



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efectos transgeneracionales de la restricción proteínica
materna de la rata sobre el metabolismo de glucosa e insulina
y las concentraciones de leptina de las crías**

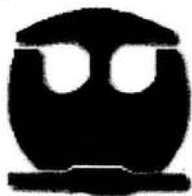
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

PAOLA MARÍA MARTÍNEZ SAMAYOA



MÉXICO, D.F.

**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA**

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

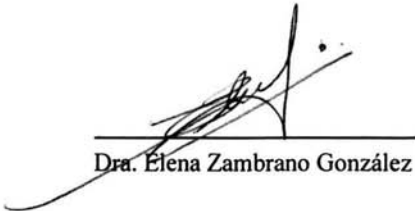
Jurado asignado:

Presidente	Prof. Angela Sotelo López
Vocal	Prof. Lucía Gabriela Bascuñan Termini
Secretario	Prof. Elena Zambrano González
1er. Suplente	Prof. Lucía Cornejo Barrera
2° Suplente	Prof. Euclides Ávila Chávez

Lugar donde se desarrolló el tema:

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ).
Departamento Biología de la Reproducción.

Asesor del tema



Dra. Elena Zambrano González

Sustentante



Paola María Martínez Samayoa

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mis padres por darme la oportunidad de estudiar y por que sin todo su apoyo y amor no hubiera conseguido este logro.

- ❖ A la Dra. Elena Zambrano por haberme permitido colaborar en su equipo de trabajo del laboratorio de Programación Intrauterina en el departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ, así como por los conocimientos que compartió conmigo, su tiempo y asesoría dedicado a este trabajo y por la gran oportunidad de desarrollo profesional.

- ❖ A los miembros del jurado, la Prof. Angela Sotelo y la Prof. Lucía Bascuñan por la revisión y comentarios del presente trabajo.

- ❖ A mis compañeras de trabajo del laboratorio: Lupita, Carolina, Claudia y Martha por todo su apoyo y asesoría durante todo el estudio experimental.

DEDICATORIAS

A mi padre por todo el apoyo y amor incondicional que siempre me ha mostrado y porque tu constancia y entusiasmo siempre será motivo de inspiración para muchos éxitos más. Este logro también es tuyo. Gracias por todo tu amor.

A mi madre, quien con todo su empeño y esfuerzo ha logrado superar las dificultades, sobretodo dando todo por su familia. Gracias por todo tu amor.

A mi hermano, a quien dedico este trabajo como muestra de mi cariño. Espero siempre ser un buen ejemplo en tu vida.

A mi tío Neto, quien sé que disfruta y festeja este éxito tanto como yo en alguna parte cerca de Dios. Tu vida siempre será inspiración de triunfos y logros.

A Mamaty y Minina quien desde el cielo me han protegido y escuchado mi silencio. Gracias por permitirme llegar hasta este momento.

A Victor, por tu amor, apoyo paciencia y comprensión, y por haber llegado a mi vida como una bendición. Gracias por todos tus oportunos comentarios y críticas de este trabajo y por conservarme cerca de tu corazón. TE AMO Chulis.

A Mónica por tantos años de amistad incondicional que parecen no terminar y a tu familia por considerarme una hija más.

A Norma, Ligia, Lilita, Juan Carlos, Miriam, Anafí, Carlos, Pancho, Maribel, Jorge, Vanessa, Larissa, Nayeli, Olga, Itzajade, Edgar, Martín, Marcela, Deyanira y Víctor M. porque sin su amistad mi vida en la Facultad de Química no hubiera trascendido con tanto cariño. Gracias a ustedes viví la mejor etapa de mi vida estudiantil. Me considero muy afortunada de haberlos conocido.

*Un buen comienzo es crítico para casi todo lo que hagamos en la vida.
Esto es particularmente cierto cuando pensamos
en cómo es que crecimos antes de nacer.*

P.W. Nathanielsz

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. MARCO TEÓRICO	
1.1 Nutrición fetal.....	3
1.1.1 Desarrollo fetal y Desnutrición.....	4
1.1.2 Lactancia y Desnutrición postnatal.....	8
1.2 Programación en la vida fetal.....	12
1.2.1 Metabolismo de glucosa e insulina y Programación.....	14
1.2.2 Orígenes fetales de Diabetes Mellitus Tipo2 y Obesidad.....	19
1.3 Programación Fetal Transgeneracional.....	25
1.3.1 Efectos transgeneracionales.....	26
1.3.2 Mecanismos no genómicos.....	30
1.4 Leptina.....	32
1.4.1 Leptina e Insulina.....	35
1.4.2 Leptina y Programación.....	36
JUSTIFICACIÓN.....	39
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo General.....	41
2.2 Objetivos Particulares.....	41

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Modelo biológico y grupos de estudio	42
3.2 Dietas	43
3.2.1 Elaboración de dietas.....	44
3.3 Línea de tiempo	45
3.4 Peso corporal e ingesta de alimento	45
3.5 Obtención de muestras biológicas	46
3.6 Determinación de leptina e insulina en el suero de rata	46
3.6.1 Fundamento.....	47
3.6.2 Procedimiento para la cuantificación de insulina en el suero.....	47
3.6.3 Procedimiento para la cuantificación de leptina en el suero.....	49
3.7 Determinación de glucosa de rata en el suero de rata	50
3.7.1 Fundamento.....	51
3.8 Análisis Estadístico	52

4. RESULTADOS

4.1 Efecto de la dieta sobre el peso corporal y la ingesta de alimento de las madres de la generación cero (F0)	
4.1.1 Peso corporal durante la gestación y la lactancia.....	53
4.1.2 Ingesta de alimento durante la gestación y la lactancia.....	54
4.2 Efecto de la dieta materna (F0) en las crías hembras de la primera generación (F1)	
4.2.1 Perfil de crecimiento.....	55
4.2.2 Crías hembras (F1) en la edad adulta joven	
4.2.2.1 <i>Ingesta de alimento y peso corporal</i>	56
4.2.2.2 <i>Concentraciones de leptina</i>	57
4.2.2.3 <i>Concentraciones de glucosa e insulina</i>	58

4.3 Efecto de la dieta materna (F0) en las crías hembras de la segunda generación (F2)	
4.3.1 Perfil de crecimiento.....	60
4.3.2 Crías hembras (F2) en la edad adulta joven	
4.3.2.1 <i>Ingesta de alimento y peso corporal</i>	62
4.3.2.2 <i>Concentraciones de leptina</i>	63
4.3.2.3 <i>Concentraciones de glucosa e insulina</i>	64
4.4 Efecto de la dieta materna (F0) en las crías machos de la segunda generación (F2)	
4.4.1 Perfil de crecimiento.....	65
4.4.2 Crías machos (F2) en la edad adulta joven	
4.4.2.1 <i>Ingesta de alimento y peso corporal</i>	67
4.4.2.2 <i>Concentraciones de leptina</i>	68
4.4.2.3 <i>Concentraciones de glucosa e insulina</i>	69
5. DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXOS	87

EFFECTOS TRANSGENERACIONALES DE LA DESNUTRICIÓN PROTEÍNICAMATERNAL DE LA RATA SOBRE EL METABOLISMO DE GLUCOSA E INSULINA Y LAS CONCENTRACIONES DE LEPTINA DE LAS CRÍAS

El término de programación fetal o del desarrollo ha sido aplicado para describir el proceso en el cual condiciones subóptimas en periodos críticos del desarrollo intrauterino, tienen consecuencias en la salud del feto en la vida adulta. Los factores ambientales como la desnutrición, programan permanentemente la fisiología y metabolismo de los tejidos y sistemas del organismo. Modificaciones en la morfología y función de los islotes pancreáticos del feto ocasionan cambios en el metabolismo de glucosa e insulina, mientras que alteraciones en periodos críticos del desarrollo del tejido adiposo fetal, puede modificar las concentraciones séricas de leptina en la vida adulta.

Los efectos de la programación fetal no sólo se limitan a la primera generación, sino que pueden tener consecuencias en la salud de las siguientes generaciones. La alteración del ambiente metabólico y endócrino de ratas gestantes desde su propia vida fetal, pueda afectar la salud y crecimiento de sus crías.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la restricción proteínica materna de la rata en las crías de la primera y segunda generación. Se experimentó con el uso de dos tipos de dietas, ambas isocalóricas, pero diferentes en el contenido de proteína; una con la cantidad normal de proteína (dieta control: C) y la otra con la mitad de ésta (dieta restringida: R). De esta manera se logró la restricción proteínica en ratas de experimentación durante la gestación y/o la lactancia. Se observó el efecto de la desnutrición sobre el metabolismo de glucosa e insulina así como la concentración de leptina en suero de sus crías. A su vez, se estudió el efecto de la restricción proteínica en las crías de la segunda generación.

Para el desarrollo experimental de este trabajo, se utilizaron ratas de experimentación preñadas (F0). Los grupos experimentales fueron: control (CC), restringido durante el embarazo y la lactancia (RR), restringido únicamente en el embarazo (RC) o durante la lactancia (CR). Después del destete (día 21), todas las crías consumieron dieta control hasta finalizar el experimento. Las crías hembras de la primera generación (F1), al llegar a la edad adulta fueron apareadas. Las crías hembras y machos (F2), provenientes de los 4 grupos experimentales de la generación cero (F0) fueron estudiados en peso corporal, ingesta de alimento y leptina, así como glucosa e insulina.

Se observó que a la edad adulta joven, los machos (F2) cuyas abuelas (F0) fueron desnutridas durante la lactancia (RR y CR), tuvieron menor peso corporal e ingesta de alimento respecto al grupo control. Este efecto también se presentó en las hembras (F1) las cuales además mostraron menores concentraciones de leptina en estos grupos, en comparación con el grupo control. Respecto al metabolismo de glucosa e insulina se vio que las hembras (F1) de madres (F0) desnutridas durante la lactancia (RR y CR), a pesar de haber mostrado ser sensibles a la acción de la insulina, sus crías machos (F2), en especial los del grupo CR, mostraron altas concentraciones de insulina, lo cual impacta en el metabolismo de glucosa desarrollando intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en la edad adulta joven. Las hembras (F2) cuyas abuelas fueron desnutridas únicamente durante la gestación (RC) mostraron altas concentraciones de insulina, lo cual puede originarse por alteración del ambiente intrauterino de sus madres. Las hembras madres (F1) pudieron haber desarrollado diabetes durante la gestación, como consecuencia de la

alteración hormonal del ambiente intrauterino, lo cual repercute en la salud de sus propias crías en la vida adulta.

Como conclusiones, la restricción proteínica materna de la rata presenta efectos transgeneracionales sobre el crecimiento y metabolismo de glucosa e insulina de las crías cuyas abuelas fueron desnutridas durante la lactancia. Las adaptaciones fetales a la desnutrición proteínica materna alteran no sólo la salud de las hembras de la primera generación (F1) en la vida adulta, sino también la salud y desarrollo de las crías de la segunda generación (F2). Este efecto transgeneracional de la desnutrición proteínica materna fue diferente entre sexos.

*1. Marco
Teórico*

1.1 NUTRICIÓN FETAL

El desarrollo orgánico del individuo depende de las condiciones nutritivas que haya tenido durante la vida intrauterina y el periodo postnatal.

Numerosos factores interactúan para determinar el progreso y el resultado del embarazo. Aunque todavía falta mucho por conocerse sobre la función que desempeña la nutrición en la modificación de este proceso, es ampliamente aceptado que el estado nutricional de la mujer embarazada afecta el resultado de su embarazo. Esto es muy cierto con respecto al peso al nacimiento de su bebé, un factor relacionado con el riesgo de resultados adversos a largo plazo para su salud.³⁹

El ambiente intrauterino en el que vivimos establece el que alcancemos un crecimiento pleno y potencial, lo cual constituye un mayor efecto que el de los genes. El ambiente intrauterino de la madre actúa como una poderosa condicionante del desarrollo durante la vida fetal. El crecimiento normal del feto implica un progreso ordenado y secuencial de divisiones y movimientos de las células, cambios en la adhesión de éstas y finalmente muerte celular. También implica la continua interacción de los reguladores genéticos de los cromosomas (el genoma) y nutrimento (entorno). El potencial del genoma se verá constantemente modificado por los factores del entorno.⁴⁴

Los factores nutricionales y hormonales son determinantes en el crecimiento y desarrollo del feto²⁹, pero en particular depende de los nutrimentos y el oxígeno que recibe de la madre. El suministro de nutrimentos al feto es la principal influencia que regula su crecimiento y depende del estado de salud de la madre, de su composición y talla corporal, su alimentación durante el embarazo, un buen funcionamiento de su corazón, así como de la función placentaria y del flujo uteroplacentario, del estado endócrino y cardiovascular del feto e incluso de la historia prenatal de la madre.^{6,25} Por lo tanto, la nutrición de la madre afecta de manera determinante el crecimiento y la nutrición del feto.

El feto sólo puede obtener nutrimentos por medio de la placenta, un órgano vivo que utiliza a la glucosa como fuente de energía para realizar sus actividades. La sangre de la madre nunca llega a estar en contacto directo con la del feto, por lo que todos los componentes básicos que el feto necesita tienen que atravesar las células de la placenta para alcanzar la sangre del feto y así llevar a cabo la absorción de nutrimentos. La placenta es la única vía por la cual el feto

que está creciendo y desarrollándose, puede obtener los constituyentes básicos que necesita, como son la glucosa, aminoácidos, lípidos, agua, minerales y vitaminas. Si la madre lleva una dieta sana, su sangre contendrá todos los componentes básicos que el feto necesita para la formación de sus tejidos así como para el suministro de energía.⁴⁴

1.1.1 Desarrollo fetal y Desnutrición

El feto crece de acuerdo a un programa perfectamente elaborado, que evoluciona de un modo preciso de una etapa a la siguiente, con un orden preestablecido. En el útero, el feto debe desarrollar una serie de sistemas que le ayudarán a enfrentarse a un entorno que aún le es ajeno. La información necesaria para que pueda responder adecuadamente en ese mundo exterior está contenida en los genes. Gracias a esta información el feto puede responder a los cambios y alteraciones que le impone la actividad de su madre la cual incluye factores relacionados con sus hábitos y estilo de vida, situaciones sobre las que el feto no tiene control pero contra las que puede protegerse aportando respuestas apropiadas.⁴⁴

Durante el desarrollo intrauterino las células se reparten para formar los distintos órganos que conformarán el cuerpo del feto, cada una de ellas conserva ciertas características y pierde otras.^{6,44} Existen dos características distintas y hasta cierto punto contrapuestas en el desarrollo de las células. Se trata del crecimiento y la diferenciación. El crecimiento es una actividad demandante para las células ya que tienen necesidades energéticas y estructurales mucho más grandes que las células que han completado su crecimiento y se han establecido para llevar a cabo su propia función.⁴⁴

Cada tipo de célula es un ejemplo de diferenciación, cuyo papel es asegurar que queden convenientemente cubiertas todas las necesidades del organismo. Durante este proceso una célula se concentra sobre algunas de sus capacidades, excluyendo a otras formando así tejidos nuevos o de reemplazo. Una vez tomada la decisión ya no hay posibilidad de retroceder. Hasta cierto punto, el crecimiento y la diferenciación se excluyen mutuamente. En etapas críticas de desarrollo, las células deben decidir entre continuar su división para producir más células o especializarse para llevar a cabo una función en particular. Una vez que la célula se ha diferenciado ya no suele crecer más y concentra sus actividades en las funciones especializadas que ha asumido en nombre de las demás células del cuerpo. Sin embargo,

existen tejidos que mantienen una reserva de células primitivas e indiferenciadas, que pueden dividirse cuando se les necesita para reemplazar a las células que van muriendo.^{43,44}

La morfología final del cuerpo de un adulto y su correcto funcionamiento dependerán de que cada una de las células haya tomado las decisiones correctas. El cuerpo es una sociedad compuesta de un gran número de células distintas, destinadas a diversos tejidos con el fin de realizar funciones especializadas. El correcto desarrollo del embrión depende del éxito de la comunicación intercelular. En todas las fases de crecimiento y diferenciación, las células necesitan información e instrucciones para poder responder de forma adecuada a los estímulos de su entorno.⁴⁴

Así como algunas células se dividen para formar las distintas partes del cuerpo, otras elaboran la placenta y las membranas que formarán una bolsa a su alrededor para protegerlo y aislarlo. La placenta crece más rápidamente que el feto durante las primeras etapas de la gestación. De esta forma, puede desarrollar su capacidad de abastecer al feto con todos los nutrientes que necesitará en cuanto empiece a crecer rápidamente durante el último trimestre de la gestación.⁴⁴

La placenta tiene que cubrir sus propias necesidades nutricionales a lo largo del embarazo para poder crecer y cumplir su función, por lo que en tiempos de escasez y en los que la nutrición de la madre se vea afectada, la placenta y el feto pueden terminar compitiendo. La placenta puede tomar para sí los nutrientes que estaban destinados para el feto, de modo que éste queda privado de parte de los nutrientes que necesita. Si esto sucede, el feto puede no tener más alternativa que vaciar sus propias y escasas reservas, aumentando su demanda de nutrientes.⁴³

Cuando la demanda nutricional del feto es mayor que el aporte placentario, se desencadena la desnutrición fetal (Fig. 1.1). El feto humano es capaz de adaptarse a la desnutrición. Sus respuestas incluyen cambios metabólicos, redistribución del flujo sanguíneo y cambios en la producción fetal y placentaria de hormonas reguladoras del crecimiento.⁶

Los mecanismos reguladores de los tejidos de la madre se aseguran que su cerebro esté bien abastecido de todos los nutrientes que necesita. Inmediatamente después del cerebro de la madre viene el del feto. El feto hace todo lo posible para mantener el crecimiento de su propio cerebro. La desnutrición fetal origina una distribución selectiva de los nutrientes entre los órganos, protegiendo el crecimiento de algunos como el cerebro, mientras que se

restringe el crecimiento de otros como el hígado y otras vísceras abdominales. Si el suministro de oxígeno que recibe se reduce, el feto pondrá en marcha mecanismos reguladores que mantienen e incluso incrementan el caudal sanguíneo que va hacia el cerebro. Una redistribución similar tendrá lugar si son los nutrientes los que escasean. Todo está organizado para minimizar en lo posible cualquier daño al cerebro.^{6.44, 49}

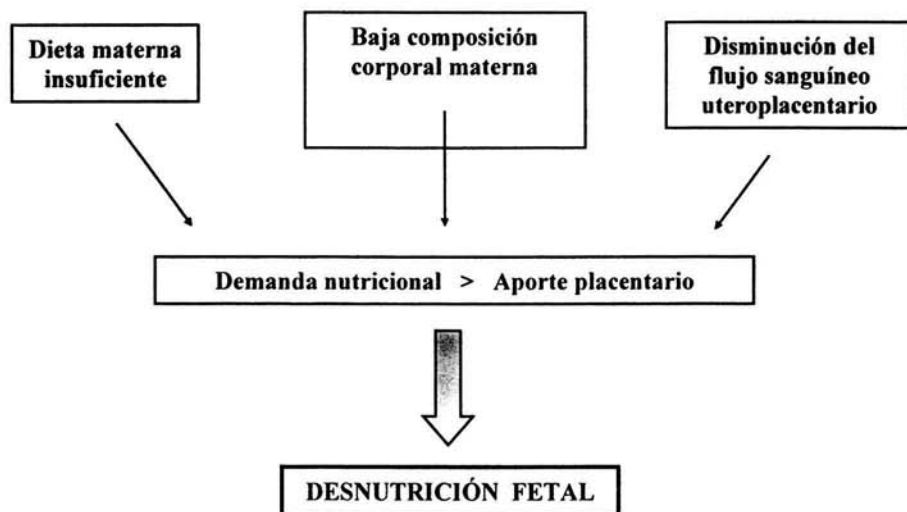


Fig.1.1 Origen de la desnutrición fetal
(FUENTE: Barker, 1998)

La respuesta metabólica inmediata del feto a la desnutrición es el catabolismo, al consumir sus propios sustratos para obtener energía. En contraste a su incapacidad de almacenar oxígeno, el feto sí puede guardar reservas de glucosa, que la servirán como fuente de energía en caso de que la madre no pueda proveerle. La glucosa queda almacenada en forma de glucógeno en su corazón, músculos e hígado, y en la placenta. Si el suministro de glucosa que debe recibir el feto disminuyera, el glucógeno almacenado pasaría a la sangre para que el feto pudiera utilizarlo. Sin embargo, los depósitos de glucógeno del feto son pequeños y quedaría privado del alimento al cabo de un día aproximadamente. Si se gastaran todas sus reservas de glucosa, tendría que destruir sus propios tejidos, tan recientemente formados, para abastecerse de energía.^{6.44}

El ritmo de crecimiento se establece en el primer trimestre de la gestación. Un ritmo acelerado del crecimiento aumenta la demanda de nutrientes y se refleja en el mantenimiento de los requerimientos nutricionales, los cuales son mayores en fetos que han alcanzado un tamaño más grande como resultado de un ritmo de crecimiento más rápido. La desnutrición fetal prolongada se refleja en la disminución en el ritmo de crecimiento. Esto hace que la capacidad del feto para adaptarse a la desnutrición, reduzca el uso de sustratos así como su metabolismo. Si disminuye el ritmo de crecimiento en el último trimestre de la gestación el feto desarrollará órganos de tamaños desproporcionados debido a que los órganos y tejidos que están creciendo rápidamente en esa etapa de la gestación son los más afectados.^{6,25}

Los efectos de la desnutrición fetal dependen de la etapa de la gestación. Durante el primer trimestre, la concentración de nutrientes influyen en el desarrollo y crecimiento del embrión. El estado nutricional de la madre influye en el crecimiento y desarrollo del embrión desde la implantación en el útero. El embrión de pocas células es particularmente sensible a la carencia nutricional. El embrión selecciona el uso de nutrientes y utiliza piruvato, lactato y aminoácidos como la glutamina, más que la glucosa. Antes de ser implantado, el embrión cambia su metabolismo a uno a base de glucosa, por lo que menores concentraciones de glucosa retardan su crecimiento y desarrollo. Por otro lado, las concentraciones elevadas de glucosa, condición presente en la madre diabética, también demora el crecimiento embrionario.^{6,44}

Durante el segundo trimestre de la gestación, la placenta crece más rápido que el feto, por lo que la deficiencia de nutrientes puede afectar el crecimiento fetal cambiando la interacción entre el feto y la placenta. La desnutrición materna grave restringe el crecimiento del feto y la placenta, mientras que durante la desnutrición moderada el crecimiento del feto puede sacrificarse para mantener la función de la placenta.⁶

En el último trimestre de la gestación, la desnutrición puede resultar en la disminución inmediata del crecimiento fetal y alterar la interacción metabólica entre el feto y la placenta. La desnutrición prolongada puede disminuir el ritmo de crecimiento fetal de manera irreversible por lo que hay reducción del tamaño del bebé al nacer.^{6,7}

Condiciones adversas al inicio de la gestación produce un retardo simétrico en el crecimiento en donde el cuerpo completo del feto es afectado. El número total de células en todas las

partes del cuerpo es reducido. Por otro lado, condiciones desfavorables a finales de la gestación, produce efectos asimétricos los cuales afectan el número total de células de los diferentes órganos fetales. Cada órgano es afectado de forma distinta de acuerdo al ritmo de crecimiento de cada uno y dependiendo del tiempo preciso de cuando el feto estuvo expuesto a la condición desfavorable, en este caso a la desnutrición fetal.^{43,44}

1.1.2 Lactancia y Desnutrición postnatal

Al nacer el bebé e iniciarse la lactancia, en cierta forma se prolonga el proceso de alimentación, crecimiento y desarrollo que tuvo durante la gestación. La diferencia consiste en que ahora la glándula mamaria ha sustituido a la placenta como proveedor de nutrimentos. La nutrición de la madre continúa siendo determinante del estado nutricional del niño en la vida extrauterina.²

Desde que inicia la vida extrauterina, el recién nacido debe alimentarse adecuadamente, para lo cual es necesario que coincidan por lo menos tres factores: un aporte de leche de buena calidad y cantidad, capacidad del recién nacido para succionarla y deglutirla, y un aparato digestivo sano capaz de absorber el alimento.³⁵

La leche materna es el alimento ideal, en calidad y cantidad, para el recién nacido, siempre y cuando la madre se encuentre bien nutrida. La leche materna cubre todos los requerimientos nutricionales del recién nacido durante el periodo postnatal. En la producción de la leche intervienen los nutrimentos previamente asimilados por la madre, acumulados en sus tejidos de reserva.³⁵

La leche materna es una emulsión de agua con lípidos, hidratos de carbono y proteínas (entre ellas las inmunoglobulinas), además de vitaminas y minerales. Las proteínas reciben el nombre de lactoglobulinas, lactoalbúminas y caseína, y son sintetizadas por las células de la glándula mamaria a partir de aminoácidos de la sangre. La lactosa, el principal hidrato de carbono en la leche al igual que las proteínas, es sintetizada por la glándula mamaria. A diferencia de lo que sucede con la lactosa y las proteínas de la leche, los lípidos no son sintetizados en la glándula mamaria por lo que son sintetizados y transportados de otros sitios.^{2,16}

La leche humana además de proporcionar los nutrimentos adecuados, contiene sustancias con actividad antimicrobiana y compuestos que actúan como señales biológicas para el niño, que promueven el crecimiento y diferenciación celular.⁷¹

Uno de los factores que más influyen en la composición de la leche materna es la etapa de la lactancia en que se encuentre. La fisiología distingue tres etapas:

- a) la etapa inicial en que se produce el calostro;
- b) la etapa de transición; y
- c) la etapa de estabilización en que se produce la leche madura.

Generalmente las dos primeras etapas son muy cortas. En el caso de la lactancia humana, la primera etapa dura aproximadamente 5 días, la de transición de una a dos semanas y la de estabilización, la cual termina con el destete, varios meses. Durante esta última etapa la composición de la leche es más estable aunque tiende a diluirse después de cuatro meses. En la tabla 1.1 se muestra la composición química de la leche humana madura.

Durante los primeros días de vida, el recién nacido recibe el calostro, un líquido amarillo transparente que satisface sus necesidades durante la primera semana. Contiene menos grasa y carbohidratos, pero más proteína y mayores concentraciones de sodio y potasio que la leche madura.³⁹

Tabla 1.1 Composición química de la leche humana madura.

FUENTE: Bourges,1997.

COMPONENTE	CONTENIDO (en 100 ml)
Agua (g)	87
Lactosa (g)	6.8
Proteínas (g)	1.1
Lípidos (g)	4.5
Vitamina A (mg Eq)	63
Vitamina B1 (mg)	16
Vitamina B2 (mg)	36
Niacina (mg)	147
Vitamina B6 (mg)	10
Vitamina B12 (mg)	0.1
Vitamina C (mg)	4.3
Vitamina D (U.I.)	2.1
Calcio (mg)	34
Fósforo (mg)	14
Sodio (mg)	0.7
Potasio (mg)	1.3
Energía (kcal)	75

Durante la lactancia, los requerimientos de energía son muy altos, lo cual se compensa con el aumento en el consumo de alimento. La madre necesita recibir una cantidad adicional de nutrimentos para cubrir las necesidades impuestas por esta situación fisiológica. En la etapa de plena producción de leche dichas necesidades son muy importantes, al grado de que representan aproximadamente el doble de los requerimientos nutricionales de la gestación en la época de mayor crecimiento fetal.

La capacidad para secretar leche depende del número y de la actividad de las células mamarias; el desarrollo de estas células antes y después del parto requiere proteína adicional para este crecimiento mamario. Durante la lactancia se incrementa considerablemente la demanda de aminoácidos que varía de acuerdo a la cantidad de leche y a su contenido de

proteínas. Se recomienda que los requerimientos adicionales de energía durante la lactancia humana sea de 500 kcal /día adicionales al nivel requeridos por las mujeres no embarazadas. En cuanto a proteína, el requerimiento nutricional contempla 17 g adicionales durante los primeros seis meses de la lactancia y 12 g durante los siguientes seis meses, cuando se produce menos leche.^{2,39}

El aumento en el gasto total de energía en mujeres lactantes tiene relación con el aumento en el consumo de glucosa por la glándula mamaria, lo cual se determina por la composición corporal de la madre.³⁹

Existen diferencias en el contenido de proteína en leches provenientes de diferentes especies. En el caso de la rata y el humano, la rata produce leche con concentraciones de proteína de 8.1g/100ml, mientras que la leche humana madura contiene 1.1 g/100 ml. La diferencia se atribuye al tamaño corporal, al número de crías por camada y al grado de desarrollo que alcanza la cría al momento de nacer.¹¹

Sin duda, la lactancia materna tiene efectos muy importantes a corto plazo en el crecimiento, tanto en peso como en talla del lactante, y estos efectos pueden resultar benéficos a largo plazo para su salud en la vida adulta.

La calidad y cantidad de leche materna depende del estado nutricional materno. La buena nutrición, si bien es siempre importante, resulta fundamental en los periodos de crecimiento y desarrollo rápidos. Este es el caso de los primeros meses y años de la vida. Se considera que en condiciones de buena nutrición, la madre inicia la lactancia con reservas suficientes de energía acumulada durante la gestación, reservas que son utilizadas durante las fases iniciales de la lactancia. Sin embargo, si la madre terminó la gestación sin haber acumulado dichas reservas, seguramente influirá negativamente en la eficacia de la lactancia. Generalmente, las madres desnutridas durante la lactancia producen menos leche y de menor calidad, con deficiencias en vitaminas hidrosolubles, proteína, calcio y lípidos.^{2,35, 57}

La desnutrición en esta etapa trasciende en la vida del lactante de muchas maneras. Los efectos que puede provocar la calidad nutricional de la dieta materna durante la lactancia se ven reflejados en su propio estado nutricional, en la calidad de la leche y en el crecimiento de su bebé. Se ha observado que el efecto de la desnutrición durante la lactancia de la rata, afecta el peso corporal y el crecimiento de las crías.⁵

Por otro lado, los efectos de la restricción proteínica durante la lactancia de la rata también se observan a nivel celular. Las ratas en periodo de lactancia aumentan la síntesis de proteína en la glándula mamaria y en el hígado. La baja ingesta de proteína durante la lactancia de la rata provoca que la síntesis de proteína en la glándula mamaria y en el hígado, disminuyan.^{59,62}

La desnutrición durante la lactancia presenta consecuencias particularmente graves para el sistema nervioso central. La disminución del número de neuronas y conexiones sinápticas son daños irreversibles en el cerebro de lactantes que sufrieron desnutrición. La mala nutrición en este periodo, además de las consecuencias inmediatas, produce efectos a largo plazo que comprometen la calidad de la vida futura del individuo.^{39,71}

1.2 PROGRAMACIÓN EN LA VIDA FETAL

Durante el desarrollo fetal en el útero, hay una constante relación entre la herencia genética del feto y el ambiente en el cual se desarrolla. El resultado del desarrollo fetal depende de la naturaleza incluida en los genes, y de la nutrición, la cual se mantiene por las condiciones del ambiente intrauterino.

La vida antes del nacimiento representa retos y situaciones estresantes para el desarrollo fetal. Existen factores ambientales que están asociados con condiciones de estrés intrauterino y que afectan el crecimiento del feto. Ejemplos de estos factores ambientales son la falta de oxígeno o hipoxia, la ingesta de alcohol de la madre, el humo de cigarrillos si la madre fuma, infecciones, los fármacos o las temperaturas muy altas. Muchos de estos factores provocan reducción del flujo sanguíneo hacia el útero, lo cual reduce el suministro de nutrientes y oxígeno que llegará a la placenta y al feto. Esta disminución terminará produciendo un retraso en el crecimiento fetal.⁴⁴

Desde el punto de vista biológico, cada organismo que sobrevive y se reproduce, está por definición adaptado a su ambiente. El individuo desnutrido se adapta a su ambiente restringido en nutrientes mediante el lento aumento de peso corporal sobretudo en periodos tempranos del desarrollo, además de ajustar su metabolismo a la deficiente disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, una vez adaptado la estrategia de supervivencia exige condiciones de adaptación que realmente beneficien al individuo. La adaptación más exitosa del feto será la continua flexibilidad durante todo su desarrollo, en donde podrá permanecer pequeño y

eficiente si el ambiente intrauterino permanece pobre. El retraso en el crecimiento implica que el organismo ha aumentado potencialmente su acondicionamiento, promoviendo su sobrevivencia inmediata mediante cambios morfológicos, metabólicos y endócrinos permanentes. Existe un costo para tal adaptación, sin embargo este costo no aparece sino a largo plazo, en término del estado de salud y mayor riesgo de enfermedades.^{6,37,73}

El término de programación fetal ha sido aplicado para describir el proceso en el cual condiciones subóptimas en periodos críticos del desarrollo intrauterino y postnatal, tienen consecuencias en la salud en la vida adulta (Fig. 1.2). Los factores ambientales como la desnutrición, programan permanentemente la morfología y fisiología de los tejidos y sistemas del organismo.^{26,38}

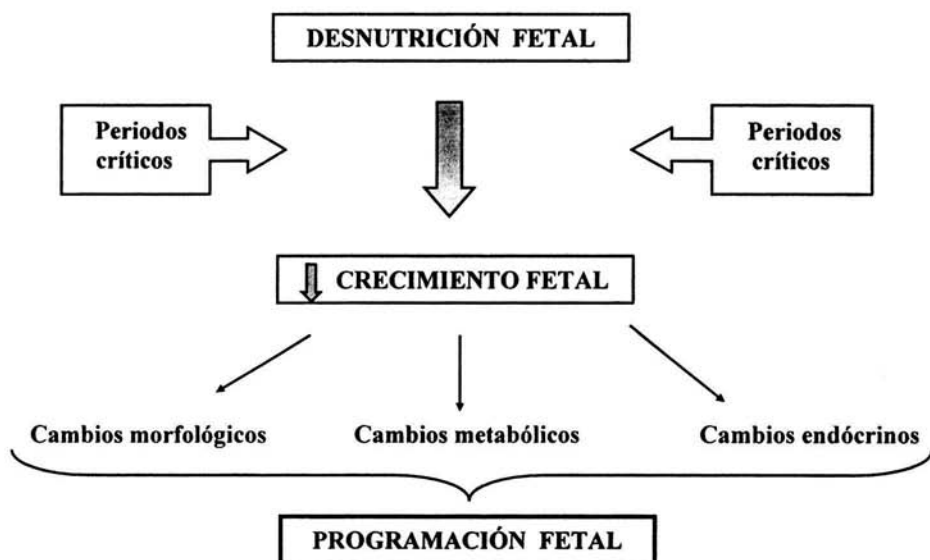


Figura 1.2 Mecanismos de adaptación fetal a la desnutrición intrauterina
FUENTE: Modificado de Barker, 1998.

Para entender cómo es que las reglas biológicas de la vida intrauterina pueden afectar nuestra vida postnatal, es importante tener en cuenta varios principios que sigue la programación fetal. Existen dos conceptos que son fundamentales en el crecimiento y desarrollo de toda persona: la presencia de periodos críticos del desarrollo en los cuales se lleva a cabo la programación fetal y los efectos permanentes e irreversibles de la programación. Un principio

que debemos recordar es que durante la programación, órganos importantes del organismo sufren diferentes cambios estructurales, lo cual involucra que existan cambios en el número de células en algún órgano o que el abastecimiento de sangre a un órgano importante no sea suficiente.⁴³

Otro de los principios de la programación fetal plantea que la placenta juega un papel muy importante en la programación, que tiene diferentes efectos en hombres y en mujeres, y uno más menciona que en un ambiente intrauterino desfavorable, el feto se adapta a las deficiencias.⁴³

Estudios epidemiológicos han mostrado que la calidad de vida en épocas tempranas del desarrollo puede afectar profunda e irreversiblemente las características fisiológicas y metabólicas del adulto, apoyando la hipótesis de la programación fetal. Un investigador pionero de este concepto fue el Dr. David J. Barker, quien junto con sus colaboradores en la Universidad de Southampton en Inglaterra, han estudiado los efectos de la experiencia prenatal en la salud humana. Uno de sus estudios fue el registro de nacimientos de más de 15.000 hombres y mujeres nacidos en Hertfordshire, en Inglaterra. En una amplia variedad de análisis en los que se utilizó ese conjunto de datos se encontró una relación entre las medidas del crecimiento del recién nacido y lactante, y la enfermedad cardiovascular y mortalidad por esa causa en la edad adulta. El Dr. Barker ha difundido los datos registrados en humanos en relación a la vida intrauterina y la salud en la vida adulta, incluyendo poblaciones de Europa, India y China.^{7,26}

Al ser el Dr. Barker, el pionero de la idea de que la salud humana está programada como resultado de la experiencia prenatal, muchos investigadores en este campo han llamado al término de programación fetal, la hipótesis de Barker.

1.2.1 Metabolismo de glucosa e insulina y Programación fetal

Durante la gestación, la madre es la fuente de glucosa para el feto. El metabolismo de glucosa durante la primera mitad del embarazo, es un periodo de anabolismo sostenido por la madre. Durante este tiempo, el aumento de calorías que ingiere la madre no sólo sostiene el crecimiento fetal sino que también se almacenan como glucógeno y lípidos en la madre. El almacenamiento de energía durante la primera mitad del embarazo es importante para la

segunda mitad, al ser un periodo de crecimiento logarítmico del feto. Durante este tiempo, las demandas energéticas del crecimiento rápido fetal requiere no sólo la energía adquirida de la ingesta de alimentos de la madre, sino también de la energía almacenada durante la primera mitad del embarazo. Las alteraciones en la sensibilidad y disponibilidad de la insulina materna es importante en este proceso.⁵¹

Después de la absorción celular, la glucosa se utiliza de inmediato para proveer de energía a la célula. La insulina, hormona reguladora del flujo de glucosa hacia las células, aumenta enormemente el transporte de glucosa. Cuando el páncreas secreta grandes cantidades de insulina, el transporte de glucosa aumenta en la mayoría de las células hasta diez veces o más que cuando no hay insulina. Es así como la insulina es un importante regulador de la disponibilidad de energía para las células.^{43,37}

Por otro lado, la insulina desempeña varias funciones para almacenar la energía sobrante o en exceso:

1. Favorece la glucogénesis, proceso de síntesis de glucógeno a partir de glucosa. Así la insulina facilita la captación, almacenamiento y utilización de glucosa por el hígado y el músculo.
2. Favorece la síntesis y el depósito de lípidos. El aumento en la ingesta de hidratos de carbono aporta el sustrato para la síntesis de ácidos grasos los cuales son transportados desde el hígado hacia las células adiposas, promoviendo un depósito de grasa en el tejido adiposo.
3. Si el exceso es de proteínas, la insulina ejerce un efecto directo para que las células absorban más aminoácidos y los transformen en proteínas, inhibiendo el catabolismo de proteínas.

Otra ruta importante para la producción endógena de glucosa fetal es a través de su síntesis a partir de precursores como ciertos aminoácidos, lactato o piruvato. Aunque la regulación de la gluconeogénesis ha sido estudiada en humanos adultos, la capacidad de llevar a cabo la gluconeogénesis en el feto humano, no ha sido suficientemente expolarada. Para que la glucosa pueda ser sintetizada a partir de sustratos como lactato, se requiere de la presencia de las enzimas clave, localizadas principalmente en el hígado fetal.⁵¹

El estado nutricional de la madre es importante para la posterior acumulación de glucógeno fetal. La ruptura de glucógeno (glucogenólisis) que resulta en la disponibilidad de la glucosa

como fuente de sustrato, es un importante factor que contribuye a la homeostasis de la glucosa durante el periodo perinatal y tiene un valor importante de sobrevivencia para el feto durante condiciones subóptimas. En órganos fetales como el hígado y el riñón, la ruptura del glucógeno puede ser inducida por hormonas como el glucagon o por estímulos ambientales como el frío, la hipoxia o la desnutrición.⁵¹

Cuando el feto está desnutrido requiere de otra fuente de energía, dado que la madre no cubre éstas necesidades. Durante la desnutrición, el feto promueve una manera de sobrevivir minimizando el uso de energía y aprovechándola al máximo, dando prioridad a aquellos tejidos que en proceso de desarrollo la necesiten más.⁴⁴

El feto metabólicamente programado, tendrá alteraciones permanentes en la estructura y función o metabolismo de órganos.^{48,49} No sólo se altera la estructura de órganos importantes en el metabolismo de glucosa como el páncreas y el hígado sino también hay cambios permanentes tanto en sus funciones metabólicas como en la expresión genética de enzimas.^{17,46}

Durante la programación fetal ocurren diferentes cambios estructurales en órganos importantes, lo cual involucra que:

- el número total de células de un órgano aumente o disminuya
- la distribución relativa de diferentes tipos de células de un órgano puedan estar desproporcionadas
- puede no haber abastecimiento sanguíneo normal al órgano

Las células fetales de los diferentes órganos y tejidos del cuerpo son más vulnerables cuando están dividiéndose rápidamente.⁷ Debido a que los órganos fetales están creciendo a diferentes etapas y ritmos de la vida fetal, los resultados a largo plazo serán distintos de acuerdo al momento preciso en el que el feto sufrió una condición desfavorable como la desnutrición. Durante la desnutrición fetal, el crecimiento de algunos órganos como el cerebro está relativamente protegida, mientras que otros como el hígado y el páncreas sufren más el efecto de la distribución de nutrientes debido a que utilizan menos energía para su crecimiento. El reto de desarrollarse bajo condiciones adversas puede ocasionar que el feto presente problemas en su salud a largo plazo. Los problemas pueden ser generales o restringirse a órganos en específico como el corazón, el cerebro o el páncreas.^{43,49}

Estudios epidemiológicos han demostrado que existe una relación entre la disminución del crecimiento fetal y el subsecuente desarrollo de enfermedades metabólicas como hipertensión, dislipidemias, diabetes y obesidad.⁴⁹ Por otra lado, se han llevado a cabo estudios con animales de experimentación para explorar los mecanismos que pueden explicar los hallazgos epidemiológicos relacionados con el aumento del riesgo de padecer enfermedades en la vida adulta y la experiencia intrauterina del individuo.⁴⁸

Se ha propuesto que la hipótesis del fenotipo ahorrador provee un concepto que puede ser estudiado en animales de experimentación; dicha hipótesis plantea que durante la desnutrición intrauterina, el feto puede desarrollar el fenotipo ahorrador, como una manera de almacenar energía al encontrarse en un ambiente de escasez. El fenotipo ahorrador adapta al feto a sobrevivir en un ambiente donde los recursos nutrimentales son escasos, por lo que el feto queda programado para sobrevivir en dichas condiciones después del nacimiento. Sin embargo, cuando el estrés nutricional intrauterino se combina con abundancia en la vida postnatal, se favorece el desarrollo de enfermedades metabólicas en la vida adulta.^{43,49}

(Fig.1.3).

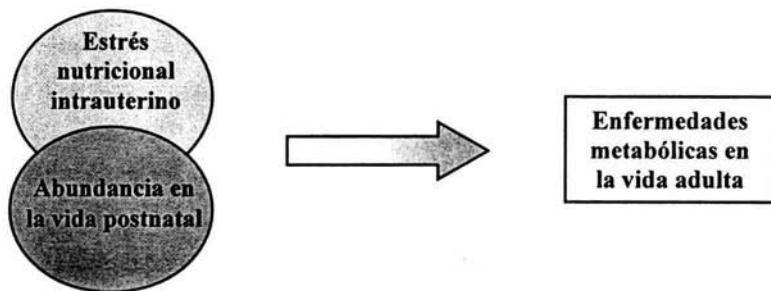


Figura 1.3 Hipótesis del fenotipo ahorrador

Por lo que si durante la vida intrauterina el feto desarrolla el fenotipo ahorrador, quedará metabólicamente programado, presentando alteraciones permanentes en la estructura y función metabólica de un órgano. Un ejemplo de esto son los estudios realizados con animales de experimentación, sobre los efectos de la programación fetal en la estructura y función de los islotes pancreáticos. Se ha demostrado que la desnutrición intrauterina o en la vida postnatal temprana puede reducir el número de células beta y la secreción de insulina,

favoreciendo alteraciones en el metabolismo de glucosa e insulina. Cuando éstas alteraciones se combinan con el fenotipo ahorrador, se favorece el desarrollo de intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 (no dependiente de insulina).^{7,23,49}

Por otro lado, un mecanismo celular por el cual podría explicarse cómo es que la memoria de los eventos de la programación fetal se almacenan de tal manera que se ven expresados en la vida adulta, es mediante el estudio de alteraciones en la expresión genética de enzimas clave involucradas en el metabolismo, como el de glucosa y el de lípidos. La programación puede alterar permanentemente la expresión de dichas enzimas, aumentando o disminuyendo su actividad en los diferentes tejidos y órganos.^{6,17} Por lo que los efectos de la programación fetal no sólo se observan a nivel fisiológico y bioquímico, sino también a nivel celular y molecular mediante la regulación de la expresión genética.

Estudios con animales de experimentación han demostrado que al alimentar ratas gestantes con dieta baja en proteína, se altera permanentemente la actividad de dos enzimas localizadas en el hígado y que regulan la síntesis y ruptura del glucógeno. La glucocinasa, enzima reguladora de la glucólisis y la PEPCCK (fosfoenolpiruvato carboxilasa), enzima clave de la gluconeogénesis. Se ha observado que hígados de crías cuyas madres fueron restringidas en proteína en la gestación, presentan mayor actividad de la PEPCCK y menor actividad de la glucocinasa, mientras que en el grupo control sucede lo contrario. La expresión de éstas dos enzimas hepáticas en crías desnutridas durante su vida intrauterina, es programada de tal forma que su permanente alteración resulta en resistencia hepática a la insulina.^{17,18}

Por otro lado, estudios experimentales han evaluado la actividad de varias enzimas reguladoras de las vías glucolíticas. Se ha medido la actividad de las enzimas PEPCCK (fosfoenolpiruvato carboxilasa), piruvato carboxilasa, fructosa 1-6 difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa en hígado fetal de varias especies, incluyendo humanos.⁵¹ Aunque la actividad de la glucosa 6-fosfatasa está presente a partir de la doceava semana de gestación en el humano, la actividad de la PEPCCK es considerablemente menor en la vida postnatal y parece estar limitada en su velocidad para la producción de glucosa.⁵¹

1.2.2 Orígenes fetales de Obesidad y Diabetes mellitus tipo 2

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de muerte en el mundo. Durante los últimos cincuenta años, la investigación sobre su origen se ha enfocado en cuatro principales factores. Estos son la dieta, fumar, el ejercicio y el estilo de vida urbano y estresante. Nueva evidencia epidemiológica, clínica y experimental ha logrado demostrar que nuestro sistema cardiovascular queda programado durante la vida fetal por el ambiente intrauterino en el que nos desarrollamos antes de nacer. Este hecho puede ser el factor más importante de todos para la predisposición de riesgo de enfermedades cardiovasculares en la vida adulta.⁴³

Las adaptaciones prenatales que alteran de forma permanente el metabolismo para responder favorablemente a la desnutrición, pueden ser contraproducentes si el ambiente prenatal es diferente al esperado. El feto con el fenotipo ahorrador estará más expuesto a la abundancia de nutrientes, después de haber programado su apetito y sus mecanismos de control metabólico para sobrevivir en condiciones de escasez alimenticia. Las personas preparadas en su vida intrauterina para sobrevivir en una vida de escasez, después del nacimiento pagarán el precio si viven en un ambiente de alto consumo de alimentos.⁴³ Cuando esto sucede, las personas estarán más predispuestas al desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2 (no dependiente de insulina). El desarrollo del fenotipo ahorrador explica el por qué el riesgo de padecer diabetes es más alto en adultos que tuvieron bajos pesos al nacimiento.¹⁸

DIABETES MELLITUS TIPO 2. La diabetes es una de las enfermedades más frecuentes en la actualidad. El número de personas con diabetes en el mundo en 1995, fue de 135 millones, de los cuales 51 millones eran de países desarrollados.⁶¹ Se espera que para el año 2025, la cifra aumente a 300 y 72 millones, respectivamente. El 90% de los pacientes diabéticos presentan diabetes tipo 2 ó no dependiente de insulina. La población mexicana tiene una de las prevalencias más altas del mundo, la cual se ha incrementado en los últimos años, probablemente como consecuencia del sedentarismo, el alto consumo de hidratos de carbono y la obesidad , entre otros factores.⁷²

La resistencia a la insulina es en esencia la reducción de la sensibilidad a la insulina, que impide que esta hormona disminuya la concentración de la glucosa plasmática por su falta de

absorción por tejido periférico además de la sobreproducción de glucosa por el hígado. La resistencia a la insulina desencadena la diabetes.³⁷

En la diabetes mellitus tipo 2 existe una combinación de resistencia y deficiencia a la acción de la insulina. Las alteraciones en el metabolismo de glucosa pueden resultar de alguno de los siguientes factores:³⁷

- a) incapacidad de secretar insulina
- b) incapacidad de la insulina para inhibir la producción de glucosa hepática y promover el aprovechamiento periférico de la glucosa (resistencia a la insulina)
- c) incapacidad de la glucosa para entrar a las células por deficiencia de la insulina (intolerancia a la glucosa).

Dentro de los efectos del estrés intrauterino y sus consecuencias a largo plazo, está la diabetes tipo 2, una de las enfermedades más estudiadas. Un hallazgo epidemiológico realizado con hombres de 64 años de edad en Hertfordshire, Inglaterra logró relacionar el desarrollo temprano y el riesgo de padecer intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2 en la vida adulta. Se observó que la proporción de hombres con intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2, aumentaba con peso bajo al nacimiento. Los hombres con menor peso al nacimiento fueron cerca de siete veces más propensos de presentar intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2, a diferencia de aquellos cuyos pesos al nacimiento fueron mayores. Otro estudio fue el realizado con la población de los indios Pima de Norteamérica, en donde hay una alta incidencia de diabetes. Los bebés con bajo peso al nacimiento mostraron mayor riesgo de padecer diabetes tipo 2, al igual que los bebés de mayor peso al nacimiento. Sin embargo, éstos últimos se asocian al desarrollo de diabetes gestacional de la madre.^{7,45}

Aunque la evidencia epidemiológica humana sugiere que el origen fetal de la intolerancia a la glucosa se debe principalmente a cambios en la sensibilidad a la insulina más que a defectos en su secreción, cambios en la morfología y función de los islotes pancreáticos durante la vida intrauterina pueden contribuir al aumento en la susceptibilidad de padecer diabetes tipo 2.^{23,53}

Existe evidencia experimental, en ratas y ratones de experimentación, para la programación fetal del páncreas. Cambios en el ambiente nutricional intrauterino altera la estructura y función de los islotes pancreáticos, lo cual tiene efectos en la vida adulta del individuo. La vida fetal y neonatal son periodos críticos para el desarrollo de las células β pancreáticas.

Alrededor del año de edad, casi la mitad de la masa celular β adulta ya se encuentra presente.^{23,45}

En humanos, el porcentaje de tejido pancreático al nacimiento es proporcional al peso al nacimiento. Cuando se presenta retardo del crecimiento fetal, el porcentaje de tejido pancreático se reduce de un 4% a sólo 2% del total del páncreas. Los niveles basales de glucosa y los estimulados por insulina, también son bajos en estos niños. Estas observaciones clínicas sugieren que las condiciones subóptimas afectan el desarrollo del páncreas.²³

La secreción de insulina por las células β es indispensable para la absorción de glucosa por los tejidos fetales sensibles a la insulina. La obstrucción de las células β provocan el desarrollo de hiperglicemia, menor consumo de glucosa, y por lo tanto, a un retardo en el crecimiento fetal. Las células β actúan como sensores de la insuficiencia nutricional y muestran respuestas apropiadas a cambios en los niveles de glucosa que ocurren en el feto y tienen un papel fisiológico importante en la regulación del metabolismo fetal.²³ El retardo en el crecimiento fetal se asocia con la disminución en el número de células β y en la secreción de insulina, mientras que la diabetes gestacional provoca hiperinsulinemia.⁷

El desarrollo de las células de los islotes pancreáticos fetales depende de la disponibilidad de glucosa y aminoácidos. Las células β parecen ser muy sensibles a la baja ingesta de proteína en la dieta materna. Muchos de los estudios experimentales de la restricción proteínica materna en ratas se han enfocado a los efectos en el desarrollo del páncreas. Se ha observado que la desnutrición proteínica en la vida fetal o durante la vida postnatal temprana puede reducir el número de células β del páncreas, la secreción de insulina y la vascularización de los islotes pancreáticos, lo cual provoca el desarrollo de intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2.^{7, 23, 45} (Fig. 1.4).

La baja secreción de insulina no será perjudicial para aquellos individuos que continúan con escasez nutricional, conservando bajo peso corporal y que por lo tanto, permanecen sensibles a la acción de la insulina. Mientras que la intolerancia a la glucosa puede desarrollarse por un balance positivo de energía como resultado del aumento en la ingesta de alimento y disminución en el gasto energético, dando lugar al desarrollo de la obesidad.²³

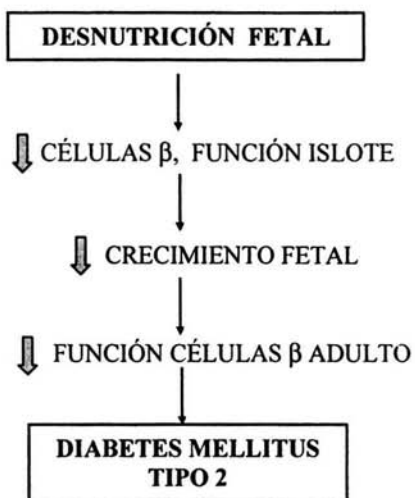


Figura 1.4 Origen fetal de diabetes mellitus tipo 2

OBESIDAD. La obesidad es una enfermedad metabólica crónica, resultado de la alteración del balance energético.¹³ El estilo sedentario de la vida urbana y el desequilibrio entre el consumo de alimentos y la actividad física han hecho que la frecuencia de casos de obesidad entre la población mexicana y la población mundial hayan aumentado en los últimos dos decenios.⁶⁸

Los motivos de esta enfermedad son multifactoriales (Fig. 1.5). Entre las principales causas que aumentan el riesgo de padecer obesidad se encuentran los factores biológicos (genéticos, raza, edad, género), factores fisiológicos (metabólicos y endócrinos, ej. embarazo) y los factores ambientales (nutrición, nivel de actividad física, fumar o consumir alcohol, estado socioeconómico).

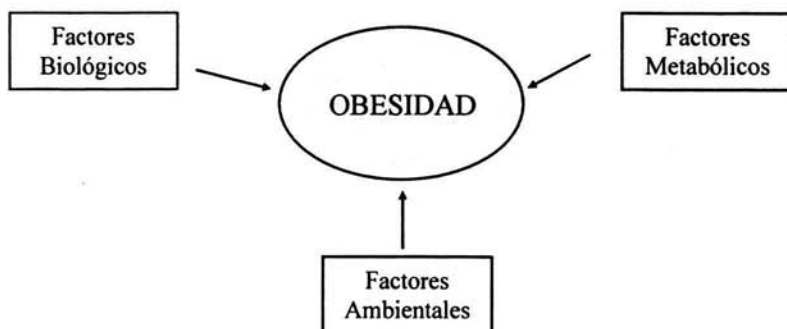


Figura 1.5 Causas de la obesidad

Los factores perinatales ambientales como el estilo de vida y la dieta, aceleran el desarrollo de obesidad y el riesgo de padecer diabetes tipo 2 aumenta en personas obesas o con sobrepeso.^{7,70} Datos epidemiológicos sugieren que el origen de la obesidad proviene desde antes del nacimiento.⁵⁴ La vida fetal parece ser un periodo crítico para el desarrollo de obesidad, sin embargo los mecanismos por los cuales los factores ambientales como la dieta, regulan el sistema fisiológico del control del apetito no han sido del todo entendidos. Por otro lado, la hipótesis de la programación fetal señala que los cambios ambientales a los cuales es expuesto el feto, pueden alterar el desarrollo intrauterino lo cual se refleja en el riesgo de padecer obesidad a largo plazo.^{7,54}

La obesidad juega un papel importante en la hipótesis del fenotipo ahorrador. Una persona obesa es más propensa a padecer enfermedades metabólicas como diabetes tipo 2, la cual generalmente es proporcional al exceso y ubicación corporal del tejido adiposo. La obesidad se combina con el fenotipo ahorrador y favorece el desarrollo de diabetes.

Los efectos de la vida intrauterina en la obesidad en la vida adulta, fueron observados en estudios realizados en hombres nacidos durante la invasión nazi a Holanda occidental en la Segunda Guerra Mundial. La invasión coincidió con un invierno crudo durante los meses de septiembre de 1944 a mayo de 1945, por lo que es conocido como “Invierno Hambriento Holandés”. Las raciones de alimentos se redujeron de 1,800 kcal/día a 600 kcal/día durante la hambruna de estos seis meses, y posteriormente aumentaron a 1,700 kcal/día cuando terminó la invasión.⁵⁸ Por lo que los efectos específicos de la hambruna en la salud del feto en la vida adulta, dependían de la etapa de la gestación en la cual la madre no tuvo la nutrición adecuada. Los hombres nacidos durante el “Invierno Hambriento Holandés” fueron más propensos a padecer obesidad en la vida adulta, si su madre fue desnutrida durante el primer trimestre del embarazo. Mientras, que si la madre era desnutrida durante el último tercio del embarazo, la tendencia de estos bebés a padecer obesidad en la vida adulta disminuía.⁴⁴ Este estudio es ejemplo de uno de los principios de la programación fetal, el cual explica que durante el desarrollo existen periodos críticos que afectan de diferente forma y en diferentes tiempos a los tejidos y sistemas del cuerpo. Las células que se encuentran dividiéndose rápidamente estarán en mayor riesgo.⁴⁴ Si durante la vida fetal, los adipocitos se dividen rápidamente durante el último trimestre de la gestación, las personas cuyas madres sufrieron desnutrición en esta etapa, presentarán menor tendencia a la obesidad. El número de adipositos y de tejido adiposo será menor .

Por otro lado, existen estudios con animales de experimentación en los que siguiendo un modelo biológico de programación fetal como la ingesta de dieta baja en el contenido de proteína durante la gestación, se ha observado el fenotipo de la obesidad y las alteraciones metabólicas comúnmente presentadas en poblaciones humanas.^{13, 69} Se ha visto que a largo plazo se presenta hiperfagia como consecuencia de la programación fetal, lo cual contribuye al desarrollo de obesidad, aumentando el riesgo de padecer enfermedades metabólicas. El efecto de la programación fetal en la salud en la vida adulta aumenta en crías de animales de

experimentación expuestos a condiciones subóptimas durante la gestación y que en la vida postnatal fueron alimentados con dietas hipercalóricas.⁶⁹

La obesidad es condicionante del desarrollo de enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2, y si éste se combina con el mal funcionamiento de órganos como el hígado, consecuencia de la programación fetal, se favorece el riesgo de padecer el síndrome metabólico.

1.3 PROGRAMACIÓN FETAL TRANSGENERACIONAL

Las principales hipótesis propuestas para explicar el mecanismo por el cual el bajo peso al nacimiento se asocia con el desarrollo de enfermedades, han sido planteadas a partir de la desnutrición fetal y la exposición prenatal a glucocorticoides, estudiadas en animales de experimentación. Sin embargo, los factores genéticos también influyen en esta relación.

Durante la vida intrauterina, existe una constante interacción entre nuestra herencia genética y el ambiente en el cual nos desarrollamos. Somos producto de nuestra naturaleza contenida en los genes y de los nutrimentos que adquirimos del ambiente, sin embargo la expresión genética se verá modificada por los factores del entorno.⁴³

Se conoce poco sobre los genes que controlan las adaptaciones hormonales, metabólicas y cardiovasculares a la desnutrición fetal. La función principal de la información genética es permitir a la célula y al organismo mantener la homeostasis ante condiciones ambientales subóptimas. Los genes permiten conservar las concentraciones intracelulares necesarias para la sobrevivencia del feto mientras se mantenga el abastecimiento externo de estas concentraciones. Una de las respuesta fetales ante condiciones ambientales subóptimas como la desnutrición, es la disminución del ritmo de crecimiento de algunos sistemas y tejidos.^{6, 44}

La habilidad materna de nutrir correctamente a su bebé durante la gestación, depende de su propia vida fetal y de su estado nutricional durante la infancia y la adolescencia, lo cual determina su peso, talla y composición corporal y su metabolismo en la vida adulta.⁶

Existe evidencia epidemiológica y experimental de que aquello que parece ser heredado y genético, podría ser consecuencia de las alteraciones provocadas por la programación fetal, lo cual se transmite a través de generaciones.^{1, 19, 40, 68} Los efectos de la programación fetal no sólo se limitan a la primera generación sino que pueden repercutir en la salud y desarrollo de

futuras generaciones. Estudios realizados con humanos y animales han identificado los efectos transgeneracionales de la programación fetal tanto en el peso al nacimiento como en el desarrollo a largo plazo de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2.²⁰

1.3.1 Efectos transgeneracionales

En 1986, Emanuel I. y colaboradores²⁰ definieron las influencias o efectos transgeneracionales como aquellos factores, condiciones, exposiciones y ambientes que experimenta una generación y que se relaciona con la salud, crecimiento y desarrollo de la siguiente generación.

Para poder entender cómo es que las experiencias que sufre una generación repercuten en la salud de las siguientes, se han propuesto tres posibles explicaciones:²⁰

- 1) Los atributos genéticos de la madre pueden manifestarse similarmente en su descendencia.
- 2) Las condiciones subóptimas pueden permanecer a través de las generaciones.
- 3) Las experiencias intrauterinas subóptimas pueden afectar permanentemente el crecimiento y desarrollo materno, alterando su metabolismo de tal forma que provee un ambiente intrauterino adverso para sus propios bebés.

Esta última explicación sugiere un mecanismo por el cual los efectos de la programación fetal podrían permanecer por varias generaciones.

Una fuerte evidencia de los efectos transgeneracionales de la programación fetal en humanos, proviene de estudios realizados en diferentes poblaciones. Estos estudios han demostrado que el peso al nacimiento de la madre influye en el peso al nacimiento de sus bebés.^{34,52}

Estudios con ratas de experimentación han mostrado que la desnutrición materna o la exposición prenatal a glucocorticoides en varias generaciones, pueden tener efectos transgeneracionales en el crecimiento de las crías.^{19,64} En un estudio en donde se alimentaron ratas de experimentación con dieta deficiente en el contenido de proteína durante 12 generaciones, se observó que el retardo en el crecimiento fetal iba en aumento con el paso de las generaciones. Cuando estas ratas fueron alimentadas con dieta normal, la cual contenía mayor contenido de proteína, tardaron tres generaciones en recuperar su crecimiento y desarrollo normal. El estudio demostró que la ingesta de dieta hipoproteínica durante la

gestación de la rata por doce generaciones, produce bajo peso al nacimiento de las crías, efecto que se amplifica con el paso de las generaciones.⁶⁴

En estudios recientes con animales de experimentación se ha observado otro efecto transgeneracional de la programación fetal. La desnutrición fetal puede producir efectos en el metabolismo de glucosa de las crías de la segunda generación,^{28,40,56} lo que ocasiona que sean más propensas al desarrollo de enfermedades como hipertensión, obesidad y diabetes en la vida adulta.

La ingesta de dietas hipoproteínicas durante el desarrollo intrauterino de la rata resulta en cambios permanentes del hígado y del páncreas fetal. Este efecto se ha observado en las siguientes generaciones. La desnutrición materna durante la gestación o el desarrollo de diabetes gestacional en ratas tienen efectos transgeneracionales en la estructura y función del páncreas.^{28,56}

Las observaciones con animales de experimentación de las influencias transgeneracionales, también se han observado en estudios epidemiológicos como en el caso del estudio del “Invierno Hambriento Holandés”, en donde las consecuencias de un ambiente intrauterino desfavorable puede pasar a través de generaciones. Las madres de bebés con bajo peso al nacimiento también presentaron retardo en el crecimiento fetal.^{43,58}

La diabetes tipo 2 se presenta en la mayoría de las poblaciones alrededor del mundo, sin embargo existen diferencias muy grandes entre grupos étnicos. Por ejemplo, cerca de trece millones de personas de la población mexicano-americana, presenta diabetes tipo 2. Entre los factores que colocan a esta población en tan alto riesgo de padecer esta enfermedad se encuentran la obesidad, los hábitos alimenticios, el estrés emocional y el estilo de vida sedentario. A partir de la Segunda Guerra Mundial, los mexicanos-americanos, al igual que los indios Pima americanos, tendieron a modificar la preparación de sus platillos nativos, sustituyendo alimentos tradicionales bajos en el contenido de lípidos y altos en hidratos de carbono como el frijol y el maíz, por alimentos con alto contenido de hidratos de carbono simples y lípidos, los cuales se encuentran en la mayoría de las comidas ya preparadas para su venta. Por otro lado, las poblaciones urbanas son mucho más sedentarias que las rurales. Hasta la Segunda Guerra Mundial, la población mexicano-americana era rural. En la actualidad más del 80% de la población es urbana y por lo tanto, mucho más sedentaria y propensa al desarrollo de obesidad.^{22,68}

Alrededor del 1 al 3% de las mujeres muestran alguna modificación en la función de glucosa durante el embarazo, pero algunos grupos étnicos como los Indios Pima del desierto de Sonora, en la frontera con Estados Unidos, presentan alta incidencia de diabetes tipo 2. El 70% de esta población, cuyo ambiente intrauterino presentó alteraciones en las concentraciones de glucosa, ha desarrollado diabetes entre los 26 y 35 años de edad.²² La prevalencia de intolerancia a la glucosa, de diabetes tipo 2 y diabetes gestacional es mucho más alta en hijos de mujeres que presentaron diabetes durante su embarazo, que en hijos cuyas madres presentaron diabetes únicamente después de la gestación.¹

Probablemente, la predisposición al desarrollo de diabetes que presentan los Indios Pima del suroeste de Estados Unidos y el norte de México, este controlada por factores ambientales más que genéticos. El ambiente intrauterino en el cual el feto se desarrolla claramente juega un papel mucho más importante que la herencia genética.

Los efectos transgeneracionales de la programación fetal pueden explicarse con un modelo propuesto por Drake y Walker²⁰ (Fig. 1.6). La exposición materna al ambiente adverso resulta en la alteración del crecimiento y desarrollo de la futura primera generación, lo cual origina cambios fisiológicos, metabólicos y endócrinos o la programación del feto. Estos cambios alteran el desarrollo fetal de la segunda generación, continúe o no la alteración del ambiente intrauterino, por lo que permanece un ciclo de efectos transgeneracionales de la programación fetal.

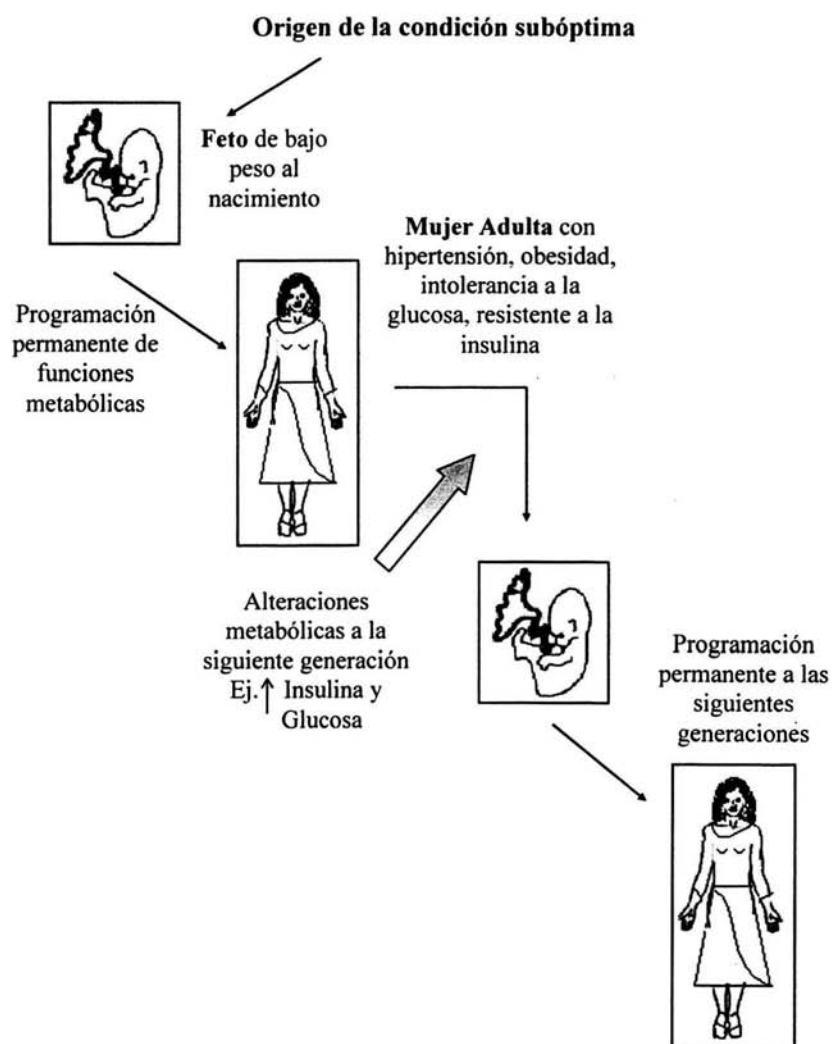


Figura 1.6 Modelo propuesto para la programación fetal transgeneracional.
FUENTE: Modificado de Drake y Walker, 2004.

1.3.2 Mecanismos no genómicos

El desarrollo prenatal no depende únicamente de la herencia genética de los padres. La interacción de los factores genéticos y ambientales es importante durante nuestro desarrollo intrauterino. Uno de los principios de la programación fetal explica que los efectos de la programación fetal pueden pasar a través de varias generaciones mediante mecanismos que no involucran cambios genéticos.⁴³ Cualquier impacto de los efectos transgeneracionales de la programación fetal resultarán de la interacción de los genes y del ambiente pre y postnatal, ya que esta interacción ocasiona alteraciones de la expresión génica como consecuencia a la respuesta a los cambios ambientales.⁷ Por lo que los efectos serán diferentes dependiendo de la población que se trate.²⁰

Existe evidencia experimental que indica que los mecanismos por los cuales los efectos de la programación fetal pueden trascender a través de las generaciones son no genómicos.^{19, 20, 28,40,56} Uno de estos mecanismos es la alteración del crecimiento materno. El crecimiento y desarrollo fetal depende de la propia experiencia prenatal de la madre. La exposición a un ambiente subóptimo durante la vida fetal de la madre, origina cambios fisiológicos que pueden resultar en un ambiente intrauterino adverso para sus hijos, por lo que las alteraciones que sufrió la madre durante su vida fetal trasciende a la siguiente generación.^{20,43} Esto se observa claramente en los efectos transgeneracionales del “Invierno Hambriento Holandés”. Las mujeres que nacieron durante la hambruna y que fueron desnutridas durante su vida fetal, conservaron menor tamaño corporal hasta su vida adulta, por lo que fueron más propensas a tener bebés con retardo en el crecimiento intrauterino.⁴³

El feto sólo podrá alcanzar su máximo crecimiento intrauterino, si el tamaño del útero de la madre lo permite. La experiencia experimental indica que el ambiente en el útero materno actúa como fuerte condicionante del crecimiento durante la vida fetal, controlando el grado al cual el feto alcanzará su máximo tamaño. La importancia del tamaño corporal materno para determinar el crecimiento intrauterino del feto ha sido demostrado con la cruce de ponies Shetland y caballos Shire (Fig. 1.7).⁴³ Cuando la madre era de la raza del pony Shetland y el padre el caballo Shire, la cría era de menor tamaño que cuando la madre era de el caballo Shire y el padre el pony Shetland. Lo cual sigue que el tamaño corporal, y por lo tanto del útero materno, tiene influencia importante en el tamaño de las crías.^{20,43}

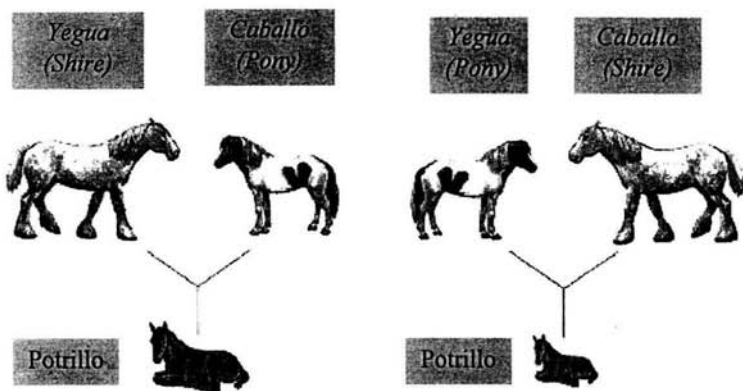


Figura 1.7 Resultados de la cruce del pony Shetland y el caballo Shire
 FUENTE: Nathanielsz, 1999.

Otro mecanismo no genómico se explica con la influencia de la nutrición materna. Los efectos de la desnutrición que sufre la madre afectará el peso al nacimiento de su bebé. Modelos experimentales han mostrado que los efectos de la desnutrición intrauterina trascienden a la segunda generación.^{6, 28, 40, 64}

Por otro lado, es evidente que la diabetes puede ser transmitida por herencia genética. Sin embargo, también el ambiente intrauterino de una madre diabética influye en el desarrollo fetal, incluso cuando no hay una predisposición genética para contraer diabetes.^{1, 40, 45} La transmisión intrauterina de la diabetes es otro mecanismo no genómico de los efectos transgeneracionales de la programación fetal. Las alteraciones en el metabolismo de glucosa, inducidas por la desnutrición fetal y que resultan en intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, predisponen al desarrollo de diabetes gestacional. Esta diabetes gestacional es un factor que, a la vez predispone a la siguiente generación a desarrollar intolerancia a la glucosa en la vida adulta. Es mediante este mecanismo que la diabetes pasa de una generación a otra.^{1, 28}

1.4 LEPTINA

En 1994, el investigador Y. Zhang y sus colaboradores clonaron una proteína expresada por el gen de la obesidad (*ob*) del ratón.⁷⁵ Esta proteína fue llamada leptina, del griego *leptos* que significa delgado, debido a que se observó que ratones con deficiencia de esta proteína presentaban obesidad, hiperfagia, infertilidad y alteraciones metabólicas asociadas como resistencia a la insulina.^{12, 31, 65, 75}

El gen de la leptina humana se encuentra en el cromosoma 7q31 y su DNA tiene más de 15 mil pares de bases.^{4, 63, 74} La leptina es una proteína de 167 aminoácidos, su peso molecular es de 16 kD y se encuentra en la circulación periférica. Presenta una estructura terciaria (Fig. 1.8) y está conformada por cuatro α -hélices antiparalelas y una parte hidrofóbica compuesta por los residuos de las α -hélices; estos residuos hidrofóbicos son importantes porque mantienen la integridad de la proteína. La leptina contiene dos cisteínas residuales, Cys 96 y Cys 146, entre las que se forma un puente disulfuro el cual es importante para conservar la estructura de la proteína y para la unión a su receptor. La mutación de cualquiera de los dos cisteínas que contiene la proteína ocasiona la inactivación biológica de la proteína.^{63, 74}



Figura 1.8 Estructura de la leptina. A, B, C y D representan las cuatro α -hélices; E, segmento corto helicoidal de la α -hélice D. Las hélices están unidas por los segmentos AB, BC y CD.

FUENTE: Zhang y col, 1997.

Al igual que en el ratón, en los humanos la leptina es producto del gen *ob*, la cual es secretada por el tejido adiposo hacia la circulación periférica.³¹ La leptina es sintetizada principalmente por el tejido adiposo blanco, y en muy pequeñas cantidades por el tejido adiposo pardo, aunque también se ha encontrado que la placenta, glándulas mamarias, ovarios, el estómago y el músculo esquelético la sintetizan en menores cantidades.^{12, 24, 65, 67}

Las mutaciones en el gen de la obesidad (*ob*) y de la diabetes (*db*) del ratón, originan obesidad. Ratones experimentales obesos con mutaciones en el gen *ob*, cuyos adipocitos no expresan leptina o que carecen de receptores funcionales para leptina, han sido denominados como ratones *ob/ob* o ratones *db/db* respectivamente.²¹ Esta conclusión se obtuvo a partir del descubrimiento de la leptina en 1994⁷⁵ y de los resultados de Coleman en 1973,⁶³ utilizando modelos de parabiosis, al comunicar la circulación sanguínea de dos ratones con diferentes características. Al llevar a cabo la parabiosis entre un ratón normal un ratón *ob/ob*, se observó que el ratón normal no sufrió cambios mientras que el ratón *ob/ob* disminuyó su peso y la ingesta de alimentos. Por otro lado, la parabiosis entre el ratón *db/db* y el normal resultó en muerte por inanición del ratón normal, mientras que el ratón *db/db* no sufrió cambios.^{31,24,63}

El hipotálamo se considera el principal órgano blanco de la leptina, la cual es transportada hacia el sistema nervioso central al hipotálamo, por la circulación periférica y a través de la barrera hematoencefálica, en donde informa al cerebro sobre la abundancia de grasa corporal. La leptina actúa como un liporregulador debido a que modula la cantidad la grasa corporal, a través de la modulación de factores de saciedad y gasto energético (Fig.1.9). Cuando el tejido adiposo almacena exceso de lípidos, la secreción de leptina a la circulación periférica aumenta para prevenir la acumulación de lípidos en tejidos no adiposos. En el hipotálamo, la leptina se une a su receptor de membrana y disminuye la actividad de los factores de transcripción lipogénicos, induciendo la disminución en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y el aumento en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos, lo que a su vez, aumenta el gasto energético y provoca la pérdida de peso corporal.^{4,21}

La secreción de leptina inhibe la acción del neuropéptido Y (NPY), un neuromodulador que estimula el apetito y la ingesta de alimento.⁴ Cuando los niveles de leptina en suero disminuyen, como por ejemplo después de un ayuno prolongado, el NPY estimula la ingesta de alimento, aumentando la cantidad de tejido adiposo y la secreción de leptina. Por lo que la producción de leptina por el tejido adiposo está regulada por el balance energético.^{3,4,9}

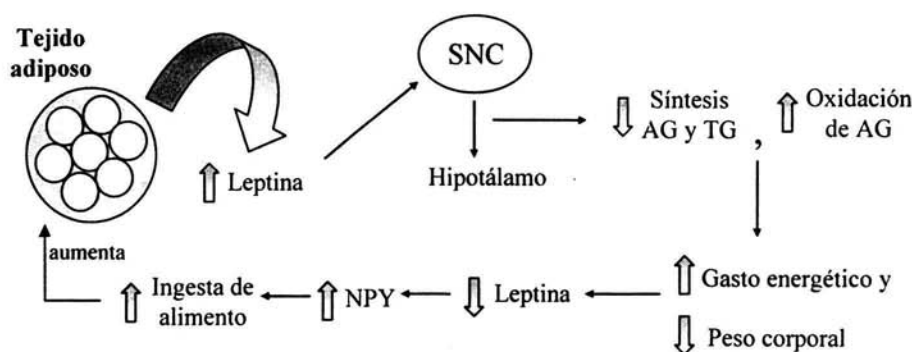


Figura 1.9 Regulación de la leptina

SNC: sistema nervios central; AG: ácidos grasos; TG: triglicéridos; NPY: neuropeptido Y

De esta manera, la leptina permite que la ingesta de alimento, el metabolismo y la fisiología endócrina se acople al estado nutricional del organismo. Los niveles séricos de leptina en personas con peso normal está en el rango de 1-15 ng/ml, mientras que en personas con un índice de masa corporal (IMC) superior a 30, pueden presentar valores de 30 ng/ml o superiores.⁶³

La leptina logra sus efectos metabólicos por la interacción con receptores específicos localizados en el sistema nervios central y en diferentes tejidos. Se han encontrado receptores de leptina en diferentes órganos como el hígado, el músculo esquelético, el páncreas, las células hematopoyéticas, la placenta y ovarios.^{4,12,24,31} El receptor de leptina (Ob-R) fue identificado por Tartaglia y col. en 1995⁶⁵ Este receptor pertenece a la clase I del tipo de receptores de las citocinas y presenta al menos seis isoformas (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re y Ob-Rf). Todos los receptores, con excepción del Ob-Re, son idénticos en sus dominios extracelulares y transmembranales, y diferentes en el dominio intracelular hasta el carboxilo terminal.^{4,24,66} De estos receptores los más importantes son el Ob-Ra, posiblemente la isoforma más corta del receptor por tener 34 residuos de aminoácidos, y el receptor Ob-Rb, que se le conoce como isoforma larga por tener 302 residuos de aminoácidos. La isoforma Ob-Rb parece que modula los efectos de la leptina aunque no se conoce todavía cómo es que trabaja. Se cree que el receptor Ob-Ra sea utilizado para el transporte de la leptina a través de la barrera hematoencefálica y que posteriormente la leptina se une a la isoforma Ob-Rb en el

hipotálamo e induce la disminución de la producción del neuropéptido Y u otros factores involucrados en la regulación del apetito y la saciedad.^{31,65}

Por otro lado, la expresión de la leptina puede estar regulada positiva o negativamente. La obesidad, la insulina, los glucocorticoides y los estrógenos la regulan positivamente, mientras que el ayuno, los andrógenos y los ácidos grasos de cadena larga inhiben su síntesis.^{14,65}

1.4.1 Leptina e Insulina

Los ratones ob/ob y db/db son fenotípicamente idénticos, pesan tres veces más que un ratón normal, aún cuando comen lo mismo, y su contenido de grasa corporal es cinco veces mayor al de un ratón sano. Ambos ratones presentan obesidad, hiperinsulinemia e hiperglicemia, factores que favorecen el desarrollo de diabetes tipo 2.^{24,31}

Existe evidencia experimental que ha demostrado que la leptina tiene la capacidad de mejorar las alteraciones en el metabolismo de glucosa cuando se inyecta a ratones ob/ob. El mismo efecto parece que se observa en ratones sanos de experimentación. La isoforma Ob-Rb del receptor de leptina se expresa en las células β pancreáticas, por lo que la secreción de insulina puede estar regulada por la leptina.^{4,31,63}

Por otro lado, la insulina es un regulador positivo de la leptina y aumenta su expresión en ratones de experimentación. El transporte y metabolismo de glucosa son factores importantes en el control de la expresión y modulación de la leptina; la insulina estimula la utilización de glucosa por los adipocitos, por lo que un mecanismo por el cual las concentraciones séricas de leptina disminuyen con el ayuno prolongado, puede ser la disminución de la absorción de glucosa por el tejido adiposo.⁴²

La insulina, al igual que la leptina, regula el peso corporal y la ingesta de alimentos y lo realiza mediante los órganos sensibles a la insulina como el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo. La leptina y la insulina se consideran hormonas reguladoras de la cantidad de grasa corporal.⁸ Kieffer y Habener (2000), propusieron la existencia de un eje adipoinsular, a partir de los efectos de la insulina observados sobre la secreción de leptina por el tejido adiposo (Fig. 1.10). La insulina es una hormona adipogénica, por lo que estimula la síntesis de ácidos grasos y aumenta la cantidad de tejido adiposo. El tejido adiposo estimula la secreción de leptina, la cual actúa a nivel del hipotálamo reduciendo la ingesta de alimento

y aumentando el gasto energético. Al mismo tiempo, la leptina inhibe la secreción de insulina por las células β del páncreas, disminuyendo la secreción de insulina. La insulina inhibe la síntesis de ácidos grasos, lo cual origina el aumento de la ingesta de alimento por la disminución de las concentraciones séricas de leptina.³³

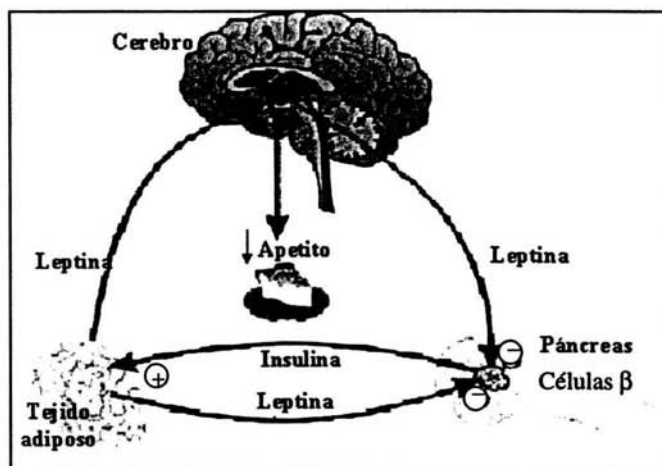


Figura 1.10 Eje Adipoinular

FUENTE: Modificado de: Kieffer y Habener, 2000.

1.4.2 Leptina y Programación

La leptina está presente durante las distintas etapas del desarrollo fetal y sus concentraciones se elevan progresivamente durante la gestación, lo cual puede estar relacionado con el aumento de tejido adiposo fetal en el último trimestre de la gestación.^{10, 14} Se ha observado que el líquido amniótico y la sangre del cordón umbilical contienen leptina y se estima que ésta podría tener un origen fetal, aunque también se ha encontrado leptina en la placenta.^{12, 14, 65} La desnutrición materna durante el periodo de desarrollo y crecimiento de la placenta, origina bajas concentraciones de leptina y a su vez aumenta la cantidad de tejido fetal adiposo. Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, las adaptaciones fetales a la desnutrición dependen del periodo de desarrollo fetal y la etapa de la gestación, como lo demuestran estudios del “Invierno Hambriento Holandés”, donde la desnutrición materna en el último trimestre del embarazo se asocia con obesidad del bebé en la vida adulta.⁵⁸

Después del parto, hay un descenso de las concentraciones de leptina en el recién nacido, lo cual se cree podría ser un estímulo para iniciar la actividad de succión y amamantamiento del recién nacido.¹⁴ Se ha observado que animales de experimentación desnutridos durante la lactancia muestran una regulación de peso corporal e ingesta de alimento diferente a aquellos animales que son alimentados normalmente, y las concentraciones de leptina son más altas, lo cual podría aumentar la sensibilidad de los receptores de leptina en el hipotálamo.⁴¹

La programación de las funciones neuroendócrinas en la vida fetal ha sido de creciente interés en los últimos 15 años. Los cambios metabólicos y endócrinos en el ambiente intrauterino pueden tener consecuencias a largo plazo en las funciones postnatales neuroendócrinas del feto. Las alteraciones del ambiente intrauterino dependen del buen funcionamiento de la placenta. Estos cambios originan una reorganización de las funciones endócrinas, lo cual conduce a la programación de las funciones neuroendócrinas del feto.^{27, 32}

El descubrimiento de la leptina ha ayudado a entender los mecanismos por los cuales se lleva a cabo ésta reorganización o adaptación de las funciones endócrinas del feto, en base a la regulación neuroendócrina del apetito y el consumo de energía. Estudios experimentales han mostrado que el hipotálamo del feto puede ser un sitio clave para la programación mediante alteraciones del estado endócrino prenatal.^{25,32} Por lo que para entender la programación fetal de la regulación de la ingesta de alimento y el gasto energético en la vida adulta, se deben tomar en cuenta varios factores.

- a) Para que la leptina fetal actúe a nivel del sistema nervioso central se requiere la inducción de la proliferación de neuronas.
- b) La proliferación de neuronas debe ser específica, es decir que la leptina necesita de la proliferación de neuronas hipotalámicas durante el desarrollo fetal.
- c) La secreción de leptina es muy importante durante el periodo crítico de formación y crecimiento de neuronas.
- d) Si el periodo crítico de formación de neuronas hipotalámicos es atrofiado o alterado, la leptina no podrá interactuar con sus receptores, conduciendo a una deficiencia o resistencia a la leptina. Este efecto continuará hasta la vida adulta.

El tratamiento del ratón neonatal ob/ob (deficiente en leptina) en los primeros días de vida, revierte la reducción de fibras nerviosas involucradas en la acción específica de la leptina,

mientras que el tratamiento de este ratón en la vida adulta durante veinte días, no resultó en la formación de fibras nerviosas que participan en la señalización de hormonas reguladoras del apetito y la saciedad.³² Este es un mecanismo por el cual cambios en las concentraciones de leptina durante la vida fetal y neonatal pueden alterar las estructuras hipotalámicas que controlan la regulación de la ingesta de alimento y el gasto energético, lo cual podría explicar la programación fetal de los centros reguladores del apetito y la saciedad.

Justificación

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la diabetes es una de las enfermedades más frecuentes. El número de personas con diabetes en el mundo en 1995, fue de 135 millones de los cuales 51 millones eran de países desarrollados. Se espera que para el año 2025, la cifra aumente a 300 y 72 millones, respectivamente.⁶⁷ La población mexicana tiene una de las prevalencias de diabetes más altas del mundo y se ha incrementado en los últimos años, probablemente como consecuencia del sedentarismo, el consumo de carbohidratos y la obesidad, entre otros. Es evidente que la diabetes puede ser transmitida por herencia genética. Sin embargo, también el ambiente intrauterino de una madre diabética influye en el desarrollo fetal, incluso cuando no hay predisposición genética para contraer diabetes.

Por otra parte, la obesidad es una enfermedad metabólica crónica. De acuerdo a información de la OMS, en el año 2002 había 330 millones de personas adultas con obesidad en el mundo.⁶⁰ México tiene una numerosa población de emigrantes de zonas rurales a urbanas, y el cambio de sus hábitos alimenticios y estilo de vida ha contribuido al incremento de la enfermedad. El ambiente intrauterino de madres desnutridas durante la gestación podría explicar el origen de la obesidad. La alteración del desarrollo del tejido adiposo fetal puede tener consecuencias en el desarrollo de obesidad a largo plazo y repercutir en las concentraciones circulantes de leptina, proteína encargada de la regulación del gasto y consumo energético.

De acuerdo con la FAO y la Secretaría de Salud, se estima que actualmente 840 millones de personas padecen hambre y desnutrición en el mundo. De este total más de 40 millones son mexicanos. Cada año, 17 millones de niños nacen con bajo peso porque sus madres sufrieron desnutrición, y este número va en aumento según la OMS.⁶⁰

Estudios epidemiológicos demuestran la relación entre deficiencias nutricionales durante el desarrollo temprano con diferentes enfermedades en la vida adulta, principalmente vinculadas con el consumo y la tolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina y otras más con el síndrome metabólico. De estas evidencias ha surgido la hipótesis de la programación fetal o del desarrollo, la cual propone que la desnutrición fetal desencadena adaptaciones endócrinas que cambian permanentemente la morfología, la fisiología y el metabolismo. Por lo tanto el feto será más propenso a padecer enfermedades metabólicas a

largo plazo como diabetes, obesidad, intolerancia a la glucosa e hipertensión arterial, entre otras.

Por otro lado, la programación fetal no sólo afecta a la primera generación sino que puede tener consecuencias en la salud, crecimiento y desarrollo de las siguientes generaciones.²⁰

A la fecha no existen suficientes estudios sobre los efectos transgeneracionales de la desnutrición proteínica durante el periodo perinatal del desarrollo, por lo que en el presente trabajo se estudiará el impacto de la restricción proteínica en el ambiente metabólico de la vida intrauterina y postnatal de la rata, y se observará si dicho impacto puede trascender a la siguiente generación.

Se experimentará con el uso de dos tipos de dietas, ambas isocalóricas pero diferentes en el contenido de proteína; una con la cantidad normal de proteína y la otra con la mitad de ésta. De esta manera se logrará la restricción proteínica en ratas de experimentación durante la gestación y/o la lactancia. Se observará el efecto de esta desnutrición sobre el metabolismo de glucosa e insulina así como en la concentración de leptina en suero de sus crías y a su vez, se estudiará el efecto de esta restricción proteínica en las crías de la segunda generación.

Los resultados de este estudio serán importantes para conocer el impacto de la calidad de vida intrauterina sobre la funcionalidad de sistemas complejos y regulados hormonalmente, como es el metabolismo de glucosa e insulina, y cuyo efecto puede trascender a las siguientes generaciones.

2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Estudiar los efectos metabólicos de la restricción proteínica materna durante el periodo perinatal de la rata, en las crías de la primera y segunda generación.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Registrar el peso corporal y la ingesta de alimento durante la gestación y la lactancia de ratas madres de la generación cero (F0), expuestas a restricción proteínica en su alimentación.
- Registrar el peso corporal de hembras de la primera generación (F1), así como de hembras y machos de la segunda generación (F2) desde el nacimiento y a diferentes edades.
- Registrar la ingesta de alimento de hembras de la primera generación (F1), así como de hembras y machos de la segunda generación (F2) a los 100 días de edad.
- Cuantificar las concentraciones séricas de leptina en crías hembras de la primera generación (F1), así como de hembras y machos de la segunda generación (F2) a los 100 días de edad.
- Cuantificar las concentraciones circulantes de glucosa e insulina de crías hembras de la primera generación (F1), así como de crías hembras y machos de la segunda generación (F2) a los 100 días de edad.

3. Materiales y Métodos

3.1 MODELO BIOLÓGICO Y GRUPOS DE ESTUDIO

Los animales empleados para el estudio experimental fueron ratas de la raza Wistar, las cuales se mantuvieron en cuartos del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ), en condiciones controladas de temperatura (22° C) y de ciclos de luz /oscuridad (12:12 h).

Todos los procedimientos involucrados con los animales empleados, fueron aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal del INCMNSZ.

Ratas hembras Wistar de 10 a 12 semanas de edad y con peso de 240 ± 20 g, fueron apareadas con machos de la misma raza. Los animales seleccionados se colocaron en cajas de acrílico durante 5 días. Diariamente de 9:00 a 10:00 a.m., se realizaron frotis vaginales a las hembras. Si en la muestra se observaban espermatozoides, se consideraba como día 0 de la gestación. Antes del inicio de la gestación, las ratas fueron alimentadas con dieta de bioterio (Purina 5001, A-0207-171 Rodent Lab. Chow. Richmond, In. E.U.). El alimento y el agua estuvieron disponibles *ad libitum* durante todo el estudio experimental.

Las ratas preñadas, consideradas como la generación cero (F0), fueron retiradas de la caja de acrílico y colocadas en cajas separadas. En el día del parto (día 22), designado como día 0 de lactancia, se registró el peso y talla de las crías. Para asegurar que la lactancia fuera entre el mismo número de crías, se ajustó la camada a doce crías. Las ratas que tuvieron más de 14 crías fueron eliminadas del estudio.

Las ratas preñadas fueron incluidas al azar en dos grupos experimentales, de acuerdo a su alimentación.

GRUPO CONTROL (C). Madres gestantes alimentadas con dieta isocalórica con 20% de caseína, la cual se denominó dieta control (C).

GRUPO RESTRINGIDO (R). Madres gestantes alimentadas con dieta isocalórica con 10% de caseína, que se denominó dieta restringida (R).

Después del parto, las crías de ambos grupos experimentales se dividieron en cuatro subgrupos, de acuerdo a su patrón de alimentación.

- I. GRUPO CONTROL-CONTROL (CC).** Grupo alimentado con dieta control durante la gestación y lactancia.
- II. GRUPO RESTRINGIDO-RESTRINGIDO (RR).** Grupo alimentado con dieta restringida durante la gestación y lactancia.
- III. GRUPO CONTROL-RESTRINGIDO (CR).** Grupo alimentado con dieta control durante la gestación y con dieta restringida durante la lactancia.
- IV. GRUPO RESTRINGIDO-CONTROL (RC).** Grupo alimentado con dieta restringida durante la gestación y con dieta control durante la lactancia.

Las crías fueron destetadas a los 21 días de edad y alimentadas con dieta control durante el resto del estudio. Estas crías conformaron la primera generación (F1). A los 100 días de edad, las crías hembras (F1), se colocaron en cajas de acrílico con ratas macho de la misma raza, alimentados con dieta de bioterio (Purina 5001) para su cruce. Después de 5 días, cada una de las ratas preñadas se colocaron en cajas de acrílico en donde se mantuvieron durante la gestación (22 días). El día del parto, asignado como día 0 de edad, se registró el peso y talla de cada cría.

Al día 21 de edad, todas las crías provenientes de los cuatro subgrupos experimentales de la generación cero (F0), fueron destetadas de la madre y al igual que las crías de la primera generación (F1), consumieron dieta control mientras duró el estudio. A esta misma edad fueron separadas por género y se mantuvieron 3 crías por sexo por caja y 6 crías por camada.

3.2 DIETAS

Las dietas utilizadas durante el estudio experimental fueron dietas isocalóricas con diferente contenido de proteína de acuerdo al tipo de dieta: dieta control (20% caseína) y dieta restringida (10% caseína). Con el fin de mantener el mismo contenido energético de las dietas, se compensó la proporción de proteína con el contenido de hidratos de carbono en

cada dieta. La formulación y contenido energético de los dos tipos de dieta, se muestran a continuación en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Formulación y contenido energético de la dieta control y restringida
FUENTE: Modificado de Reeves y col.,1999.

FUENTE DE NUTRIMENTO	DIETA CONTROL		DIETA RESTRINGIDA	
	% (g / 100g)	kcal	% (g / 100g)	kcal
Caseína (90% de proteína) ³	20	80	10	40
Aceite de maíz ⁴	5	45	5	45
Almidón ⁵	32.5	130	37.5	150
Dextrosa ⁵	32.5	130	37.5	150
Mezcla de vitaminas ¹	1		1	
Mezcla de minerales ²	3.5		3.5	
Cistina ⁶	0.3		0.3	
Colina Clorhidrato ³	0.165		0.165	
Celulosa ⁶	5		5	
Totales	99.965	385	99.965	385

¹ La mezcla mixta de vitaminas (Teklad AIN-93-VX TD 94047) contiene: ácido nicotínico, pantotenato de calcio, piridoxina, tiamina, riboflavina, ácido fólico, D-biotina, vitamina B₁₂, DL- α -acetato de tocoferon, vitamina A, vitamina D₃, vitamina K, sacarosa.

² La mezcla mixta de minerales (Teklad AIN 93 G-MX TD 94046) contiene: calcio, potasio, sodio, magnesio, hierro, zinc, manganeso, molibdeno, yodo, fósforo, cloro, azufre, cobre, níquel, vanadio, silicio.

³ Caseína (libre de vitaminas) y colina clorhidrato de Harlan Teklad Indianápolis, Indiana. E.U. NP 160040.

⁴ Aceite de maíz "La Gloria" México, D.F.

⁵ Almidón y dextrosa de Droguería cosmopolita S.A. de C.V. Mixcoac, México D.F.

⁶ Celulosa y cistina de Sigma Aldrich St. Louis, MO. E.U. 63103

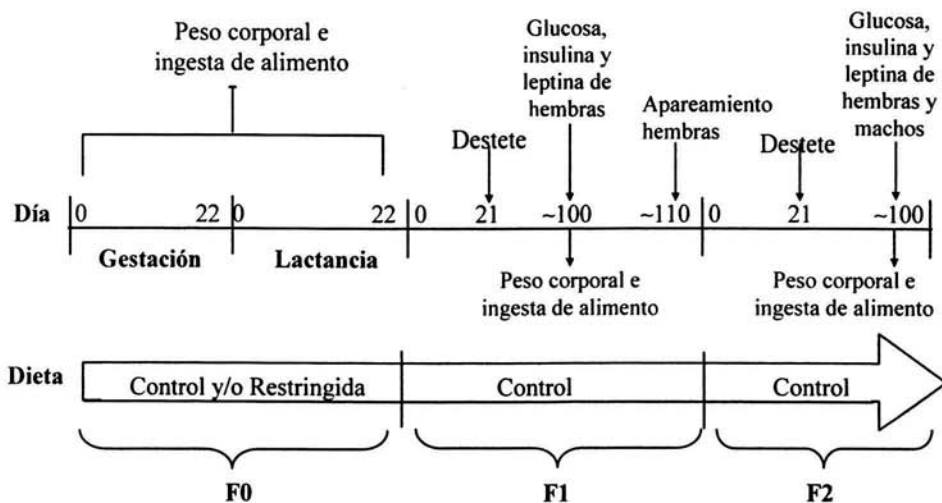
3.2.1 Elaboración de dietas

Las dietas fueron preparadas en la planta piloto del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos del INCMNSZ. Para la preparación de las dietas se siguió el siguiente procedimiento:

1. Pesar cada uno de los ingredientes de la formulación en una báscula EURA® (modelo 2000/100) para la preparación de 7 kg de cada dieta.
2. Mezclar todos los ingredientes en una mezcladora Hobart® (modelo A200 con capacidad para 20 l), a una velocidad media durante 15 minutos.
3. Agregar a la mezcla 2 L de agua y mezclar durante 5 minutos más.
4. Una vez obtenida una mezcla pastosa, extender la masa en una superficie plana y dividirla en cuadros de 3 x 3 cm y 1.5 cm de grosor.
5. Dejar secar a temperatura ambiente.

Para pesar los ingredientes con un peso menor a 500 g se utilizó una balanza Sartorius® con sensibilidad de 0.001 g.

3.3 LÍNEA DE TIEMPO



3.4 PESO CORPORAL E INGESTA DE ALIMENTO

Madres generación cero (F0)

Se llevó el registro diario del peso corporal y la ingesta de alimento de las ratas madres (F0) durante la gestación y la lactancia, con excepción de la ingesta de alimento durante la lactancia, la cual se registró cada tercer día.

Hembras de la primera generación (F1)

Se registró el peso corporal de las crías hembras (F1) al nacimiento y a los 100 días de edad se llevó a cabo el registro de peso corporal e ingesta de alimento.

Segunda generación (F2)

El peso corporal de las crías hembras y machos de la segunda generación (F2) se registró cada 5 días a partir de su nacimiento hasta el primer mes de edad. Se continuó con la medición de peso corporal a partir del tercer mes de edad y posteriormente las ratas se pesaron cada semana hasta los 100 días de edad. A partir de esta edad, se registró tanto el peso corporal como la ingesta de alimento de las crías de ambos sexos, diariamente durante dos semanas. En los posteriores meses, las ratas hembras fueron pesadas cada mes hasta el año de edad y los machos hasta los 9 meses de edad.

3.5 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

A los 100 días de edad las ratas de ambas generaciones (F1 y F2), fueron decapitadas después de un ayuno de 12 a 14 horas. Después de la decapitación se recolectó la sangre, la cual fue centrifugada a 1000 r.p.m.(revoluciones por minuto) por 15 min a 4° C en una centrifuga Sorvall® RT-7 para la separación del suero. Las muestras de suero fueron almacenadas a -20° C hasta su uso en las posteriores determinaciones.

3.6 DETERMINACIÓN DE INSULINA Y LEPTINA EN EL SUERO DE RATA

Las concentraciones de leptina e insulina se cuantificaron en muestras de suero de crías hembras (F1) y de hembras y machos (F2), provenientes de los cuatro grupos experimentales, a los 100 días de edad. Se utilizaron 100 µl de suero por duplicado para la cuantificación de leptina e insulina mediante radioinmunoanálisis (RIA), mediante el uso de estuches adquiridos de Linco Research®, Inc. Missouri, E.U. Estuche de insulina Cat.# RI-13K. Rangos de sensibilidad de 0.3-0.6 ng/ml y de 1.2-2.4 ng/ml. Estuche de leptina Cat.# RL-83K. Rangos de sensibilidad de 1.1-2.3 ng/ml y de 3.8-7.9 ng/ml. Los reactivos utilizados en cada estuche fueron almacenados en refrigeración (2-8° C) por no más de una semana

después de recibidos (Anexo 1 y 3). Las muestras se descongelaron unos minutos antes de empezar con el procedimiento para la cuantificación de insulina y leptina.

3.6.1 Fundamento

La técnica empleada para la cuantificación de leptina e insulina en suero fue el radioinmunoanálisis (RIA). En el RIA una cantidad de anticuerpo se mezcla con una concentración constante de antisuero. Al mismo tiempo, se mezcla con la hormona control purificada o antígeno, que ha sido marcado con un isótopo radioactivo. La unión de la hormona del líquido a analizar y la hormona control radiactiva compiten por los sitios de unión del anticuerpo. La cantidad de la hormona no marcada y radioactiva que se une al anticuerpo, será proporcional a su concentración en la muestra a analizar. Cuando la unión ha alcanzado su equilibrio, se separa el complejo anticuerpo-hormona del resto de la solución y con un instrumento que mida la radioactividad, se determina la cantidad de hormona marcada que se ha unido al complejo, la cual disminuirá conforme la concentración de la hormona en la muestra problema aumente.

3.6.2 Procedimiento para la cuantificación de insulina en el suero de rata

Para la cuantificación de insulina en el suero de rata se utiliza una solución de insulina marcada radioactivamente con I ¹²⁵ (Linco ®) así como soluciones estándar de insulina de rata no marcada radioactivamente a diferentes concentraciones, con las que se grafica la curva patrón (Anexo 2) para así calcular las concentraciones de insulina en la muestra problema.

El procedimiento para la cuantificación de insulina en el suero de rata se realizó en dos días.

Día uno

1. Rotular dos tubos de vidrio de 12 x 75 mm (1 y 2) como cuentas totales en los cuales se agregan 100 µl de la solución de insulina marcada radioactivamente.

2. Rotular dos tubos de vidrio de 12 x 75 mm (3 y 4) como uniones no específicas en los cuales se agregan 200 µl del amortiguador de ensayo y 100 µl de la solución de insulina marcada radioactivamente.
3. Rotular los siguientes dos tubos de vidrio de 12 x 75 mm (5 y 6) como blanco en donde se agregan 100 µl del amortiguador de ensayo, 100 µl de la solución de insulina marcada radioactivamente y 100 µl de la solución con el anticuerpo de insulina de rata.
4. A los siguientes 14 tubos de vidrio de 12 x 75 mm para la curva patrón (7 al 20), se les agregan 100 µl de las soluciones estándar con diferentes concentraciones de insulina de rata no marcada radioactivamente, por duplicado.
5. Rotular los tubos 21 y 22 como controles de calidad 1 y 2 respectivamente a los que se les agregan 100 µl de las soluciones de control de calidad 1 y 2.
6. Rotular adicionalmente suficientes tubos (23 en adelante) para las muestras de suero a analizar.
7. Colocar 100 µl de las muestras por duplicado, directamente en el fondo del tubo.
8. Adicionar 100 µl de la solución de insulina marcada radioactivamente y 100 µl de la solución con el anticuerpo de insulina de rata a todos los tubos, a partir del número 7.
9. Agitar con vortex, cubrir e incubar todos los tubos de 20 a 24 horas a 4° C.

Día dos

10. Agregar 1 ml del reactivo precipitante a 4° C a todos los tubos, con excepción de los tubos de cuentas totales (1 y 2).
11. Agitar con vortex e incubar todos los tubos por 20 minutos a 4° C.
12. Centrifugar a 3,000 r.p.m. a 4° C todos los tubos con excepción de los tubos de cuentas totales.
13. Inmediatamente después decantar completamente el sobrenadante de todos los tubos centrifugados y remover la mayor cantidad de líquido posible.
14. Medir la radioactividad en cuentas por minuto de las pastilla (pellets) obtenidos en un contador de radiaciones gamma.

3.6.3 Procedimiento para la cuantificación de leptina en el suero de rata

Para la cuantificación de leptina en el suero de rata se utiliza una solución de leptina marcada radioactivamente con I^{125} (Linco ®) así como soluciones estándar de leptina de rata no marcada radioactivamente a diferentes concentraciones, con las cuales se grafica la curva patrón (Anexo 4) y así calcular las concentraciones de leptina en la muestra problema.

El procedimiento para la cuantificación de leptina en el suero de rata se realizó en tres días.

Día uno

1. Rotular dos tubos de vidrio de 12 x 75 mm (3 y 4) como uniones no específicas en los cuales se agregan 300 μ l del amortiguador de ensayo.
2. Rotular los siguientes dos tubos de vidrio de 12 x 75 mm (5 y 6) como blanco en donde se agregan 200 μ l del amortiguador de ensayo y 100 μ l de la solución con el anticuerpo de leptina de rata.
3. A los siguientes 14 tubos de vidrio de 12 x 75 mm para la curva patrón (7 al 20), se les agregan 100 μ l de las soluciones estándar con diferentes concentraciones de leptina de rata no marcada radioactivamente, por duplicado y 100 μ l de la solución con el anticuerpo de leptina de rata a cada tubo.
4. Rotular los tubos 21 y 22 como controles de calidad 1 y 2 respectivamente a los que se les agregan 100 μ l de las soluciones de control de calidad 1 y 2.
5. Rotular adicionalmente suficientes tubos (23 en adelante) para las muestras de suero a analizar.
6. Colocar 100 μ l de las muestras por duplicado, directamente en el fondo del tubo.
7. Adicionar 100 μ l de la solución con el anticuerpo de leptina de rata a todos los tubos, a partir del número 7.
8. Agitar con vortex, cubrir e incubar todos los tubos de 20 a 24 horas a temperatura ambiente.

Día dos

9. Rotular dos tubos de vidrio de 12 x 75 mm (1 y 2) como cuentas totales en los cuales se agregan 100 µl de la solución de leptina marcada radioactivamente.
10. Adicionar 100 µl de la solución de leptina marcada radioactivamente al resto de los tubos.
11. Agitar con vortex, cubrir e incubar todos los tubos de 20 a 24 horas a temperatura ambiente.

Día tres

12. Agregar 1 ml del reactivo precipitante a 4° C a todos los tubos, con excepción de los tubos de cuentas totales (1 y 2).
13. Agitar con vortex e incubar todos los tubos por 20 minutos a 4° C.
14. Centrifugar a 3,000 r.p.m. a 4° C todos los tubos con excepción de los tubos de cuentas totales.
15. Inmediatamente después decantar completamente el sobrenadante de todos los tubos centrifugados y remover la mayor cantidad de líquido posible.
16. Medir la radioactividad en cuentas por minuto de los pastillas (pellets) obtenidos en un contador de radiaciones gamma.

3.7 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN SUERO DE RATA

La cuantificación de glucosa, tanto en suero de crías hembras (F1) como en hembras y machos (F2) a los 100 días de edad, se realizó mediante el Sistema Clínico SYNCHRON CX de Beckman Coluter (BC) Fullerton, C.A., E.U. Este sistema cuantifica las concentraciones de glucosa en suero a través de métodos enzimáticos utilizando reactivos específicos para cada determinación. La proporción usada es una parte de muestra y 100 de reactivo. El sistema dispensa automáticamente los volúmenes apropiados de muestra y reactivo en la cubeta. Los reactivos se almacenan a una temperatura de 2 a 8° C.

3.7.1 Fundamento

Las determinaciones cuantitativas del Sistema Clínico SYNCHRON CX son enzimáticas, por lo que los reactivos requeridos para la cuantificación de glucosa están conformados por enzimas específicas que catalizan una reacción específica dentro de la ruta metabólica requerida. Las concentraciones de glucosa se determinan indirectamente por espectrofotometría, en donde las concentraciones de los metabolitos de la reacción enzimática son directamente proporcionales a las concentraciones de glucosa. Las absorbancias obtenidas son transformadas mediante los cálculos que el sistema efectúa internamente en el resultado final, reportado en mg/dl.

El Sistema SYNCHRON CX utiliza el reactivo glucosa para medir las concentraciones de glucosa en suero. El fundamento de la cuantificación de glucosa se basa en el siguiente esquema de reacción.

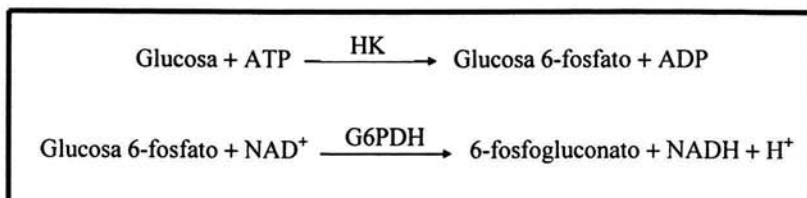


Figura 3.1 Reacciones para la cuantificación de glucosa en suero

HK: hexoquinasa; G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada); NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida).

En la reacción, la hexoquinasa (HK) cataliza la transferencia de un grupo fosfato del adenosina trifosfato (ATP) a la glucosa para formar adenosina difosfato (ADP) y glucosa 6-fosfato. La glucosa 6-fosfato luego se oxida a 6-fosfogluconato con la reducción de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) para dar su correspondiente forma reducida (NADH) por la acción catalítica de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

El sistema controla el cambio de absorbancia a 340 nm. Este cambio de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra de suero y es usado por el sistema para calcular y expresar la concentración de glucosa.

En la tabla 3.2 se muestra la composición del reactivo glucosa utilizado por el sistema SYNCHRON CX, para la determinación enzimática de las concentraciones de glucosa en suero.

Tabla 3.2 Composición del reactivo glucosa

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Adenosina trifosfato	3.8 mmol/ l
NAD ⁺	2.7 mmol/l
Hexoquinasa	2.0 KIU /l
Glucosa 6-PDH	3.0 KIU /l

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se presentan como la media \pm error estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando análisis de variancia (ANOVA) de una vía siguiendo la prueba de Dunett, considerando un nivel mínimo de significancia de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando la versión 2.0 de Sigma Stat.

4. Resultados

4.1 EFECTO DE LA DIETA SOBRE EL PESO CORPORAL Y LA INGESTA DE ALIMENTO DE LAS MADRES DE LA GENERACIÓN CERO (F0)

4.1.1 Peso corporal durante la gestación y la lactancia

Los resultados del peso corporal de las madres de la generación 0 (F0), muestran que el consumo de dieta control (20% de caseína) o restringida (10% de caseína) no alteró el peso corporal de las madres durante la gestación, como se observa en la figura 4.1. Sin embargo, al final de este periodo los grupos restringidos tuvieron una ligera disminución de peso, lo cual no fue significativo.

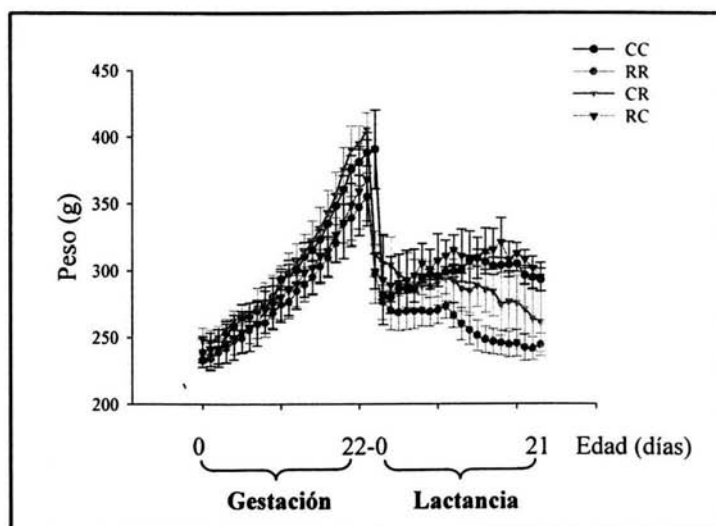


Figura 4.1 Peso corporal materno (F0) durante la gestación y la lactancia. Datos expresados como media \pm error estándar; n= 10 madres por grupo.

La caída de peso corporal al término de la gestación, indica el inicio de la lactancia durante la cual el tratamiento materno con la dieta restringida altera el peso corporal de los grupos restringidos en este periodo (RR y CR). El grupo alimentado con dieta restringida en la gestación y la lactancia (RR), continúa con el menor peso corporal que mostró durante la gestación (Figura 4.1). El grupo restringido únicamente durante la lactancia (CR), a pesar de que mantuvo su peso similar al grupo control (CC) durante la gestación, en la lactancia mostró una pérdida de peso, la cual no fue significativa.

4.1.2 Ingesta de alimento durante la gestación y la lactancia

El registro de la ingesta de alimento durante la gestación y la lactancia de las madres de la generación cero (F0) pertenecientes a los cuatro grupos experimentales, se muestran en la figura 4.2. El tratamiento de las madres (F0) con dieta control o restringida durante la gestación, no afectó su ingesta de alimento. Después de la disminución en la ingesta de alimento al término de la gestación y al inicio de la lactancia, las madres (F0) alimentadas con dieta restringida en la lactancia (RR y CR), presentaron menor ingesta de alimento a pesar de no ser significativo. Esto también se observó en el registro de peso corporal durante la lactancia de las madres (F0) que se muestra en la figura 4.1.

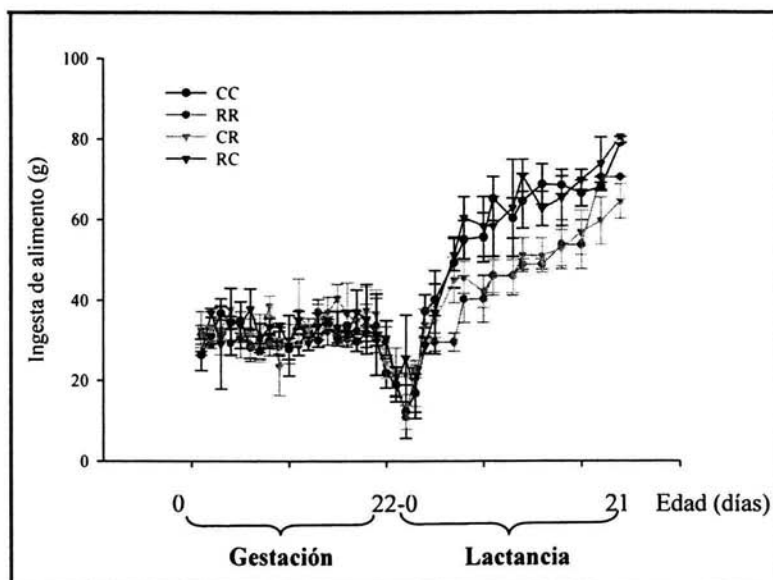


Figura 4.2 Ingesta de alimento materno (F0) durante la gestación y la lactancia. Datos expresados como media \pm error estándar; n= 10 madres por grupo.

4.2 EFECTO DE LA DIETA MATERNA (F0) EN LAS CRÍAS HEMBRAS DE LA PRIMERA GENERACIÓN (F1)

4.2.1 Perfil de crecimiento

El peso al nacimiento de las crías hembras de la primera generación (F1) fue estadísticamente diferente como se observa en la figura 4.3. Las crías hembras (F1) cuyas madres consumieron dieta restringida (10% de caseína) durante la gestación tuvieron menor peso al nacimiento (5.69 ± 0.10 g) con respecto a las crías hembras de madres alimentadas con dieta control (6.08 ± 0.08 g).

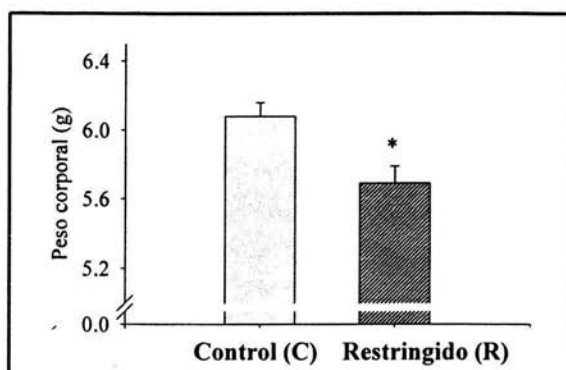


Figura 4.3 Peso al nacimiento de las crías hembras (F1). Datos expresados como media \pm error estándar; n= 16 animales del grupo C y 22 del grupo R. * $p < 0.05$ vs grupo control (C).

Los datos para el perfil de crecimiento de las hembras (F1) a los 21, 100, 270 días y al año de edad, se muestra en la tabla 4.1. Durante el crecimiento de las crías hembras cuyas madres consumieron dieta control y restringida durante la gestación y/o la lactancia, observamos que hubo diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). El peso corporal de las hembras de los grupos restringidos durante la lactancia (RR y CR) es menor que el de las hembras del grupo control (CC) en todas las edades. El grupo restringido únicamente durante la gestación (RC) presentó mayor peso al nacimiento y al año de edad, aunque no significativo, respecto al grupo control (CC).

Tabla 4.1 Perfil de crecimiento de las crías hembras (F1) de los cuatro grupos experimentales

Edad	CC (g)	RR (g)	CR (g)	RC (g)
21d	38.72 ± 1.93a n=5	22.89 ± 0.69b n=5	27.30 ± 0.36b n=6	42.91 ± 1.04a n=6
100d	319.24 ± 9.96a n=5	248.68 ± 16.21b n=5	259.67 ± 10.4b,c n=6	311.05 ± 25.1a,c n=6
270d	406.78 ± 16.89a n=4	328.92 ± 14.27b n=4	331.95 ± 8.15b n=5	396.51 ± 47.37a n=5
1 año	400.38 ± 15.33a n=4	322.1 ± 15.45b n=4	326.93 ± 6.52b n=5	493.30 ± 43.72a n=5

Datos expresados como la media ± error estándar; n= número de camadas. Datos con letras diferentes son estadísticamente diferentes, $p < 0.05$.

4.2.2 Crías hembras (F1) en la edad adulta joven

4.2.2.1 Ingesta de alimento y peso corporal

Respecto al registro de ingesta de alimento de las hembras (F1) en la edad adulta joven (100 días de edad), se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$). En la tabla 4.2 se muestra que los grupos experimentales de hembras (F1) cuyas madres consumieron dieta restringida durante la lactancia (RR y CR), mostraron menor consumo de alimento respecto al grupo control (CC).

Las mismas diferencias significativas encontradas en el caso de la ingesta de alimento, se observaron en el peso corporal de las hembras (F1) a la misma edad (Tabla 4.2). Las hembras (F1) de madres (F0) alimentadas con dieta restringida durante la lactancia (RR y CR), tuvieron menor peso corporal ($p < 0.05$). En estos grupos experimentales, el peso corporal cambia con la ingesta de alimento, ya que al disminuir la ingesta de alimento, las hembras (F1) de estos grupos experimentales (RR y CR) pesan menos respecto al grupo control (CC). Sin embargo, el grupo restringido únicamente durante la gestación (RC), a pesar de haber consumido la misma cantidad de alimento que los grupos restringidos durante la lactancia (RR y CR) mostró un peso similar al grupo control.

Tabla 4.2 Ingesta de alimento y peso corporal de las crías hembras (F1) de los cuatro grupos experimentales a los 100 días de edad

	CC	RR	CR	RC
Ingesta de alimento (g/día)	22.79 ± 1.03a	19.45 ± 0.19b	19.51 ± 0.40b	20.10 ± 2.20a,b
Peso corporal (g)	319.24 ± 9.96a	248.68 ± 16.2b	259.67 ± 10.4b,c	311.05 ± 25.1a,c

Datos expresados como la media ± error estándar; n= 5-6 camadas por grupo. Datos con letras diferentes son estadísticamente diferentes, $p < 0.05$.

4.2.2.2 Concentraciones de leptina

Los resultados de las concentraciones séricas de leptina de las hembras (F1) a los 100 días de edad se muestran en la gráfica 4.4. Se observaron diferencias significativas entre los grupos de hembras (F1) cuyas madres consumieron dieta restringida durante la lactancia (RR y CR) respecto al grupo control (CC). Grupo CC (3.44 ± 0.44 ng/ml), grupo RR (1.44 ± 0.21 ng/ml), grupo CR (1.83 ± 0.31 ng/ml) y grupo RC (2.34 ± 0.27 ng/ml).

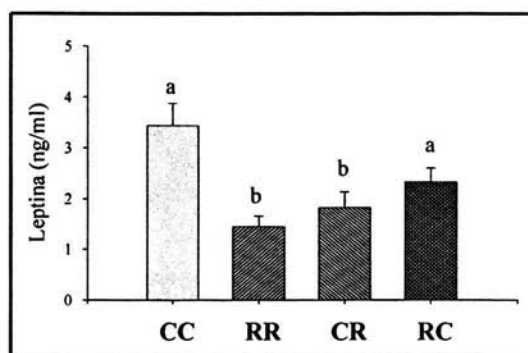


Figura 4.4 Concentraciones de leptina en suero de crías hembras (F1) a los 100 días de edad, para los cuatro grupos experimentales: grupo CC, RR CR y RC. Datos expresados como la media ± error estándar; n= 5-6 camadas por grupo. Datos con letras diferentes son estadísticamente diferentes, $p < 0.05$.

A pesar de que los grupos restringidos durante la lactancia (RR y CR) presentaron menor peso corporal y menores concentraciones séricas de leptina, su ingesta de alimento es

también menor, lo cual indica que hay una alteración en el balance energético. Al presentar menores concentraciones de leptina, se espera que el gasto energético disminuya y la ingesta aumente.³¹

4.2.2.3 Concentraciones de glucosa e insulina

Respecto a las concentraciones de glucosa e insulina en suero entre los grupos experimentales, no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$). Las concentraciones de glucosa de los grupos experimentales son similares al grupo CC. (Grupo CC 73.3 ± 3.98 mg/dl, RR 80.5 ± 3.9 mg/dl, CR 78.3 ± 4.1 mg/dl, RC 84.7 mg/dl). Sin embargo, las concentraciones de insulina, a pesar de que no fueron estadísticamente diferentes respecto al grupo control ($p > 0.05$), los grupos de hembras (F1) cuyas madres (F0) fueron alimentadas con dieta restringida durante la lactancia (grupo RR y CR), mostraron menor concentración de insulina (10.4 ± 1.9 μ U / ml y 9.2 ± 2.1 μ U/ml, respectivamente; figura 4.5) que el grupo control y el grupo de hembras de madres alimentadas con dieta restringida únicamente durante la gestación (12.6 ± 1.9 μ U/ml y 13.5 ± 2.5 μ U/ml, respectivamente; figura 4.5).

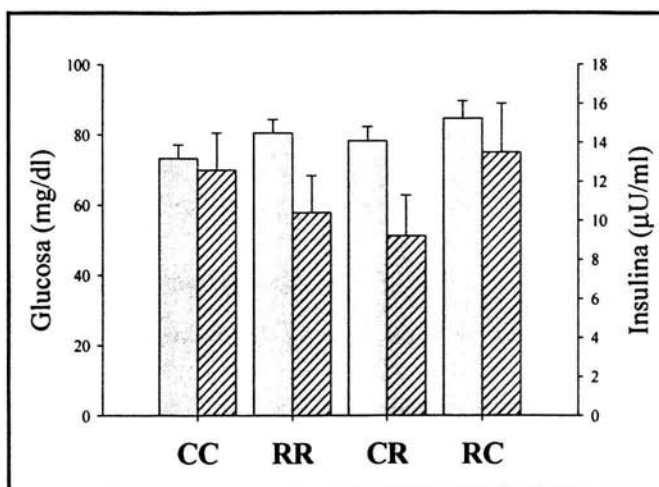




Figura 4.5 Concentraciones de glucosa  e insulina  en suero de hembras (F1) de los cuatro grupos experimentales: grupo CC, RR CR y RC. Datos expresados como la media \pm error estándar; n= 5-6 camadas por grupo.

Respecto a los resultados de la relación insulina/glucosa (figura 4.6), se observa que los grupos de hembras (F1) cuyas madres (F0) consumieron dieta restringida durante la lactancia (RR y CR) presentaron menores valores ($p < 0.05$): 0.13 ± 0.013 y 0.12 ± 0.013 , respectivamente, que los del grupo RC, grupo restringido únicamente durante la gestación (0.17 ± 0.009). A pesar de que el grupo control (CC) tuvo un valor en la relación insulina/glucosa (0.16 ± 0.015) similar al grupo RC, los grupos restringidos durante la lactancia no fueron estadísticamente diferentes con respecto al grupo control (CC).

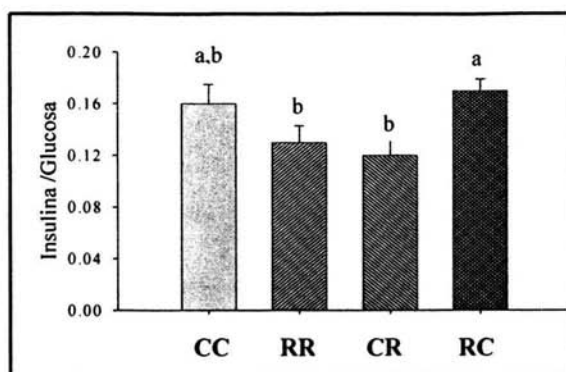


Figura 4.6 Relación insulina/glucosa de las hembras (F1) de los cuatro grupos experimentales: grupo CC, RR, CR y RC. Datos expresados como la media \pm error estándar; $n=5-6$ camadas por grupo. Las letras representan la diferencia significativa entre los grupos experimentales, $p<0.05$.

4.3 EFECTO DE LA DIETA MATERNA (F0) EN LAS CRÍAS HEMBRAS DE LA SEGUNDA GENERACIÓN (F2)

4.3.1 Perfil de crecimiento

El consumo de dieta restringida durante la gestación y/o la lactancia de las abuelas (ratas F0) de las crías hembras de la segunda generación (F2), no alteró el perfil de crecimiento de las crías hembras (F2) desde el nacimiento y a los 21, 100, 270 días y al año de edad, respecto al grupo control (CC). La restricción proteínica en la dieta de las madres (F0), la cual alteró el crecimiento de las crías hembras (F1) de madres alimentadas con dieta restringida durante la lactancia (RR y CR), no afectó el crecimiento de sus crías hembras (F2) en las primeras etapas de la vida y hasta la edad adulto joven (día 100). Sin embargo, como se muestra en la figura 4.7, los grupos de hembras (F2) cuyas abuelas (F0) consumieron dieta restringida en la lactancia (RR y CR) comenzaron a tener menor peso, a partir de la edad adulto maduro (270 días) y hasta el año de edad. Los efectos de la restricción proteínica materna (F0) durante la lactancia podrían observarse hasta la edad adulto maduro de las hembras (F2).

Por otro lado, el grupo RC de hembras (F2) mostraron mayor peso, estadísticamente significativo ($p<0.05$) respecto a los grupos RR y CR. A pesar de no ser diferentes

estadísticamente respecto al grupo control (CC), este grupo tuvo el mayor peso al nacimiento y a partir de la edad adulto joven (día 100) hasta el año de edad, lo cual también se observó durante el crecimiento de las crías hembras (F1), con excepción de los 100 y 270 días de edad.

Tabla 4.4 Perfil de crecimiento de las crías hembras (F2) de los cuatro grupos experimentales

Edad	CC (g)	RR (g)	CR (g)	RC (g)
Al nacimiento	5.94 ± 0.14a,b n=6	5.57 ± 0.13a n=6	6.04 ± 0.13a,b n=6	6.25 ± 0.16b n=4
21d	45.04 ± 0.86 n=6	43.61 ± 0.86 n=6	44.99 ± 0.76 n=6	44.99 ± 2.18 n=4
100d	292.24 ± 8.24a,b n=6	298.09 ± 10.16a,b n=6	284.57 ± 6.06a n=6	317.26 ± 6.15b n=4
270d	332.57 ± 10.87a,b n=5	320.22 ± 15.42a,b n=5	308.57 ± 5.69a n=5	346.02 ± 10.41b n=4
1 año	381.66 ± 26.06 n=5	347.58 ± 18.58 n=5	367.16 ± 14.99 n=5	403.02 ± 26.18 n=4

Datos expresados como la media ± error estándar; n= número de camadas. Datos con letras diferentes son estadísticamente diferentes, $p < 0.05$.

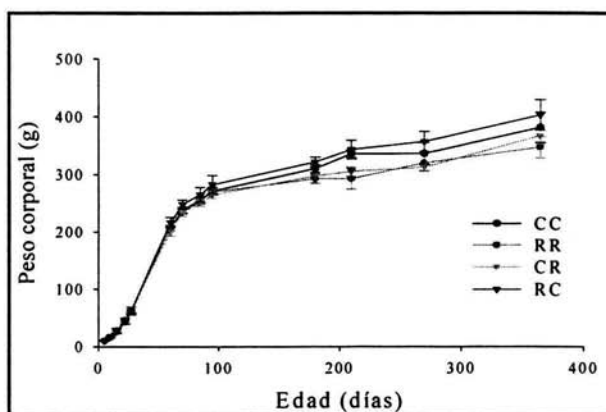


Figura 4.7 Curva de crecimiento de hembras (F2) pertenecientes a los cuatro grupos experimentales: grupo CC, RR, CR y RC. Datos expresados como la media ± error estándar; n=4-6 camadas por grupo.

4.3.2 Crías hembras (F2) en la edad adulta joven

4.3.2.1 Ingesta de alimento y peso corporal

El efecto de la restricción proteínica materna (F0) durante la gestación y/o la lactancia no afectó la ingesta de alimento de las hembras (F2), a los 100 días de edad. Como se muestra en la figura 4.8 B, no se observó diferencia estadística en la ingesta de alimento entre los grupos experimentales (CC 19.69 ± 0.71 , RR 18.89 ± 0.78 , CR 19.45 ± 0.46 , RC 19.02 ± 0.34 g/día; figura 4.8 B) y esto se presenta durante los quince días en los cuales se registró la ingesta de alimento (Figura 4.9 B) de los cuatro grupos experimentales. Al inicio del registro se observa disminución de la ingesta de alimento en los grupos experimentales (Figura 4.9 B), lo que pudo haberse presentado por alteraciones en los ciclos de luz:oscuridad o por cambios en la temperatura del bioterio. Esto pudo haber provocado la pérdida de peso corporal en los cuatro grupos experimentales durante los primeros días de registro (Figura 4.9 A).

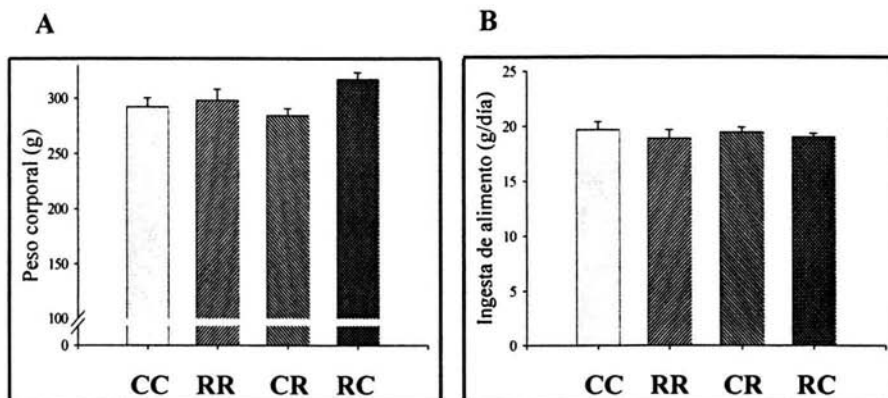


Figura 4.8 Resultados de A. Peso corporal y B. Ingesta de alimento de las crías hembras (F2) a los 100 días de edad, de los cuatro grupos experimentales: grupo CC, RR, CR y RC. Datos expresados como la media \pm error estándar; n= 4-6 camadas por grupo.

Los resultados de la ingesta de alimento se acompañan de los del peso corporal a los 100 días de edad (Figura 4.8A), en los cuales tampoco se observó diferencia estadística entre los grupos experimentales, sin embargo el grupo de hembras cuyas abuelas consumieron dieta restringida durante la gestación (RC), presentó el mayor peso, a pesar de no ser

significativo y a pesar de que la ingesta de alimento fue similar al resto de los grupos experimentales. Este comportamiento se presentó durante los quince días en que se llevó a cabo el registro de peso corporal (Figura 4.9A), al mismo tiempo en que se registró la ingesta de alimento de los cuatro grupos experimentales.

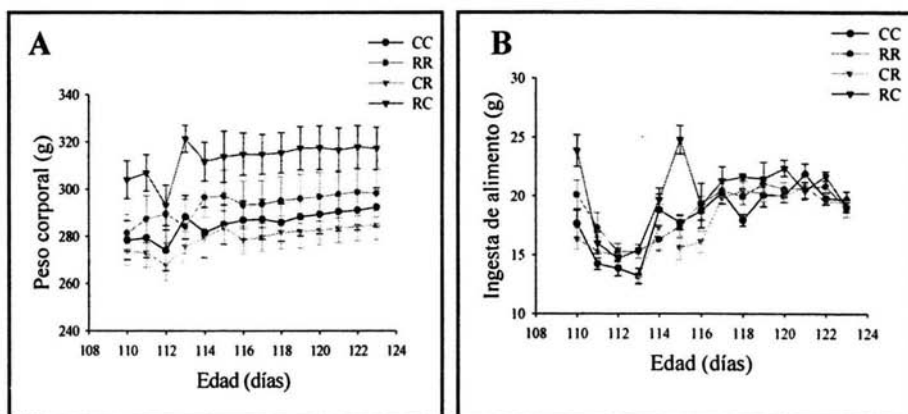


Figura 4.9 Resultados del registro diario de **A.** Peso corporal y **B.** Ingesta de alimento de hembras (F2) de los cuatro grupos experimentales: grupo CC, RR, CR y RC. Datos expresados como la media \pm error estándar; $n=4-6$ camadas por grupo.

4.3.2.2 Concentraciones de leptina

El tipo de dieta que consumieron las madres (F0) durante la gestación y/o la lactancia no influyó en las concentraciones séricas de leptina de las crías hembras (F2) en la edad adulto joven (100 días). No se presentaron diferencias significativas entre las concentraciones de leptina de los cuatro grupos experimentales (Tabla 4.5).

Tabla 4.5 Concentraciones de leptina en crías hembras (F2) a los 100 días de edad, de los cuatro grupos experimentales

	CC	RR	CR	RC
Leptina (ng/ml)	3.13 ± 0.26	3.74 ± 0.46	2.08 ± 0.16	2.79 ± 0.34
	$n=6$	$n=6$	$n=6$	$n=4$

Datos expresados como la media \pm error estándar; $n=$ número de camadas.

4.3.2.3 Concentraciones de glucosa e insulina

Se observó que las concentraciones de glucosa en suero de las hembras (F2) no mostraron diferencia significativa entre los grupos experimentales (CC: 67.6 ± 6.92 mg/dl; RR: 67.2 ± 6.04 mg/dl; CR: 58.8 ± 3.29 mg/dl; RC: 63.3 ± 0.80 mg/dl; figura 4.10). Sin embargo, las concentraciones de insulina en suero presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). El grupo de hembras (F2) de abuelas alimentadas con dieta restringida únicamente durante la gestación (RC) tuvo mayor concentración de insulina (10.1 ± 1.81 μ U/ml) a los 100 días de edad que las hembras (F2) del resto de los grupos experimentales, $p < 0.05$. (CC: 3.2 ± 0.84 μ U/ml; RR: 1.5 ± 0.52 μ U/ml, CR: 2.6 ± 0.38 μ U/ml; figura 4.10).

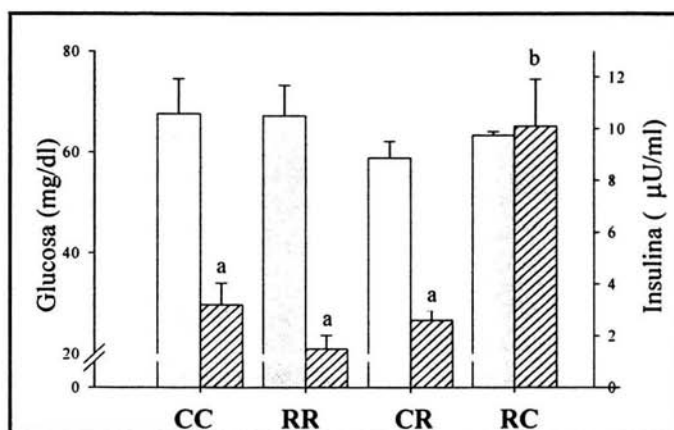




Figura 4.10 Concentraciones de glucosa  e insulina  en suero de hembras (F2) de los cuatro grupos experimentales: grupo CC, RR, CR y RC. Datos expresados como la media \pm error estándar; n= 4-6 camadas por grupo. Datos con letras diferentes son estadísticamente diferentes, $p < 0.05$.

Las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) observadas entre las hembras (F2) del grupo RC y el resto de los grupos experimentales, también se presentaron en la relación insulina/glucosa. Se observa que el metabolismo de glucosa e insulina de hembras (F2) del grupo RC fue el más afectado por la restricción proteínica de sus abuelas (F0). (CC: 0.04 ± 0.01 , RR: 0.02 ± 0.008 , CR: 0.05 ± 0.009 , RC: 0.16 ± 0.04 ; figura 4.11).

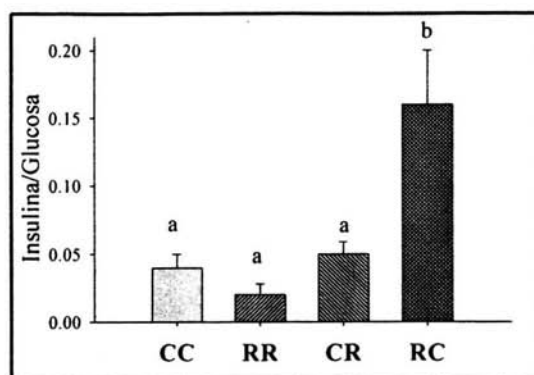


Figura 4.11 Relación insulina/glucosa de las hembras (F2) de los cuatro grupos experimentales: grupo CC, RR, CR y RC. Datos expresados como la media \pm error estándar; n= 4-6 camadas por grupo. Las letras representan la diferencia significativa entre los grupos experimentales, $p < 0.05$.

4.4 EFECTO DE LA DIETA MATERNA (F0) EN LAS CRÍAS MACHOS DE LA SEGUNDA GENERACIÓN (F2)

4.4.1 Perfil de crecimiento

La restricción proteínica de las madres (F0) no alteró el peso al nacimiento de las crías macho de la segunda generación (F2). El grupo de machos (F2) cuyas abuelas consumieron dieta restringida durante la gestación (RC) mostró mayor peso, aunque no significativo con respecto al resto de los grupos experimentales. Dentro del perfil de crecimiento (tabla 4.5), a partir del destete (día 21) y a los 100 y 270 días de edad, se observó diferencia estadística ($p < 0.05$). Los grupos de machos (F2) de abuelas alimentadas con dieta restringida en la lactancia (RR y CR) tuvieron menor peso corporal con respecto al grupo control (CC), a los 100 días de edad. A los 21 días de edad, el grupo de machos (F2) de abuelas restringidas en el consumo de proteína durante la gestación y la lactancia (RR), fue significativamente menor que el grupo control, lo cual también se presentó con el grupo restringido únicamente durante la lactancia (CR), pero a la edad de 270 días.

A pesar de que el grupo de machos (F2) cuyas abuelas fueron alimentadas con dieta restringida en la gestación (RC), presentó un peso significativamente menor a los 21 días de

edad con respecto al grupo control, a los 100 días de edad presentó mayor peso (no significativo). A la edad de 270 días, este mismo grupo tuvo el mayor peso de todos los grupos experimentales, sin embargo solamente fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) con respecto al grupo CR. Como se observa en la figura 4.12, a partir de los 100 días de edad el grupo de machos (F2) cuyas abuelas consumieron dieta restringida durante la gestación (RC), presentaron el mayor peso corporal, sin embargo este aumento de peso no fue estadísticamente diferente respecto al grupo control (CC), mientras que el grupo CR de machos (F2) se mantuvo con el menor peso.

Tabla 4.5 Perfil de crecimiento de las crías macho (F2) de los cuatro grupos experimentales

Edad	CC (g)	RR (g)	CR (g)	RC (g)
Al nacimiento	6.21 ± 0.18 n=6	6.00 ± 0.16 n=6	6.29 ± 0.11 n=6	6.53 ± 0.12 n=4
21d	48.35 ± 0.66 a n=6	45.41 ± 0.63 b n=6	46.24 ± 0.88 a,b n=6	44.85 ± 1.73 b n=4
100d	489.63 ± 6.70a n=6	459.14 ± 8.84b n=6	460.21 ± 8.30b n=6	483.86 ± 11.65a,b n=4
270d	559.65 ± 7.65a,b n=5	542.37 ± 10.86a,b n=5	522.59 ± 9.85a n=5	570 ± 7.05 b n=4

Datos expresados como la media ± error estándar; n= número de camadas. Datos con letras diferentes son estadísticamente diferentes, $p < 0.05$.

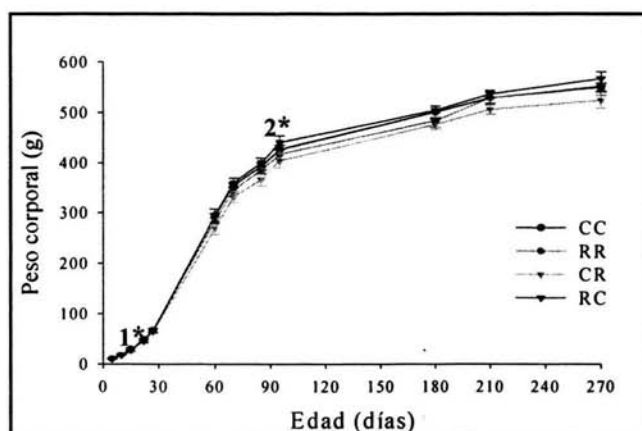


Figura 4.12 Curva de crecimiento de machos (F2) de los cuatro grupos experimentales: grupo CC, RR, CR y RC. Datos expresados como la media ± error estándar, 1* RR y RC vs grupo CC a los 21 días de edad y 2* RR y CR vs grupo CC a los 100 días de edad, $p < 0.05$; n= 4-6 camadas por grupo.

4.4.2 Crías machos (F2) en la edad adulta joven

4.4.2.1 Ingesta de alimento y peso corporal

Respecto a la ingesta de alimento de los machos (F2) en la edad adulta joven (100 días) que se muestra en la figura 4.12B, se observó que los grupos de machos (F2) provenientes de abuelas (F0) alimentadas con dieta restringida durante la lactancia (RR y CR), fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) respecto al grupo control. Los grupos RR y CR tuvieron menor ingesta (27.89 ± 1.22 y 27.99 ± 0.87 g/día, respectivamente) que el grupo CC (32.41 ± 0.87 g/día). La disminución de la ingesta de alimento en estos grupos de machos (F2) provenientes de abuelas desnutridas en la lactancia (RR y CR), repercutió en el peso corporal debido a que tuvieron menor peso ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (CC). El grupo RC de machos (F2) mostró peso corporal similar al grupo CC. (Figura 4.12A). Este compartamiento se presentó durante el registro diario de ingesta de alimento y peso corporal durante quince días (Figura 4.13 A y B), aunque en los primeros días del estudio se registró una caída de la ingesta e alimento en los cuatro grupos experimentales lo cual pudo originarse por cambios en los ciclos de luz:oscuridad o en la temperatura del bioterio.

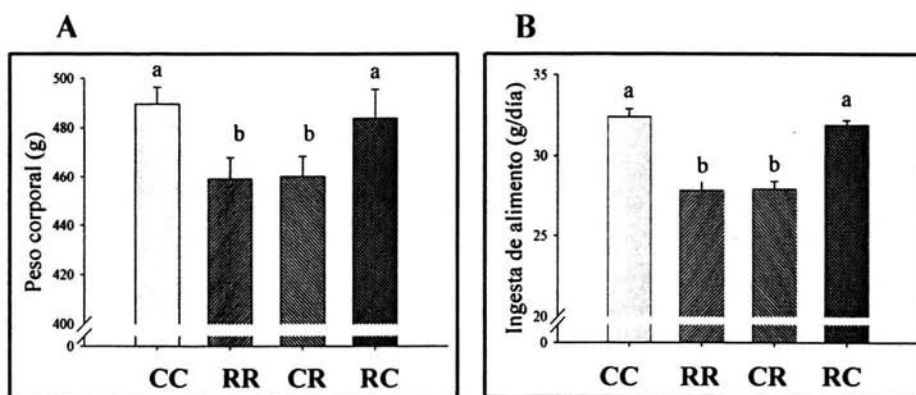


Figura 4.12 Resultados de A. Peso corporal y B. Ingesta de alimento de las crías macho (F2) a los 100 días de edad de los cuatro grupos experimentales: grupo CC, RR, CR y RC. Datos expresados como la media \pm error estándar; n= 4-6 camadas por grupo. Las letras diferentes representan la diferencia estadística, $p < 0.05$.

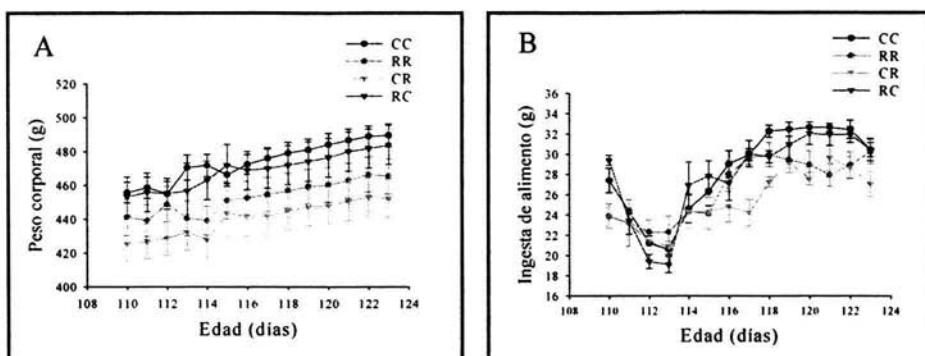


Figura 4.13 Resultados del registro diario de **A.** Peso corporal y **B.** Ingesta de alimento de machos (F2) de los cuatro grupos experimentales: grupo CC, RR, CR y RC. Datos expresados como la media \pm error estándar; n= 4-6 camadas por grupo.

Estos resultados muestran que el efecto de la desnutrición proteínica de las madres (F0) durante la lactancia, no sólo se manifestó en la disminución de peso e ingesta de alimento de los grupos experimentales de hembras (F1), sino que cuando éstas hembras (F1) fueron madres, sus crías macho (F2) presentaron el mismo efecto que sufrieron sus madres a la misma edad. Estos resultados muestran la presencia del efecto transgeneracional.

4.4.2.2 Concentraciones de leptina

A pesar de haber observado diferencias estadísticas ($p < 0.05$) en el peso corporal e ingesta de alimento entre los cuatro grupos experimentales de los machos (F2) de abuelas desnutridas durante la gestación y/o la lactancia (F0), las concentraciones séricas de leptina no fueron estadísticamente diferentes (Tabla 4.6), al igual que lo ocurrido con las concentraciones de leptina de hembras (F2).

Tabla 4.6 Concentraciones de leptina en crías macho (F2) a los 100 días de edad, de los cuatro grupos experimentales

	CC	RR	CR	RC
Leptina (ng/ml)	6.24 ± 1.87	5.84 ± 1.21	5.72 ± 1.26	7.51 ± 1.24
	n= 6	n= 6	n= 6	n= 4

Datos expresados como la media \pm error estándar; n= número de camadas.

4.4.2.3 Concentraciones de glucosa e insulina

Las concentraciones séricas de glucosa e insulina de los machos (F2) cuyas abuelas (F0) fueron desnutridas en la gestación y/o la lactancia (F0), mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 4.14). El grupo de machos (F2) de abuelas alimentadas con dieta restringida durante la lactancia (CR), presentó concentraciones de glucosa significativamente más altas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control, CC. (58 ± 5.08 mg/dl vs 42.2 ± 2.28 mg/dl, respectivamente); lo mismo ocurrió en las concentraciones de insulina (CR: 33.2 ± 10.1 μ U/ml vs CC: 4.2 ± 1.7 μ U/ml). Con respecto al grupo RR de machos (F2), no presentó diferencias significativas en las concentraciones de glucosa e insulina (47.2 ± 4.23 mg/dl y 13.82 μ U/ml, respectivamente) respecto a las concentraciones de glucosa e insulina del grupo control, CC. (42.2 ± 2.28 mg/dl y 4.2 ± 1.7 μ U/ml, respectivamente).

Se observó que la concentración de insulina (12.4 ± 1.5 μ U/ml) del grupo de machos (F2) cuyas abuelas consumieron dieta restringida durante la gestación (RC), fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el grupo control (CC). Sin embargo, la relación insulina/glucosa solamente mostró diferencias entre los grupos de machos (F2) provenientes de abuelas con restricción proteínica durante la lactancia (RR y CR) con respecto al grupo CC, en donde el grupo CR fue el más afectado. (Insulina/glucosa del grupo CC: 0.113 ± 0.05 , RR: 0.39 ± 0.09 , CR: 0.65 ± 0.051 , RC: 0.40 ± 0.16 ; figura 4.15).

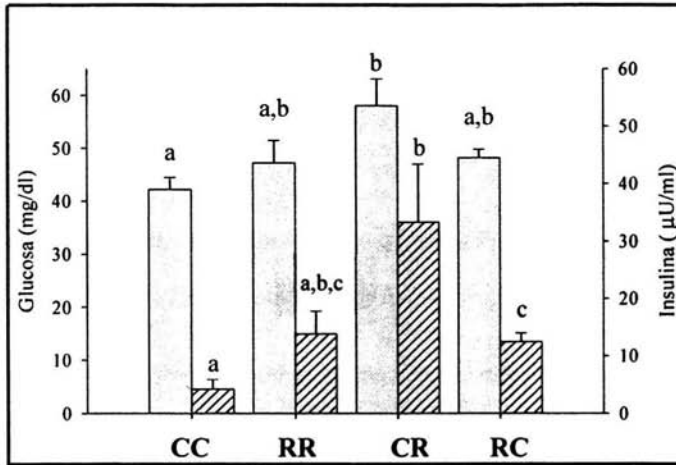




Figura 4.14 Concentraciones de glucosa  e insulina  en suero de machos (F2) de los cuatro grupos experimentales: grupo CC, RR, CR y RC. Datos expresados como la media \pm error estándar; n= 4-6 camadas por grupo. Datos con letras diferentes son estadísticamente diferentes, $p < 0.05$.

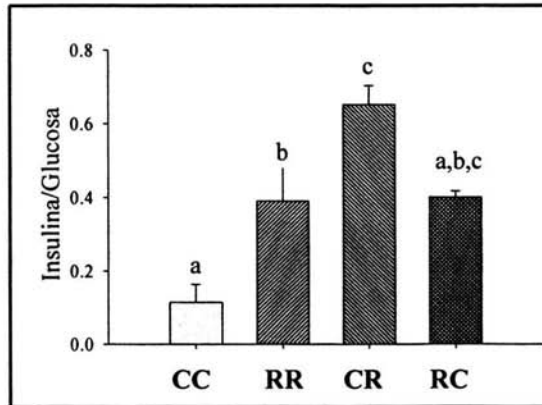


Figura 4.15 Relación insulina/glucosa de los machos (F2) de los cuatro grupos experimentales: grupo CC, RR, CR y RC. Datos expresados como la media \pm error estándar; n= 4-6 camadas por grupo. Las letras representan la diferencia significativa entre los grupos experimentales, $p < 0.05$.

5. *Discusión*

5. DISCUSIÓN

El estrés nutricional durante la vida intrauterina y neonatal modifica permanentemente las funciones fisiológicas y metabólicas del feto en la vida adulta. La hipótesis de la programación fetal ha establecido que estos efectos son irreversibles y que el estado de salud del individuo dependerá de las condiciones postnatales a las que se enfrente a lo largo de su vida.³⁸

El retraso en el crecimiento intrauterino ha sido considerado como un indicador de la desnutrición fetal,⁶ lo que se comprueba con los resultados obtenidos a partir del modelo biológico utilizado en el presente estudio. Durante la gestación de las ratas madres (F0) se observó que los grupos restringidos mantuvieron menor peso corporal, a pesar de que su consumo de alimento fue similar a los grupos control. El consumo de dieta restringida (10% de caseína) durante la gestación de ratas madres (F0) afectó el peso al nacimiento de sus crías hembras (F1), el cual fue menor que el grupo control (C). Aún cuando las ratas gestantes desnutridas comen en similar cantidad de alimento que el grupo control, la calidad nutricional de su dieta no es la misma, por lo que el feto limita el uso de nutrientes y disminuye su metabolismo, reduciendo así su ritmo de crecimiento como una adaptación a la desnutrición proteínica.

El estado nutricional materno durante la lactancia es tan importante como el de la gestación; la diferencia radica en que en la lactancia la glándula mamaria sustituye a la placenta como medio de obtención de nutrimentos. La desnutrición proteínica materna durante la lactancia puede afectar negativamente el crecimiento de las crías.^{5,36,67} En el presente estudio, se observó que los grupos de hembras de la primera generación (F1) cuyas madres (F0) fueron desnutridas durante la lactancia (RR y CR), a pesar de que a partir del destete las hembras (F1) de estos grupos experimentales fueron alimentadas con dieta control (20% de caseína), presentaron menor peso con respecto al grupo control (CC) a lo largo de su crecimiento, a diferencia de lo ocurrido con el grupo RC donde no se observó este fenómeno. El grupo RC de hembras (F1) es alimentado durante su vida postnatal con dieta control (20% de caseína), por lo que el aumento de proteína en su dieta favorece el incremento de su peso corporal.

La rata nace en una condición más inmadura que el ser humano. Es posible que durante la lactancia las crías de rata continúen su crecimiento y que algunos órganos terminan su desarrollo de tal forma que el estrés nutricional durante el periodo de rápido desarrollo puede alterar de forma irreversible el tamaño de algunos órganos.

Por otro lado, en este periodo de crecimiento rápido de las crías, las demandas nutricionales de la madre aumentan. La capacidad de secreción de leche por las glándulas mamarias depende del número de células mamarias y su desarrollo en esta etapa perinatal, requiere proteína adicional para su crecimiento.² Generalmente, las madres desnutridas durante la lactancia producen menos leche y de menor calidad.

En recientes publicaciones, se ha reportado la disminución de las concentraciones séricas de leptina de crías de ratas madres sometidas a restricción proteínica durante la lactancia, a los 12 y 21 días de edad. A partir del destete las concentraciones de leptina en suero de estas crías aumentan con su edad, al igual que las ratas control.⁶⁷ Al realizar la cuantificación de leptina en las crías hembras (F1) en la edad adulto joven (100 días) se observó que los grupos alimentados con dieta restringida durante la lactancia presentaron menor concentración de leptina que las crías hembras del grupo CC. A la misma edad, la ingesta de alimento de estas ratas hembras (F1) fue menor en estos grupos restringidos durante la lactancia, así como lo fue el peso corporal. El bajo peso corporal de las hembras (F1) de madres (F0) desnutridas durante la lactancia (grupos RR y CR), podría explicar que estos grupos experimentales presenten menores concentraciones de leptina, con respecto al grupo CC. Las concentraciones circulantes de leptina dependen en parte, de la cantidad de tejido adiposo. El bajo peso corporal de las hembras (F1) provenientes de los grupos RR y CR, puede indicar menor cantidad de tejido adiposo corporal, lo cual podría explicar la disminución en las concentraciones de leptina de estos grupos (RR y CR) de hembras (F1), con respecto al grupo CC. Por otro lado, la leche secretada por las ratas madres puede contener hormonas regulatorias del apetito y la saciedad, las cuales son transferidas a las crías.¹⁵ La alta o baja concentración de leptina en la leche llega al torrente sanguíneo de las crías y actúa a nivel del hipotálamo, causando la disminución del consumo de alimento y el aumento en el gasto energético de las hembras (F1) cuyas madres fueron alimentadas con dieta restringida durante la lactancia (RR y CR), lo cual se ve reflejado en el bajo peso corporal que mostraron respecto al grupo CC.

Durante la desnutrición fetal el desarrollo de los diferentes órganos es selectiva, por lo que el crecimiento de algunos órganos como el cerebro está relativamente protegido, mientras que otros como el hígado y el páncreas utilizan menos energía para su desarrollo.⁴⁹ Existen varios estudios experimentales que han demostrado que la exposición intrauterina a la desnutrición puede afectar irreversiblemente el desarrollo del páncreas fetal.^{28,29,45} Otros trabajos han mostrado que el requerimiento de proteína de ratas gestantes juegan un papel clave en el desarrollo de los islotes pancreáticos fetales. Dietas que contienen poco menos de la mitad de proteína de la dieta de un grupo control de ratas, repercute en el tamaño y vascularización de los islotes pancreáticos de las crías, lo cual disminuye la tolerancia a la glucosa a largo plazo.^{17,29} Sin embargo, en este estudio se observó que las concentraciones de glucosa e insulina de las hembras (F1) en la edad adulto joven (100 días), aumentaron la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, el grupo de hembras (F1) de madres desnutridas únicamente durante la gestación (RC), tiende a aumentar la concentración sérica de insulina. Este resultado es similar a las observaciones de otros estudios experimentales en donde ratas alimentadas con dietas isocalóricas con 8% de proteína en épocas tempranas del desarrollo tuvieron mejor regulación de la glucosa que las ratas del grupo control, pero que eventualmente desarrollaron intolerancia a la glucosa al año de edad.^{50,62} El aumento de la sensibilidad de la insulina puede deberse a que los órganos sensibles a la insulina como el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo se adaptan a la desnutrición proteínica fetal, de tal forma que aumentan el número de receptores de insulina y la capacidad de distribución de glucosa a las células fetales.^{30,46,47}

A partir de los estudios realizados en hombres nacidos durante el “Invierno Hambriento Holandés” y con el planteamiento de la hipótesis del fenotipo ahorrador, se sabe que la desnutrición intrauterina puede programar al feto para vivir en condiciones de escasez, de tal manera que si en la vida postnatal vive en abundancia habrá más riesgo de padecer obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares. En el estudio realizado por Mark. H. Vickers y colaboradores,⁷⁰ en el que se desnutrieron madres gestantes y posteriormente sus crías fueron alimentadas con dieta hipercalórica, se observó que las crías fueron hiperinsulinémicas, con altas concentraciones séricas de leptina, presentaron hiperfagia y obesidad. Por lo que la abundancia nutricional postnatal tuvo consecuencias en la salud de estas crías programadas durante su vida intrauterina.

Este efecto se ha estudiado en este trabajo con el cuarto grupo experimental RC, el cual consiste en someter a ratas gestantes a desnutrición proteínica y alimentarse con dieta control (20% de caseína) durante la lactancia. En el caso de las hembras (F1) cuyas madres pertenecen a este grupo experimental, se observó que el bajo peso al nacimiento fue recuperado rápidamente con el consumo de dieta normal por sus madres durante la lactancia. A pesar de que este grupo no presentó alteraciones en el peso corporal a lo largo de su crecimiento, se observó que la concentración de insulina, a la edad adulto joven (100 días), fue mayor (aunque no significativo) que los grupos de hembras (F1) de madres desnutridas durante la lactancia (RR y CR). Por lo que las hembras (F1) del grupo RC corrían más el riesgo de padecer alguna alteración metabólica que el resto de los grupos experimentales.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar las influencias transgeneracionales de la desnutrición proteínica materna de la rata, por lo que la discusión previa de los resultados de las hembras de la primera generación (F1) es necesaria para entender los efectos que trascienden a las crías de la segunda generación (F2).

Recientemente se ha encontrado que los efectos de la programación fetal trascienden a más de una generación. El estudio de Stewart en 1975, mostró que la desnutrición proteínica durante la gestación de la rata reduce el peso al nacimiento de las crías y que este efecto seguía observándose durante su crecimiento. Este trabajo se continuo por 12 generaciones y se vio que las crías hijas cuyas madres habían sido desnutridas durante la gestación, continuaron presentando alteraciones en su desarrollo. Por lo que el bajo peso que éstas ratas tenían al nacimiento, no se recuperaba a lo largo de su vida.⁶⁴ Por otro lado, se ha observado que factores ambientales, como la exposición fetal a glucocorticoides en ratas, puede alterar el peso al nacimiento y la actividad de la PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxilasa), enzima clave en la síntesis de glucógeno, en crías de la segunda generación expuestas a este tipo de estrés ambiental.¹⁹ En el presente trabajo se observó que el efecto transgeneracional de la desnutrición proteínica durante la gestación de las ratas de la generación cero (F0), no altera el crecimiento y metabolismo de las hembras de la segunda generación (F2), cuyas abuelas consumieron dieta restringida durante la lactancia (RR y CR), sin embargo el peso al nacimiento del grupo de hembras (F2) cuyas abuelas

consumieron dieta restringida únicamente en la gestación (RC) fue el mayor de todos los grupos experimentales, aunque no significativo respecto al grupo CC.

Se observó que los efectos transgeneracionales de la restricción proteínica influyó de forma diferente entre sexos, ya que los machos (F2) fueron más afectados que las hembras. A pesar de no mostrar diferencias estadísticas en el peso al nacimiento, a la edad adulto joven (100 días) los machos (F2) cuyas abuelas fueron desnutridas durante la lactancia (RR y CR), presentaron las mismas alteraciones en el peso corporal que las hembras (F1), es decir sus madres. Los cambios fisiológicos que sufrieron las hembras (F1) durante su vida fetal pueden repercutir en un ambiente intrauterino adverso para sus crías durante la gestación, por lo que las alteraciones que sufrió la madre durante su vida fetal trasciende a las siguientes generaciones.^{20,43} Esto podría explicar los resultados obtenidos para el grupo experimental RR de crías (F2), en donde la desnutrición proteínica durante la gestación de las madres (F0) origina adaptaciones fetales que alteran permanentemente el crecimiento de sus crías. Un ejemplo de este efecto transgeneracional de la programación fetal que no involucra mecanismos no genómicos es el observado durante el “Invierno Hambriento Holandés”, en donde las mujeres que nacieron durante este periodo fueron desnutridas durante su vida fetal, fueron más pequeñas por lo que fueron más propensas a tener bebés con retardo en el crecimiento intrauterino.⁴³

En el presente trabajo, tanto las hembras (F1) como sus crías machos (F2) pertenecientes al grupo experimental CR, conservan menor tamaño corporal. La desnutrición proteínica de las madres (F0) durante la lactancia, al igual que el estrés nutricional intrauterino, genera cambios fisiológicos en sus crías hijas (hembras F1) y sus nietos (machos F2). Las madres (F1) son más pequeñas, lo cual trasciende a sus crías machos (F2). Es importante tener presente que el feto sólo podrá alcanzar su máximo crecimiento intrauterino, si el tamaño del útero de la madre lo permite. La evidencia experimental indica que el ambiente en el útero materno actúa como fuerte condicionante del crecimiento durante la vida fetal, controlando el límite al cual el feto alcanzará su máximo tamaño.⁴³

A la fecha se conoce poco sobre los efectos transgeneracionales de la programación fetal sobre la concentración sérica de leptina de la rata. En este trabajo se observó que el efecto del consumo de la dieta restringida (10% de caseína) por las madres (F0) durante la gestación y/o la lactancia, solamente afectó a las hembras (F1) de los grupos restringidos en

la lactancia. La concentración de leptina de las crías hembras y machos de la segunda generación (F2) no fue alterada, sin embargo la ingesta de alimento en la edad adulto joven (100 días) fue menor en los grupos de machos (F2) cuyas abuelas fueron desnutridas en la lactancia (RR y CR). Por lo que el efecto de la desnutrición proteínica de las madres (F0) durante la lactancia, no sólo se presentó en la disminución de peso e ingesta de alimento de los grupos de hembras (F1), sino que cuando éstas hembras (F1) fueron madres, sus crías macho (F2) tuvieron la misma característica que sus madres a la misma edad. Estos resultados muestran el efecto transgeneracional de la desnutrición proteínica.

El relacionar la disminución del peso corporal y de la ingesta de alimento en estos grupos de machos (F2) con concentraciones de leptina similares al grupo control, indica que existen alteraciones a la acción de la leptina. Si las hembras (F1) tuvieron menor concentración de leptina en estos grupos restringidos en la lactancia, a la misma edad que los machos (F2), posiblemente durante la gestación se presentaron cambios metabólicos que modificaron el ambiente endócrino de sus crías macho, cambiando su propio metabolismo.

Las alteraciones en el ambiente nutricional intrauterino modifica permanentemente el crecimiento del páncreas fetal y el número de células β al nacimiento, lo cual favorece el desarrollo de las alteraciones en el metabolismo de glucosa en la edad adulta.²³ Esta situación resulta en intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en la vida adulta, lo que predispone al desarrollo de diabetes gestacional.⁵⁶ A pesar de que las hembras (F1) no tuvieron cambios en las concentraciones de glucosa e insulina a la edad adulto joven, posiblemente fueron más propensas a padecer alteraciones en el metabolismo de glucosa al aumentar la edad y durante la gestación. En el ambiente intrauterino de una madre con diabetes gestacional, el feto debe adaptarse al aumento en el abastecimiento de glucosa y dichas adaptaciones las lleva a cabo mediante la acción y producción de insulina, aumentando la actividad de las células β fetales del páncreas lo cual ocasiona hiperinsulinemia en las crías. Como consecuencia de la hiperinsulinemia, aumentan los receptores de insulina en los tejidos sensibles a la insulina, lo cual acelera la absorción de glucosa y el feto no presenta bajo peso al nacimiento.¹ En el presente estudio se observó que las crías de la segunda generación (F2), no mostraron diferencias estadísticas en el peso al nacimiento con respecto al grupo control (CC). Los grupos de machos (F2) cuyas abuelas

fueron alimentadas con dieta restringida durante la lactancia (RR y CR), presentaron altas concentraciones de insulina a los 100 días de edad, en donde el grupo CR fue el más afectado. La relación insulina/glucosa del grupo de machos (F2) restringido únicamente en la lactancia (CR), indica que este grupo mostró insensibilidad a la insulina y mayor riesgo de padecer resistencia a la insulina, lo cual probablemente es el resultado de haber experimentado durante su vida fetal un ambiente intrauterino con alteraciones en la homeostasis de la glucosa.

Este efecto transgeneracional de la desnutrición proteínica de madres (F0) durante la gestación y/o la lactancia, sobre el metabolismo de glucosa también se observó en el caso de las hembras (F2) del grupo RC. Este grupo de hembras (F2) mostró alta concentración de insulina, lo cual se refleja en la relación insulina/glucosa. Por lo que las hembras (F1) cuyas madres consumieron dieta restringida únicamente durante la gestación (RC), probablemente son más propensas a desarrollar diabetes durante la gestación.

Por lo tanto, la diabetes gestacional es un factor que predispone a la siguiente generación a presentar intolerancia a la glucosa en la vida adulta, por lo que éste es uno de los mecanismos no genómicos que explican el desarrollo de diabetes a través de las generaciones.

*Conclusiones y
Perspectivas*

CONCLUSIONES

- La restricción proteínica durante el periodo perinatal de la rata repercute a largo plazo en la salud y desarrollo de las crías.
- La restricción proteínica durante la lactancia de las ratas madres (F0) ocasiona un efecto transgeneracional en el peso corporal y la ingesta de alimento de los machos de la segunda generación (F2).
- La desnutrición proteínica materna no mostró efectos transgeneracionales en la concentración de leptina de las hembras de la segunda generación (F2), sin embargo si afecta la regulación de la leptina en las crías macho (F2).
- La alteración del metabolismo de glucosa de las hembras (F1) en la edad adulto joven (100 días), provocada por la dieta baja en proteína de sus madres (F0) durante la gestación y/o la lactancia, ocasiona que sean más propensas a presentar diabetes durante su gestación, lo cual a su vez provee una alteración en la homeostasis de la glucosa de sus propias crías durante su vida fetal.
- La dieta baja en proteína durante la lactancia de ratas madres de la generación cero (F0) ocasiona el incremento de las concentraciones de insulina y glucosa en machos en la segunda generación (F2) en la edad adulto joven (100 días), aumentando el riesgo de presentar insensibilidad y resistencia a la insulina.
- La restricción proteínica materna de la rata presenta efectos transgeneracionales sobre el crecimiento y metabolismo de glucosa e insulina de las crías.

-
- Los grupos experimentales más afectados por la restricción proteínica materna de las madres de la generación cero (F0), fueron las crías de ratas alimentadas con dieta restringida (10% de caseína) durante la lactancia, en ambas generaciones (F1 y F2).
 - Los efectos transgeneracionales de la desnutrición proteínica intrauterina de la rata afecta a las crías hembras y machos de diferente manera, siendo los machos (F2) los más alterados.
 - Los efectos de la restricción proteínica durante la gestación y/o la lactancia de la rata trascienden a través de generaciones.

PERSPECTIVAS

- Estudiar a las ratas de la primera generación (F1) durante el crecimiento y la gestación para poder esclarecer el ambiente intrauterino metabólico y endócrino al que estarán sometidas las crías de la segunda generación (F2).
- Estudiar la respuesta del páncreas a la estimulación por glucosa en las crías de la primera y segunda generación (F1 y F2) de los diferentes grupos experimentales.
- Cuantificar el contenido de insulina en el páncreas de las ratas de la segunda generación (F2) cuyas abuelas (F0) fueron desnutridas durante el embarazo y/o la lactancia.
- Analizar la composición química de la leche materna de las ratas de la generación cero (F0) y de la primera generación (F1).
- Estudiar cuántas generaciones tardarán en recuperarse las crías de los efectos de la desnutrición proteínica durante la gestación y/o lactancia de las ratas de la generación cero (F0).

Bibliografía

1. Aerts L, Van Assche FA. *Intra-uterine transmission of disease*. Placenta. 2003, 24(10):905-11.
2. Arroyo A. P. *La nutrición de la madre: el periodo de la lactancia*. Cuad Nutr. 1983, 8:17-31.
3. Aubert ML, Pierroz DD, Gruaz NM, d'Allevés V, Vuagnat BA, Pralong FP, Blum WF, Sizonenko PC. *Metabolic control of sexual function and growth: role of neuropeptide Y and leptin*. Mol Cell Endocrinol. 1998 May 25;140(1-2):107-13.
4. Auwerx J, Staels B. *Leptin*. Lancet. 1998, 351(9104):737-42.
5. Barbosa L, De Santiago S. *Effect of food consumption restriction in adult rats on the growth and tissue composition of their suckling offspring*. Arch Latinoam Nutr. 1994, 44(2):98-104.
6. Barker DJP. *The malnourished baby and infant*. Br Med Bull. 2001,60:69-88.
7. Barker, DJP. *Mothers, Babies and health in Later Life*. 1998. London: Churchill Livingstone.
8. Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D Jr, Schwartz MW. *Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight*. Brain Res. 1999, 848(1-2):114-23.
9. Bates SH, Myers MG Jr. *The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function*. Trends Endocrinol Metab. 2003 Dec;14(10):447-52.
10. Bispham J, Gopalakrishnan GS, Dandrea J, Wilson V, Budge H, Keisler DH, Broughton Pipkin F, Stephenson T, Symonds ME. *Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy to nutritional manipulation: consequences for maternal plasma leptin and cortisol and the programming of fetal adipose tissue development*. Endocrinology. 2003, 144(8):3575-85.
11. Bourges, H. *Una respuesta evolutiva. Los motivos de la lactancia*. Cuad Nutr. 1997, 20(4); 10-16.
12. Brann DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB, Buchanan CD. *Leptin and reproduction*. Steroids. 2002 Feb;67(2):95-104.
13. Breier BH, Vickers MH, Ikenasio BA, Chan KY, Wong WP. *Fetal programming of appetite and obesity*. Mol Cell Endocrinol. 2001,185(1-2):73-9.

14. Carrascosa, A. Yeste, D. *Leptina: una hormona del tejido adiposo*. Rev. Chil. 1999,26 (1).
15. Casabiell X, Pineiro V, Tome MA, Peino R, Dieguez C, Casanueva FF. *Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake*. J Clin Endocrinol Metab. 1997 Dec;82(12):4270-3.
16. Casanueva, E. *La lactancia: un reto materno*. Cuad Nutr.1997, 20 (1);34-40.
17. Desai M, Byrne CD, Zhang J, Petry CJ, Lucas A, Hales CN. *Programming of hepatic insulin-sensitive enzymes in offspring of rat dams fed a protein-restricted diet*. Am J Physiol. 1997, 272(5 Pt 1):G1083-90.
18. Desai M, Crowther NJ, Ozanne SE, Lucas A, Hales CN. *Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life*. Biochem Soc Trans. 1995, 23(2):331-5.
19. Drake AJ, Walker BR, Seckl JR. *Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004 Jun 3. (In press)
20. Drake AJ, Walker BR. *The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk*. J Endocrinol. 2004,180(1):1-16.
21. Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD. *Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y*. Science. 1996, 274(5293):1704-7.
22. Fall CH. *Non-industrialised countries and affluence*. Br Med Bull. 2001;60:33-50.
23. Fowden AL, Hill DJ. *Intra-uterine programming of the endocrine pancreas*. Br Med Bull. 2001;60:123-42.
24. Friedman JM, Halaas JL. *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature. 1998 , 395(6704):763-70.
25. Gluckman PD. *Editorial: nutrition, glucocorticoids, birth size, and adult disease*. Endocrinology. 2001,142(5):1689-91.
26. Godfrey KM, Barker DJ. *Fetal nutrition and adult disease*. Am J Clin Nutr. 2000, 71(5 Suppl):1344S-52S.

27. Godfrey KM. *The role of the placenta in fetal programming-a review*. *Placenta*. 2002 ,23 Suppl A:S20-7.
28. Hoet JJ, Hanson MA. *Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development*. *J Physiol*. 1999, 514 (Pt 3):617-27.
29. Holness M, Langdown ML, Sugden MC. *Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of Type 2 diabetes mellitus*. *Biochem. J*. 2000,349; 657-665.
30. Holness MJ, Sugden MC. *Antecedent protein restriction and high-fat feeding interactively sensitive the leptin response to elevated insulin*. *Mol Cell Endocrinol*. 2001,173(1-2):53-62.
31. Ibañez,E. Tejero,E. *La Leptina*. *Cuad Nutr*. 1999, 22(5);200-204.
32. Jorg Dotsch, Wolfgang Rascher, Udo Meibner. *Perinatal programming of appetite control by leptin?* *Eur. J. Endocrinol*. 2004, 151; 159-160.
33. Kieffer TJ, Habener JF. *The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000, 278(1):E1-E14.
34. Klebanoff MA, Schulsinger C, Mednick BR, Secher NJ. *Preterm and small-for-gestational-age birth across generations*. *Am J Obstet Gynecol*. 1997,176(3):521-6.
35. Langer A. *La alimentación del recién nacido: una experiencia compartida*. *Cuad Nutr*. 1983,9:17-32.
36. Latorraca MQ, Carneiro EM, Boschero AC, Mello MA. *Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats*. *Br J Nutr*. 1998, 80(3):291-7.
37. Leticia Parra-Gámez, Joaquín Reyes Téllez-Gurón, Carolina Escobar Briones. *La desnutrición y sus consecuencias en el metabolismo intermedio*. *Rev Fac Med UNAM*. 2003,46 (1);32-36.
38. Lucas A. *Programming by early nutrition: an experimental approach*. *J. Nutr*. 1998 128:104S-406S.
39. Mahan, K y Escott-Stump, S. *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. 2001. México, D.F. Mc Graw Hill Interamericana. 181-259.

40. Martin JF, Johnston CS, Han CT, Benyshek DC. *Nutritional origins of insulin resistance: a rat model for diabetes-prone human populations*. J Nutr. 2000, 130(4):741-4.
41. Moura AS, Franco de Sa CC, Cruz HG, Costa CL. *Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptin*. Braz J Med Biol Res. 2002, 35(5):617-22.
42. Mueller WM, Gregoire FM, Stanhope KL, Mobbs CV, Mizuno TM, Warden CH, Stern JS, Havel PJ. *Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes*. Endocrinology. 1998, 139(2):551-8.
43. Nathanielsz, PW. *Life in the womb: The origin of health and disease*. 1999 Ithaca, NY. Promethean Press.
44. Nathanielsz, PW. *Tiempo para nacer*. 1995. Barcelona, España. Galaxia-Gutenberg.
45. Ozanne SE, Hales CN. *Early programming of glucose-insulin metabolism*. Trends Endocrinol Metab. 2002, 13(9):368-73.
46. Ozanne SE, Smith GD, Tikerpae J, Hales CN. *Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams*. Am J Physiol. 1996, 270(4 Pt 1):E559-64.
47. Ozanne SE, Wang CL, Coleman N, Smith GD. *Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats*. Am J Physiol. 1996, 271(6 Pt 1):E1128-34.
48. Ozanne SE. *Metabolic programming in animals*. Br Med Bull. 2001;60:143-52.
49. Petry CJ, Ozanne SE, Hales CN. *Programming of intermediary metabolism*. Mol Cell Endocrinol. 2001, 185(1-2):81-91.
50. Petry CJ, Ozanne SE, Wang CL, Hales CN. *Early protein restriction and obesity independently induce hypertension in 1-year-old rats*. Clin Sci (Lond). 1997, 93(2):147-52.
51. Polin R, Fox W, Abman S. *Fetal and neonatal physiology*. 2004. Philadelphia, Pennsylvania. Saunders. Vo.1; 464, 478-482.
52. Ramakrishnan U, Martorell R, Schroeder DG, Flores R. *Role of intergenerational effects on linear growth*. J Nutr. 1999, 129(2S Suppl):544S-549S.

53. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP. *Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine*. Lancet. 1998, 351(9097):173-7.
54. Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. *Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally*. Am J Clin Nutr. 1999, 70(5):811-6.
55. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. J Nutr. 1993, 123(11):1939-51.
56. Reusens B, Remacle C. *Intergenerational effect of an adverse intrauterine environment on perturbation of glucose metabolism*. Twin Res. 2001,4(5):406-11.
57. Reynaldo Miranda, Nancy G. Saravia, Ruben Ackerman, Neva Murphy, Stephen Berman, David N McMurray. *Effect of maternal nutritional status on immunological substances in human colostrums and milk*. Am J Clin Nutr.1983, 37; 632-640.
58. Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. *Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview*. Mol Cell Endocrinol. 2001, 185(1-2):93-8.
59. Sampson DA, Hunsaker HA, Jansen GR. *Dietary protein quality, protein quantity and food intake: effects on lactation and on protein synthesis and tissue composition in mammary tissue and liver in rats*. J Nutr. 1986, 116(3):365-75.
60. Sánchez-Castillo CP, B.A., Pichardo-Ontiveros E, Esteves-Jaramillo A, Sierra-Ovando AE, Villa AR, Lara A, Velázquez-Monroy O, Philip W, James T., *Epidemiología de la obesidad*, en *Obesidad. Epidemiología, fisiopatología y manifestaciones clínicas*, M.U. Nahum Méndez Sánchez, Editor. 2002, Manual Moderno: México, D.F. 5-31.
61. Seidell, J.C. y K.M. Flegal. *Assessing obesity: classification and epidemiology*. Br Med Bull, 1997. 53(2): 238-52.
62. Shepherd PR, Crowther NJ, Desai M, Hales CN, Ozanne SE. *Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats*. Br J Nutr.1997, 78(1):121-9.

63. Simón E, Del Barrio AS. *Leptin and obesity* An Sist Sanit Navar. 2002, 25 Suppl 1:53-64.
64. Stewart RJ, Preece RF, Sheppard HG. *Twelve generations of marginal protein deficiency*. Br J Nutr. 1975, 33(2):233-53.
65. Sweeney G. *Leptin signalling*. Cell Signal. 2002, 14(8):655-63.
66. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J. *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. Cell. 1995, 83(7):1263-71.
67. Teixeira C, Passos M, Ramos C, Dutra S, Moura E. *Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation*. J Nutr Biochem. 2002, 13(8): 493- 498.
68. Urdaneta M.A. *El problema de la diabetes mellitus tipo II en la población mexicano-americana*. Cuad Nutr. 2000, 23(4): 461-463.
69. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. *Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000, 279(1):E83-7.
70. Vickers MH, Ikenasio BA, Breier BH. *IGF-I treatment reduces hyperphagia, obesity, and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming*. Endocrinology. 2001,142(9):3964-73.
71. Villalpando, S. *Efectos tempranos y tardíos de la alimentación al pecho sobre la salud de los niños*. Cuad Nutr.2001, 24 (5);211-222.
72. Weiss PA, Scholz HS, Haas J, Tamussino KF, Seissler J, Borkenstein MH. *Long-term follow-up of infants of mothers with type 1 diabetes: evidence for hereditary and nonhereditary transmission of diabetes and precursors*. Diabetes Care. 2000, 23(7):905-11.
73. Wells JC. *The thrifty phenotype hypothesis: thrifty offspring or thrifty mother?* J Theor Biol. 2003, 221(1):143-61.
74. Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP, Schevitz RW. *Crystal structure of the obese protein leptin-E100*. Nature. 1997, 387(6629):206-9.

75. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature. 1994, 372(6505):425-32.

Anexos

Anexo 1. Reactivos utilizados para la cuantificación de insulina en el suero de rata
(Estuche de insulina Cat.# RI-13K. Linco Research®)

1. Amortiguador de ensayo pH 7.4

0.05 M sales de fosfato, con 0.025 M de EDTA y 0.08% de azida de sodio.

2. Antisuero

Solución en amortiguador de ensayo de antisuero de cobayo con el anticuerpo de insulina de rata.

3. Insulina marcada con I¹²⁵

Insulina liofilizada purificada por HPLC (Cromatografía de líquidos de alta resolución) y marcada con I¹²⁵ (actividad específica 367 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). Para su uso se disuelve la insulina marcada radioactivamente con el amortiguador de hidratación de la marca. Se deja reposar a temperatura ambiente por 30 minutos, con agitación suave ocasional.

4. Amortiguador de hidratación de la marca

Amortiguador de ensayo que contiene el anticuerpo de IgG normal de cobayo como cargador.

5. Soluciones estándar

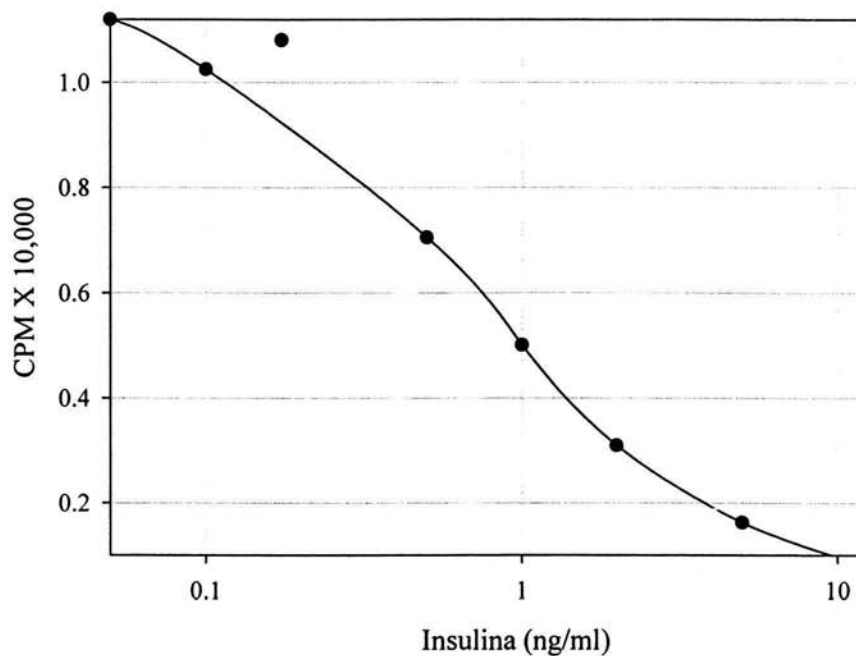
Insulina de rata purificada y disuelta en amortiguador estándar de insulina a las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 ng/ml.

6. Controles de calidad 1 y 2

Insulina de rata purificada en amortiguador de ensayo.

7. Agente precipitante

Antisuero de cabra con el anticuerpo de IgG de cobayo con 0.05% de tritón x-100 en 0.05M de sales de fosfato, 0.025 M de EDTA y 0.08% de azida de sodio.

Anexo 2. Curva patrón para la cuantificación de insulina en el suero de rata**Tabla A.** Concentración y radioactividad de los estándares de insulina (Linco ®)

Estándar	Concentración de insulina (ng/ml)	Cuentas por minuto (CPM) x 1,000
1	0.1	1.0224
2	0.2	0.7051
3	0.5	1.0836
4	1	0.5005
5	2	0.3098
6	5	0.1624
7	10	0.0959

Anexo 3. Reactivos utilizados para la cuantificación de leptina en el suero de rata
(Estuche de leptina Cat.# RL-83K. Linco Research ®)

1. Amortiguador de ensayo pH 7.4

0.05 M sales de fosfato, con 0.025 M de EDTA, 0.08% de azida de sodio y 0.05% de tritón x-100.

2. Antisuero

Solución en amortiguador de ensayo de antisuero de cobayo con el anticuerpo de leptina de rata.

3. Leptina marcada con I¹²⁵

Leptina liofilizada purificada por HPLC (Cromatografía de líquidos de alta resolución) y marcada con I¹²⁵ (actividad específica 135 µCi/µg). Para su uso se disuelve la leptina marcada radioactivamente con el amortiguador de hidratación de la marca. Se deja reposar a temperatura ambiente por 30 minutos, con una agitación suave ocasional.

4. Amortiguador de hidratación de la marca

Amortiguador de ensayo que contiene el anticuerpo de IgG normal de cobayo como cargador.

5. Soluciones estándar

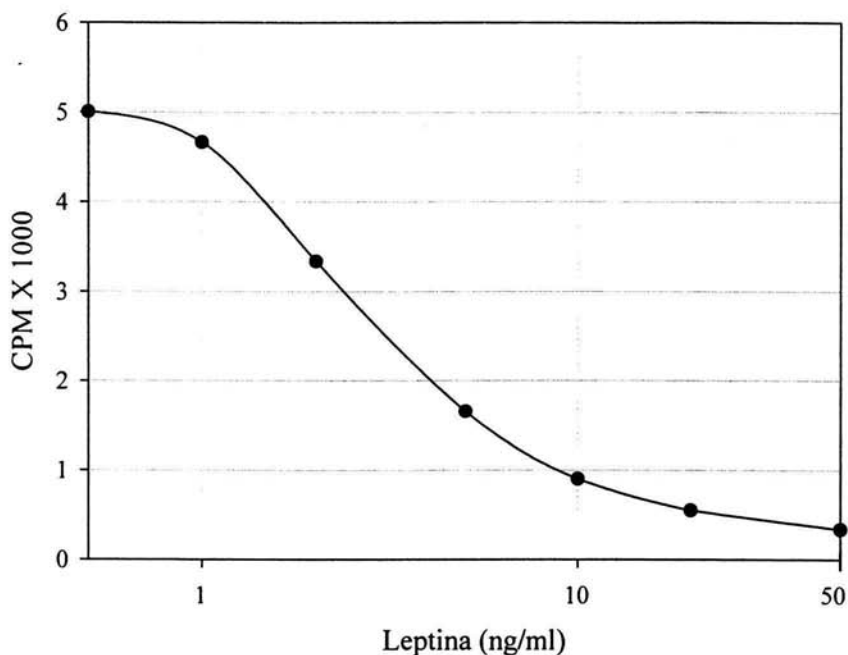
Leptina de rata purificada y disuelta en amortiguador estándar de leptina a las siguientes concentraciones: 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 y 50 ng/ml.

6. Controles de calidad 1 y 2

Leptina de rata purificada en amortiguador de ensayo.

7. Agente precipitante

Antisuero de cabra con el anticuerpo de IgG de cobayo con 0.05% de tritón x-100 en 0.05M de sales de fosfato, 0.025 M de EDTA y 0.08% de azida de sodio.

Anexo 4. Curva patrón para la cuantificación de leptina en el suero de rata**Tabla B.** Concentración y radioactividad de los estándares de leptina (Linco®)

Estándar	Concentración de leptina (ng/ml)	Cuentas por minuto (CPM) x 1,000
1	0.5	5.0040
2	1	4.6640
3	2	3.3362
4	5	1.6570
5	10	0.9010
6	20	0.5500
7	50	0.3350