



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE UN AMBIENTE HIPERCALÓRICO PERINATAL
SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RITMO DIARIO DE GLUCOSA,
INSULINA Y LEPTINA EN LA RATA JUVENIL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

BUSTAMANTE VALDEZ DULCE JOCELYN



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de Datos de Jurado

1. Datos del alumno
Bustamante
Valdez
Dulce Jocelyn
22 32 91 11
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
30714511-4
2. Datos del Tutor
Doctora.
Pilar
Durán
Hernández
3. Datos del sinodal 1
Doctor.
Rene de Jesús
Cárdenas
Vázquez
4. Datos del sinodal 2
Doctora.
María Guadalupe
Flores
Cruz
5. Datos del sinodal 3
Doctor.
Josué Orlando
Ramírez
Jarquin
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Cinthia Rocío
Juárez
Tapia
7. Datos del trabajo escrito
Efecto de un ambiente hipercalórico perinatal sobre la expresión del ritmo diario
de glucosa, insulina y leptina en la rata juvenil
90 p
2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación académica, por la calidad y oportunidad de los conocimientos recibidos.

A la Facultad de Ciencias por el uso de las instalaciones y por el apoyo del personal. Al laboratorio de Biología Animal Experimental por permitirme el uso de sus instalaciones en mis procedimientos experimentales.

A mis padres Dulce y Marco por el apoyo incondicional, la dedicación, la ayuda para realizar mis sueños, por la educación que me han brindado y sobre todo por el amor que me dan a cada día.

A mis hermanas Jacquelyn y Jéssica por estar conmigo en cada paso, triunfo y fracaso, por el apoyo y por los buenos consejos, a Vale y Vane por permitirme ser su ejemplo, y a mi abuelita por siempre apoyarme.

A mi hermano Carlos por ser mi orgullo y el mejor ejemplo a seguir que puedo tener.

Al M. en C. Enrique Moreno por todo su apoyo, tiempo, conocimientos y los sabios consejos que me brindo siempre para realizar este proyecto, por darse el tiempo de revisar este trabajo, además por enseñarme el mundo de la cronobiología.

A la Dra. Pilar Durán por apoyar a cada día dentro y fuera de las aulas, por ser un ejemplo a seguir y por alentarme a siempre dar lo mejor de mí y por todo el tiempo y ayuda brindada.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado, por compartirme sus conocimientos, por su apoyo y experiencia recibida.

- Dra. Pilar Durán Hernández
- Dr. Rene Cárdenas Vázquez
- Dra. Guadalupe Flores Cruz
- Dr. Josué O. Ramírez Jarquin
- M. en C. Cinthia Juárez Tapia.

Al Biol. Martin Fuentes Cano, por su apoyo, conocimientos, tiempo y sabios consejos.

A mis amigos Sebastián, Mariana, Horacio por ser un gran apoyo durante toda mi formación universitaria, por sus ánimos y sobre todo por sus sabios consejos para realizar este proyecto.

Al M. en C. Sebastián Zúñiga por asesorarme en la realización de los análisis estadísticos.

A mi amiga Miriam, por confiar en mí, por todo su apoyo y por alentarme a seguir adelante en los malos momentos.

A mis compañeros de laboratorio por sus consejos, por apoyarme incondicionalmente y sobre todo por las tardes de risas y momentos divertidos.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a las personas que me dieron su apoyo incondicional y me alentaron a seguir con este sueño que se ha vuelto realidad:

A mis padres, **Dulce y Marco Antonio**

A mi tutora, **Dra. Pilar Durán.**

A mis hermanos, **Carlos, Jacquelyn, Jéssica, Valeria y Vanessa**

A mis amigos, **Miriam, Gustavo, Israel, Horacio y Mariana**

| I. ÍNDICE | |
|--|----------------|
| APARTADOS | PÁGINAS |
| I. ÍNDICE..... | 7 |
| II. ÍNDICE DE FIGURAS..... | 9 |
| III. ÍNDICE DE TABLAS..... | 10 |
| IV. ABREVIATURAS..... | 11 |
| V. RESUMEN..... | 14 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 15 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 18 |
| 2.1. Periodos críticos del desarrollo en el cerebro en mamíferos..... | 18 |
| 2.2. Ritmos Biológicos..... | 20 |
| 2.3. Sistema circadiano, el Sistema Nervioso Central y el metabolismo en mamíferos..... | 24 |
| 2.4. Patrones rítmicos de la glucosa..... | 28 |
| 2.5. Patrones rítmicos de la insulina..... | 29 |
| 2.6. Patrones rítmicos de la leptina..... | 30 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 32 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 32 |
| 5. OBJETIVOS..... | 32 |
| 5.1. Objetivo General..... | 32 |
| 5.2. Objetivos Particulares..... | 33 |
| 6. METODOLOGÍA..... | 33 |
| 6.1. Animales..... | 34 |
| 6.2. Dietas..... | 34 |
| 6.2.1. Dieta control (Lab Chow, Purina 5008)..... | 34 |
| 6.2.2. Protocolo de Malnutrición Hiperclórica (MH)..... | 34 |
| 6.3. Cruza de las ratas..... | 35 |
| 6.4. Análisis de parámetros plasmáticos..... | 36 |
| 6.5. Índice de HOMA (Modelo de evaluación Homeostática)..... | 37 |
| 6.6. Prueba de tolerancia a la glucosa (PTG)..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 6.7. Análisis de los datos..... | 38 |
| 7. RESULTADOS..... | 40 |
| 7.1. Curvas de crecimiento e Índice de Lee..... | 40 |
| 7.2. Análisis de los parámetros plasmáticos..... | 43 |
| 7.2.1. Perfiles diarios en la concentración de Glucosa..... | 45 |
| 7.2.2. Prueba de tolerancia a la glucosa..... | 46 |
| 7.2.3. Perfiles diarios en la concentración de Insulina..... | 48 |
| 7.2.4. Índice de HOMA (Modelo de Evaluación Homeostática)..... | 50 |
| 7.2.5. Perfiles diarios en la concentración de Leptina..... | 51 |
| 7.3. Corticosterona como índice de estrés..... | 53 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 54 |
| 8.1. Malnutrición hipercalórica perinatal..... | 54 |
| 8.1.1. Análisis de los parámetros plasmáticos..... | 56 |
| 8.1.1.1. Glucosa e insulina..... | 57 |
| 8.1.1.2. Leptina..... | 61 |
| 8.1.2. Prueba de tolerancia a la glucosa e índice de HOMA..... | 63 |
| 9. CONCLUSIÓN..... | 65 |
| 10. REFERENCIAS..... | 67 |
| 11. ANEXOS..... | 78 |
| 11.1. Malnutrición hipercalórica materna..... | 78 |
| 11.1.1. Análisis de los datos..... | 78 |
| 11.1.2. Resultados..... | 79 |
| 11.1.2.1 Ingesta de alimento..... | 79 |
| 11.1.2.2. Ganancia de peso corporal..... | 80 |
| 11.1.2.3. Niveles de glucosa en sangre y la prueba de tolerancia a la glucosa..... | 80 |
| 11.1.3. Discusión..... | 83 |
| 11.2. Corticosterona como índice de estrés..... | 86 |
| 11.2.1. Discusión..... | 88 |
| 11.3. El reloj molecular en mamíferos..... | 89 |

II. ÍNDICE DE FIGURAS.

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| Figura 1. | Comparación de los principales eventos del desarrollo en el cerebro de ratas y seres humanos..... | 19 |
| Figura 2. | Esquema que muestra las propiedades básicas de los ritmos biológicos..... | 23 |
| Figura 3. | Localización y caracterización del núcleo supraquiasmático en la rata..... | 24 |
| Figura 4. | El Núcleo supraquiasmático y la homeostasis energética..... | 27 |
| Figura 5. | Diseño experimental..... | 33 |
| Figura 6. | Peso corporal..... | 41 |
| Figura 7. | Talla corporal..... | 41 |
| Figura 8. | Índice de Lee | 42 |
| Figura 9. | Fotografía de la comparación de talla en ratas control y malnutridas..... | 42 |
| Figura 10. | Perfil diario de glucosa en plasma..... | 46 |
| Figura 11. | Prueba de tolerancia a la glucosa..... | 47 |
| Figura 12. | Área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa ... | 48 |
| Figura 13. | Perfil diario de insulina en plasma..... | 49 |
| Figura 14. | Índice de HOMA-RI..... | 50 |
| Figura 15. | Índice de HOMA-B..... | 51 |
| Figura 16. | Perfil diario de leptina en el plasma..... | 52 |
| Figura 17. | Corticosterona como índice de estrés..... | 53 |
| Figura 18. | Consumo de alimento..... | 79 |
| Figura 19. | Ganancia de peso (madres)..... | 80 |
| Figura 20. | Glucosa en sangre (madres)..... | 81 |
| Figura 21. | Prueba de tolerancia a la glucosa (madres)..... | 82 |
| Figura 22. | Área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa.... | 82 |
| Figura 23. | Perfil diario de corticosterona..... | 87 |
| Figura 24. | Mecanismo central del reloj molecular de mamíferos..... | 90 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| II. | ÍNDICE DE TABLAS..... | |
| Tabla I. | Composición nutricional de las dietas..... | 35 |
| Tabla II. | Concentraciones promedio máximas para los perfiles diarios de glucosa e insulina..... | 43 |
| Tabla III. | Valores obtenidos del ajuste de Cosinor para los perfiles diarios de glucosa e insulina | 44 |
| Tabla IV. | Valores obtenidos del ajuste de Cosinor para el perfil diario de corticosterona..... | 87 |

II. ABREVIATURAS.....

| | |
|--------------------------------|--|
| α-MSH | α -Melanocito estimulante. |
| ACTH | Hormona adrenocorticotropa. |
| AgRP | Proteínas relacionadas con agouti. |
| ARC | Núcleo arqueado. |
| Bmal | Gen <i>Bmal</i> . |
| BMAL1 | Proteína tipo ANRT de músculo y cerebro (brain-and-muscle-ANRT-like protein). |
| CLOCK | Proteína del gen que elimina del ritmo circadiano de actividad locomotriz (circadian locomotor output cycles kaput). |
| Clock | Gen <i>Clock</i> . |
| CO | Grupo control, alimentado con dieta estándar para roedores de laboratorio. |
| CRH | Factor liberador de corticotropinas. |
| CRY | Proteína del gen <i>Cryptochrome</i> (Cry). |
| Cry | Gen <i>Cryptochrome</i> . |
| CT | Tiempo circadiano (<i>CT</i> , por sus siglas en inglés) |
| DMH | Hipotálamo dorsomedial. |
| FFA | Ácidos grasos libres. |
| GR | Glucocorticoides. |
| HOMA | Modelo de evaluación homeostática (<i>Homeostasis model assessment</i>). |
| HOMA-RI | Modelo de evaluación homeostática de resistencia a la insulina (<i>Homeostasis model assessment-Insulin resistance</i>). |

| | |
|-----------------|---|
| HOMA-β | Modelo de evaluación homeostática de la función de las células β del páncreas (<i>Homeostasis model assessment-of pancreatic β-cell fuction</i>). |
| HPA | Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. |
| Ip | Intraperitoneal. |
| LepR | Receptor específico de leptina. |
| LH | Hipotálamo lateral. |
| LHA | Área hipotalámica lateral |
| MCH | Hormona controladora de melanina |
| MH | Malnutrido hipercalórico. |
| MHp | Malnutrido hipercalórico perinatal. |
| MPOA | Área preóptica medial |
| NPV | Núcleo paraventricular. |
| NPY | Neuropéptido Y. |
| NSQ | Núcleo Supraquiasmático. |
| ORX | Orexina. |
| PER | Proteína del gen <i>Period</i> . |
| Per | Gen <i>period</i> . |
| POMC | Propiomelanocortina. |
| PTG | Prueba de Tolerancia a la Glucosa. |
| REV-ERBα | Receptor nuclear <i>reverse erythroblas-tosis virus α</i> . |
| RI | Resistencia a la Insulina. |
| RORα | Receptor α huérfano relacionado con el receptor de ácido retinoico (<i>retinoic acid receptor-related orphan receptor</i>). |
| SNA | Sistema nervioso autónomo. |

| | |
|-------------|---|
| SNC | Sistema nervioso central. |
| SPZ | Zona subparaventricular del hipotálamo. |
| TG | Triglicéridos. |
| VLPO | Núcleo preóptico ventrolateral. |
| VMH | Región ventromedial del hipotálamo. |
| WT | Wild type |
| ZT | Tiempo del <i>zeitgeber</i> . |

V. RESUMEN

El núcleo supraquiasmático (NSQ) está involucrado en procesos fisiológicos como el sueño, el hambre, la saciedad, y el metabolismo, generando ritmos cercanos a 24 horas (circadianos). Hormonas involucradas en el metabolismo como la insulina, el glucagón, la leptina, la grelina, y el cortisol (o corticosterona en los roedores), están reguladas por el control circadiano. La ingesta de alimentos en cantidad, calidad y tiempo está relacionada con la utilización correcta de estas hormonas metabólicas y por lo tanto en el balance energético.

La nutrición adecuada es uno de los factores involucrados en la salud y desarrollo de los seres vivos. La cantidad y calidad de los nutrientes deben satisfacer las necesidades vitales, por lo que un desbalance en estos provoca alteraciones a diferentes niveles, entre los que se encuentran el hormonal, el metabólico y en la organización del sistema nervioso central en general. Dependiendo del momento en que se presente el desbalance, puede influir en los periodos críticos del desarrollo cerebral y somático con efectos en diferentes etapas de la vida.

Debido a esto, es importante evaluar las alteraciones provocadas por un ambiente hipercalórico perinatal sobre la expresión temporal diaria de los parámetros metabólicos involucrados en el balance energético. En el presente trabajo, se buscó establecer las diferencias en los perfiles diarios, así como las diferencias en amplitud y acrofase de las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina y leptina en rata macho juvenil de la cepa *Sprague-Dawley*.

Las ratas sometidas a malnutrición hipercalórica perinatal (MHp) mostraron menor talla y peso respecto al grupo control (CO) en los días cercanos al destete y hasta los 40 días de edad, así como una menor área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa en el grupo MHp con respecto al grupo CO, por otro lado, en la evaluación del ritmo diario de los parámetros plasmáticos de glucosa ambos grupos presentaron un periodo de 24 horas, pero con un retraso en la acrofase de 2.73 para el MHp, así como un aumento en la amplitud y una disminución en el mesor, en la evaluación del ritmo diario de insulina y leptina, para ambos parámetros no se encontró la expresión de un ritmo diario para el grupo MHp.

Con las observaciones realizadas se concluye que las condiciones nutricionales durante las primeras etapas de desarrollo influyen en el balance energético en las etapas posteriores de la vida, así como en la ritmicidad diaria de glucosa, insulina y leptina por lo que pueden estar relacionadas con condiciones negativas o enfermedades en etapas posteriores del ciclo de vida.

Palabras clave: ritmo diario, malnutrición hipercalórica perinatal, glucosa, insulina y leptina.

I. Introducción

La malnutrición implica que uno o más de los nutrientes esenciales falta, o que los nutrientes están presentes pero en las proporciones incorrectas, afectando la calidad de la dieta (Morgane *et al*, 2002). Actualmente en México existe un doble reto en la malnutrición, la desnutrición y la sobrenutrición, contribuyendo al deterioro de la salud, aumentando el riesgo de enfermedades crónicas como la diabetes y las afecciones cardíacas (OMS, 2015); la desnutrición, afecta principalmente la región sur, la obesidad, lo hace en la región norte, extendiéndose por todo el territorio mexicano. Según la UNICEF, México actualmente ocupa el primer lugar en obesidad infantil y el segundo en obesidad en adultos; la principal causa se debe a los malos hábitos en la alimentación, lo que desemboca en la prevalencia de un 70% de sobrepeso en la edad adulta (UNICEF México)

Las familias de escasos recursos tienen una tendencia a consumir fuentes de calorías baratas, porque el costo relativo de alimentos nutritivos es generalmente mayor. Según la Organización Mundial de la Salud, la malnutrición, directa o indirectamente es responsable del 35% de las muertes entre los niños menores de cinco años; más del 70% de los niños con malnutrición proteico-energética viven en Asia, el 26% vive en África y el 4% en América Latina y el Caribe (OMS, 2000).

Además es uno de los factores que más contribuyen a la carga mundial de morbilidad, retraso en el crecimiento, aumento en el sobrepeso y la obesidad en la infancia, adolescencia, adultez y de manera especial en mujeres embarazadas,

además de que una buena nutrición durante el embarazo es garantía de un bebé más sano (OMS, 2012).

En las últimas décadas se han llevado a cabo diversos estudios tanto en humanos como en modelos animales incluyendo los roedores, para poder dilucidar cuestiones relacionadas con la etiología, el curso y el tratamiento de diversas enfermedades que se presentan actualmente en nuestra sociedad, entre las que se encuentra el sobrepeso, obesidad y diabetes gestacional, las cuales están relacionadas con una ingesta inadecuada de los nutrientes necesarios para un funcionamiento adecuado.

La ingesta de alimentos en cantidad, calidad y tiempo está relacionada con la utilización correcta del balance energético. La cantidad y calidad de los nutrientes deben satisfacer las necesidades vitales de los individuos, por lo que un desbalance en estos provoca alteraciones a diferentes niveles entre los que se encuentran el hormonal y el metabólico, dependiendo del momento en que se establece, puede influir en los periodos críticos del desarrollo cerebral y somático con efectos en la morfología, fisiología y neuroquímica cerebral que impactan altamente las funciones del sistema nervioso, que pueden prevalecer en el corto, mediano o largo plazo (Morgane *et al*, 2002; Morgane *et al*, 1993).

En los últimos años ha aumentado el consumo de alimentos industrializados, los cuales son palatables, y contienen grandes cantidades de azúcar, harinas refinadas y aceites, son altos en calorías y deficientes en nutrientes, se caracterizan por tener precios relativamente bajos, un alto consumo de estos desemboca en un desajuste del balance energético.

El núcleo supraquiasmático (NSQ) está involucrado entre otros procesos fisiológicos en la homeostasis energética, recibiendo la información del estado metabólico del organismo empleando aferencias desde el núcleo paraventricular (NPV), el cual es inervado por el sistema nervioso simpático y parasimpático, o a través de señales hormonales (como la leptina y la grelina) o los nutrientes que atraviesan la barrera hematoencefálica (como la glucosa) (Buijs y Kreier, 2006; Froy, 2010).

Las oscilaciones circadianas permiten a los organismos anticipar su metabolismo y adaptarse ante cambios externos que varían de manera predecible, incrementando la posibilidad de aprovechar los recursos de manera más eficiente en un ambiente cambiante (Fuentes-Granados, 2011).

Se han realizado diversos estudios epidemiológicos y experimentales para sustentar la relación que existe entre una ingesta desequilibrada durante periodos críticos como la gestación y el periodo postnatal temprano, dando como resultado una programación *in utero*, la cual se refiere a las adaptaciones fisiológicas o metabólicas que adquiere el feto en respuesta a un microambiente adverso con un pobre aporte de nutrientes u oxígeno, o bien a un abastecimiento exagerado de los mismos que suceden en etapas críticas de desarrollo estructural o funcional de ciertos órganos, que influyen de manera permanente en las condiciones en las que el individuo se enfrentará a la vida extrauterina (Garibay y Miranda, 2008).

En el presente trabajo, se buscó establecer las diferencias en los perfiles diarios de las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina y leptina entre individuos con malnutrición hipercalórica perinatal y una dieta estándar para roedores de laboratorio en rata macho juvenil.

2. Antecedentes

2.1. Periodos críticos del desarrollo del cerebro en mamíferos.

El desarrollo del cerebro de los mamíferos se lleva a cabo antes y después del nacimiento, ciertas ventanas de tiempo durante este desarrollo representan periodos que no pueden ser revertidos o repetidos posteriormente, a los cuales se les denomina periodos críticos (figura 1) (Morgane *et al*, 1993).

En el cerebro embrionario muchos procesos críticos aceleran su actividad por periodos cortos de tiempo y luego cesan por completo, pueden ser modificados o interrumpidos más fácilmente durante los momentos en los que se producen más rápido (Morgane *et al*, 2002).

La presencia de insultos durante estos periodos en el desarrollo del SNC podría desencadenar en cambios irreversibles, es decir, si un proceso no ocurre en su tiempo programado, habrá un déficit funcional permanente.

Es importante destacar que tanto la edad, duración, y severidad en la que el insulto se produce son factores críticos relacionados con cómo y en qué punto es afectado el cerebro. (Morgane *et al*, 1993, Galler y Barrett, 2001), después de un período crítico, sólo la plasticidad limitada puede permanecer en el sistema.

Por lo tanto el crecimiento óptimo del feto, incluyendo al SNC, depende en parte de los estímulos externos que reciba, incluyendo el ambiente nutricional. En ratas adultas se ha reportado que dietas hipercalóricas aumentan los niveles de corticosterona en plasma, la presencia hiperglucemia, disminución en la amplitud del ritmo diario de melatonina pineal (Cano *et al*, 2008) hiperfagia, ganancia en la masa corporal y obesidad (Shafat *et al*, 2008).

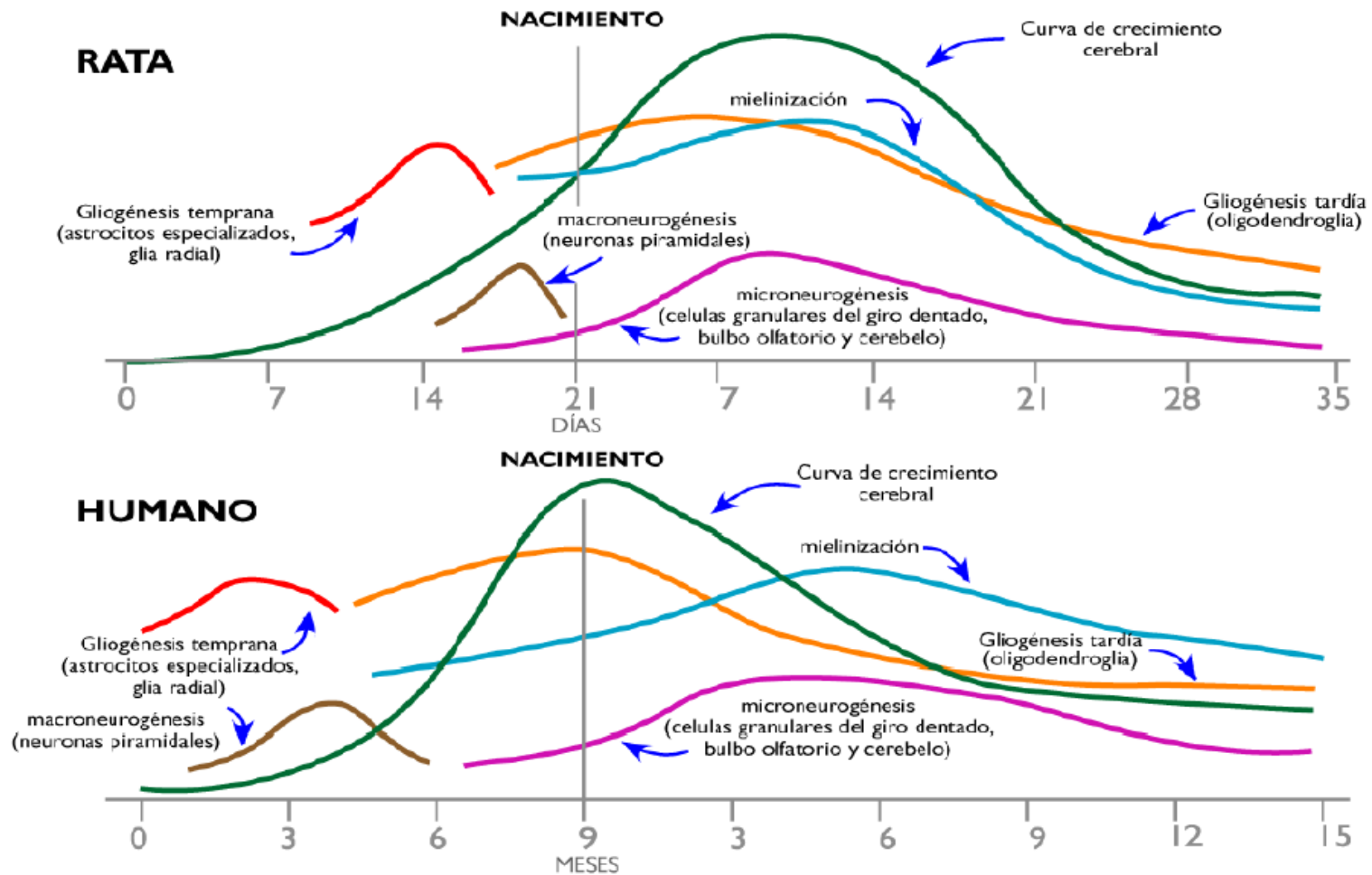


Figura 1: Comparación de los principales eventos del desarrollo en el cerebro de ratas y humanos. Los eventos de desarrollo se muestran en relación con el nacimiento, lo que proporciona información sobre las ventanas de vulnerabilidad relacionadas con eventos específicos de maduración e insultos prenatales y postnatales. Las flechas en la mielinización, gliogénesis y curva de microneurogénesis indican su continuación durante periodos prolongados postnatales (*modificado de Morgane et al, 2002*).

También se ha relacionado a la malnutrición hipercalórica durante la gestación y la lactancia en roedores con una disminución del 25% del músculo esquelético (Bayol *et al*, 2005), hipersensibilidad al neuropeptido Y (NPY) (Hansen *et al*, 2004), ganancia del peso corporal y tejido adiposo, aumento significativo del colesterol total, triglicéridos, 3 veces más propensos a la muerte fetal y disminución de la supervivencia neonatal, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, obesidad, hipertensión, hiperfagia, resistencia a la insulina y resistencia a la leptina, (Hayes *et al*, 2012; McDonald *et al*, 2011; Beaudry *et al*, 2013; Brondani *et al*, 2014; Mitra *et al*, 2008; Vickers *et al*, 2000).

2.2. Ritmos Biológicos

La naturaleza es fluctuante y rítmica, por ejemplo los ciclos lunares y el ciclo diario de luz–oscuridad, estos ritmos tienen influencia sobre los organismos, es decir existe una influencia de las fluctuaciones geofísicas sobre variables fisiológicas y conductuales (Ángeles-Castellanos *et al*, 2007).

Los fenómenos fisiológicos rítmicos requieren de un mecanismo interno que les proporcione una sincronización y les permita a los organismos el acoplamiento de sus actividades y respuestas conductuales ante estímulos del medio externo, en este sentido, por procesos de adaptación evolutiva, los organismos han generado mecanismos endógenos, coordinados por un reloj interno, que les permite adecuar su supervivencia mediante una plasticidad funcional ante las oscilaciones del medio (Durán *et al*, 2013).

El mecanismo interno que proporciona sincronización, acoplamiento y predictibilidad, es conocido como reloj u oscilador biológico, permitiendo al

organismo vivir en armonía con los ritmos de la naturaleza así como adaptar temporalmente sus funciones conductuales y fisiológicas a estos cambios, lo que se denominado también como cronostasia (Koukkari and Sothorn, 2006).

Debido a que los organismos están sujetos a fluctuaciones ambientales han desarrollado respuestas fisiológicas acopladas a los ciclos geofísicos de rotación y translación, por lo que existen diferentes tipos de ritmos según su periodo o frecuencia. De acuerdo con la frecuencia, es decir su presencia en un día, se han denominado como *ultradianos* (menores a 20 horas), *circadianos* (cercanos a 24 horas) o *infradianos* (mayores a 28 horas), de acuerdo con su duración o periodo se clasifican en 4 tipos “circa”: 1) *Circadianos*, con una repetición cercana a 24 horas, 2) *Circamareales* con una repetición aproximadamente cada 12.5 horas, 3) *Circalunares*, con repeticiones aproximadamente cada 28 días y 4) *Circanuales*, cuya duración es aproximadamente cada 365 días (revisado en Durán *et al*, 2013).

Los ritmos circadianos, aquellos con un periodo cercano a 24 h, o un día se consideran endógenos cuando en ausencia de señales externas (como la luz) el organismo expresa libre curso o *free running*, conservando un periodo cercano a 24 horas (entre 20 y 28 horas), es decir es endógeno, sincronizable ante un estímulo potente externo denominado como *Zeitgeber* (del alemán “dador del tiempo”) y tener compensación a la temperatura (Pittendrigh, 1981; Aschoff, 1999).

Los ritmos endógenos son innatos, esto quiere decir que son adquiridos vía herencia y que están fuertemente ligados a bases genéticas, es decir que se presentan aún en condiciones constantes, sin embargo, bajo condiciones naturales, las señales externas son capaces de sincronizar los ritmos endógenos, la luz el sincronizador por excelencia.

En este contexto, en el estudio de los ritmos biológicos se emplea el término tiempo circadiano o *Circadian Time*, por sus siglas en inglés (CT) cuando el organismo está bajo condiciones constantes incluyendo la luminosidad, o tiempo del sincronizador o *Zeitgeber Time* (ZT), el cual se utiliza bajo un estímulo sincronizador entre los que se encuentran la luz, disponibilidad de alimento, temperatura, señales sociales, entre otros (Golombek, 1997; Dunlap *et al*, 2004).

Para que los ritmos circadianos puedan ser evaluados paramétricamente se han considerado la función sinusoidal y sus propiedades, para lo cual se ha diseñado un algoritmo matemático de ajuste de curva conocido como análisis de cosinor (Golombek, 1997) (ver figura 2):

- *Período (τ)*: intervalo de tiempo en el que un ciclo se completa.
- *Frecuencia*: Número de veces en que un fenómeno se repite en la unidad de tiempo. Inverso del período de un ciclo.
- *Mesor*: Valor medio de la curva ajustada a través del método Cosinor.
- *Amplitud*: valor de la diferencia entre los valor máximo y el valor mínimo de la curva ajustada de cualquier ritmo biológico.
- *Fase*: cada uno de los momentos de un ritmo, también se utiliza para describir la relación entre dos o más ritmos.
- *Acrofase, cresta*: momento en el cual ocurre el punto máximo o pico de un ritmo, se emplean las unidades horas o grados en relación a una referencia absoluta o arbitraria.

- *Batifase, valle*: el momento en que ocurre el punto más bajo en una oscilación de un ritmo, se emplean las unidades horas o grados en relación a una referencia absoluta o arbitraria.
- Relación de fase (ψ): Distancia (diferencia) temporal entre dos eventos (fases) de uno o dos ritmos.

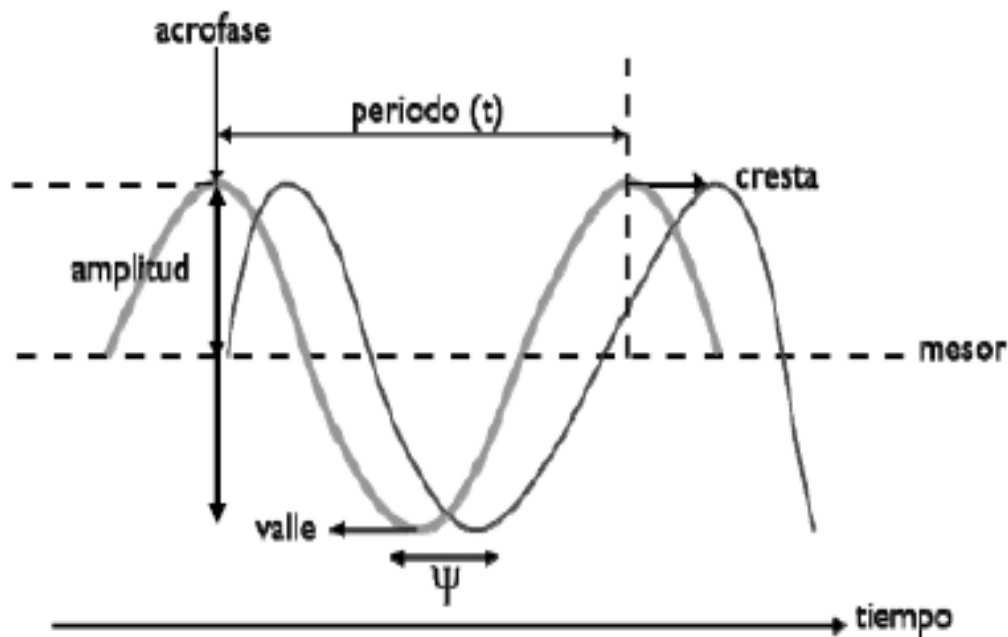


Figura 2: Esquema que muestra las propiedades básicas de los ritmos biológicos (Fuentes, 2013).

En los mamíferos, se presenta una organización jerárquica, en la cual el NSQ del Hipotálamo contiene el Oscilador maestro o marcapasos central, es un núcleo bilateral, de un diámetro pequeño, que se encuentran lateral al tercer ventrículo, por encima del quiasma óptico, el NSQ es necesario para la coordinación de los ritmos circadianos (figura 3).

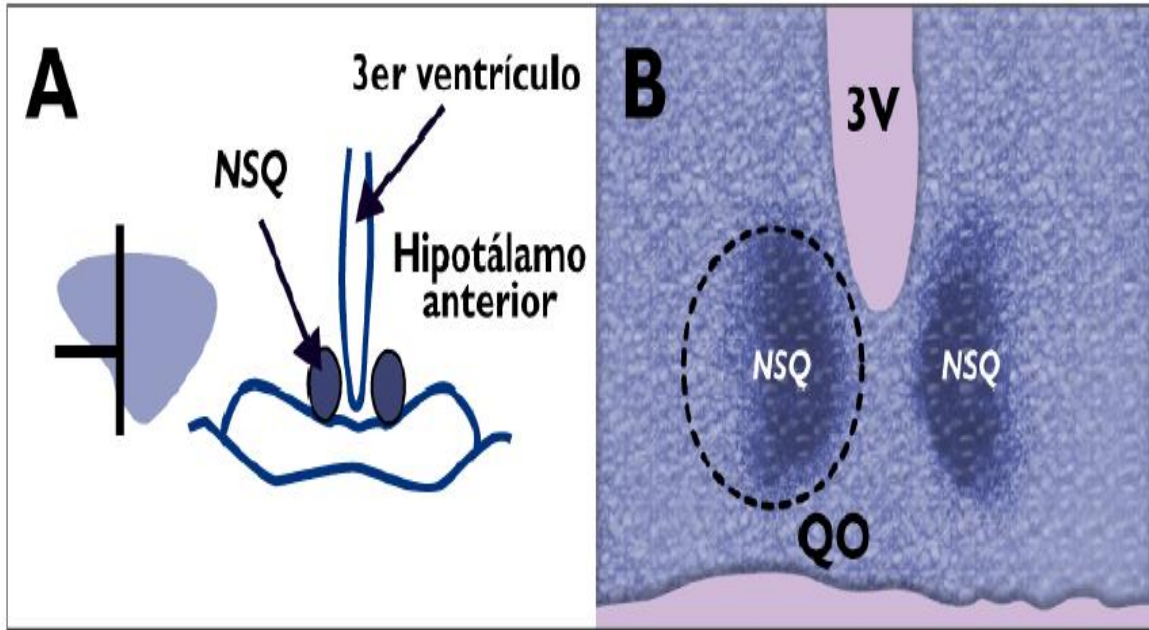


Figura 3: Localización y caracterización del NSQ en la rata. La figura A es el esquema de un corte coronal del hipotálamo que muestra las relaciones anatómicas del NSQ, el corte está indicado en la vista lateral del cerebro. La figura B es un corte histológico teñido con la técnica de Nissl, las líneas punteadas indican el NSQ del lado derecho, 3V, Tercer Ventrículo, QO, Quiasma óptico (Revisado en Romero-Sánchez, 2010).

El marcapasos central hace uso de conexiones neurales y/o factores humorales, acoplado a los osciladores periféricos, los cuales se encuentran en diversos órganos, por ejemplo el tejido adiposo blanco, el hígado, páncreas, músculo e intestino (Kumar *et al*, 2015).

2.3. El sistema circadiano, el Sistema Nervioso Central y el metabolismo en mamíferos

Los organismos están organizados en dos fases, una caracterizada por un período de actividad y otro por uno de reposo, en el primero se lleva a cabo la ingesta de nutrientes que proveen de energía, tales como la glucosa, y en el

segundo el cuerpo mantiene una homeostasis metabólica, para la función adecuada del reloj circadiano (Peek *et al*, 2012).

Actualmente, se conoce que existe la participación de la maquinaria del reloj circadiano en la regulación del metabolismo, aproximadamente entre un 10% y un 30% de los genes, dependiendo de los tejidos, parece mantener un ritmo de expresión guiado por los genes de reloj, es decir hay evidencia sólida que demuestra que el sistema circadiano influye sobre el metabolismo y que a su vez diferentes señales metabólicas hacen que este sistema se regule (Gómez-Abellán *et al*, 2011).

Una ventaja evolutiva del reloj circadiano es el mejoramiento de la eficiencia energética a través de la separación temporal de reacciones anabólicas y catabólicas, tales como la gluconeogénesis y glucólisis (Marcheva *et al*, 2013).

Procesos circadianos y metabólicos interactúan tanto a nivel neuroanatómico y neuroendocrino para regular la homeostasis metabólica global. Esta regulación se lleva a cabo por una comunicación de diversos núcleos hipotalámicos, entre la zona subparaventricular (SPZ), la región dorsomedial (DMH) que actúa como un centro de retransmisión, amplificando las señales circadianas del NSQ a múltiples regiones del cerebro involucradas en la regulación del sueño, actividad y alimentación, la región ventromedial (VMH), en la cual se encuentra el núcleo arqueado (ARC) que desempeña un papel bien caracterizado en la regulación de la alimentación y el apetito (Froy, 2010)

El ARC contiene neuronas orexigénicas que expresan el NPY y la proteína relacionada con agouti (AgRP), así como las neuronas que expresan péptidos

anorexígenicos incluyendo pro-opiomelanocortina (POMC), (Marcheva *et al*, 2013; Kalsbeek *et al*, 2014).

Estas estructuras a su vez inervan otras regiones como el NPV implicado en la liberación de la corticosterona y la liberación de la glucosa hepática, el hipotálamo lateral (LH) participando en la regulación de la alimentación y la vigilia y el núcleo preóptico ventrolateral (VLPO) que participan en la secreción de corticosteroides, alimentación y vigila, así como en el sueño respectivamente (Froy, 2010).

Por otra parte el control del NSQ en el balance energético está relacionado con aferencias desde el NPV, es cual es inervado por el sistema nervioso simpático y parasimpático, o bien por señales hormonales, (como la leptina y la grelina) o nutrientes que atraviesan la barrera hematoencefálica (como glucosa y los aminoácidos) que conectan con el sistema simpático y parasimpático (Kumar *et al*, 2011; Buijs *et al*, 2006; Froy, 2010),

Por lo tanto parece que el NSQ es capaz de controlar los tejidos periféricos no sólo por la secreción de señales humorales sino también al afectar las dos ramas del sistema nervioso autónomo, es decir, el simpático y parasimpático (Chun-Xia *et al.*, 2006; Froy, 2010; Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2013).

La comprensión de las redes neuronales que integran los centros implicados en la regulación del balance energético puede ayudar al entendimiento de la interacción entre las conductas anticipatorias y adaptativas en la homeostasis energética (figura 4).

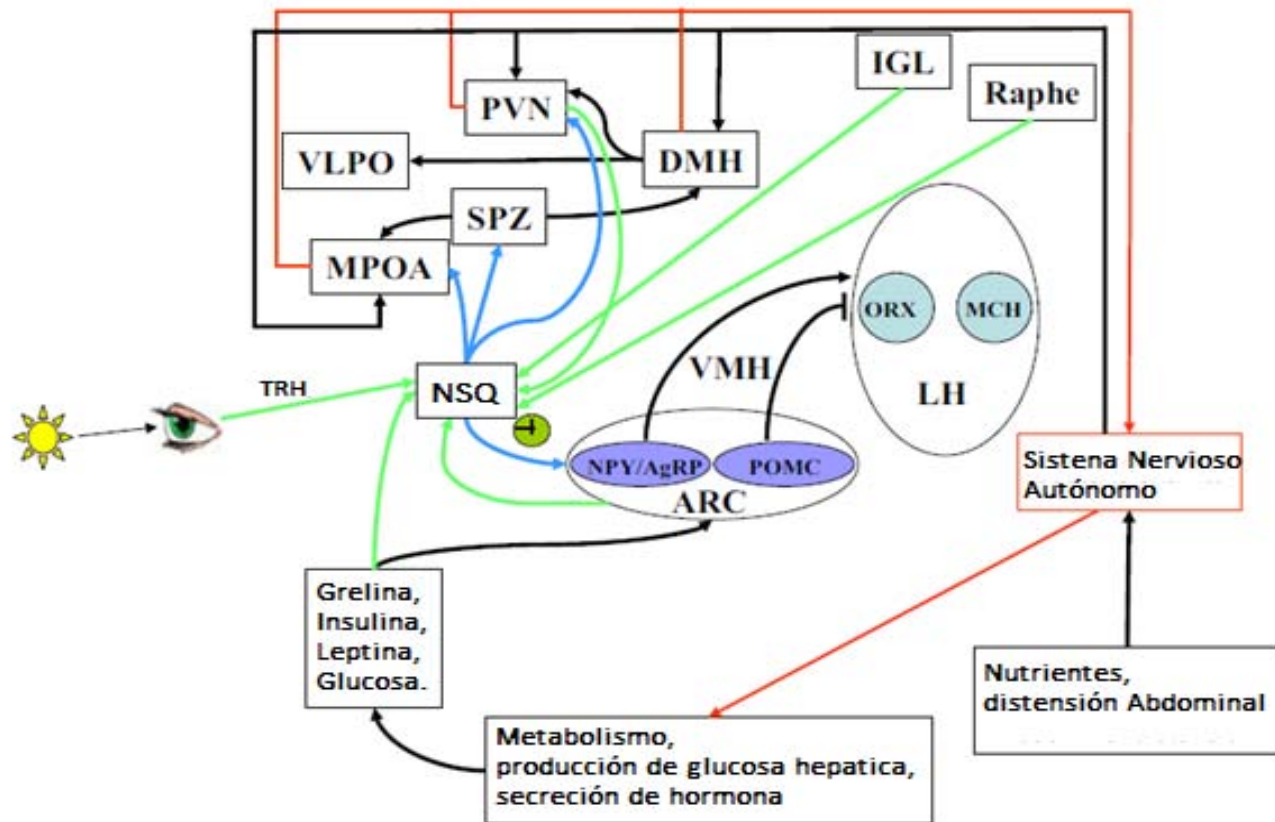


Figura 4: El núcleo supraquiasmático y la homeostasis energética. El NSQ puede ser sincronizado por señales luminosas, hormonas y nutrientes, o bien por la información que le llega desde el ARC y el NPV (flechas verdes). A su vez, este núcleo emite eferencias (flechas azules) hacia el ARC, el NPV, el MPOA y la SPZ. A través del sistema nervioso autónomo, el MPOA, el NPV y el DMH regulan el tejido adiposo, el hígado y otros órganos periféricos (flechas rojas). Las señales como la distensión abdominal, hormonas derivadas del tracto digestivo y nutrientes llegan al sistema nervioso central a través del sistema nervioso autónomo (*Imagen modificada de Froy, 2010*).

2.4. Patrones rítmicos de la glucosa

En los mamíferos la glucosa es la fuente de energía, durante la fase de actividad la glucosa en sangre es de origen dietético, mientras que en la fase de reposo el hígado es la principal fuente de glucosa endógena, su metabolismo presenta fluctuaciones a lo largo del día debido a su utilización o almacenamiento.

La homeóstasis de la glucosa diaria en la sangre exógena (producto de la ingestión, digestión y absorción) y endógena (gluconeogénesis) también involucra el control del NSQ, como de los relojes periféricos hígado, páncreas, músculo y tejido adiposo (Kalsbeek *et al*, 2014).

En los seres humanos y roedores los niveles de glucosa circulante aumentan antes de despertar, y de esta manera el organismo se anticipan su metabolismo (Bailey, 2014).

En los humanos se ha establecido que la tolerancia a la glucosa y la acción de la insulina varían a lo largo del día, la tolerancia a la glucosa oral se ve afectada por la tarde en comparación con horas de la mañana debido a efectos de la reducción de la sensibilidad a la insulina combinada con la disminución de la secreción de la insulina durante la noche (Marcheva *et al*, 2013).

Efectos provocados por lesiones en el NSQ de ratas establecen que existe un control del reloj circadiano en la homeostasis de la glucosa en roedores. El ritmo diario de las concentraciones de glucosa en plasma de roedores nocturnos muestra una acrofase al final del período de luz, anticipando el aumento de la actividad en la oscuridad, mientras que cuando se realizan curvas de tolerancia a

la glucosa, se presentan niveles más altos al comienzo del periodo de oscuridad (Kumar *et al*, 2015).

El control circadiano del metabolismo de la glucosa ha sido bien documentado, aunque los mecanismos moleculares precisos aún no han sido bien establecidos, (Marcheva *et al*, 2013).

Los estudios en roedores nocturnos y los seres humanos sugieren que la pérdida de la ritmicidad circadiana del metabolismo de la glucosa puede incluso contribuir al desarrollo de trastornos metabólicos como la diabetes tipo 2, alteraciones en la secreción de insulina, así como efectos en tolerancia a la glucosa (Kalsbeek *et al*, 2004).

2.5. Patrones rítmicos de la insulina

Las células- β de los islotes de Langerhans del páncreas desempeñan un papel clave en el control de la homeostasis de la glucosa mediante la secreción de la hormona insulina, en respuesta a las concentraciones elevadas de glucosa en la sangre; sin embargo, tal como lo demuestran varios estudios, la glucosa presenta variaciones a lo largo del día y también se observa esta variación en la secreción de insulina varía (Kumar *et al*, 2015).

En humanos la insulina presenta diferencias en los niveles por la mañana respecto a la tarde, se observan concentraciones superiores en la mañana (posteriores al pico de glucosa) aún después de 72 horas de ayuno. Esta observación se presenta en individuos con un peso normal y con sobrepeso (tanto mujeres como hombres); sin embargo, los individuos con sobrepeso muestran

concentraciones de insulina más elevadas (en particular las mujeres), indicando un posible estado de resistencia a la insulina (Merl, *et al.*, 2004).

Peschke y Peschke (1998) demostraron que la secreción de insulina a partir de islotes pancreáticos aislados de rata muestran un ritmo circadiano. En ratas se mostró una variación diurna en los niveles de insulina en plasma en ayunas (Bizot-Espiard *et al.*, 1998). Por otra parte, en ratones alimentados *ad libitum*, se ha encontrado un ritmo diario de insulina que muestra su pico máximo durante la fase nocturna, el cual podría estar asociado con su patrón de alimentación (Ahrén, 2000).

Picianato *et al.*, 2002, mostro que una pinealectomia aumenta la secreción de insulina a lo largo de 24 horas, además de observar alteraciones en la amplitud rítmica y un avance de fase de las curvas diarias.

La sensibilidad a la insulina también presenta una variación a lo largo del día, la interrupción del reloj circadiano provoca una alteración en la secreción de la insulina (Kalsbeek *et al.*, 2014).

2.6. Patrones rítmicos de la leptina

La leptina es una hormona principalmente secretada por tejido adiposo blanco, participa en la regulación del balance energético, disminuyendo la ingesta de alimento, regulando la saciedad, aumentando el gasto de energía y la sensibilidad a la insulina (Gavrila *et al.*, 2003).

La leptina reduce la producción de los péptidos orexigénicos, orexina (ORX) y la hormona concentradora de melanina (MCH) dentro del LHA, estimula producción de α -melanocito-estimulante (α -MSH) de neuronas POMC, mientras

que inhibe simultáneamente producción NPY / AgRP dentro del ARC (Cowley *et al.* 2001).

Cuando los niveles de leptina son bajos, las neuronas orexigenicas en el ARC producen NPY y AgRP estimulando el hambre y reduciendo el gasto de energía a través de señalización del LHA (Kumar *et al.*, 2015).

Curiosamente, además de la regulación de la situación de nutrientes, la leptina también muestra un patrón circadiano de expresión. En las ratas, el NSQ podría desempeñar el papel más importante al generar el ritmo diario de leptina, pues esta estructura posee receptores para esta hormona y su lesión elimina el patrón diario observado, además en condiciones *in vitro* la leptina puede generar avances de fases en la oscilación de las células del NSQ (Piccione *et al.*, 2004).

El tejido adiposo, como tejido periférico, posee genes reloj que desempeñan un papel fundamental en la fisiología del propio tejido, regulando la expresión rítmica de sustancias bioactivas secretadas como son las adipocinas (adiponectina, leptina y resistina, entre otras), la desincronización de los genes reloj del tejido adiposo podría desarrollar ciertas enfermedades como la obesidad (Gómez-Abellán *et al.*, 2011).

Gluckman *et al.*, en 2007 proponen que un tratamiento neonatal con leptina no solo induce cambios epigenéticos en la expresión de genes específicos medidos en el hígado adulto, sino que la dirección de estos cambios inducidos depende de la exposición ambiental anterior del feto.

3. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que un desbalance en la cantidad o calidad de la dieta en las etapas críticas del desarrollo conlleva a una mala organización del Sistema nervioso en general, así como en la integridad funcional de diversos órganos, que desemboca en una respuesta inadecuada ante los retos del medio.

Por lo cual, es importante evaluar las alteraciones provocadas por un ambiente hipercalórico perinatal sobre la expresión temporal diaria de glucosa, insulina y leptina.

4. HIPÓTESIS

Si un ambiente hipercalórico perinatal representa para el organismo condiciones adversas a nivel de desarrollo general y del balance energético en particular, entonces la progenie juvenil, presentará una alteración en la concentración plasmática de glucosa, insulina y leptina, así como alteraciones en su distribución temporal diaria.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar los ritmos diarios de parámetros plasmáticos relacionados con el balance energético en ratas macho juveniles con una malnutrición hipercalórica perinatal (MHp), así como en los bien nutridos.

5.2. Objetivos particulares

- Determinar la distribución temporal diaria de la concentración de glucosa, insulina y leptina.
- Establecer las diferencias en la amplitud y acrofase de la distribución temporal diaria de glucosa, insulina y leptina.

6. METODOLOGÍA

En la figura 5 se presenta el diseño experimental del presente trabajo el cual se detalla en los siguientes párrafos.

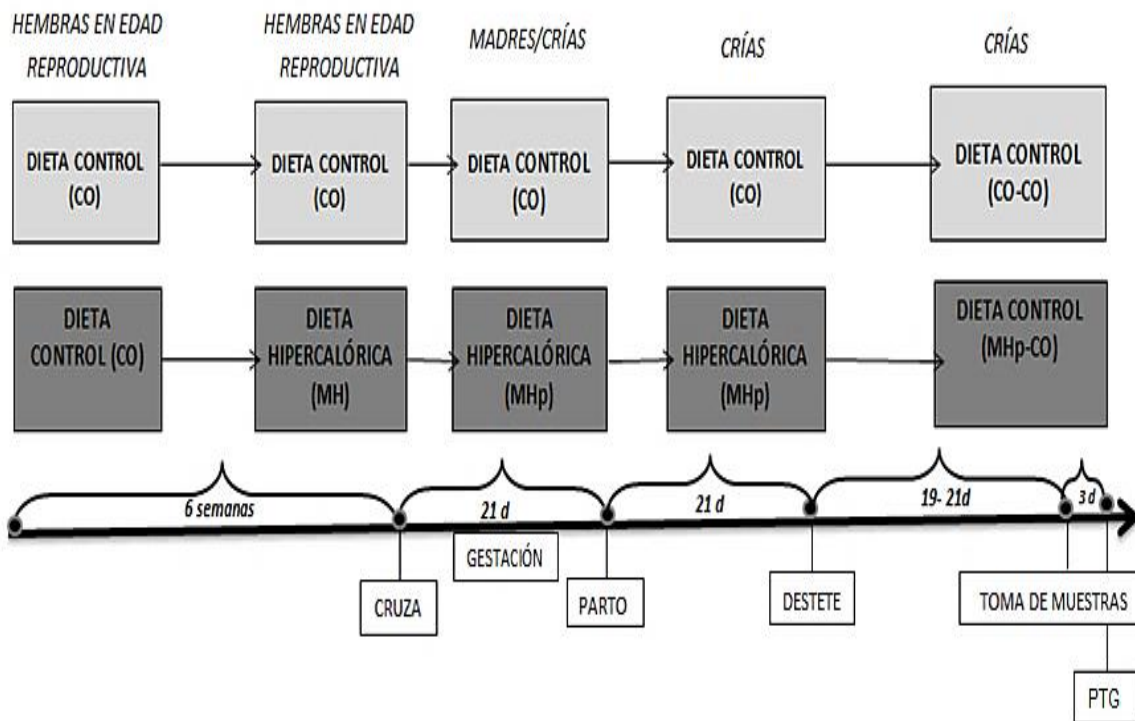


Figura 5: Diseño experimental. Los cuadros claros hacen referencia al grupo control y los cuadros oscuros al grupo con malnutrición, CO indica alimentación con dieta control (*Lab Chow*, Purina 5008), MH indica alimentación con dieta Hipercalórica. MHp-CO hace referencia al grupo alimentado con la dieta Hipercalórica durante la gestación y lactancia, así como con dieta control posterior al destete. CO-CO hace referencia al grupo alimentado con dieta control durante la gestación, lactancia y postdestete.

6.1. ANIMALES

Para este estudio se emplearon ratas hembras en edad reproductiva de la cepa *Sprague-Dawley* (200-300 gr) de la colonia del Laboratorio de Biología Animal Experimental de la Facultad de Ciencias de la UNAM, mantenidas con agua y alimento *ad libitum*, en una temperatura ambiental de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, en condiciones de iluminación 12:12 Luz/Oscuridad ($ZT_0= 7$ am y $ZT_{12}= 7$ pm).

Aleatoriamente las ratas se dividieron en dos grupos, uno con una dieta estándar para roedores de laboratorio con un aporte de 4.15 Kcal/g (control) y el otro con una dieta hipercalórica con un aporte de 6.32 Kcal/g (malnutridos) (ver tabla I), ambos se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum* por un período de 6 semanas previas a la cruce (fue importante mantener este período con el propósito de restablecer el equilibrio metabólico impuesto previamente por la dieta con contenido calórico normal antes de la gestación), y se registró el consumo diario de alimento de para ambos grupos.

6.2. DIETAS

6.2.1. Dieta control (Lab Chow, Purina 5008)

El grupo control (CO) fue alimentado con la dieta estándar para roedores de laboratorio *Lab Chow*, Purina 5008 con un aporte energético de 4.15 Kcal/g.

6.2.2. Protocolo de Malnutrición Hipercalórica (MH)

A ratas hembras adultas de la cepa *Sprague-Dawley* en edad reproductiva, se les administró una dieta hipercalórica formulada de la siguiente manera: se consideró como base la dieta (*Lab Chow*, Purina 5008) y se le adicionó leche

condensada, pan de caja, chocolate¹, galletas, coco seco, queso, papa hervida y manteca vegetal (modificado de Kumar *et al*, 2011), con un aporte de energía bruta de 6.32 Kcal/g.

Tabla I. Composición nutrimental de las dietas

| Componentes | Dieta control (%) | Dieta Hipercalórica (%) |
|----------------------|--------------------------|--------------------------------|
| <i>Carbohidratos</i> | 49.4 | 67.16 |
| <i>Proteína</i> | 23.5 | 8.78 |
| <i>Grasa</i> | 6.5 | 13.73 |
| <i>Cenizas</i> | 6.8 | 2.58 |
| <i>Fibra Cruda</i> | 3.8 | 0.65 |
| Kcal/g | 4.15 | 6.32 |

6.3. Cruza de las ratas

Posterior a las 6 semanas de malnutrición para el grupo con dieta hipercalórica ambos grupos fueron colocados en cajas de acrílico, conservando las condiciones nutrimentales y ambientales previas, en una proporción de dos hembras (en proestro o estro) por un macho sexualmente experto, al día siguiente se les realizó frotis vaginales y se consideró como preñada al encontrar la

¹ El efecto de la administración gestacional y/o prenatal de las metilxantinas (principalmente absorbidas del té, café o cacao) puede ser controversial (Skopinski *et al*, 2011), ya que cruzan libremente tanto la barrera hematoencefálica como la barrera placentaria debido a sus propiedades hidrofóbicas (Colomina *et al*, 2002). En humanos se ha asociado la ingesta de chocolate con la disminución de pre-eclampsia e hipertensión gestacional (Saftlas *et al*, 2010), aunque en roedores se ha demostrado que altas concentraciones de cacao (80% de la composición de la dieta) aumenta la frecuencia cardíaca fetal (Buscicchio *et al*, 2013), sin embargo de uno de los componentes empleados en diversos protocolos de dietas hipercalóricas y palatables.

presencia de espermatozoides, durante los días subsecuentes las hembras fueron observadas para registrar el día del parto.

Después del parto, la camadas fueron estandarizadas a 8 crías, las cuáles fueron separados por sexo y se registró el peso y la longitud naso-anal de cada cría durante los primeros cuarenta días postnatales para determinar el índice de Lee.

$$\text{Índice Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{Peso corporal}}}{\text{Longitud naso anal} \times 10^4}$$

(Revisado en Carmona, 2006).

Las crías tuvieron acceso libre durante la gestación y la lactancia a la dieta con la cual se alimentó la madre. A los 21 días postnatales se destetó a las crías manteniéndolas juntas. Las hembras obtenidas fueron descartadas y los machos se mantuvieron en condiciones de temperatura y fotoperiodo igual al de sus madres pero se les cambió la dieta, hipercalórica por la CO, con agua y alimento *ad libitum*.

6.4 Análisis de parámetros plasmáticos

En el día 40 de edad a las ratas macho juveniles tanto CO como MHP se les tomaron muestras de sangre para obtener plasma y determinar el ritmo diario de glucosa, insulina, así como para evaluar los niveles de corticosterona como control de estrés² (ver el anexo 11.2).

Se tomaron muestras sanguíneas del seno retro-orbital en 6 puntos temporales: ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16, ZT20, por 24 horas (CO n=8, MHP=8),

² La corticosterona es una hormona liberada por la glándula suprarrenal, se libera en respuesta al estrés, tiene diversos efectos metabólicos y cardiovasculares que aseguran la supervivencia a través de periodos de adversidad (Hill and Wyse, 2006).

para lo cual, previamente a la extracción de sangre los animales permanecieron 6 horas en ayuno, posteriormente se anestesiaron con Isoflurano (Sofloran Vet) y anestesia ocular Proparacaína y Fluoresceína al 5%, se realizó la extracción de sangre en tubos capilares con heparina.

Cada muestra se centrifugo por 5 minutos a 10,000 rpm para obtener el plasma, el cual se extrajo de los capilares empleando una jeringa Hamilton de 50 µl. El plasma obtenido de cada individuo se almacenó en tubos Eppendorf por separado bajo congelación a -40°C, con el fin de analizar los parámetros en tiempos distintos y no afectar los resultados por el deterioro de muestras debido a la congelación y descongelación.

La concentración plasmática de glucosa fue determinada empleando el ensayo enzimático-colorimétrico con el kit Spinreact Glucose-LQ, por otra parte las concentraciones de insulina, leptina y corticosterona se determinaron mediante ensayos de ELISA, Rat/Mouse Insulin ELISA Millipore (Cat. #EZRMI-13K), Rat Leptin ELISA EZRL-83K, Corticosterona ELISA IBL International, (RE52211) respectivamente. La absorbancia de los ensayos de glucosa, insulina, leptina y corticosterona se leyó mediante un lector de microplacas (Biotek ELx800) con una absorbancia de 450 nm.

6.5. Índice de HOMA (Modelo de Evaluación Homeostática)

Basado en el análisis de glucosa e insulina en plasma, se determinó el modelo de evaluación homeostática (HOMA, por sus siglas en inglés – *Homeostasis model assessment*–) para la evaluación de resistencia a la insulina (HOMA-IR) empleando la siguiente ecuación:

$$[\text{Insulina en plasma (uIU/ml)} \times \text{Glucosa en plasma (mmol/l)}] / 22.5.$$

Así como para la evaluación de la función de las células β -pancreáticas (HOMA- β) empleando la siguiente ecuación:

$$[\text{Insulina plasmática (uIU/ml)} \times 20] / \text{Glucosa en plasma (mmol/l)} - 3.5.$$

HOMA-RI está más relacionado con la resistencia a la insulina, mientras que HOMA- β está relacionado con la secreción de la insulina (Costa *et al*, 2013).

6.6. Prueba de tolerancia a la glucosa (PTG)

Cuarenta y ocho horas posteriores a la obtención de muestras para la determinación de los parámetros plasmáticos se realizó una PTG para ambos grupos (MHp y Co) en el ZT4 (ya que fue el punto temporal donde se observó una mayor concentración plasmática de glucosa previamente analizada), se les mantuvo en un período de ayuno de 4 horas, posteriormente se colocaron en una caja de restricción de acrílico para rata adulta y se tomó una muestra de sangre por medio de una punción en la punta de la cola, se midió la concentración basal de glucosa en sangre (tiempo 0), se continuo con la administración de una solución de glucosa de 2 gr. de glucosa / kg vía intraperitoneal se colectaron muestras sanguíneas con el mismo método cada 30 min durante las siguientes 2 hrs (30, 60, 90 y 120 min), para evaluar la concentración de glucosa en sangre se emplearon tiras reactivas y el glucómetro *Accu-chek perfoma* (Hoefel *et al*, 2011; Akyol *et al*, 2012).

6.7. Análisis de los datos

Los datos obtenidos de los registros de peso, talla e índice de Lee se graficaron mediante el programa de Microsoft Excel 2010, y se analizaron con el paquete estadístico *STATISTICA*, cada tiempo (del día 1 al 40 postnatal) se

analizó empleando una prueba de *t* de *Student* para muestras no pareadas para comparar entre grupos ($p < 0.05$).

Los datos de los perfiles diarios de glucosa, insulina, leptina, así como el Índice de HOMA y la concentración de corticosterona fueron ordenados y graficados mediante el programa de Microsoft Excel 2010, obteniendo el promedio, el error estándar de los 6 puntos de muestreo de los 2 grupos (CO, $n = 7-10$; MHp, $n = 8-12$); mediante el paquete estadístico *GraphPad PRISM 5.01*, se analizaron las concentraciones plasmáticas de glucosa en los 6 puntos temporales empleando una ANOVA de una vía y se compararon empleando la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$). Las concentraciones plasmáticas de insulina (CO, $n = 4-7$; MHp, $n = 4-7$), leptina (CO, $n = 4-5$; MHp, $n = 4-5$) y corticosterona (CO, $n = 3$; MHp, $n = 3$) en los 6 puntos temporales se analizaron mediante el paquete estadístico *GraphPad PRISM 5.0* empleando una prueba de *Kruskal-Wallis* y se compararon utilizando la prueba post hoc *Dunns* ($p < 0.05$). El índice de HOMA se comparó entre grupos en cada punto temporal empleando una prueba de *t* de *Student* no pareada ($p < 0.05$).

Posteriormente se realizó el ajuste de Cosinor para cada uno de los parámetros plasmáticos evaluados (glucosa, insulina y leptina), empleando el programa *Chronos-Fit* (Zuther y Lemmer, 2004), el cual se utiliza para analizar ritmos que no presentan una frecuencia marcada. Este programa utiliza ajustes mediante senos y cosenos para determinar una señal sinusoidal y así calcular acrofase, mesor y amplitud. La ritmicidad en términos estadísticos está dada por el valor p ; $p < 0.05$, entonces significa que si se presenta ritmicidad (Fuentes, 2013).

Los datos obtenidos de la curva de tolerancia a la glucosa fueron graficados mediante el programa de Microsoft Excel 2010, se determinó la capacidad de asimilar la glucosa inyectada calculando el área bajo la curva mediante el programa *GraphPad PRISM 5.0*, y posteriormente se graficaron los promedios y error estándar, para cada condición y se compararon con una prueba de *t* no paramétrica (*Mann-Withney*) con una $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Curvas de crecimiento e Índice de Lee.

Debido a que se considera que el peso y la talla de un organismo son un indicador del estado de su salud, durante los primeros 40 días de edad se realizó el registro de estos parámetros.

En las figuras 6 y 7, se observa que ambos grupos presentan un peso y talla similar al día uno postnatal, sin embargo, a partir del día 2 postnatal se observa una disminución significativamente menor hasta los 40 días de edad ($p < 0.05$), indicando un retraso en el crecimiento del grupo MHp (figura 9).

Por otro lado, también se realizó la evaluación del Índice de Lee, el cual es un indicador de la relación entre el peso y la talla, frecuentemente se emplea para identificar el sobrepeso y la obesidad, se ha correlacionado con el porcentaje de grasa corporal para modelos animales con dietas obesogénicas (Simson *et al*, 1982).

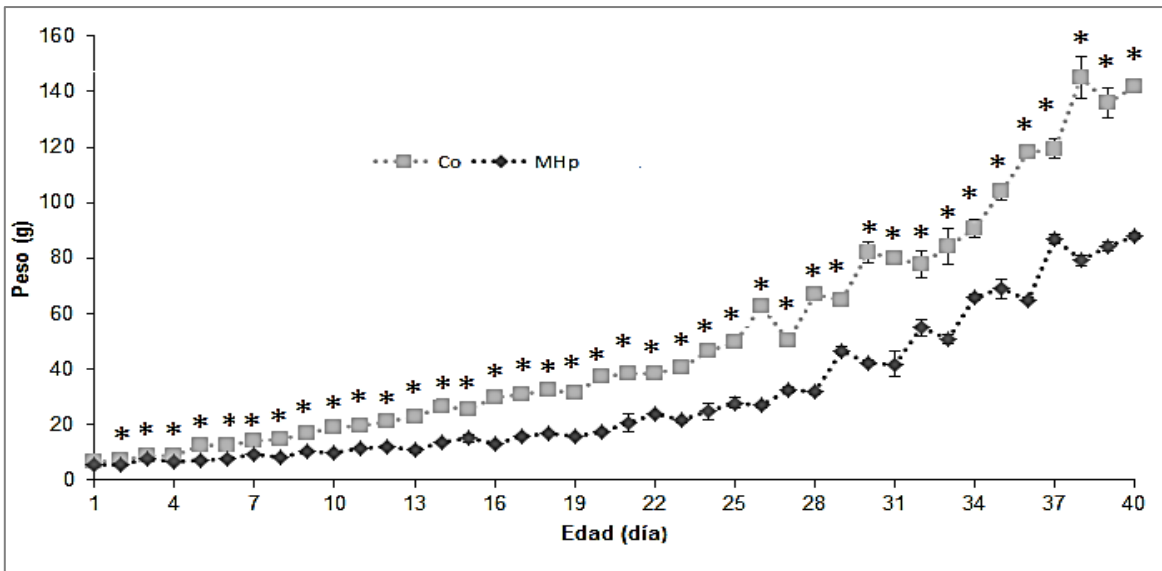


Figura 6: Peso corporal del día 1 postnatal a los 40 días de edad. La línea clara corresponde al grupo CO (n=70-43), la línea oscura corresponde al grupo MHP (n=66-45), los * indican una diferencia significativa entre grupos según la prueba de *t* de *Student* ($p < 0.5$). Los datos se muestran como promedio \pm ee.

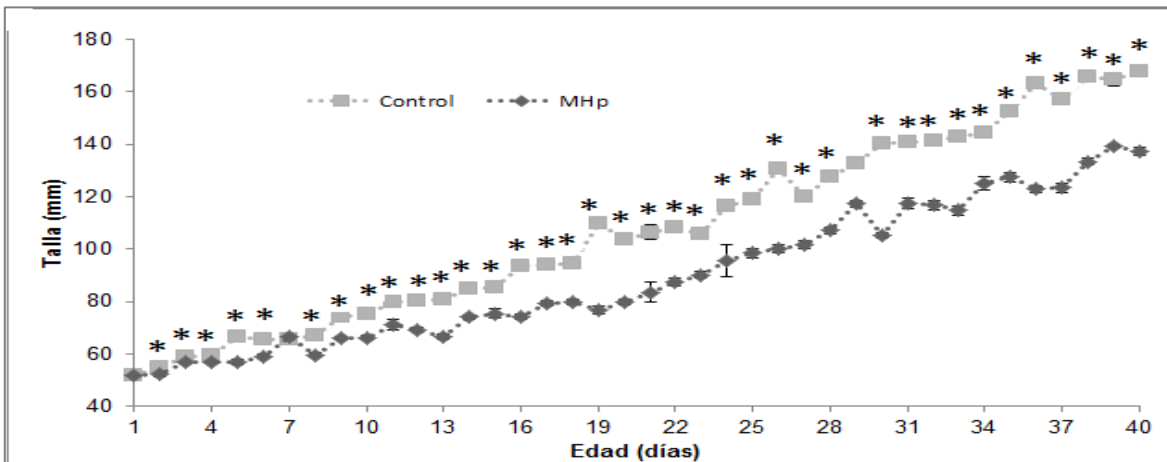


Figura 7: Talla corporal del día 1 postnatal a los 40 días de edad. La línea clara corresponde al grupo CO (n=70-43), la línea oscura corresponde al grupo MHP (n=66-45), los * indican una diferencia significativa entre grupos según la prueba de *t* de *Student* ($p < 0.5$). Los datos se muestran como promedio \pm ee.

En la figura 8 se observa que en los días postnatales 1, del 4 al 10, del 12 al 15, 17,18 y el 28 de edad el grupo CO presenta un índice de Lee significativamente mayor que el grupo MHP, mientras que en los días 30, 33, 36 y

40 de edad se presenta un índice de Lee significativamente mayor en el grupo MHP; lo cual indica que el grupo malnutrido presenta un desarrollo morfológico menor al del grupo bien nutrido en los primeros días de edad, sin embargo, al final del estudio se observa una tendencia al sobrepeso u obesidad en el grupo con malnutrición ($p < 0.05$).

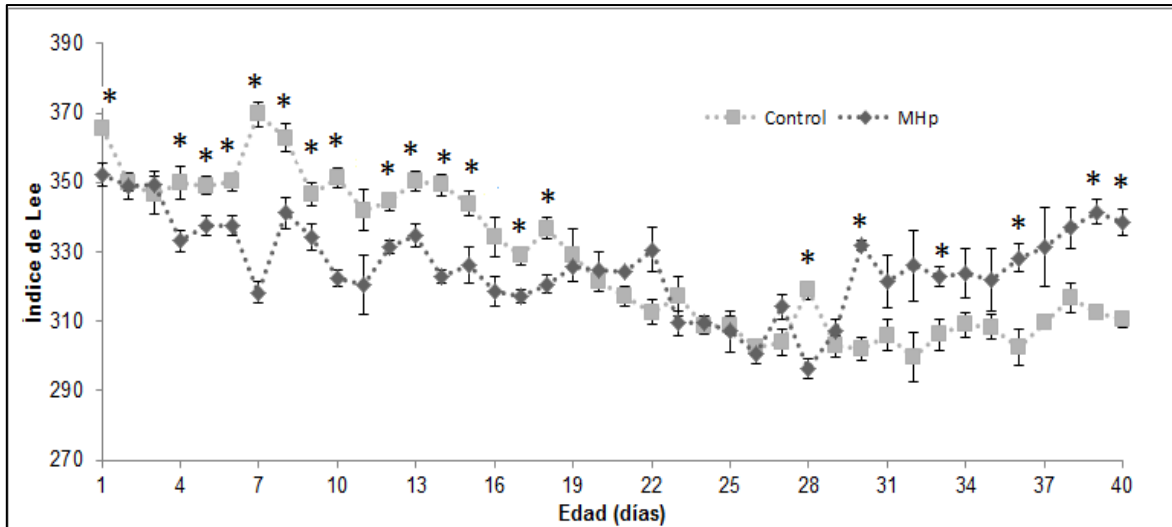


Figura 8: Índice de Lee del día 1 al 40 de edad. La línea clara corresponde al grupo CO ($n=70-43$), la línea oscura corresponde al grupo MHP ($n=66-45$), los * indican una diferencia significativa entre grupos según la prueba de *t* de Student ($p < 0.5$). Los datos se muestran como promedio \pm ee.

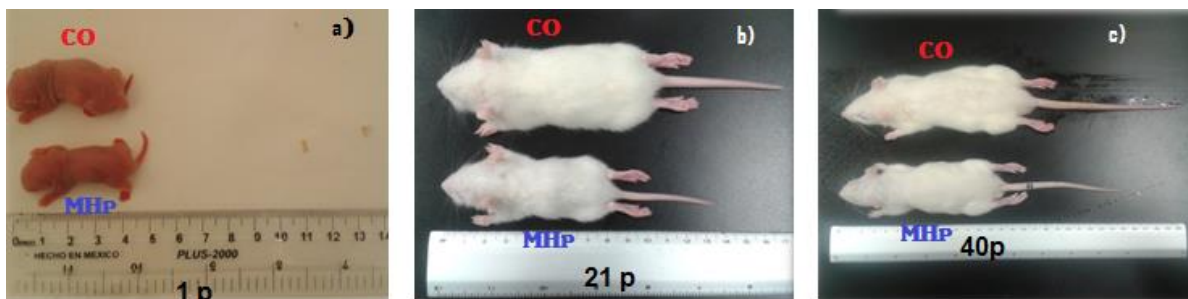


Figura 9: Fotografías de la comparación de la talla de las ratas CO y MHP. Se muestra una comparación de la talla al día 1 postnatal (a), el día 21 postnatal (b) cuando fueron destetadas, día 40 postnatal (c), en la parte superior se observa la talla de una rata CO y en la parte inferior la rata MHP.

7.2. Análisis de los parámetros plasmáticos

Al llevar a cabo el análisis de las concentraciones plasmáticas diaria los distintos parámetros, se encontró que los niveles de insulina y leptina son similares dentro de cada grupo (según la prueba de Kruskal-Wallis, $p > 0.05$); las concentraciones máximas de estos se presentan en puntos temporales diferentes para ambas condiciones, en el caso de la insulina el punto máximo del grupo CO se encuentra en el ZT20 y en MHp en el ZT0, en el caso de leptina el punto máximo se observa en el ZT16 para el CO y en el ZT12 para el MHp ($p < 0.05$) (figura 13A y 16A). En cuanto a la evaluación plasmática diaria de glucosa se encontraron variaciones dentro de cada grupo, así como al comparar ambas condiciones (figura 10A), las concentraciones máximas para este parámetro fueron en el ZT4 para ambas condiciones ($p < 0.05$) como se observa en la Tabla II.

Tabla II: Concentraciones promedio máximas \pm ee para los perfiles diarios de glucosa e insulina y leptina, ZT indica el tiempo del Zeitgeber, * hace referencia a la diferencia significativa en cada parámetro dentro de un mismo grupo ($p < 0.05$), ^a hace referencia a la diferencia significativa entre grupos para el mismo parámetro.

| Parámetro | Condición | Concentración más alta | ZT | Valor de P (inter grupos) |
|----------------------------|-----------|------------------------|----|---------------------------|
| Glucosa (mg/dL) | CO | 226.60 ^{*a} | 4 | <0.05 |
| | MHp | 193 ^{*a} | 4 | |
| Insulina (ng/ml) | CO | 0.98 ^a | 20 | <0.05 |
| | MHp | 0.68 ^a | 0 | |
| Leptina (ng/ml) | CO | 4.47 | 16 | >0.05 |
| | MHp | 3.56 | 12 | |

En cuanto a los perfiles diarios con el ajuste de Cosinor de insulina y leptina control, la acrofase se presenta durante la fase oscura (escotofase) (figura 13B y 16B), el grupo MHp no presenta ritmicidad para los dos perfiles, en cambio en el caso de la glucosa plasmática, ambos grupos presentan un ritmo de 24 horas y la acrofase durante la fase luminosa (fotofase), aunque en puntos temporales diferentes (figura 10B).

En la Tabla III se observan los valores del ajuste de Cosinor, ambos grupos presentan variaciones tanto en amplitud, acrofase, mesor y porcentaje de ritmicidad para cada parámetro plasmático evaluado. Así mismo en las figuras 10, 13 y 16 se observan el ajuste de Cosinor para estos parámetros.

Tabla III: Valores obtenidos del ajuste de Cosinor para los perfiles diarios de glucosa, insulina y leptina, * indican los perfiles que tuvieron un ajuste significativo ($p < 0.05$).

| Parámetro | Condición | Periodo | Amplitud | Acrofase | Mesor | % de Ritmicidad | valor de p |
|------------------|-----------|---------|----------|----------|--------|-----------------|------------|
| Glucosa (mg/dL) | CO | 24* | 18.95 | 1.48 | 174.63 | 11.81 | <0.05 |
| | MHp | 24* | 20.05 | 4.21 | 156.33 | 15.93 | <0.05 |
| Insulina (ng/ml) | CO | 24* | 0.12 | 19.72 | 0.64 | 10.07 | <0.05 |
| | MHp | - | - | - | 0.57 | - | - |
| Leptina (ng/ml) | CO | 24* | 1.52 | 13.26 | 2.43 | 33.28 | <0.05 |
| | MHp | - | - | - | 3.02 | - | - |

7.2.1. Perfiles diarios en la concentración de Glucosa

En la figura 10A se observa el perfil diario de glucosa en plasma sin el ajuste de Cosinor, se presentan diferencias significativas en las concentraciones en los puntos ZT4, ZT12 y ZT20 (*ANOVA de una vía y la prueba post hoc Tukey*, $p < 0.05$, $F = 9.79$, $gl = 11$), pero el punto máximo presenta para ambas condiciones durante la fotofase en el ZT4.

En el caso de las concentraciones plasmáticas con ajuste de Cosinor (figura 10B) ambos grupos presentan un período de 24 horas, sin embargo, se observa que la acrofase de ambos grupos se encuentra en puntos temporales diferentes, en CO en el ZT 1.48 y para MHP a las 4.21, indicando un retraso en la expresión del ritmo diario de las rata macho con malnutrición hipercalórica perinatal respecto a los CO. Además se presentaron diferencias en amplitud y mesor, el grupo MHP presenta una mayor amplitud (20.05 mg/dL) y un mesor menor (156.33 mg/dL) en comparación con el Co (18.95 y 174.63 mg/dL respectivamente), lo cual indica una mayor diferencia entre el punto máximo y el punto mínimo de los MHP. Por último el porcentaje de ritmicidad es mayor para el grupo CO (11.81) en comparación con MHP (15.93).

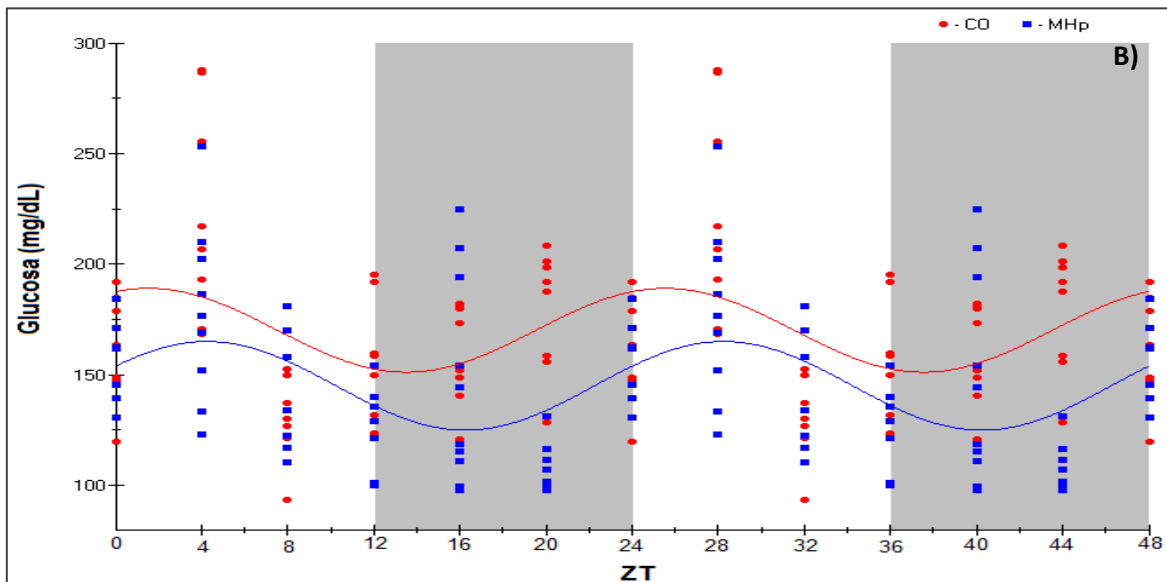
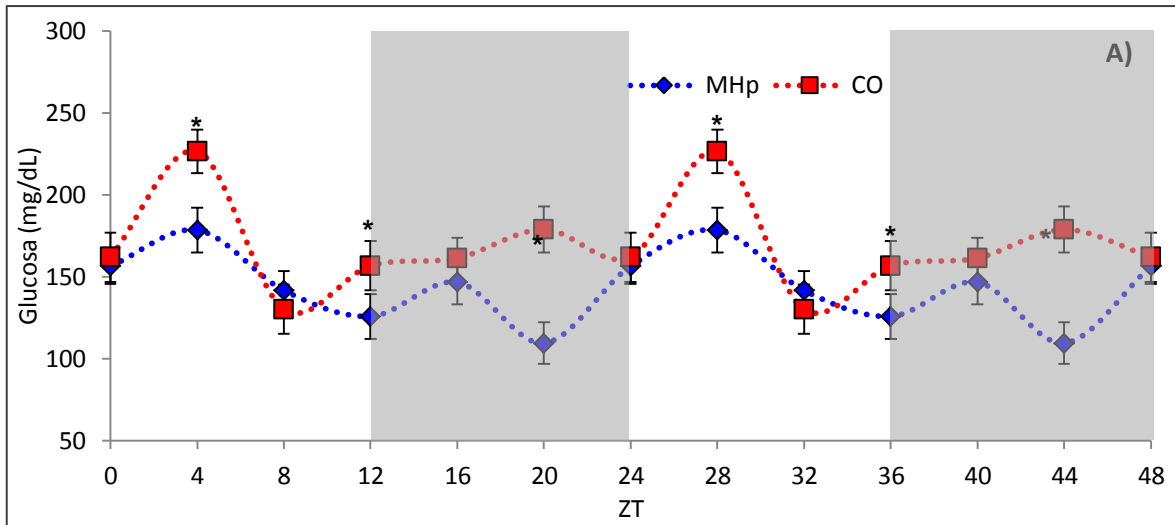


Figura 10: Doble gráfica del perfil diario de glucosa en plasma (CO n=7-10, MHP n=8-12).

A) Sin ajuste de Cosinor, la línea roja corresponde al grupo control, la línea azul corresponde al grupo MHP a lo largo de 24 horas, los datos están expresados en mg/dL y se muestran promedios \pm ee, ambos grupos presentan la máxima concentración en el ZT4. * indican diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0.05$). B) corresponde al ajuste de Cosinor para ambos grupos, el área sombreada indica la fase de oscuridad, el área sin sombreada a la fase de luz.

7.2.2. Prueba de tolerancia a la glucosa

Posterior a la obtención del perfil diario de glucosa se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa, prueba que mide la capacidad que tiene el organismo para metabolizar la glucosa (Trijillo, 2007), en la figura 11 se observa que las

concentraciones en sangre del grupo MHP son menores a las que presenta en grupo control al minuto 30 y 60 posterior a la administración ip de glucosa, también se observa que a pesar de ello ambos grupos regresan a una concentración similar a la basal (minuto 120). Para obtener una mejor evaluación de la respuesta a la administración de glucosa se realizó el análisis del área bajo la curva (figura 12), los valores promedio de las áreas bajo la curva en unidades relativas (UR) fueron 243.7 ± 21.10 para CO y 118.2 ± 11.17 para MHP, así el área bajo la curva del grupo MH fue menor ($p < 0.05$), entonces ambos grupos son capaces de metabolizar a la glucosa, aunque se observa que los niveles de glucosa circulantes durante la prueba son menores para el grupo MHP.

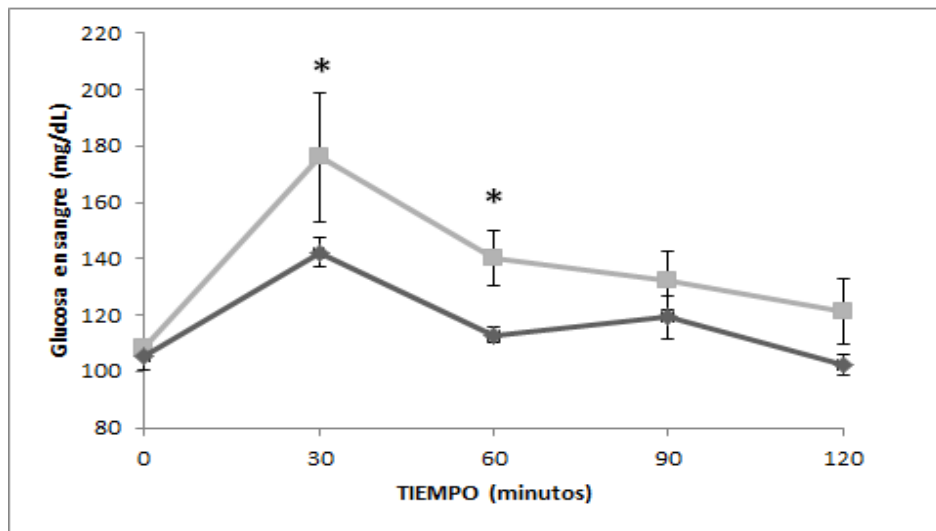


Figura 11: Prueba de Tolerancia a la Glucosa. La línea clara corresponde al grupo CO y la línea oscura corresponde al grupo MHP, ambos grupos regresan a su concentración basal, aunque el grupo MHP presenta niveles de glucosa circulantes menores (* $p < 0.05$, $n=4$, según la prueba de *Mann-Whitney*), los datos están expresados en mg/dL y se muestran promedios \pm ee,

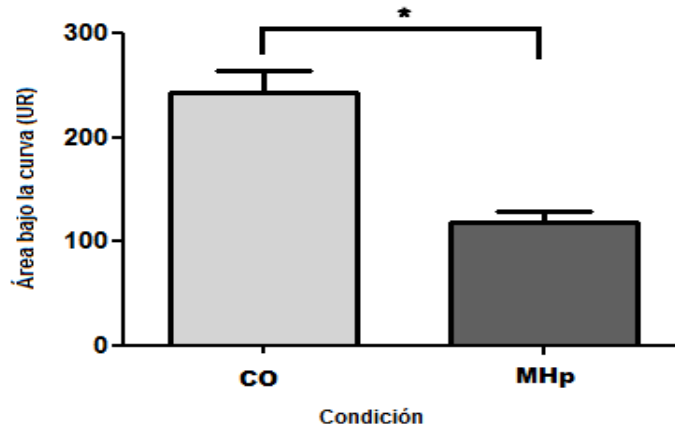


Figura 12: Valor promedio del área bajo la curva de la PTG. La barra clara corresponde al grupo CO y las barras oscuras corresponde al grupo MHp, los datos se muestran como promedios \pm ee, (*: $p < 0.05$, $n=4$, según la prueba de *Mann-Withney*).

7.2.3. Perfiles diarios en la concentración de Insulina

En la figura 13A se observa el perfil diario de insulina en plasma sin el ajuste de Cosinor, se observa una concentración similar de insulina para el grupo MHp $p > 0.05$, y un aumento de los niveles plasmáticos en el ZT20 para el grupo CO (según las pruebas de Kruskal-Wallis, $p < 0.05$, estadístico Kruskal-Wallis 13.51), se presenta una diferencia significativa entre los picos de ambas condiciones, las concentraciones máximas se presentan en diferentes fases, el grupo control presenta su pico durante la escotofase (ZT20) y el grupo con malnutrición durante la transición entre el apagado y encendido de las luces (ZT0).

En el caso de las concentraciones plasmáticas con ajuste de Cosinor (figura 13B) los organismos CO presentan un período de 24 horas, una acrofase de 19.72 y un mesor de 0.64 ng/ml, sin embargo el grupo MHp no presenta un

ajuste pero presenta un mesor de 0.57, lo que indica que el grupo MHP presenta una alteración en la regulación circadiana de la secreción de insulina.

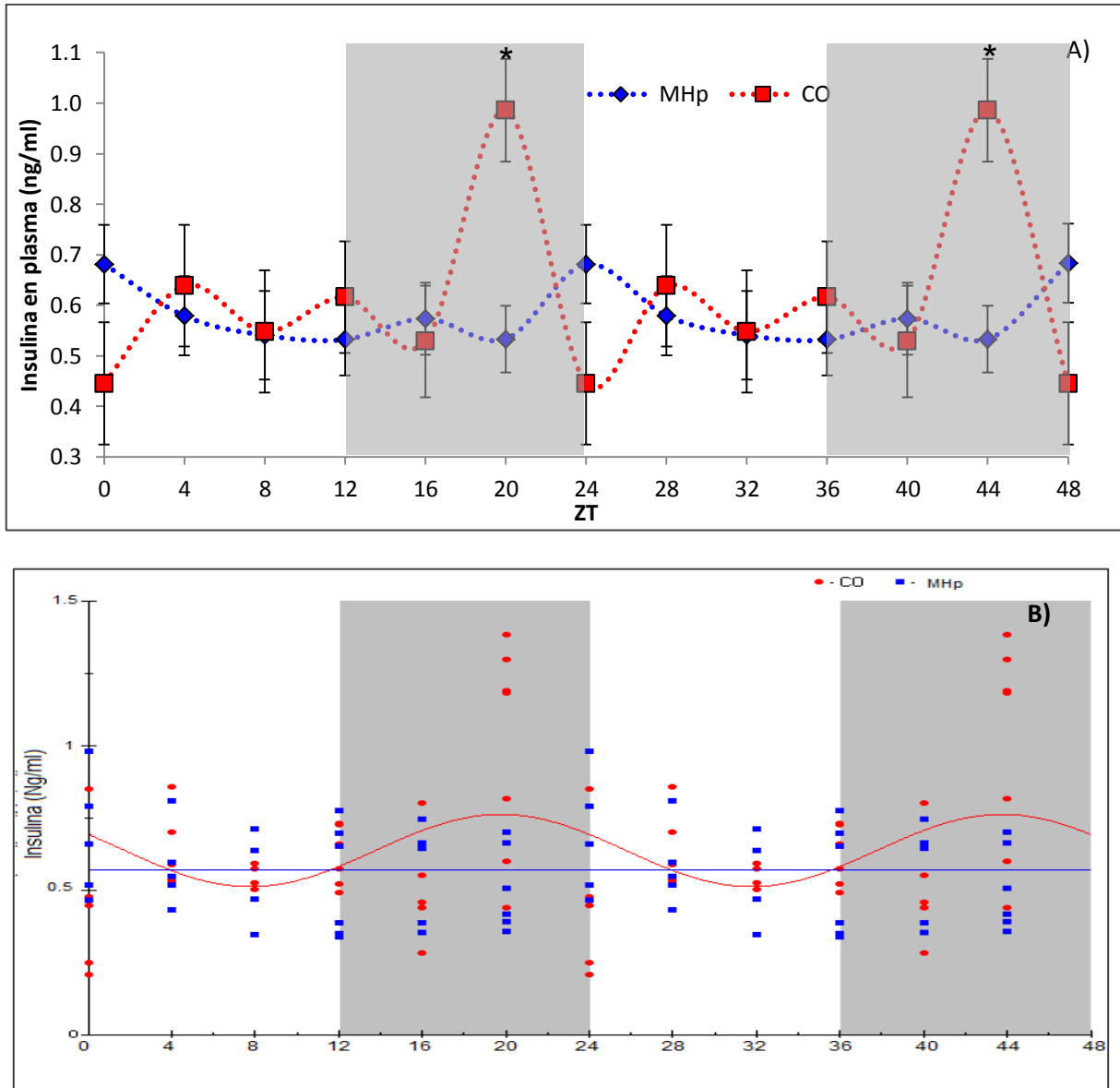


Figura 13: Doble gráfica del perfil diario de insulina en plasma (CO n=6; MHP n=6). A) ambos grupos sin ajuste de Cosinor, la línea roja corresponde al grupo CO, la línea azul corresponde al grupo MHP a lo largo de 24 horas, el grupo control presenta su máxima concentración en el ZT20, y el grupo MHP en el punto ZT0, los datos están expresados en Ng/ml, se muestran promedios \pm ee, * corresponden a $p < 0.05$ según la prueba de Mann-Withney. B) ajuste de Cosinor, el área sombreada indica la escotofase, el área sin sombreada la fotofase.

7.2.4. Índice de HOMA (Modelo de Evaluación Homeostática).

Se realizó la evaluación del índice de HOMA, el cual indica la presencia de resistencia a la insulina (RI), en la figura 14 se observa que el HOMA-RI es mayor para el grupo CO en los puntos temporales ZT4 y ZT20 (según la prueba de *t* de Student, $p < 0.05$), lo cual indica que hay una mayor cantidad de glucosa circulante y por lo tanto una mayor cantidad de insulina secretada en el grupo control en comparación con el grupo MHp, lo cual también se puede observar en las figuras 10A y 13A

Se evaluó el HOMA- β , el cual indica la función de las célula β -pancreáticas, en la figura 15 se observa un aumento significativo en los ZT4 y ZT16 en el grupo MHp (según la prueba de *t* de Student, $p < 0.05$), lo cual indica una mayor función de las células β -pancreáticas, esto se relaciona con el menor nivel de glucosa en el MHp y la mayor concentración de insulina en esos puntos temporales (figura 10A y 13A).

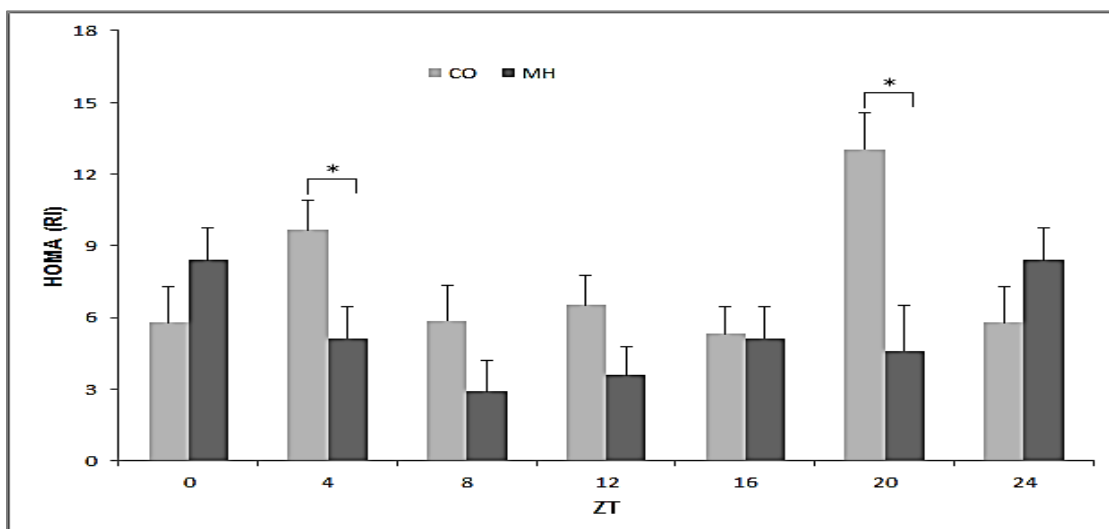


Figura 14: Índice de HOMA-RI, las barras claras corresponden al grupo CO (n=4-7), las barras oscuras corresponden al grupo MHp (n=5-7), se observa que el grupo control presenta un aumento en el ZT4 y ZT20 con respecto al grupo MHp, los datos se muestran como promedios \pm ee, * corresponden a $p < 0.05$, n=6.

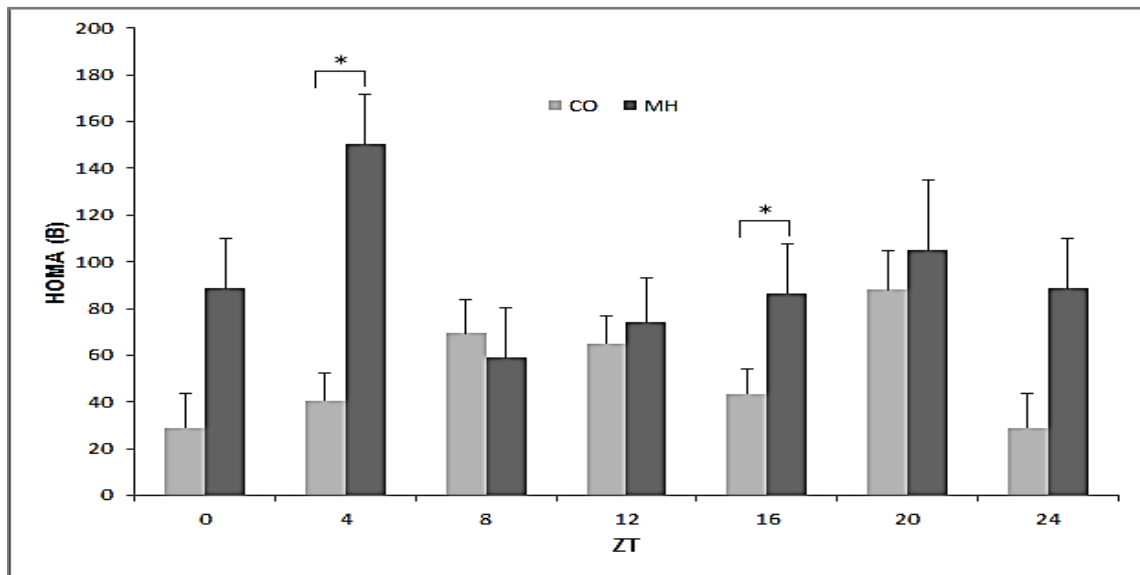


Figura 15: Índice de HOMA- β , las barras claras corresponden al grupo CO (n=4-7), las barras oscuras corresponden al grupo MHp (n=5-7), se observa que el grupo MHp presenta un aumento en el ZT4 y ZT16 los datos se muestran como promedios \pm ee, * corresponden a $p < 0.05$, n=6.

7.2.5. Perfiles diarios en la concentración de Leptina

En la figura 16A se muestra el perfil diario de leptina en plasma sin el ajuste de Cosinor, se observa una concentración similar de leptina dentro de cada grupo de Cosinor, se observa una concentración similar de leptina dentro de cada grupo (según la prueba de Kruskal-Wallis, $p > 0.05$, estadístico Kruskal-Wallis 15.51) y aunque no se presenta una diferencia significativa entre los picos de ambas condiciones, las concentraciones máximas se presentan en diferentes fases; el grupo control presenta su pico durante la escotofase (ZT16) y el grupo con malnutrición durante la transición entre el encendido y apagado de las luces (ZT12) lo cual indicaría un retraso en la expresión del ritmo diario de leptina del grupo MHp en comparación con el grupo CO.

En el caso de las concentraciones plasmáticas con ajuste de Cosinor (figura 16B) los organismos CO presentan un período de 24 horas, una acrofase de 13.96 y un mesor de 2.43 ng/ml, sin embargo el grupo MHp no presenta un

ajuste, lo que indica que el grupo MHP presenta una alteración en la regulación circadiana de la secreción de leptina.

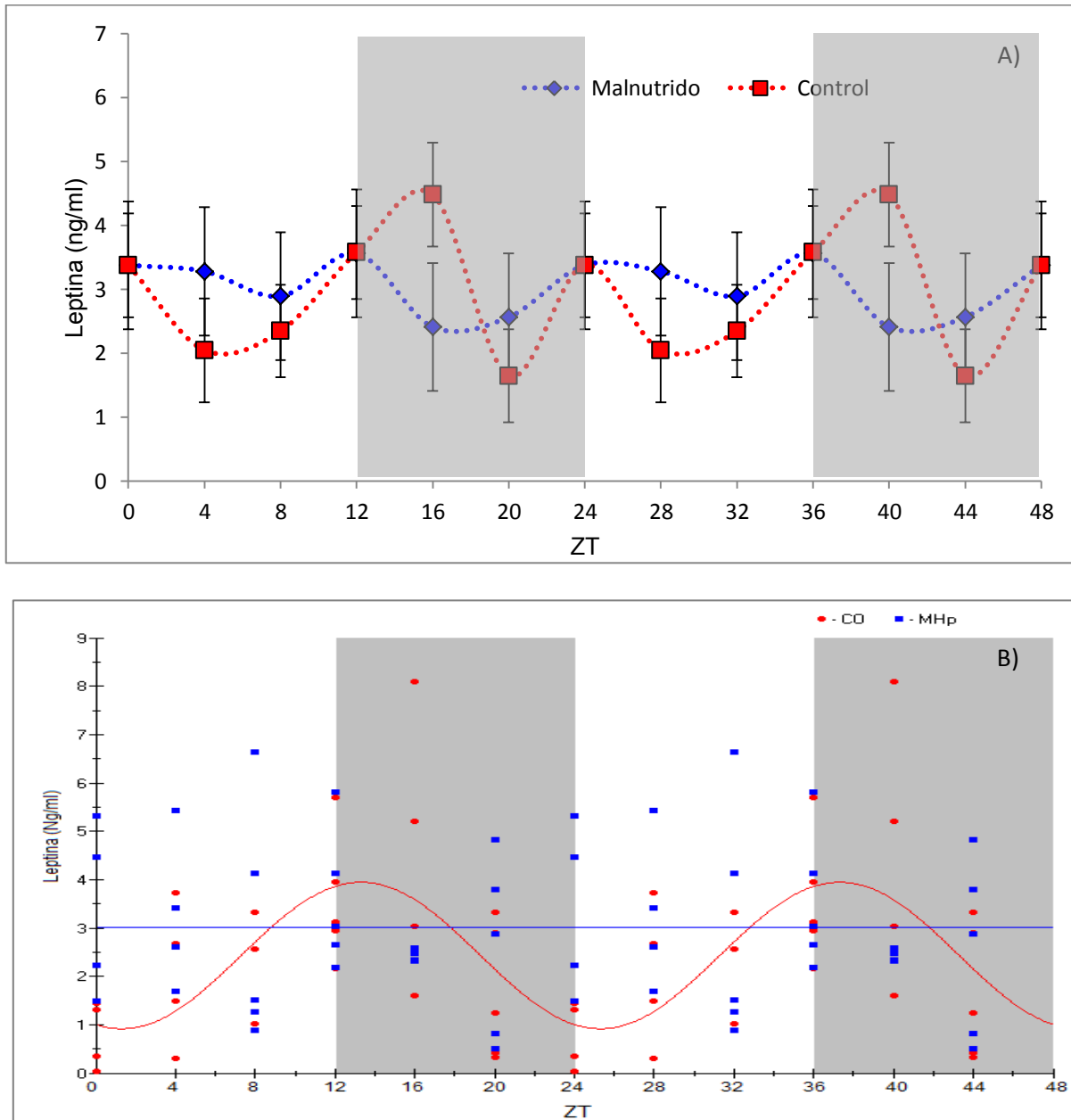


Figura 16: Doble grafico del perfil diario de leptina en plasma (CO n=6, MHP n=6). A) ambos grupos sin ajuste de Cosinor, la línea roja corresponde al grupo CO, la línea azul corresponde al grupo MHP a lo largo de 24 horas, el grupo CO presenta su máxima concentración en el ZT16, y el grupo MHP en el punto ZT12. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0.05$), los datos están expresados en ng/ml y se muestran promedio \pm ee. B) corresponde al ajuste de Cosinor, el área sombreada indica la escotofase, el área sin sombreada a la fotofase.

7.3. Corticosterona como índice de estrés.

Por último se llevó a cabo la evaluación de la concentración plasmática de corticosterona en cada punto temporal en que se evaluaron los parámetros plásticos antes mencionados, en la figura 17 se observa que no hay diferencia entre los niveles secretados en el grupo CO y el grupo MHP en ninguno de los 6 puntos temporales evaluados (según la prueba de Manny-Withney, $p > 0.05$, $n = 3$, estadístico Kruskal-Wallis 12.44), indicando que los resultados obtenidos no son efecto de estrés.

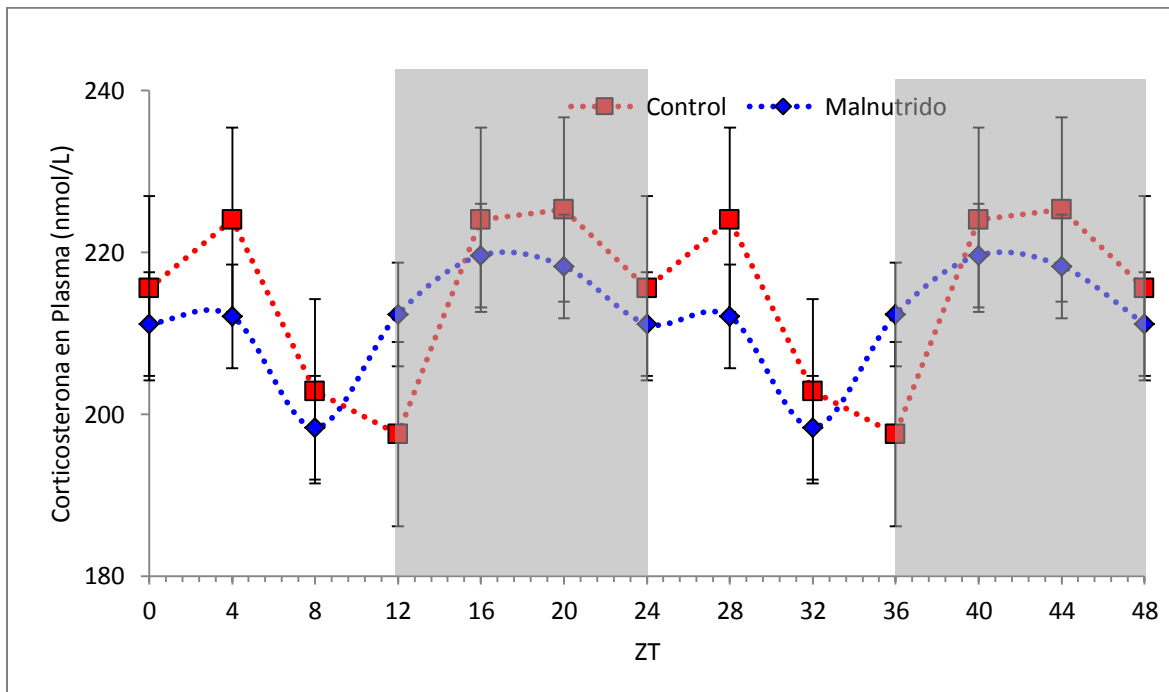


Figura 17: niveles de corticosterona en plasma (como índice de estrés), la línea roja corresponde al grupo CO, la línea azul corresponde al grupo MHP, a lo largo de 24 horas, los datos están expresados en nmol/L, se muestra el promedio \pm ee, no se observan diferencias en ningún punto temporal evaluado ($p > 0.05$, $n = 4$), el área sombreada indica la escotofase, el área sin sombreada a la fotofase.

8. Discusión

En el presente trabajo, el objetivo fue determinar si una malnutrición perinatal desemboca una alteración en la producción y/o distribución diaria de la glucosa, insulina y la leptina en la rata macho juvenil.

8.1. Malnutrición hipercalórica perinatal

La variabilidad de las dietas altas en grasas y los modelos animales empleados en los estudios sobre este tema hace que sea difícil comparar sus hallazgos, por lo tanto, el impacto de la obesidad materna inducida por una dieta en diferentes etapas de la vida en el desarrollo así como la expresión del ritmo diario de parámetros metabólicos, siguen siendo un punto de interés actual, ya que el estado nutricional durante la gestación influye en el crecimiento y desarrollo fetal (Shimizu *et al*, 2013). El peso corporal en edades tempranas es un indicador clave del riesgo de trastornos metabólicos en la vida posterior (Cunningham *et al*, 2014), en el presente trabajo el peso y la talla evaluados, al nacimiento no fueron significativamente diferentes entre la descendencia del grupo CO y del MHP, este hallazgo es consistente con estudios reportados con anterioridad por Bieswal, (2006); Brondani *et al*, (2014); Wright *et al*, (2011) y Akyol *et al*, (2012), además fueron significativamente menores desde el día 1 al 40 de edad como ya fue reportado por Akyol *et al*, (2012), mientras que otros estudios han sugerido que la sobrealimentación materna impulsa el aumento del peso y la hiperfagia (Chen *et al*, 2008).

En el presente estudio encontramos que la relación peso/talla es menor en el grupo MHP con respecto al grupo CO en los primeros días del estudio, indicando un desarrollo morfológico menor para el grupo malnutrido, lo cual puede

estar relacionado con una menor disponibilidad de proteínas ingeridas por la madre malnutrida antes, durante y después de la gestación, ya que la dieta solo contiene el 8% de proteína, si bien no se evaluó la composición de la leche materna, se sabe que la obesidad materna provocada por una dieta de cafetería o una dieta materna alta en grasas tiene efectos en la disponibilidad de los nutrientes para las crías, como la disminución en la disponibilidad de las proteínas y el aumento en la de los ácidos grasos (Rolls y Gurr, 1985). En estudios con una malnutrición hipoproteínica se ha observado una disminución de la talla y el peso en comparación con el grupo control (Galler y Tonkiss, 1990; Passos *et al*, 2000; Da Silva *et al*, 2009).

También se sabe que la alimentación con alto contenido en grasas durante la gestación puede tener consecuencias postnatales similares a la desnutrición, Samuelsson *et al* (2008) reportaron que la descendencia de ratones obesos a causa de la alimentación con alto contenido en azúcar y grasa durante 6 semanas previas al apareamiento, durante la gestación y lactancia presentan obesidad, hipertensión e intolerancia a la glucosa; por otro lado se ha considerado que la malnutrición es un factor de estrés para la madre y el feto en desarrollo, se sabe que el estrés durante el embarazo conduce a la restricción de crecimiento fetal, glucocorticoides naturales, como la corticosterona, son elevados por el estrés de la madre, por lo tanto, pueden mediar los efectos del estrés sobre el crecimiento fetal, reduciendo el suministro de aminoácidos y la densidad de los vasos sanguíneos en la placenta, en respuesta a estas alteraciones se establece que es posible un mecanismo por el que durante el embarazo se puede programar el

crecimiento intrauterino y el desarrollo, con consecuencias en su vida posterior (Vaughan *et al*, 2012).

En la última semana del estudio, se encontró un aumento significativo en el índice de Lee para el grupo MHP, lo cual puede indicar una predisposición al sobrepeso u obesidad, como se ha reportado en trabajos anteriores, los cuales sugieren que la exposición a una dieta alta en grasas en periodos de concepción, gestación y lactancia favorece la predisposición a la obesidad (Bringhenti *et al*, 2013; Kalsbeek *et al*, 2014), exceso en la adiposidad (Mingrone *et al*, 2008), aumento de triglicéridos así como trastornos metabólicos relacionados con la homeostasis anormal de la glucosa, reducción a la sensibilidad a la insulina, secreción alterada de insulina por las células beta y cambios en la estructura del páncreas (Guo y Jen, 1995) resistencia a la insulina (Bayol *et al*, 2005), esteatosis hepática (Kruse *et al*, 2012). Así estos datos sugieren que los procesos epigenéticos generados por la malnutrición son centros de proceso de plasticidad del desarrollo y también sustentan la relación entre los efectos de la vida metabólica temprana y tardía (Gluckman *et al*, 2007).

Si bien en este estudio no se observa una obesidad materna, si se reporta una alteración en la homeostasis de la glucosa, lo que podría estar relacionado con la presencia de la resistencia a la insulina, lo que en los humanos denominamos síndrome metabólico.

8.1.1. Análisis de los parámetros plasmáticos

Los parámetros metabólicos oscilan a lo largo del día, debido a la demanda energética y el suministro de nutrientes, mediante la sincronización de los relojes internos con su entorno (Bailey *et al*, 2014) apropiada para las fases de actividad y

reposo de los organismos. En las últimas décadas se ha enfatizado el estudio de hormonas y sustancias relacionadas con el balance energético, la mayor parte de las hormonas circulantes presenta fluctuaciones rítmicas. Las alteraciones en el suministro de estos nutrientes, así como en la sincronización de los osciladores periféricos pueden generar consecuencias metabólicas a corto, mediano o largo plazo (Bailey *et al*, 2014).

En el presente estudio las concentraciones plasmáticas de insulina y leptina sin ajuste de Cosinor fueron similares dentro de cada grupo y entre grupos excepto en el ZT20 para insulina, donde se presenta una secreción mayor para el grupo CO con respecto al MHp, aunque la concentración máxima se presenta en diferentes puntos temporales, es decir, que la producción de ambas hormonas es similar en los dos grupos, pero su distribución diaria no lo es. En contraste los niveles plasmáticos de glucosa fueron significativamente mayores en los ZT4, ZT12, ZT20 en el grupo CO, lo cual indicaría una hipoinsulinemia en las ratas MHp, en la evaluación sin ajuste de cosinor ambos grupos presentan la concentración más alta en el ZT4. En los siguientes párrafos se discuten los aspectos particulares para cada parámetro.

8.1.1.1. Glucosa e Insulina

En este trabajo, ambos grupos (CO y MHp) presentan la concentración más alta de glucosa en plasma en el mismo punto temporal, aunque existe una diferencia significativa al compararlas entre sí. El grupo CO presenta una concentración mayor a la del grupo MHp, por lo cual se puede inferir que el último presenta alteraciones en la producción o regulación de ésta, estos datos concuerdan con lo reportado por Akyol *et al* (2012), que aunque sólo evaluaron los

niveles circulantes de glucosa en un punto temporal, observó una concentración menor de esta en condiciones de ayuno en ratas con una exposición a una dieta alta en grasas durante la gestación y la lactancia en comparación con ratas que siempre fueron alimentadas con dieta control, por lo cual se propone que la exposición temprana a una la dieta alta en grasas puede influir en la homeostasis de la glucosa, aumentando la secreción de insulina, lo que conlleva a una mayor captura de glucosa disminuyendo los niveles circulantes de esta última y a su vez podría estar impactando el desarrollo del páncreas, aumentando el agotamiento de éste y provocando alteración como la resistencia en la insulina en etapas posteriores.

Sin el análisis de Cosinor, ambos grupos presentan su concentración mayor en el ZT4, aunque después de realizarlo se observa que la acrofase de los grupos se presenta en puntos temporales diferentes a pesar de que ambos presentan un período de 24 hrs, el grupo CO presenta su acrofase en el ZT1.48, y el grupo MHp en el ZT4.21, así como en el mesor, el cual es mayor para el grupo CO (144.95 mg/dL), pero la amplitud del ritmo es menor (18.95 mg/dL), contrario al grupo MHp, el cual presente un mesor menor (170.07 mg/dL), pero con una amplitud mayor (20.05 mg/dL) estos datos sugieren una mayor homogeneidad de los niveles plasmáticos de glucosa para el grupo CO y una mayor varianza entre los individuos con malnutrición, lo cual podría sugerir que el control metabólico o los controles de la maquinaria celular metabólica se afectan de manera diferencial en la progenie.

En ambos grupos no se encontró una coincidencia en la acrofase sin el ajuste de Cosinor y con este, esto puede deberse a la variabilidad de los datos

que presentan ambos grupos, aunque la acrofase del grupo MHP sin ajuste es relativamente similar a la que se presenta con el ajuste matemático, la hora en que se presenta la acrofase es similar a la que reportaron Rudic *et al* (2004), donde se evaluó la homeostasis de la glucosa en ratones *wild type* (WT, sin manipulación), los cuales fueron alimentados con una dieta alta en grasas, se observó que presentan la acrofase para glucosa en el CT4 (donde el CT0 es inicio del día subjetivo, comenzando a las 7 am) lo cual coincide con el punto máximo de glucosa encontrado en este estudio.

En el caso de los niveles plasmáticos de insulina, ambos grupos presentan concentraciones similares (excepto en el punto ZT20, donde es mayor para el grupo CO), pero acrofases en ZT diferentes sin el ajuste matemático, sin embargo al evaluarlo con éste el grupo MHP no presenta un ritmo diario para insulina.

Previamente se ha relacionado concentraciones plasmáticas reducidas de glucosa e insulina en la descendencia masculina de madres obesas (con dieta hipercalórica), con un mayor nivel de ARNm de Glut4 en el músculo esquelético. Glut4 es el principal transportador de glucosa en el músculo estriado, una sobreexpresión de la proteína GLUT4 en el músculo aumenta la eliminación de glucosa estimulada por la insulina en todo el cuerpo (Ren *et al*, 1995; Raipuria *et al*, 2015). Por otro lado las bajas concentraciones de insulina pueden estar relacionadas con el agotamiento de las células- β (Samuelsson *et al*, 2008), implicando que la sobrealimentación como ya se ha mencionado puede tener un impacto en el desarrollo del páncreas, se ha reportado que una dieta de cafetería durante la gestación, tiene efectos sobre la insulina basal, disminuyéndola, contribuyendo al deterioro de la homeostasis de la glucosa o sobre vías de

señalización de la insulina (Akyol *et al*, 2012). Como ya fue mencionado una dieta alta en grasas consumida durante el período preconcepcional, así como durante los periodos de gestación y lactancia resulta en alteraciones en el páncreas de la descendencia en la etapa juvenil así como el desarrollo posterior de enfermedades degenerativas crónicas, como la obesidad y la diabetes en ratones (Bringhenti *et al*, 2013).

La ritmicidad del metabolismo de la glucosa puede ser mediada por osciladores periféricos (como el hígado) y/o el NSQ. El NSQ necesita una inervación simpática intacta del hígado para generar un ritmo diario de las concentraciones de glucosa, ya que el hígado desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de niveles óptimos de glucosa para equilibrar su la entrada dentro y fuera de la circulación, de esta manera tiene efectos sobre la captación de esta glucosa, así como la liberación y sensibilidad a la insulina (Kalsbeek, *et al*, 2014).

Hoy en día se sabe que la glucosa plasmática presenta una ritmicidad aún en condiciones de ayuno (Kalsbeek *et al*, 2014), sin embargo, en humanos se ha demostrado que el ayuno prolongado de hasta 72 horas disminuye gradualmente la glucemia inhibiendo el patrón circadiano (Merl *et al*, 2004).

Una dieta alta en grasas modula el metabolismo de los carbohidratos mediante la amplificación de la variación circadiana en la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina (Rudic *et al*, 2004), en las últimas décadas se han realizado diversos estudios donde se evalúa el papel de los genes y proteínas del reloj molecular sobre el control del metabolismo energético relacionado con una dieta alta en grasas. Se ha reportado que ratones mutantes del gen *Clock* atenúan

la obesidad inducida por una dieta alta en grasas, además de presentar una disminución en los triglicéridos (TG), ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés), una disminución en los niveles séricos de insulina y leptina (Katsutaka *et al*, 2006), gluconeogénesis deprimida, o una inhibición de la misma al eliminar a *Bmal1*, ratones mutantes tanto de *Clock* como *Bmal1*³ (componentes del reloj molecular) en ayuno presentan hipoglucemia, niveles de insulina disminuidos, así como una mayor adiposidad (Rudic *et al*, 2004)

Los ratones mutantes de *Per2* muestran hipoglucemia en ayunas, una pérdida de la ritmicidad de acumulación de glucógeno en el hígado, disminuyendo la actividad de glucógeno fosforilasa (Zani *et al*, 2013), aunque niveles elevados de insulina en plasma (Zhao *et al*, 2012) pero no oscilaciones en los glucocorticoides (Yang *et al*, 2009). Lo cual podría indicar que los trastornos metabólicos observados en el presente estudio pueden estar relacionados con alteraciones a nivel del reloj molecular, así como a nivel de los osciladores periféricos, por lo cual debe realizarse estudios posteriores para enfatizar en estas vías.

8.1.1.2. Leptina

La leptina es una hormona principalmente producida por el tejido adiposo, tiene efectos en la regulación de la ingesta de alimentos y el metabolismo (Hsuchou *et al*, 2013), regula la energía disponible en el tejido adiposo por señales hipotalámicas, tiene efectos sobre el peso corporal, la ingesta de alimentos, la

³ *Clock* y *Bmal* son genes del reloj molecular, que componen la parte positiva del bucle de retroalimentación transcripcional del reloj molecular, forman un heterodímero que actúa como reguladores de la expresión génica activando a su vez la expresión de los reguladores negativos (*Cry* y *Per*) (Gómez-Abellán *et al*, 2011; Kalsbeek *et al*, 2014).

temperatura corporal y la tasa metabólica (Pelleymounter *et al*, 1995; Friedman y Halaas, 1998), además se sabe presenta un ritmo circadiano (Banks *et al*, 1996), se ha reportado que la exposición a una dieta de cafetería materna en cualquier etapa del desarrollo antes del destete no tiene un impacto en la ingesta de alimentos o adiposidad (Akyol *et al*, 2012), mientras que algunos estudios han sugerido que la sobrealimentación materna favorece el aumento de hiperfagia en la descendencia (Samuelsson *et al*, 2008).

Aunque las concentraciones secretadas de leptina son similares, la distribución diaria no lo es, el grupo CO presenta un periodo de 24 horas, con una acrofase a las 13.25 hrs, estos resultados concuerdan con los reportados por Hsuchou *et al* (2013), aproximadamente 2 horas posteriores al ZT12, en comparación con el grupo MHP que no presenta una ritmicidad diaria. Estas alteraciones podrían estar ocurriendo en diferentes niveles, entre ellos alteraciones en el LepR (receptor específico de leptina), así como sus mecanismos de señalización a nivel del oscilador periférico (tejido adiposo).

El mantener la dieta de cafetería durante la lactancia aumenta el contenido lipídico intramuscular y la grasa caracterizada por hipertrofia en los adipocitos (Bayol *et al*, 2005). La obesidad pueden conducir a la interrupción en el ritmo circadiano de leptina (Hsuchou *et al*, 2013). En el presente estudio, el grupo MHP no presenta un ritmo diario, este grupo presenta un aumento en el índice de Lee en los últimos días de registro indicando una tendencia al sobrepeso, lo cual es corroborado con lo reportado por Hsuchou *et al*, (2013). Este estudio abre la posibilidad de evaluar si en etapas posteriores estos grupos desarrollarían sobrepeso u obesidad.

Se sugiere que la sobrealimentación durante el embarazo es un factor clave en la programación de la adiposidad; que podría relacionarse con los bajos niveles de glucosa e insulina y su falta de ritmo en el grupo MHP, debido a que existe una correlación con la secreción de insulina en respuesta a la ingesta de alimentos (Ahrén, 2000).

8.1.2. Prueba de tolerancia a la glucosa e índice de HOMA

En el presente estudio la evaluación del índice de HOMA-RI no mostró evidencia de resistencia a la insulina, aunque presenta disminución significativa en los ZT4 y ZT20 para el grupo MHP (figura 14), lo cual podría estar relacionado con las concentraciones mayores de glucosa e insulina en estos ZT respectivamente para el grupo CO, a pesar de que el HOMA- β presenta un aumento significativo en los ZT4 y Z16 en MHP (figura 15), lo cual indica una mayor función de las células β -pancreáticas, relacionándolo con los menores niveles de glucosa en el MHP y una mayor concentración de insulina para este grupo en dichos ZT, como lo reportan Akyol *et al* (2012) en ratas es posible que en etapas posteriores la intolerancia a la glucosa podría presentarse debido a la señalización de la insulina deteriorada.

Por otro lado, otros estudios han considerado que la exposición a la sobrenutrición materna impacta la vida temprana en la homeostasis de la glucosa (Brondani *et al*, 2014, Samuelsson *et al*, 2008), así como que el consumo materno crónico de una dieta alta en grasas se asocia con resistencia a la insulina en la progenie debido a diversas causas, entre ellas el hecho de que el consumo de esta dieta perjudica la absorción de glucosa en el músculo esquelético (Wilkes *et al*, 1998), altera la señalización de la insulina (Frangioudakis *et al*, 2005) y

conduce al fallo de las células- β (Zhou y Grill, 1994; Sako, y Grill, 1990) sustentando el desarrollo de la intolerancia a la glucosa. En cuanto a la señalización metabólica de la madre al feto (el cual inicia adaptaciones metabólicas que posteriormente se manifiestan como intolerancia a la glucosa), puede ser que la obesidad inducida por una dieta de cafetería exacerba la resistencia normal de la insulina durante el la gestación y aumenta la carga metabólica en el desarrollo del hígado y el páncreas (Akyol *et al*, 2012).

Al realizar la PTG se encontró que ambos grupos presentan concentraciones basales similares de glucosa, aunque el grupo MHP presenta niveles menores de esta en plasma después de la administración ip de glucosa, así como un área bajo la curva en la PTG significativamente menor en comparación con el grupo CO (figuras 11 y 12), coincidiendo con los resultados encontrados en el análisis de los índices de HOMA.

Es posible que en edades más avanzadas, la intolerancia a la glucosa pueda ser más pronunciada y se muestre una señalización de la insulina más deteriorada. Se ha reportado que la intolerancia a la glucosa está asociada a la exposición a una obesidad materna exclusivamente durante la lactancia, cuando las crías son destetadas y se les impone a una dieta baja en grasa, se encuentra poca evidencia de una perturbación del metabolismo, aunque también se puede deber a una mayor sensibilidad a la insulina (Akyol *et al*, 2012). Observaciones similares se han encontrado en crías de ratas alimentadas con una dieta hipoproteínica durante la gestación, donde la sensibilidad a la insulina temprana da lugar a la resistencia a la insulina en la edad adulta mayor (Langley *et al*, 1994), se sabe que una dieta hipoproteínica durante la infancia puede provocar cambios

duraderos en las mitocondrias que pueden contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina en la vida posterior (Brodani *et al*, 2014).

Por ultimo cabe mencionar que los niveles plasmáticos analizados de corticosterona, presentan las concentraciones similares como se puede observar en la figura 17, indicando que los resultados obtenidos en el presente estudio son resultado de la malnutrición perinatal.

Existe mucha discrepancia en los resultados metabólicos para estas hormonas en estudios que han empleado dietas similares a las del presente trabajo. Este desacuerdo podría ser explicado desde el punto de vista del momento del día en que las muestras fueron colectadas y procesadas ya que la distribución temporal en 24 horas varía significativamente.

Ese trabajo aporta, por lo tanto información muy valiosa de la importancia de los ritmos circadianos sobre los procesos metabólicos.

9. Conclusión.

La exposición a una MH en etapas críticas del desarrollo resulta en un fenotipo metabólico anormal tanto para las madres como para la descendencia. Los datos del presente estudio sugieren que una dieta hipercalórica/hipoproteínica afecta negativamente la integridad fisiológica y metabólica de la descendencia, se sugiere que la obesidad materna antes del embarazo, durante la gestación y la lactancia es suficiente para programar la regulación metabólica de la glucosa, insulina y leptina en la descendencia resultante.

Los mecanismos que conducen a la disfunción de homeostasis de la glucosa pueden variar de acuerdo con el momento del insulto de

sobrealimentación materna. Se propone que una malnutrición hipercalórica perinatal puede contribuir al desarrollo de la obesidad en etapas adultas, así como a la resistencia a la insulina debido a alteraciones en la ritmicidad circadiana.

En conclusión, estos resultados refuerzan la idea que la herencia epigenética de una malnutrición transgeneracional incrementa la incidencia de enfermedades metabólicas, así como una alteración de la expresión circadiana de mecanismos metabólicos encargados de regular el balance energético en la descendencia, produciendo un retraso de fase en la distribución temporal diaria de la glucosa así como de la corticosterona e inhibiendo la ritmicidad de la insulina y leptina, sugiriendo que el NSQ y/o los osciladores periféricos fueron comprometidos *in utero* ante la exposición de una dieta hipercalórica materna, lo cual hace suponer que sea posible una serie de efectos sobre la salud en etapas posteriores.

Referencias

- ✓ Ahrén, B. 2000. Diurnal variation in circulating leptin is dependent on gender, food intake and circulating insulin in mice. *Acta Physiol. Scand.* 169; 325-221.
- ✓ Akiyama, T. Tachibana, I. Shirohara, H. Watanabe, N. Otsuki, M. 1996. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hiperlipidemia in normal adult male Wistar rat, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 31, 27-35.
- ✓ Akyol, A. McMullen S. Langley-Evans S. 2012. Glucose intolerance associated with early-life exposure to maternal cafeteria feedings is dependent upon post-weaning diet, *British Journal of Nutrition*, 107, 964-978.
- ✓ Alemany, M. 1989. The etiologic basis for the classification of obesity, *Prog. Food. Nutr. Sci.* 13:45-66.
- ✓ Andrade, F. Judice, L. Perez, G. Cisne, R. Fonte, C. Babinski. 2012. Maternal malnutrition durign lactation in wistar rats: effects on elastic fibers of the extracellular matrix in the trechea of offspring, *J Bras Pneuniol*, 38:5, 588-594.
- ✓ Angeles-Castellanos M. Mendoza J. and Escobar C. 2007. Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in cortico-limbic regions in rats, *Neuroscience*, 144:344-355.
- ✓ Aschoff, J. 1999. Masking and parametric effects of high-frequency Light-Dark Cycles. *Review of Japanese Journal of Physiology*, 49(1), 11-18.
- ✓ Asiaei, M. Solati, J. and Salari, A. 2011. Prenatal exposure to LPS leads to long-lasting physiological consequences in male offspring. *Dev Psychobiology* 53, 828–838.
- ✓ Bailey, S. Udoh, U. and Young, M. 2014. Circadian regulation of metabolism, *Journal of Endocrinology*, 222, R75-R96.
- ✓ Banks, W. Kastin, A. Huang, W, Jspan, J. Maness, L. 1996. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17: 305–311.
- ✓ Bayol, S. Simbi, B. Stickland, N. 2005. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at wening, *J. Physiol*, 567:3, 951-961.

- ✓ Beaudry, J. D'souza, A. Telch, T. Tsushima, R. Riddell, M. 2013. Exogenous Glucocorticoids and High-Fat Diet Cause Severe Hyperglycemia and Hyperinsulinemia and Limit Islet Glucose Responsiveness in young Male Sprague-Dawley Rats, *Endocrinology*, 154 (9), 3197-3208.
- ✓ Belkacemi, L. Jelks, A. Chen, C. Ross, M. and Desai, M. 2011. Altered placental development in undernourished rats: role of maternal glucocorticoids. *Reprod Biol Endocrinol* 9, 105.
- ✓ Benoit, S. Kemp, C. Elias, C. 2009. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. *J Clin Invest*; 119(9): 2577–2589.
- ✓ Bieswal, F. Ahn, M. Reusens, B. Holvoet, P. Raes, M. Rees, D. Remacle, C. 2006. The importance of Catch-up Growth after Early Malnutrition for the programming of Obesity in Male Rat. *Cell Biochemistry and Function*, 29; 569-576.
- ✓ Bizot-Espiard, J. Double, A. Guardiola-Lemaitre, B. Delagrangue, P. Ktorza, L. 1998. Diurnal rhythms in plasma glucose, insulin, growth hormone and melatonin levels in fasted and hyperglycemic rats. *Diabetes Metab*; 24, 235–240.
- ✓ Bringhenti, I. Moraes-Teixeira, J. Rabello, Cunha, M. Ornellas, F. Mandarim-de-Lacerda, C. Barbosa, M. 2013. Maternal Obesity during the preconception and Early Life Periods Alters Pancreatic Development in Early and Adult Life in Male Mouse Offspring, *Plos one*, 8: 1, e55711.
- ✓ Brondani, M. Ferraz, G. Araujo, G. Corrêa, C. Noschang, C. Benetti, C. Pelufo, S. Luiz, S. 2014. Effects of exposure to a cafeteria diet during gestation and after weaning on the metabolism and body weight of adult male offspring in rats, *British Journal of Nutrition*, 111, 1499-1506.
- ✓ Brunton, P. 2010. Resetting the dynamic range of hypothalamic–pituitary–adrenal axis stress responses through pregnancy. *J Neuroendocrinol* 22:1198–1213.
- ✓ Buijs, R. Kreier, F. 2006 The metabolic syndrome: a brain disease? *Journal endocrinol*, 18: 715-.716.

- ✓ Buscicchio, G. Lorenzi, S. Tranquilli, A. 2013. The effects of different concentrations of cocoa in the chocolate intaken by the mother on fetal heart rate, *The journal of maternal-fetal and neonatal medicine*, 26 (15): 1465-7.
- ✓ Cano, P. Jiménez-Ortega, V. Larrad, A. Reyes, C. Cardinali, D. Esquifino, A. 2008. Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats, *Endocrinology*, 33, 118-125.
- ✓ Carmona, A. 2006. *Obesidad, Esteatosis hepática y parámetros sanguíneos en el ratón de los volcanes (Neotomodon alstoni alstoni)*, Tesis para obtener el grado académico de maestro en ciencias biológicas, *Facultad de ciencias*, 95.
- ✓ Castell, J. Iglesias, R. Alemany, M. 1986 Influence of a cafeteria diet on heat production during postnatal development of the rat. *Comp. Biochem. Physiol.* 85:693-696.
- ✓ Chen, H. Simar, D. Lambert, K. Mercier, J. Morris, M. 2008. Maternal and Postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism, *Endocrinology*, 149: 11, 5348-5356.
- ✓ Chun-Xia, Y. Jan, V. Jiapei, D. Guanfu, Y. Liqiang, R. Buijs, R. 2006. Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinol.* 147 (1): 283-294.
- ✓ Colomina MT, Albina ML, Sanchez DJ, Domingo JL. **2001** Interactions in developmental toxicology: combined action of restraint stress, caffeine, and aspirin in pregnant mice. *Teratology* 63: 144-151.
- ✓ Costa, C. Sousa dos Santos, C. Moura, E. Nascimento-Saba, C. 2013. High-fat Diets Containing Soybean or Canola Oil Affect Differently Pancreas Function of Young Male Rats, *Horm Metab Res*, 45: 652-654.
- ✓ Cottrell, E. Holmes, M. Livingstone, D. Kenyon, C. and Seckl, J. 2012. Reconciling the nutritional and glucocorticoid hypotheses of fetal programming. *FASEB J* 26, 1866–1874.
- ✓ Cowley, M. Smart, J. Rubinstein, M. Cerdan, M. Diano-Tamas, S., Horvath, T. Cone, R. Low, M. 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus, *Letters to Nature*, 411: 480-484.

- ✓ Cryer, P. 1993. Glucose counterregulation: Prevention and correction of hypoglycemia in humans, *Am J Physiol*, 264: E149-155.
- ✓ Cunningham, S. Kramer, M. Narayan, K. 2014. Incidence of Childhood Obesity in the United States. *New England Journal of Medicine*, 370:403–411.
- ✓ Da Silva, T. Bittencourt, F. Sampaio, F. Fonte, C. 2009. Maternal malnutrition during lactation affects folliculogenesis, gonadotropins, and leptin receptors in adult rats, *Nutrition*, 1-8.
- ✓ Dunlap, J. Loros, J. De Coursey, P. 2004. Chronobiology, Biological Timekeeping, *Sinauer Associates* 2004; 382.
- ✓ Dúran, H. P. Miñana, S. Fuentes, C. 2013. Ritmos biológicos y corteza prefrontal. Hernández G., Chacón, g., Barradas, B., Guevara, P., Universidad de Guanajuato, *En Corteza prefrontal cognición y conducta*, 219-244.
- ✓ Eckel-Mahan, K. and Sassone-Corsi. 2013. Metabolism and the circadian clock converge, *Physiol Rev*, 93, 107-135.
- ✓ Esteve, M. Rafecas, I. Fernanández-López. Remesar, X. Alemany, M. 1994. Effect of a Cafeteria Diet on Energy Intake and Balance in Wistar Rats, *Physiology and Behavior*, 56: 1, 65-71.
- ✓ Frangioudakis, G. Ye J. Cooney, G. 2005. Both saturated and n-6 polyunsaturated fat diet reduce phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and protein kinase B in muscle during the initial stages of in vivo insulin stimulation. *Endocrinology* 146: 5596-5603.
- ✓ Friedman, J. Hallas, J. Leptin and the regulation of body weight in mammals, *Nature*, 395, 763-770.
- ✓ Froy, O. 2010. Metabolism and Circadian Rhythms-Implications for Obesity. *Endocr. Rev.* 31: 1-24.
- ✓ Fuentes, C. 2013, Alteraciones producidas por la administración perinatal de nicotina sobre los procesos de aprendizaje y memoria, UNAM, *Facultad de ciencias*, 62.
- ✓ Galler, J. Barrett, L. 2001. Children and famine: long-term impact on development. *Ambulatory Child Health*. 7:81–95.

- ✓ Galler, J. Tonkiss, J. 1990. Prenatal protein malnutrition and maternal behavior in Sprague-Dawley rats, *Nutrition and Behavior*, 762-769.
- ✓ Garibay, N. and Miranda, L. 2008. Impacto de la programación fetal y la nutrición durante el primer año de vida en el desarrollo de obesidad y sus complicaciones, *Bio. Med., Hosp. Infant Mex*; 451, 467.
- ✓ Gavrilu, A. Peng, C. Chan, J. Mietus, J. Goldberger, A. Mantzoros, C. 2003. Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns, *Journal of Clinical endocrinology and Metabolism*, 88, 2838-2843.
- ✓ Gluckman, P. Lillycrop, K. Vickers, M. Pleasants, A. Pjillips, E. Beedle, A. Burdge, G. Hanson, M. 2007. Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status, *PNAS*, 104 (31), 12796-12800.
- ✓ Golombek, D. 1997, Cronobiología, Principios y aplicaciones, *Editorial Universitaria de Buenos Aires*, 306-321.
- ✓ Gómez-Abellán, P. Madrid, J. Ordovás, J. Garaulet, M. 2011. Aspectos cronobiológicos de la obesidad y el síndrome metabólico, *Endocrinología y Nutrición*, 267, 1-12.
- ✓ Guo, F. Jen, KL. 1995. High-fat feeding during pregnancy and lactation effects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav* 57:681-686.
- ✓ Hansen, M. Valentina, J. Morris, M. 2004. Adaptative responses in hypothalamic neuropeptide Y in the face of prolonged high-fat feeding in the rat, *Journal of Neurochemistry*, 88, 909-916.
- ✓ Hautanen, A. Räikkönen, K. Adlerkreutz, H. 1997. Associations between pituitary-adrenocortical function and abdominal obesity, hyperinsulinaemia and dyslipidaemia in normotensive males. *J Intern Med* 241: 451–461.
- ✓ Hayes, E. Lechowicz, A. Petrik, J. Storozhuk, Y. Paez-Parent, S. Dai Q. Samjoo, I. Mansell, M. Gruslin, A. Holloway, A. Raha, S. 2012. Adverse Fetal and Neonatal Outcomes Associated with a Life-Long High Fat Diet: Role of Altered Development of the Placental Vasculature, journal *PlosOne*, 7, 1-12.

- ✓ Hill, R. and Wyse, G. 2006. Fisiología Animal, *Ed. Médica Panamericana*, España, 1038.
- ✓ Hoefel, A. Hansen, F. Rosa P. Assis, A. Silveira, S. Denardi, C. Pettenuzzo, L. Augusti, P. Somacal, S. Emanuelli, T. Perry, M. Wannmacher, C. 2011. The effects of hypercaloric diets on glucose homeostasis in the rat: influence of saturated and monounsaturated dietary lipids, *Cell Biochemistry and Function*, 29: 569-576.
- ✓ Hsuchou, H. Wang, Y. Cornelissen-Guillaume, G. Kastin, A. Jang. E. Halberg, F. Pan, W. 2013. Diminished leptin signaling can alter circadian rhythm of metabolic activity and feeding, *J. Appl Physiol*, 115: 995.-1003.
- ✓ Jacoby, E. Tirado, C. Diaz, A. Peña, M. Sanches, A. Coloma, M.J. Rapallo, R. Rodríguez, A. Sotomayor, O. Arias, J. and Courtis, C. 2014. Una mirada mundial a las políticas públicas de agricultura familiar, seguridad alimentaria, nutrición y salud pública en las Américas: Acercando agendas de trabajo en las Naciones Unidas, *Joint PAHO/WHO/FAO/ECLAC/IICA and OHCR document*, 14.
- ✓ Kalsbeek, A. Fleur, S. Filers, E. 2014. Circadian control of glucose metabolism, *Molecular Metabolism*, 3: 372-383.
- ✓ Katsutaka, O. Gen-ichin, A. Shinobu, S. Ikuko, K. Manami, K. Kazuhiko, M. Norio, I. 2006. Disrupted fat absorption attenuates obesity induced by a high-fat diet in Clock mutant mice, *FEBS Letters*, 580: 127-130.
- ✓ Kruse, M. Seki, Y. Vuguin, P. Quan, X. Flallo, A. Glenn, A. Singer, S. Breuhahn, K. Katz, E. Charron, M. 2012. High-Fat intake during pregnancy and lactation exacerbates High-fat diet-induced complications in male offspring in mice, *Energy Balance-Obesity*, 154; 10, 3565-3576.
- ✓ Kumar, J. Challet, E. Kalsbeek, A. 2015. Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1-14.
- ✓ Kumar, S. Alagawadi, K. Raghavendra, R. 2011, Effect of *Agyreia speciosa* root extract of cafeteria diet-induced obesity in rats, *Indian Journal of Pharmacology*, 43(2): 163-168.

- ✓ Laugley, S. Browne, R. Jackson, A. 1994. Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets *in utero*, *Comp Biochem Physiol*, 109, 223-229.
- ✓ Lesage, J. Blondeau, B. Grino, M. Breant, B. and Dupouy, J. 2001. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology* 142, 1692–1702.
- ✓ Maegawa, H. Kobayashi, M. Ishibashi, O. Takata, Y. Shiegeta, Y. 1986. Effect of diet change on insulin action: difference between muscles and adipocytes, *Am. J. Physiol.* 251: E616-E623.
- ✓ Marcheva, B. Ramsey, K. Peek, C. Affinati, A. Maury, E. and Bass, J. 2013. Circadian Clock and Metabolism, *NIH Public Access*, 217, 127-155.
- ✓ McDonald, S. Pesarchuk, E. Don-Wauchope, A. Zimmaity, H. Holloway A. 2011. Adverse metabolic effects of a hypercaloric, high-fat diet in rodents precede observable changes in body weight, *Nutrition Research*, 31, 707-714.
- ✓ Mendoza, P. 2008. Farmacología médica, México, *Ed. Médica Panamericana*, UNAM, *Facultad de Medicina*, 1008.
- ✓ Merl, V. Peters, A. Oltmanns, K. Kerm, W. Hubold, C. Hallschmid, M. Born, J. Fehm, H. and Schultes, B. 2004 Preserved Circadian Rhythms of Serum Concentration at Low Plasma Glucose During Fasting in Lean and Overweight Humans; *Metabolism*, 53, 11, 1449-1453.
- ✓ Mingrone, G. Mnaco, M. Mora, M. Guidone, C. Iaconelli, A. Gniuli, D. Leccesi, L. Chiellini, C. Ghirlanda, G. 2008. Influence of Maternal obesity on Insulin sensitivity and secretion in offspring, *Cardiovascular and Metabolic Risk*, 31:9, 1872-1876.
- ✓ Mitra, A. Alvers, K. Crump, E. Rowland, N. 2008. Effect of high-fat during gestation, lactation, or postweaning on philological and behavioral indexes in borderline hypertensive rats, *am J. Physiology*, 20-28.

- ✓ Montano, M. Wang, M. Even, M. and Vom, F. 1991. Serum corticosterone in fetal mice: sex differences, circadian changes, and effect of maternal stress. *Physiol Behav* 50,323–329.
- ✓ Morgane, J. Austin-LaFrance, R. Bronzino, J. Tonkinss, J. Díaz-Cintra, S. Cintra, L. Kemper, T. Galler, J. 1993. Prenatal malnutrition and development of brain, *Neurosc. Biobeh. Rev.* 17:91-128.
- ✓ Morgane, P. Mokler, D. Galler, J. 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation, *Neurosci Biobehav Rev*, (4), 471-83.
- ✓ OMS. 2015. La alianza para la salud de la madre el recién nacido y el niño.
- ✓ OMS. Serie de Informes Técnicos 916. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas, Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
- ✓ Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS). Organización para la Agricultura y Alimentación (FAO), Comisión Económica para América Latina (CEPAL), *Instituto Intramericano de Cooperación para la Agricultura*.
- ✓ Passos, M. Ramos, C. Moura, E. 2000. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring, *Nutrition Research*, 20:11; 1603-1612.
- ✓ Peek, C. Ramsey, K. Marcheva, B. Bass, J. 2012. Nutrient sensing and the circadian clock, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23, 312-318.
- ✓ Pellemounter, M. Culler, M. Baker, M. Hecht, R. winters, D. Boone, T. Collins, F. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice, *Science*, 269, 540-543.
- ✓ Peschke, E. and Peschke, D. 1998. Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused pancreatic islets, *Diabetología*, 41, 1085-355.
- ✓ Piccione, G. Bertolucci, C. Foa, A. and Caola, G. 2004. Influence of Fasting and Exercise on the Daily Rhythm of Serum Leptin in the Horse, *Cronobiol. Interl*, 21(3), 405-417.
- ✓ Picianato, M. Haber, E. Carpinelli, A. Cipolla-Neto, J. 2002. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rats, *J. Pineal Res*, 33; 172-177.

- ✓ Pittendrigh, C. 1981. Circadian organization and the photoperiodic phenomena, *Biological Clocks in Reproductive Cycles*. Bristol: John Wright.
- ✓ Raipuria, M. Bahari, H. Morris, M. 2015. Effects of maternal diet and exercise during pregnancy on glucose metabolism in skeletal muscle and fat of weanling rats, *Plos One*, 1-14.
- ✓ Ren, J. Marshall, B. Mueckler, M. McCaleb, M. Amatruda, J. Shulman, G. 1995. Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. *J Clin Invest* 95: 429–432
- ✓ Rolls, B. and Gurr, M. 1985. Lactation in lean and obese rats: effect of cafeteria feeding and of dietary obesity on milk composition, *Physiology and Behavior*, 38, 185-190.
- ✓ Romero, M. Holmgren-Holm, F. Grasa, M. Esteve, M. Romesar, X. Fernandez-López, J. Alemany, M. 2013. Modulation in wistar rats of blood corticosterone compartmentation by sex and cafeteria diet, *PLOS ONE*, 8:2, e57342.
- ✓ Romero-Sánchez, M. 2010. Ritmo iario de los procesos de atención y el impacto de la malnutrición en la rata adulta Sprague-Dawley. Tesis que para obtener el título de Bióloga, *UNAM*, México, 99.
- ✓ Rothwell, N. J. Stock, M. 1982. Effects of feeding a palatable 'cafeteria' diet on energy balance in young and adult lean (+/?) Zucker rats. *Br. J. Nutr.* 47:461-471; 1982.
- ✓ Rudic, D. McNamara, P. Curtis, A-M. Boston, R. Panda, S. Hogenesch, J. FitzGerald, G. 2004. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis, *PLOS BIOLOGY*, 2:11, e377.
- ✓ Saftlas, A. Triche, E. Beydoun, H. Bracken, M. 2010. Does chocolate intake during pregnancy reduce the risks of preeclampsia and gestational hypertension? *Ann Epidemiol*, 20 (8); 584-591.
- ✓ Sako, Y. Grill, V. 1990. A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology* 127: 1580–1589.

- ✓ Samuelsson, A. Matthews, P. Argenton, M. Christie, M. McConnell, J. Jansen, E. Piersma, A. Ozanne, S. Fernandez, D. Remacle, C. Rowlerson, A. Poston, L. Taylor, P. 2008. Diet-Induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance, *Hypertension*, 51:2, 382-392.
- ✓ Schutz, Y. Flatt, J. Jaquier, E. 1989. Failure of dietary fat intake to promote fat oxidation: A factor favoring the development of obesity.
- ✓ Shafat, A. Murray, B. Rumsey, D. 2008. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat, *Appetite*, 52, 34-38.
- ✓ Shimizu, N. Chikahisa, S. Nishi, Y. Harada, S. Iwaki, Y. Fujihara, H. Kitaoka, K. Shiuchi, T. Séi, H. 2013. Maternal dietary restriction alters offspring's Sleep homeostasis, *Plos One*, 8:5; e64263.
- ✓ Shyti, R. Eikerman-Haerter, K. Heiningen, S. Meijer, O. Ayta, C. Joëls, M. Ferrari, M. Maagdenberg, A. Tolner, E. 2014. Stress hormone corticosterona enhances susceptibility to cortical spreading depression in familial hemiplegic migraine type 1 mutant mice, *Experimental Neurology*, 263, 214-220.
- ✓ Simson, E. and Gold, R. 1982. The Lee Obesity Index vindicated? *Physiology and Behavior*, 29 (2), 371-376.
- ✓ Skopinski, P. Woronkowiez, M. Skopinska-Rózewska, E. Siwicki, A. 2011. The effects of prenatal exposure to methylxanthines, *Polisj Journal of Veterinary Sciences*, 14 (4); 695-701.
- ✓ Spiers, J. Cortina, C. Sernia, C. Lavidis, N. 2015. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress, *Frontiers in Neuroscience*, 1-6.
- ✓ Trujillo, A. 2007. La curva de tolerancia a la glucosa oral. Un enfoque alternativo, *ContantoS* 64, 21-24.
- ✓ Vazquez, D. 1998. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 23:663-700.
- ✓ Vegiopoulos, A. and Herzig, S. 2007. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol* 275, 43- 61.

- ✓ Vickers, M. Breier, B. Cutfield, W. Hofman, P. Gluckman, P. 2000. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition, *Am J Physiol Endocrinol, Metab*, 279, E38-E87.
- ✓ Ward, I. and Weisz, J. 1984. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. *Endocrinology* 114, 1635–1644.
- ✓ Welberg, L. Seckl, J. 2001. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Endocrinol* 13:113–128.
- ✓ Wilkes, J. Bonen, A. Bell, R. 1998. A modified high-fat diet induces insulin resistance in rat skeletal muscle but not adipocytes, *AmJ Physiol* 275:E679-686.
- ✓ Woods, S. Seeley, R. Rishing, P. 2003. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J. Nutrition*, 133 (4); 1081-1087.
- ✓ Wright, T. Fone, K. Langley-Evans, S. Voigt, J. 2011. Exposure to maternal consumption of cafeteria of cafeteria diet during the lactation period programmes feeding behavior in the rat, *Internatonal Journal of Developmental Neuroscience*, 29; 785-793.
- ✓ Yang, S. Liu, A. Weidenhammer, A. Cooksey, R. McClain, D. Kim, M. Ahuilera, G. Abel, E. Chung, J. 2009. The role of mPer2 Clock gene in glucocorticoid and feeding Rhythms, *Energy Balance-Obesity*, 150: 2153-2160.
- ✓ Zani, F. Reason, L. Becattini, B. Vukolic, A. Montani, J-P. Albrecht, U. Provenzani, A. Ripperger, J. Solinas, G. 2013, PER2 promotes glucose storage to liver glycogen during feeding and acute fasting by inducing Gys2 PTG and GL expression, *Molecular Metabolism*, 2: 292-305.
- ✓ Zhao, Y. Zhang, Y. Zhou, M. Wang, S. Hua, Z. Zhang, J. 2012. Loss of mPer2 increases plasma insulin levels by enhanced glucose-stim insulin secretion and impaired insulin clearance in mice, *FEBS Letters*, 586: 1306-1311.
- ✓ Zhou, Y. Grill, V. 1994. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest* 93: 870–876.
- ✓ Zuther, P. y Lemmmer, B. *Chronos-Fit* 1.05

11. ANEXOS

11.1. Malnutrición hipercalórica materna

Ya que el peso corporal es un parámetro para determinar la salud nutricional de los individuos, el peso de las ratas hembras en edad reproductiva tanto del grupo control (CO) como del grupo con malnutrición (MH) se midió cada 7 días, también se determinó la concentración basal de glucosa en sangre (con un período de 6 horas de ayuno) para cada uno de los organismos.

Posterior a las 6 semanas en el protocolo de malnutrición para el grupo experimental, ambos grupos fueron sometidos a una prueba de tolerancia a la glucosa (PTG) para determinar el estado metabólico de las hembras.

11.1.1. Análisis de datos

Los resultados obtenidos de los registros de ingesta de alimento, ganancia de peso corporal y glucosa en sangre, se graficaron mediante el programa de Microsoft Excel 2010 y se analizaron empleando el paquete estadístico *GraphPad PRISM 5.0*, se comparó cada parámetro en cada tiempo empleando una prueba de *t* de *Student* ($p < 0.05$).

Los datos obtenidos de la curva de tolerancia a la glucosa fueron graficados mediante el programa de Microsoft Excel 2010, se comparó la concentración de glucosa en cada tiempo (0, 30, 60, 90 y 120 minutos) entre ambos grupos empleando una prueba de *t* no paramétrica (*Mann-Withney*) con un valor de significancia de $p < 0.05$. También determinó la capacidad de asimilar la glucosa inyectada calculando el área bajo la curva mediante el programa *GraphPad PRISM 5.0*, y posteriormente se graficaron los promedios y error estándar, para

cada condición y se compararon con una prueba de *t* no paramétrica (*Mann-Whitney*) con un valor de significancia de $p < 0.05$.

11.1.2. Resultados

Seis semanas previas a la cruce se registró la ingesta de alimento, el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre, al término de estas se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa para ambos grupos.

11.1.2.1. Ingesta de alimento

Se registró diariamente el consumo de alimento de cada rata y fue promediado semanalmente para cada grupo experimental durante las 6 semanas previas a la cruce, en la figura 18 se observa un mayor consumo promedio diario durante las tres primeras semanas en el grupo con malnutrición ($p < 0.05$, $n = 7$), en las tres semanas posteriores se observa un consumo de alimento similar ($p > 0.05$).

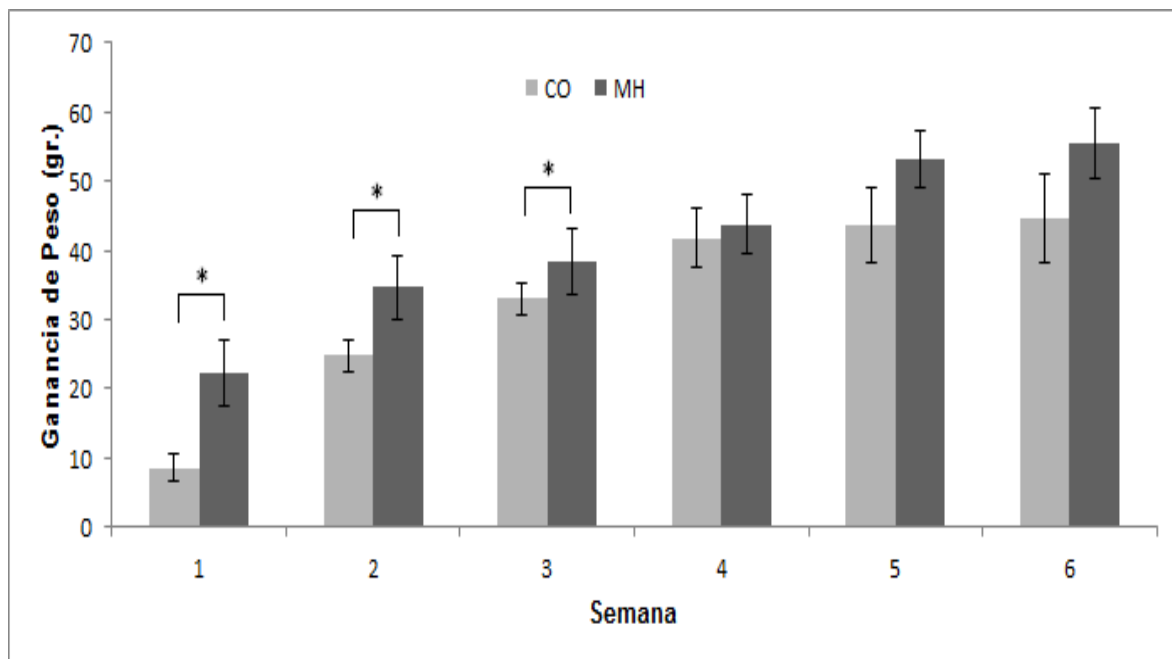


Figura 18: Consumo de alimento en ratas hembras antes de la cruce. En el histograma se muestra el consumo diario en las 6 semanas previas a la cruce; las barras claras corresponden al grupo CO y las barras oscuras al grupo MH. Se puede observar que en las primeras tres semanas el grupo MH presenta mayor consumo que el grupo CO, según la prueba de *t* de *Student*, * $p < 0.05$, $n = 7$. Los datos están expresados en gramos y se muestran promedios \pm ee.

11.1.2.2. Ganancia de peso corporal

Se registró el aumento de peso semanal con respecto al registro basal (el peso inicial antes de la exposición a la dieta hipercalórica para el grupo MH) durante las 6 semanas previas a la cruce. En la figura 19 se observa que los animales en el grupo MH experimentan una ganancia de peso mayor respecto a los controles en las primeras dos semanas después del cambio de la dieta.

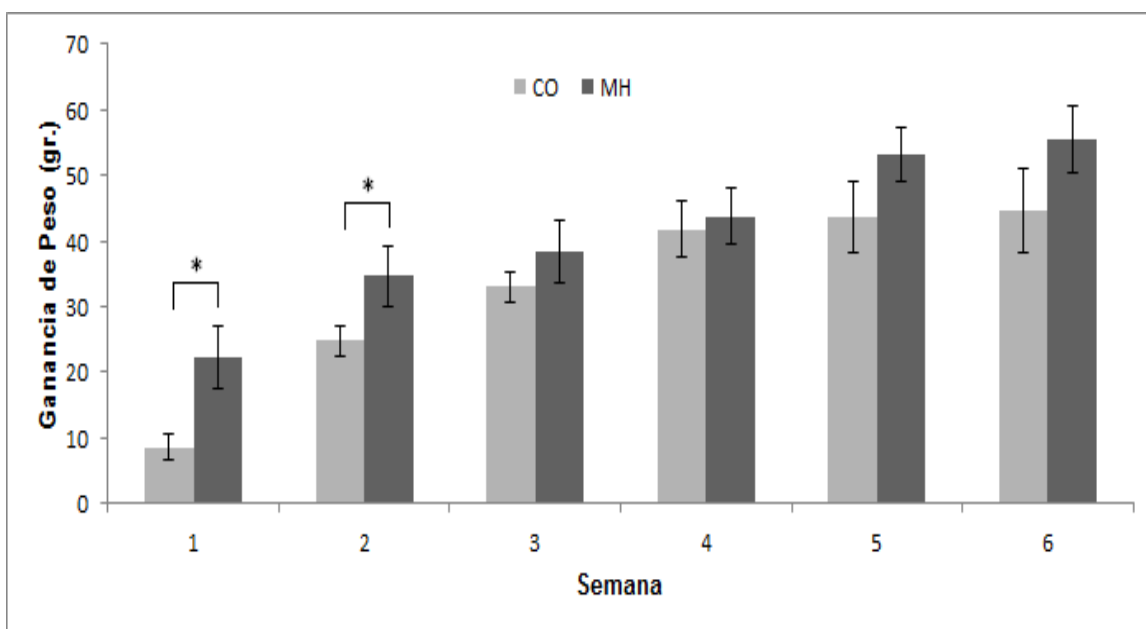


Figura 19: Ganancia de peso en ratas hembras antes de la cruce. En el histograma se muestra la ganancia de peso promedio semanal en las 6 semanas previas a la cruce; las barras claras corresponden al grupo CO y las barras oscuras al grupo MH. Se puede observar que en las primeras dos semanas el grupo MH presenta una mayor ganancia de peso que el grupo CO, según la prueba de *t* de *Student*, * denotan $p < 0.05$, $n=7$. Los datos están expresados en gramos y se muestran promedios \pm ee.

11.1.2.3. Niveles de glucosa en sangre y PTG

Se evaluaron los niveles basales de glucosa en sangre una vez a la semana durante las 6 semanas previas a la cruce, se encontró una mayor concentración en el grupo MH de la semana 1 a la 6 con respecto a la concentración basal en la semana 0 ($p < 0.05$, $n=7$), también se observa que hay

una mayor concentración de glucosa en el grupo MH con respecto al grupo CO ($p < 0.05$, $n=7$) de la semana 1 a la 6 (figura 20).

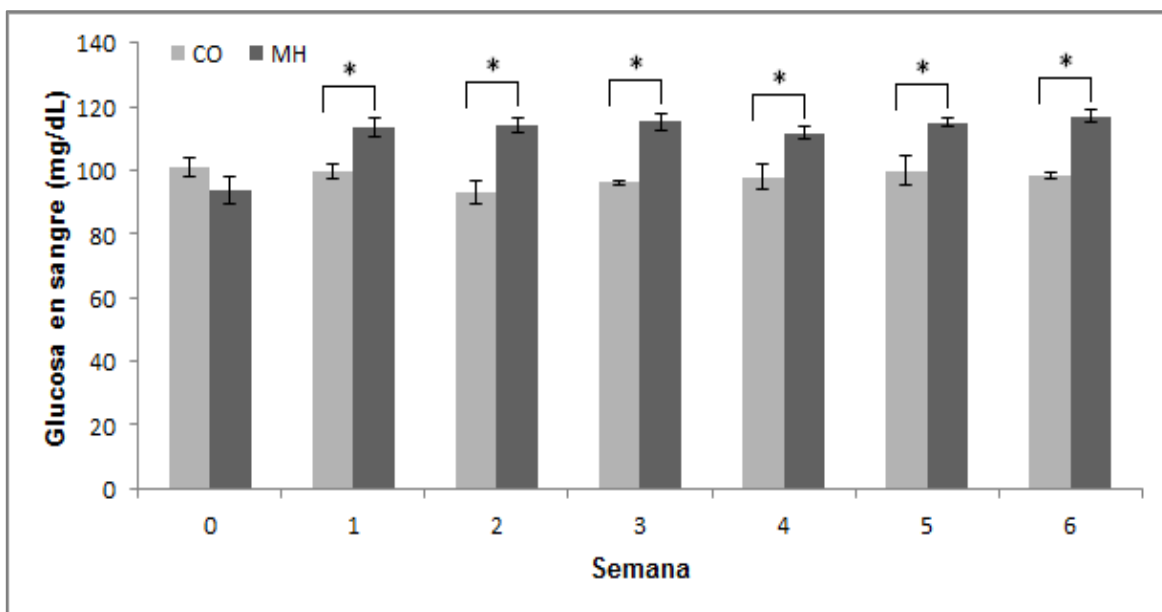


Figura 20: Glucosa en sangre de ratas hembras antes de la cruce. En el histograma se muestra la glucosa en concentraciones basales durante las 6 semanas previas a la cruce, las barras claras corresponden al grupo con la dieta control (CO) y las barras oscuras corresponden al grupo alimentado con la dieta hipercalórica (MH). Se muestra un aumento significativo en los niveles de glucosa basal en el grupo MH de la semana 1 a la 6 según la prueba de *t* de Student, * denotan $p < 0.05$, $n=7$.

Por otra parte, al término de las 6 semanas de malnutrición del grupo MH se realizó una PTG para ambos grupos, los cuales presentaron niveles similares en los puntos temporales evaluados excepto al minuto 60 para el grupo MH, donde se presenta un aumento significativo con respecto al grupo CO ($p < 0.05$, $n=7$), sin embargo ambos grupos regresan a una concentración similar a la basal al minuto 120 (figura 21).

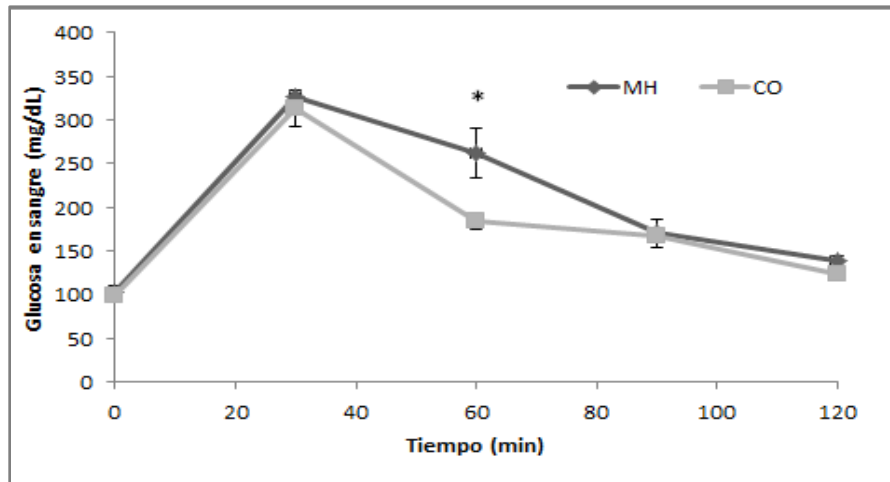


Figura 21: Prueba de tolerancia a la glucosa. La línea clara corresponde al grupo CO, la oscura corresponde al grupo MH. Se observa que ambos grupos regresan a una concentración similar a la basal, aunque el grupo MH presenta un aumento significativo en el minuto 60 posterior a la inyección de ip glucosa según la prueba de *Mann-Whitney*, * denotan $p < 0.05$, $n=4$. Los datos se muestran como mg/dL, se presenta el promedio \pm ee.

Para obtener una mejor evaluación de la respuesta a la administración de glucosa se realizó el análisis del área bajo la curva, los valores promedio de las áreas bajo la curva en unidades relativas (UR) fueron 415.5 ± 6.062 en CO y 520.8 ± 33.34 en los MH (figura 22), así el área bajo la curva del grupo MH fue mayor aunque ambos grupos regresaron a una concentración similar a la basal ($p < 0.05$, $n=4$).

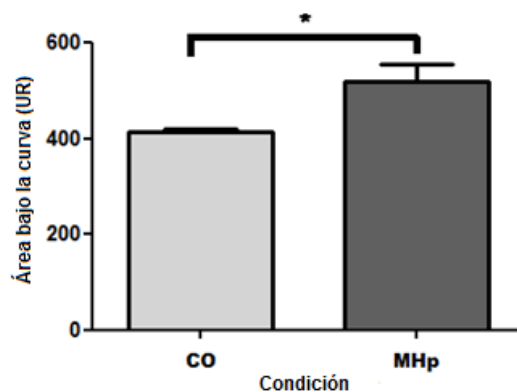


Figura 23: Valores promedio de las áreas bajo curva por grupo \pm ee. La barra clara corresponde al grupo control y la barra oscura al grupo con malnutrición hipercalórica, * hace referencia a la diferencia significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

11.1.3 Discusión

En el presente trabajo, llevo a cabo un protocolo de malnutrición pregestacional (por seis semanas), durante la gestación y la lactancia con una dieta hipercalórica con el objetivo de determinar las alteraciones en la producción y/o distribución diaria de la glucosa, insulina y la leptina en la rata macho juvenil.

Se observó un aumento significativo en la ganancia de peso en las primeras tres semanas previas a la cruce en el grupo malnutrido, esto podría estar relacionado con el aumento en el consumo de alimento observado en este grupo durante las primeras semanas (figuras 18 y 19), lo cual puede deberse a la exposición a la dieta nueva, ya que la homeostasis energética requiere un tiempo para regresar al valor basal del control de la ingesta de alimentos en mamíferos (Alemany, 1989), la ingesta de energética puede ser alterada, cuando se expone al organismo a una dieta de cafetería (alta en grasas), ya que las dietas ricas en energía son altamente palatables (Schutz *et al.*, 1989).

El SNC mediante señales centrales y periféricas refleja la disponibilidad de energía, regulando de esta manera entre otros aspectos el peso corporal (Benoit *et al*, 2009). Se ha demostrado que tanto en roedores como humanos expuestos a dietas hipercalóricas, se presenta un desajuste en este mecanismo controlador del peso corporal. Los efectos sobre el peso corporal se han atribuido a una mayor disponibilidad de energía, superando la capacidad de la rata para agotar éste exceso a través de la termogénesis sin embargo, la adaptación a esta dieta reduce su consumo (Rothwell y Stock, 1982), Cabe mencionar que tanto la edad como la duración de la dieta son factores importantes para la regulación del metabolismo, la ganancia de peso, así como la presencia de hiperfagia, o aumento en el

consumo normal de alimento cuando las ratas son expuestas a la ingesta de una dieta de cafetería (Shafat, *et al.*, 2008).

Previamente se ha demostrado que una exposición por periodos largos a una dieta de cafetería en ratas produce una tendencia a ingerir menor cantidad de alimento y cambiar su preferencia a ciertos alimentos (Hoefel *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados por Esteve *et al.* (1994), en donde se encontró que después de exponer durante 15 días consecutivos a una dieta de cafetería el consumo de la dieta aumentó gradualmente (alimentado con una dieta Purina Lab Chow). La densidad baja de proteínas en la dieta de cafetería (Esteve *et al.*, 1993) puede también contribuir al aumento de la ingesta de alimentos, compensando la baja disponibilidad de dichas proteínas (Castell *et al.*, 1986).

El consumo de una alimentación con alto contenido calórico se ha asociado con el sobrepeso y la obesidad y esto a su vez con el aumento de la prevalencia de otras enfermedades crónicas. La obesidad es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la resistencia a la insulina (RI) y la diabetes mellitus tipo II, se ha demostrado que la asociación de la obesidad con una dieta alta en grasas y calorías es causada por el consumo excesivo y no por la composición de la dieta (Woods *et al.*, 2003).

En el presente estudio se observó que a partir de la segunda semana de exposición a la malnutrición, el grupo MH presenta concentraciones de glucosa en sangre significativamente mayores en condiciones de ayuno, la PTG demostró una mayor área bajo la curva para el MH, corroborando los resultados anteriormente publicados para la rata (Akiyama *et al.*, 1996).

Se ha sugerido que los niveles altos de grasa en la dieta aumentan el consumo de energía, la grasa corporal y la resistencia a la insulina (Maegawa *et al*, 1986). Estos datos muestran que las madres alimentadas con una dieta hipercalórica presentan alteraciones en la producción de glucosa, ya se ha demostrado que tras la alimentación con una dieta hipercalórica, la rata presenta un aumento de la síntesis de glucógeno en hígado, así como este tipo de dieta está asociada con la presencia de hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa (Hoefel *et al*, 2011), lo cual podría indicar una intolerancia a la insulina, una afección en el páncreas, así como un posible efecto en el páncreas y resistencia a la insulina en la descendencia de nuestros grupos con malnutrición perinatal.

11.2. Corticosterona como índice de estrés

Los glucocorticoides naturales son hormonas que se liberan en la corteza de las glándulas suprarrenales en respuesta a la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), regulan el metabolismo intermediario de los carbohidratos, el catabolismo de proteínas, respuestas inmunitarias y la inflamación, entre estas hormonas se encuentra el cortisol (para los humanos) corticosterona (en roedores), la cual se libera en respuesta al estrés, tienen diversos efectos metabólicos y cardiovasculares que aseguran la supervivencia a través de periodos de adversidad (Spiers *et al*, 2015; Mendoza, 2008; Vegiopoulos and Herzig, 2007).

En situaciones de estrés, se requieren mayores concentraciones de glucosa en sangre para responder a la crisis, la secreción de glucagón aumenta mientras que la insulina disminuye. También se aumenta la excitabilidad neuronal mediante la mejora de la neurotransmisión glutamatérgica (Shyti *et al*, 2015).

En animales de experimentación las concentraciones aumentan en respuesta a la fisiología y tensiones psicológicas de origen ambiental, incluyendo el exceso de luz y/o calor, la restricción física, infección y la restricción calóricas y proteínicas de la dieta, así como tensiones ambientales y en la determinación intrauterina (Ward y Weisz, 1984; Montano *et al.*, 1991; Lesage *et al*, 2001; Asiaei *et al*, 2011; Belkacemi *et al*, 2011; Cottrell *et al*, 2012).

En el presente trabajo se llevó a cabo la evaluación de la concentración plasmática de corticosterona en cada punto temporal en que se evaluaron las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina y leptina, en la figura 17 se

observa que no hay diferencia entre los niveles secretados en el grupo CO y el grupo MHP en ninguno de los 6 puntos temporales evaluados sin el ajuste de Cosinor. Al evaluar los datos con el ajuste de Cosinor, se encontró que ambos grupos presentan un periodo de 24 horas, aunque el MHP presenta un adelanto de fase, y una disminución en la amplitud (tabla 4, figura 23), indicando un adelanto en la expresión del ritmo diario de las rata macho con malnutrición hipercalórica perinatal respecto a los CO.

Tabla IV: Valores obtenidos del ajuste de Cosinor para el perfil diario de Corticosterona.

Los * indican los perfiles que tuvieron un ajuste significativo ($p < 0.05$).

| Parámetro | Condición | Periodo | Amplitud | Acrofase | Mesor | % de Ritmicidad | valor de P |
|-------------------------|-----------|---------|----------|----------|--------|-----------------|------------|
| Corticosterona (nmol/L) | CO | 24* | 214.90 | 21.76 | 214.90 | 18.12 | <0.05 |
| | MHp | 24* | 213.33 | 19.09 | 213.33 | 40.88 | <0.05 |

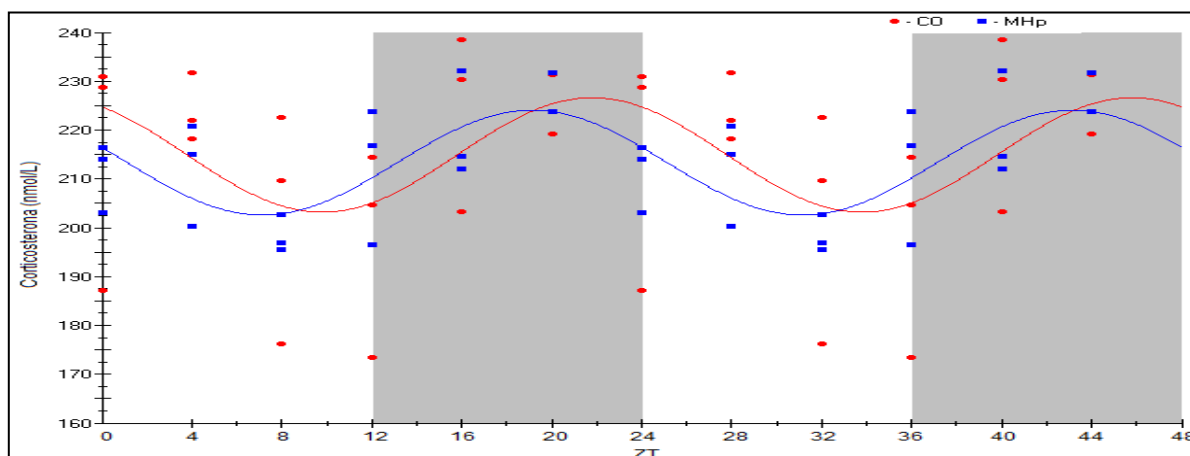


Figura 23: Niveles de corticosterona en plasma (como indicador de estrés). La línea roja corresponde al grupo CO, la línea azul corresponde al grupo MHP con ajuste de Cosinor, se observa un adelanto en la acrofase del grupo MHP, los datos se muestran como promedio \pm ee, el área sombreada indica escotofase, el área sin sombreada a la fotofase.

11.2.1 Discusión

En el presente trabajo se observa que las concentraciones plasmáticas de corticosterona presentan una distribución diaria significativa para ambos grupos (figura 23). Esta hormona está relacionada con el estrés (Shyti *et al*, 2014) y estimula la gluconeogénesis durante la hipoglucemia (Cryer, 1993).

En animales expuestos a una dieta perinatal alta en grasas se mostró una alteración en los receptores de corticosteroides, en regiones límbicas tales como el hipocampo y la amígdala, las cuales están involucradas en proceso de atención, ansiedad y estrés (Vázquez, 1998; Welber and Seckl, 2001, Brunton, 2010), también se sabe que en el síndrome metabólico, la actividad de los glucocorticoides se aumenta, pero los niveles circulantes muestran poco cambio (Romero *et al.*, 2013). En la obesidad y la diabetes, la corticosterona suele mostrar niveles séricos circulantes normales (Hautenen *et al*, 1997), lo cual concuerda con los resultados observados en el presente estudio, ya que se observan niveles plasmáticos similares en ambos grupos (figura 17), pero con una distribución temporal diaria diferente (figura 23), lo cual podría estar relacionado con un desajuste en los osciladores periféricos como la glándula suprarrenal, por lo cual se propone estudiar este aspecto en el futuro.

11.3. El reloj molecular en mamíferos

Los ritmos circadianos están dados por variaciones en la expresión del mecanismo molecular en el reloj central (NSQ), generando un ritmo que ocurren en un período cercano a un día (*circa*: cercano, *diem*: día), que tiene influencias a nivel fisiológico y conductual, cuando los organismos se mantienen en condiciones constantes, los ritmos circadianos discurren en curso libre con un periodo ligeramente diferente a 24 horas. La presencia de estas oscilaciones circadianas permite a los organismos poder anticiparse a cambios externos por ejemplo adaptándose y anticipando su metabolismo (Gómez-Abellán *et al*, 2011; Kalsbeek *et al*, 2014).

El mecanismo molecular que regula y mantiene la ritmicidad circadiana se basa en un complejo programa de expresión génica que activa o reprime su propia expresión. Es un complejo formado por un bucle de retroalimentación transcripcional negativo, que involucra cambios en la concentración, localización subcelular, modificaciones postraduccionales (fosforilación, acetilación, y desacetilación) y retraso entre transcripción y traducción.

Los elementos positivos, *Clock* y *Bmal* son factores de transcripción formando el heterodímero que actúa como reguladores de la expresión génica activando a su vez la expresión de los reguladores negativos de la expresión de genes circadianos: familia Criptocromo (*Cry1* y *Cry2*) y la familia periodo (*Per1*, *Per2*, *Per3*) (Froy, 2010).

CRY y *PER* son proteínas que inhiben su propia expresión, así como la expresión de otros genes reloj. *REV-ERB α* , es un receptor nuclear que regula el

metabolismo de lípidos, la adipogénesis, *Rora* (Receptor α huérfano relacionado con el receptor de ácido retinoico), este par de receptores nucleares participan en la regulación de la expresión de *Bmal1*, inhibiendo o activando su transcripción respectivamente (figura 24) (Kalsbeek *et al*, 2014).

Para iniciar un nuevo ciclo de transcripción, se reprime el complejo *PER* y *CRY* por degradación proteolítica, *CLOCK* y *BMAL* comienzan de nuevo. Esta maquinaria molecular es capaz de generar patrones rítmicos de expresión de genes con un período aproximadamente de 24 horas (Gómez-Abellán *et al.*, 2011).

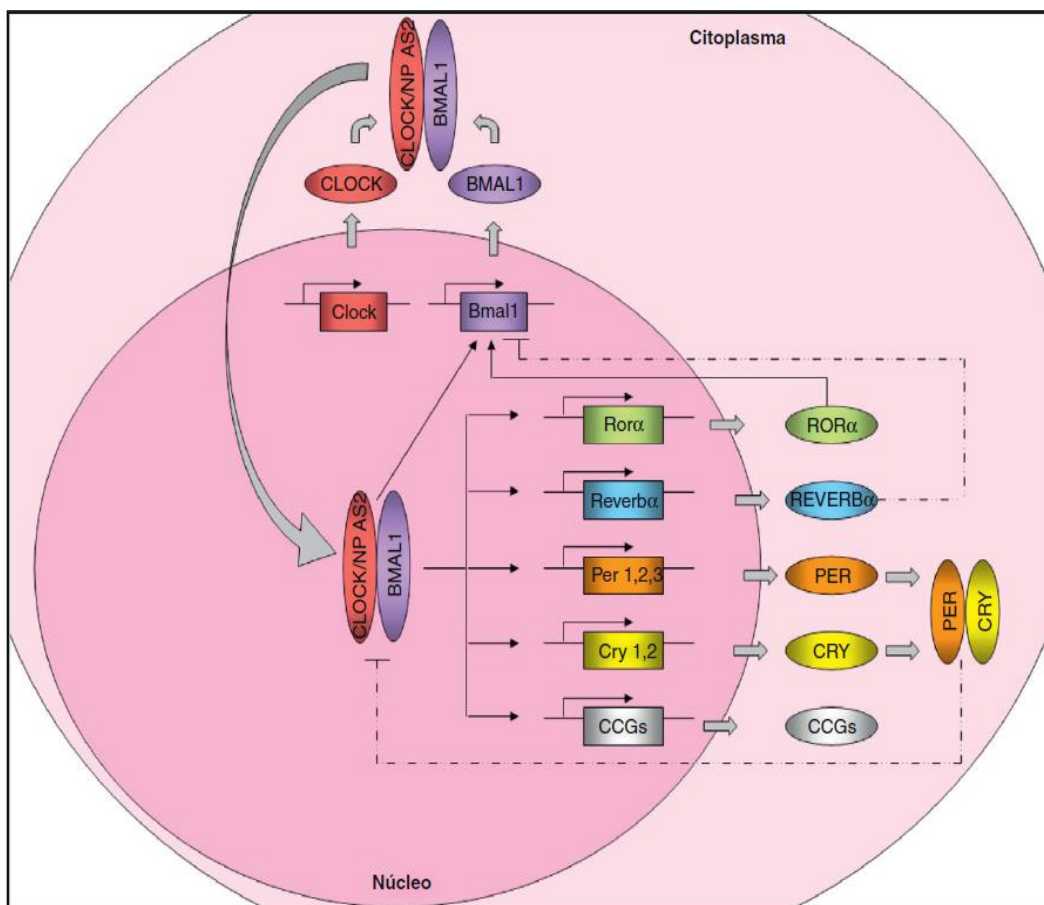


Figura 24: Mecanismo central del reloj molecular de mamíferos, Los elementos positivos *CLOCK* y *BMAL1* heteromerizan en el citoplasma, formando un complejo proteico, el heterodímero se transloca al núcleo y se une sobre el promotor de determinados genes (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Reverb*, *Ror*, y muchos genes controlados por el reloj) controlando su expresión. Líneas sólidas: estimulación. Líneas punteadas: inhibición (Gómez-Abellán *et al*, 2011)