



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“EFECTO DE LA RESTRICCIÓN PROTEICA MATERNA SOBRE LA EXPRESIÓN PANCREÁTICA DE Hnf4 α , Pdx1, Isl1, Rfx6 e Ins EN CRÍAS MACHO DE RATAS EN LAS ETAPAS POSTNATALES TARDÍAS”.

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

QFB. RODRÍGUEZ FARFÁN ITZEL DANIELA

TUTOR:

**DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS, UNAM**

**DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

MÉXICO, D. F., DICIEMBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN PROTEICA MATERNA SOBRE LA EXPRESIÓN
PANCREÁTICA DE Hnf4 α , Pdx1, Isl1, Rfx6 e Ins EN CRÍAS MACHO DE RATAS EN LAS
ETAPAS POSTNATALES TARDÍAS**

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO D.F., NOVIEMBRE 2014

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO:

PRESIDENTE

**DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM-INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA**

VOCAL

**DRA. PATRICIA ILEANA JOSEPH BRAVO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

VOCAL

**DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

VOCAL

**DR. ANGEL ZARAIN HERZBERG
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

SECRETARIO

**DRA. NIMBE TORRES Y TORRES
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**



*A mi esposo Humberto Y
A mi familia*

Toda teoría es gris, y solo es verde el árbol de dorados frutos que es la vida
Joham Wolfgang Von Goethe

La verdadera ciencia enseña, sobre todo a dudar y a ser ignorante
Ernest Rutherford



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta Menjívar por guiarme, apoyarme y brindarme el conocimiento necesario para la realización de esta tesis.

A los integrantes del laboratorio 202, Dra. Lupita, Dra. Ángeles y Mtra. Isela por el apoyo incondicional.

Al comité tutorial, Dra. Elena Zambrano y la Dra. Marcia Hiriart, por sus consejos, apoyo y conocimiento que brindaron a mi formación.

Al Dr. Pedraza y su grupo de trabajo por sus consejos y ayuda en el trabajo de laboratorio.

A Lety por su paciencia y ayuda a lo largo de estos dos años.

A mis compañeros, amigos y colegas de laboratorio, Miguel, Julio, Helena, Barbará, Caro, Katy y Dante por su apoyo, entusiasmo y compañerismo.

A mis amigos por acompañarme y apoyarme en todo momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por la beca que se me brindó para realizar estos estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, PAEP, por el apoyo para asistir al Magno Congreso Internacional de Endocrinología, Diabetes y Reproducción (ALAD/SMNE /ALIRH), 2013.

A mi esposo, por estar siempre conmigo, escucharme y ayudarme a salir adelante.

Finalmente a mi familia que es el pilar de mi vida.

A mamá y papá por creer en mí y ayudarme a crecer, gracias a su paciencia, ayuda y comprensión.

A mi hermana, Ana, por estar conmigo en todo momento, ayudarme, aconsejarme y apoyarme a lo largo de esta etapa.



CONTENIDO

RESUMEN	11
1. ANTECEDENTES.....	13
1.1. Programación en el desarrollo y diabetes tipo 2.....	13
1.2. Desnutrición y restricción proteica materna.....	14
1.3. Diabetes.....	16
1.4. Anatomía y función del páncreas.....	18
1.5. Desarrollo del páncreas.....	20
1.5.1. Transición primaria.....	20
1.5.2. Transición secundaria.....	21
1.5.3. Transición terciaria.....	22
1.6. Expresión génica como mecanismo de programación pancreática.....	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVOS	30
4.1. General.....	30
4.2. Específicos.....	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1. Animales de experimentación.....	31
5.1.1. Grupos experimentales.....	31
5.1.2. Manejo de las crías.....	32
5.2. Análisis de las medidas somatométricas.....	33
5.3. Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal - P90.....	33
5.4. Análisis bioquímico.....	34
5.4.1. Determinación de colesterol.....	34
5.4.2. Determinación de triglicéridos.....	34
5.4.3. Determinación de glucosa.....	35
5.4.4. Determinación de insulina.....	35
5.5. Aislamiento de islotes pancreáticos.....	35



5.6.	Ensayo de secreción de insulina estimulada por glucosa - P28.....	36
5.7.	Extracción de ARN de islotes pancreáticos y síntesis de ADNc.....	37
5.8.	Estudio de la expresión génica por RT-PCR.....	37
5.9.	Análisis estadístico.....	38
6.	RESULTADOS	39
6.1.	Efecto de la restricción proteica materna en la vida postnatal temprana (P28):.....	39
6.1.1.	Crecimiento de las crías macho.....	39
6.1.2.	Somatometría de las crías macho	40
6.1.3.	Expresión génica en el islote.....	41
6.1.4.	Parametros bioquímicos y niveles de Insulina	42
6.1.5.	Peso de páncreas e hígado en crías macho	43
6.1.6.	Secreción de insulina estimulada por glucosa.....	44
6.2.	Consecuencias de la restricción proteica materna en la adultez temprana (P90):.....	45
6.2.1.	Crecimiento de las crías macho.....	45
6.2.2.	Somatometría de las crías macho	46
6.2.3.	Expresión génica en el islote.....	47
6.2.4.	Parametros bioquímicos	48
6.2.5.	Peso de páncreas e hígado en crías macho	49
6.2.6.	Prueba de tolerancia a la glucosa, P90	50
7.	DISCUSIÓN	51
7.1.	Efecto de la restricción proteica materna en la vida postnatal temprana (P28):.....	51
7.2.	Efecto de la restricción proteica materna en la adultez temprana (P90):.....	54
8.	CONCLUSIONES	51
9.	PERSPECTIVAS	58
10.	APÉNDICE A. SOLUCIÓN DE HANKS	59
11.	REFERENCIAS	60



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Anatomía del páncreas	18
Figura 2. Desarrollo del páncreas en roedores	21
Figura 3. Factores de transcripción involucrados en el desarrollo del páncreas	23
Figura 4. Interacción de los genes estudiados en etapas tempranas del desarrollo	24
Figura 5. Gradiente de Ficoll para la separación de islotes pancreáticos.....	36
Figura 6. (A) Curva de crecimiento, (B) Ganancia de peso desde el nacimiento hasta P28.....	39
Figura 7. Perfil de expresión relativa de los genes Hnf4 α , Pdx1, Isl1, Rfx6 e Ins en islotes pancreáticos en P28.....	41
Figura 8. HOMA-IR de crías macho en P28.....	43
Figura 9. Secreción de insulina estimulada por glucosa en P28	44
Figura 10. (A) Curva de crecimiento, (B) Ganancia de peso de P28 a P90.....	45
Figura 11. Perfil de expresión relativa de los genes Hnf4 α , Pdx1, Isl1, Rfx6 e Ins en islotes pancreáticos en P90.....	47
Figura 12. HOMA-IR de las crías macho en P90.....	49
Figura 13. (A) Curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en P90, (B) Área bajo la curva (ABC).....	50

TABLAS

Tabla 1. Tipos celulares que forman el islote pancreático y las hormonas que producen...	19
Tabla 2. Variaciones en la expresión de algunos genes en el modelo de restricción proteica.....	25
Tabla 3. Composición de las dietas Harlan empleadas.....	32
Tabla 4.- Oligonucleótidos y sondas utilizadas en el ensayo de qPCR.....	38



Tabla 5. Consumo de alimento y parámetros somatométricos de crías macho con restricción proteica materna en P28.....	40
Tabla 6. Cambios en la expresión en islotes pancreáticos en P28.....	42
Tabla 7. Parámetros bioquímicos de crías macho con restricción proteica materna en P28	42
Tabla 8. Peso del páncreas e hígado de crías macho con restricción proteica en P28.....	43
Tabla 9. Consumo de alimento y parámetros somatométricos de crías macho con una restricción proteica materna en P90.....	46
Tabla 10. Cambios en la expresión en islotes pancreáticos en P90.....	48
Tabla 11. Parámetros bioquímicos de crías macho con restricción proteica materna en P90.....	48
Tabla 12. Peso del páncreas e hígado de crías macho con restricción proteica en P90.....	49
Tabla 13. Preparación de la solución de Hanks en 100 mL.....	59



ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN de una sola cadena
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análisis de varianza de una sola vía
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
Arx	Gen homeótico relacionado a Aristaless
ATP	Adenosina trifosfato
DC	Diámetro cefálico
EE	Error estándar
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
<i>En</i>	Día embrionario “ <i>n</i> ”
FoxA2	Gen de caja forkhead A2
G1P	Glicerol 1-fosfato
G6pdh	Gen de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
Glut2/Slc2a2	Transportador de glucosa (transporte facilitado) de la familia 2 de portadores de soluto, miembro 2
GPO	Glicerol 1-fosfato oxidasa
H3K4m2	Dimetilación de la histona 3 en la lisina 4
H3K4me3	Trimetilación de la histona 3 en la lisina 4
Hnf1	Factor nuclear hepático 1
Hnf4 α	Factor nuclear hepático 4 alfa
Hnf6	Factor nuclear hepático 6
HOMA-IR	Modelo de evaluación homeostático para la resistencia a la insulina
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1



IGF-2	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
Ins	Gen de Insulina
Irx2	Gen homeótico iroquois 2
Isl1	Gen homeótico Islet 1, homeodominio LIM
KCl	Cloruro de potasio
Mafa	Oncogén fibrocarsonoma músculo aponeurótico aviar V-maf, homólogo A
Neurod1	Gen de diferenciación neurogénica 1
Ngn3	Gen Neurogenina 3
Nkx6	Gen homeótico NK6
PA	Perímetro abdominal
Pax4	Gen de caja pareada 4
Pax6	Gen de caja pareada 6
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Primordio/Yema dorsal
Pdx1/Ipf1	Gen homeótico pancreático y duodénico 1
Pn	Día postnatal “n”
PV	Primordio/Yema ventral
qPCR	PCR cuantitativa
Rfx6	Factor regulador X, 6
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	PCR por transcriptasa reversa
SSA	Secretaría de Salud
TMB	Tetrametil bencidina
UPL	Biblioteca de sondas universales



RESUMEN

ANTECEDENTES. Estudios epidemiológicos y modelos animales han demostrado que una restricción proteica materna durante etapas tempranas del desarrollo puede traducirse en la aparición de enfermedades crónicas como la diabetes en la edad adulta. La programación del páncreas fetal endócrino puede ser mediada a través de modificaciones en la expresión génica resultado de un medio ambiente intrauterino alterado. Recientemente se expuso que bajo una restricción proteica materna se promueve la diferenciación a través de la sobre regulación de factores de transcripción como *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6* e *Ins* a expensas de la proliferación del islote pancreático, sugiriendo que la disminución en la disponibilidad de aminoácidos regula su expresión, afectando la estructura y actividad secretora del páncreas. Sin embargo, se desconoce si estas alteraciones se mantienen al término de la maduración del páncreas endócrino (P28) y cuál es su influencia en las etapas posteriores del desarrollo y su relación funcional en la vida adulta (P90). El estudio de estos factores pancreáticos que son modificados durante periodos tempranos del crecimiento y que tienen implicaciones funcionales en la vida postnatal resulta fundamental para comprender los mecanismos moleculares de programación en el desarrollo que conducen a la aparición de diabetes en el adulto.

OBJETIVO. Evaluar el efecto de la restricción proteica materna sobre la expresión de *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6* e *Ins* al término de la maduración funcional del páncreas endócrino (P28) y en la adultez-temprana (P90) de crías macho, así como, las alteraciones funcionales en islotes pancreáticos y en la tolerancia a la glucosa.

METODOLOGÍA. Ratas hembras de la cepa Wistar fueron alimentadas con dieta restringida en proteínas (R, 6%) y control (C, 20%) durante gestación y/o maduración funcional del páncreas (P28), más dieta *chow* (c) hasta el día 90 (P90), generando 8 grupos: CC, CR, RC y RR en P28 y CCc, CRc, RCc y RRc en P90 (1ª letra gestación, 2ª lactancia, 3ª post lactancia). Se aislaron islotes pancreáticos de todos los grupos mencionados y se analizó la



expresión génica de *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6* e *Ins* por RT-PCR. Además, se hicieron las determinaciones bioquímicas y hormonales e insulinoensayos de secreción de insulina estimulada por glucosa a partir de los islotes aislados en P28 y un ensayo de tolerancia a la glucosa en P90.

RESULTADOS. Al término de la maduración del páncreas endocrino (P28) la restricción proteica postnatal (CR) disminuyó la expresión de *Pdx1* y aumentó *Ins*, además conlleva a una reducción de la secreción de insulina estimulada por glucosa al ser estimulado con K^+ . En la restricción proteica prenatal (RC) la expresión de *Pdx1* está regulada negativamente, aunada a una hiperrespuesta y a una disminución en la secreción de insulina estimulada por glucosa, bajo altas concentraciones de glucosa y K^+ respectivamente. Por otro lado, cuando la restricción proteica es pre y postnatal (RR) la expresión de *Hnf4a* se incrementa, en tanto que la secreción de insulina estimulada por glucosa disminuye ante altas concentraciones de K^+ .

En la edad adulta temprana (P90) después de una normalización de la dieta en el grupo CRc la expresión de *Isl1* aumenta aunado a un incremento en la sensibilidad a la insulina pero manteniendo la tolerancia a la glucosa. En el grupo RCc la expresión de *Ins* se incrementa, pero la tolerancia a la glucosa de estas crías tiende a disminuir. Mientras, que en el grupo RRc no se producen cambios significativos en la expresión de los genes estudiados, si hay indicios de intolerancia a la glucosa y una sensibilidad alta a la insulina.

CONCLUSIÓN. Los hallazgos del presente estudio demuestran que la expresión de *Hnf4a*, *Rfx6*, *Pdx1*, *Isl1* e *Ins* fue modificada por una restricción proteica severa en etapas perinatales llevando a alteraciones en la secreción de insulina en el islote al finalizar su maduración y a una tolerancia alterada de la glucosa en la edad adulta temprana.



1. ANTECEDENTES

1.1. Programación en el desarrollo y diabetes tipo 2

El desarrollo fetal es un proceso que depende del genotipo y epigenotipo del feto, la nutrición materna, la disponibilidad de nutrientes, el oxígeno en el feto, los eventos intrauterinos y una gran variedad de factores de crecimiento y proteínas de origen materno y fetal/placentario^(1,2). La programación en el desarrollo ocurre porque el tejido y sistemas del cuerpo pasan por una ventana o punto crítico. Una ventana crítica es definida como un periodo de cambios importantes tanto estructurales como funcionales que se dan durante el crecimiento y desarrollo normal de un órgano durante la vida fetal y la infancia. Una falla en el desarrollo durante estos periodos como resultado de influencias ambientales subóptimas cambian permanentemente la estructura y función del cuerpo, dando un desbalance en la edad adulta^(3,4).

La distribución relativa de nutrientes entre la madre, la placenta y el feto es en parte responsable de la regulación y la expresión fenotípica de crecimiento fetal. La variación en la calidad o cantidad de los nutrientes consumidos durante el embarazo puede tener efectos permanentes y de gran alcance sobre el feto en desarrollo⁽⁵⁾.

Los periodos embrionarios y postnatal temprano implican diversos procesos de desarrollo que afectan permanentemente el desarrollo de órganos, la estructura y metabolismo, así como la diferenciación celular y la organogénesis⁽⁶⁾. La "hipótesis del fenotipo ahorrador" propone que existe una respuesta adaptativa para optimizar el crecimiento de los órganos vitales a costa de los órganos periféricos ante un medio ambiente adverso en estas etapas; por lo que los pesos del hígado, riñones y páncreas se reducen, pero el cerebro se resguarda⁽⁷⁾.

Modelos animales y estudios epidemiológicos en humanos sugieren que factores genéticos y ambientales durante el embarazo y la vida postnatal temprana, contribuyen al desarrollo de intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 en la edad adulta^(8,9).



Varias formas de desnutrición pueden ocurrir durante diferentes períodos del desarrollo, tales como la restricción calórica y/o proteica ⁽¹⁰⁾, la ligadura de la arteria uterina ⁽¹¹⁾, la diabetes gestacional ⁽¹²⁾, la exposición excesiva del feto a glucocorticoides ⁽¹³⁾ y las dietas altas en grasa ⁽¹⁴⁾.

1.2. Desnutrición y restricción proteica materna

La desnutrición crónica de las madres embarazadas es común en los países en desarrollo por las malas condiciones socioeconómicas, que pueden perjudicar el desarrollo del feto, lo que trae consigo deterioro del metabolismo de la glucosa y la aparición de diabetes en la descendencia ⁽¹⁵⁾. Para investigar los efectos de la desnutrición sobre el desarrollo fetal, los investigadores han utilizado datos clínicos históricos y epidemiológicos obtenidos en tiempos de guerra o hambruna. Una oportunidad única para estudiar la relevancia de estos hallazgos históricos se presentó en los individuos que estuvieron expuestos prenatalmente a la hambruna durante el periodo conocido como invierno hambriento holandés (Invierno de la segunda guerra mundial, 1944-1945) ⁽¹⁶⁾. Durante este período, la población holandesa se sometió a raciones reducidas de alimentos, gradualmente a partir de 1 800 kcal a 400-800 kcal en el pico de la hambruna. A lo largo de este episodio, las mujeres embarazadas recibieron una ración adicional en un intento de compensar la falta de nutrientes que consistió en verduras y tubérculos (principalmente papas) ⁽¹⁷⁾. Este período de la desnutrición materna resultó en crías con bajo peso al nacer y tolerancia alterada a la glucosa, lo que los hacía propensos a desarrollar diabetes y obesidad a la edad de 50 años, en comparación con las personas cuyo período en el útero se había producido ya sea el año anterior o posterior de la hambruna ⁽¹⁶⁾. Estos datos proporcionan apoyo empírico a la hipótesis de que las condiciones ambientales tempranas de la vida pueden causar cambios epigenéticos en los seres humanos que persisten durante toda su vida ⁽¹⁸⁾. Ha sido demostrado que el número de células β productoras de insulina y la cantidad de tejido endocrino está reducido en el páncreas de fetos humanos con un crecimiento restringido ⁽¹⁹⁾.



Los modelos animales de la restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) juegan un papel crítico en la construcción de nuestra comprensión de la programación durante el desarrollo de las células β . Una dieta normal durante el embarazo en roedores debe contener un 20% de proteínas, el modelo de restricción proteica se asocia a una dieta de igual valor energético que consiste en 6% (severa a un tercio de restricción) a 10% (moderada a media restricción) de proteínas⁽²⁰⁾. La dieta restringida es compensada por la adición de carbohidratos en forma de almidón de maíz⁽¹¹⁾. Sólo se ha demostrado que una dieta materna restringida en proteínas severa da lugar a una respuesta perjudicial en la descendencia masculina y femenina⁽²¹⁾.

La inducción experimental de la restricción del crecimiento intrauterino en la rata y ratón es promovido por la restricción de proteínas, que por lo general reduce el crecimiento fetal, por tanto, bajo peso al nacimiento en roedores⁽²²⁾. Estos cambios resultan en alteraciones que inducen adaptaciones deficientes del páncreas endocrino, un retraso en el desarrollo de las células β y una secreción reducida de insulina. El modelo restricción proteica durante el crecimiento es el mejor caracterizado y el más ampliamente estudiado de todos los modelos nutricionales en animales para evaluar la programación fetal y postnatal temprana de las células β pancreáticas asociado a la susceptibilidad de desarrollar diabetes en la vida adulta. Cuando el modelo de dieta restringida se maneja desde el momento de la concepción en la rata, la neogénesis no se ve afectada por *Pdx1* y *Ngn3*, genes que participan en la regulación de la especificación y diferenciación de las células β pancreáticas, siendo similar en el grupo control. Sin embargo, en el periodo embrionario E15 y E21, la masa y el número de células β se reducen. La reducción es más pronunciada si una dieta fetal baja en proteínas se aplica durante la última semana de embarazo, que se caracteriza por presentar la más alta actividad proliferativa de las células β en el feto, durante la cual comienzan a regular su propia homeostasis de la glucosa^(23, 24). La restricción de proteínas actúa mediante la alteración de la replicación de las células β durante la última etapa de la gestación sin alterar la diferenciación de las mismas, aunque retos causados por la dieta en la gestación temprana, intermedia o tardía resulta en una eficiencia relativa de estas células tras el nacimiento^(25, 26).



Cuando una dieta normal se restaura inmediatamente después del nacimiento, la red vascular en el páncreas endocrino parece recuperarse en la edad adulta, sin embargo, las células β no se recuperan. Por otra parte, la masa de las células α y β se mantiene sin cambios en los animales restringidos en comparación con los controles. La restricción de proteínas reduce el área de células β en los islotes y hace que se formen irregularmente en animales recién destetados^(27, 28). La descendencia producida bajo condiciones de bajo contenido de proteínas también muestra la distribución inadecuada de células dentro del islote, y la localización central de las células α es perturbada por la infiltración de las células β en el nacimiento y el destete, lo cual se observa típicamente en modelos animales diabéticos^(4, 29).

Por otra parte, estas adaptaciones durante ventanas críticas del desarrollo pueden programar permanentemente la masa de células β y al metabolismo fetal para mejorar las posibilidades de supervivencia del feto. Sin embargo, esta ventaja se convierte en perjudicial para el individuo programado/descendencia cuando se encuentre con abundancia nutricional posteriormente⁽³⁰⁾. Del mismo modo, la recuperación con una dieta normal después del nacimiento restaura el peso en el adulto (*catch-up*) pero no mejora la insuficiencia de insulina⁽³¹⁾. Por lo tanto, los efectos adversos de la rápida recuperación posnatal del crecimiento pueden dar lugar al desarrollo de un estado de sobrepeso y obesidad en la vida adulta.

La susceptibilidad a desarrollar diabetes en la etapa adulta puede ser mediada a través de la programación del páncreas endocrino fetal debido a las modificaciones en la expresión génica fetal resultado de un medio ambiente intrauterino alterado⁽³²⁾.

1.3. Diabetes

La diabetes ocurre como consecuencia de la alteración de la homeostasis de la glucosa. Se define como un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizado por hiperglucemia crónica, en el cual se presentan alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, y proteínas como consecuencia de una secreción y/o acción deficiente de la insulina. Los individuos con diabetes presentan a largo plazo disfunción de varios órganos (ojos, riñones,



nervios, corazón, y vasos sanguíneos) ⁽³³⁾. La diabetes tiene una alta prevalencia mundial, aproximadamente de 346 millones de personas. Se estima que más del 80% de las muertes asociadas a diabetes ocurren en países en vías de desarrollo y que éstas se duplicarán en el 2030 ⁽³⁴⁾.

El diagnóstico de diabetes puede establecerse a partir de uno de los siguientes criterios ⁽³⁵⁾:

1. Síntomas de diabetes (poliuria, polidipsia y pérdida de peso inexplicable) y una concentración plasmática de glucosa casual ≥ 200 mg/dL.
2. Concentración de glucosa plasmática ≥ 126 mg/dL en ayuno.
3. Concentración de glucosa plasmática ≥ 200 mg/dL 2 h después de la ingesta de una carga de glucosa oral (75 g de glucosa anhidra disuelta en agua) durante una prueba de tolerancia a la glucosa.

La gran mayoría de los casos de diabetes se clasifican en dos categorías etiopatogénicas: diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2.

La diabetes tipo 1 se caracteriza por una deficiencia total en la secreción de insulina, la cual se debe a la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. Mientras, la diabetes tipo 2 tiene resistencia a la insulina y una secreción deficiente de esta hormona ⁽³⁶⁾. Definiendo a la resistencia a la insulina como la incapacidad de esta hormona para incrementar la captación de glucosa y su utilización en un individuo en comparación con una población normal ⁽³⁷⁾.

La diabetes tipo 2 es la más común (90-95%), en tanto que la diabetes tipo 1 tiene una prevalencia de 5-10%. En México, la diabetes está considerada como una de las principales causas de muerte ⁽³⁶⁾. En el 2012, la prevalencia de diabetes tipo 2 en adultos mexicanos entre 20 y 69 años fue de 9.2% (6.4 millones de personas) ⁽³⁸⁾.

Existen factores genéticos (variaciones en la secuencia genética) y ambientales que incrementan el riesgo a desarrollar diabetes tipo 2. Entre los factores ambientales destacan una dieta alta en carbohidratos y lípidos ⁽³⁹⁾, la obesidad, el sedentarismo ⁽⁴⁰⁾, y el bajo peso al nacer ⁽⁴¹⁾.



1.4. Anatomía y función del páncreas

El páncreas es una glándula mixta formada por tejido endocrino y exocrino. La ampulla de Váter conecta al páncreas con el duodeno, donde también el conducto pancreático principal o conducto de Winsurg se une con el conducto biliar. En el humano consta de cuatro secciones denominadas cabeza, cuerpo y cola que van desde la región proximal hasta la distal, figura 1A⁽⁴²⁾.

El tejido exocrino constituye al rededor del 95% del páncreas y está formado por agrupaciones de células de secreción enzimática que se denominan acinos, figura 1B, 1C.

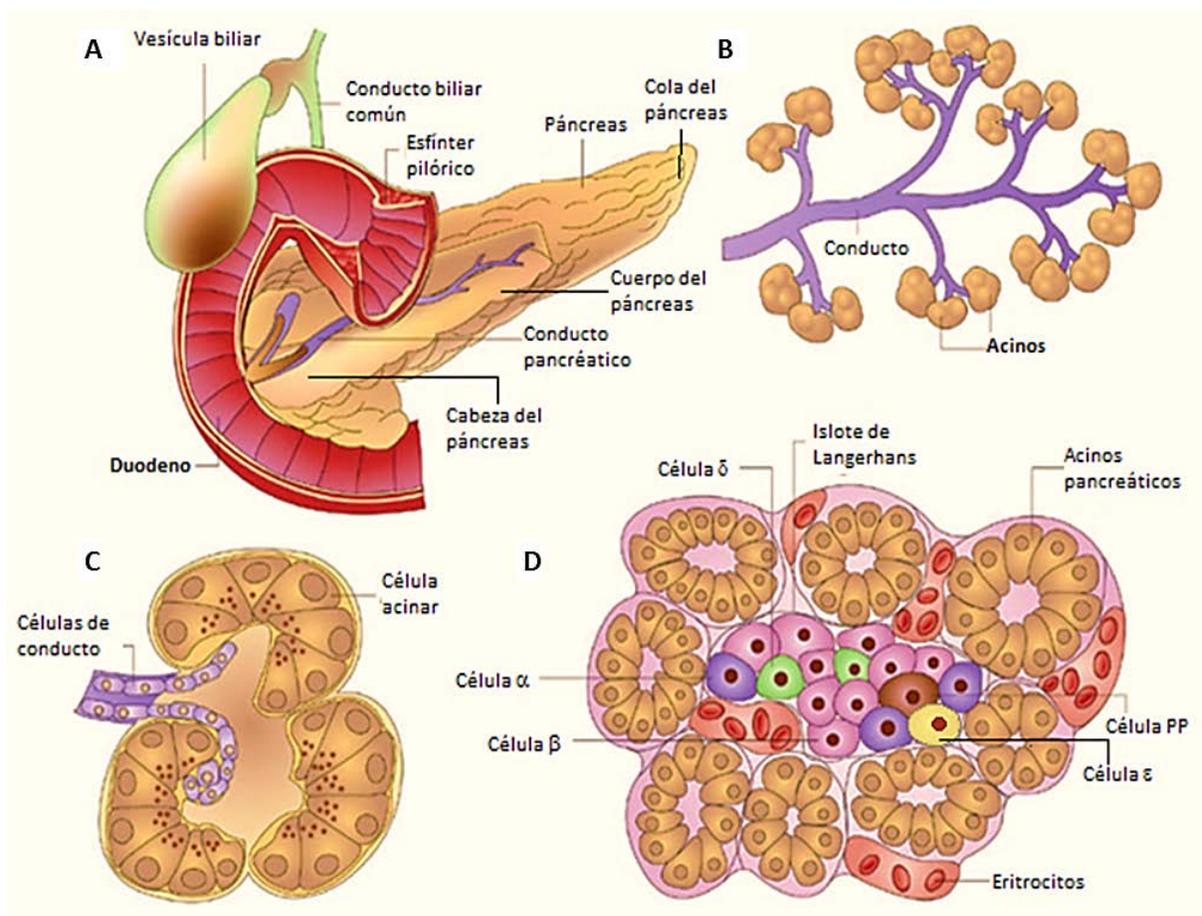


Figura 1. Anatomía del páncreas: A) región proximal a distal del páncreas: cabeza, cuerpo y cola; B) páncreas exocrino formado por acinos y conductos; C) células acinares y de conductos; D) islote pancreático (células endocrinas) rodeado de tejido exocrino. Modificado de Bardeesy y DePincho, 2002.



Los acinos tienen una forma piramidal y los núcleos se encuentran en la parte basal de las células. Entre las enzimas digestivas que se producen están las proteasas, amilasas, lipasas y nucleasas, las cuales son transportadas al intestino a través de células que se organizan para formar un sistema ramificado de conductos, cuyas células añaden mucosa y bicarbonato a la mezcla de enzimas^(43, 44).

El tejido endocrino (1-2% del páncreas) sintetiza y secreta hormonas a la circulación sistémica, entre sus funciones está la de regular la homeostasis de la glucosa en sangre. Está formado por 5 tipos celulares productores de hormonas (tabla 1) organizadas en estructuras llamadas islotes pancreáticos los cuales están distribuidos a través del tejido exocrino^(45, 46), figura 1D. La composición de células en los islotes varía dependiendo de la región del páncreas y de la especie. Los islotes están formados principalmente por células β (50-80% de células totales), las células α constituyen el 20%-40%, mientras que las células δ , PP y ϵ están en una menor proporción^(47, 48). El mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en sangre depende, en gran medida, de la acción de las hormonas pancreáticas insulina y glucagón. Además del tejido glandular exocrino y endocrino, el páncreas tiene un flujo importante de sangre arterial, un extenso drenaje linfático y varias innervaciones parasimpáticas⁽⁴²⁾.

Tabla 1. Tipos celulares que forman el islote pancreático y las hormonas que producen.

Tipo celular	Hormona sintetizada	Función
α	Glucagón	Hiperglucemiante
β	Insulina	Hipoglucemiante y anabólica
PP	Polipéptido pancreático	Regula procesos digestivos
δ	Somatostatina	Regula motilidad gástrica y secreción endócrina intestinal
ϵ	Grelina	Regulación del peso corporal y la ingesta (efecto orexigénico)



1.5. Desarrollo del páncreas

El desarrollo de un individuo inicia con el establecimiento del cigoto como consecuencia de la fecundación. La segmentación y la gastrulación son periodos críticos que ocurren entre la fecundación y la formación de un órgano⁽⁴⁹⁾. En la segmentación, el cigoto se divide varias veces, formándose el blastómero. Durante la gastrulación, estas células se reorganizan para formar un embrión trilaminar. Las células que forman los órganos mesodérmicos y endodérmicos son llevadas hacia el interior del embrión. Mientras que aquellas que forman la epidermis y el sistema nervioso central se extienden sobre la superficie exterior. Al término de esta etapa se distinguen tres capas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo^(49, 50). Cuando la capa más interna del embrión (endodermo) se cierra, forma el intestino primitivo, a partir de lo cual se originarán el esófago, estómago, intestino y las glándulas digestivas. El intestino se regionaliza en intestino anterior, medio y posterior, mediante la expresión de genes específicos e interacciones entre el epitelio endodérmico y el mesénquima que lo rodea⁽⁴⁹⁾.

El desarrollo del páncreas consiste en tres etapas principales denominadas transición primaria, secundaria y terciaria.

1.5.1. Transición primaria

La formación del páncreas inicia con la inducción de dos primordios: dorsal (PD) y ventral (PV), los cuales provienen del epitelio del intestino anterior y convergen para formar un solo órgano, figura 2. En el ratón, la generación de los primordios que formarán las yemas pancreáticas dorsal y ventral ocurre en los días embrionarios 8.5 -9.5. (E8.5-E9.5). Posteriormente, en el E 10.5, el epitelio parcialmente diferenciado en las dos yemas, se ramifican para generar un árbol de conductos constituido por células epiteliales y en el E12.5, ya se identifican las yemas pancreáticas dorsal y ventral^(51, 52).

Los primordios pancreáticos se desarrollan en respuesta a señales de tejidos mesodérmicos adyacentes: la notocorda, la aorta y el mesodermo cardiogénico⁽⁵⁰⁾. La yema pancreática dorsal se desarrolla cerca de la notocorda. Poco después, la notocorda es desplazada por el



mesénquima esplácnico, el cual forma la aorta. El desarrollo del primordio ventral ocurre cerca del epitelio que dará origen al hígado y conducto biliar. Dicho epitelio se forma en la cara ventral del intestino anterior^(9, 53).

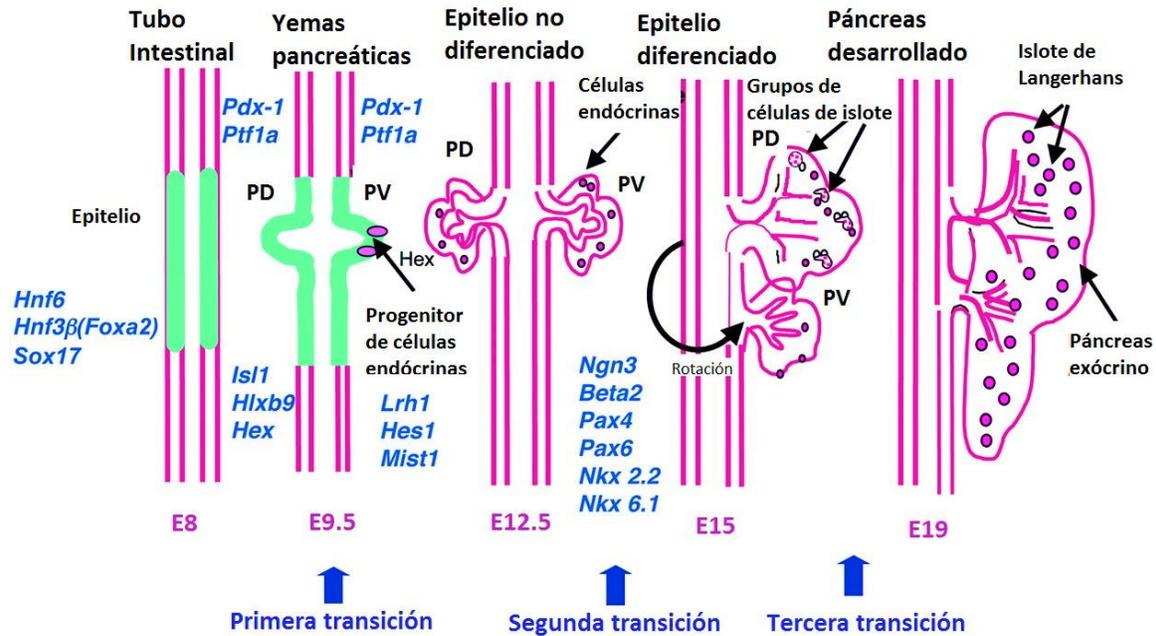


Figura 2. Desarrollo del páncreas en roedores. Día embrionario (E); Primordio/Yema ventral (PV); primordio/yema dorsal (PD). Los factores de transcripción representativos durante la programación del desarrollo se muestran en azul. Modificado de Habener y cols., 2005.

La primera célula endocrina detectada en el páncreas expresa glucagón (E9.5). Subsecuentemente las células coexpresan glucagón e insulina, siendo estos precursores de las células α y β ⁽⁵⁴⁾.

1.5.2. Transición secundaria

En la segunda etapa de transición (E13.5-E15.5), las yemas ventral y dorsal giran debido a la rotación del intestino y se fusionan. Las células progenitoras endocrinas migran al mesénquima adyacente y forman agregados celulares, mientras que las células exocrinas se organizan en acinos. Las células endocrinas se encuentran en forma individual adyacentes a



los conductos. En el E16, las células endocrinas comienzan a organizarse en conjuntos parecidos a islotes. Los islotes se forman al término de la gestación en E18 y E19^(51, 53). En esta etapa, las células endocrinas y exocrinas tienen una alta actividad proliferativa, aumentando así su masa^(45, 55).

En humanos, el proceso de evaginación es observado a las 10 semanas de gestación, y la fase primaria del desarrollo del islote ocurre durante el segundo trimestre, la remodelación ocurre entre la etapa tardía de la gestación y la etapa temprana de la infancia⁽⁵⁶⁾.

1.5.3. Transición terciaria

En la tercera transición del páncreas se lleva a cabo una remodelación y maduración durante las siguientes 2 a 3 semanas posteriores al nacimiento. Las células β de los roedores tienen una actividad secretora inmadura caracterizada por una sensibilidad disminuida a la glucosa y una secreción reducida de insulina. La maduración de la función de las células β (aumento de la secreción de insulina en respuesta al incremento en la concentración de glucosa) ocurre en los primeros días de vida postnatal en el ratón y al final del primer mes en la rata^(47, 57).

En el feto humano, las células β exhiben una secreción de insulina robusta en respuesta a secretagogos de insulina⁽⁵⁸⁾. Sin embargo, en roedores, las células β inician a ser responsivas cerca del término de la gestación, pero la respuesta no es robusta hasta una semana después del nacimiento⁽⁵⁹⁾. Al nacimiento, el arreglo de células endocrinas en el islote parece ser el mismo que en el animal adulto, mientras el tamaño de la población total continua incrementándose después del nacimiento. Para las poblaciones de células α y β , un periodo adicional de crecimiento acelerado ocurre entre el día 4 y 10 postnatal, el crecimiento continua hasta el día 28 debido al incremento de la demanda fisiológica sobre la producción de insulina⁽⁹⁾⁽⁴⁷⁾.

La masa total de células β es un factor crítico en la regulación de la homeostasis de glucosa y la morfología del islote y es el resultado del equilibrio entre los cambios dinámicos del crecimiento de nuevas células y pérdida de las células viejas⁽⁶⁰⁾. La expansión de la masa de células β en animales adultos continua, sin embargo, su habilidad regenerativa



disminuye con la edad. Se ha postulado que la regeneración de la célula β se da a través de 3 posibles mecanismos: proliferación de células β preexistentes, neogénesis de progenitores adultos i ndefinidos o c élulas t roncales, y t ransdiferenciación de células d iferenciales terminales, particularmente en a sociación c on c ondiciones c omo o b e s i d a d y e m b a r a z o , a pesar de l a s v a r i a c i o n e s e n l a d e m a n d a d e i n s u l i n a d e b i d o a q u e e l e s t a d o f i s i o l ó g i c o y p a t o l ó g i c o d e s e m b o c a n e n e l i n c r e m e n t o d e l o s n i v e l e s d e i n s u l i n a e n e l c u e r p o .

1.6. Expresión génica como mecanismo de programación pancreática

La diferenciación de los distintos tipos celulares endocrinos y exocrinos que conforman el páncreas resulta de la activación ordenada y represión de genes que son regulados por factores transcripcionales específicos del tejido pancreático, figura 3 ⁽⁶¹⁾.

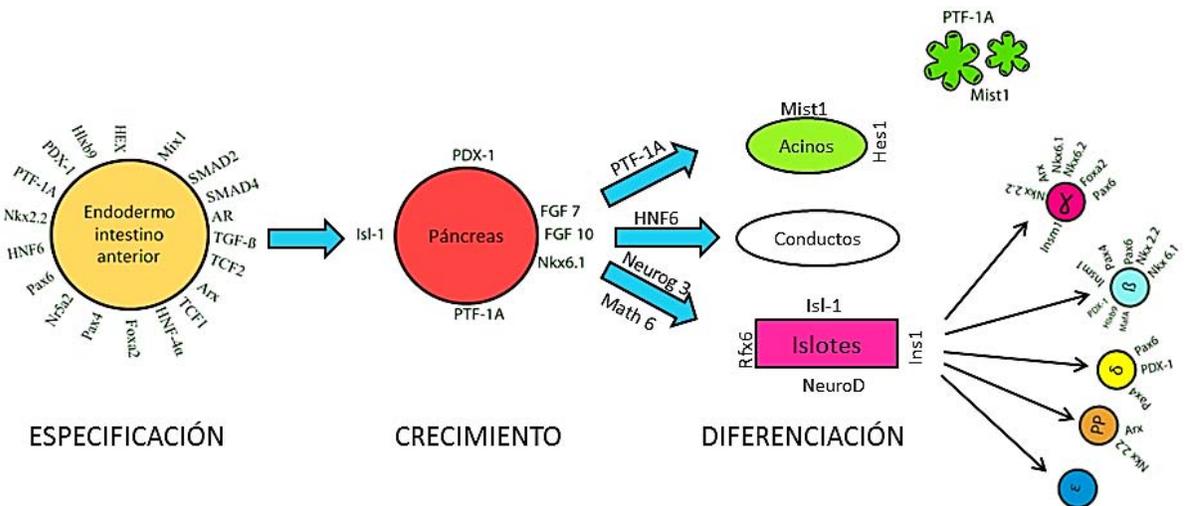


Figura 3. Factores de transcripción involucrados en el desarrollo del páncreas.

La programación de las células β por una restricción proteica materna refleja la expresión alterada de genes clave que controlan diversas etapas de desarrollo del páncreas y la función de células β maduras

. La dieta con una restricción proteica moderada es la mejor caracterizada, donde los genes como *Ins*, *Slc2A2*, *Ngn3*, *Pdx1*, *Hnf6*, *Hnf1*, *Nkx6*, *Pax4* y *Pax6* se han estudiado en las etapas embrionarias y postnatales, tabla 2. Arantes y cols., estudiaron la expresión de *Pdx1* en un modelo de restricción proteica al 6% en el día postnatal 28 (P28) ⁽⁶²⁾. En estudios



previos realizados por nuestro grupo de trabajo se demostró que una restricción proteica al 6% promueve la diferenciación a través de la regulación positiva de factores de transcripción (*Hnf4a*, *Hnf1a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6*, *Slc2A2* e *Ins*) a expensas de la proliferación (63).

Variaciones en la secuencia génica de estos factores transcripcionales pueden causar diabetes en humanos, de igual forma, es probable que cambios en su expresión contribuyan a la programación del desarrollo de las células β debido a que son cruciales para su adecuado desarrollo y función (64, 65, 66). A continuación se describe la función de algunos factores de transcripción involucrados en el cambio de proliferación a diferenciación en el modelo de restricción proteica y su interacción en etapas tempranas del desarrollo, figura 4.

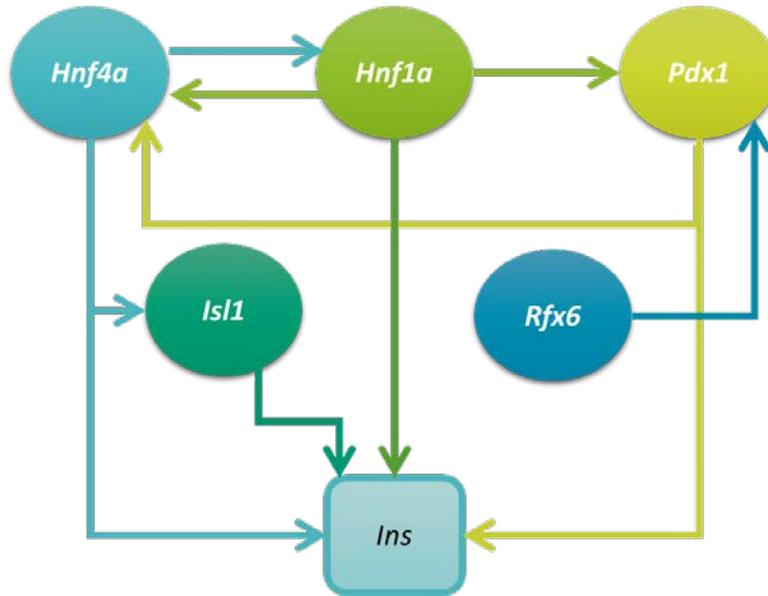


Figura 4. Interacción de los genes estudiados en etapas tempranas del desarrollo.



Tabla 2. Variaciones en la expresión de algunos genes en el modelo de restricción proteica.

Gen	Cambios de expresión	Edad	Restricción proteica	Referencia
<i>IGF-II</i>	↓	E19.5-P21	8%	(28)
<i>Ins</i>	↑	P1		
<i>Slc2A2</i>	↑	P21(RR)	8%	(25)
<i>Pdx1</i>	=			
<i>Ngn3</i>	=	E15	8%	(23)
<i>Pdx1</i>	=	E21		
<i>Foxa2</i>	=			
<i>Hnf1b</i>	=			
<i>Hnf1a</i>	↑			
<i>Hnf4a</i>	↑			
<i>Pdx1</i>	↑			
<i>Rfx6</i>	↑			
<i>Neurod1</i>	=	P21(RR)	6%	(63)
<i>Isl1</i>	↑			
<i>Pax4</i>	=			
<i>Nkx6-1</i>	=			
<i>Ins</i>	=			
<i>Slc2A2</i>	↑			
<i>Kenj11</i>	=			
<i>Pdx1</i>	↓ (RR) ↑ (RC)	P28	6%	(62)
<i>Pdx1</i>	=			
<i>Hnf6</i>	=			
<i>Hnf1</i>	=			
<i>Ngn3</i>	=			
<i>Nkx6</i>	=	E21.5	8%	(67)
<i>Pax4</i>	=			
<i>Pax6</i>	=			
<i>Ins</i>	=			
<i>Slc2A2</i>	=			

“↓” indica una disminución, mientras que “↑” representa un aumento y el signo “=” indica que no hubo variación con respecto al control.



PDX1/IPF-1

El factor de transcripción pancreático duodenal homeobox-1 (PDX1) es conocido como un marcador específico en etapas tempranas del endodermo pancreático en el ratón y en humanos. La expresión de *Pdx1* es detectable en los primordios ventral y dorsal en el embrión de ratón iniciando en E 8.5 y E 9 respectivamente y es requerido para el crecimiento de la yema ventral ⁽⁵⁵⁾. Las células que expresan *Pdx1* representan los progenitores de todos los tipos celulares pancreáticos maduros, incluyendo células ductales, exocrinas y endocrinas. Las células que expresan *Pdx1* entre E9.5 y E11.5 conducen a tres linajes celulares pancreáticos. Sin embargo, las células que expresan *Pdx1* en E8.5, E12.5, o después, dan lugar solo a células acinares y endocrinas, pero no células ductales ⁽⁵⁰⁾. Al comienzo de la segunda transición PDX1 permanece restringido a células β (E18.5), donde activa la expresión génica de Insulina. También se expresa en células PP ^(51, 68).

HNF4 α

El factor nuclear hepático 4 alfa (HNF4 α) es un receptor nuclear de esteroides que juegan un papel en el desarrollo y diferenciación de células β . En el ratón, el gen *Hnf4 α* es expresado primero en el endodermo primario a E4.5 pero está restringido al endodermo visceral de E5.5 a E8.5. Posteriormente, la expresión de *Hnf4 α* es evidente en el desarrollo y en el páncreas adulto. HNF4 α es responsable de la regulación de genes participantes en los procesos como secreción de insulina en humanos adultos ⁽⁶⁹⁾. *Hnf1 α* es el principal regulador de *Hnf4 α* . Estos dos genes son independientes y la activación recíproca entre ellos puede servir para mantener su actividad en un estado estable ⁽⁶⁵⁾.



ISL1

El gen islet 1 (ISL1) es un factor homeodominio miembro de la familia de proteínas que contienen dominio LIM. *Isl1* es requerido para la formación del mesénquima de la yema pancreática dorsal al E9.0 en el embrión del ratón y no está expresado en el mesénquima ventral, también es requerido para la diferenciación del epitelio pancreático dorsal de células endócrinas. *Isl1* está expresado en todas las células productoras de hormonas del islote pancreático^(51, 53).

RFX6

El factor regulador X-6 (RFX6) se expresa en las células del epitelio durante el desarrollo temprano y posteriormente, su expresión se restringe a las células pancreáticas y del intestino. En el páncreas la transcripción de *Rfx6* es activada por el gen proendócrino *Neurog3* (neurogenina 3) en las células progenitoras endócrinas y se expresan en todos los tipos celulares de los islotes adultos. Rfx6 es esencial para la diferenciación de las células α y β . Además este factor regula la expresión de *Irx2*, *Arx*, *Pax6*, *Mafa*, *Neurod1*, *Pdx1* y *Pax4*⁽⁷⁰⁾.



2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Modelos animales y estudios epidemiológicos en humanos han demostrado que factores genéticos y ambientales adversos durante el embarazo y la vida posnatal temprana contribuyen al desarrollo de intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 en la edad adulta.

Hay evidencia que demuestra que en la restricción proteica severa se promueve la desregulación de factores de transcripción como *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6* e *Ins* que estimulan la diferenciación a expensas de la proliferación, resultando en un decremento de la reserva de células β al término de la lactancia, el cual puede contribuir a una predisposición a diabetes tipo 2 en la vida adulta.

México, como en otros países en desarrollo tienen una alta prevalencia de diabetes que se ha relacionado a un bajo peso en el nacimiento y en la edad infantil. El consumo de proteínas en estos países con bajos recursos es limitado o escaso.

El estudio de factores pancreáticos esencial para la función endocrina al finalizar la maduración del páncreas y en la etapa adulta es fundamental para comprender los mecanismos moleculares de programación en el desarrollo que predisponen a la aparición de diabetes tipo 2 en la población.



3. HIPÓTESIS

Los factores de transcripción involucrados en el cambio de diferenciación a proliferación en el desarrollo del islote pancreático en la restricción proteica severa durante la gestación y/o lactancia seguirán alterados al término de la tercera transición del páncreas en las crías macho (ratas), estas alteraciones ocasionadas durante estas ventanas críticas del desarrollo del páncreas conducirá a intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en la edad adulta temprana.



4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar el efecto de la restricción proteica materna al 6% sobre la expresión pancreática de *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6*, e *Ins* en crías macho al término de la tercera transición del páncreas y en adultos jóvenes.

4.2. Específicos

Evaluar el efecto de la restricción proteica severa sobre:

- La expresión génica de *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6*, e *Ins* en los islotes pancreáticos de crías macho en los días 28 y 90.
- Los parámetros bioquímicos, hormonales y somatométricos en crías macho en los días 28 y 90.
- La función del islote en el día 28, así como, la respuesta del organismo en el ensayo de tolerancia a la glucosa en el día 90.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales de experimentación

Ratas Wistar machos y hembras (Centro UNAM-Harlan, México) fueron mantenidas a una temperatura de 22-24 °C, en un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad con libre acceso a la comida (dieta *chow*) y al agua. Todos los procedimientos fueron probados por el Comité Interno de Cuidado y Uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la UNAM, OFICIO/FQ/CICUAL/057/13.

5.1.1. Grupos experimentales

Las hembras con un peso de 225-250 g (90-110 días de edad) fueron puestas a monta. El día 1 de gestación fue determinado mediante el hallazgo de espermatozoides en el frotis vaginal. Las hembras preñadas fueron alojadas individualmente y alimentadas *ad libitum* con una dieta control (20% proteína; “C”) o una dieta isocalórica baja en proteínas (6% proteínas; “R”) durante la gestación. La composición de las dietas se muestra en la tabla 3. Se registró el peso de las ratas y el consumo de alimento cada tercer día. Al nacimiento un grupo de ratas permaneció con la misma dieta y al otro se le asignó un cambio de dieta, la cual se le dio durante la lactancia y hasta el día 28, dado que se sabe el páncreas termina de madurar a este día (47), posteriormente se les alimentó con dieta *chow* (“c”), las ratas se sacrificaron en el día 28 y día 90; formando 8 grupos: CC, CR, RC y RR en P28 y CCc, CRc, RCc y RRc en P90, la primera letra hace referencia a la dieta asignada en la gestación, la segunda a la dieta durante la lactancia/día 28 y la tercera a la dieta que se le suministró hasta el día 90 postnatal (cuando aplica), figura 4.

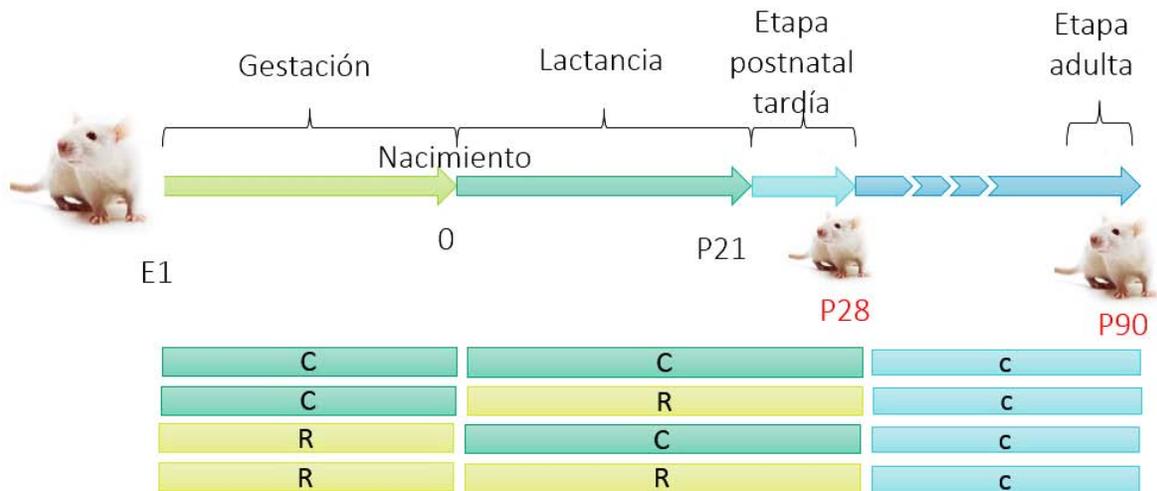


Figura 4. Diseño experimental. E1; día embrionario 1: P21, P28, P90; día postnatal 21, 28 y 90 respectivamente. C; dieta control: R; dieta restringida en proteínas: c; dieta *chow*. En rojo se remarcan los días de sacrificio

Tabla 3. Composición de las dietas Harlan empleadas

Dieta	20% proteína	6% proteína
	TD.91352	TD.90016
Proteínas ^a	20.3	6.1
Carbohidratos ^a	61.6	75.6
Grasas ^a	5.5	5.5
Kcal/ g	3.8	3.8

^a representa % en peso

5.1.2. Manejo de las crías

El día del parto, el tamaño de la camada fue ajustado a 8 crías/camada (4 machos y 4 hembras cuando fuera posible) y se realizó el cambio de dieta correspondiente al grupo experimental. Se obtuvo el peso, talla, circunferencia abdominal y ancho de cráneo al nacer. En el día 21 las crías fueron separadas de la madre. Unas camadas fueron sacrificadas a los 28 días de nacidas y otras al día 90 (3 meses) para ello las crías macho fueron puestas en ayuno por 8 h y anestesiadas con pentobarbital sódico (30 µg/g *i. p.*), para



la recolección de sangre por punción cardiaca y recolección de tejidos (páncreas, hígado, grasa, músculo y cerebro). A partir del páncreas se procedió al aislamiento de islotes. Se obtuvo el peso de las crías, la talla, circunferencia abdominal y ancho del cráneo al día 28 y 90 postnatal (P28 y P90 respectivamente). El suero se separó de la sangre total por centrifugación a 3000 rpm por 10 min. Los sueros fueron almacenados a -20°C hasta la realización de las determinaciones de colesterol, triglicéridos, glucosa e insulina.

5.2. Análisis de las medidas somatométricas

El peso de las crías se tomó con una balanza digital (Scientech Instruments, CO, EUA). La talla y circunferencia abdominal se tomaron con un flexómetro de plástico. La talla se registró como la longitud de la nariz hasta la punta de la cola y la circunferencia abdominal se registró en la parte más prominente del abdomen. El ancho del cráneo se midió con vernier y se tomó como lectura la distancia de oreja a oreja.

5.3. Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal - P90

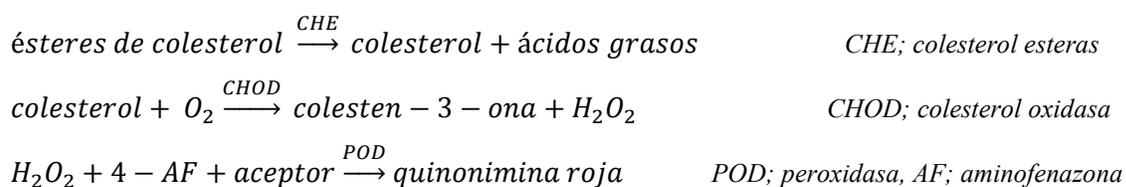
Antes de iniciar la prueba de tolerancia a glucosa intraperitoneal tres machos de cada camada (90 días postnatales de edad, P90) fueron puestos en ayuno toda la noche (12 h). Posteriormente, se administró una dosis de 2 mg/g de peso corporal de una solución al 50% (g/mL) de glucosa. La primera muestra de sangre fue colectada (tiempo cero) antes de la inyección de glucosa. Se tomó una muestra sanguínea a los 15, 30, 45, 60 y 120 minutos después de su administración. La homeostasis de la glucosa fue evaluada mediante el cálculo del área bajo la curva (ABC) empleando los valores de glucosa en sangre a los 0, 15, 30, 45, 60 y 120 min.



5.4. Análisis bioquímico

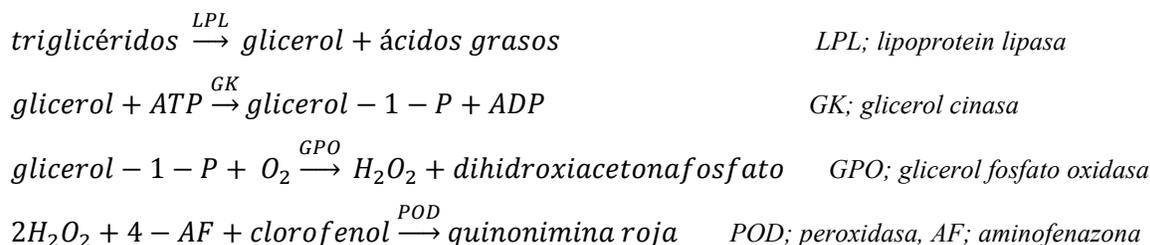
5.4.1. Determinación de colesterol

La concentración de colesterol se determinó después de una hidrólisis enzimática y oxidación, utilizando un kit comercial Colestat enzimático (Wiener Laboratorios S.A.I.C, Rosario, Argentina). Se obtuvo la concentración de las muestras por un espectrofotómetro, leyendo a 505 nm. El fundamento de la técnica se describe a continuación.



5.4.2. Determinación de triglicéridos

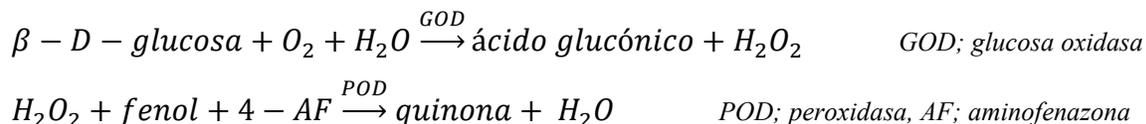
La determinación de triglicéridos fue medida a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas empleando un kit comercial TG Color GPO/PAP AA (Wiener Laboratorios S.A.I.C, Rosario, Argentina). Se obtuvo la concentración de las muestras por un espectrofotómetro, leyendo a 505 nm. El fundamento de la técnica se describe a continuación.





5.4.3. Determinación de glucosa

La glucosa fue medida por el método de la glucosa oxidasa con el reactivo Glucemia enzimática AA (Wiener Laboratorios S.A.I.C, Rosario, Argentina). Se obtuvo la concentración de las muestras por un espectrofotómetro, leyendo a 505 nm. El fundamento de la técnica se describe a continuación.



5.4.4. Determinación de insulina

La concentración de insulina fue determinada por ELISA (Alpco, Windham, NH). Es un inmunoensayo de tipo sándwich. Los pozos de la microplaca se recubren con un anticuerpo monoclonal específico para la insulina. Los estándares, controles y muestras se añaden a los pozos de la microplaca con el anticuerpo de detección. La microplaca se incubó a continuación en un agitador de microplacas a 700-900 rpm. Después de la primera incubación, los pozos se lavaron con buffer de lavado. El sustrato TMB se añade, y la microplaca se incubó por segunda vez en un agitador de microplacas a 700 a 900 rpm. Una vez que la segunda incubación es completada, se añade la solución de *stop*, y se mide la densidad óptica (D.O.) con un espectrofotómetro a 450 nm. La intensidad de color generado es directamente proporcional a la cantidad de insulina en la muestra.

5.5. Aislamiento de islotes pancreáticos

A los 28 y 90 días se procedió al aislamiento de los islotes pancreáticos por digestión con colagenasa. Los páncreas recién extraídos se colocaron en una solución de 1 mg/mL de colagenasa tipo IX (Sigma) disuelta en solución de Hanks, solución salina balanceada, pH 7.4). La digestión se llevó a cabo por aproximadamente 20 min a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se añadió solución de Hanks fría a la suspensión para detener la digestión. La suspensión se centrifugó a 1200 rpm por 10 min a 4°C y se eliminó el



sobrenadante. El botón se resuspendió en solución de Hanks y se centrifugó nuevamente a las condiciones anteriores. Después de retirar el sobrenadante, se añadió solución de Hanks suplementada con el 10% de suero fetal bovino para resuspender el botón. Los islotes se separaron por un gradiente discontinuo de soluciones al 27, 23, 20 y 11% de Ficoll (Ficoll PM400, GE Healthcare). El gradiente se centrifugó a 2000 rpm/10 min y se recuperaron los islotes de la interface entre los gradientes 11 y 20%, figura 5.

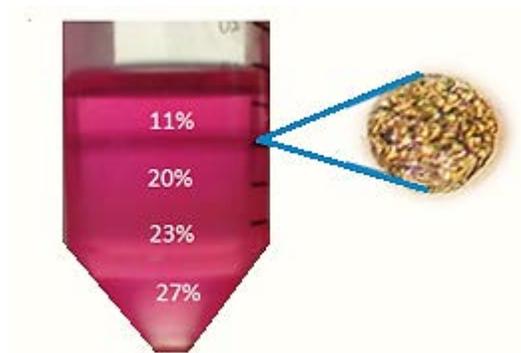


Figura 5. Gradiente de Ficoll para la separación de Islotes pancreáticos

Los islotes fueron colocados en una caja Petri para su selección, después fueron lavados con buffer de fosfatos (pH 7.4, Gibco-Invitrogen) para su posterior extracción de ARN. Las células individuales fueron cultivadas a 37°C, en medio RPMI-1640 (11.6 mM de glucosa) suplementada con 200 U/mL de penicilina G, 200 mg/mL de estreptomycin, 0.5 mg/mL de anfotericina B y 1% de suero fetal bovino. Los experimentos de secreción de insulina estimulada por glucosa fueron realizados después de 48 h de cultivo.

5.6. Ensayo de secreción de insulina estimulada por glucosa - P28

La concentración de insulina fue determinada en el sobrenadante del medio recolectado de un cultivo de 10 a 20 islotes aislados de todos los grupos experimentales en el día 28, expuestas a 1) 5.6 mM de glucosa, 2) 5.6 mM de glucosa/ 40 mM de KCl, 3) 15.6 mM de glucosa por 1 h a 37°C. Todos los cultivos fueron equilibrados con solución de Hanks (5.6 mM de glucosa) por 1 h a 37°C antes de iniciar el experimento. La concentración de



insulina fue determinada como se menciona anteriormente, realizando un duplicado de cada ensayo. Los resultados fueron expresados por número de islotes.

5.7. Extracción de ARN de islotes pancreáticos y síntesis de ADNc

La extracción de ARN de los islotes recién aislados se llevó a cabo utilizando el Kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la concentración de ARN y pureza se llevó a cabo por espectrofotometría en un Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE.UA.). La integridad se confirmó en un gel de agarosa al 1%. Se retro-transcribió un total de 200 ng de ADNc mediante transcripción reversa del ARN con el Kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, Valencia, CA, EE.UA.), utilizando oligonucleótidos hexaméricos aleatorios.

5.8. Estudio de la expresión génica por RT-PCR

La evaluación de la expresión génica de *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Isl1* e *Ins*, se hizo a través de la cuantificación relativa de los niveles de ARN por PCR cuantitativa (RT-qPCR), empleando el gen *G6pdh* como constitutivo. Las reacciones se realizaron por duplicado. La expresión relativa se obtuvo por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las reacciones se realizaron en un equipo LightCycler 2.0 con sondas de hidrolisis UPL (Biblioteca de sondas universales) marcadas con fluoresceína. Los oligonucleótidos para cada gen fueron diseñados con el programa Profinder (Roche Applied Science, Hague Road, IN, EE.UU.) y el kit LightCycler TaqMan Master (Roche Applied Science, Hague Road, IN, EE.UU.). Las secuencias de los oligonucleótidos y las sondas utilizadas para cada gen se muestran en la tabla 4.



5.9. Análisis estadístico

Los datos están presentados como la media \pm 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.

Los efectos de la dieta entre los cuatro grupos al día 28 y 90 pos natal (3 meses) fueron determinados mediante un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y con la prueba post hoc Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $P < 0.05$. El programa estadístico empleado fue GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., California, SD, EUA.).

Tabla 4.- Oligonucleótidos y sondas utilizadas en el ensayo de qPCR.

Gen	Oligo sentido(5'-3')	Oligo anti-sentido(3'-5')	Sonda UPL
<i>Hnf4a</i>	AGGCAGAGGTCCTGTCTCAG	CCCATTCGACCAGAACCA	68
<i>Pdx1</i>	TAAGGCCTGGCTTGTAGCTC	GGGTCCTTGTAGAGCTGTGTG	68
<i>Rfx6</i>	GGGAGCTTCAATTCCTCAGT	TGTGCCTCTGGGTAGTTTATATTG	68
<i>Isl1</i>	AGCAACCCAACGACAAAAC	CCATCATGTCTCTCCGGACT	83
<i>Ins</i>	GACCTTGGCACTGGAGGTT	CCAGTTGGTAGAGGGAGCAG	29
<i>G6pdh</i>	TTATCATCATGGGTGCATC	AAGGTGTCTTCGGGTAGAAGG	83

Hnf4a, factor nuclear hepático 4 alfa; *Pdx1*, gen homeótico pancreático y duodénico; *Rfx6*, factor regulador X, 6; *Isl1*, gen homeótico islet 1, homeodominio LIM; *Ins*, insulina; *Slc2a2* (Glut2), transportador de glucosa (transporte facilitado) de la familia 2 de portadores de soluto, miembro 2; *G6pdh*, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.



6. RESULTADOS

6.1. Efecto de la restricción proteica materna en la vida postnatal temprana, al término de la maduración funcional del páncreas endócrino (P28):

6.1.1. Crecimiento de las crías macho

Los resultados indicaron que las crías con una restricción prenatal (RC), presentaron un peso similar al control (CC). Sin embargo, cuando la dieta restringida fue administrada postnatalmente con o sin restricción prenatal (CR y RR) el peso de las crías fue menor en comparación con el grupo CC, figura 6A. Los datos de la ganancia de peso neto (Δ peso) enfatizan que una restricción proteica materna en la etapa postnatal temprana es suficiente para afectar el peso de la progenie. Destacando, la pérdida significativa de peso en los grupos CR y RR, a diferencia del grupo RC, en el cual no se encontró algún cambio, figura 6B.

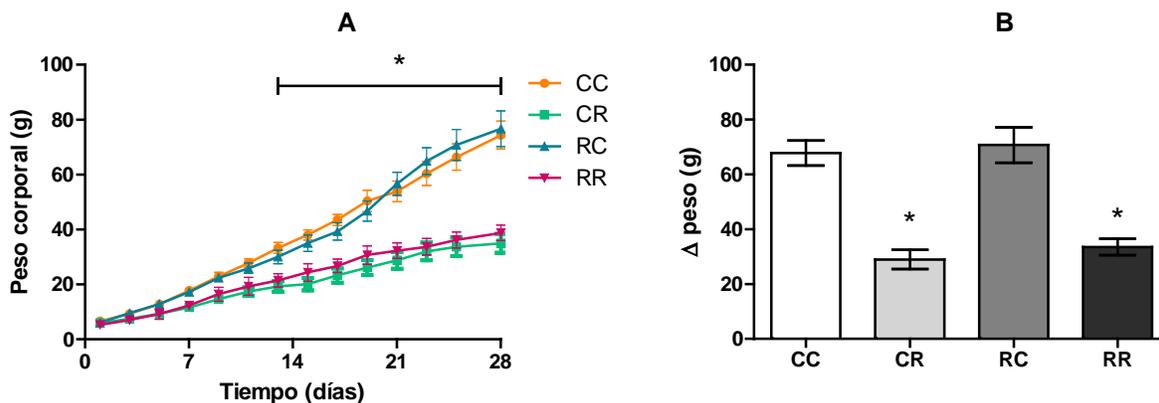


Figura 6. (A) curva de crecimiento y (B) ganancia de peso desde el nacimiento hasta P28. Los datos representan la media \pm EE. $n=4-5$ camadas, 4 crías macho por camada. * $p<0.05$ vs CC. La primera letra hace referencia a la dieta en gestación, la segunda durante la lactancia hasta el día 28.



6.1.2. Somatometría de las crías macho

Los resultados muestran que la talla de las crías del grupo CR fue menor en comparación con el grupo CC. En contraste, cuando la restricción es prenatal (RC), las crías tuvieron una talla similar al control. De manera interesante, el consumo de alimento de las madres que se enfrentaron a un cambio en su dieta después del parto (CR y RC) fue menor, a diferencia del grupo RR cuyo consumo de alimento tiende a ser mayor que en CC. Sin embargo, la talla de las crías disminuyó en este último grupo.

Por otra parte, el diámetro cefálico no fue afectado en ninguno de los grupos experimentales, pero sí el perímetro abdominal, el cual fue menor en los grupos CR y RR. Además, se calculó la relación diámetro cefálico/perímetro abdominal (DC/PA), un parámetro que ayuda a evaluar la severidad de una mala nutrición. Los resultados señalaron que el grupo más afectado fue el CR, en el cual hubo un incremento del 33% de la relación DC/PA cuando se le comparó con el control, tabla 5.

Tabla 5. Consumo de alimento y parámetros somatométricos de crías macho con restricción proteica materna en P28.

	CC (n=5)	CR (n=5)	RC (n=5)	RR (n=4)
Consumo de alimento ^a (g/día)	18.13 ± 1.18	16.28 ± 1.12	16.42 ± 1.57	19.54 ± 0.89
Talla (cm)	24.4 ± 0.6	19.2 ± 1.1*	25.1 ± 0.3	19.3 ± 0.5*
Diámetro cefálico (cm)	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1
Perímetro abdominal (cm)	8.8 ± 0.2	6.6 ± 0.3*	8.2 ± 0.2	6.8 ± 0.2*
DC/PA	0.23 ± 0.01	0.31 ± 0.01*	0.25 ± 0.02	0.28 ± 0.01

Los datos representan la media ± EE. DC; diámetro cefálico, PA; perímetro abdominal. ^a representa el consumo de alimento de la madre del día 1 al día 21 después del nacimiento de las crías. “n” representa el número de camadas, 4 crías macho por camada. * $P < 0.05$ vs. CC.



6.1.3. Expresión génica en el islote

Los datos revelaron que en las crías del grupo CR la expresión de *Hnf4α*, *Pdx1* y *Rfx6* disminuye significativamente en comparación con el control. Por el contrario, *Ins* incrementa su expresión e *Isl1* tiende a aumentar comparado con el grupo CC.

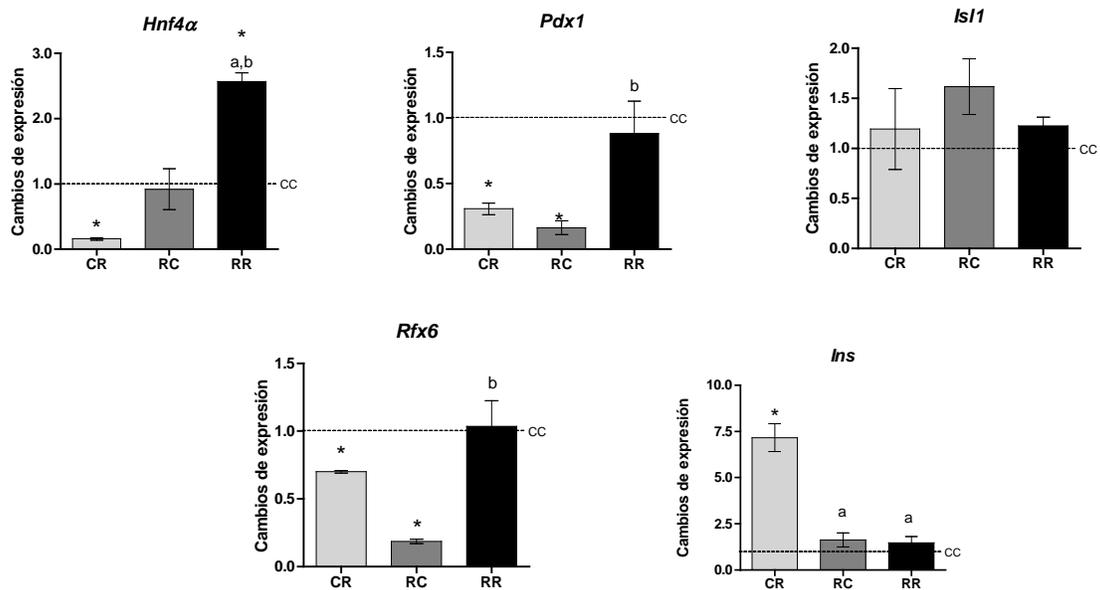


Figura 7. Perfil de expresión relativa de los genes *Hnf4α*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6* e *Ins* en islotes pancreáticos en P28. Los datos representan la media \pm ES. n= 4-5 camadas. * $p < 0.05$ vs. CC, ^a $p < 0.05$ vs. CR, ^b $p < 0.05$ vs. RC.

En el grupo RC la expresión *Pdx1* y *Rfx6* se redujo, mientras la expresión de los genes *Hnf4α*, *Ins* e *Isl1* no mostraron alteraciones en su expresión cuando se les compara con el grupo control.

La expresión en el grupo RR aumentó en *Hnf4α* en contraste, la expresión de *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6* e *Ins* no se modificó con respecto al grupo CC, figura 7, tabla 6.



Tabla 6. Cambios en la expresión en islotes pancreáticos en P28.

	CR (n=5)	RC (n=5)	RR (n=4)
<i>Hnf4a</i>	0.16 ± 0.02*	0.92 ± 0.31	2.67 ± 0.13*
<i>Pdx1</i>	0.31 ± 0.04*	0.16 ± 0.05*	0.88 ± 0.25
<i>Isl1</i>	1.19 ± 0.04	1.62 ± 0.28	1.22 ± 0.09
<i>Rfx6</i>	0.70 ± 0.3*	0.19 ± 0.02*	1.04 ± 0.19
<i>Ins</i>	7.17 ± 0.75*	1.63 ± 0.38	1.48 ± 0.34

El cambio de expresión es relativo al grupo CC. Los datos representan la media ± EE. “n” representa el número de camadas. * $P < 0.05$ vs. CC.

6.1.4. Parametros bioquímicos y niveles de Insulina

Los niveles de colesterol no se modifican tras una restricción proteica materna en P28. En tanto, una restricción pre y/o posnatal (CR, RC y RR) conlleva a una disminución significativa en los niveles de triglicéridos con respecto al grupo CC.

Tabla 7. Parámetros bioquímicos de crías macho con restricción proteica materna en P28.

	CC (n=5)	CR (n=5)	RC (n=5)	RRc (n=4)
Colesterol (mg/dL)	81.1 ± 7.3	87.3 ± 13.5	78.8 ± 3.1	81.9 ± 8.9
Triglicéridos (mg/dL)	123.9 ± 13.3	77.0 ± 10.6*	67.3 ± 4.4*	75.2 ± 1.8*
Glucosa (mg/dL)	211.9 ± 5.8	201.1 ± 19.8	211.5 ± 17.1	241.6 ± 14.6
Insulina (ng/mL)	0.51 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.43 ± 0.04	0.40 ± 0.05

Los datos representan la media ± EE. “n” representa el número de camadas, 4 crías macho por camada. $P < 0.05$ vs. CC.

Las concentraciones de glucosa de los grupos CR y RC no mostraron un cambio en relación al grupo control. Por el contrario, en el grupo RR la glucosa tiende a aumentar. Los grupos CR, RC y RR mostraron una caída en las concentraciones de insulina sin llegar a ser significativa, tabla 7.



Los valores de l índice HOMA-IR fueron s imilares a l C C e n l o s g r u p o s R C y R R, s i n e m b a r g o, e l g r u p o C R p r e s e n t ó u n a t e n d e n c i a a d i s m i n u i r, f i g u r a 8.

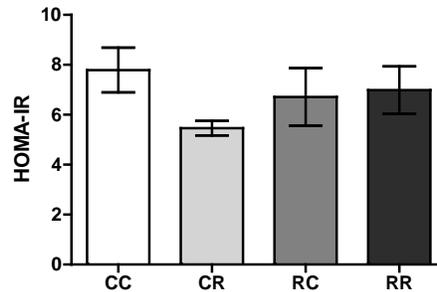


Figura 8. HOMA-IR de crías macho en P28. n= 4-5 camadas, 4 crías macho por camada.

Los datos representan la media ± EE.

6.1.5. Peso de páncreas e hígado en crías macho

El páncreas e hígado tuvieron un m enor peso en los grupos CR y RR c omparado con el grupo CC.

Tabla 8. Peso del páncreas e hígado de crías macho con restricción proteica en P28.

	CC (n=5)	CR (n=5)	RC (n=5)	RRc (n=4)
Páncreas (g)	0.36 ± 0.06	0.12 ± 0.02*	0.31 ± 0.03	0.14 ± 0.01*
Hígado (g)	3.4 ± 0.4	1.6 ± 0.2*	3.6 ± 0.2	1.9 ± 0.2*
% Páncreas^b	0.45 ± 0.05	0.34 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.40 ± 0.01
% Hígado^b	4.6 ± 0.3	4.4 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.9 ± 0.3

Los datos representan la media ± EE. ^a indica el consumo del alimento por la madre,

^b representa el % en peso del órgano respecto al peso corporal. “n” representa el número de camadas, 4 crías macho por camada. * $P < 0.05$ vs. CC.

La no rmalización c on e l p e s o c o r p o r a l i n d i c ó q u e e l p á n c r e a s e n l o s g r u p o s C R y R C p r e s e n t a r o n m e n o r t a m a ñ o e n r e l a c i ó n c o n e l c o n t r o l s i n s e r s i g n i f i c a t i v o. E n t a n t o, e l h í g a d o s e m a n t u v o s i n c a m b i o s e n c o m p a r a c i ó n c o n e l g r u p o C C c u a n d o s e r e l a c i o n ó c o n e l p e s o c o r p o r a l, t a b l a 8.



6.1.6. Secreción de insulina estimulada por glucosa

Para evaluar una posible falla secretora a nivel de la célula β , se analizó el funcionamiento de éstas a través de un ensayo de secreción de insulina en el islote pancreático. Los datos indicaron que cuando el islote es sometido a una concentración de 5.6 mM de glucosa, el grupo RR disminuye su secreción de insulina, demostrando la presencia de una falla secretora en los islotes, mientras CR y RC no revelaron cambios en la secreción de insulina en comparación con el grupo CC. No obstante, cuando el islote fue retado con una concentración de 15.6 mM de glucosa, el grupo CR exhibió una sobre estimulación en la secreción de insulina (2 veces mayor al CC), en tanto las crías RC y RR no presentaron cambios con respecto al control.

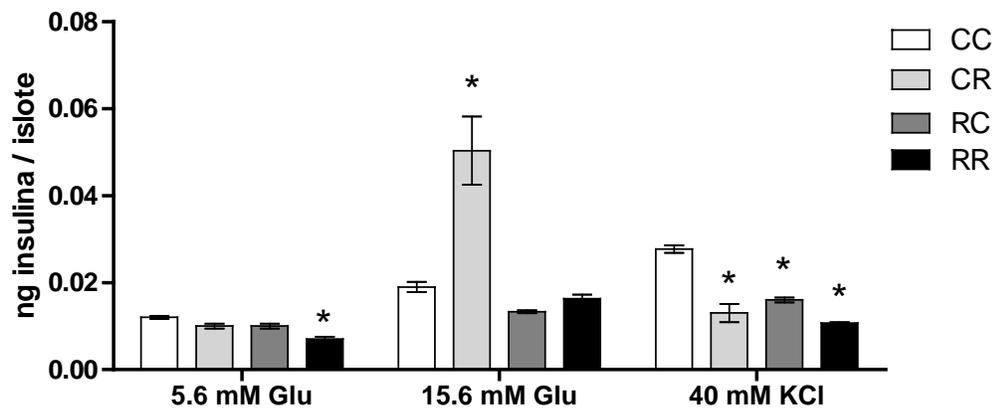


Figura 9. Secreción de insulina estimulada por glucosa en P28. n= 4-5 camadas. Los datos representan la media \pm EE. CCc, CRc, RCc y RRc, n=3. * $P < 0.05$ vs. CC.

La respuesta de los islotes de los grupos CR, RC y RR a la despolarización de la membrana bajo una concentración de 40 mM de KCl, condujo a una secreción de insulina significativamente menor en comparación con el grupo CC, figura 9.



6.2. Consecuencias de la restricción proteica materna en la adultez temprana (P90):

6.2.1. Crecimiento de las crías macho.

Con el fin de evaluar si estas alteraciones observadas a P28 programan a la progenie a un estado patológico en la edad adulta temprana (P90), las crías macho fueron alimentadas con dieta *chow* a partir de P28 hasta P90, día al que se procedió a estudiar el estado de la descendencia.

La evolución del crecimiento en las crías macho mostró un perfil similar que en P28. Sin embargo, a partir del día 76 postnatal, el grupo CRc incrementó su peso, superando al grupo RRc pero sin llegar a alcanzar el registrado por el grupo CCc figura 10A.

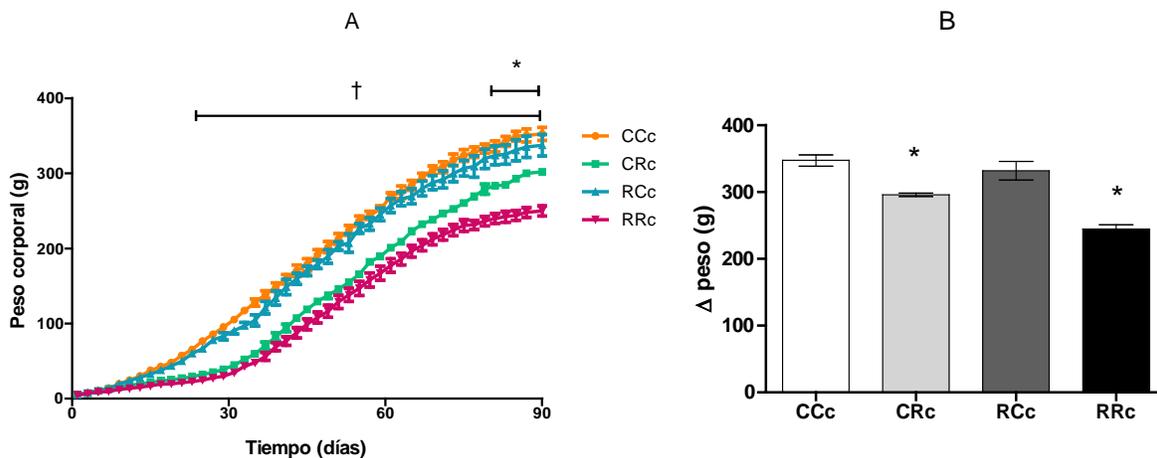


Figura 10. (A) curva de crecimiento y (B) ganancia de peso de P28 a P90. n= 4-6 camadas, 4 crías macho por camada. Los datos representan la media \pm EE. * $p < 0.05$ c vs CC(c). † $p < 0.05$ RCc vs RRc. La primera letra hace referencia a la dieta en gestación, la segunda a la dieta asignada en la lactancia hasta el día 28 y la tercera a la dieta *chow* después de este periodo.

En P90 el comportamiento de la ganancia de peso fue diferente en el periodo comprendido entre P28 hasta P90. La ganancia de peso disminuyó considerablemente en el grupo RRc con respecto al grupo control, figura 10B.



6.2.2. Somatometría de las crías macho

Los resultados mostraron que las crías cuyas madres fueron expuestas a un cambio en la dieta después del nacimiento, grupos CRc y RCc, tienden a consumir menor cantidad de alimento con respecto al grupo RRc, cuya ingesta fue mayor que el CCc sin llegar a ser significativo, a pesar de esto no hubo recuperación en la talla del grupo RRc, y en las crías del grupo CRc tiende a ser baja en relación al grupo CCc. Ninguno de los grupos estudiados reflejó cambios en el diámetro cefálico, tabla 9.

Tabla 9. Consumo de alimento y parámetros somatométricos de crías macho con una restricción proteica materna en P90.

	CCc (n=6)	CRc (n=4)	RC (n=5)	RRc (n=6)
Consumo de alimento^a (g/día)	45.46 ± 1.50	41.77 ± 2.25	42.36 ± 3.06	47.65 ± 1.44
Talla (cm)	42.6 ± 0.4	40.9 ± 0.4	42.4 ± 0.7	39.3 ± 0.4*
Diámetro cefálico (cm)	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1
Perímetro abdominal (cm)	16.2 ± 0.2	15.6 ± 0.2	16.0 ± 0.6	14.0 ± 0.4*
AC/PA	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.21 ± 0.01

Los datos representan la media ± EE. DC; diámetro cefálico, PA; perímetro abdominal. ^a representa el consumo de alimento por las crías desde el día 28 hasta el día 90 postnatal. “n” representa el número de camadas, 4 crías macho por camada. * $P < 0.05$ vs. CCc.

El grupo RRc no alcanzó los valores descritos en el grupo CCc para el perímetro abdominal, en tanto, el grupo CRc tuvo un perímetro abdominal 3% mayor que las crías RRc, la descendencia RCc tuvo un perímetro abdominal similar al detectado en CCc. Cuando se hizo la relación DC/PA, todos los grupos presentaron valores similares, tabla 9.



6.2.3. Expresión génica en el islote

Los datos indicaron que el grupo CRc se presentó un incremento en la expresión de *Isl1*. En tanto la expresión de *Pdx1* y *Rfx6* tiende a disminuir cuando se le compara con el grupo CCc, no encontrándose cambios en la expresión de *Hnf4α* e *Ins*.

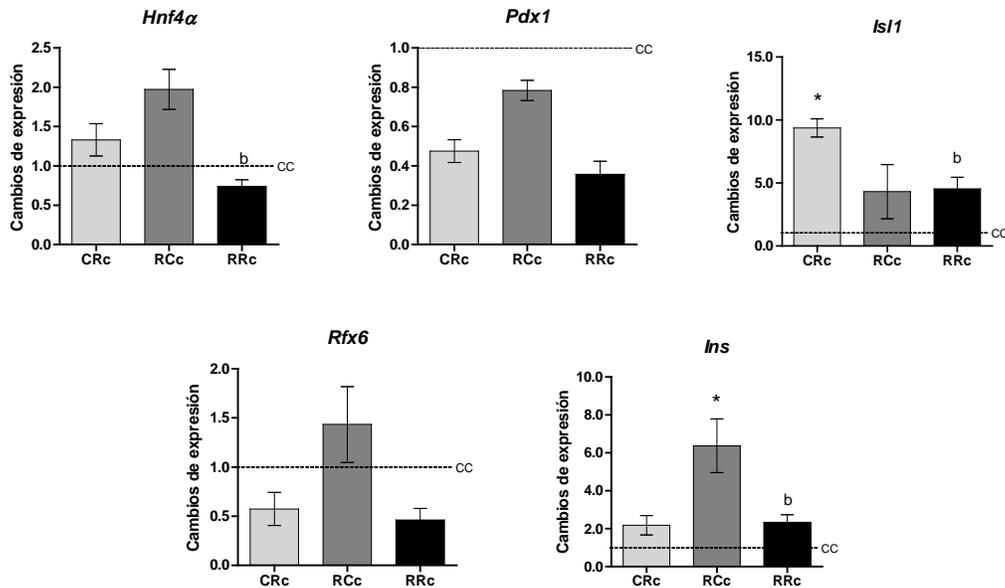


Figura 11. Perfil de expresión relativa de los genes *Hnf4α*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6* e *Ins* en islotes pancreáticos en P90. n= 4-6 camadas. Los datos representan la media ± EE. * $P < 0.05$ vs. CCc, ^ $P < 0.05$ vs. CRc, ^b $P < 0.05$ vs. RCc.

En el grupo RCc la expresión de *Hnf4α* e *Isl1* tienden a aumentar e *Ins* incrementa su expresión significativamente con respecto al CCc, en contraste el gen *Pdx1* tiende a disminuir su expresión comparado con el CCc, en tanto que la expresión de *Rfx6* no fue modificada.

En el grupo RRc no se apreciaron cambios significativos. Sin embargo, la expresión de los genes *Hnf4α*, *Pdx1* y *Rfx6* tiende a disminuir, por el contrario, *Isl1* e *Ins* mostraron tendencia a aumentar comparado con el grupo CCc, figura 11, tabla 10.



Tabla 10. Cambios en la expresión en islotes pancreáticos en P90.

	CRc (n=4)	RC (n=5)	RRc (n=6)
<i>Hnf4a</i>	1.33 ± 0.21	1.98 ± 0.26	0.73 ± 0.09
<i>Pdx1</i>	0.48 ± 0.06	0.78 ± 0.05	0.36 ± 0.07
<i>Isl1</i>	9.38 ± 0.72*	4.31 ± 2.14	4.54 ± 0.92
<i>Rfx6</i>	0.57 ± 0.17	1.43 ± 0.39	0.46 ± 0.12
<i>Ins</i>	2.18 ± 0.51	6.38 ± 1.41*	2.35 ± 0.40

El cambio de expresión es relativo al grupo CC. Los datos representan la media ± EE.

“n” representa el número de camadas. * $P < 0.05$ vs. CC.

6.2.4. Parametros bioquímicos

Los parámetros bioquímicos describieron altas concentraciones de colesterol en los grupos CRc y RCc. Las concentraciones de triglicéridos se redujeron en el grupo RRc y en el grupo CRc presentan una tendencia a disminuir en relación al control. Los niveles de glucosa no mostraron cambios significativos, sin embargo, en el RRc tienden a disminuir, en contraste, la concentración de insulina decrece en los grupos CRc y RRc, tabla 11.

Tabla 11. Parámetros bioquímicos de crías macho con restricción proteica materna en P90.

	CCc (n=6)	CRc (n=4)	RCc (n=5)	RRc (n=6)
Colesterol (mg/dL)	58.7 ± 1.9	84.9 ± 1.5*	101.2 ± 4.6*	72.2 ± 5.4
Triglicéridos (mg/dL)	177.0 ± 11.5	141.6 ± 5.3*	168.1 ± 8.8	139.8 ± 6.2*
Glucosa (mg/dL)	147.2 ± 10.1	150.8 ± 6.3	144.0 ± 8.1	134.8 ± 6.5
Insulina (ng/mL)	1.40 ± 0.10	0.71 ± 0.03*	1.29 ± 0.04	0.66 ± 0.02*

Los datos representan la media ± EE. “n” representa el número de camadas, 4 crías macho por camada. * $P < 0.05$ vs. CCc.

Por otro lado, los valores de índice HOMA-IR en los grupos CRc y RRc fue significativamente menor que en el grupo CCc, sugiriendo mayor sensibilidad a la insulina, figura 12.

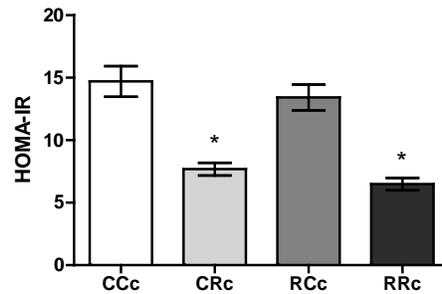


Figura 12. HOMA-IR de las crías macho en P90. Los datos representan la media \pm EE. n= 4-6 camadas, “n” representa el número de camadas, 4 crías macho por camada.. * $p < 0.05$ vs CCc.

6.2.5. Peso de páncreas e hígado en crías macho

El peso del páncreas en los grupos CRc y RRc tiende a ser menor en relación al grupo CCc, mientras que en el grupo RCc tiende a incrementarse. Cuando se normalizó con el peso corporal, no se encontró cambios significativos, sin embargo en los grupos RCc y RRc se demuestra que el páncreas tiende a reducir su peso.

Tabla 12. Peso del páncreas e hígado de crías macho con restricción proteica en P90

	CCc (n=6)	CRc (n=4)	RC (n=5)	RRc (n=6)
Páncreas (g)	0.83 \pm 0.06	0.67 \pm 0.10	0.93 \pm 0.04	0.71 \pm 0.03
Hígado (g)	12.3 \pm 0.4	10.0 \pm 0.3	10.8 \pm 1.0	8.0 \pm 0.4*
% Páncreas^b	0.23 \pm 0.02	0.22 \pm 0.03	0.28 \pm 0.02	0.27 \pm 0.02
% Hígado^b	3.5 \pm 0.1	3.3 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1	3.1 \pm 0.2

Los datos representan la media \pm EE. ^a indica el consumo del alimento por la camada, ^b representa el % en peso del órgano respecto al peso corporal. “n” representa el número de camadas, 4 crías macho por camada. * $P < 0.05$ vs. CCc.

El peso del hígado presentó un decremento en el grupo RRc y tiende a disminuir en CRc y RCc. La normalización con el peso corporal indicó que el grupo RCc tiende a tener un hígado de menor tamaño con respecto a grupo control, tabla 12.



6.2.6. Prueba de tolerancia a la glucosa, P90

En la figura 13 se representan las curvas de tolerancia a la glucosa y el área bajo la curva (ABC). En el minuto 30 de spués de la administración de glucosa hay una disminución significativa en los niveles de glucosa entre el grupo RCc y RRc. En tanto, el ABC se mantuvo en CRc, en el grupo RCc la tolerancia a la glucosa decreció, no así en el grupo RRc donde aumentó ligeramente, sin embargo, estos cambios no son significativos.

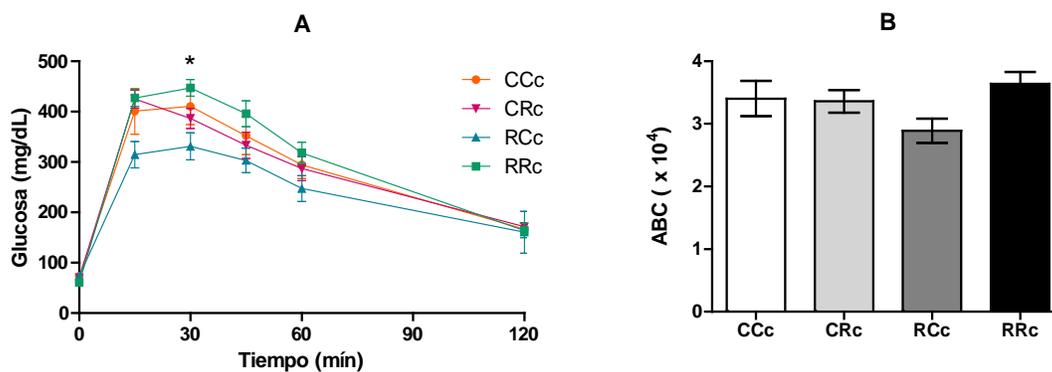


Figura 13. (A) Curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en P90, (B) Área bajo la curva (ABC). Las unidades de ABC son arbitrarias. n= 4-6 camadas, “n” representa el número de camadas, 4 crías macho por camada. Los datos representan la media \pm EE. * $p < 0.05$ RCc vs RRc.



7. DISCUSIÓN

En estudios anteriores realizados por nuestro grupo de trabajo se demostró que en el islote pancreático la restricción proteica promueve la diferenciación a través de la sobre regulación de factores de transcripción como *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6* e *Ins* a expensas de la proliferación⁽⁴⁰⁾. Sin embargo, se desconoce si estas adaptaciones se mantienen al término de la maduración del páncreas endócrino que se considera ocurre al día 28 (P28) y cuál es su influencia en las etapas posteriores del desarrollo, así como, su relación funcional en el adulto-joven (P90).

La evaluación de factores de transcripción implicados en la diferenciación del páncreas que son modificados durante períodos tempranos de crecimiento y que contribuyen funcionalmente en la vida postnatal, resulta fundamental para comprender los mecanismos moleculares de programación en el desarrollo que conduce a la aparición de diabetes. Por lo tanto, en el presente estudio se investigó la influencia de la expresión en el islote pancreático de *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6*, e *Ins* en las alteraciones metabólicas en etapas postnatales tardías (P28 y P90) en el modelo de restricción proteica severa (6%) administrada durante la vida intrauterina y postnatal temprana.

7.1. Efecto de la restricción proteica materna en la vida postnatal temprana: día 28 postnatal

El análisis de expresión en P28 mostró que *Hnf4a* fue sobre expresado en el grupo RR, este incremento ha sido relacionado con reducción en la proliferación de la célula β e inducción de apoptosis^(71,72), como fue observado en P21 en un estudio previo, en el cual la sobre expresión de *Hnf4a* se asoció a una reducción en la masa de células β ⁽⁶³⁾.

El gen *Pdx1* en P28 disminuyó significativamente en los grupos CR y RC a diferencia de los resultados obtenidos en P21 donde la expresión no se modificó por la dieta⁽⁶³⁾. Se ha demostrado que la restricción proteica moderada durante la gestación y lactancia reduce la expresión de *Pdx1* en el islote pancreático, relacionado con reducción en el área del islote y



falla en la secreción de insulina en P 28 ⁽⁶²⁾, e stos r esultados s on c ongruentes c on l os encontrados e n este estudio c on l a r estrictión proteica s evera. *Pdx1* es es encial en el desarrollo e mbrionario del pá ncreas ^(73, 7 4) y en l as etapas p ostnatales *Pdx1* actúa principalmente regulando de manera positiva la transcripción de varios genes específicos de la célula β ^(75, 76, 77), además *Pdx1* regula la formación de *novo* y regeneración de células β ⁽⁷⁸⁾. Por lo tanto, la disminución en la expresión de *Pdx1* sugiere efectos en cascada que afectan diversas reacciones de la secreción de insulina estimulada por glucosa y puede traer serias consecuencias en el mantenimiento de la masa de células β provocando una disminución ⁽⁶³⁾. L os r esultados e n P 28 m uestran una t endencia a disminuir l as concentraciones de insulina en los grupos CR y RC (tabla 6), lo cual está en concordancia con las implicaciones mencionadas.

Previamente, nuestro grupo de trabajo mostró que el aumento en la expresión de *Isl1* en P21 tras una restricción proteica pre y postnatal se relaciona con una aceleración en la maduración del islote ⁽⁶³⁾. En el presente estudio en P28 *Isl1* tiende a aumentar en los tres grupos experimentales sugiriendo que l os islotes pa ncreáticos s iguen e n pr oceso de maduración.

En este estudio la expresión de *Rfx6* se encuentra disminuida en el grupo CR en P 28, mientras que en estudios previos en P21 se encontró un aumento en su expresión ⁽⁶³⁾. La expresión de este gen está restringida a etapas tempranas del desarrollo del páncreas ⁽⁷⁹⁾, por consiguiente, este cambio de expresión puede deberse a un mecanismo compensatorio para tratar de regular la producción de insulina ⁽⁸⁰⁾. Por otro lado la expresión de *Rfx6* también se reduce en el grupo RC en P 28. La regulación y función de *Rfx6* en el islote pancreático en esta etapa del desarrollo aún no es clara, sin embargo, estos cambios en su expresión resaltan la importancia de este gen en la maduración del páncreas endócrino.

Todos los factores transcripcionales estudiados, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6*, regulan en gran medida la masa de células β , alteraciones en su expresión en P28 podrían conducir a un cambio estructural en la célula β en todos los grupos experimentales conduciendo a una falla en la secreción de insulina. Adicionalmente, el ARN mensajero de *Ins* en P28 aumenta significativamente en el grupo CR, con una tendencia a incrementarse en RC y RR, lo cual



sugiere una actividad compensatoria en las etapas tempranas del desarrollo posterior a la administración de una dieta con restricción proteica severa en gestación y/o lactancia ^(9, 81).

El ensayo de la secreción de insulina estimulada por glucosa en los islotes de los tres grupos experimentales pone de manifiesto que los cambios en la expresión de los genes estudiados en P28 provocan alteraciones en el funcionamiento de la célula β pancreática que altera la secreción de insulina ⁽⁸²⁾. La hiper respuesta observada en el grupo CR ante altas concentraciones de glucosa, destaca que una nutrición deficiente en proteínas afecta la sensibilidad a la insulina pese a que durante la gestación las crías tuvieron un microambiente nutricional idóneo para un correcto desarrollo de los tejidos. En tanto, la secreción de insulina estimulada por K^+ , un secretagogo importante en la liberación de esta hormona, fue significativamente disminuida en todos los grupos experimentales, revelando que está implicado un mecanismo común provocado por los ambientes de restricción pre y postnatal. El grupo más afectado, sin lugar a duda es el RR, el cual presenta una secreción deficiente de insulina ante condiciones basales de glucosa (5.6 mM). La deficiencia de aminoácidos altera la síntesis de proteínas en el organismo ⁽⁸³⁾ lo cual, podría tener efectos negativos sobre la producción de la insulina en las crías RR, en este estudio la expresión de *Ins* no mostró cambios significativos en el grupo RR, sugiriendo que su baja secreción puede deberse a una falla en la transcripción del mensajero a proteína.

Adicionalmente, los niveles bajos de triglicéridos en CR, RC y RR indican alteraciones celulares en el metabolismo de lípidos. Se sabe que los niveles de triglicéridos generalmente se relacionan con el tipo de dieta, así mismo, niños con desnutrición por una disminución en la ingesta de proteínas presentan bajos niveles de triglicéridos ⁽⁸⁴⁾. No obstante, el mecanismo por el cual la restricción proteica severa regula los niveles de triglicéridos circulantes aún es desconocido.

En su conjunto, la restricción proteica provoca alteraciones moleculares y metabólicas vía programación en el desarrollo en P28 que pueden ser consecuencia de un mecanismo adaptativo para minimizar los cambios metabólicos a corto plazo y sobrevivir a condiciones



adversas en etapas posteriores ⁽⁸⁵⁾. Sin embargo, esta ventaja adaptativa se convierte en perjudicial para el individuo programado/descendencia cuando se encuentre posteriormente con abundancia nutricional ⁽³⁰⁾. Para poder revelar las alteraciones a las que lleva una restricción pre y postnatal temprana en la vida adulta temprana (P90), a partir del día 28 postnatal se alimentó a las crías con dieta *chow* obteniendo los siguientes resultados que se discuten a continuación.

7.2. Efecto de la restricción proteica materna en la adultez temprana, día 90 postnatal:

La expresión de *Hnf4α* en el grupo R/Rc tiende a disminuir, a algunos estudios han demostrado que la restricción proteica intrauterina moderada regula epigenéticamente la expresión de *Hnf4α* en el islote vía interacción con su promotor, y en la etapa adulta provoca un silenciamiento progresivo ⁽⁸⁶⁾, probablemente la restricción proteica severa programe a las crías por mecanismos similares. La expresión de *Hnf4α* en P90 presenta valores similares respecto de C/Cc y disminuidos en referencia a P28, *Hnf4α* está relacionado con un largo número de promotores en el hepatocito e islote pancreático ⁽⁸⁷⁾, lo que revela su importancia en la función de las células del islote además de su papel durante el desarrollo pancreático.

En los islotes la expresión de *Pdx1* en P90 tiende a disminuir, similar a P28. El papel de *Pdx1* en la vida adulta se restringe en estimular la expresión del gen de la insulina en las células β ⁽⁸⁸⁾, sin embargo, a pesar de que la expresión de *Pdx1* está disminuida, la expresión de *Ins* aumenta, indicando que hay otros genes que regulan la expresión de insulina. Es importante hacer notar que la restricción proteica severa modifica la expresión de *Pdx1* como se muestra en este trabajo no así en la restricción proteica moderada que no ejerce cambios en la expresión de *Pdx1* ⁽²⁸⁾. Otros estudios que utilizan el modelo de la ligación de la arteria útero-placentaria para producir un retraso en el crecimiento intrauterino han demostrado al igual que en nuestro trabajo disminución en la expresión de *Pdx1* señalando que la disminución es vía modificaciones de histona que deriva en silenciamiento permanente en el *locus* de este gen ⁽⁸⁹⁾. Recalcando la importancia de la



regulación epigenética para la programación que se da durante etapas tempranas del desarrollo.

La expresión de *Isl1* en P90 fue sobre expresado en el grupo CRc y tiende a aumentar en los grupos RCc y RRc. La función de *Isl1* en la etapa adulta del islote aún no ha sido establecida, sin embargo, en etapas tempranas del desarrollo participa en la regulación a genes específicos del islote como, glucagón, somatostatina, amilina e insulina^(90, 91). Por lo tanto, su expresión elevada puede afectar la función del islote en la edad adulta.

La expresión de *Rfx6* en P90 tiende a disminuir en los grupos CRc y RRc, además, los patrones de expresión cambian de P28 a P90. La poca información sobre la función de este gen en el islote hace difícil su entendimiento, pero es claro que la restricción proteica pre y postnatal afectan su expresión.

La expresión de *Ins* se incrementó significativamente en el grupo RCc y tiende a aumentar en CRc y RRc, contrastando con bajos niveles de insulina en suero, esto puede relacionarse con una alteración en el aclaramiento de la insulina por el hígado como se ha reportado en el modelo de restricción proteica moderada seguido de una administración de dieta alta en grasas⁽⁹²⁾ o por la limitada disposición de aminoácidos de la dieta restringida en proteínas. No obstante, los mecanismos que regulan su secreción son complejos, involucrando factores de transcripción⁽⁶⁵⁾, la función mitocondrial⁽⁹³⁾ y del retículo endoplásmico⁽⁹⁴⁾, así como ARNs no codificantes, que son susceptibles a ser modificados por una mala nutrición en etapas tempranas del desarrollo^(95, 96).

En el análisis bioquímico los grupos CRc, RCc y RRc exhibieron altas concentraciones de colesterol en suero. La elevada concentración de colesterol circulante en el modelo de restricción proteica moderada se ha asociado a una falla en la síntesis de ácidos biliares a partir de colesterol por el hígado⁽⁹⁷⁾, fenómeno que podría estar pasando en estas crías.

En el grupo RRc, la disminución en el índice HOMA-IR refleja mayor sensibilidad a la insulina en estas crías. Sin embargo, las crías RRc en la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal tienden a aumentar el área bajo la curva (ABC), indicando intolerancia a la glucosa. Las bajas concentraciones de insulina en ayuno (tabla 9) sugieren que la insulina



aumenta su concentración lentamente ante el reto de glucosa en la prueba de tolerancia a la glucosa, manteniendo las concentraciones de glucosa altas por más tiempo, aunque a las 2 horas llegue a concentraciones normales, estas condiciones se han relacionado a un bajo peso al nacimiento^(16, 22). La administración de una dieta baja en proteínas al 6% por un período mayor como es en el grupo RRc da como resultado un peso bajo al nacimiento que no se recupera aún en la vida adulta.

Por otro lado, las crías RCc tienden a disminuir el área bajo la curva en la prueba de tolerancia a la glucosa reflejando una mejor capacidad de síntesis de insulina estimulada por glucosa. La respuesta del grupo RCc puede explicarse por el efecto *catch up* o recuperación del crecimiento, posterior a la normalización de la dieta al momento del nacimiento. Las crías del grupo RCc aceleran su metabolismo provocando desgaste del páncreas y de otros órganos que conduce rápidamente al desarrollo de un fenotipo diabético⁽⁹⁸⁾. También, es importante hacer notar que la restricción durante la lactancia es suficiente para afectar a las crías en su programación, de tal manera que en P90 la sensibilidad a la insulina aumenta en los grupos C Rc y R Rc. Se sabe que la resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa son parámetros dependientes del sexo y la edad^(86, 93, 99), por tanto, sería conveniente evaluar periodos posteriores a P90 para ver cambios contundentes en el metabolismo de la descendencia que produce la dieta con restricción proteica severa.

Es de notar que si bien existen cambios transitorios, también existen cambios que se mantienen de P28 a P90 y que probablemente conlleven a alteraciones en las funciones del páncreas en etapas posteriores, como se ha reportado en estudios con una restricción proteica moderada donde se presenta intolerancia a la glucosa posterior a los 6 meses en ratas⁽¹⁰⁶⁾. Es evidente que las variaciones en la expresión y las características bioquímicas del modelo dependen en gran medida del grado de restricción proteica y del periodo crítico del desarrollo en el cual se dio la intervención, la influencia que estos cambios tengan en etapas posteriores aún no es conocida, probablemente el estudio de otros genes recientemente descritos y los aún desconocidos que estén involucrados en la función del páncreas endocrino puedan ayudar a explicar las alteraciones funcionales en el islote en P28 y en la tolerancia a la glucosa en P90.



8. CONCLUSIONES

La restricción proteica severa administrada durante periodos críticos del desarrollo como gestación y lactancia alteran la expresión de genes involucrados en el desarrollo y función del páncreas como *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6* e *Ins* al término del desarrollo funcional del páncreas endócrino (P28) y en la edad adulta (P90), a pesar de que en este último periodo las crías estuvieron alimentadas 62 días con dieta normal de laboratorio, dieta *chow*.

La expresión génica en P28 es diferente de la expresión en P21, publicada anteriormente. Del mismo modo, la expresión cambia de P28 a P90, indicando una expresión diferencial tiempo dependiente.

Los parámetros bioquímicos, hormonales en la etapa postnatal temprana (P28) y en la edad adulta temprana (P90) revelan alteraciones en la homeostasis de la glucosa como alteraciones en la secreción de insulina es estimulada por glucosa, mayor sensibilidad a la insulina e indicios de intolerancia a la glucosa a pesar de que en algunos grupos las crías recobraron su peso y talla.

En conjunto, la expresión génica alterada en el islote de genes como, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6* e *Ins* y los parámetros bioquímicos y hormonales, sugieren un descontrol metabólico que podría conducir al desarrollo de un fenotipo diabético en etapas posteriores.



9. PERSPECTIVAS

A partir de los estudios y discusión presentados en esta Tesis de Maestría, las perspectivas del trabajo se orientan en cuatro direcciones.

En un primer plano estarían los trabajos destinados a evaluar la función del islote, como flujo de colesterol, a acumulación de triglicéridos. También, sería interesante realizar un estudio de los efectos de la dieta en otros órganos, como el hígado, tejido adiposo que podrían relacionarse con los efectos observados en este estudio. Otro punto que sería interesante completar sería el estudio de la secreción de insulina in vitro en la edad adulta.

En un segundo lugar, se encontrarían los estudios relativos a la regulación epigenética que es un factor muy aceptado para los efectos de la programación, por lo que estudiar los marcadores epigenéticos que ocurren en estas crías sería de gran relevancia para entender los mecanismos moleculares que llevan a la susceptibilidad de enfermedades, así como la evaluación de otros factores de transcripción involucrados en la función del islote.

En tercer plano, un trabajo muy interesante evaluar la función mitocondrial, haciendo estudios sobre biogénesis mitocondrial, contenido de ATP y ROS, así como de enzimas clave del metabolismo de carbohidratos y lípidos.

Finalmente, la comparación de diferentes tipos de malnutrición materna como baja en proteínas, restricción hiper o hipocalóricas, exceso de carbohidratos, o bien, la combinación de estas durante el desarrollo ayudará a esclarecer sus efectos a largo plazo, al igual que sus implicaciones en la susceptibilidad a enfermedades crónicas degenerativas como la diabetes tipo 2.



10. APÉNDICE A. SOLUCIÓN DE HANKS

Esta solución se utilizó en el aislamiento de islotes pancreáticos y en la prueba de secreción de insulina estimulada por glucosa, la solución fue ajustada a pH 7.4 y complementada según los requerimientos descritos en la técnica.

Tabla 13. Preparación de la solución de Hanks en 100 mL.

	Concentración	Hanks stock	15.6 mM de Glucosa	40 mM de KCl
NaCl	132 mM ^a	0.776 g	0.776 g	0.776 g (90 mM)
KCl	5 mM ^b	0.04 g	0.04 g	0.04 g (40 mM)
CaCl ₂	12.8 mM	0.014 g	0.014 g	0.014 g
MgSO ₄	1 mM	0.123 g	0.123 g	0.123 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.5 mM	0.01 g	0.01 g	0.01 g
Na ₂ HPO ₄	0.5 mM	0.007 g	0.007 g	0.007 g
KH ₂ PO ₄	0.5 mM	0.006 g	0.006 g	0.006 g
Glucosa	5.6 mM ^b	0.1 g	0.28 g (15.6 mM)	0.1 g
NaHCO ₃	4 mM	0.35 g	0.35 g	0.35 g
BSA	0.1 %	0.1 g	0.1 g	0.1 g

^a indica que esta sal solo se ajustó para mantener la osmolaridad, ^b indica que se modifica según la solución.



11. REFERENCIAS

1. **Holemans, K, Aerts, L and Van Assche, F A.** *Lifetime consequences of abdominal fetal pancreatic development.* 2003, *J Physiol*, 547: 11-20.
2. **Randhawa, R S.** *The insulin-like growth factor system and fetal growth restriction.* 2008, *Pediatr Endocrinol Rev*, 6: 235-240.
3. **Roseboom, T J, et al.** *Perceived health of adults after prenatal exposure to the Dutch famine.* 2003, *Pediatr Perinat Epidemiol*, 17(4): 391-397.
4. **Vuguin, P M.** *Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease.* 2007, *Hormone Research*, 68(3): 113-123.
5. **Langley-Evans, S C and McMullen, S.** *Developmental origins of adult disease.* 2010, *Med Princ Pract*, 19: 87-98.
6. **Anway, M D, et al.** *Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility.* 2005, *Science*, 308: 1466-1469.
7. **Hales, C N and Barker, D J** *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis.* 1992, *Diabetologia*, 35: 595-601.
8. **Breant, B, Gesina, E and Blondeau, B.** *Nutrition, glucocorticoids and pancreas development.* 2006, *Horm Res*, 65(Suppl 3): 98-104.
9. **Remacle, C, et al.** *Intrauterine programming of the endocrine pancreas.* 2007, *Diabetes Obes Metab*, 9(Suppl 2): 196-209.
10. **Garofano, A, Czernichow, P and Breant, B.** *In utero undernutrition impairs rat beta cell development.* 1997, *Diabetologia*, 40: 1231-1234.
11. **Snoeck, A, et al.** *Effect of low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas.* 1990, *Biol Neonate*, 57: 109-118.
12. **Simmons, R A, et al.** *Intrauterine growth retardation: fetal glucose transport is diminished in lung but spared in brain.* 1992, *Pediatric Research*, 31(1): 390-394.
13. **Van Assche, F A, Holemans, K and Aerts, L.** *Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy.* 2001, *Br Med Bull*, 60: 173-182.



14. **Drake, A J and Walker, B R.** *The intergenerational effect of fetal programming: non genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk.* 2004, *J Endocrinol*, Vol. 180(1): 1-16.
15. **Zambrano, E.** *The transgenerational mechanism in developmental programming of metabolic diseases.* 2009, *Rev Invest Clin*, 61: 41-52.
16. **Ravelli, A C, et al.** *Obesity at the age of 50 in men and women exposed to famine prenatally.* 1999, *Am J Clin Nutr*, 70(5): 811-816.
17. **Painter, R C, Roseboom, T J and Bleker, O P.** *Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview.* 2005, *Reprod Toxicol*, 20: 345-252.
18. **Heijmans, B T, et al.** *Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans.* 2008, *Proc Natl Acad Sci*, 105(44): 17046-17049.
19. **Simmons, R A.** *Developmental origins of adult metabolic disease: concepts and controversies.* 2005, *Trends in endocrinology and Metabolism*, 16(8): 390-394.
20. **Reeves, P G, Nielsen, F H and Fahey Jr, G C.** *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A.* 1993, *J Nutr*, 123: 1939-1951.
21. **Woods, L L, Ingelinger, J R and Rasch, R.** *Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats.* 2005, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289: R1131-R1136.
22. **Schwitzgebel, V W, Somm, E and Klee, P.** *Modeling intrauterine growth retardation in rodents: impact on pancreas development and glucose homeostasis.* 2009, *Mol Cell Endocrinol*, 304: 78-83
23. **Dumortier, O, et al.** *Different mechanism operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet.* 2007, *Diabetologia*, 50(2): 2495-2503.
24. **Aerts, L and Van Assche, F A.** *Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus.* 2006, *Int J Biochem Cell Biol*, 38: 894-903.
25. **Chamson-Reig, A, et al.** *Altered pancreatic morphology in the offspring of pregnant rats given reduced dietary protein is time and gender specific.* 2006, *J Endocrinol*, 191: 83-92.
26. **Delghingaro-Augusto, V, et al.** *A low protein diet clusters gene expression in rat pancreatic islets.* 2004, *J Nutr*, 134(2): 321-327.



27. **Frantz, E D, et al.** *Transgenerational endocrine pancreatic adaptation in mice from maternal protein restriction in utero.* 2011, *Mech Ageing Dev*, 132(3): 110-116.
28. **Petrik, J, et al.** *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 factors-II.* 1999, *Endocrinology*, 140: 4861-4873.
29. **Janssen, S W, et al.** *Progressive histopathological changes in pancreatic islets of Zucker Diabetic Fatty Rats.* 2001, *Exp clin Endocrinol Diabetes*, 109(5): 23-282.
30. **Gluckman, P D, et al.** *Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases.* 2009, *Nat Rev Endocrinol*, 5(7): 401-408.
31. **Dahri, S, et al.** *Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation.* 1991, *Diabetes*, 40 (Suppl 2): 115-120.
32. **Simmons, R A, Templeton, L J and Gertz, S J.** *Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat.* 2001, *Diabetes*, 50: 2279-2286.
33. **Federación Internacional de Diabetes.** *IDF Diabetes Atlas.* [En línea] 2011. <http://www.idf.org/atlasmap/atlasmap>.
34. **Organización Mundial de Salud.** *Ficha descriptiva No. 312.* [En línea] Septiembre de 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>.
35. **American Diabetes Association.** *Diagnosis and classification of diabetes Mellitus.* s.l. : Diabetes Care, 2007. S42-S47.
36. *Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad en México.* [En línea] 2010. www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/A_Morta_%202010_FINAL_Junio%202012.pdf.
37. **Triplitt, C L.** *Examining the mechanisms of glucose regulation.* 2012, *Am J Manag Care*, 18(Suppl 1): S4-S10.
38. **Holstein, A, et al.** *Substantial increase in incidence of severe hypoglycemia between 1997-2000 and 2007-2010.* 2012, *Diab Care*, 35: 972-975.
39. **Thayer, K A, et al.** *Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program Work shop review.* 2012, *Environ Healt Perspect*, 120(6): 779-789.
40. **Huang, T T and Goran, M I.** *Prevention of type 2 diabetes in young people: a theoretical perspective.* 2003, *Pediatr Diabetes*, 4: 38-56.



41. **Lithell, H O, et al.** *Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentration in men aged 50-60 years.* 1996, *BMJ*, 312: 406-410.
42. **Slack, JM W.** *Developmental biology of the pancreas.* 1995, *Development*, 121: 1569-1580.
43. **Bardeesy, N and De Pincho, R A.** *Pancreatic cancer biology and genetics.* 2002, *Nat Rev Cancer*, 2: 897-909.
44. **Kune, S.** *The molecular basis and prospect in pancreatic development.* 2005, *Dev Growth Differ*, 47: 367-374.
45. **Spagnoli, F M.** *From endoderm to pancreas: a multistep journey.* 2007, *Cell Mol Life Sci*, 64: 2378-2390.
46. **Bocian-Sbkowska, J, et al.** *Polyhormone aspect of the endocrine cells of the human fetal pancreas.* 1999, *Histochem Cell Biol*, 141: 1926-1929.
47. **Aguayo-Mazucato, C, et al.** *Restructuring of pancreas islet and insulin secretion in a postnatal critical window.* 2006, *PLoS ONE*, 1: E35-E41.
48. **Murtaugh, L C.** *Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible.* 2007, *Development*, 134: 427-438.
49. **Gilbert, S F.** *Biología del desarrollo. 7a.* Buenos Aires : Médica Panamericana, 2005. pp 239, 244-245, 544 y 547.
50. **Cano, D A, Hebrok, M and Zenker, M.** *Pancreatic development and disease.* 2007, *Gastroenterology*, 132: 745-762.
51. **Habener, J F, Kemp, D M and Thomas, M K.** *Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development.* 2005, *Endocrinology*, 146: 1025-1034.
52. **Dhawan, S, B hushan, A and G eorgia, S .** *Formation and regeneration of the endocrine pancreas.* 2007, *Curr Opin Cell Biol*, 19: 634-645.
53. **Jensen, J.** *Gen regulatory factors in pancreatic development.* 2004, *Developmental Dynamics*, 229: 176-200.
54. **Hara, A, et al.** *Rat pancreatic islet is formed by unification of multiple endocrine cell clusters.* 2007, *Dev Dyn*, 236(12): 3451-3458.
55. **Ackermann, A G and Gannon, M.** *Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion.* 2007, *J Mol Endocrinol*, 38: 193-206.



56. **Frantz, E D , Peixoto-Silva, N a nd P inheiro-Mulder, A .** *Endocrine pancreas development: effects of metabolic and intergenerational programming caused by a protein restriction in utero.* 2011, *Mech Ageing Dev*, 132(3): 110-116.
57. **Lernmark A y W enngren B I.** *Insulin and glucagon release from the isolated pancreas of foetal and newborn mice.* 1972, *J Embryol Exp Morphol*, 28: 607-614.
58. **Adam , P A , e t al.** *Human fetal insulin metabolism in early gestation responses to acute elevation of the fetal glucose concentration and placental transfer of human insulin-I.* 1969, *Diabetes*, 18(6): 409-416.
59. **Kervran, A , R andom, J an d M ailtier, J P .** *Effect of ambient temperature on pancreatic hormone secretions at birth.* 1979, *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*, 165-174.
60. **Bonner-Weir, S .** *Perspective: postnatal pancreatic beta cell growth.* 2000, *Endocrinology*, 141: 1926-1929.
61. **Lee, J C , e t al.** *Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3.* 2001, *Diabetes*, 50: 928-936.
62. **Arantes, V C , e t al.** *Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation.* 2002, *J Nutr*, 132: 3030-3035.
63. **Rodríguez-Trejo, A , e t al.** *Developmental programming of neonatal pancreatic beta-cells by a maternal low-protein diet in rats involves a switch from proliferation to differentiation.* 2012, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302: E1431-E1439.
64. **Barat-Houari, M , e t al.** *Positional candidate gene analysis of Lim domain homeobox gene (*Isl-1*) on chromosome 5q11-q13 in a French morbidity obese population suggests indication for association with type 2 diabetes.* 2002, *Diabetes*, 51: 1640-1643.
65. **Cerf, M E.** *Transcription factors regulating beta-cell function.* 2006, *Eur J Endocrinol*, 155: 671-679.
66. **Tabassum, R , e t al.** *Genetic variants of FOXA2: risk of type 2 diabetes and effect on metabolic traits in North Indians.* 2008, *J Hum Genet*, 53: 957-965.
67. **Reusens, B a nd Remacle, C .** *Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment.* 2006, *Int J Biochem Cell Biol*, 38: 913-922.
68. **Attali, M , e t al.** *Control of beta-cell differentiation by the pancreatic mesenchyme.* 2007, *Diabetes*, 56: 1248-1258.



69. **Harries, L W, et al.** *The diabetic phenotype in HNF4A mutation carriers is moderated by the expression of HNF4A isoforms from the P1 promoter during fetal development.* 2008, *Diabetes*, 57(6): 1745-1752.
70. **Smith, S B, et al.** *Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans.* 2010, *Nature*, 463: 775-780.
71. **Erdmann, S, et al.** *Tissue-specific transcription factor HNF4a inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the pancreatic INS-1 beta-cell line.* 2007, *Biol Chem*, 388(1): 91-106.
72. **Luco, R F, et al.** *A conditional model reveals that induction of hepatocyte nuclear factor-1 alpha in Hnf1alpha-null mutant beta-cell can activate silenced genes postnatally, whereas overexpression is deleterious.* 2006, *Diabetes*, 55: 2202-2211.
73. **McKinnon, C M and Docherly, K.** *Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function.* 2001, *Diabetologia*, 44: 1203-1214.
74. **Melloul, D, Tsur, A and Zangen, D.** *Pancreatic duodenal homeobox (PDX-1) in health and disease.* 2002, *J Pediatr Endocrinol Metab*, 15: 1461-1472.
75. **Attali, M, et al.** *Control of beta-cell differentiation by the pancreatic mesenchyme.* 2007, *Diabetes*, 56: 1248-1258.
76. **Ohlsson, H, Karlsson, K and Edlund, T.** *IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene.* 1993, *EMBO J*, 12: 4251-4259.
77. **Chakrabarti, S K, James, J C and Mirmira, R G.** *Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor Pdx1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding.* 2002, *J Biol Chem*, 277: 13286-13293.
78. **Babu, D A, Deering, T G and Mirmira, R G.** *A feat of metabolic proportions: Pdx1 orchestrates islet development and function in the maintenance of glucose homeostasis.* 2007, *Mol Genet Metab*, 92(1-2): 43-55.
79. **Pearl, E J, Jaarikji, Z and Horb, M E.** *Functional analysis of RFX6 and mutant variants associated with neonatal diabetes.* 2011, *Dev Biol*, 351(1): 135-145.
80. **Taleb, N and Polychronakos, C.** *RFX6 is needed for the development and maintenance of the beta-cell phenotype.* 2011, *Islets*, 3(5): 291-293.
81. **Bruce, K D and Hanson, M A.** *The developmental origins mechanisms and implications of metabolic syndrome.* 2010, *J Nutr*, 140: 648-652.



82. **Muniyappa, R, et al.** *Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate use.* 2008, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294: 15-26.
83. **Mirzaei, H, Suarez, J A and Longo, V D.** *Protein and amino acid restriction, aging and disease: from yeast to humans.* 2014, *TEM*, 977.
84. **Kuwahata, M, et al.** *Dietary medium-chain triglycerides attenuate hepatic lipid deposition in growing rats with protein malnutrition.* 2011, *J Nutr Sci Vitaminol*, 57 (2): 138-143.
85. **Hoet, J J, Ozanne, S and Reusens, B.** *Influences of pre- and postnatal nutritional exposures on vascular/endocrine systems in animals.* 2000, *Environ Health Perspect*, 108(Suppl 3): 563-568.
86. **Sandovici, I, et al.** *Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets.* 2011, *Proc Natl Acad Sci*, 108(13): 5449-5454.
87. **Odom, D T, et al.** *Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors.* 2004, *Science*, 303 (5662): 1378-1381.
88. **Holland, A M, et al.** *Conditional expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor Pdx1 in maintenance and regeneration of beta-cell in the adult pancreas.* 2005, *Diabetes*, 54: 2586-2595.
89. **Park, J H, Stoffers, D A, Nicholis, R D, Simmons, R A.** *Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1.* 2008, *The Journal of Clinical Investigation*, 118 (6): 2316-2324.
90. **Guo, T, et al.** *ISL1 promotes pancreatic islets cell proliferation.* 2011, *PLoS One*, 6(8): e22387.
91. **Du, A, et al.** *Islet-1 is required for the maturation, proliferation and survival of the endocrine pancreas.* 2009, *Diabetes*, 50(2): 2059-2069.
92. **Valera-Mora, M E, et al.** *Insulin clearance in obesity.* 2003, *J Am Coll Nutr*, 22(6): 487-493.
93. **Theys, N, et al.** *Maternal low-protein diets alters pancreatic islets mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat.* 2009, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(5): R1516-R1525.



94. **Back, S H and Kaufman, R J.** *Endoplasmic Reticulum Stress and Type 2 Diabetes.* 2012, *Annu Rev Biochem*, 81: 767-793.
95. **Ouaamari, A, et al.** *miR-375 targets 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells.* 2008, *Diabetes*, 57: 2708-2717.
96. **Guay, C, et al.** *Emerging roles of non-coding RNAs in pancreatic beta-cell function and dysfunction.* 2012, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 14(Suppl 3): 12-21.
97. **Sohi, G, et al.** *Maternal protein restriction elevates cholesterol in adult rat offspring due to repressive changes in histone modifications at the cholesterol 7 α -hydroxylase promoter.* 2011, *Mol endocrinol*, 25(5): 785-798.
98. **Ozanne, S E and Hales, C N.** *Poor fetal growth followed by rapid postnatal catch-up growth leads to premature death.* 2005, *Mech Ageing Dev*, 126(8): 852-854..
99. **Zambrano, E, et al.** *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.* 2006, *J Physiol*, 571(Pt 1): 221-230.