.26^{***}$
Consumo de agua ml/ día/ 100g de peso corporal	20.40 ± 1.67	21.02 ± 1.18
(equivalente en kcal)	0	$25.23 \pm 1.42^{***}$
Kilocalorías totales (Kcal/día/100g de peso corporal)	30.45 ± 0.85	$38.98 \pm 1.88^*$

Tabla 6. Consumo de alimento y agua por semana, e ingesta de calorías totales. Se muestra la media \pm e.e. Diferencias estadísticamente significativas comparado con el control (* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, *t*-Student). C(n=6) y A30(n=6).

7.6 Parámetros bioquímicos

7.6.1 Glucosa

De igual forma la concentración de glucosa sérica en ambos grupos (C y A30) no muestra diferencias ($p = 0.0754$; tabla 7).

GRUPO EXPERIMENTAL 2		
	Control (C)	Experimental (A30)
Glucosa (mg/dl)	93.33 ± 3.82	104.5 ± 5.13

Tabla 7. Concentración de glucosa sérica. Se muestra media \pm e.e. No hay diferencias entre grupos. $p > 0.05$, *t*-Student. C (n=6) y A30(n=6).

7.7 Peso de tejido adiposo

En cuanto a la cantidad de tejido adiposo total y visceral por 100 gramos de peso corporal, no se encontraron diferencias entre grupos ($p > 0.05$; tabla 8).

GRUPO EXPERIMENTAL 2		
Variables	Control (C)	Experimental (A30)
Tejido adiposo total (g)	2.21 ± 0.32	3.47 ± 0.40
Tejido adiposo visceral (g)	1.09 ± 0.21	1.79 ± 0.26

Tabla 8. Tejido de adiposo total y visceral. Se muestra media ± e.e. No hay diferencias entre grupos. $p > 0.05$, *t*-Student. C (n=6) y A30(n=6).

En la figura 16, se muestran fotografías de las ratas colocadas en posición supina exponiendo el tejido adiposo visceral. Se observa una mayor acumulación de tejido adiposo en la rata A30 del grupo experimental dos comparado con su control.

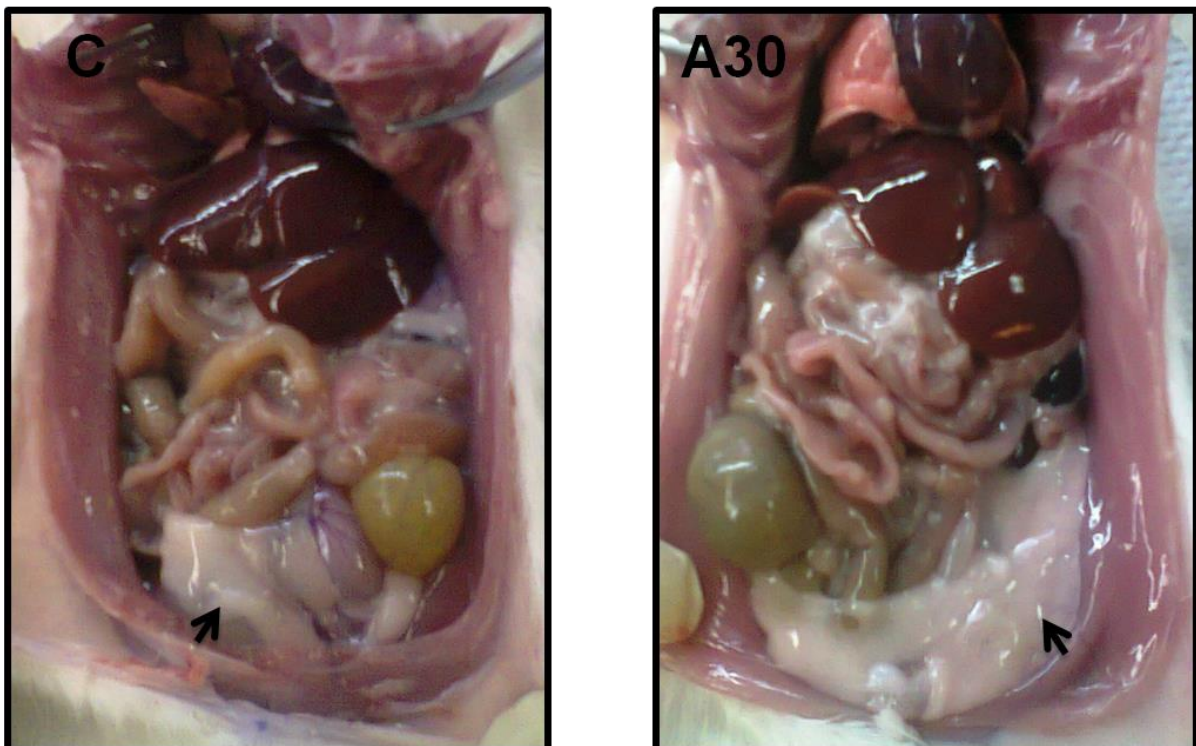


Figura 16. Las fotografías muestran el tejido adiposo visceral (flechas negras) de ambos grupos experimentales. C(n=6) y A30(n=6).

7.8 Peso y características histológicas del páncreas

7.8.1 Peso del páncreas

En cuanto al peso del páncreas por 100 gramos de peso corporal en las ratas C fue de $0.446 \pm 0.03g$ y de las ratas A30 fue de $0.446 \pm 0.03g$. No se encontraron diferencias en los grupos ($p= 0.3490$; figura 17).

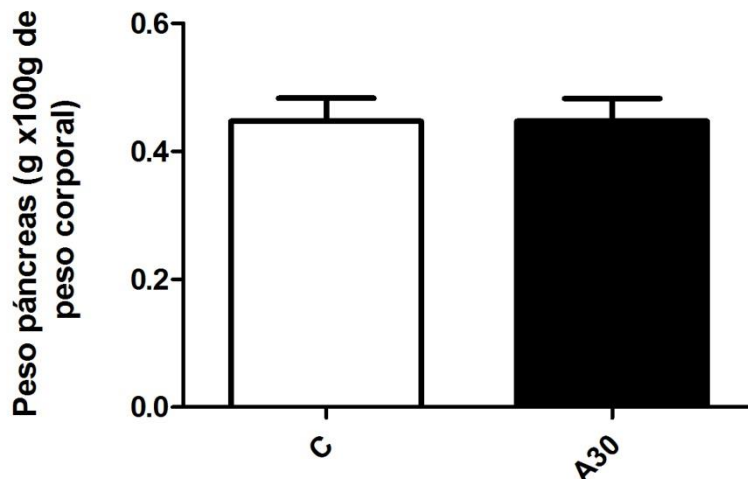


Figura 17. Peso del páncreas. Se muestra la media \pm e.e. No hay diferencias entre grupos. $p>0.05$, *t*-Student. C(n=6) y A30(n=6).

7.8.2 Histología del páncreas

En las fotomicrofotografías de los cortes histológicos del grupo experimental dos, no se observaron diferencias morfológicas entre el grupo A30 y su control. En la figura 18 se observan los distintos lóbulos que conforman el páncreas; así como la presencia de venas, arterias, el sistema de conductos, tejido acinar y conectivo, y la presencia de Islotes de Langerhans.

Con respecto a los islotes de Langerhans, estos presentaron características similares al grupo experimental 1, encontrándose estos bien delimitados, presentando distintos tamaños y formas (circulares y/u ovalados). Dentro de estos se observó que los núcleos de los distintos tipos celulares se encontraban bien definidos; mientras que el citoplasma celular en ambos grupos no llegó a distinguirse de forma clara su delimitación (figura 19).

Grupo experimental 2

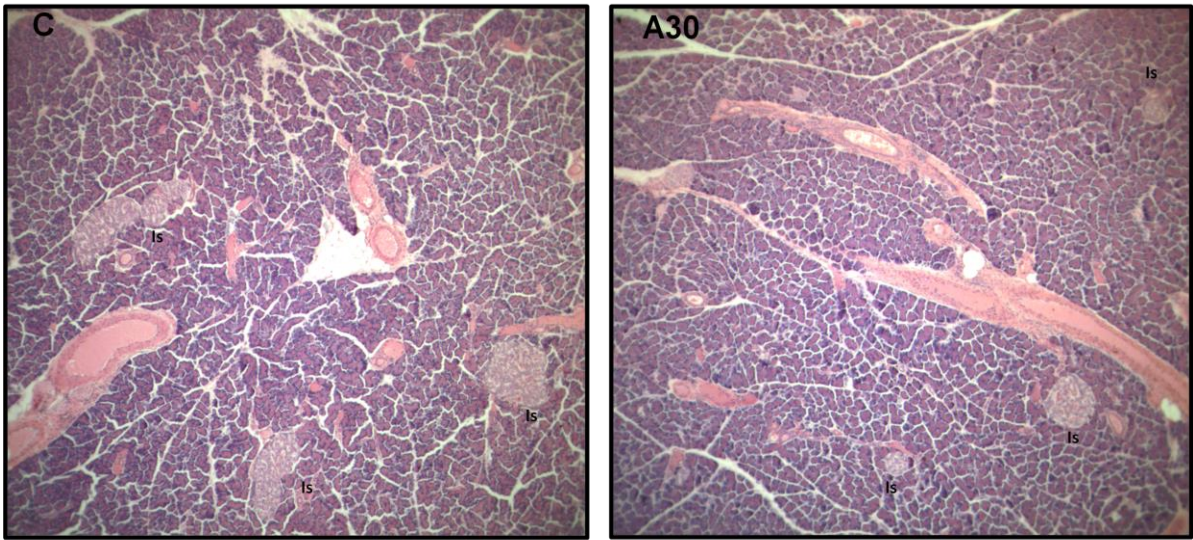


Figura 18. Fotomicrografías de cortes histológicos del páncreas del grupo experimental dos (C y A30) con tinción de Hematoxilina-Eosina (4x). Se observa la presencia de Islotes de Langerhans (Is). Las barras negras equivalen a 50 μ m. C(n =6) y A30(n=6).

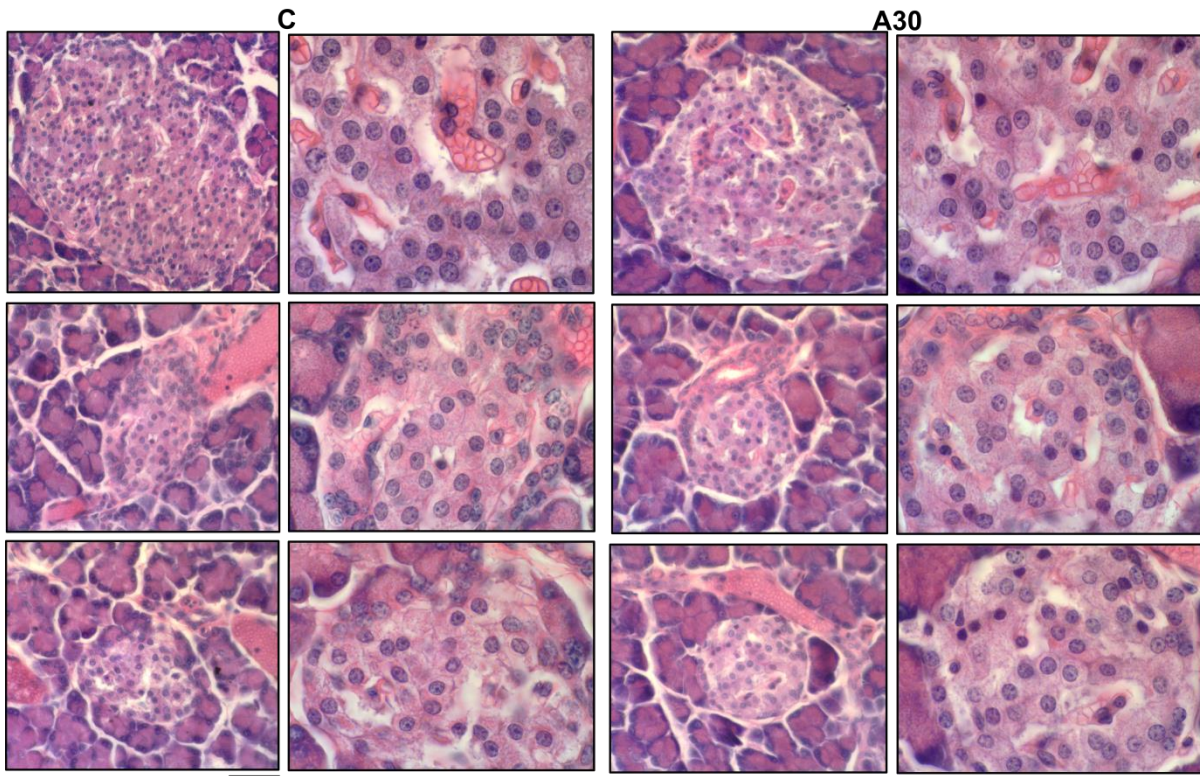


Figura 19. Fotomicrografías de los Islotes de Langerhans del grupo experimental dos (C y A30) con tinción de Hematoxilina-Eosina (40 y 100x). Las barras negras equivalen a 50 μ m. C(n =6) y A30(n=6).

7.8.3 Área de los islotes

Con respecto al porcentaje de islotes de acuerdo a su tamaño, no se encontraron diferencias entre grupos ($p > 0.05$; figura 20).

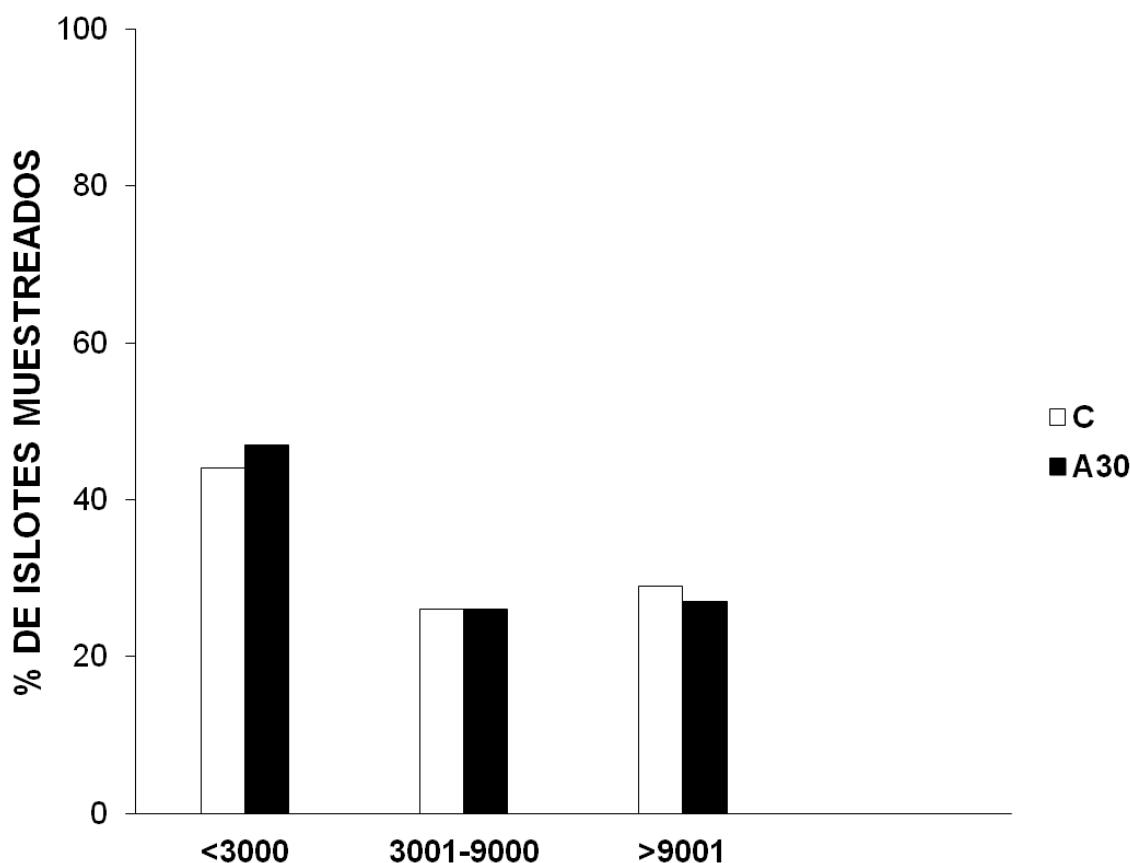


Figura 20. Área de islotes. Se muestra media. No hay diferencias entre grupos. $p > 0.05$, Prueba de Fisher's. Control(n=6) y A30(n=6).

7.8.4 Número de células dentro de los islotes

Así mismo, cuando se contabilizó el número de células que se encontraron en los islotes seleccionados de acuerdo con su tamaño, se observó que en los islotes chicos en las ratas C fue de 13.50 ± 1.17 células y las ratas A30 fue de 14.33 ± 1.30 células ($p = 0.6904$; Figura 21A), en los islotes medianos en las ratas C fue de 47.50 ± 2.48 células y las ratas A30 fue de 56.17 ± 6.28 células ($p = 0.2902$; Figura 21B), y en los islotes grandes en las ratas C fue de 212.8 ± 15.82 células y las ratas A30 fue de 191.2 ± 17 células ($p = 0.4493$; Figura 21C), sin encontrar diferencias en ninguno grupo.

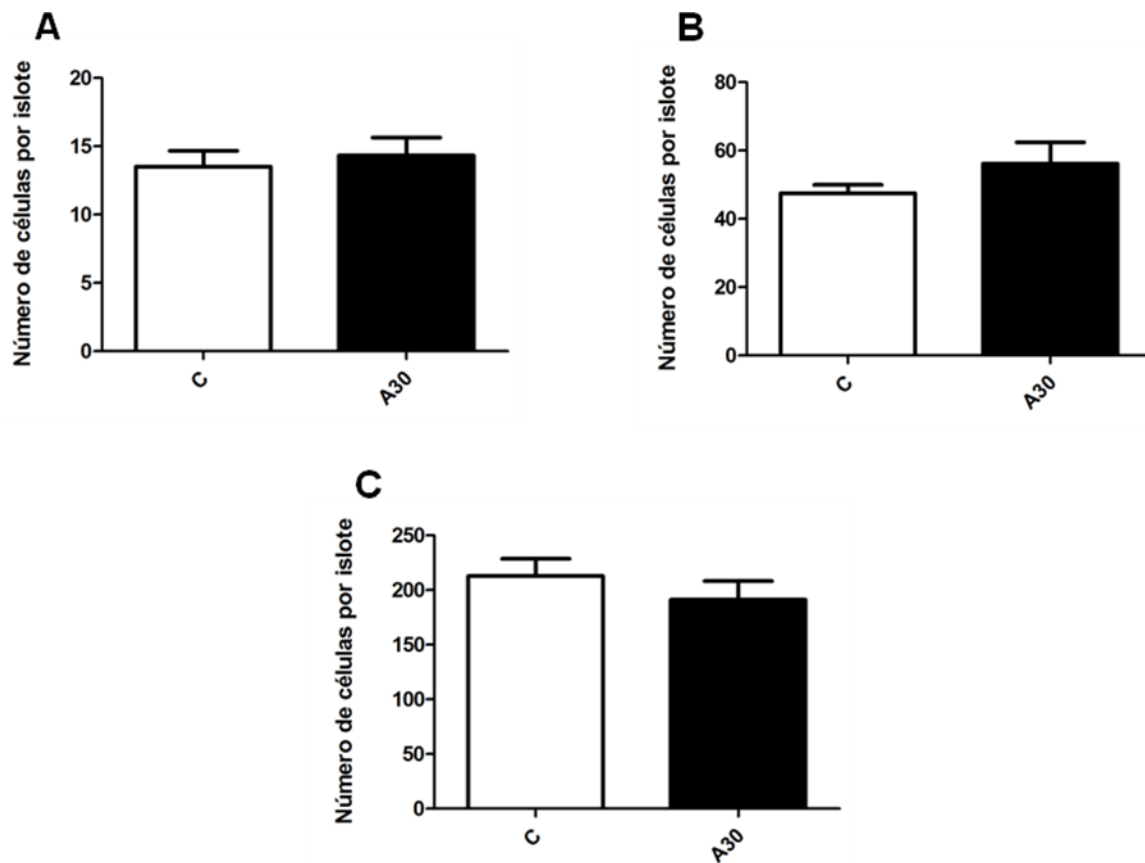


Figura 21. Distribución de número de células por tamaño de islote: chicos (A), medianos (B), grandes (C). Se muestra la media \pm e.e. No hay diferencias entre grupos. $p > 0.05$. Los datos fueron analizados mediante una prueba de *U Mann-Whitney* y *t-Student*. Control (n =6) y A30 (n=6).

7.8.5 Células β

En cuanto al porcentaje de células β de acuerdo con el tamaño del islote, se observó que no hay diferencias en las ratas A30 comparado con el grupo control (tabla 9).

GRUPO EXPERIMENTAL 2		
Tamaño del islote	Control (C)	Experimental (A30)
< 3000 μm^2	89.67 \pm 1.95	82.33 \pm 3.67
3001-9001 μm^2	83.33 \pm 4.27	77.87 \pm 4.16
> 9001 μm^2	80.58 \pm 1.95	78.89 \pm 2.05

Tabla 9. Porcentaje de células β por islote. Se muestra la media \pm e.e. No hay diferencias entre grupos. $p > 0.05$. Los datos fueron analizados mediante una prueba de *U Mann-Whitney* y *t-Student*. Control (n =6) y A30 (n=6).

A nivel histológico, podemos observar que las ratas A30 continúan teniendo una distribución normal de las células dentro de los islotes chicos, medianos y grandes comparados con el grupo control. De igual forma notamos que las células β pancreáticas ocupan la zona central del islote, así como las células no β se sitúan en la periferia del estos (figura 22).

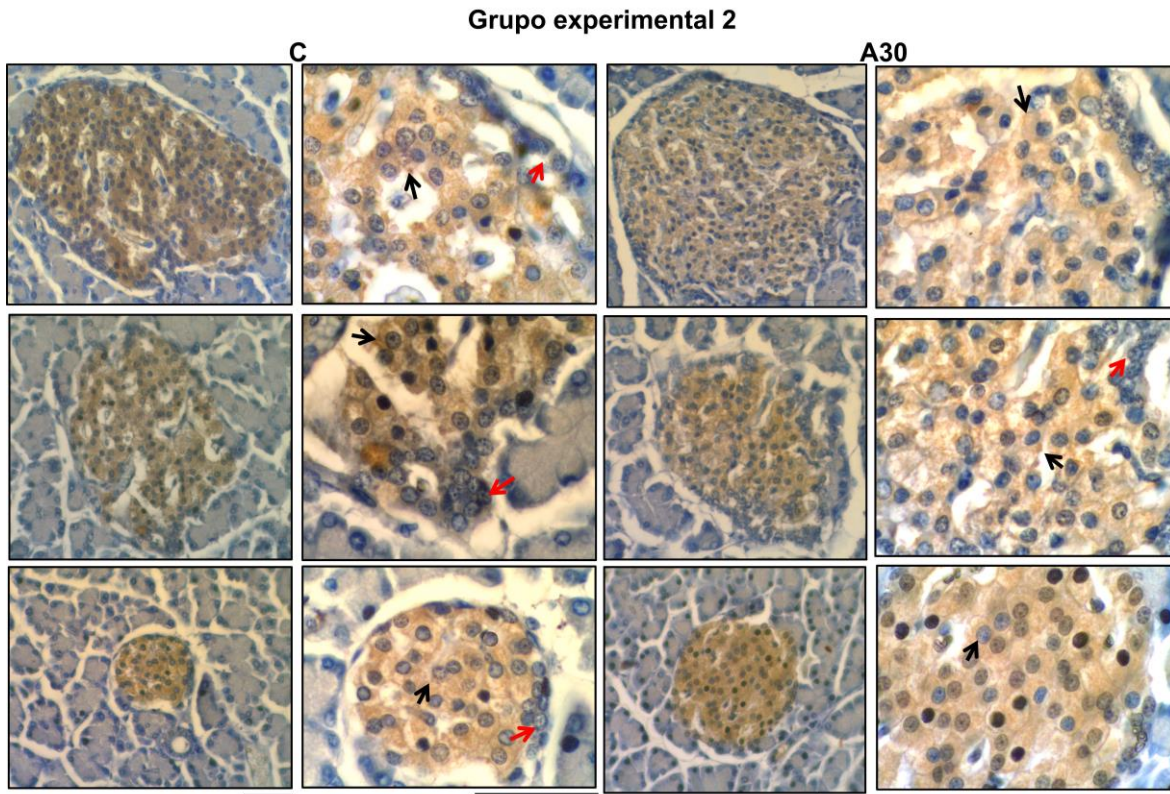


Figura 22. Fotomicrograffías de inmunohistoquímicas para la detección de células β contra-teñidas con Hematoxilina de Harris. (40 y 100x). Las flechas negras indican la ubicación de células β , mientras que, las flechas rojas indican la ubicación de células no β . Las barras negras equivalen a 50 μ m. C(n=6) y A30(n=6).

8 DISCUSIÓN

En la rata, la etapa posdestete representa un periodo crítico en la ontogenia del páncreas porque aún está en desarrollo. Lo que hace que sea un órgano susceptible a modificarse por la dieta, afectando su organización histológica (Bramblett y cols. 2000). Por ejemplo, la dieta rica en grasa proveniente de la leche materna provoca un estado fisiológico caracterizado por hiperglucemia e hiperinsulinemia, esta condición se asoció con un aumento en el número de células β , la falta de respuesta a altas concentraciones de glucosa, estimuló un aumento de células α (Aguayo-Mazzucato y cols. 2006).

Nuestros resultados muestran que no hay diferencia en el peso corporal a pesar de que las ratas de los grupos A30 consumieron la mitad de alimento comparado con sus grupos control, tanto en el primer y segundo mes del consumo elevado de sacarosa. Esta falta de diferencia pudo haber sido porque las ratas A30 ingirieron más calorías a través del consumo de agua con sacarosa a pesar de que no hubo diferencia en la cantidad de agua que bebieron entre los grupos experimentales en ambos experimentos. Estos resultados se correlacionan con otros estudios donde evalúan el efecto del consumo de una dieta alta en carbohidratos (El Hafidi y cols. 2001; Alexander y cols. 2004; Pérez-Torres y cols. 2009).

Con respecto a las concentraciones de glucosa e insulina se observan valores similares entre el grupo control y el grupos A30 en los dos grupos experimentales, estos datos se corroboran con otros estudios realizados en edad adulta, en donde observan que los animales que consumen dietas altas en carbohidratos liberan más insulina que los animales control, manteniendo los niveles de glucosa normales (Massa y cols. 1997, 2001, Del Zotto y cols. 1999); además se ha observado que la actividad de algunas enzimas (hexoquinasa y glucoquinasa) encargadas del proceso de fosforilación de la glucosa aumentan su actividad catalítica permitiendo la liberación adecuada de insulina para mantener en homeostasis la glucosa (Aalinkeel y cols. 1999; 2001). De tal manera que, porque los animales que consumen azúcar no tienen elevada la insulina (aquí como las ratas están en crecimiento y desarrollo lo que consumen están cubriendo la demanda del crecimiento y desarrollo, posteriormente cuando termina ese

proceso, empiezan acumular las calorías como con la acumulación de tejido visceral y la insulina aumenta (Díaz y cols. enviado).

Por otra parte, observamos en el grupo tratado por dos meses con sacarosa al 30% que hay una disminución en el consumo de calorías comparado con el grupo tratado por un mes, esto probablemente debido a que la demanda fisiológica para su crecimiento y desarrollo ha disminuido, ya que, se sabe que durante etapas tempranas los organismos aun se encuentran en crecimiento y desarrollo (Alberts 2005; Brown 2005). Dado que las calorías ingeridas son utilizadas para el crecimiento y desarrollo, no encontramos diferencia en la cantidad de tejido adiposo total y visceral, en los grupos que consumieron sacarosa (Corona-Pérez 2013). Cuando las ratas son alimentadas con sacarosa al 30% por tres meses hay una acumulación de tejido adiposo lo que corrobora que solo en edad adulta se almacena mayor cantidad de tejido adiposo (Hafidi y cols. 2001; Alexander y cols. 2004; Díaz y cols. enviado), debido a que su demanda metabólica disminuye comparado con la etapa infantil y juvenil (Hafidi y cols. 2001; Alexander y cols. 2004).

Nuestros resultados indican que el consumo de sacarosa no afectó el peso del páncreas en ambos grupos experimentales. A nivel histológico, en ambos grupos experimentales no encontramos cambios en el porcentaje de los islotes de acuerdo a su área. Se ha reportado en humanos y en ratas que la hiperglucemia estimula la formación de islotes pequeños debido a que tienen mayor capacidad de secretar insulina, probablemente por la mayor irrigación comparado con los islotes grandes donde observan que disminuye su capacidad para secretar insulina (MacGregor y cols. 2006, Su y cols. 2010, Fujita y cols. 2011). Estos resultados difieren de los nuestros, ya que, nosotros no encontramos hiperinsulinemia en las ratas que consumieron sacarosa. 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 β , 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). En el presente trabajo, encontramos que en el grupo experimental uno, el número de células dentro de los islotes chicos aumenta en el grupo

A30 comparado con su grupo control, mientras que los islotes medianos y grandes no presenta diferencias en las ratas que consumieron agua azucarada, comparadas con el control, sin embargo, se observa que en los islotes grandes hay una tendencia a presentar un mayor número de células en las ratas que consumieron agua azucarada comparado con su respectivo grupo control. En el grupo experimental dos, no encontramos diferencias, pero la tendencia de la distribución celular cambia, presentando los islotes medianos del grupo A30 mayor cantidad de células comparado con su grupo control, mientras que los islotes grandes el grupo A30 disminuye control. De tal manera, que los cambios esperados no son tan evidentes en el grupo experimental dos, debido a que los islotes pancreáticos tienen la capacidad de modificar su estructura y función, en respuesta al consumo de sacarosa. Cabe mencionar que la regulación de los islotes pancreáticos depende de diversos factores, como son: cambios en la conformación de células α y β , 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).

En apoyo a lo anterior, se analizó el porcentaje de células β , así como su distribución en los islotes de acuerdo a su tamaño, no observamos diferencias en ninguno de los grupos experimentales. Esto podría deberse a que se estén llevando a cabo procesos compensatorios como la proliferación celular y por ende no encontramos modificaciones en este aspecto, no descartamos la idea de que el proceso de neogénesis de los islotes y la apoptosis celular de igual forma se estén llevando a cabo, debido a que no encontramos un aumento y/o disminución en la porción endocrina del páncreas. En otros estudios en donde se administra sacarosa durante la lactancia y en edad adulta observan que este consumo durante un periodo de tiempo corto aumenta la replicación de la célula β y por ende el porcentaje de apoptosis celular se ve disminuido; también se observa la formación de nuevos islotes a partir de conductos acinares, sin presentar cambios en el porcentaje de células α y β (Massa y cols. 1997; Del Zotto y cols. 1999; 2000), por el contrario, esta administración durante un periodo de tiempo largo produce que la proliferación celular se ve afectada debido a que la velocidad de células apoptóticas aumenta (Del Zotto y cols. 1999; 2004). Quizás en edad adulta esta capacidad se pierde, en las ratas que consumen sacarosa durante tres meses, ya que, los niveles

de insulina aumentan (Ferreira y cols. 2010; Díaz y cols. Enviado). Aunque no se ha estudiado proliferación celular en el páncreas en esa condición y edad.

Se ha observado que las células β , no sólo dependen de una fuente de combustible como la glucosa, sino que también requieren de factores de crecimiento, así como la regulación de la transcripción de los genes de insulina y enzimas involucradas en la liberación de esta (Liang y cols. 1992; Chen y cols. 1994; Gasa y cols. 2000). Se ha estudiado que la hiperglucemia puede tener efectos beneficiosos como la estimulación del crecimiento de las células β , así como efectos perjudiciales como el deterioro de la secreción de insulina y apoptosis celular (Swenne y cols. 1980; Kim y cols. 2005). Además, la hiperglucemia puede afectar la señalización en las células β , a través de la disminución del GLUT 2 y la expresión del gen de la glucoquinasa (Tsuboi y cols. 2006). Por otra parte, se ha visto que la respuesta de las células β son distintas durante la edad adulta y edad postnatal tras estar expuesto a altas concentraciones de glucosa, debido a que en edades tempranas estas parecen ser menos susceptibles a dañarse ante esta demanda metabólica, debido a que las células β aún se encuentran inmaduras (Kuhl y cols. 1980). También debemos considerar que algunas incretinas (GLP-1 y GIP), el sistema adrenérgico, el ácido γ -aminobutírico (GABA) y hormonas tiroideas pueden estar participando en la regulación de la homeostasis de la glucosa, mejorando el crecimiento, diferenciación, proliferación y supervivencia de la células β pancreáticas, para la secreción adecuada de insulina (Quesada y cols. 2007; Quintanilla-García y Zúñiga-Guajardo 2010; Martínez-Rodríguez y Gil 2012; Aguayo-Mazzucato y cols. 2013; Aiello y cols. 2014).

Algunos mecanismos que contribuyen en la disfunción de la célula β , por el consumo de sacarosa en la edad adulta, son la glucolipotoxicidad que involucra cambios en la fosforilación y/o oxidación de la glucosa, aumento en los niveles de triglicéridos, la regulación de varios genes incluyendo la glucoquinasa, y el receptor alfa, activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR α) entre otros, los cuales dañan la función de la mitocondria y retículo endoplásmico, por la producción de estrés oxidativo (superóxido, óxido nítrico), glucosilación de proteínas estructurales y la activación de vías de señalización que finalmente conducen a la muerte celular (Sakuraba y cols. 2000; Briaud y cols. 2001; Robertson y cols. 2003; Poitout 2004) aunque a temprana edad no hay estudios.

Esto nos sugiere que probablemente no encontramos cambios a nivel histológico en el páncreas, debido a que la ingesta de sacarosa una semana antes de completar la etapa de maduración del páncreas, pudo haber modificado 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).

9 CONCLUSIONES

El consumo de sacarosa al destete durante un mes y dos meses no afecta los niveles séricos de glucosa e insulina, sin embargo, el consumo de sacarosa por un mes modifica el arreglo histológico del páncreas. Aunque, estos cambios no son evidentes o no se agravan con el consumo de sacarosa por dos meses. Lo que sugiere que este órgano tiene la capacidad de modular su estructura y función a temprana edad ante el consumo elevado de sacarosa. Más estudios son necesarios para evaluar el tejido pancreático a los tres meses del consumo de sacarosa en animales que ya presentan niveles de insulina elevada y resistencia a la insulina.

10 PERSPECTIVAS

En nuestro mismo modelo, sería importante realizar inmunohistoquímicas para determinar el porcentaje de proliferación y apoptosis celular, neogénesis de islotes pancreáticos, así como el número de células secretoras de glucagón; ya que, es posible que se estén llevando a cabo procesos compensatorios, por los cuales en los tiempos considerados en este estudio no encontramos cambios significativos a nivel histológico en el segundo grupo experimental. Sin embargo, sería interesante seguir estudiando el páncreas en el contexto de consumo de sacarosa en edades posteriores para ver cómo se va modificando su estructura y función.

Por otro lado, sería importante utilizar otras técnicas para observar si se altera la transcripción de genes (PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox gene 1, neurogenina 3 (Ngn3), Pax-4, Nkx-2.2, Nkx-6.1, Pax-6, etc.), involucrados en fisiología del páncreas.

Con respecto, a los resultados obtenidos de glucosa e insulina, sería importante medir la actividad enzimática de hexoquinasa y glucoquinasa, ya que, podría estar aumentada, por lo cual no encontramos alteraciones en estos parámetros bioquímicos.

11 REFERENCIAS

- Aalinkel R**, Srinivasan M, Kalhan C.S, Laychock GS, Patel S.M. 1999. A dietary intervention (high carbohydrate) during the neonatal period causes islet dysfunction in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 277:E1061-69.
- Aalinkel R**, Srinivasan M, Song F, Patel S.M. 2001. Programming into adulthood of islet adaptations induced by early nutritional intervention in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 281:E640-48.
- Aiello V**, Moreno-Asso A, Servitja J.M, Martín M. 2014. Thyroid hormones promote endocrine differentiation at expenses of exocrine tissue. *Exp Cell Res.* 322(2):236-48.
- Abraham L.K.** 2008. Histología y Biología celular. Editorial: Elsevier Mosby, 2da edición.
- Aguayo-Mazzucato C**, Sánchez S.C, Godínez P.V, Gutiérrez O.G, Hiriart M. 2006. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS ONE.* 1(1): e35.
- 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 β -cell development and glucose-responsive insulin secretion through MAFA. *Diabetes.* 62(5):1569-80.
- Alberts JR.** 2005. Infancy. The behavior of the laboratory rat. Editorial OXFORD University Press. USA.
- Alexander A.A**, Hernández D.G, Lara BM, Angulo G.O, Oliart R.R. 2004. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor- α in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem.* 15: 350-57.
- Ando K** y Fujita T. 2009. Metabolic syndrome and oxidative stress. *Free Radic Res.* 213-8.
- Barquera S** y Tovar-Guzman V. 2003. Geography of diabetes mellitus mortality in Mexico: An epidemiologic transition analysis. *Arch Med Res.* 34(5):407-14.
- Blakely S**, Hallfrisch J, Reiser S, Prather E. 1981. Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. *J Nutr.* 111:307-314.
- Bramblett D**, Huang H, Tsai M. 2000. Pancreatic islet development. *Adv Pharmacol.* 47: 255–315.

- Brown RW.** 2005. Adolescence. The behavior of the laboratory rat. Editorial OXFORD University Press. USA.
- Chaloupka F,** Wang Y, Powell L, Andreyeva T, Chriqui J, Rimkus L. 2011. Estimating the potential impact of sugar-sweetened and other beverage excise taxes in Illinois. *CCHHS*. 1-18.
- Chen C,** Hosokawa H, Bumbalo L.M, Leahy J.L. 1994. Regulatory effects of glucose on the catalytic activity and cellular content of glucokinase in the pancreatic beta cell. Study using cultured rat islets. *J Clin Invest*. 94 1616–20.
- Cerf M.** 2006. Transcription factors regulating beta-cell function. *Euro J Endocrinol*. 155: 671–79.
- Collombat P,** Hecksher-Sorensen J, Krull J, Berger J, Riedel D, Herrera P.L, Serup P, Mansouri A. 2007. Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon. *J Clin Invest*. 117:961–70.
- Corona-Pérez A.** 2013. El consumo elevado de sacarosa a temprana edad disminuye la concentración de corticosterona e induce un daño hepático en ratas. Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Del Zotto H,** Massa L, Gómez D.C, Gagliardino J.J. 1999. Changes induced by Sucrose Administration upon the Morphology and Function of Pancreatic Islets in the Normal Hamster. *Diabetes Metab Res Rev*. 15: 106-12.
- Del Zotto H,** Massa L, Rafaeloff R, Pittenger G.L, Vinik A, Gold G, Reifel-Miller A, Gagliardino J.J. 2000. Possible relationship between changes in islet neogenesis and islet neogenesis-associated protein-positive cell mass induced by sucrose administration to normal hamsters. *J Endocrinol*. 165:725–33.
- Del Zotto H,** Gómez Dumm C.L, Drago S, Fortino A, Luna G.C, Gagliardino J.J. 2002. Mechanisms involved in the beta cell mass increase induced by chronic sucrose feeding to normal rats. *J Endocrinol*. 174(2):225-31.
- Del Zotto H,** Borelli M.I, Flores L, García M.E, Gómez Dumm C.L, Chicco A, Lombardo Y.B, Gagliardino J.J.(2004). Islet neogenesis: an apparent key component of long-term pancreas adaptation to increased insulin demand. *J Endocrinol*. 183(2):321-30.

- Deichert M**, Ellenbecker M, Klehr E, Pesarchick L, Ziegler K. 2006. Industry Analysis: Soft Drinks. *Strategic Management in a Global Context*. 1-25.
- Deutsch G**, Jung J, Zheng M, Lora J, Zaret K.S. 2001. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development*. 128: 871–81.
- Díaz-Aguila Y**. 2012. Efecto del consumo elevado de sacarosa sobre la concentración de corticosterona, indicadores metabólicos e histología de la glándula adrenal. Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Díaz-Aguila Y**, Castelán F, Cuevas E, Zambrano E, Martínez-Gómez M, Rodríguez-Antolín J, Nicolás L. At weaning and continuous high-sucrose consumption promoted adrenal glands disruption associated with metabolic syndrome indicators in male rats. Enviado.
- Dubois L**, Farmer A, Girard M, Peterson K. 2007. Regular sugar-sweetened beverage consumption between meals increases risk of overweight among preschool-aged children. *J Am Diet Assoc*. 6:924-35.
- Dumortier O** y Van Obberghen E. 2012. MicroRNAs in pancreas development. *Diabetes Obes Metab*. 3:22-28.
- El Hafidi M** y Baños G. 1997. In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hipertrigliceridemia and hypertension. *Hypertens*. 30:624-28.
- El Hafidi M**, Valdez R, Baños G. 2000. Possible relationship between altered fatty acid composition of serum, platelets, and Aorta and Hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin and Exp Hypertens*. 22(1): 99-108.
- El Hafidi M**, Cuellar A, Ramírez J, Baños G. 2001. Effect of sucrose addition to the drinking water that induces hypertension in the rats on liver microsomal $\Omega 9$ and $\Omega 5$ -desaturase activity. *J Nutr Biochem*. 12:65-71.
- El Hafidi M**, Pérez I, Zamora J, Soto V, Carvajal-Sandoval G, Baños G. 2004. Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287:R1387-93.
- El Hafidi M**, Pérez I, Carrillo S, Cardoso G, Zamora J, Chavira R and Baños G. 2006. Effect of sex hormones on non-esterified fatty acids, intra-abdominal fat accumulation, and hypertension induced by sucrosa diet in male rats. *Clin Exp Hipertens*. 28:669–81.

- Euromonitor International.** 2011. Who drinks what: Identifying international drinks consumption trends. *Euromonitor International*. 1-101.
- Ferreira M del R,** Lombardo Y, Chicco A. 2000. β -cell adaptation/dysfunction in an animal model of dyslipidemia and insulin resistance induced by the chronic administration of a sucrose-rich diet. *Islets*. 2(6):367-73.
- Fujita Y,** Takita M, Shimoda M, Itoh T, Sugimoto K, Noguchi H, Naziruddin B, Levy MF, Matsumoto S. 2011. Large human islets secrete less insulin per islet equivalent than smaller islets in vitro. *Islets*. 3(1):1-5.
- Gao N,** LeLay J, Vatamaniuk M.Z, Rieck S, Friedman J.R, Kaestner K.H. 2008. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes Dev*. 22: 3435–48.
- Gasa R,** Fabregat M, Gomis R. 2000. The role of glucose and its metabolism in the regulation of glucokinase expression in isolated human pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*. 268:491–95.
- Gradwohl G,** Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. 2000. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 1607-11.
- Geneser Finn.** 2003. Histología sobre bases biomoleculares. Editorial: Médica Panamericana, 3ra edición.
- Gu G,** Dubauskaite J, Melton D.A. 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3⁺ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*. 129: 2447–57.
- Habener J,** Kemp D.M, Thomas M.K. 2005. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinol*. 146: 1025–34.
- Hebrok M,** Kim S.K, Melton D.A. 1998. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev*. 12: 1705-13.
- Hellerstrom C y Swenne I.** (1991). Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 40: 89–93.
- Henquin J.C.** (2004). Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. *Diabetes*. 53: S48–58.

- 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. *J. Anat.* 206:185–92.
- Jácome R.A.** 2005. Fisiología endocrina. Academia Nacional de Medicina, 3ra edición.
- Jacquemin P**, Durviaux S.M, Jensen J, Godfraind C, Gradwohl T, Guillemot F, Madsen O.D, Carmeliet P, Dewerchin M, Collen D, Rousseau GG, Lemaigre F.P. 2000. Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene *ngn3*. *Mol Cell Biol.* 20: 4445–54.
- Jiménez-Cruz A**, Velasco-Martínez R.M, Bacardí-Gascón M, Higuera D.F, Domínguez P.E. 2009. HOMA-IR, síndrome metabólico y hábitos dietéticos en adolescentes de Chiapas, México. *Rev Biomed.* 20:82-88.
- Kaung H.C.** 1994. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn.* 200: 163–75.
- Kim H.W**, Lee J.W, Suh Y.H, Hong S.H, Choi J.S, Lim J.H, Song J.H, Gao B, Jung M.H. 2005. Exposure to chronic high glucose induces beta-cell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 54 2606–11.
- 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. *J Clin Invest.* 110:1839–47.
- Krauss S**, Zhang C.Y, Scorrano L, Dalgaard L.T, St-Pierre J, Grey S.T, Lowell B.B. 2003. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest.* 112:1831–42.
- Kuhl C**, Hornness P.J, Jensen S.L, Lauritsen K.B. 1980. Gastric inhibitory polypeptide and insulin: response to intraduodenal and intravenous glucose infusions in fetal and neonatal pigs. *Endocrinology.* 107 1446–50.
- Lee J.C**, Smith S.B, Watada H, Lin J, Scheel D, Wang J, Mirmira R.G, German M.S. 2001. Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene *neurogenin3*. *Diabetes.* 50: 928–36.

- Liang Y**, Najafi H, Smith R.M, Zimmerman E.C, Magnuson M.A, Tal M, Matschinsky F.M. 1992. Concordant glucose induction of glucokinase, glucose usage, and glucose-stimulated insulin release in pancreatic islets maintained in organ culture. *Diabetes*. 41 792–806.
- Lombardo Y.B**, Drago S, Chicco A, Fainstein D.P, Gutman R, Gagliardino J.J, Gomez Dumm C.L. 1996. Long-Term Administration of a Sucrose-Rich Diet to Normal Rats: Relationship between Metabolic and Hormonal Profiles and Morphological Changes in the Endocrine Pancreas. *Metabolism*.12: 1527-32.
- London E**, Lala G, Berger R, Panzenbeck A, Kohli A.A, Renner M, Jackson A, Raynor T, **Loya K**, Castonguay W.T. 2007. Sucrose access differentially modifies 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase message in liver and adipose tissue in rats. *The Nutr*. 12: 2616-2621.
- Lorenzo F**, Moreno G, Leza J, Lizasoain H, Moro S, Portolés P. 2008. Velázquez Farmacología básica y clínica. Editorial: Médica Panamericana, 18a edición.
- Lucas A**. 1998. Programming by early nutrition. An experimental approach. *J Nutr* 128: 401S–406S.
- MacGregor R.R**, Williams S.J, Tong P.Y, Kover K, Moore W.V, Stehno-Bittel L. 2006. Small rat islets are superior to large islets in vitro function and in transplantation outcomes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 290(5):E771-9.
- Martín Cuenca Eugenio**. 2006. Fundamentos de fisiología. Editorial Thomson.
- Martínez-Rodríguez R**, Gil A. 2012. Nutrient-mediated modulation of incretin gene expression: a systematic review. *Nutr Hosp*. 27(1):46-53.
- Massa L**, Del Zotto H, Gómez Dumm C.L, Gagliardino J.J. 1997. Postnatal sequential changes in islet morphology and insulin secretion of normal hamsters. *Pancreas*.14:58–64.
- Massa M**, Borelli M, Del Zotto H, Gagliardino J. 2001 .Changes induced by sucrose administration on glucose metabolism in pancreatic islets in normal hamsters. *J Endocrinol*. 171: 551–56.
- Maiztegui B**, Borelli M, Raschia M, Del Zotto H, Gagliardino J. 2009. Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: β -cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion. *J Endocrinol*. (2) 139-49.
- Mataix V.J**. 2009. Nutrición y alimentación humana. Editorial: Ergón. 2da edición.

- Mellitzer G**, Bonné S, Luco R.F, Van De Castele M, Lenne-Samuel N, Collombat P, Mansouri A, Lee J, Lan M, Pipeleers D, Nielsen F.C, Ferrer J, Gradwohl G, Heimberg. 2006. H.IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *Embo J*. 25: 1344–52.
- Mohammed H**, Munavvar A, Sattar, Abdullah N.A, Khan. 2010. The contribution of $\alpha 1B$ -adrenoceptor subtype in the renal vasculature of fructose-fed Sprague–Dawley rats. *Eur J Nutr*. 50:251–60.
- Morimoto M.S**. 2000. Mecanismos moleculares que intervienen en la regulación de la síntesis de insulina por glucosa. *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González*. 3(3):118-120.
- Murtaugh L**. 2007. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development*. 134: 427–38.
- Ninov N**, Hesselton D, Gut P, Zhou A, Fidelin K, Stainier D.Y. 2013. Metabolic regulation of cellular plasticity in the pancreas. *Curr Biol*. 23(13):1242-50.
- Nseir W**, Nassar F, Assy W.N. 2010. Soft drinks consumption and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 21:2579-88.
- Okamoto H**, Hribal M.L, Lin H.V, Bennett W.R, Ward A, Accili D. 2006. Role of the forkhead protein FoxO1 in beta cell compensation to insulin resistance. *J Clin Invest*. 116:775–82.
- Oron-Herman M**, Kamari Y, Grossman E, Yeager G, Peleg E, Shabtay Z, Shamiss A, Sharabi Y. 2008. Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *Am J Hypertens*. 21: 1018-22.
- Pagliuca F** y Melton D.A. 2013. How to make a functional β -cell. *Development*. 140: 2472-83.
- Pérez-Sánchez E**. 2011. Restricción proteínica en la rata madre gestante: consecuencias en la anatomía y el metabolismo de la progenie que en su etapa adulta consume cantidades elevadas de carbohidratos. Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Pérez-Torres I**, Roque P, El Hafidi M, Diaz-Diaz E, Baños G. 2009. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radic Res*. 43(8):761-71.

- Pierreux C**, Poll A.V, Kemp C.R, Clotman , Maestro M, Cordi S, Ferrer J, Leyns L, Rousseau G, Lemaigre F.P. 2006. The transcription factor hepatocyte nuclear factor-6 controls the development of pancreatic ducts in the mouse. *Gastroenterol.* 130: 532–41.
- Piper K**, Brickwood S, Turnpenny L.W, Cameron I.T, Ball S.G, Wilson D.I, Hanley N.A. 2004. Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J Endocrinol.* 181: 11–23.
- Poitout V**. 2004. β -cell lipotoxicity: Burning fat into heat?. *Endocrinology.*145:3563-5.
- Ponce G**, Haro M.A, Arce M.A, Núñez A.A, Ruiz J, Mayagoitia J.J. 2010. Obesidad y tejido adiposo. *RESPYN.* 1 (2).
- Quesada I**, Tudurí E, Nadal A. 2007. El islote pancreático en el desarrollo y tratamiento de la diabetes en: Regula por glucosa de las células alfa, beta y delta en el islote de Langerhans. Editorial: *Sociedad Española de Diabetes.*
- Quintanilla-García C** y Zúñiga-Guajardo S. 2010. El efecto incretina y su participación en la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 48 (5): 509-20.
- Rahmoune H**, Thompson P.W, Ward J.M, Smith C.D, Hong G y Brown J. 2005. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes.* 54:3427-34.
- Robertson R.P, Harmon J, Tran P.O, Tanaka Y, Takahashi H. 2003. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes.* 52:581–87.
- Rojas J**, Bermúdez V, Leal E, Aparicio D, Peña G, Acosta L, Finol F, Urdaneta A, Colmenares C, Almarza J, Linares S, Carrillo M, Bustamante M. 2008. Orígenes étnicos y enfermedades cardiovasculares. *Redalyc.* 1: 2-23.
- Rossi J**, Dunn N.R, Hogan B.L, Zaret K.S. 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.M**, Romrell J, Lynn, Kaye I. 1997. Histology: a text and atlas. Editorial: Médica Panamericana. 3ra edición.

- Sakuraba H**, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S. 2002. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia*. 45:85–96.
- 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.
- Srinivasan M**, Song F, Aalinkeel R, Patel M.S. 2001. Molecular adaptations in islets from neonatal rats reared artificially on a high carbohydrate milk formula. *J Nutr Biochem*. (10):575-84.
- Srinivasan M**, Aalinkeel R, Song F, Patel M.S. 2003. Programming of Islet Functions in the Progeny of Hyperinsulinemic/Obese Rats. *Diabetes*. 52:984–90.
- Su Z**, Xia J, Shao W, Cui Y, Tai S, Ekberg H, Corbascio M, Chen J, Qi Z. 2010. Small islets are essential for successful intraportal transplantation in a diabetes mouse model. *Scand J Immunol*. 72(6):504-10.
- Swenne I**, Bone A.J, Howell S, Hellerstrom C. 1980. Effects of glucose and amino acids on the biosynthesis of DNA and insulin in fetal rat islets maintained in tissue culture. *Diabetes*. 29:686–92.
- Tortora G** y Reynolds G. 2000. Principios de Anatomía y Fisiología. Editorial: Médica Panamericana. 9na edición.
- Tsuboi T**, Ravier M.A, Parton L.E, Rutter G.A. 2006. Sustained exposure to high glucose concentrations modifies glucose signaling and the mechanics of secretory vesicle fusion in primary rat pancreatic b-cells. *Diabetes*. 55:1057–1065.
- Vadlamudi S**, Hiremagalur B, Tao L, Kalaria S, Kaung H, Patel M. 1993. Long- term effects on pancreatic function of feeding a HC formula to rats during the preweaning period. *Am. J. Physiol*. 265: E565-71.
- 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⁺ cells contribute to β -cell neogenesis and proliferation in injured adult mouse pancreas. *Cell Death Dis*. 4:e523.
- Vizmanos B**, Hunot C, Capdevila F. 2006. Alimentación y obesidad. *Inv Salud*. 2:79-85.

- Waterland R** y Garza C. 1999. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 69: 179–97.
- Wang J**, Shen L, Najafi H, Kolberg J, Matschinsky F, Urdea M y German M. 1997. Regulation of insulin pre ARN splicing by glucose. *Pro Natl Acad Sci USA.* 94:4360-65.
- Wu L**, Nicholson W, Knobel S.M, Steffner R.J, May J.M, Piston D.W, Powers A.C. 2004. Oxidative stress is a mediator of glucose toxicity in insulin-secreting pancreatic islet cell lines. *J Biol Chem.* 279:12126–34.
- Zhang H**, Ables E.T, Pope C.F, Washington M.K, Hipkens S, Means A.L, Path G, Seufert J, Costa R.H, Leiter A.B, Magnuson M.A, Gannon M. 2009. Multiple, temporal-specific roles for HNF6 in pancreatic endocrine and ductal differentiation. *Mech Dev.* 126: 958–73.
- Zhou Q**, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton D.A. 2008. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature.*455:627–32.

12 GLOSARIO

1.- Posición supina: sujeto tendido y descansando sobre nalgas, espalda, cabeza y hombros.

2.-Bouin: es un fijador popular para estudios de histología, debido a su excelente estado de conservación de los núcleos y cromosomas.

13 ANEXOS

13.1 Deshidratación del tejido pancreático

- a) Después de la disección, seccionar el páncreas en cabeza, cuerpo y cola.
- b) Mantener la porción de la cola del páncreas en Bouin durante 24 horas.
- c) Sacar el tejido del Bouin y realizar la deshidratación de acuerdo a la siguiente lista, cuidando que la solución cubra el tejido, manteniéndolo en agitación.

N. de solución	Solución y concentración	Tiempo en minutos
1	OH 70%	30 minutos
2	OH 80%	30 minutos
3	OH 96%	60 minutos
4	OH 100%	60 minutos
5	OH 100% -Xileno	30 minutos
6	Xileno I	30 minutos
7	Xileno II	30 minutos
8	Paraplast Plus I	2 horas
9	Paraplast Plus II	18 horas

- d) Incluir todos los tejidos con Paraplast Plus limpio y dejar que solidifiquen.

Nota: Previamente poner a licuar el Paraplast Plus en el horno a una temperatura máxima de 56°C.

13.2 Tinción de hematoxilina-eosina

Después de obtener los cortes histológicos en el micrótopo se dejan secar mínimo 15 días, posteriormente se tiñen con los siguientes tiempos en las diferentes soluciones.

Paso	No.	Solución	Tiempo
Desparafinar	1	Xileno I	5 minutos
	2	Xileno II	5 minutos
	3	Xileno: Etanol	5 minutos
Hidratación	4	Etanol 100%	5 minutos
	5	Etanol 100%	5 minutos
	6	Etanol 96%	3 minutos
	7	Etanol 80%	3 minutos
	8	Etanol 60%	3 minutos
	9	Agua destilada	3 minutos
	10	Hematoxilina de Harris	35 minutos
	11	Agua corriente	40 segundos
Contraste	12	Etanol ácido	40 segundos
	13	Agua destilada	40 segundos
Azuleamiento	14	Etanol amoniacal	3 minutos
	15	Agua destilada	40 segundos
	16	Eosina	8 minutos
	17	Agua destilada	40 segundos
Deshidratación	18	Etanol 96%	40 segundos
	19	Etanol 96%	40 segundos
	20	Etanol 100%	30 segundos
	21	Etanol 100%	30 segundos
	22	Etanol: Xileno	30 segundos
	23	Xileno I	30 segundos
	24	Xileno II	30 segundos

Montaje		Cytoseal TM 60	
----------------	--	----------------	--

-
- En cada canastilla caben 32 portaobjetos
- En caso de meter más de dos trenes, el tren 3 y 4 darles más tiempo en el paso 12 y 14.
- Revisar al salir el tren en la hematoxilina, eosina, alcohol ácido, y alcohol amoniaco un portaobjetos en el microscopio para ver si se tiñó.
- En el caso de que a la hora de montar con el Cytoseal queden burbujas regresar el portaobjetos al Xileno para volver a montar.