



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la restricción proteínica materna en el estado de las mitocondrias de hígado y riñón de ratas crías machos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

Q.A. ADRIANA BERENICE PÉREZ JIMÉNEZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA (FQ, UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ (INCMNSZ)

DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI (FQ, UNAM)

Ciudad de México, Junio, 2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:

DR. AGUIRRE LINARES JESÚS

VOCAL:

DRA. JAIMES HOY ELIZABETH LORRAINE

VOCAL:

DR. JIMÉNEZ GARCÍA LUIS FELIPE

VOCAL:

DR. HERNÁNDEZ MUÑOZ ROLANDO EFRAÍN

SECRETARIO

DR. DÍAZ MUÑOZ MAURICIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

LABORATORIO DE DIABETES. EDIFICIO F, LABORATORIO 202, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA.

ASESOR DEL TEMA

DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA

ASESOR TÉCNICO

DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES GRANADOS SILVESTRE

SUSTENTANTE

QA. ADRIANA BERENICE PÉREZ JIMÉNEZ

RESUMEN

Las características del entorno fetal y neonatal ejercen una profunda influencia en el establecimiento del fenotipo del individuo. Estímulos aplicados en estos periodos sensibles del desarrollo pueden desencadenar respuestas permanentes en la estructura y/o función de células y tejidos, un proceso conocido como programación. La deficiencia en el suministro de proteínas durante la gestación y la lactancia no solo conduce a un bajo peso en el nacimiento y la infancia, sino que también se ha asociado con el desarrollo de síndrome metabólico (SM), diabetes tipo 2 (DT2) y enfermedades cardiovasculares (ECV) en la vida adulta. A pesar de que este fenómeno se describió desde hace décadas, los mecanismos involucrados siguen siendo poco claros. Recientemente, se ha postulado que la programación de la mitocondria es uno de los mecanismos que enlaza la malnutrición durante el desarrollo temprano y la enfermedad del adulto. Se sabe que la mitocondria se regula por sensores maestros de nutrientes y energía como las cinasas AMPK y mTOR y que la disfunción mitocondrial está ligada en gran medida a enfermedades que incluyen la hipertensión, el hígado graso y la DT2, entre otras.

El objetivo de la presente tesis fue evaluar la función mitocondrial en tejido hepático y renal de crías macho de ratas sometidas a restricción proteínica severa.

Metodología. Se utilizaron ratas Wistar preñadas, que se alimentaron con una dieta control (“C”; 20% de proteína) o una dieta isocalórica baja en proteínas (“R”; 6% de proteína) durante la gestación y la lactancia. Al nacimiento, el tamaño de camada se ajustó a 8 crías por camada (4 hembras y 4 machos, cuando fue posible). Los animales se destetaron en el día 21 y, posteriormente, las crías machos de ambos grupos fueron alimentados con dieta estándar de laboratorio “Chow” hasta el día 28 o 180 postnatal (P28 y P180). Durante este período, se realizó la evaluación somatométrica de las crías (peso, talla, circunferencia abdominal y composición corporal) y se realizó el test de tolerancia a la glucosa oral en las crías P180. El día del sacrificio, un lote de crías se estudió en condiciones normales (25°C) y otro se sometió a estrés por exposición al frío (4 °C por 1h) con el fin de estimular la actividad mitocondrial y exponer posibles defectos funcionales. Así, se crearon 4 grupos experimentales: C, R, CF y RF (“C” control, “R” restringida; “F” grupos expuestos al frío). Se evaluaron parámetros bioquímicos y se realizaron las pruebas de función mitocondrial: tasa de consumo de oxígeno y generación de potencial de membrana, en mitocondrias de hígado y riñón utilizando un respirómetro de alta

resolución. Se evaluó la actividad de la ATP sintasa midiendo la generación de NADPH. Adicionalmente, utilizamos qPCR-RT para evaluar los niveles de RNAm de los sensores energéticos AMPK y mTOR, y de la proteína desacoplante UCP2.

Resultados: La capacidad respiratoria de las mitocondrias hepáticas de crías R y C de P28 no fue diferente, pero la exposición al frío mostró que el control respiratorio de las crías RF de P28 fue menor que la de las crías CF ($p < 0.05$). En el día P180, las mitocondrias hepáticas del grupo R tuvieron menor velocidad de respiración inducida por ADP que C y una disminución del 18% del control respiratorio. Este comportamiento también se observó en las crías RF del mismo período. La reducción del control respiratorio mitocondrial correlacionó con un descenso en la expresión hepática de RNAm de AMPK y mTOR en P28 y P180. En las mitocondrias renales, se observó un incremento en la velocidad de consumo de oxígeno del estado desacoplado de las crías R entre los días 28P y 180P. En este tejido, la restricción proteínica materna provocó que la expresión renal de la proteína desacoplante UCP2 disminuyera en P28 con un incremento en P180. No se detectaron cambios en el metabolismo de glucosa y lípidos de las crías R en las edades estudiadas.

Conclusiones: Los resultados de este estudio indican que una dieta materna baja en proteínas durante la gestación y la lactancia altera la capacidad respiratoria de las mitocondrias hepáticas y renales de las crías de forma tejido-específica. Sin embargo, las deficiencias funcionales de la mitocondria son detectables cuando las crías son sometidas a estrés por frío o al envejecer. La disminución de la función mitocondrial ocurre antes de la aparición de los desórdenes metabólicos reportados para las crías del modelo de RPM, por lo cual es importante determinar si la programación de la función mitocondrial es causante del desarrollo de dichos desórdenes metabólicos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta Menjívar por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por todas sus enseñanzas acerca de la vida y la investigación.

Al fondo PAIP (clave 5000-9110) por el apoyo económico para la adquisición de equipos, materiales y reactivos para la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realizar mis estudios de maestría.

A los miembros del comité tutor: la Dra. Elena Zambrano y el Dr. José Pedraza Chaverri, por sus observaciones y comentarios para el mejoramiento de este trabajo.

CONTENIDO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	6
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Estructura y función de las mitocondrias	10
1.2. Efecto de la nutrición materna en la programación de la salud de la vida adulta	18
1.2.1. Modelos animales de restricción del desarrollo intrauterino	19
1.4. La programación mitocondrial como un vínculo entre la malnutrición en la vida temprana y las alteraciones del metabolismo en la vida posterior	25
1.4.2. Disfunción mitocondrial en el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2	26
1.5. La respuesta fisiológica al frío	27
2. ANTECEDENTES	29
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
4. JUSTIFICACIÓN	29
5. HIPÓTESIS	29
6. OBJETIVOS	30
7. METODOLOGÍA	32
7.1. Manejo de Animales y grupos experimentales	32
7.2. Obtención de muestras biológicas	34
7.3. Medidas somatométricas y análisis de composición corporal	34
7.4. Análisis de la composición de la leche materna	34
7.5. Ensayo de tolerancia a la glucosa oral	35
7.6. Determinación de parámetros bioquímicos en sangre	35
7.7. Evaluación de la función mitocondrial	36
7.8. Evaluación de la expresión a nivel de mensajero de sensores energéticos: AMPK y mTOR	39
7.9. Análisis estadístico	40
8. RESULTADOS	41
8.1 Madres: peso corporal y consumo de alimento durante la gestación y la lactancia	41
8.2. Caracterización del fenotipo de las crías	43

8.2.1. Estructura corporal	43
8.2.2. Parámetros bioquímicos	45
8.3. Expresión de los sensores energéticos AMPK y mTOR	46
8.3. Efecto de la dieta materna en la respiración y la generación de potencial de membrana mitocondrial	48
8.3.1. Hígado	48
8.3.2. Riñón	51
8.4. Actividad de la ATP sintasa	53
8.5. Expresión de la proteína desacoplante UCP2	53
9. DISCUSIÓN	55
10. CONCLUSIONES	66
12. MATERIALES SUPLEMENTARIOS	67
12.1. Formulación de las dietas control y restringida	68
12.2. Análisis de la composición de la leche materna	68
12.3. Pruebas bioquímicas	69
12.4. Cuantificación de proteína mitocondrial por el método de Bradford	72
13. REFERENCIAS	73

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
ADP	Adenosín difosfato
AG	Ácidos grasos
AMPK	AMP cinasa
ANOVA	Análisis de varianza de una sola vía
ATP	Adenosín trifosfato
BAT	Tejido adiposo pardo
BSA	Albúmina sérica bovina
CA	Crías control estudiadas a temperatura ambiente
CCCP	Carbonilcianuro clorofenilhidrazona
CF	Crías control con tratamiento de frío
CI	Complejo respiratorio I- NADH deshidrogenasa
CICUAL	Comité interno del cuidado y uso de animales de laboratorio
CII	Complejo respiratorio II- Succinato Deshidrogenasa
CIII	Complejo respiratorio III- Citocromo bc1
CIV	Complejo respiratorio IV- Citocromo c oxidasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DT2	Diabetes tipo 2
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDO3	Estado 3 de la respiración
EDO4	Estado 4 de la respiración
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
G6pdh	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno

HPT	Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides
IA	Inseguridad alimentaria
IRS	Sustrato del receptor de insulina
IUGR	Restricción del crecimiento intrauterino
MEM	Membrana externa mitocondrial
MIM	Membrana interna mitocondrial
mtADN	ADN mitocondrial
mTOR	Blanco de rapamicina de mamíferos
NAD ⁺	Nicotinamida adenin dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenin dinucleótido reducido
nADN	ADN nuclear
NADP ⁺	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido
NO	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PGC1- α	Coactivador del receptor activador de proliferación del peroxisoma
Q	Coenzima Q - Ubiquinona
QH ₂	Ubiquinol
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RA	Crías restringidas estudiadas a temperatura ambiente
RF	Crías restringidas con tratamiento de frío
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPM	Restricción proteínica materna
Sirt1	Sirtuina 1
SM	Síndrome Metabólico
SNS	Sistema nervioso simpático
SOD	Superóxido dismutasa

SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
STE	Sistema de transporte de electrones
TRH	Hormona liberadora de tirotrófina
TSH	Hormona estimulante de tiroides
UCP	Proteína desacoplante
UPL	Biblioteca de sondas universales (Universal probe library)
WAT	Tejido adiposo blanco
XO	Xantina oxidasa
$\Delta\mu\text{M}$	Cambio en la concentración micromolar
$\Delta\mu\text{H}^+$	Potencial de membrana

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estructura y función de las mitocondrias

Las mitocondrias son organelos conformados por dos bicapas lipídicas. La membrana externa (MEM) delimita el espacio intermembranal y se caracteriza por contener una gran cantidad de porinas, que le permiten ser permeable a sustancias de hasta 10 kDa, mientras que la membrana interna (MIM) delimita la matriz mitocondrial y es poco permeable (FIGURA 1). La MIM se pliega para formar las crestas mitocondriales, en las cuales están embebidos los complejos del sistema de transporte de electrones, la ATP sintasa y proteínas de transporte. La matriz mitocondrial contiene una mezcla concentrada de enzimas involucradas en la degradación de piruvato, ácidos grasos y aminoácidos, entre las que destacan las enzimas que forman parte del ciclo de los ácidos tricarbóxicos¹. La mitocondria posee su propio ADN, el cual, al igual que los ADN bacterianos, tiene una estructura bicatenaria, circular, sin extremos. En los seres humanos tiene un tamaño de 16,569 pares de bases y contiene 37 genes: dos ARN ribosómicos, 22 ARN de transferencia y 13 proteínas que participan en la fosforilación oxidativa (FIGURA 1). Estos organelos se encuentran en todas las células de los mamíferos, excepto en los eritrocitos maduros. Una célula somática puede contener entre 200 y 2000 mitocondrias, dependiendo su actividad metabólica. La mayor cantidad de mitocondrias se encuentra en las células más activas metabólicamente, como el músculo, el hígado y el cerebro². Así mismo, la morfología y tamaño de las mitocondrias también varía entre los diferentes tipos celulares, adoptando una forma esférica, alargada o filamentosa de acuerdo con su función de origen y a su estado metabólico³.

Las mitocondrias se encargan de más del 90% de la producción de la energía celular⁴. Esta energía se genera a medida que pasan los electrones desde moléculas donantes a receptores con mayor potencial redox a través de diversos complejos de proteínas. El flujo de electrones permite el bombeo de protones desde la matriz hacia el espacio inter-membranal, generando una diferencia de potencial a través de la membrana interna. La energía potencial resultante se transfiere al ADP o se disipa en forma de calor, a medida que los protones se filtran de regreso hacia la matriz⁵.

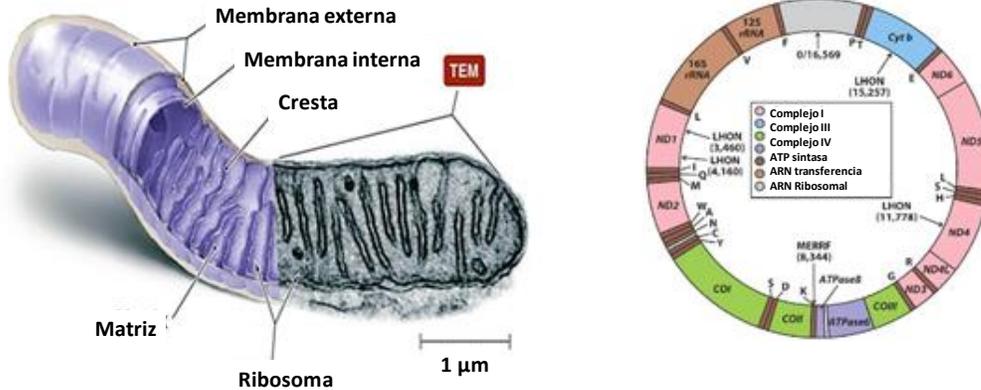


Figura 1. Representación esquemática de la mitocondria (izquierda) y del DNA mitocondrial (derecha).

En la FIGURA 2 se muestra un diagrama del sistema de transporte de electrones (STE) mitocondrial. Los electrones entran al STE por dos sitios principales que son convergentes, en el sentido de que ambos resultan en la reducción de la ubiquinona (coenzima Q). Los electrones donados por NADH entran en el complejo I (NADH ubiquinona reductasa), mientras que la conversión de succinato en fumarato genera electrones para el complejo II (succinato deshidrogenasa). La ubiquinona reducida o ubiquinol (QH₂) es una molécula móvil que media el flujo de electrones desde los sitios de entrada hacia el complejo III (ubiquinol-citocromo c reductasa), donde es oxidada nuevamente. Los electrones se transfieren posteriormente a otro intermediario móvil, el citocromo c (Cyt c), que dirige el flujo al complejo IV (citocromo c oxidasa). En el complejo IV los electrones finalmente son donados al oxígeno, para la formación de agua. En los complejos I, III y IV la transferencia de electrones se encuentra acoplada a la translocación de H⁺ desde la matriz hacia el espacio intermembranal, contribuyendo a la generación del gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu\text{H}^+$) necesario para la síntesis de ATP^{6,7}. La ATP sintasa, cataliza la formación de ATP a partir de ADP y Pi. Este complejo enzimático consiste en una porción F₀-ATPasa anclada en la membrana interna mitocondrial y una porción F₁-ATPasa, que es una proteína periférica de membrana. La porción F₀ tiene un poro protónico a través del cual los H⁺ bombeados al espacio intermembranal pueden regresar a la matriz. El paso de estos H⁺ a través de F₀ promueve el giro de la porción F₁ y con ello, la síntesis de ATP. Por cada 3 H⁺ que pasan a través del poro en F₀ las subunidades α y β de F₁ realizan un giro, permitiendo la síntesis de una molécula de ATP. De esta manera se acopla el transporte de electrones con la fosforilación oxidativa (síntesis de ATP), utilizando la fuerza protón motriz del espacio intermembranal⁸.

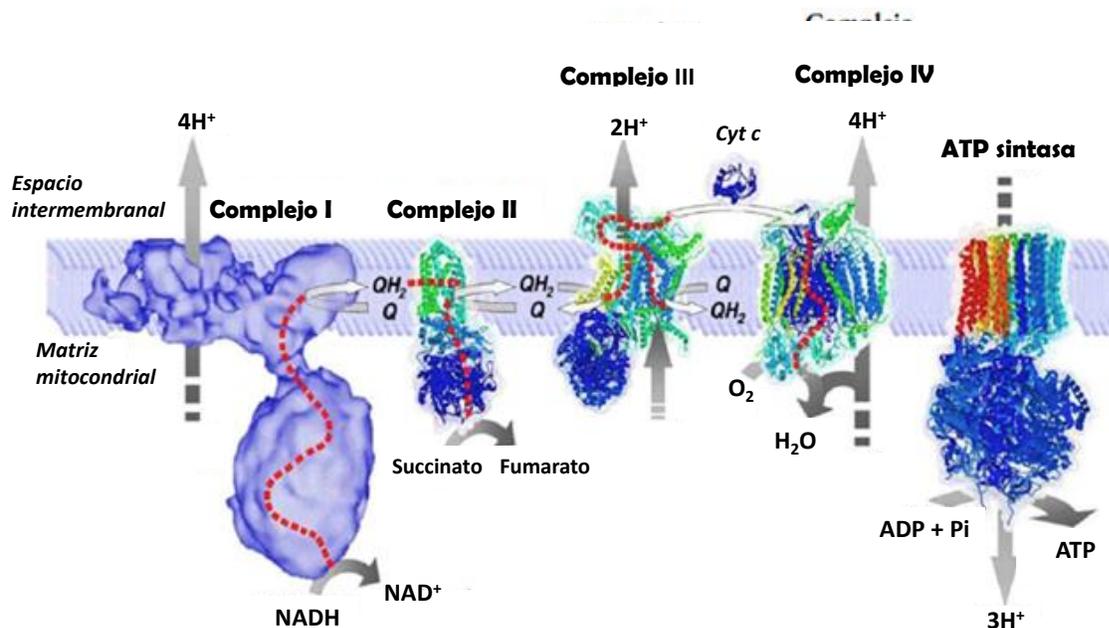


Figura 2. Sistema de transporte de electrones mitocondrial.

1.1.1. Consumo de oxígeno

El flujo de electrones, y por ende la velocidad de consumo de oxígeno, está en función de la disponibilidad de moléculas donadoras de electrones y de los niveles de ADP. Cuando la concentración de ADP incrementa como consecuencia del agotamiento de ATP, la velocidad de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) debe aumentar para lograr restablecer los niveles de ATP. Dado que la OXPHOS está acoplada al STE, el incremento en la velocidad de la OXPHOS se refleja en un aumento del flujo de electrones a través de los complejos respiratorios y, por lo tanto, un incremento del consumo de oxígeno. La regulación de la velocidad de la OXPHOS por los niveles de ADP se denomina control respiratorio⁹.

El control respiratorio puede evaluarse *in vitro* en mitocondrias aisladas de tejido al emplear un electrodo sensible a las concentraciones de oxígeno y sustratos que generen moléculas donadoras específicas para los complejos I y II. Para el complejo I suelen emplearse como sustratos malato y glutamato, que por transporte a través de la lanzadera malato aspartato y su posterior reducción generan NADH. El piruvato es otro de los sustratos que puede usarse, ya que genera NADH al ser reducido por la enzima piruvato deshidrogenasa. El succinato puede adicionarse como molécula donadora del complejo II, ya que es capaz de ingresar a la mitocondria por antitransporte con fumarato.

La adición secuencial de sustratos y ADP permite determinar la respuesta mitocondrial en diferentes condiciones. Para este tipo de estudios se han definido cinco diferentes velocidades de consumo de oxígeno o estados respiratorios. (TABLA 1, FIGURA 3)

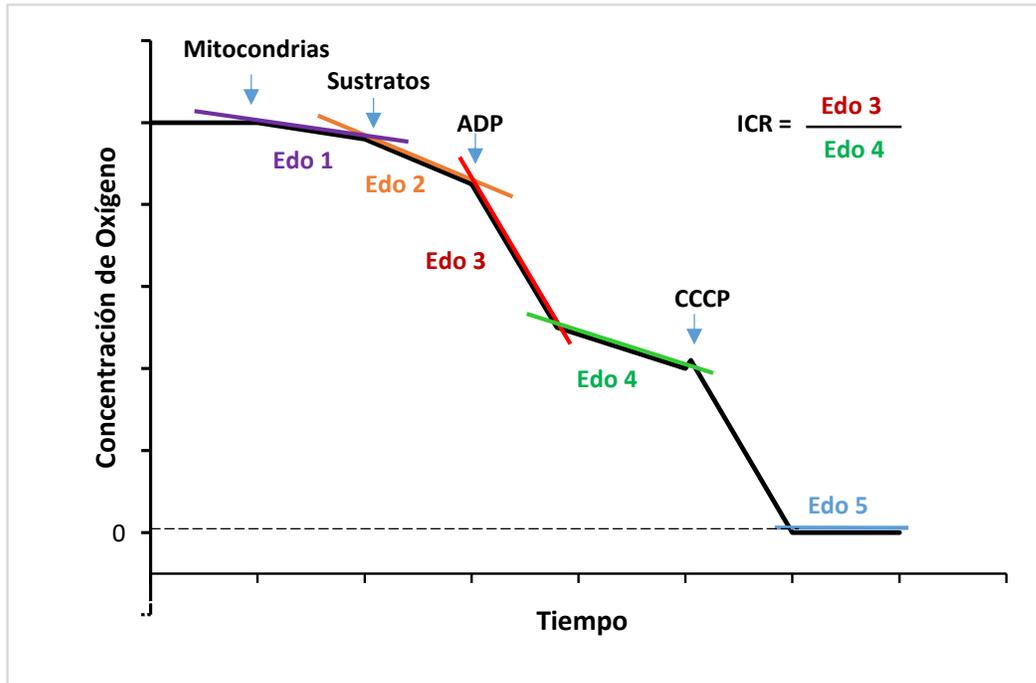


Figura 3. Estados respiratorios de mitocondrias aisladas EDO1. Respiración mitocondrial basal, EDO2. Respiración mitocondrial en presencia de Pi y un sustrato de oxidación como succinato o una mezcla glutamato/malato, EDO3. Respiración en presencia de ADP, Pi y sustrato de oxidación EDO4. Respiración cuando el ADP se agota o en presencia de un inhibidor de la ATP sintasa. La adición de CCCP representa la respiración máxima. EDO5. Respiración anaeróbica en ausencia de oxígeno.

El estado 1 representa la respiración mitocondrial basal, sin adición de sustratos ni ADP. El estado 2 representa la respiración mitocondrial en presencia de sustratos de oxidación (succinato o malato-glutamato). El estado 3 (EDO3) corresponde a la respiración mitocondrial en presencia de ADP, sustratos de oxidación y Pi. En este estado, la adición de ADP al medio estimula la síntesis de ATP e incrementa la velocidad del transporte de electrones, por lo que incrementa el consumo de oxígeno. El estado 4 (EDO4) comienza cuando todo el ADP añadido ha sido fosforilado, lo que provoca una disminución en el consumo de oxígeno. Finalmente, el estado 5 se ha definido como la respiración anaeróbica después del agotamiento del oxígeno⁹

La relación entre los estados 3 y 4 de respiración [EDO3/EDO4], se denomina índice de control respiratorio (ICR). Este índice es muy útil para poder estimar la integridad mitocondrial. Un ICR

elevado implica que las mitocondrias tienen una alta capacidad para la oxidación del sustrato, alto recambio de ATP y una baja fuga de protones. Los valores bajos de ICR indican mitocondrias desacopladas o dañadas¹⁰.

Tabla 1. Estados respiratorios de mitocondrias aisladas. (Modificado de Luis, 2014)

Estado respiratorio	O ₂	Nivel de sustrato	Nivel de ADP	Velocidad de respiración	Factor determinante de la actividad respiratoria
1	Disponible	Bajo	Bajo	Lenta	ADP, sustrato
2	Disponible	Alto	Muy bajo	Lenta	ADP
3	Disponible	Alto	Alto	Rápida	Cadena respiratoria
4	Disponible	Alto	Bajo	Lenta	ADP
5	No disponible	Alto	Alto	Nula	Oxígeno

El índice de control respiratorio mitocondrial depende de numerosos factores, un cambio en casi cualquier aspecto de la fosforilación oxidativa cambiará el ICR. El ICR depende de las velocidades del EDO3 y el EDO4. El EDO3 está controlado exclusivamente por la oxidación del sustrato y es útil para detectar la disfunción de los componentes del STE, translocasas del sustrato o deshidrogenasas. El estado 4 está controlado predominantemente por la fuga de protones y por la presencia de ATPasas contaminantes que reciclan el ATP sintetizado como ADP (y aproximadamente el 10% por la oxidación del sustrato)¹⁰.

1.1.2. Generación de potencial de membrana

El potencial de membrana mitocondrial se genera mediante el bombeo de protones en los complejos I, III y IV (FIGURA 2) y se consume por la transferencia de protones en la dirección opuesta, en primera instancia a través de la ATP sintasa, pero también por un fenómeno denominado fuga de protones, que hace referencia al reingreso de protones a la matriz por mecanismos diferentes a la ATP sintasa. Aunque este proceso puede ocurrir de formas menos definidas, aparentemente independientes de enzimas o vehículos conocidos, gran parte de la fuga de protones es debida a la actividad catalítica de moléculas específicas denominadas proteínas de desacoplamiento (UCP). En mamíferos, se han descrito tres tipos de UCPs. La UCP1, inicialmente denominada "termogenina", fue la primera de ellas descrita y es responsable de

convertir el potencial de membrana mitocondrial en producción de calor en el tejido adiposo pardo (BAT)¹¹. La UCP2, la forma más ubicua, se expresa en muchos tejidos, principalmente en hígado, riñón, páncreas y pulmón. La UCP3 es la forma principal presente en el músculo esquelético y el corazón. Las funciones probables de UCP2 y UCP3 no parecen incluir la termogénesis. Por el contrario, implican la mitigación de la generación de ROS, la exportación de ácidos grasos desde las mitocondrias (UCP3) y la regulación de la liberación de insulina (UCP2)¹².

El potencial de membrana mitocondrial puede evaluarse cuantitativamente al medir la concentración de cationes dirigidos a la mitocondria, como el metiltrifenilfosfonio (TPMP) o tetrafenilfosfonio (TPP) dentro y fuera de la matriz mitocondrial, y posteriormente calcular el potencial utilizando la ecuación de Nernst. El potencial de membrana también puede estimarse empleando compuestos fluorescentes sensibles al potencial y monitorear los cambios en la fluorescencia al añadir diferentes sustratos⁷.

1.1.3. Producción de ATP

La producción de ATP depende principalmente de la generación de fuerza protón motriz por el bombeo de protones al espacio intermembranal, pero también en defectos en la ATP sintasa. Existen dos tipos de defectos aislados que se asocian a alteraciones de la biogénesis de la ATP sintasa: defectos cualitativos, cuando la enzima es modificada estructuralmente y no funciona adecuadamente, y defectos cuantitativos cuando disminuye la cantidad de enzima presente. En ambos casos, la provisión de energía celular se ve afectada, y el uso disminuido de $\Delta\mu\text{H}^+$ mitocondrial puede resultar nocivo para la célula¹³.

1.1.4. Generación de especies reactivas de oxígeno y respuesta antioxidante

Como se mencionó anteriormente, los electrones que son transportados en el STE suelen ser entregados al oxígeno molecular en el complejo IV; sin embargo, una pequeña porción de estos electrones se pierde durante su transporte y conlleva a la formación de especies de oxígeno parcialmente reducido, denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son moléculas con gran capacidad de reacción debido a su alta inestabilidad química, que pueden oxidar fácilmente a macromoléculas lipídicas, proteínas y ácidos nucleicos. Las ROS de mayor importancia biológica son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo.

En condiciones normales (no patológicas) del 2 al 4% del oxígeno utilizado por la mitocondria genera anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), por la actividad de los complejos I y III, principalmente, y por otras enzimas como las deshidrogenasas mitocondriales o el complejo II, en menor grado¹⁴. El anión superóxido no es considerado una especie particularmente destructiva; sin embargo, da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de radical hidroxilo (OH^{\bullet}) mediante reacciones catalizadas por enzimas o por hierro y cobre. El radical hidroxilo es la principal molécula causante de daño celular. Además de las ROS, la mitocondria produce especies reactivas del nitrógeno (NOS), entre ellas el óxido nítrico (NO). El NO es el producto de la sintasa de óxido nítrico mitocondrial sensible a Ca^{2+} , el cual es capaz de incrementar la producción de anión superóxido por el STE, al inducir daño a los grupos hemo en los complejos respiratorios¹⁵.

Para combatir la producción de ROS, la mitocondria cuenta con sistemas antioxidantes endógenos. La concentración de superóxido es reducida por medio de la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD2), mientras que los peróxidos mitocondriales se eliminan por medio de la catalasa, la glutatión-peroxidasa y las peroxirredoxinas. Además, algunas coenzimas y metabolitos como la ubiquinona, el ácido lipoico, el glutatión y la vitamina E pueden servir como antioxidantes de bajo peso molecular¹⁶.

Aunque las ROS generadas pueden ser destructivas, la presencia de estas moléculas resulta necesaria debido a que también cumplen con funciones metabólicas, principalmente de señalización celular. Por tal razón, debe existir un equilibrio entre la producción y eliminación de ROS. Cuando dicho equilibrio es alterado en favor de la generación de ROS, se dice que la célula se encuentra en un estado de estrés oxidante. La principal consecuencia del estrés oxidante es la oxidación de lípidos, proteínas y del ADN, que genera alteraciones en el metabolismo celular como ruptura del ADN, mutaciones, acumulación de agregados proteicos, desregulación en la homeostasis del calcio y disfunción mitocondrial, conduciendo a muerte celular por apoptosis y/o necrosis¹⁷.

1.1.5. Regulación de la función mitocondrial

Las mitocondrias son organelos con una regulación constante, ya que deben responder de manera adecuada a los diferentes estados y demandas energéticas. Por ejemplo, cuando la relación AMP/ATP incrementa debido a una baja disponibilidad de nutrientes (i.e. ayuno) o a una alta demanda energética (i.e. ejercicio intenso) se encienden mecanismos mediante los cuales se incrementa la concentración de enzimas involucradas en vías catabólicas, la cantidad de mitocondrias (biogénesis mitocondrial) y la eficiencia de la OXPHOS (formación de supercomplejos e incremento de las crestas mitocondriales). Esta respuesta es iniciada por acción de sensores energéticos que conectan los niveles de energía con efectores celulares como cinasas y factores de transcripción. Entre ellos destacan la cinasa dependiente de AMP (AMPK) y la sirtuina 1 deacetilasa dependiente de NAD⁺ (SIRT1), que se activan por altos niveles de AMP y NAD⁺, respectivamente, e inician una cascada de señalización mediada por fosforilaciones y desacetilaciones^{18, 19}. Uno de los blancos de estas vías de señalización, es el coactivador del receptor activador de proliferación del peroxisoma (PGC-1 α), que está encargado de dirigir la transcripción de proteínas mitocondriales y la biogénesis mitocondrial^{20, 21}.

La transcripción de proteínas mitocondriales y la biogénesis mitocondrial también son reguladas por el sensor maestro de nutrientes y energía, el complejo mTOR (blanco de rapamicina en mamíferos), que censa específicamente la disponibilidad de aminoácidos (AA) e integra esta información con el estado energético celular. mTOR es necesario para el mantenimiento de la función oxidativa mitocondrial, ya que modula la expresión génica de reguladores transcripcionales mitocondriales como PGC-1 α , el receptor alfa relacionado con estrógenos y factores respiratorios nucleares²². La escasez de AA y energía inactivan al complejo mTOR, lo que resulta en una disminución en la expresión génica mitocondrial y en el consumo de oxígeno.²³

Además de la regulación por sensores energéticos, las mitocondrias de varios tipos celulares poseen receptores para hormonas glucocorticoides, estrógenos, andrógenos y hormonas tiroideas²⁴. Las hormonas tiroideas, sintetizadas en la glándula tiroides, juega un papel clave en la regulación de la función mitocondrial y el gasto energético. Las hormonas tiroideas son liberadas ante estímulos como el frío, viajan por el torrente sanguíneo y se unen a receptores intracelulares. Estos receptores actúan como factores de transcripción tanto del DNA nuclear (nDNA) como del

DNA mitocondrial (mtDNA). La acción de las hormonas tiroideas conduce a cambios en la morfología, la cantidad y la composición enzimática de las mitocondrias²⁵.

1.2. Efecto de la nutrición materna en la programación de la salud de la vida adulta

El crecimiento y el desarrollo fetales están controlados por dos factores principales: factores genéticos, determinados por el genoma fetal, y factores ambientales, como las condiciones nutrimentales, hormonales y metabólicas *in-utero* que alteran la expresión del genoma fetal.

Es bien sabido que el crecimiento y desarrollo del feto son regulados en una ruta predeterminada por el genoma, en el cual se activan e inactivan genes específicos en etapas determinadas del desarrollo fetal, y que los factores ambientales influyen sobre este patrón normal de expresión genética, dando lugar al fenotipo más adecuado para las condiciones del medio²⁶. Sin embargo, las modificaciones al fenotipo en respuesta a un estímulo aplicado en un periodo crítico o sensible del desarrollo tienen efectos a largo plazo o de por vida sobre la estructura o función del organismo. Este proceso se conoce como programación²⁷.

La programación del fenotipo ahorrador es uno de los temas que más ha atraído la atención de la comunidad científica por la evidencia que lo liga a enfermedades metabólicas de la vida adulta. Este fenotipo se desarrolla cuando un organismo es sometido a una restricción nutrimental o energética en etapas tempranas del desarrollo y, en vías de sobrevivir, disminuye su crecimiento y ajusta su metabolismo para maximizar el aprovechamiento de sustratos y energía. La reducción del crecimiento que experimenta es un proceso dirigido, en el cual, los órganos esenciales como el cerebro y los pulmones son protegidos relativamente de la reducción del crecimiento a expensas de órganos viscerales como el hígado, el páncreas, el músculo y los riñones²⁸. El resultado final es una cría con peso corporal reducido, órganos viscerales pequeños y un metabolismo conservativo. Estas características favorecen a aquellos individuos cuyo ambiente postnatal permanece pobre en nutrientes; sin embargo, en las condiciones de abundancia calórica de las sociedades occidentales modernas, esta ventaja se torna en una desventaja y conduce al desarrollo de síndrome metabólico (SM) y enfermedades metabólicas no transmisibles como la diabetes tipo 2 (DT2) y la enfermedad cardiovascular (ECV)²⁹. De ahí, que la Organización mundial de la salud (OMS) haya establecido que el bajo peso al nacer es el principal factor individual de riesgo para el desarrollo de enfermedades en la vida adulta³⁰.

La primera evidencia convincente de que la malnutrición fetal (definida como la carencia, exceso o desequilibrio en el suministro de nutrimentos) podría tener una influencia a largo plazo en la salud humana proviene del seguimiento de adultos que estaban en útero durante el invierno hambriento holandés (1944). En este periodo, los nazis bloquearon el racionamiento de alimentos a Holanda occidental en represalia por las huelgas de los trabajadores de los ferrocarriles, lo cual resultó en hambre generalizada durante un período de 6 meses. En el pico máximo de la hambruna, la ración de alimentos para un adulto era de sólo 400-800 kcal por día, cuando la ingesta recomendada para un adulto es aproximadamente cinco veces mayor. En esta población se encontró que las personas que cursaban por la gestación tardía en ese momento, presentaron mayores índices de obesidad e intolerancia a la glucosa a la edad de 40 años, mientras que la exposición al hambre durante la gestación temprana dio como resultado mayor prevalencia de hipertensión^{31, 32}. Con base en estas observaciones, la ciencia del origen fetal de las enfermedades comenzó a atraer interés y 20 años después, el equipo de Barker relacionó el bajo peso al nacer con un mayor riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular³³. Posteriormente, una gran cantidad de estudios de cohorte han vinculado el bajo peso al nacer con otros efectos adversos en la vida posterior. Estos incluyen la reducción del "capital humano" (menor estatura, menor masa corporal magra, menor capacidad cognitiva y menor rendimiento laboral³⁴), un aumento de los factores de riesgo a enfermedad (presión arterial alta³⁵, mayor adiposidad³⁶, resistencia a la insulina, menor tolerancia a la glucosa³⁶, y disminución de la función renal³⁷ e inmunológica³⁸), enfermedades metabólicas (DT2, enfermedad coronaria y enfermedad renal crónica) y aumento de la mortalidad en general.³⁹

1.2.1. Modelos animales de IUGR y el modelo de restricción proteínica materna

Los modelos animales de restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) representan un recurso invaluable para el estudio de las adaptaciones metabólicas y endocrinas del feto a la nutrición deficiente, su base molecular, y su impacto a largo plazo. Para este fin, se han empleado mamíferos grandes, como ovejas, cerdos y primates no humanos. Sin embargo, la mayoría de los estudios en animales utilizan modelos de roedores debido a que el periodo de gestación y el tiempo de vida de estas especies son más cortos. En ellos, se ha utilizado una variedad de manipulaciones nutrimentales, intervenciones quirúrgicas y tratamientos hormonales para desafiar al feto en crecimiento y al recién nacido⁴⁰ (TABLA 1.).

Tabla 1. Modelos experimentales de restricción fetal del crecimiento (Modificado de Vuguin, 2007)⁴⁰

Tipo	Modelo	Características
Nutrimental	Restricción proteínica materna	Alimentación de madres con una dieta isocalórica con un 4-12% de proteína (vs 20% de controles) durante la gestación y/o la lactancia
	Restricción calórica materna	Restricción del 30-70% del alimento ad libitum durante la gestación y/o la lactancia
	Deficiencia de Hierro	Alimentación de madres con una dieta baja en hierro 4 semanas antes del apareamiento y en diferentes periodos de la gestación
	Sobrenutrición de madres adolescentes	Alimentación de madres adolescentes con el doble de su requerimiento energético durante la gestación y/o la lactancia
Quirúrgica	Ligamiento uterino	Bloqueo temporal de una o de las dos arterias uterinas para limitar el flujo de nutrimentos a las crías por medio de una sutura
	Embolización uteroplacentaria	Obstrucción del flujo de nutrimentos por inyección de microesferas dentro del lecho vascular placentario

La manipulación nutrimental durante el embarazo es una técnica que se ha utilizado por más de 30 años para producir retraso en el crecimiento de la descendencia. Este tipo de intervención imita el reto que enfrentan los países subdesarrollados, que presentan altos índices de inseguridad alimentaria y prevalencia elevada de insuficiencia ponderal al nacimiento y durante la infancia. En los hogares donde se vive inseguridad alimentaria, la nutrición puede ser desequilibrada (deficiente en algún macro- o micronutriente) o insuficiente (restricción energética). El desbalance de nutrimentos en la dieta es una condición más común que la restricción calórica, ya que la alimentación es una necesidad primaria y si el individuo tiene recursos económicos limitados, debe recurrir a alternativas que le permitan satisfacer dichas necesidades y no padecer hambre. Por tal razón, la alimentación de los individuos más pobres está orientada a alimentos con alto contenido energético y bajo costo como pan, tortillas y cereales, frutas y hortalizas, y

aceites y grasas vegetales comestibles, con la eliminación o reducción en el consumo de carnes, leche, derivados de leche y huevo⁴¹. Este tipo de dieta se caracteriza por ser alta en carbohidratos y grasas, pero deficiente en proteínas y micronutrientes⁴².

El modelo de restricción proteínica materna (RPM) es el mejor caracterizado de los modelos de restricción del crecimiento intrauterino. En este modelo, se alimenta a las madres con dietas isocalóricas bajas en proteínas durante la gestación y/o la lactancia, y las crías reciben el mismo alimento que los grupos control a partir del destete. De acuerdo con el Instituto Americano de Nutrición, el contenido de proteína recomendado en la dieta para una rata gestante y en desarrollo es del 20 % (p/p). Sin embargo, para estudiar los efectos de la deficiencia proteínica, se han empleado dietas isocalóricas con diferentes porcentajes de reducción, entre ellas: 12%, 10%, 8%, 6% y 4% de proteína⁴⁰.

Diversos estudios coinciden en que las crías de ratas alimentadas con dietas bajas en proteínas presentan un retardo del crecimiento y cambios permanentes y selectivos en el crecimiento de los órganos.⁴³ El cerebro presenta el peso adecuado para la edad, pero el páncreas, el hígado y los riñones son más pequeños que los de los animales control. Si la restricción se mantiene durante la lactancia, el retraso en el crecimiento se vuelve permanente. En cambio, si en este periodo se normaliza la nutrición, las crías experimentan una fase de crecimiento compensatorio (*catch-up growth*)⁴⁴.

Así mismo, se ha descrito que la RPM en la rata compromete las adaptaciones cardiovasculares maternas al embarazo y conduce a hipertensión y disfunción endotelial en la descendencia. La hipertensión en las crías se presenta desde el destete⁴⁵ y persiste a lo largo de la vida adulta⁴⁶, mientras que la disfunción endotelial, evidenciada por la alteración en la vasodilatación inducida por acetilcolina y la disminución en la expresión de la sintasa de óxido nítrico (NO), se ha observado en ratas de 4 meses y de un año de edad⁴⁷.

La RPM también modifica los patrones de alimentación y el gasto energético de la descendencia. Las crías de un año con RPM durante la gestación y la lactancia presentan hiperfagia a pesar de su peso corporal reducido, lo que sugiere un aumento del gasto energético total. A los 4 meses de edad, las crías presentan menores concentraciones de leptina en sangre y, al año de vida, tienen menor sensibilidad a dicha hormona⁴³. La resistencia a la leptina, además de hiperfagia, produce

reducción de la cantidad de minerales óseos y de la densidad ósea de estos animales.^{43, 48}
(FIGURA 4.)

Otros desórdenes metabólicos han sido reportados en las crías adultas de ratas expuestas a RPM en la gestación y la lactancia, como esteatosis hepática y alteraciones en el metabolismo de lípidos. A los 6 meses de edad, las crías muestran una reducción de las concentraciones de colesterol plasmático, colesterol HDL y triglicéridos en comparación con los controles, pero a la edad de 18 meses sufren hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia⁴⁹.

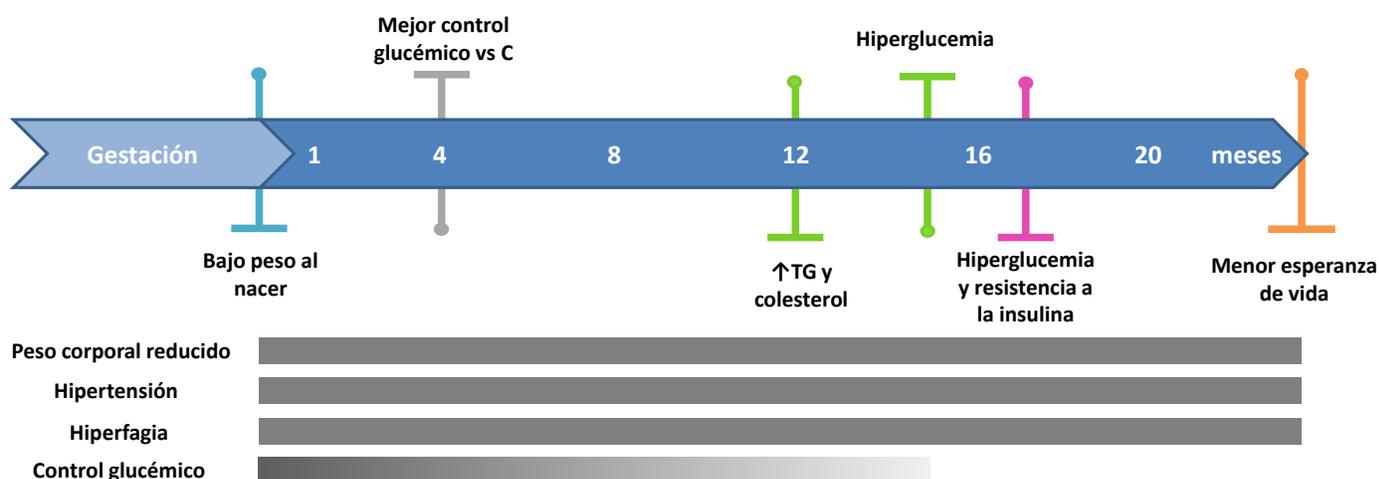


Figura 4. Línea de la vida. Fenotipo de las crías machos de madres alimentadas con una dieta baja en proteínas en la gestación y la lactancia. En la parte superior, se marcan algunos acontecimientos importantes en el fenotipo de las crías. En la parte inferior, se describe el comportamiento de ciertas características a lo largo de la vida. Los bloques continuos indican que la condición es constante en el tiempo marcado y los bloques degradados indican la pérdida del atributo con el tiempo. Abreviaturas: C: Animales control, TG: Triglicéridos (17,21).

1.2.3. Programación de la función renal

Se ha informado en una gran cantidad de estudios que la RPM durante el embarazo en ratas tiene un impacto sobre la presión sanguínea en la descendencia. La hipertensión observada en tales animales se ha relacionado en parte con la programación del desarrollo renal. En el riñón, la remodelación en respuesta a una dieta baja en proteínas durante la gestación provoca una reducción del 30-40% del número de nefronas, a pesar de no producir la reducción del peso relativo del órgano⁵⁰. La disminución del número de unidades funcionales, manteniendo la masa tisular normal, sugiere que la malnutrición tiene un efecto importante en la diferenciación de las

estructuras especializadas. La alteración de la programación del número de nefronas se ha comparado con cuadros de deficiencia de nefronas severa como la oligomeganefronia o con la condición de personas con un solo riñón, ya que conducen al desarrollo de hipertensión, proteinuria progresiva y pérdida de la función renal con el tiempo^{51, 52}.

Un indicador importante de los cambios que conducen a enfermedad renal es la alteración del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) en la descendencia. Este sistema es una cascada hormonal que participa en el control homeostático de la presión arterial, la perfusión tisular y el volumen extracelular. El SRAA se activa cuando hay pérdida de volumen sanguíneo o una caída en la presión sanguínea, como una medida compensatoria. Se ha informado que el SRAA se suprime en crías recién nacidas de madres restringidas⁵³, pero tiene una mayor expresión cuando esas crías son adultas⁵⁴. Se ha demostrado que la hiperactivación del SRAA contribuye a la hipertensión y la enfermedad renal posterior. Existen reportes de actividad elevada de la enzima convertidora de angiotensina y el aumento de la expresión renal del receptor de angiotensina II en la descendencia expuesta a RPM^{54, 55} y que el tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y antagonistas del receptor de angiotensina II durante el período de lactancia parece revertir el efecto de programación de la dieta materna⁵⁶. La causa precisa del desbalance de la actividad de los componentes del SRAA no se ha elucidado, pero se ha demostrado que el aumento del estrés oxidante renal regula positivamente la expresión de los receptores de la angiotensina II (AT1R), dirigiendo a la estimulación de la NA-K-ATPasa y el intercambiador NA^+/H^+ 3 en los túbulos proximales, contribuyendo a la retención de sodio y al aumento de la presión⁵⁷.

1.2.4. Programación de la función hepática

El hígado de crías de madres alimentadas con una dieta baja en proteínas durante la gestación y la lactancia tiene menor peso y menor vasculatura que el de las crías control al nacer. Además, presenta mayor acumulación de lípidos, misma que puede detectarse desde la etapa fetal⁵⁸. Los animales adultos con malnutrición intrauterina presentan una mayor susceptibilidad para el desarrollo de "hígado graso". El desarrollo de hígado graso en estos animales es independiente del aumento paralelo de la adiposidad⁵⁹. Los mecanismos subyacentes que contribuyen a la desregulación y acumulación de lípidos en el hígado incluyen aumento de la lipogénesis *de novo*, disminución de la oxidación de AG, aumento del transporte de AG, disminución de la liberación

de AG y / o resistencia a la insulina hepática⁶⁰. La grasa hepática está altamente correlacionada con todos los componentes del SM. Se ha reportado específicamente que el aumento en la concentración de lípidos conlleva al aumento del estrés oxidante y a resistencia a la insulina, con lo que puede aumentar el riesgo de padecer DT2^{61, 62}.

Por otro lado, el hígado juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa sanguínea mediante el control de la producción de glucosa hepática. En las ratas con RPM se ha observado que existe un decremento en la actividad de la enzima glucolítica glucocinasa y un incremento en la actividad de la enzima gluconeogénica fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK) en las crías de 11 meses de edad⁶³. Lo anterior sugiere que la respuesta adaptativa a la deficiencia proteínica favorece la formación de glucosa más que su degradación. Así mismo, se ha descrito la alteración de la respuesta del hígado al glucagón y a la insulina en las crías de 4 meses de edad. En ellas, la liberación hepática de glucosa en respuesta al glucagón es mayor que en los animales control, y la supresión de la liberación del azúcar en presencia de la insulina es baja, aun cuando la expresión de su receptor es tres veces mayor⁶⁴. Esta desregulación de la liberación de glucosa favorece la hiperglicemia descrita en las crías del modelo de RPM y ha sido descrita también en modelos animales de DT2⁶⁵.

1.2.5. Páncreas

En el páncreas endocrino de ratas expuestas a dietas bajas en proteínas en la gestación y la lactancia se ha observado una disminución del número y tamaño de unidades funcionales (islotos de Langerhans). Se ha reportado que esto ocurre tanto por reducción en la proliferación de las células β como por aumento en la apoptosis de las mismas^{66, 67}. Los islotos además de ser más pequeños, tienen un suministro vascular reducido⁶⁸.

Usando el modelo de RPM, se ha demostrado que la restricción proteínica en el útero impacta la expresión del gen Pdx-1 (homeobox-1 duodenal pancreático)⁶⁹. Durante el desarrollo, este factor de transcripción es crítico para la diferenciación del linaje de células endocrinas y la expansión de la masa de células β . Los cambios en la expresión de Pdx-1 se correlacionaron tanto con la masa de los islotos como con los niveles de secreción de insulina, lo que demuestra que la restricción proteínica resulta en perturbaciones de la estructura y función de los islotos⁷⁰.

En la etapa fetal se ha demostrado, mediante un análisis proteómico, que la malnutrición proteínica modifica la expresión de 70 proteínas pancreáticas. La mayor parte de ellas relacionadas con la transferencia de energía mitocondrial, la diferenciación y la defensa celular 71.

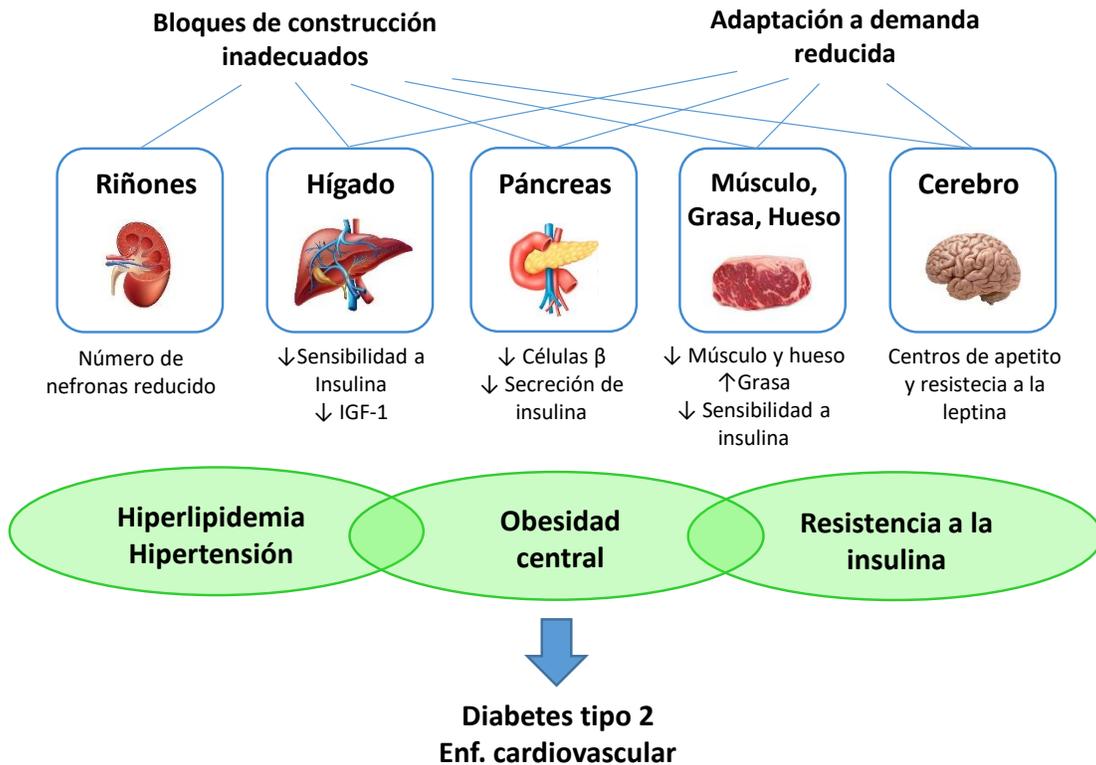


Figura 5. Programación de las enfermedades del adulto en respuesta a una dieta materna baja en proteínas. (Modificado de Fall CH, 2013)³⁹

1.4. La programación mitocondrial como un vínculo entre la malnutrición en la vida temprana y las alteraciones del metabolismo en la vida posterior

La restricción proteínica en edades tempranas del desarrollo tiene múltiples consecuencias; sin embargo, poco se conoce de los mecanismos moleculares involucrados. Recientemente, se ha postulado la programación de la mitocondria como uno de los mecanismos que enlaza la malnutrición durante el desarrollo temprano y la enfermedad del adulto. Esta propuesta está basada en que la mitocondria es el principal centro productor de energía y su función está regulada por los principales sensores de nutrientes y energía celulares, así como en observaciones efectuadas en humanos y modelos animales, donde se han demostrado

perturbaciones mitocondriales relacionadas a muchos de los estados patológicos ligados a la programación de la vida temprana (revisado a continuación).

1.4.2. Disfunción mitocondrial en el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2

Está bien establecido que la disfunción mitocondrial es un factor crítico y común asociado con casi todas las características del SM (hipertensión, resistencia a la insulina, hiperlipidemia), la esteatosis hepática y la DT2⁷²⁻⁷⁴. Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial, la reducción en los niveles de ATP, la inhibición del consumo de oxígeno mitocondrial y la biogénesis mitocondrial reducida son algunas de las deficiencias mitocondriales descritas en pacientes y modelos animales de dichos padecimientos⁷⁵.

En 1963, se describió por primera vez la interacción entre la disfunción mitocondrial y la resistencia a la insulina, una característica central del SM⁷⁶. Posteriormente, se describió también la alteración de la función mitocondrial en el músculo de adultos mayores con resistencia a la insulina, encontrándose disminución en la producción de ATP mitocondrial, reducción del RNA mitocondrial y menor actividad de los complejos respiratorios⁷⁷. Se ha planteado que esta relación se establece a través de defectos en la oxidación de ácidos grasos en hígado y músculo. La acumulación de ácidos grasos libres y de DAG específicamente lleva a la activación de la cinasa de serina PKC, que fosforila al sustrato del receptor de insulina (IRS) en residuos de serina, inhabilitando su función en la cascada de señalización de la insulina⁷⁵.

En la enfermedad del hígado graso no alcohólico, que es considerada por algunos autores como la representación hepática del SM⁷⁸, se han demostrado actividades disminuidas de complejos del STE e hiperacetilación de proteínas mitocondriales que contribuyen a la disfunción mitocondrial en el hígado⁷⁹.

La disfunción mitocondrial también se ha asociado con la disfunción endotelial, el desarrollo de hipertensión y la hipertrofia cardíaca. Se cree que los niveles elevados de ROS y RNS, así como las alteraciones en la dinámica mitocondrial son probablemente causa y consecuencia de la hipertensión⁸⁰.

Por otro lado, la disfunción mitocondrial está relacionada con la deficiencia en la secreción de insulina por las células β pancreáticas. La liberación de insulina dependiente del canal de potasio sensible a ATP (KATP), requiere del aumento de la relación ATP / ADP intracelular mediado

por las mitocondrias, que conduce secuencialmente al cierre del canal KATP, la despolarización de la membrana plasmática, la apertura de canales dependientes de voltaje Ca^{2+} , incremento del Ca^{2+} intracelular y la eventual activación de la exocitosis de los gránulos de insulina. Cualquier afectación en la producción de ATP puede generar defectos en la secreción de insulina⁸¹.

La secreción deficiente de insulina y la resistencia a la insulina en músculo e hígado forman parte de la etiología de la DT2. En pacientes con DT2, se han descrito defectos tanto en la función, como en el número, tamaño y morfología mitocondriales⁷⁵. En el músculo de estos individuos se ha encontrado menor expresión de la ATP sintasa, actividad disminuida del complejo I respiratorio y de la enzima citrato sintasa (reguladora del ciclo de Krebs), disminución de la eficiencia de la OXPHOS y mayor contenido de lípidos en los miocitos, con respecto a individuos sin diabetes. Además de la disminución del número y tamaño de los organelos y el incremento de la proporción de mitocondrias esféricas sobre mitocondrias alargadas^{72, 75}.

1.5. La respuesta fisiológica al frío

En animales homeotermos, los mecanismos termogénicos permiten la supervivencia ante la disminución de la temperatura ambiental⁸². En respuesta a un ambiente frío o una caída en la temperatura corporal central, las señales termosensibles se transmiten al hipotálamo. Estos eventos conducen a una respuesta rápida del sistema nervioso simpático (SNS) que provoca escalofríos y vasoconstricción. Simultáneamente, la activación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HPT) conduce a un aumento en la liberación de hormona liberadora de tirotrófina (TRH) en la sangre portal, así como a concentraciones séricas aumentadas de tirotrófina (TSH) y de hormona tiroidea. La estimulación por frío también aumenta las concentraciones plasmáticas de otras hormonas, entre ellas la norepinefrina, el glucagón, la hormona del crecimiento, la adrenocorticotropina (ACTH) y la insulina⁸². Estos cambios provocan una gama de respuestas conductuales, fisiológicas y metabólicas para prevenir la hipotermia, de las cuales la mejor descrita es el aumento de la termogénesis en el tejido adiposo pardo (BAT). El BAT es activado por el SNS durante la exposición al frío y produce calor como resultado de la expresión específica de la proteína desacoplante 1 (UCP-1)⁸³.

A pesar de que la producción de calor se debe principalmente a la termogénesis en BAT, las hormonas liberadas en respuesta al frío tienen efectos metabólicos en diferentes órganos y sistemas. La exposición al frío induce cambios metabólicos concertados en el hígado y el tejido

adiposo blanco (WAT) que se encargan de la movilización de sustratos para la termogénesis. Los ácidos grasos y la glucosa son los principales combustibles termogénicos, por lo que el estrés por frío da como resultado un aumento de la gluconeogénesis hepática y una mayor sensibilidad a la insulina⁸⁴.

Así, se ha reportado que la activación de BAT representa hasta el 40% del consumo total de oxígeno durante la exposición a bajas temperaturas, y que el resto del consumo energético ante este estímulo es debido al incremento en la actividad de otros órganos.

A nivel mitocondrial, se ha reportado que la respuesta a la exposición aguda al frío incluye la formación de crestas, la fusión y la biogénesis mitocondriales. Entre ellos, la formación de crestas mitocondriales y la fusión de mitocondrias, son eventos dependientes de activación, por lo que ocurren en tiempos cortos^{29, 30}. La biogénesis mitocondrial, por otro lado, es un proceso complejo, ya que implica la expresión coordinada de genes nucleares y mitocondriales, así como la importación y ensamblaje de las diferentes subunidades de los complejos respiratorios, por lo que requiere tiempos mayores^{85, 86}.

La formación de crestas mitocondriales es un evento que tiene como consecuencia el ensamblaje de supercomplejos mitocondriales y la dimerización de la ATP sintasa^{87, 88}. Esto permite que la circulación de electrones de un complejo al siguiente y la OXPHOS sean más eficientes⁸⁹.

Por otro lado, la fusión mitocondrial es una respuesta ante el estrés energético mediante la cual se forman grandes redes interconectadas de mitocondrias, capaces de producir energía con mayor eficiencia y las insuficiencias en la fusión mitocondrial se han relacionado con la fragmentación de la red mitocondrial. Las mitocondrias pequeñas, generadas por fragmentación de la red mitocondrial, producen menor cantidad de energía y se han descrito en pacientes con obesidad y DT2⁹⁰.

La exposición al frío estimula también la expresión de los componentes del sistema de transporte de electrones y la ATP sintasa para incrementar la eficiencia de la OXPHOS (biogénesis mitocondrial). La activación de AMPK y del complejo mTOR regulan positivamente este proceso^{85, 86}.

2. ANTECEDENTES

Se estudió la programación de la mitocondria previamente en un modelo de insuficiencia uteroplacentaria provocada por ligadura de la arteria uterina, en el que se encontró una reducción crónica del ATP proveniente de la fosforilación oxidativa en músculo. Esto compromete la externalización del transportador de glucosa 4 (GLUT4), el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno, contribuyendo a la resistencia a la insulina e hiperglucemia asociadas a DT2⁹¹. En relación con las células β fetales se observó que la deficiencia energética induce la disfunción mitocondrial, provocando un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la reducción de la producción de ATP y la disminución de los complejos I y III del STE, lo que conduce al deterioro progresivo de las células β asociado a DT2⁹².

En el modelo de restricción proteínica materna (RPM) se ha reportado una alteración en la expresión de genes mitocondriales tanto en músculo⁹³ como en las células β ⁹⁴ en crías recién nacidas y de 3 meses, respectivamente, y se ha descrito que la restricción proteínica al 8% solamente durante la gestación, provoca disminución en la producción de ATP y aumento en la producción de ROS en el páncreas de crías machos a la edad de 3 meses⁹⁵.

Se ha descrito que las mitocondrias renales de crías restringidas durante la gestación tienen capacidad respiratoria reducida por disminución del EDO4⁹⁶ y se cree que esto está relacionado con la disminución del número de mitocondrias, ya que hay evidencia de que, en un modelo de IUGR por ligamiento de arteria intrauterina, el número de copias de mtDNA renal disminuye progresivamente después del alumbramiento⁹⁷. En el hígado fetal de cerdos, se ha reportado que la RPM incrementa la expresión de genes codificados por el DNA mitocondrial⁹⁸ y, de forma consistente en ratas recién nacidas, se ha descrito la sobreexpresión de genes mitocondriales⁹³.

Así, la mayoría de los estudios efectuados sobre la programación de la mitocondria han tenido un enfoque genómico, por lo que existen pocas o nulas aproximaciones desde una perspectiva bioenergética. Además, se han realizado estudios que abordan el estado mitocondrial durante o al final de la gestación y en la adultez, pero no existe información acerca de lo que ocurre en la infancia y hasta la aparición de los diferentes padecimientos asociados a la malnutrición temprana.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe evidencia de que la malnutrición durante la vida fetal y postnatal temprana predispone a los individuos al desarrollo de SM, DT2 y ECV en la vida adulta, como fruto de la programación *in utero*, sin embargo, los mecanismos moleculares por los que esto ocurre no se conocen y menos aún el papel que tiene la mitocondria en el desarrollo de la enfermedad.

4. JUSTIFICACIÓN

La disfunción mitocondrial está ligada a enfermedades asociadas a la programación fetal, entre las que se incluyen: la hipertensión, el hígado graso y la DT2. El hecho de que las crías restringidas presenten hiperfagia y que a pesar de ello mantengan un peso corporal reducido es el principal indicador de las modificaciones efectuadas al metabolismo energético, sin embargo, hasta ahora no se conoce el efecto de la restricción proteínica materna en la función de las mitocondrias de las crías.

5. HIPÓTESIS

La capacidad de respuesta mitocondrial en las crías sometidas a condiciones de estrés es modificada por una restricción proteínica materna severa (6% de caseína) durante la gestación y la lactancia.

6. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la función mitocondrial en hígado y riñón en crías macho de ratas cuyas madres fueron sometidas a restricción proteínica durante la gestación y la lactancia.

Objetivos particulares

- Caracterizar bioquímica y somatométricamente a las crías machos en los días P28 y P180
- Evaluar la función mitocondrial en los días P28 y P180 postnatales en hígado y riñón de las crías macho en condiciones de estrés por frío
- Determinar la expresión de genes clave en el metabolismo energético: mTOR, AMPK y UCP-2 en hígado y riñón al final de la lactancia y en la adultez

7. METODOLOGÍA

7.1. Manejo de animales y grupos experimentales

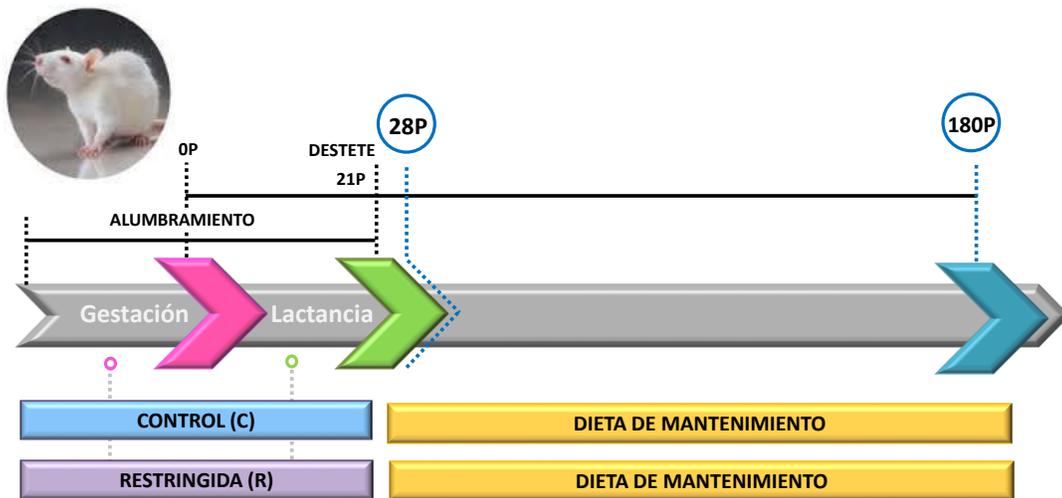
Ratas hembras nulíparas y machos de la cepa Wistar fueron obtenidas de ENVIGO (México) y se mantuvieron bajo condiciones controladas (22-24 °C y ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad) con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Química (CICUAL), UNAM (ANEXO 10.1).

Al alcanzar un peso de aproximadamente 220 g (~12 semanas), las ratas hembra se colocaron toda la noche con machos de la misma edad en proporción 3:1 y a la mañana siguiente se realizaron frotis vaginales para la identificación de espermatozoides. El día en que se confirmó la presencia de espermatozoides (día 0 de gestación), las ratas se transfirieron a cajas individuales y se seleccionaron al azar para conformar 2 grupos, los cuales se alimentaron *ad libitum* con una dieta control (20% de proteína, “C”) o una dieta isocalórica baja en proteínas (6% de proteína “R”) durante la gestación y la lactancia. Ambas dietas fueron adquiridas de ENVIGO, México (TD.91352 y TD.90016) y se diseñaron de forma que contenían la misma cantidad de lípidos, pero el contenido calórico de la dieta baja en proteínas fue ajustado por adición de carbohidratos. La composición de las dietas se describe en la TABLA 3 y la formulación se detalla en el ANEXO 10.2.

Tabla 3. Información nutrimental de las dietas empleadas

DIETA +++++ -ENVIGO	CONTROL 20% de proteína TD.91352		RESTRINGIDA 6% de proteína TD.90016	
	% peso	% calorías	% peso	% calorías
Nutrimento				
Proteínas	20.3	21.6	6.1	6.5
Carbohidratos	61.6	65.4	75.5	80.4
Lípidos	5.5	13.1	5.5	13.1

El día del parto (0P), el tamaño de la camada se ajustó a ocho individuos (4 hembras y 4 machos). Las crías se destetaron a los 21 días de edad (21P) y recibieron una dieta de mantenimiento *Chow* por el resto del experimento. FIGURA 5.



Diseño experimental. Sacrificio: día postnatal 28 (P28), 6 días control (20% proteínas) y dieta restringida (6% proteínas); m: dieta de mantenimiento "Chow", **Figura 6. Modelo experimental.**

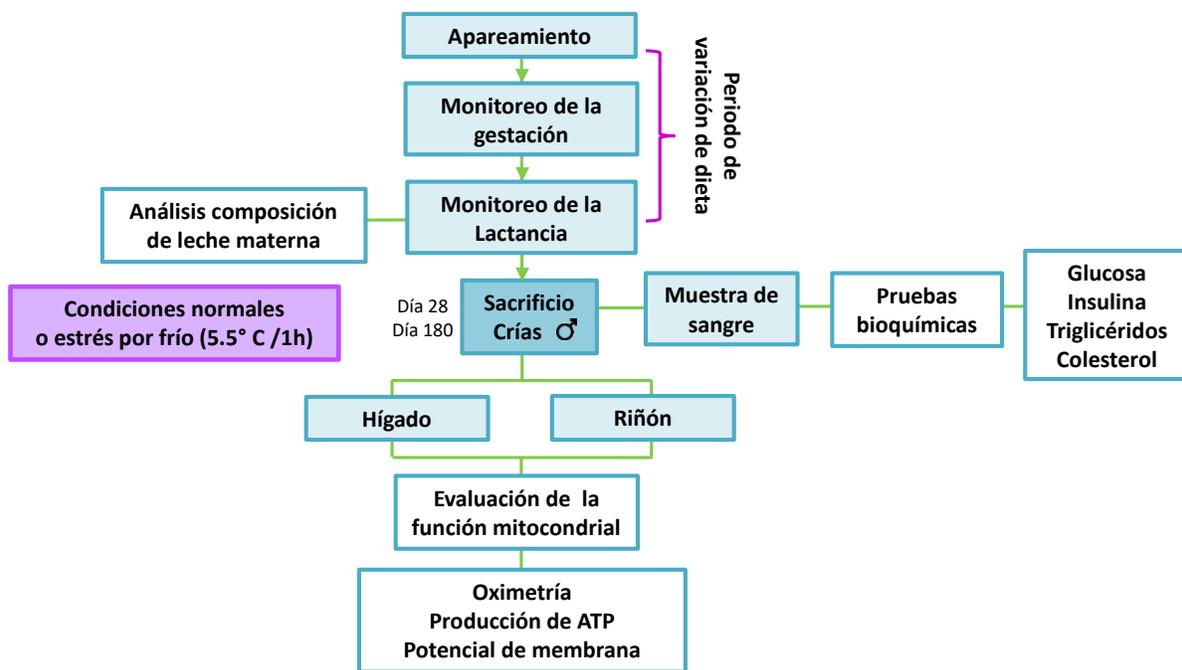


Figura 7. Diagrama general de trabajo.

Al llegar el día 28 posnatal (P28), se sacrificaron tres machos de cada camada para realizar el estudio de la función mitocondrial. Un macho por camada continuó su desarrollo y su estado mitocondrial fue evaluado al cumplir 180 días de edad (P180).

7.2. Obtención de muestras biológicas

Las crías de P28 y P180 fueron sacrificadas. Las crías de P28 se colocaron en ayuno por 8 horas, que es suficiente para ratas infantiles y evita el estrés de estos animales, mientras que las crías de P180 ayunaron 12 horas. Los individuos de la mitad del total de camadas fueron colocados, por una hora, en una cámara de frío (5.5 ± 0.5 °C) ubicada en un cuarto contiguo al área de sacrificio, mientras que la otra mitad se mantuvo a temperatura ambiente. Inmediatamente después de concluir el tratamiento, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico y se procedió a la recolección sanguínea por punción cardiaca. Posteriormente, se disectaron el hígado y el riñón, y se registraron los pesos correspondientes. El manejo de los órganos el día del sacrificio fue el siguiente:

Hígado: aproximadamente 1 cm³ proveniente del lóbulo medial izquierdo fue empleado para el aislamiento de mitocondrias. Otra fracción de la misma zona se almacenó a -70 °C.

Riñón: Un riñón completo fue destinado al aislamiento de mitocondrias mientras que el otro se almacenó a -70 °C.

7.3. Medidas somatométricas y análisis de composición corporal

Durante la gestación y lactancia se registró el peso y el consumo de alimento de las madres. En el caso de las crías, se llevó a cabo un monitoreo del peso, la talla, el perímetro abdominal (PA) y el diámetro cefálico. La talla se consideró como la distancia de la nariz a la punta de la cola. Las ratas que por alguna razón perdieron la punta de la cola no fueron consideradas. El perímetro abdominal se tomó de la parte más prominente del abdomen. El diámetro cefálico corresponde a la distancia de oreja a oreja obtenida con un Vernier.

Además, se realizó un análisis de la composición corporal tanto de las madres al final de la lactancia como de las crías en los días 28P y 180P, utilizando un densitómetro óseo de rayos X basado en CORE (Lunar iDXA, GE Healthcare). FIGURA 8.

7.4. Análisis de la composición de la leche materna

A las 12:00 horas del día 21 postnatal las madres fueron separadas de las crías y se mantuvieron aisladas por las siguientes cuatro horas. Pasado este tiempo, se anestesiaron con pentobarbital sódico y se les administró oxitocina (15 UI) por vía intraperitoneal. La leche se recolectó y se almacenó a -20°C hasta su análisis. Se determinó el contenido de carbohidratos reductores por el

método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) empleando una curva estándar de lactosa; el contenido de lípidos por una modificación al método de Gerber y las proteínas totales por el método de micro-Kjeldhal. (SUPLEMENTARIO 11.2).

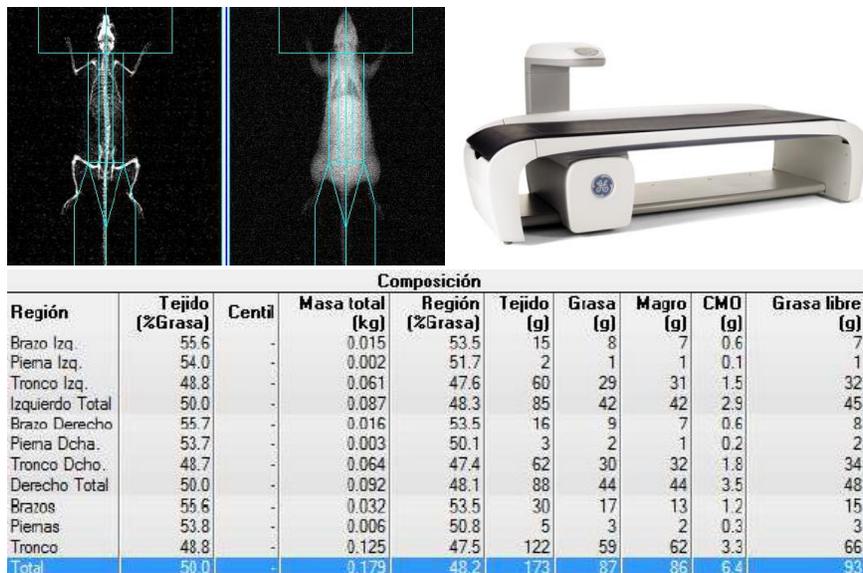


Figura 8. Análisis de composición corporal. Se ilustran el densitómetro de rayos X empleado (iDXA) y un ejemplo de los resultados del análisis efectuado a una de las crías.

7.5. Ensayo de tolerancia a la glucosa oral

Ratas machos de 180 días de edad se colocaron en ayuno por 12 horas. La concentración basal de glucosa se midió utilizando un glucómetro BAYER Contour TS. En seguida, se administró una solución de glucosa por vía oral, en una dosis de 200 mg/kg de peso corporal y se tomó la lectura de la concentración de glucosa a los 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores.

7.6. Determinación de parámetros bioquímicos en sangre

Los sueros se obtuvieron por centrifugación y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Se determinó la concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol y albúmina usando kits comerciales (GLUCOSE-LIQ, TRIGLYCERIDE-LIQ y CHOLESTEROL-LIQ de SPINREACT, España). La concentración de insulina se determinó por la técnica de ELISA empleando un kit para insulina de rata (Alpco, Windham, NH). SUPLEMENTARIO 11.3.

7.7. Evaluación de la función mitocondrial

7.7.1. Aislamiento de fracción mitocondrial

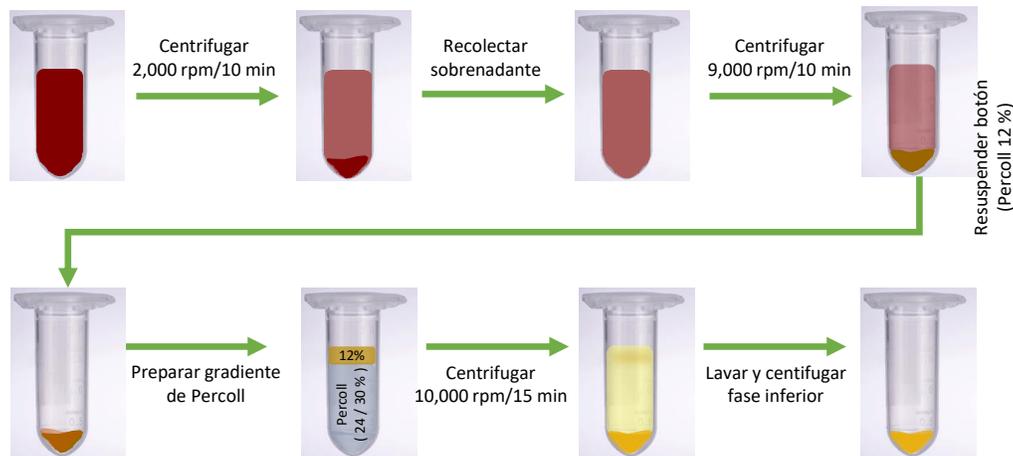


Figura 9. Aislamiento de mitocondrias por centrifugación diferencial. Se muestra el flujo de trabajo partiendo del homogenizado de hígado o riñón con buffer A. Se empleó Percoll al 24% para la separación de mitocondrias de riñón y al 30% para hígado.

Las fracciones mitocondriales de hígado y riñón se aislaron por centrifugación diferencial con gradientes de Percoll®, utilizando un método descrito anteriormente⁹⁹. (FIGURA 9.) Los órganos recién disectados de cada rata fueron enfriados inmediatamente por inmersión en medio de aislamiento “A” (D-manitol 225.0 mM, sacarosa 75.0 mM, EDTA 1.0 mM, HEPES 5.0 mM, BSA al 0.1%, pH = 7.2) en hielo. El tejido se homogeneizó con 2.0 mL de medio de aislamiento “A” en un homogeneizador con mortero de teflón. El homogeneizado se centrifugó durante 10 minutos a 2,000 rpm a 4°C y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 9,000 rpm por 10 minutos. El botón (pellet) resultante se resuspendió cuidadosamente en 100 µL de una solución de Percoll al 12% en medio de aislamiento “A”. Posteriormente, el homogeneizado proveniente de las crías de 28 días (pool por camada) o de una cría de 180 se colocó cuidadosamente sobre una cama de 1.4 mL de Percoll al 30% para hígado y 24% para riñón, generándose 2 fases. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 minutos y se conservó la fracción de la parte inferior del tubo. Esa fracción enriquecida en mitocondrias se lavó en medio de aislamiento “B” (Medio A sin BSA ni EDTA) y se centrifugó nuevamente a 9,000 rpm por 5 minutos. El pellet resultante se resuspendió en medio de aislamiento B (80.0 -100.0 µL).

La concentración de proteína mitocondrial se cuantificó por el método de Bradford (ANEXO 11.4).

7.7.2. *Respirometría y potencial de membrana mitocondriales*

La determinación del consumo de O₂ por las mitocondrias se realizó utilizando un sistema para respirometría de alta resolución OROBOROS (FIGURA 10.) con cámara de agitación y temperatura constante (37 °C). De manera simultánea se llevó a cabo la evaluación de los cambios en el potencial de membrana mitocondrial por un método indirecto previamente descrito¹⁰⁰, en el que se detectan los cambios en la fluorescencia emitida por la safranina O, un compuesto catiónico liposoluble sensible al potencial.

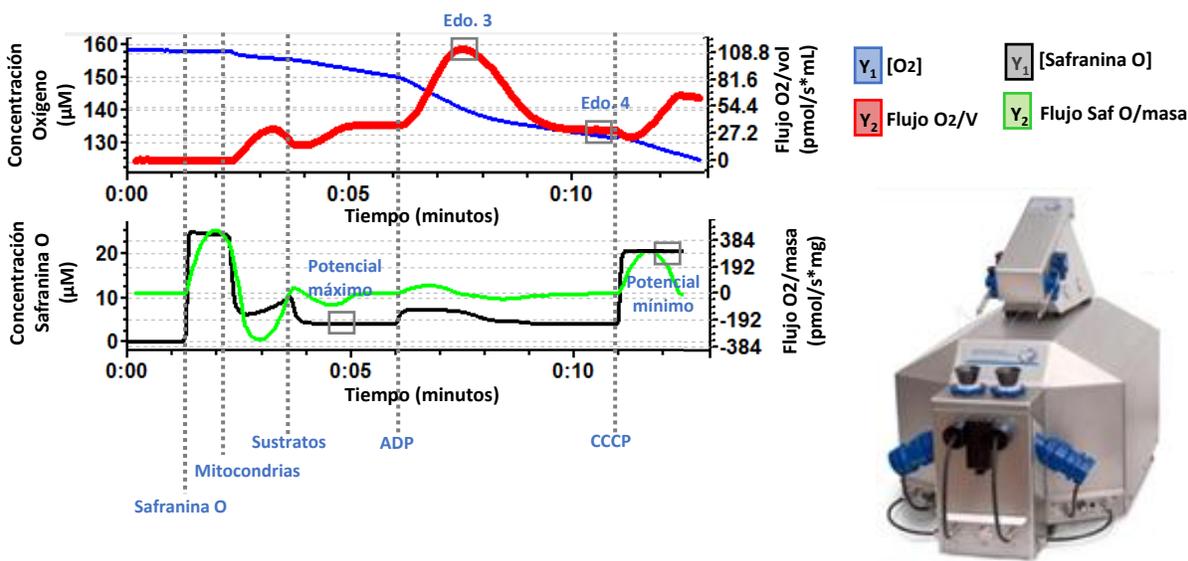


Figura 10. Medición de la tasa de consumo de oxígeno y de la generación de potencial de membrana en mitocondrias aisladas. Se indican las muestras y reactivos añadidos secuencialmente y cambios observados en la concentración de oxígeno (gráfico superior) y fluorescencia de Safranina O (gráfico inferior).

El estudio se inició colocando 2.0 mL de medio de respiración (sacarosa 200.0 mM, KCl 25.0 mM, K₂HPO₄ 2.0 mM, HEPES 5.0 mM, 0.1% de BSA libre de ácidos grasos y MgCl₂ 5 mM, pH= 7.4) en la cámara del equipo, con agitación y temperatura constantes. Después de un periodo de estabilización, se inyectaron i) una solución de safranina O para alcanzar una concentración 25 µM y ii) una muestra de mitocondrias aisladas (~30 µg de proteína total).

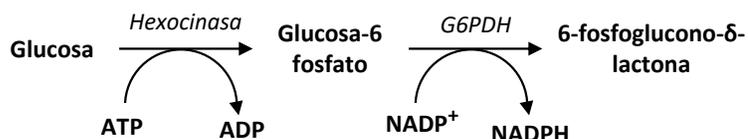
Para activar la cadena de transporte de electrones, se adicionaron sustratos respiratorios del complejo I (0.125 M de glutamato y 0.75 M de malato de sodio) o del complejo II (succinato 0.7 M adicionado con el inhibidor de complejo I rotenona 1 µg/mL). Posteriormente, se añadió ADP en una concentración limitante (200.0 µM), para promover la formación de ATP y el consecuente

incremento en el consumo de oxígeno. Por último, se provocó la disipación del potencial de membrana por adición de CCCP (0.2 μ M).

Las velocidades de respiración se expresaron en pmol de oxígeno/segundo/miligramo de proteína (ng/min/mg) y el índice de control respiratorio mitocondrial (ICR) se calculó como el cociente EDO3 / EDO 4. La medida relativa del potencial de membrana se expresa como la safranina medida al adicionar CCCP, menos la safranina tras la adición de sustratos, entre los mg de proteína mitocondrial ($\Delta\mu$ M = (μ M_{CCCP}- μ Ms) /mg proteína).

7.7.3. Actividad de la ATP sintasa

La actividad de la ATP sintasa se midió indirectamente a través de un ensayo de cinética enzimática basado en que el ATP producido en la mitocondria puede ser utilizado por la hexocinasa para fosforilar a la glucosa, obteniéndose glucosa-6P. Si a su vez, la glucosa-6P se oxida por la glucosa-6P deshidrogenasa (G6PDH) se produce NADPH por reducción del NADP⁺, el cual puede cuantificarse por espectrofotometría UV-vis (340 nm)¹⁰⁰. Para descartar la fracción de ATP producido por fuentes diferentes a la ATP sintasa, también se sigue la cinética después de añadir oligomicina (inhibidor de la enzima) y se calcula la diferencia entre ambas condiciones.



El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pozos, utilizando un lector de placas Sinergy H1 (BIOTEK) a 37 °C. En cada pozo se colocaron 190.0 μ L de mezcla de reacción fresca que contenía: hexocinasa 4.5 U/mL, G6PDH 2.0 U/ μ L, glucosa 22.0 mM, NADP⁺ 1.4 mM y sustratos (glutamato-malato o succinato) y 5.0 μ L del aislado mitocondrial. En el experimento se monitoreó la absorbancia a 340 nm bajo las siguientes condiciones: i) condiciones basales, ii) tras la adición de ADP y iii) 10 minutos después de agregar oligomicina. Cada una de las condiciones se siguió por 3 minutos con lecturas cada 30 segundos. La actividad total de la enzima se calculó como la actividad sin inhibidor menos la actividad enzimática con inhibidor presente. La actividad de la enzima se calculó como:

$$A = \frac{\Delta Abs (1000)}{(mg_{prot})(\epsilon_{NADPH})}$$

Siendo ϵ_{NADPH} el coeficiente de extinción molar del NADPH= 6.22 mM⁻¹cm⁻¹

7.8. Evaluación de la expresión a nivel de mensajero de sensores energéticos: AMPK y mTOR

7.8.1. Extracción de RNA total

El RNA total de hígado y riñón se obtuvo por el método de TRIzol cloroformo.

En un tubo se colocaron 70 mg de hígado o 30 mg de riñón con 750.0 µL de TRIzol (Gibco). Se homogeneizó completamente y se dejó reposar 5 minutos. Se adicionaron 150.0 µL de cloroformo (SIGMA), se agitó vigorosamente y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó 10 minutos a 12,000 rpm. Luego de centrifugar, se conservó la fase superior (incolora) que contenía el RNA, el cual se hizo precipitar con 500.0 µL de isopropanol. El RNA se aisló por centrifugación a 12,000 rpm por 10 minutos y se lavó 3 veces con etanol al 75% en agua DEPC (inactivador de RNasas). Finalmente, se eliminó el etanol del botón obtenido y se disolvió en agua libre de RNasas.

7.8.2. Cuantificación de RNA y obtención de cDNA

El RNA obtenido se cuantificó utilizando un Nanodrop (Thermo Scientific). La integridad se confirmó en un gel de agarosa al 1%. La retrotranscripción se realizó usando el Kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.8.3. Estudio de la expresión génica por qPCR

La evaluación de la expresión génica se llevó a cabo a través de la cuantificación relativa de los niveles de RNA por PCR cuantitativa (qPCR) utilizando un equipo LightCycler 2.0. La expresión relativa se obtuvo por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, considerando al gen G6pdh como constitutivo.

7.9. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media ± el error estándar (EE). El valor de n indica el número de madres o camadas evaluadas en cada medición. Los datos se analizaron con las medias de las crías de cada camada usando el programa estadístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software,

Inc., California, SD, EUA). Los datos fueron analizados empleando una *t-student* con comparaciones dirigidas entre individuos con el mismo tratamiento. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $P < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Madres: peso corporal y consumo de alimento durante la gestación y la lactancia

Nuestro trabajo de investigación comenzó con la observación de los cambios en el peso y en los patrones de alimentación de las madres R y C (6% y 20% de proteína, respectivamente), debido a que las condiciones del medio intrauterino y de la producción láctea se establecen de acuerdo con la nutrición y el metabolismo de la madre.

En la TABLA 4, todas las ratas empleadas para este trabajo tenían un peso similar al inicio de la gestación (C: 224 ± 8 g, R: 226 ± 6 g, n= 10) y consumieron la misma cantidad de alimento durante los 21 días de gestación (~18 g). Sin embargo, a pesar de que las dietas administradas fueron isocalóricas, la ganancia de peso al final de la gestación fue menor para las madres R que para las madres C ($P < 0.05$). Esta diferencia se mantuvo después del alumbramiento, aunque no se observó diferencia en el tamaño de la camada de ambos grupos (C: 10.8 ± 2.0 , R: 9.8 ± 1.9 crías).

Interesantemente, a partir del inicio de la lactancia, las madres R comenzaron a disminuir su ingesta alimentaria (FIGURA 11), que representó una reducción del 48 % en el día 14 de la lactancia (día de máxima producción láctea), con respecto a las madres C. La consecuencia inmediata para las madres R fue una pérdida de peso gradual durante este periodo. Mientras las madres C conservaron el peso con el que iniciaron la lactancia, las madres R perdieron ~12% del peso corporal inicial.

Los resultados del análisis de composición corporal de las madres (el primero realizado en el modelo de RPM severa) muestran que la pérdida de peso experimentada por las madres R corresponde casi exclusivamente al detrimento de tejido muscular. Como se puede observar en la TABLA 4, la masa muscular de las madres R fue ~45 g menor que la de las madres C, mientras que la masa de tejido graso permaneció sin cambios importantes con respecto al grupo C. Así, aunque el porcentaje de grasa parece ser mayor para las madres R, este cambio podría ser consecuencia de la disminución del porcentaje de músculo y no del aumento de la lipogénesis en estos animales.

En la TABLA 5, los cambios en el peso y la composición corporal materna no se vieron reflejados en la composición de la leche, ya que las concentraciones de carbohidratos, lípidos y proteínas fueron similares entre la leche de las madres R y C.

Tabla 4. Monitoreo de las madres durante la gestación y la lactancia

Gestación		Día	C	R
Peso corporal de las madres (g)		1	223.6 ± 7.9	226.1 ± 6.2
		21	321.4 ± 10.3	295.5 ± 6.9*
Ingesta de alimento de las madres (g/día)		1-21	17.9 ± 0.4	18.1 ± 0.3
Crías por camada			10.8 ± 2.0	9.75 ± 1.98
Lactancia		Día	C	R
Peso corporal de las madres (g)		1	233.5 ± 8.3	212.7 ± 7.1*
		21	241.4 ± 6.9	186.8 ± 5.2*
Ingesta de alimento de las madres (g/día)		14	41.3 ± 1.4	21.2 ± 0.9*
		21	44.6 ± 1.2	25.3 ± 1.6*
Masa magra (g)		21	159.2 ± 5.1	114.6 ± 4.7*
Masa magra (%)		21	66.3 ± 1.8	61.6 ± 3.0
Masa grasa (g)		21	81.2 ± 3.3	72.6 ± 4.2
Masa grasa (%)		21	33.7 ± 1.8	38.4 ± 3.1
DMO (mg/cm ²)		21	119 ± 3.0	119 ± 2.2

C grupo control (20% proteína); R grupo restringido (6% de proteína); Gestación: Día 1: inicio de la gestación; día 21: día del nacimiento; Lactancia: Día 1: inicio de la lactancia; día 14: día de máxima producción láctea; día 21: día del destete. DMO: Densidad de masa ósea. Los resultados se expresan como media ± EE, n=10. El análisis estadístico se realizó mediante una t-student, * indica diferencia significativa (p<0.05).

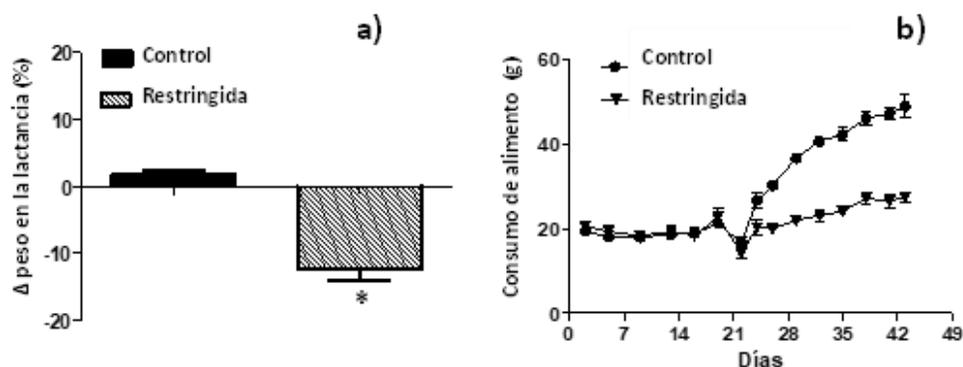


Figura 11. Monitoreo de las madres durante la lactancia; a) Diferencia de peso de las madres de los dos grupos entre los días 0 y 21 de la lactancia b) Alimento consumido por las madres de los dos grupos durante la gestación y la lactancia. C grupo control (20% proteína); R grupo restringido (6% de proteína). Los resultados se expresan como media ± EE (n=10), El análisis estadístico se realizó mediante un análisis t-student *, indica diferencia significativa (p<0.05)

Tabla 5. Composición de leche materna al final de la lactancia.

Nutrimento	C	R
Carbohidratos (%)	5.67 ± 0.79	5.46 ± 0.62
Lípidos (%)	4.29 ± 0.64	4.68 ± 0.31
Proteínas (%)	4.83 ± 0.36	4.35 ± 0.18

C grupo control (20% proteína); R grupo restringido (6% de proteína); Los resultados se expresan como media ± EE, n=5. El análisis estadístico se realizó mediante una t-student, * indica diferencia significativa (p<0.05).

8.2. Caracterización del fenotipo de las crías

8.2.1. Estructura corporal

Al nacimiento, las crías de madres R mostraron menor peso (75%) y talla (88%) que las crías C, sin cambios significativos en el diámetro abdominal y el perímetro cefálico (TABLA 6). La extensión de la restricción proteínica a la lactancia provocó que las crías mantuvieran una tasa de crecimiento menor al grupo C durante este período (FIGURA 12), de forma que en el día P28 el peso de las crías R representó solamente el 41% del peso de las crías C.

Hacia el día P180, las crías R continuaron teniendo un peso corporal reducido ($p < 0.05$) a pesar de haber consumido la misma dieta que el grupo C a partir del destete. La talla, que era menor en el día P28 (~82%), mostró el mismo patrón hacia el día P180; sin embargo, el cambio no fue estadísticamente significativo. El cociente cefálico-abdominal, un parámetro que ayuda a evaluar la severidad de la malnutrición, fue calculado al nacimiento y en los días P28 y P180, pero en ninguno de los tiempos se encontraron cambios en este parámetro (TABLA 6).

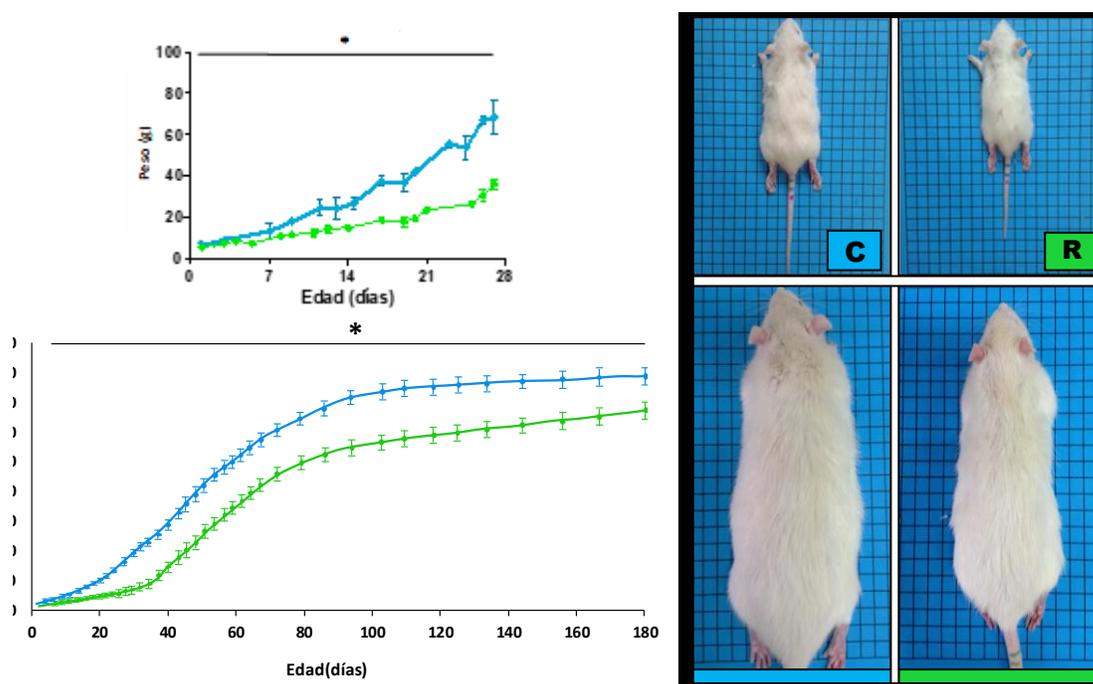


Figura 12. Ganancia de peso de las crías de los dos grupos durante la lactancia. C grupo control (20% proteína); R grupo restringido (6% de proteína); Los resultados se expresan como media \pm EE (n=10), El análisis estadístico se realizó mediante una t-student, * indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

Tabla 6. Parámetros somatométricos de las crías machos

Parámetro	Día postnatal	C	R
Peso corporal (g)	1	7.0 ± 0.66	5.2 ± 0.34*
	28	68.4 ± 7.99	36.1 ± 2.44*
	180	395 ± 14	320 ± 6.0*
Talla (cm)	1	7.8 ± 0.32	7.0 ± 0.38*
	28	23.6 ± 0.78	19.3 ± 0.50*
	180	45.6 ± 1.5	42.36 ± 2.4
Diámetro abdominal (cm)	1	4.6 ± 0.19	4.3 ± 0.25
	28	9.6 ± 0.66	7.7 ± 0.22*
	180	20.6 ± 0.3	18.4 ± 0.1
Perímetro cefálico (mm)	1	10.6 ± 0.07	10.5 ± 0.06
	28	19.9 ± 1.56	19.3 ± 1.14
	180	3.8 ± 0.1	3.6 ± 0.1
Cociente cefálico abdominal	1	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.01
	20	0.21 ± 0.02	0.25 ± 0.02
	180	0.18 ± 0.1	0.20 ± 0.1

C grupo control (20% proteína); R grupo restringido (6% de proteína). Los resultados se expresan como media ± EE (n=10), El análisis estadístico se realizó mediante un análisis t-student *, indica diferencia significativa (p<0.05)

En la TABLA 7, el análisis de composición corporal reveló que a pesar de que las crías R son aparentemente delgadas, presentan un porcentaje de grasa 8% superior al grupo C en el día P28 y, consecuentemente, el porcentaje de músculo de estos animales es menor. Además, en las crías R de esta edad, la densidad de masa ósea (DMO) fue significativamente menor que la del grupo C. No obstante, los resultados de la evaluación de las crías de P180 no dejaron ver cambios significativos en el porcentaje de grasa, músculo o DMO.

Tabla 7. Composición corporal y peso relativo de órganos de crías machos

Parámetro\Grupo	Día P28		Día P180	
	C (n=13)	R (n=11)	C (n=10)	R (n=10)
Peso corporal (g)	68.4 ± 8.0	36.1 ± 2.4*	395 ± 14	320 ± 6.0*
Tejido magro (%)	59.1 ± 0.45	51.2 ± 4.6*	49 ± 4.4	52 ± 3.0
Tejido graso (%)	40.9 ± 1.5	48.8 ± 4.6*	51 ± 4.3	48 ± 2.9
DMO (mg/cm ²)	78 ± 2.9	61 ± 2.0*	158 ± 6.2	149 ± 4.7
Peso relativo de los órganos				
Páncreas	0.44 ± 0.09	0.42 ± 0.07	0.249 ± 0.05	0.216 ± 0.27
Hígado	3.56 ± 0.51	3.75 ± 0.78	2.46 ± 0.07	2.35 ± 0.06
Riñón	0.89 ± 0.07	0.92 ± 0.16	0.514 ± 0.07	0.510 ± 0.10
Cerebro	1.75 ± 0.21	2.89 ± 0.33*	0.37 ± 0.12	0.44 ± 0.17

C grupo control (20% proteína); R grupo restringido (6% de proteína). Los resultados se expresan como media ± EE (n=10), El análisis estadístico se realizó mediante un análisis t-student *, indica diferencia significativa (p<0.05)

Respecto al tamaño de los órganos, en el día P28, el peso neto del hígado, el riñón y el páncreas de crías R fue significativamente menor que el de los animales C, mientras que no se registraron cambios en el peso del cerebro (resultados no mostrados). Sin embargo, al realizar el ajuste del peso del órgano con relación al peso corporal (peso relativo= peso órgano/peso corporal) se encontró que el tamaño del hígado, el riñón y el páncreas guardó la misma proporción entre crías R y C, y el cerebro de las crías R superaba la proporción observada en los animales C (TABLA 7). En las crías de P180, la proporción de todos los órganos fue la misma entre los grupos.

8.2.2. Parámetros bioquímicos

La caracterización bioquímica se realizó evaluando las concentraciones de glucosa, triglicéridos, colesterol, insulina y albúmina en el suero de las crías en los días P28 y P180 (TABLA 8).

Las crías R de P28 y P180, tienden a presentar menores concentraciones de glucosa e insulina sérica que las crías C, aun cuando no existe diferencia estadística en dichos parámetros.

Como se puede apreciar en la FIGURA 13, al efectuar la prueba de tolerancia a la glucosa oral en el día P180 se encontró que la concentración de glucosa sanguínea tiende a disminuir más rápidamente en las crías R, a pesar de que la comparación del área bajo la curva (ABC) obtenida para cada grupo no fue diferente.

Con el propósito de revelar alteraciones metabólicas fruto de la programación *in utero* en condiciones de restricción proteínica materna, se utilizó el estrés por frío. Mediante esta estrategia, se observó que las crías R sometidas a estrés por frío durante una hora (RF) tuvieron una disminución importante en los niveles de insulina en ambas edades (TABLA 8). En el día P28, la concentración de glucosa sérica del grupo RF mantuvo el mismo comportamiento que el grupo R. Sin embargo, el estrés por frío provocó que la tendencia en la concentración de glucosa se invirtiera en el día P180, y que las crías RF de esta edad presentaran una concentración de glucosa por encima del grupo CF, aunque este cambio no resultó significativo.

No se observaron cambios en las concentraciones de triglicéridos, colesterol ni albúmina en respuesta al tratamiento térmico en las edades estudiadas.

Tabla 8. Parámetros bioquímicos de las crías machos de 28 y 180 días

Día P28				
Parámetro\Grupo	C (n=6)	R (n=6)	CF (n=7)	RF (n=5)
Glucosa (mg/dL)	176 ± 8.8	157 ± 11	175 ± 18	140 ± 18
Triglicéridos (mg/dL)	86 ± 4.3	92 ± 2.8	88 ± 2.1	95 ± 4.4
Colesterol (mg/dL)	44 ± 1.7	50 ± 2.8	47 ± 2.3	51 ± 2.9
Albúmina (mg/dL)	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.3	3.6 ± 0.2
Insulina (ng/dL)	0.38 ± 0.078	0.29 ± 0.087	0.51 ± 0.076	0.13 ± 0.03
Día P180				
Parámetro\Grupo	C (n=5)	R (n=5)	CF (n=5)	RF (n=5)
Glucosa (mg/dL)	198 ± 12	173 ± 9.1	159 ± 11	194 ± 19
Triglicéridos (mg/dL)	77 ± 1.5	80 ± 6.9	59 ± 3.7	68 ± 14
Colesterol (mg/dL)	41 ± 5.4	40 ± 2.2	32 ± 2.8	46 ± 4.5
Albúmina (mg/dL)	3.8 ± 0.3	3.4 ± 0.2	3.9 ± 0.1	3.7 ± 0.1
Insulina (ng/dL)	2.7 ± 0.10	1.8 ± 0.15	2.8 ± 0.02	0.69 ± 0.05*#

“C” grupo control (20% proteína); “R” grupo restringido (6% de proteína). “CF” grupo control expuesto al frío; “RF” grupo restringido expuesto al frío. Los resultados se expresan como media ± EE, El análisis estadístico se realizó mediante un análisis t-student *, indica diferencia significativa contra grupo C. #, indica diferencia significativa contra grupo R (p<0.05)

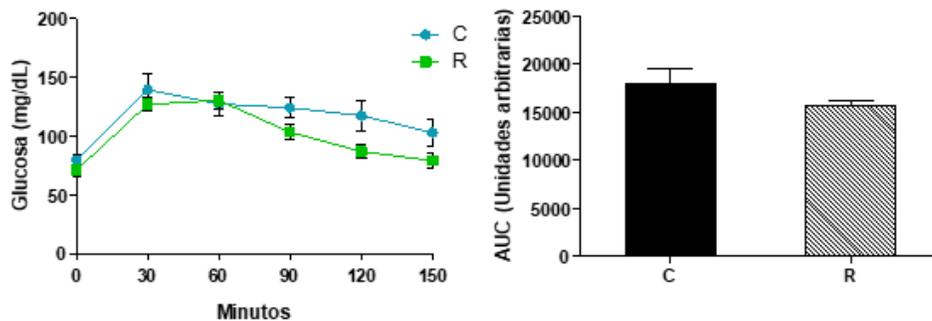


Figura 13. Prueba de tolerancia a la glucosa oral a los 180 días postnatales. C grupo control (20%); R grupo restringido (6% de proteína); Los resultados se expresan como media ± EE (n=5), El análisis estadístico se realizó mediante análisis t-student, * indica diferencia significativa entre grupos (p<0.05).

8.3. Expresión de los sensores energéticos AMPK y mTOR

A continuación, se evaluó el efecto de la RPM en la expresión de los sensores energéticos AMPK y mTOR, por su posible participación en la adaptación metabólica ante la limitación de nutrimentos y por su papel en la regulación de la función mitocondrial.

En la FIGURA 14A se muestra que la expresión hepática de AMPK del grupo R fue ~50% menor respecto a C en el día P28. En este periodo, la exposición aguda al frío ocasionó que CF incrementara tres veces la expresión obtenida para C (p<0.05). El grupo RF tuvo una respuesta

similar, triplicando la expresión del grupo R. No obstante, la expresión del grupo RF fue solamente la mitad de la obtenida para CF. En P180, la expresión de AMPK continuó siendo menor para R que para C (~70%). En esta edad, el efecto de la estimulación por frío sobre AMPK fue menor que en P28, con un ligero incremento de transcrito para CF y RF respecto a C y R de P180, que no fue significativo.

En la FIGURA 14C se observa que la expresión de mTOR, evaluada en el mismo tejido, mostró una reducción de la expresión en las crías R, que se detectó en el día P28 y se mantuvo hasta el día P180. Para este gen, la exposición al frío no ocasionó cambios significativos en la expresión hepática de las crías CF y RF respecto a sus contrapartes de temperatura ambiente.

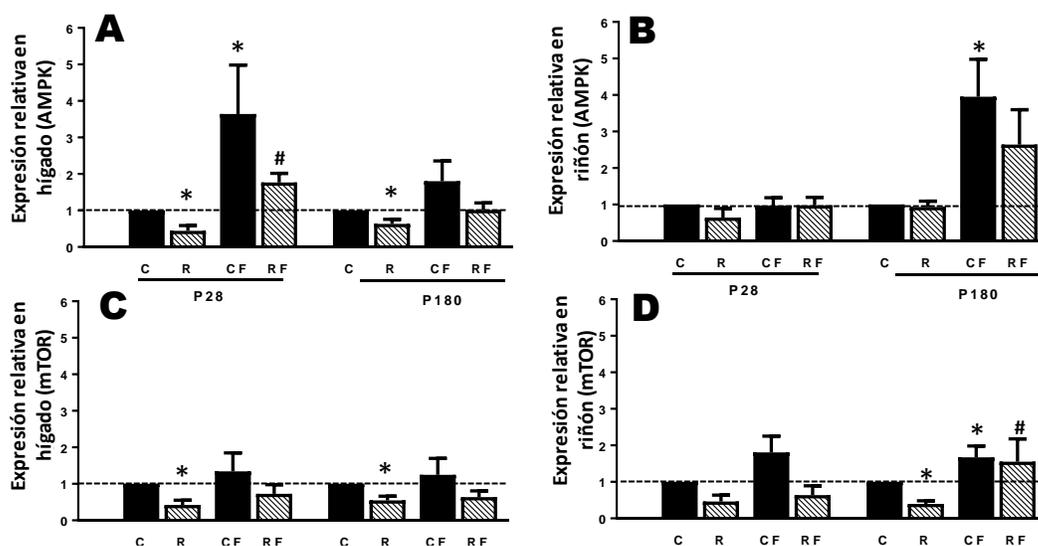


Figura 14. Expresión de RNAm de AMPK y mTOR en hígado y riñón de crías machos de ratas alimentadas con una dieta control (20% proteína) o restringida (6% proteína) a los 28 o 180 días de edad. “C” control, “R” restringida, “CF” control expuesta a frío; “RF” restringida expuesta a frío. A) Expresión hepática de AMPK; B) Expresión renal de AMPK; C) Expresión hepática de mTOR; D) Expresión renal de mTOR. Los resultados se expresan como media \pm EE (P28 n=5, P180 n=5). El análisis estadístico se realizó mediante una t-student. * diferencia contra grupo C, # diferencia contra grupo R ($p < 0.05$).

En riñón, la expresión de AMPK del grupo R de P28 presentó una reducción del ~30% respecto a C (FIGURA 14B). Las crías RF y CF de P28 tuvieron niveles de expresión similares entre ellas. Al día P180, no se observó diferencia alguna entre los niveles de transcrito de los grupos R y C. No obstante, tras la exposición al frío, el grupo CF aumentó 4 veces la expresión de C ($p < 0.05$), mientras que el aumento de RF fue solamente 2.5 veces la expresión del grupo R.

Respecto a mTOR (FIGURA 14D), en el día P28, la expresión renal del grupo R fue ~60% la del grupo C, aunque este cambio no fue significativo. En respuesta al frío, las crías CF de P28 llegaron casi a duplicar la expresión obtenida para C, sin embargo, no se observó cambio alguno para las crías RF de esta edad. En animales adultos, la expresión de mTOR del grupo R fue menor que la de C ($p < 0.05$). Interesantemente, bajo condiciones de estrés por frío los grupos RF y CF tuvieron una respuesta equivalente.

8.3. Efecto de la dieta materna en la respiración y la generación de potencial de membrana

Posteriormente se determinó si la deficiencia de proteína materna afecta la respiración y la generación de potencial de membrana mitocondriales en respuesta al estrés inducido por frío en mitocondrias aisladas de hígado y riñón. La evaluación se realizó empleando sustratos específicos del complejo I (malato-glutamato) y del complejo II (succinato).

8.3.1. Hígado

28 días

El índice de control respiratorio (ICR) obtenido al evaluar las mitocondrias aisladas de hígado de crías R de P28 no fue diferente respecto al grupo C (FIGURAS 15A-P28 Y 15B-P28). En esta edad, las velocidades de consumo de oxígeno estimulado por ADP (EDO 3) y del estado desacoplado (EDO4) de R y C no mostraron diferencias significativas al alimentar el sistema de transporte de electrones por los complejos I y II (FIGURAS 15B, 15C, 15F Y 15G). Cuando las crías fueron sometidas a estrés por frío, los animales CF tuvieron un incremento del ~40% en la velocidad del EDO3 respecto a C al emplear malato-glutamato como sustrato ($p < 0.05$); sin embargo, este comportamiento no se observó en las crías RF (FIGURA 15B). El EDO4 no registró cambios para CF ni RF de P28 (FIGURA 15C). Así, el cambio en la respuesta del EDO3 fue suficiente para que el ICR calculado para el grupo RF se redujera un 23% respecto a CF (FIGURA 15A). Interesantemente, la adición de succinato como sustrato generó una reducción similar del ICR, pero la diferencia no tuvo una significancia estadística (FIGURAS 15B, 15F Y 15G).

En cuanto al potencial de membrana, no se encontraron cambios significativos entre los grupos estudiados en este tiempo (FIGURAS 15D Y 15H).

180 días

Los resultados de la evaluación de la función mitocondrial en ratas adultas muestran que las crías R cuentan con un ICR ~22% menor que los animales C al alimentar el sistema de transporte de electrones a través del complejo I (FIGURA 15A-P180). De acuerdo con la FIGURA 14B, las crías R de P180 presentan una reducción del 18% en la velocidad del EDO3 en relación con las crías C, al utilizar malato-glutamato como sustrato ($p < 0.05$), pero no se observaron cambios significativos en el EDO4 (FIGURA 14C). Esta tendencia también se observó al usar succinato como sustrato, pero no hubo ningún cambio significativo.

Tras la exposición al frío, el ICR del grupo RF de P180 fue 18% menor que el de CF al utilizar malato glutamato (FIGURA 15A). Las crías RF tuvieron una reducción no significativa del 14% en la velocidad del EDO3 (FIGURA 15B) y mostraron un ligero incremento de la velocidad del EDO4 respecto a CF de la misma edad (FIGURA 15C). Al emplear succinato como sustrato del complejo II, se observó el mismo comportamiento, de forma que las crías RF tuvieron un ICR 24% menor que el obtenido para CF.

Respecto al potencial de membrana, las crías R de P180 tuvieron valores ligeramente menores que el grupo C al emplear ambos sustratos, tanto en temperatura ambiente como en condiciones de estrés. Sin embargo, los resultados no arrojaron diferencias significativas entre los grupos (FIGURA 15D Y 15H).

HÍGADO

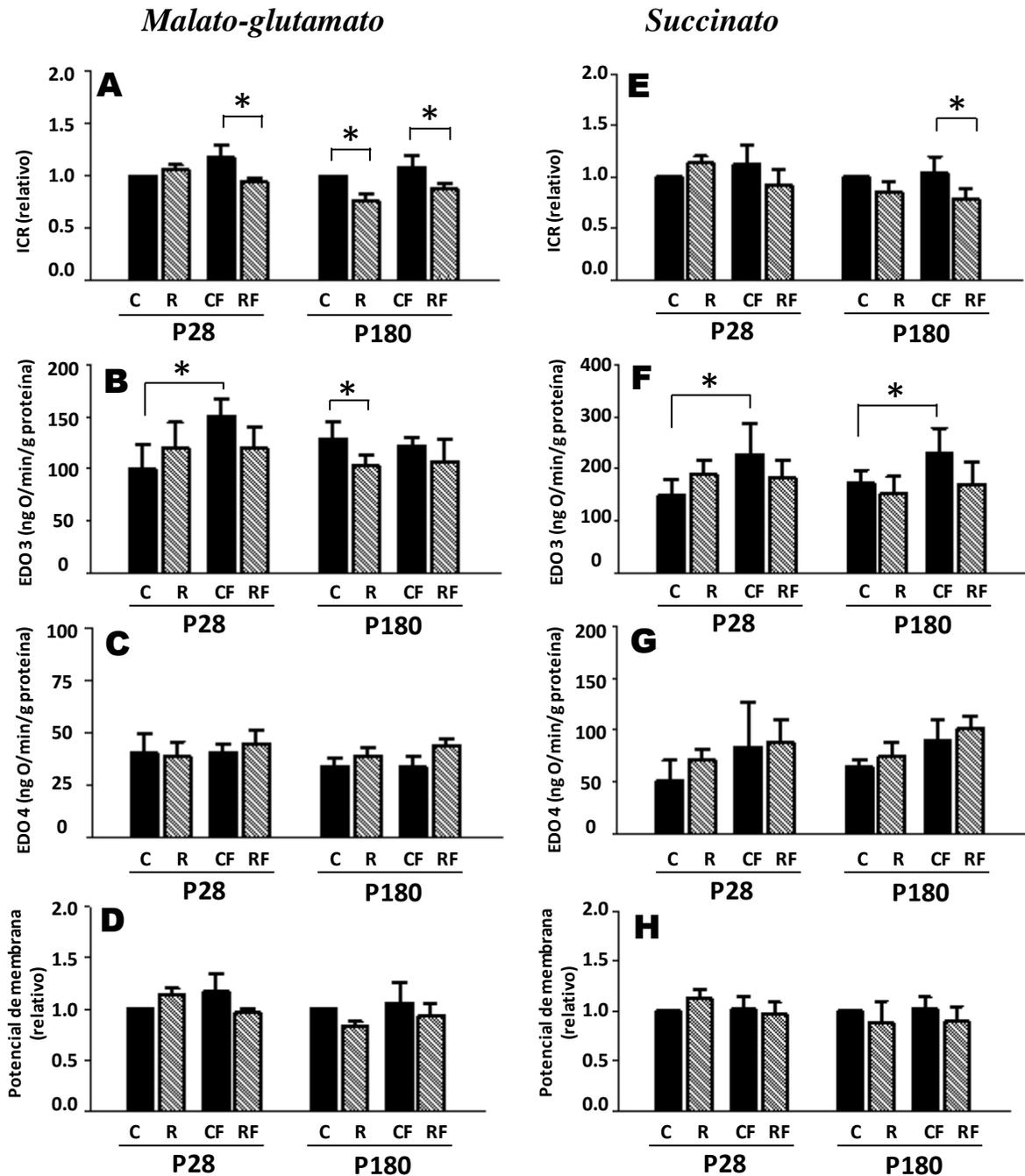


Figura 15. Parámetros de función de mitocondrias aisladas de hígado de crías machos de ratas alimentadas con una dieta control (20% proteína) o restringida (6% proteína) a los 28 ó 180 días de edad. “C” control, “R” restringida, “CF” control expuesta a frío; “RF” restringida expuesta a frío. El succinato se adicionó con rotenona. Los resultados se expresan como media \pm EE (P28 n=8, P180 n=5). El análisis estadístico se realizó mediante una t-student, * indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

8.3.2. Riñón

De acuerdo con la oximetría, las mitocondrias renales de las crías R no mostraron defectos en su capacidad respiratoria en el día P28 (FIGURA 16A Y 16B). En esta edad, no se registraron cambios significativos en la velocidad del EDO3 entre los grupos R y C, pero, interesantemente, la velocidad del EDO4 fue ligeramente menor para las crías R que para C ($p>0.05$), al evaluar la respiración con ambos sustratos (FIGURA 16C Y 16G).

Tras el tratamiento en frío, las crías CF de P28 tendieron a incrementar de forma paralela su velocidad del EDO3 y del EDO4, usando glutamato-malato como sustrato (FIGURAS 16B Y 16C). Aunque estas velocidades tendían a ser menores en las crías RF, el ICR entre los dos grupos fue similar. Al usar succinato, por otro lado, se observó que las crías RF tuvieron un decremento no significativo del EDO4 (33%) respecto a CF, sin registro de cambios en el EDO3 (FIGURAS 16F Y 16G). En P180, el ICR de las crías R permaneció sin cambios significativos en relación con C (FIGURA 16A). Al igual que en el día P28, no se registraron cambios significativos en el EDO3 respiratorio (FIGURA 16B Y 16F). Sin embargo, en esta edad, la velocidad del EDO4 fue ligeramente mayor para R empleando ambos sustratos (FIGURA 16C Y 16G). Este incremento de la velocidad del EDO4 se acentuó con la exposición al frío, que se reflejó en un incremento del ~30% para el grupo RF respecto a CF, con ambos sustratos. No obstante, la disminución del ICR resultante (~18%) no fue significativa entre RF y CF de P180.

Con respecto al potencial de membrana, en la FIGURA 16D Y 16H se pudo observar que las crías R de P28 tendían a presentar menor potencial de membrana que las crías C, pero que en el día P180 el potencial tendía a disminuir para las crías R, con y sin tratamiento frío, aunque ninguna de estas observaciones fue estadísticamente significativa.

RIÑÓN

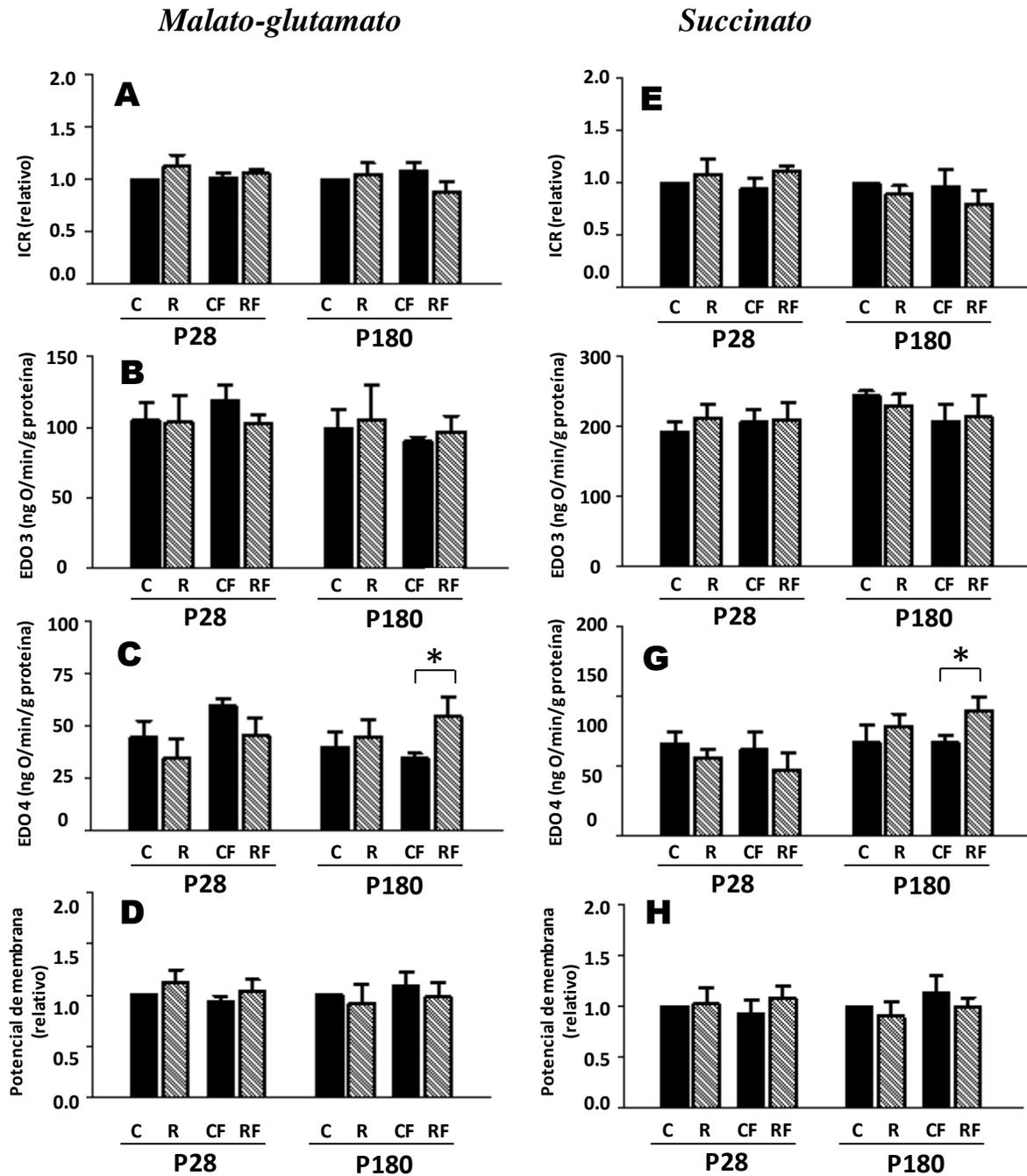


Figura 16. Parámetros de función de mitocondrias aisladas de riñón de crías machos de ratas alimentadas con una dieta control (20% proteína) o restringida (6% proteína) a los 28 ó 180 días de edad. “C” control, “R” restringida, “CF” control expuesta a frío; “RF” restringida expuesta a frío. Los resultados se expresan como media \pm EE (P28 n=5, P180 n= 4-5). El análisis estadístico se realizó mediante una t-student, * indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

8.4. Actividad de la ATP sintasa

Para saber si los cambios en el EDO3 y el ICR antes mencionados se relacionaban con alteraciones en la actividad de la ATP sintasa, se decidió evaluar la actividad de esta enzima en mitocondrias aisladas de hígado y riñón, empleando malato-glutamato como sustrato.

Como se puede observar en la FIGURA 17, la función de la ATP sintasa no se modificó en respuesta a la dieta materna ni en respuesta al estrés inducido por frío.

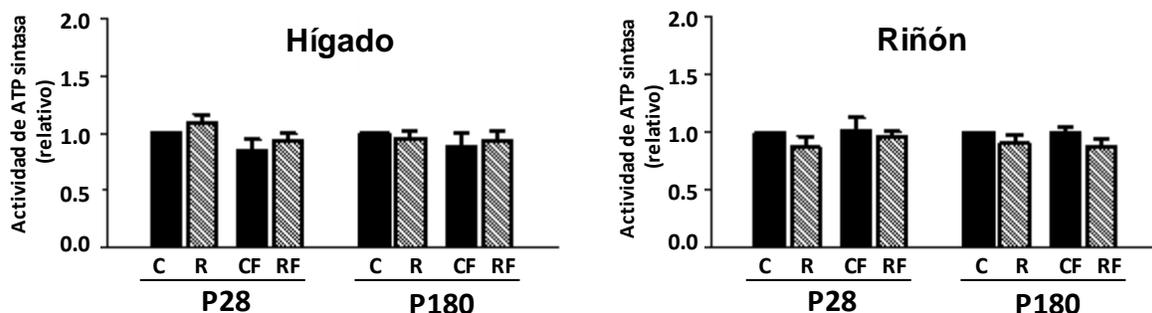


Figura 17. Actividad de la ATP sintasa en mitocondrias aisladas de crías machos de ratas alimentadas con una dieta control (20% proteína) o restringida (6% proteína) a los 28 ó 180 días de edad. “C” control, “R” restringida, “CF” control expuesta a frío; “RF” restringida expuesta a frío. Los resultados se expresan como media \pm EE (P28 n=8, P180 n=5). El análisis estadístico se realizó mediante una t-student, * indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

8.5. Expresión de la proteína desacoplante UCP2

Se evaluó la expresión del RNAm de la proteína desacoplante UCP2 en hígado y riñón debido al papel que tiene esta proteína en el control del EDO4 respiratorio en ambos tejidos.

En la FIGURA 18A, se puede ver que el grupo R de P28 no sufrió alteraciones en la expresión hepática de UCP2 debido a la dieta materna, pero que en esta edad la exposición al frío provocó la sobreexpresión del gen en los grupos CF y RF. En P180, no se encontraron cambios significativos en la expresión de UCP2 en hígado entre los grupos R y C, y la sobreexpresión de UCP2 fue similar entre los grupos RF y CF. En la FIGURA 18B, se observa que las crías R disminuyeron la expresión renal de UCP2 en el día P28. Sin embargo, en el día P180 hubo un aumento del transcrito de 2.5 veces para el grupo C cuando los animales cumplieron 180 días ($p < 0.05$). Al igual que en el hígado, el frío provocó un aumento en la expresión de UCP2, que fue parecido entre los grupos CF y RF de ambas edades.

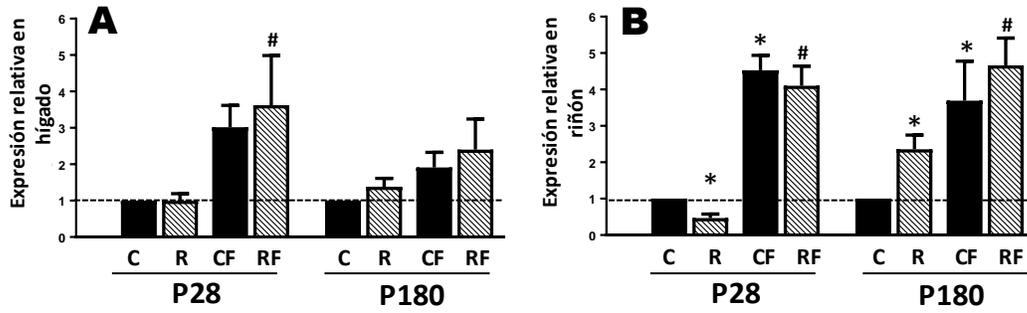


Figura 18. Expresión de RNAm de UCP2 en hígado (A) y riñón (B) de crías machos de ratas alimentadas con una dieta control (20% proteína) o restringida (6% proteína) a los 28 ó 180 días de edad. “C” control, “R” restringida, “CF” control expuesta a frío; “RF” restringida expuesta al frío. El gen G6pdh fue utilizado como housekeeping. Los resultados se expresan como media \pm EE (P28 n=5, P180 n=5). El análisis estadístico se realizó mediante una t-student. * diferencia contra C, # diferencia contra R ($p < 0.05$).

9. DISCUSIÓN

El desarrollo intrauterino bien controlado es una condición esencial para muchos aspectos de la fisiología y la salud de un adulto normal. Este proceso se ve afectado por el mal estado nutricional de la madre durante el embarazo. De hecho, las adaptaciones fisiológicas ocurren en el feto para garantizar el suministro de nutrientes a los órganos más vitales a expensas de los demás, lo que tiene consecuencias irreversibles en la formación y diferenciación de los tejidos.

Nuestros resultados muestran que la alimentación con una dieta isocalórica baja en proteínas en ratas gestantes produce retraso del crecimiento intrauterino en las crías, evidenciado por el bajo peso al nacer. La insuficiencia ponderal al nacimiento es considerado el principal factor de riesgo individual para el desarrollo de enfermedades metabólicas en la vida adulta^{75, 76}; sin embargo, la nutrición y la tasa de crecimiento durante la vida postnatal temprana pueden modular el riesgo adquirido en la gestación, dado que algunos órganos continúan su maduración fuera del útero⁷⁷.

Durante la lactancia, las ratas madres del grupo R disminuyeron su ingesta alimentaria (FIGURA 11B.), algo que no había sido reportado previamente en modelos de RPM al 8% y 10%. Las razones por las que esto ocurre no son claras, pero probablemente es debido a la fuente de carbohidratos compensatorios en la dieta. Se ha reportado que, bajo cierto límite, la compensación con sacarosa en dietas bajas en proteínas puede producir aversión al alimento en ratas durante el embarazo y/o la lactancia^{78, 79}. De esta forma, en el periodo de lactancia, las madres R enfrentaron una restricción proteínica y energética de manera simultánea.

Aunado a lo anterior, el análisis composicional de la leche materna al destete no mostró diferencia en el porcentaje de carbohidratos, lípidos y proteínas en la leche producida por las madres de los grupos R y C (TABLA 5), lo que sugiere que las madres malnutridas agotan todos los recursos disponibles para poder brindar a sus crías leche de buena calidad, por lo que el detrimento en peso y específicamente en tejido magro observado en estos animales era de esperarse.

Sin embargo, pese a los esfuerzos de las madres R por cubrir los rezagos de la malnutrición en la descendencia, las crías R mantuvieron una tasa de crecimiento menor que las crías C durante la lactancia (FIGURA 12). Esto nos habla de que, si bien la composición gruesa de la leche materna

fue similar entre las madres R y C, deben existir otras formas en que la madre comunique a sus crías la escasez de nutrimentos en el medio, como podrían ser la modificación del perfil de ácidos grasos o aminoácidos indispensables en la leche, ya que, si la madre no los obtiene en cantidades suficientes de la dieta, no puede entregarlos a la cría y debe sustituirlos en la leche por aquellos nutrimentos que sí puede sintetizar.

De esta forma, los efectos de la programación *in utero* y los estímulos de la dieta durante la lactancia pueden provocar ajustes en el fenotipo de las crías que se vuelven permanentes. Una prueba de esto es el hecho de que las crías R mantuvieron un peso corporal reducido en el día P180, aun considerando que estos animales recibieron una dieta completa (*Chow*) a partir del destete.

Como era de esperarse, la RPM también provocó cambios en el desarrollo de órganos viscerales, evidenciados por la disminución del peso de hígado, riñón y páncreas con respecto al cerebro. Reportes previos indican que la reducción del tamaño de los órganos es el reflejo de cambios estructurales y metabólicos finos, que pueden ser irreversibles¹⁰. Así, a pesar de que en el día P180 se observó que el peso relativo de los órganos fue similar entre los grupos R y C, se considera que su función se encuentra comprometida, ya que, de acuerdo con la literatura, las crías del modelo de RPM durante la gestación y la lactancia presentan resistencia a la insulina hepática, hígado graso y disfunción renal en la vida adulta^{10, 30, 38}.

Otra de las alteraciones detectadas en el fenotipo de la descendencia fue la modificación de su composición corporal. En el período P28, el porcentaje de grasa de las crías R incrementó, mientras que la cantidad de tejido magro se redujo con respecto a C (TABLA 7). Esto nos habla de diferencias en la programación de los adipocitos y las fibras musculares, que puede tener repercusiones en la vida posterior. Por ejemplo, se ha reportado que la RPM aplicada en la gestación y la lactancia altera el balance entre el tipo de fibras musculares, y que esta alteración se mantiene en ratas adultas⁸². Sin embargo, llama la atención que en el día P180 las crías del grupo R no incrementaron la cantidad de tejido graso, mientras que el grupo C tuvo un aumento de ~12%. Esto resulta interesante porque ambos grupos recibieron la misma dieta a partir del destete y no se encontró diferencia entre la cantidad de alimento ingerida por cada grupo. En ese sentido, cabe mencionar que las dietas administradas durante la gestación y la lactancia contenían

caseína como fuente de proteína y la dieta administrada posteriormente fue preparada con proteína de origen vegetal.

Respecto a los parámetros bioquímicos, se esperaba que las crías R de P28 mostraran alteraciones en el perfil de lípidos respecto al grupo C, esto al considerar que el incremento en la adiposidad (TABLA 7) está asociado con concentraciones altas de colesterol y triglicéridos en sangre⁸³; sin embargo, aunque estos parámetros tienden a ser ligeramente mayores en las crías R, no fueron estadísticamente diferentes. En este caso debe considerarse que el estudio de composición corporal que realizamos no proporciona información del tipo de tejido adiposo que poseen nuestros animales (visceral o subcutáneo) o de su organización (hiperplásico o hipertrófico), por lo que resulta necesario realizar más estudios para mejorar nuestro entendimiento de la relación entre el aumento de adiposidad y la concentración de lípidos en sangre.

Interesantemente, las crías R de P28 y P180 presentaron concentraciones de glucosa e insulina sérica ligeramente menores que el grupo C (TABLA 8), lo que sugiere que en estas edades las crías R aun presentan buen control de la glucosa en sangre. Esto fue soportado por los resultados del ensayo de tolerancia a la glucosa oral efectuados en P180, donde se observa que el área bajo la curva del grupo R tiende a ser menor que la del grupo C (FIGURA 13). Se ha reportado que las crías del modelo de RPM presentan hipersensibilidad a la insulina al inicio de la vida²⁴, la cual se pierde progresivamente con la edad, pasando por un estado de sensibilidad equivalente al control y posteriormente a la resistencia a la insulina⁸⁵. No obstante, los mecanismos involucrados siguen siendo desconocidos.

Dado que los animales jóvenes se caracterizan por poseer gran plasticidad, en esta tesis se decidió inducir estrés en las crías para generar una respuesta metabólica forzada. Entre varios estímulos reportados en la literatura, como el ejercicio intenso o el tratamiento térmico, se eligió la exposición aguda al frío porque es una condición fácil de controlar y reproducir que induce cambios en el metabolismo energético convenientes para nuestros objetivos (estimulación de la respiración mitocondrial).

En ese sentido, cuando los animales se expusieron a bajas temperaturas, los valores de insulina sérica de las crías RF fueron menores que los de las crías CF en P28 y P180 (TABLA 8). Esto denota que la malnutrición en edades tempranas genera un defecto en la secreción de insulina por

las células β en condiciones estresantes, el cual es persistente. La falla secretora de las células β en el modelo de RPM en respuesta a un reto había sido descrito previamente *in vitro*. Por ejemplo, en un experimento realizado por nuestro grupo de investigación, se observó que la secreción de insulina por islotes pancreáticos aislados de crías R de P28 disminuye al ser expuestos a altas concentraciones de glucosa (manuscrito en preparación). Esto pone de manifiesto la utilidad del modelo de exposición al frío, ya que permitió identificar cambios en la secreción de insulina *in vivo* en respuesta a un reto.

En P28, aunque los valores de insulina son mucho menores para RF que para CF las concentraciones de glucosa de RF se mantienen en rangos normales, lo que indica que en esta edad no hay resistencia a la insulina. No obstante, en P180, la falla en la secreción de insulina del grupo RF se acompañó de un aumento en la concentración de glucosa en sangre. Es probable que estos cambios en la concentración de glucosa reflejen una disminución de la sensibilidad a la insulina en las crías R de P180. Se sabe que durante la exposición al frío la adrenalina dirige la liberación de glucosa hepática para incrementar los sustratos disponibles para realizar termogénesis y que esta glucosa debe ser regulada por la insulina. En las crías C de P180, la cantidad de insulina liberada es suficiente para controlar la glucosa plasmática, en cambio, en las crías RF de la misma edad, la falla en la secreción de insulina provoca que la glucosa secretada se mantenga en circulación y se observe un aumento en la concentración de glucosa sérica. En el día P28 no se observó este cambio en respuesta al frío, posiblemente porque en esta edad existen otros mecanismos que podrían ayudar a mantener la sensibilidad a la hormona. En conjunto, nuestras observaciones sugieren que la combinación entre la falla secretora y la disminución de la sensibilidad a la hormona podría dirigir a los animales R a la hiperglicemia. Esto cobra importancia al considerar que los animales de P180, aunque son adultos no han alcanzado la vejez.

Por otro lado, es interesante observar que la RPM no afectó la concentración de albúmina en suero en las crías de P28, teniendo en cuenta que este parámetro ayuda a evaluar la desnutrición; sin embargo, el estudio de crías con restricción dietaria materna al 55%, tampoco muestran cambios en dicho parámetro (manuscrito en preparación). Esto sugiere que a pesar de que la malnutrición materna es muy severa, las crías se han adaptado al suministro reducido de aminoácidos.

Los trastornos o las fallas que se han observado en el modelo de restricción proteínica materna son diversos, pero afectan a órganos primordiales. Debido a nuestro interés en el metabolismo de carbohidratos, en este estudio buscamos evaluar algunos de los órganos involucrados en el mismo. Para este estudio se decidió evaluar el hígado y el riñón. El hígado, tiene un papel único en la regulación de la glucosa en sangre después de una ingesta y es responsable de la liberación de glucosa al torrente sanguíneo en ayunas para cubrir las necesidades de los tejidos dependientes de glucosa, especialmente del cerebro¹⁰¹. El riñón, por otro lado, está involucrado en la regulación de la homeostasis de la glucosa a través de la gluconeogénesis y posterior liberación de glucosa a la circulación, la absorción de glucosa de la circulación para satisfacer sus necesidades energéticas; y por la reabsorción de la glucosa del filtrado glomerular¹⁰². Lamentablemente, en esta tesis no fue posible evaluar el efecto de la RPM en las células β porque el tamaño del páncreas de las crías R de P28 es tan escaso, que resultó inviable.

En los tejidos seleccionados, la evaluación de la expresión a nivel de mensajero de los genes AMPK y mTOR mostró que la RPM durante la gestación y la lactancia conlleva a la reducción del transcrito de estos sensores en el día P28 (FIGURA 14). En hígado se observó que la reducción en la expresión obtenida en P28 se mantiene en la vida adulta (P180). Este comportamiento se apega a lo expuesto en el concepto de programación, que hace referencia a cambios efectuados en respuesta a un insulto aplicado en periodos críticos del desarrollo que permanecen aun cuando el estímulo que los inició ha desaparecido⁹. En nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se explora la expresión de estos sensores energéticos en un modelo de malnutrición fetal y perinatal.

Se debe mencionar que la disminución en los niveles de RNAm de estos genes no revela los cambios en la expresión de la proteína y mucho menos pueden extrapolarse como actividad, pero revelan uno de los elementos que podría participar en la adaptación a la disponibilidad limitada de nutrientes. En ese sentido, sería conveniente estudiar la actividad de AMPK y del complejo mTOR, así como el patrón de metilación de los genes que codifican estas proteínas en busca de mecanismos que respalden nuestras observaciones.

Es posible que la expresión reducida de AMPK observada en las crías R evite que la célula se mantenga en un estado de estrés permanente por deficiencia de energía. En general, la carencia energética, reflejada por el incremento en la concentración de AMP, provoca la activación de

AMPK, conllevando a la inhibición de vías anabólicas y a la activación de vías catabólicas para la generación de ATP⁸⁶. Si el estrés energético se mantiene por un periodo largo de tiempo, la célula debe asimilar que no se trata de un estado transitorio de depleción de energía sino de un nuevo estatus energético. En ese sentido, se podrían determinar los niveles de AMP, ADP y ATP en el hígado de crías R a lo largo de la gestación y la lactancia para obtener información que apoye esta hipótesis.

El complejo mTOR, por otro lado, integra estímulos de al menos cinco principales señales intracelulares y extracelulares: factores de crecimiento, estrés, estado energético, oxígeno y aminoácidos para controlar muchos procesos importantes, incluida la síntesis de proteínas, el crecimiento celular y la proliferación⁸⁷. La restricción proteínica y energética están asociadas con la inactivación de este complejo, sin embargo, la información disponible del efecto de estos estímulos nutrimentales en la expresión del gen mTOR a nivel de mensajero es limitada. No obstante, la reducción sostenida de la expresión de mTOR observada en nuestro modelo correlaciona con el retraso en el crecimiento permanente de las crías R.

Con el tratamiento en frío, se observó que las crías CF de P28 triplican la expresión de AMPK en hígado y que las crías RF, aunque tienen una menor expresión basal de AMPK, responden de forma proporcional. En cambio, al estudiar a los animales de P180 observamos que las crías del grupo R han disminuido su capacidad de responder al estímulo del frío, pues el incremento en la expresión de AMPK fue menor en comparación con el grupo CF de P180. Respecto a mTOR, observamos que el frío no provocó cambios en los niveles de RNAm para los grupos CF y RF de ambas edades, lo que sugiere que, si mTOR participa en la respuesta a la exposición aguda al frío, esto no ocurre por la modificación del número de copias de RNAm de este gen.

En P28, el patrón de expresión de riñón en condiciones de estrés por frío fue diferente respecto a hígado. En el riñón de crías CF ni RF de P28 no se detectó sobreexpresión de AMPK por efecto del frío, probablemente porque a esta edad la importancia del riñón en el mantenimiento de la temperatura corporal es menor que la del hígado. Sorpresivamente, en P180 sí se observó una elevación de la expresión de AMPK por el frío para CF y RF, lo que indica que el riñón responde de manera diferente en P28 y P180. Estas observaciones merecen mayor exploración para conocer las posibles razones de esta diferencia.

La función mitocondrial es uno de los procesos más importantes que es regulado por AMPK y el complejo mTOR^{6, 60, 86}. El funcionamiento normal de la mitocondria es primordial para el mantenimiento de la producción de ATP requerido para llevar a cabo diversos procesos metabólicos. La disfunción mitocondrial, además de impactar la relación ATP/ADP, conduce al aumento en la producción de ROS, capaces de generar estrés oxidante. El consecuente daño oxidante está involucrado en la patogénesis de diversas enfermedades⁵⁰.

La evaluación de la capacidad respiratoria y la generación de potencial de membrana de mitocondrias aisladas de hígado y riñón de crías de P28, reveló que no existieron diferencias en estos parámetros entre las crías R y C. Este resultado fue muy interesante, porque se esperaba que una restricción proteínica tan severa causara cambios marcados en la función mitocondrial, lo que demuestra la elevada capacidad adaptativa de las mitocondrias.

Sin embargo, algo sobresaliente en este trabajo es que el estudio de las mitocondrias de crías de P28 expuestas al frío reveló alteraciones tejido-específicas en la respuesta por las mitocondrias de las crías R.

9.1. Hígado

Las mitocondrias hepáticas de los animales R y C de P28 tuvieron velocidades de respiración similares. La aplicación de estrés por frío demostró la incapacidad de las mitocondrias hepáticas de las crías RF de P28 para responder de la misma forma que las crías CF. Nuestros resultados muestran que, en esta edad, las mitocondrias de hígado de las crías CF experimentan un incremento en la velocidad del EDO3 con respecto a las crías C, pero que las crías RF mantienen velocidades de consumo de oxígeno similares a las crías R. Interesantemente, cuando estos animales se hicieron adultos, observamos que las mitocondrias hepáticas del grupo R presentaron un ICR menor que las crías C, que fue causado por la reducción del EDO3. Cabe mencionar que este comportamiento también se observó entre los grupos RF y CF de P180.

Así, la falla en la respuesta de las mitocondrias hepáticas de P28 y la disminución de la función mitocondrial observada en P180 tienen como factor común la disminución del EDO3 respiratorio, lo que nos permite especular que este cambio podría ser consecuencia de la programación fetal y neonatal. La razón por la que estos defectos sólo son evidentes cuando las crías son sometidas a estrés o al aumentar la edad podría relacionarse con la existencia de mecanismos compensatorios durante la infancia, que buscan mantener una adecuada generación

de energía, evitar la sobreproducción de ROS u otras consecuencias graves de la disfunción mitocondrial, como la apoptosis. Sin embargo, estos mecanismos compensatorios no son suficientes para igualar la respuesta de un organelo funcional en condiciones de estrés y podrían disminuir con la edad.

Se sabe que las variaciones en la velocidad del EDO3 están relacionadas principalmente con la oxidación de sustratos (incluyendo el ingreso y procesamiento de los sustratos, la actividad de los complejos del sistema de transporte de electrones, y el tamaño del pool de ubiquitina y citocromo *c*), mientras que el EDO4 es controlado predominantemente por la fuga de protones y por la presencia de ATPasas contaminantes³. Así, es posible que la programación del hígado en respuesta a la baja disponibilidad de nutrientes incluya la modificación de la expresión y/o actividad de los componentes del sistema de transporte de electrones y esto resulte en la disminución del EDO3 respiratorio.

Interesantemente, la disminución del EDO3 en P28 fue significativa al alimentar el sistema de transporte de electrones por el complejo I, pero mantuvo la misma tendencia al alimentar por el complejo II. Esto sugiere que la RPM puede provocar cambios en la expresión, importación o ensamblaje del CI, que derivan en la reducción de su actividad, pero que los defectos observados en el EDO3 no se asocian exclusivamente a este complejo. Por tal razón, podrían existir modificaciones en otros componentes del sistema de transporte de electrones que contribuyan a la reducción del EDO3. Por ejemplo, la literatura señala que la RPM al 10% provoca la reducción del pool de coenzima Q en crías adultas y que la suplementación con esta molécula retrasa el acortamiento telomérico inducido por aumento del estrés oxidante⁹².

La menor respiración en el EDO3 también puede estar asociada con la síntesis de ATP alterada. Para determinar si la ATP sintasa representaba un blanco potencial de la programación, se estudió su actividad, sin embargo, no se encontraron diferencias en la actividad de la enzima asociadas al tipo de dieta materna.

Dado que el defecto en la respiración de las crías de P28 solamente fue detectado en condiciones de estrés por frío, la restricción proteínica materna podría estar afectando alguno de los mecanismos involucrados en la respuesta a dicho estímulo. Entre los mecanismos de respuesta mitocondrial descritos para la exposición aguda al frío se encuentran la formación de crestas mitocondriales (ensamblaje de supercomplejos), la fusión y la biogénesis mitocondrial.^{24, 29}

AMPK regula positivamente estos mecanismos. La disminución en la expresión hepática de AMPK observada en nuestro modelo correlaciona con la falta de respuesta de las mitocondrias de hígado del grupo R al frío, lo que nos permite especular que la RPM también podría estar impactando la actividad de esta enzima y a su vez alguno de los mecanismos mencionados.

Cabe mencionar que, aunque la formación de crestas, la fusión y la biogénesis mitocondriales se hiperactivan en condiciones de estrés energético, su papel en condiciones basales no es menos importante, ya que se encargan de mantener la integridad de la red mitocondrial. En este sentido, la reducción sostenida de la expresión de AMPK del grupo R entre P28 y P180 podría verse reflejada en la desregulación de dichos mecanismos a largo plazo y contribuir a la disminución de la capacidad respiratoria de las mitocondrias hepáticas observada en el día P180.

La disfunción mitocondrial en hígado ha sido relacionada con la resistencia a la insulina en este órgano⁸⁸, a pesar de que continúa siendo debatible si la función mitocondrial antecede a la resistencia a la insulina o es el caso contrario. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan que la disfunción mitocondrial hepática ocurre previo a la resistencia a la hormona, ya que, como se comentó previamente, en el día P180 existe una respuesta adecuada a la insulina.

9.2. Riñón

Las mitocondrias renales de las crías R no mostraron defectos significativos en su capacidad respiratoria en las dos edades estudiadas. Considerando que hay reportes de que las crías del modelo de RPM presentan hipertensión desde el nacimiento, lesión glomerular y pérdida de la función renal en la adultez y estas condiciones son posiblemente mediadas por estrés oxidante, se esperaba encontrar mitocondrias con capacidad respiratoria fuertemente afectada.

Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, las crías del grupo R tendieron a tener mejor ICR que las crías C durante la infancia, pero durante la vida adulta hubo una tendencia a la disminución de este parámetro. A diferencia de lo observado en hígado, en riñón no se detectaron cambios en la velocidad del EDO3, y los cambios en el ICR fueron relacionados con alteraciones al EDO4. En las crías R de P28, la velocidad del EDO4 tendió a ser menor respecto a C, pero en P180, la tendencia se invirtió. Esto correlaciona con los resultados obtenidos para la expresión a nivel de mensajero del gen UCP2 de las crías R, en los cuales se observa una disminución de la expresión en P28 y un incremento significativo hacia P180. Esto sugiere que el grupo R presenta desacoplamiento reducido al final del estímulo, que se torna en un desacoplamiento inducido en

la vida adulta. No obstante, es necesario evaluar si las diferencias encontradas en la expresión de UCP2 se mantienen a nivel de proteína.

La reducción del EDO4 en el día P28 podría representar un mecanismo por el cual se busca optimizar la eficiencia de la fosforilación oxidativa ante la baja disponibilidad de nutrientes. Un menor desacople indica que la energía potencial será empleada casi exclusivamente para la síntesis de ATP.

La menor expresión de UCP2 en P28 correlaciona con el decremento del mRNA de AMPK en este tejido. Se sabe que la activación de AMPK produce un incremento de la expresión mitocondrial de UCP2^{98, 99}. Es posible que, en nuestro modelo, la reducción de la expresión renal de AMPK en P28 resulte en el decremento de la expresión de UCP2 y esto a su vez conlleve a la reducción del EDO4 a esta edad.

La sobreexpresión renal de UCP2 en P 180, por otro lado, ha sido descrita también en el riñón de crías de 3 meses del modelo de RPM aplicado solamente durante la gestación , así como en el páncreas de crías del mismo modelo^{71, 76}. La mayor expresión de UCP2 también asemeja lo descrito en modelos de sobrealimentación en ratas. Cuando los animales se enfrentan a un suministro de sustrato abundante, que excede los requerimientos de energía celular, aumenta la probabilidad de formación de ROS. Para evitar esto, las células activan vías que no están acopladas de manera eficiente a la síntesis de ATP, como el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa por UCP2. Así, en nuestro modelo podría ocurrir algo similar, ya que las crías fueron programadas para un suministro nutrimental y energético menor al que les otorga la dieta *Chow* (administrada a partir del destete), de forma que, la dieta que se consideraría completa para las crías C, podría resultar excesiva para las crías R. Aunado a lo anterior, la literatura indica que las crías del modelo de RPM presentan hiperfagia, considerando su peso corporal reducido²⁴. Así, el incremento en la expresión de UCP2 podría ser consecuencia de la alimentación con una dieta completa.

A la fecha no existen reportes en la literatura donde se aborde el efecto que puede tener la sobreexpresión de UCP2 en la función renal. Sin embargo, se sabe que la sobreexpresión de UCP2 puede causar disminución del potencial de membrana, menor producción de ATP y conducir a la reducción del número de mitocondrias¹⁰⁰.

En conjunto, nuestros resultados muestran que la RPM provoca cambios en la capacidad de respuesta de las mitocondrias hepáticas y renales que son tejido específicas, sin embargo, no conocemos las razones por las que esto ocurre. Probablemente esto se relaciona con el uso preferencial de sustratos, la demanda energética específica, el nivel de regulación por sensores energéticos y la respuesta a hormonas de cada órgano.

10. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que una dieta materna baja en proteínas durante la gestación y la lactancia altera la capacidad respiratoria de las mitocondrias hepáticas y renales de forma tejido-específica, pero que las deficiencias funcionales de la mitocondria sólo se hacen evidentes cuando las crías son sometidas a estrés.

Los parámetros bioquímicos y hormonales evaluados revelaron que las crías de madres sometidas a restricción proteínica durante la gestación y la lactancia no muestran indicios de afectaciones en el metabolismo de lípidos o carbohidratos en las edades estudiadas. En el día P180, las crías R incluso poseen una mejor respuesta a la insulina que las crías C. Indicando la plasticidad de los organismos para la adaptación y exponiendo la necesidad de buscar biomarcadores más sensibles y específicos para este tipo de estudios.

La restricción proteínica materna durante la gestación y la lactancia provoca cambios en la expresión a nivel de mensajero de AMPK, mTOR y UCP2. Para AMPK y mTOR, la disminución de la expresión hepática permanece tiempo después de acabado del insulto. Sin embargo, la proteína desacoplante UCP2, incrementa su expresión al aumentar la edad de las crías.

La disminución de la función mitocondrial ocurre antes de la aparición de los desórdenes metabólicos reportados para las crías del modelo de RPM, por lo cual es importante determinar si la programación de la función mitocondrial es causante del desarrollo de dichos desórdenes metabólicos.

12. MATERIALES SUPLEMENTARIOS

Autorización del comité de ética



FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO
OFICIO/FQ/CICUAL/110/15
ASUNTO: Aprobación de Protocolo

DRA. MARTA MENJÍVAR IRAHETA
BIOLOGÍA
Presente

Por medio de la presente le informamos que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Química, UNAM, ha revisado el Protocolo con el título:

“Efecto de la restricción proteínica materna sobre la expresión pancreática en crías macho en la etapa postnatal”

Emitiendo el dictamen de: **APROBADO**

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

Atentamente
“POR MÍ RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, D. F. a 28 de Septiembre del 2015

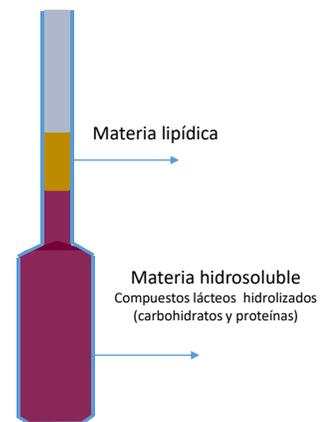
M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora
Presidenta del CICUAL

Metodología: A 1.0 mL de una dilución 1:100 de la muestra, se adicionó 1.0 mL del reactivo de DNS y se calentó por 5 min en un baño de agua hirviente. Posteriormente se enfrió y diluyó con 10 mL de agua destilada. Finalmente, se midió la absorbancia de la muestra a 540 nm frente a un blanco de reactivos y agua tratado igual que la muestra, y se interpoló en una curva estándar construida con diferentes concentraciones de lactosa.

12.2.2. Determinación de grasa butírica en leche por el método de Gerber

Fundamento: Este método se basa en la digestión parcial de los componentes de la leche en ácido sulfúrico. Emplea alcohol isoamílico para ayudar a romper la emulsión de la leche y favorecer la separación de la fase grasa.

Metodología: En el bulbo de un capilar de vidrio se mezclaron: 100 μL de ácido sulfúrico concentrado, 110 μL de muestra y 10 μL de alcohol isoamílico. Posteriormente, el bulbo se incubó a 70°C por 10 minutos y se centrifugó a 1100 rpm por 2 minutos. Por último, se midió el volumen de la fase grasa obtenida con ayuda de una jeringa de vidrio de 10 μL .



12.2.3. Determinación de proteínas en leche por el método de micro-Kjeldhal

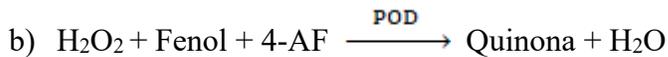
Fundamento: El método se basa en la determinación de la cantidad de Nitrógeno orgánico mediante la descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado y la cuantificación de la cantidad de amoníaco generada. Durante el proceso de descomposición, el nitrógeno orgánico es transformado a amoníaco, el cual es retenido en la disolución como sulfato de amonio.

En la mezcla de digestión se adicionan sulfato de sodio y sulfato de cobre, como catalizadores. El amoníaco en la muestra se destila y es retenido en ácido bórico para su posterior valoración.

12.3. Pruebas bioquímicas

12.3.1. Determinación de glucosa en suero (Glucosa LQ, SPINREACT)

Fundamento: La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, el fenol, 4-aminofenazona (4-AF), en presencia de la peroxidasa (POD):



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

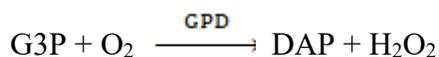
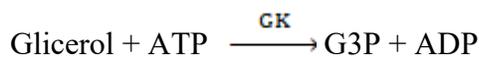
Metodología:

En un tubo de ensaye se mezclaron 10.0 µL de suero y 1.0 mL de reactivo. El blanco se preparó usando 10.0 µL de agua destilada. Se midió la absorbancia a 550 nm después de incubar 20 minutos a temperatura ambiente. La concentración de glucosa en la muestra se calculó como:

$$\frac{(A)\text{Muestra}}{(A)\text{Patrón}} \times \text{conc. patrón} \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de glucosa en la muestra}$$

12.3.2. Determinación de triglicéridos en suero (Triglicéridos-LQ, SPINREACT)

Los triglicéridos incubados con lipoproteínlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerol quinasa (GK) en presencia de ATP para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosin-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por la glicerolfosfato deshidrogenasa (GPD). Al final, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:





La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

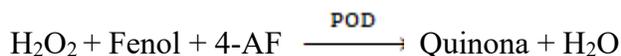
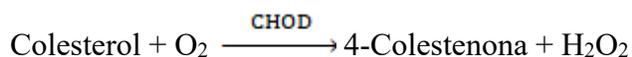
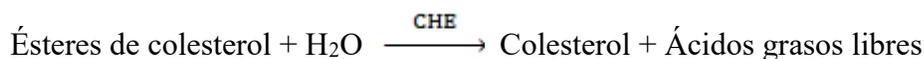
Metodología:

En un tubo de ensaye se mezclaron 10.0 μL de suero y 1.0 mL de reactivo. El blanco se preparó usando 10.0 μL de agua destilada. Se midió la absorbancia a 550 nm después de incubar 20 minutos a temperatura ambiente. La concentración de glucosa en la muestra se calculó como:

$$\frac{(\text{A})\text{Muestra}}{(\text{A})\text{Patrón}} \times \text{conc. patrón} = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de triglicéridos en la muestra}$$

12.3.3. Determinación de colesterol en suero (Colesterol-LQ, SPINREACT)

Los ésteres de colesterol de las proteínas de baja densidad (LDL), las de muy baja densidad (VLDL) y los quilomicrones son hidrolizados por la colesterol esterasa (CHE), liberando colesterol y ácidos grasos. El colesterol es oxidado por la enzima colesterol oxidasa a colestenoína con la correspondiente producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada.

Metodología:

En un tubo de ensaye se mezclaron 10.0 μL de suero y 1.0 mL de reactivo. El blanco se preparó usando 10.0 μL de agua destilada. Se midió la absorbancia a 550 nm después de incubar 20 minutos a temperatura ambiente. La concentración de colesterol en la muestra se calculó como:

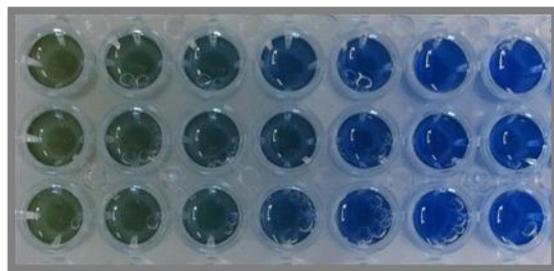
$$\frac{(A)\text{Muestra}}{(A)\text{Patrón}} \times \text{conc. patrón} = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de colesterol en la muestra}$$

12.4. Cuantificación de proteína mitocondrial por el método de Bradford

Fundamento: El método se basa en la unión del colorante azul de Coomassie brillante G250 (CBBG) a las proteínas. La forma catiónica del colorante, que predomina en la solución ácida del reactivo, muestra una coloración parda con un λ máximo de 470 nm. Por el contrario, la forma aniónica del colorante, que se une a la proteína, es de color azul con un λ_{max} de 595 nm. Por tanto, la cantidad de colorante unido a la proteína puede cuantificarse midiendo la absorbancia de la solución a 595 nm.

El colorante parece unirse más fácilmente a la arginina y a los residuos aromáticos de las proteínas, pero no se une a los aminoácidos libres.

Metodología: Para la cuantificación de la proteína mitocondrial se construyó una curva estándar de albúmina sérica bovina en un intervalo de 20 a 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ usando 40 μL de reactivo de Bradford (BIORAD) con 160 μL de la dilución correspondiente. El análisis de la muestra problema se realizó usando 5-10 μL de una dilución 1:10 de la fracción mitocondrial y llevando a 160 μL con agua destilada.



13. REFERENCIAS

1. Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., and Vecsei, L. (2007) Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders, *Journal of the neurological sciences* 257, 221-239.
2. Veltri, K. L., Espiritu, M., and Singh, G. (1990) Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs, *Journal of cellular physiology* 143, 160-164.
3. Youle, R. J., and van der Bliek, A. M. (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress, *Science* 337, 1062-1065.
4. Bratic, I., and Trifunovic, A. (2010) Mitochondrial energy metabolism and ageing, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797, 961-967.
5. Wallace, D. C., Fan, W., and Procaccio, V. (2010) Mitochondrial Energetics and Therapeutics, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5, 297-348.
6. Nicholls, D. G., and Ferguson, S. J. (2003) 5 - Respiratory chains, In *Bioenergetics (Third Edition)*, pp 89-XIII, Academic Press, London.
7. Sivitz, W. I., and Yorek, M. A. (2010) Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities, *Antioxidants & Redox Signaling* 12, 537-577.
8. Nicholls, D. G., and Ferguson, S. J. (2003) 3 - Quantitative bioenergetics: The measurement of driving forces, In *Bioenergetics (Third Edition)*, pp 31-55, Academic Press, London.
9. Chance, B., and Williams, G. R. (1955) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization, *The Journal of biological chemistry* 217, 383-393.
10. Brand, Martin D., and Nicholls, David G. (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells, *Biochemical Journal* 435, 297-312.
11. Nicholls, D. G. (2001) A history of UCP1, *Biochem Soc Trans* 29, 751-755.
12. Cannon, B., Shabalina, I. G., Kramarova, T. V., Petrovic, N., and Nedergaard, J. (2006) Uncoupling proteins: A role in protection against reactive oxygen species—or not?, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757, 449-458.
13. Houšťek, J., Pícková, A., Vojtíšková, A., Mráček, T., Pecina, P., and Ješina, P. (2006) Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757, 1400-1405.
14. Brand, M. D. (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production, *Experimental gerontology* 45, 466-472.
15. Gvozdjáková, A. (2008) *Mitochondrial Medicine. Mitochondrial metabolism, disease diagnosis and therapy.*, Springer Science & Business Media.
16. Schaffer, S. W., Suleiman, M. Saadeh (2007) *Mitochondria. The dynamic organelle.*, Springer.
17. Andersen, J. K. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?, *Nature medicine* 10 Suppl, S18-25.
18. Verdin, E., Hirschey, M. D., Finley, L. W. S., and Haigis, M. C. (2010) Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling, *Trends in Biochemical Sciences* 35, 669-675.
19. Zong, H., Ren, J. M., Young, L. H., Pypaert, M., Mu, J., Birnbaum, M. J., and Shulman, G. I. (2002) AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 15983.
20. Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., and Spiegelman, B. M. (1999) Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1, *Cell* 98, 115-124.

21. Fernandez-Marcos, P. J., and Auwerx, J. (2011) Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis, *The American journal of clinical nutrition* 93, 884S-890S.
22. Cunningham, J. T., Rodgers, J. T., Arlow, D. H., Vazquez, F., Mootha, V. K., and Puigserver, P. (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1–PGC-1 α transcriptional complex, *Nature* 450, 736.
23. Cunningham, J. T., Rodgers Jt - Arlow, D. H.-V., F., - Mootha, V. K., Mootha Vk Fau - Puigserver, P., and Puigserver, P. (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex, *Nature*.
24. Psarra, A. M., and Sekeris, C. E. (2008) Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria, *IUBMB life* 60, 210-223.
25. Harper, M. E., and Seifert, E. L. (2008) Thyroid hormone effects on mitochondrial energetics, *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 18, 145-156.
26. Lee, H.-S. (2015) Impact of Maternal Diet on the Epigenome during In Utero Life and the Developmental Programming of Diseases in Childhood and Adulthood, *Nutrients* 7, 9492-9507.
27. Lucas, A. (1991) Programming by early nutrition in man, *Ciba Foundation symposium* 156, 38-50; discussion 50-35.
28. Desai, M., and Hales, C. N. (1997) Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life, *Biological Reviews* 72, 329-348.
29. Hales, C. N., and Barker, D. J. (2001) The thrifty phenotype hypothesis, *British medical bulletin* 60, 5-20.
30. Blanc, A. K., and Wardlaw, T. (2005) Monitoring low birth weight: an evaluation of international estimates and an updated estimation procedure, *Bulletin of the World Health Organization* 83, 178-185.
31. Ravelli Gp - Stein, Z. A., and - Susser, M. W. (1976) Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy, *The New England Journal of Medicine*.
32. Ravelli, A., van der Meulen, J., Michels, R. P. J., Osmond, C., Barker, D. J. P., Hales, C., and Bleker, O. (1998) Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine, *Lancet* 351, 173-177.
33. Barker, D. J., and Winter Pd - Osmond, C.-M., B. - Simmonds, S. J. (1989) Weight in infancy and death from ischaemic heart disease, *Lancet*.
34. Victora, C. G., Adair, L., Fall, C., Hallal, P. C., Martorell, R., Richter, L., Sachdev, H. S., for the, M., and Child Undernutrition Study, G. (2008) Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital, *Lancet* 371, 340-357.
35. Law, C. M., and Shiell, A. W. (1996) Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature, *Journal of Hypertension* 14, 935-942.
36. Hua, Q., Tan, J., Liu, Z. H., Liu, R. K., and Yang, Z. (2007) [A cohort study on the correlation between birth weight, simple obesity, blood lipids, blood glucose and blood pressure from childhood to adolescence], *Zhonghua nei ke za zhi* 46, 923-925.
37. White, S. L., Perkovic, V., Cass, A., Chang, C. L., Poulter, N. R., Spector, T., Haysom, L., Craig, J. C., Salmi, I. A., Chadban, S. J., and Huxley, R. R. (2009) Is low birth weight an antecedent of CKD in later life? A systematic review of observational studies, *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 54, 248-261.
38. Raqib, R., Alam, D. S., Sarker, P., Ahmad, S. M., Ara, G., Yunus, M., Moore, S. E., and Fuchs, G. (2007) Low birth weight is associated with altered immune function in rural Bangladeshi children: a birth cohort study, *The American journal of clinical nutrition* 85, 845-852.
39. Fall, C. H. (2013) Fetal malnutrition and long-term outcomes, *Nestle Nutrition Institute workshop series* 74, 11-25.

40. Vuguin, P. M. (2007) Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease, *Hormone research* 68, 113-123.
41. Hernández LG, M. C., Aranda BR. (2012) Determinantes económicos: Evolución del costo de las calorías en México, In *Obesidad en México. Recomendaciones para una política de Estado*. (Rivera J, H. M., Aguilar SCA, Vadillo OF, Murayama RC, Ed.), pp 145-164, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
42. Müller, O., and Krawinkel, M. (2005) Malnutrition and health in developing countries, *CMAJ : Canadian Medical Association Journal* 173, 279-286.
43. Zambrano, E., Cj, B., M, D., Martinez-Samayoa, P. M., Gonzalez-Zamorano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F., and Nathanielsz, P. W. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat.
44. Hales, C. N., and Ozanne, S. E. (2003) The dangerous road of catch-up growth, *The Journal of Physiology* 547, 5-10.
45. Langley-Evans, S. C., Phillips, G. J., and Jackson, A. A. (1994) In utero exposure to maternal low protein diets induces hypertension in weanling rats, independently of maternal blood pressure changes, *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 13, 319-324.
46. Langley-Evans, S. C., and Jackson, A. A. (1995) Captopril normalises systolic blood pressure in rats with hypertension induced by fetal exposure to maternal low protein diets, *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology* 110, 223-228.
47. Sathishkumar, K., Elkins, R., Yallampalli, U., and Yallampalli, C. (2009) Protein Restriction during Pregnancy Induces Hypertension and Impairs Endothelium-Dependent Vascular Function in Adult Female Offspring, *Journal of Vascular Research* 46, 229-239.
48. Qasem, R. J., Li, J., Tang, H. M., Pontiggia, L., and D'Mello A, P. (2016) Maternal protein restriction during pregnancy and lactation alters central leptin signalling, increases food intake, and decreases bone mass in 1 year old rat offspring, *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 43, 494-502.
49. Erhuma, A., Salter, A. M., Sculley, D. V., Langley-Evans, S. C., and Bennett, A. (2007) Prenatal exposure to a low protein diet programmes disordered regulation of lipid metabolism in the ageing rat, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 292, E1702-E1714.
50. Langley-Evans, S. C., Welham, S. J., and Jackson, A. A. (1999) Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat, *Life sciences* 64, 965-974.
51. Warner, M. J., and Ozanne, S. E. (2010) Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease, *The Biochemical journal* 427, 333-347.
52. Luyckx, V. A., and Brenner, B. M. (2015) Birth weight, malnutrition and kidney-associated outcomes[mdash]a global concern, *Nat Rev Nephrol* 11, 135-149.
53. Woods, L. L., Ingelfinger, J. R., Nyengaard, J. R., and Rasch, R. (2001) Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats, *Pediatric research* 49, 460-467.
54. Langley-Evans, S. C., Sherman, R. C., Welham, S. J. M., Nwagwu, M. O., Gardner, D. S., and Jackson, A. A. (1999) Intrauterine programming of hypertension: the role of the renin-angiotensin system, *Biochemical Society Transactions* 27, 88.
55. McMullen, S., Gardner, D. S., and Langley-Evans, S. C. (2004) Prenatal Programming of Angiotensin II Type 2 Receptor Expression in the Rat, *The British journal of nutrition* 91, 133-140.
56. Sherman, R. C., and Langley-Evans, S. C. (1998) Early administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril, prevents the development of hypertension programmed by

- intrauterine exposure to a maternal low-protein diet in the rat, *Clinical science (London, England : 1979)* 94, 373-381.
57. Luo, H., Wang, X., Chen, C., Wang, J., Zou, X., Li, C., Xu, Z., Yang, X., Shi, W., and Zeng, C. (2015) Oxidative Stress Causes Imbalance of Renal Renin Angiotensin System (RAS) Components and Hypertension in Obese Zucker Rats, *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* 4, e001559.
 58. Barker, D. J., Hales, C. N., Fall, C. H., Osmond, C., Phipps, K., and Clark, P. M. (1993) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth, *Diabetologia* 36, 62-67.
 59. Souza-Mello, V., Mandarim-de-Lacerda, C. A., and Aguilá, M. B. (2007) Hepatic structural alteration in adult programmed offspring (severe maternal protein restriction) is aggravated by post-weaning high-fat diet, *Br J Nutr* 98, 1159-1169.
 60. Postic, C., and Girard, J. (2008) The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis, *Diabetes & metabolism* 34, 643-648.
 61. Kitade, H., Chen, G., Ni, Y., and Ota, T. (2017) Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments, *Nutrients* 9, 387.
 62. Williams, K. H., Shackel, N. A., Gorrell, M. D., McLennan, S. V., and Twigg, S. M. (2013) Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pathogenic Duo, *Endocrine Reviews* 34, 84-129.
 63. Desai, M., Crowther, N. J., Ozanne, S. E., Lucas, A., and Hales, C. N. (1995) Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life, *Biochem Soc Trans* 23, 331-335.
 64. Ozanne, S. E., Smith, G. D., Tikerpae, J., and Hales, C. N. (1996) Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams, *The American journal of physiology* 270, E559-564.
 65. Exton, J. H., Corbin, J. G., and Harper, S. C. (1972) Control of gluconeogenesis in liver. V. Effects of fasting, diabetes, and glucagon on lactate and endogenous metabolism in the perfused rat liver, *The Journal of biological chemistry* 247, 4996-5003.
 66. Petrik, J., Reusens, B., Arany, E., Remacle, C., Coelho, C., Hoet, J. J., and Hill, D. J. (1999) A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II, *Endocrinology* 140, 4861-4873.
 67. Rodriguez-Trejo, A., and Ortiz-Lopez MG - Zambrano, E.-G.-S., Maria de Los Angeles - Mendez, Carmen - Blondeau, Bertrand - Breant, Bernadette - Nathanielsz, Peter W. - Menjivar, Marta. (2012) Developmental programming of neonatal pancreatic beta-cells by a maternal low-protein diet in rats involves a switch from proliferation to differentiation, *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. .
 68. Snoeck, A., Remacle, C., Reusens, B., and Hoet, J. J. (1990) Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas, *Biology of the neonate* 57, 107-118.
 69. Arantes, V. C., Teixeira, V. P., Reis, M. A., Latorraca, M. Q., Leite, A. R., Carneiro, E. M., Yamada, A. T., and Boschero, A. C. (2002) Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation, *The Journal of nutrition* 132, 3030-3035.
 70. Fujimoto, K., and Polonsky, K. S. (2009) Pdx1 and other factors that regulate pancreatic β -cell survival, *Diabetes, obesity & metabolism* 11, 30-37.
 71. Sparre, T., Reusens, B., Cherif, H., Larsen, M. R., Roepstorff, P., Fey, S. J., Mose Larsen, P., Remacle, C., and Nerup, J. (2003) Intrauterine programming of fetal islet gene expression in rats—effects of maternal protein restriction during gestation revealed by proteome analysis, *Diabetologia* 46, 1497-1511.

72. Lowell, B. B., and Shulman, G. I. (2005) Mitochondrial Dysfunction and Type 2 Diabetes, *Science* 307, 384.
73. Agrawal, A., and Prakash, Y. S. (2014) Obesity, metabolic syndrome, and airway disease: a bioenergetic problem?, *Immunology and allergy clinics of North America* 34, 785-796.
74. Aroor, A. R., Mandavia, C., Ren, J., Sowers, J. R., and Pulakat, L. (2012) Mitochondria and Oxidative Stress in the Cardiorenal Metabolic Syndrome, *Cardiorenal Medicine* 2, 87-109.
75. Pieczenik, S. R., and Neustadt, J. (2007) Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease, *Experimental and Molecular Pathology* 83, 84-92.
76. Laguens, R., and Bianchi, N. (1963) Fine structure of the liver in human idiopathic diabetes mellitus: I. Parenchymal cell mitochondria, *Experimental and Molecular Pathology* 2, 203-214.
77. Petersen, K. F., Befroy, D., Dufour, S., Dziura, J., Ariyan, C., Rothman, D. L., DiPietro, L., Cline, G. W., and Shulman, G. I. (2003) Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance, *Science* 300, 1140-1142.
78. Paschos, P., and Paletas, K. (2009) Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome, *Hippokratia* 13, 9-19.
79. Perez-Carreras, M., Del Hoyo, P., Martin, M. A., Rubio, J. C., Martin, A., Castellano, G., Colina, F., Arenas, J., and Solis-Herruzo, J. A. (2003) Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology (Baltimore, Md.)* 38, 999-1007.
80. Puddu, P., Puddu, G. M., Cravero, E., De Pascalis, S., and Muscari, A. (2007) The Putative Role of Mitochondrial Dysfunction in Hypertension, *Clinical and Experimental Hypertension* 29, 427-434.
81. Ashcroft, F. M. (2005) ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion, *Journal of Clinical Investigation* 115, 2047-2058.
82. Silva, J. E. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation.
83. Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance, *Physiological reviews* 84, 277-359.
84. Penner, P. E., and Himms-Hagen, J. (1968) Gluconeogenesis in rats during cold acclimation, *Canadian Journal of Biochemistry* 46, 1205-1213.
85. Jornayvaz, F. R., and Shulman, G. I. (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis, *Essays in biochemistry* 47, 10.1042/bse0470069.
86. Chung, N., Park, J., and Lim, K. (2017) The effects of exercise and cold exposure on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle and white adipose tissue, *Journal of exercise nutrition & biochemistry* 21, 39-47.
87. Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, Maria E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, Ligia C., Perales-Clemente, E., Salviati, L., Fernandez-Silva, P., Enriquez, Jose A., and Scorrano, L. (2013) Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency, *Cell* 155, 160-171.
88. Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R. R., and Kühlbrandt, W. (2008) Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane, *The EMBO Journal* 27, 1154-1160.
89. Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quiros, P. M., Calvo, E., Rodriguez-Hernandez, M. A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, A., Lopez-Otin, C., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., Fernandez-Vizarra, E., and Enriquez, J. A. (2013) Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain, *Science* 340, 1567-1570.
90. Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., Diaz-Morales, N., Hernandez-Mijares, A., Rocha, M., and Victor, V. M. (2017) Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications, *Redox Biology* 11, 637-645.

91. Selak, M. A., Storey, B. T., Peterside, I., and Simmons, R. A. (2003) Impaired oxidative phosphorylation in skeletal muscle of intrauterine growth-retarded rats, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 285, E130-137.
92. Reusens, B., Theys, N., and Remacle, C. (2011) Alteration of mitochondrial function in adult rat offspring of malnourished dams, *World Journal of Diabetes* 2, 149-157.
93. Mortensen, O. H., Olsen, H. L., Frandsen, L., Nielsen, P. E., Nielsen, F. C., Grunnet, N., and Quistorff, B. (2010) A maternal low protein diet has pronounced effects on mitochondrial gene expression in offspring liver and skeletal muscle; protective effect of taurine, *Journal of biomedical science* 17 Suppl 1, S38.
94. Reusens, B., Sparre, T., Kalbe, L., Bouckenooghe, T., Theys, N., Kruhoffer, M., Orntoft, T. F., Nerup, J., and Remacle, C. (2008) The intrauterine metabolic environment modulates the gene expression pattern in fetal rat islets: prevention by maternal taurine supplementation, *Diabetologia* 51, 836-845.
95. Theys, N., Bouckenooghe, T., Ahn, M.-T., Remacle, C., and Reusens, B. (2009) Maternal low-protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat, *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 297, R1516-R1525.
96. Engeham, S., Mdaki, K., Jewell, K., Austin, R., Lehner, A. N., and Langley-Evans, S. C. (2012) Mitochondrial Respiration Is Decreased in Rat Kidney Following Fetal Exposure to a Maternal Low-Protein Diet, *Journal of Nutrition and Metabolism* 2012, 989037.
97. Taylor, P. D., McConnell, J., Khan, I. Y., Holemans, K., Lawrence, K. M., Asare-Anane, H., Persaud, S. J., Jones, P. M., Petrie, L., Hanson, M. A., and Poston, L. (2005) Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288, R134-139.
98. Jia, Y., Cong, R., Li, R., Yang, X., Sun, Q., Parvizi, N., and Zhao, R. (2012) Maternal low-protein diet induces gender-dependent changes in epigenetic regulation of the glucose-6-phosphatase gene in newborn piglet liver, *The Journal of nutrition* 142, 1659-1665.
99. Granados-Castro, L. F., Ds, R.-R., M, M., -, R. C., and Pedraza-Chaverri, J. (2013) Wood smoke exposure induces a decrease in respiration parameters and in the activity of respiratory complexes I and IV in lung mitochondria from guinea pigs, *Environmental toxicology* 30, 461-471.
100. Cano-Ramírez, D., Torres-Vargas, C. E., Guerrero-Castillo, S., Uribe-Carvajal, S., Hernández-Pando, R., Pedraza-Chaverri, J., and Orozco-Ibarra, M. (2012) Effect of glycolysis inhibition on mitochondrial function in rat brain, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 26, 206-211.
101. Sherwin, R. S. (1980) Role of Liver in Glucose Homeostasis, *Diabetes Care* 3, 261.
102. Gerich, J. E. (2010) Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications, *Diabetic Medicine* 27, 136-142.