

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

Expresión de los receptores de serotonina (5-HT_{1A}), grelina (GHSR-1a) y neuropéptido Y (Y1) en un modelo de diabetes mellitus tipo 2 generado por bajo peso al nacimiento y dieta hiperlipídica.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

BIOL. EXP. ERIKA CECILIA GARCÍA DÍAZ

Co-Directora:
Co-Directora:
Asesor:

Dra. María del Socorro I. Retana Márquez
Dra. Leticia Manuel Apolinar
Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Diciembre, 2010

COMITÉ TUTORAL

Co-Directora: Dra. María del Socorro Imelda Retana Márquez

Profesor titular C

Laboratorio de Neuropsicoendocrinología

Dpto. Biología de la Reproducción. D.C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Co-Directora: Dra. Leticia Manuel Apolinar

Investigador Asociado B

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas

Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro social (CMN SXXI-IMSS).

Asesor: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor titular C

Laboratorio de Farmacología

Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

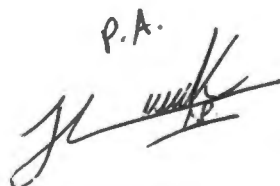
El programa de la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I: 309-1) pertenece al Padrón de Posgrado de Excelencia del CONACYT PIFOP-CONACYT-SEP y cuenta con apoyo del mismo consejo a través del convenio 309-0, con la clave C/PFPN-2002-35-32.

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas del Hospital de Especialidades del CMN SXXI-IMMS en colaboración con el Laboratorio Neuropsicoendocrinología del Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. María del Socorro I. Retana Márquez y la Dra. Leticia Manuel Apolinar. El trabajo de investigación fue apoyado por el FIS en el proyecto 2007-785-033. La alumna Erika Cecilia García Díaz recibió apoyo de CONACYT, número de registro 212815 y de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, matrícula No. 99093780.

Los miembros del Jurado de examen designados por el Posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes aprobaron la tesis “**Expresión de los receptores de serotonina (5-HT_{1A}), grelina (GHSR-1a) y neuropéptido Y (Y1) en un modelo de diabetes mellitus tipo 2 generado por bajo peso al nacimiento y dieta hiperlipídica**” realizada por la alumna **Erika Cecilia García Díaz** y se realizó la disertación pública el día 9 de Diciembre de 2010 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

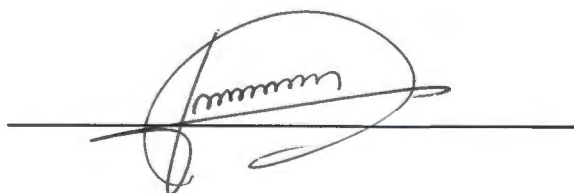
PRESIDENTE

Dr. Rubén Román Ramos
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

P.A.


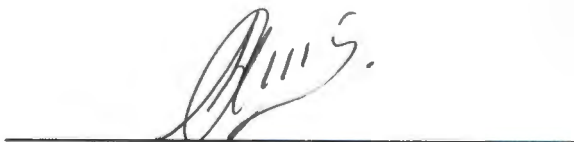
SECRETARIA

Dra. Margarita Díaz Flores
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades CMN SXXI IMSS



VOCAL

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



VOCAL

Dra. Rebeca García Macedo
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades CMN SXXI IMSS



A LA MEMORIA DE MI MADRE:



MARGARITA DÍAZ MARTÍNEZ

Extraordinario ejemplo de vida

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis hermanas y sobrinos, por su amor incondicional que me ha permitido ser quien soy y llegar a donde he llegado.

Gracias a la Dra. Socorro Retana, mi gran maestra y ejemplo a seguir. Admiro su gran dedicación y pasión por lo que hace, así como su extraordinaria capacidad de hacer lo imposible posible.

Gracias a la Dra. Leticia Manuel, por creer en mí y permitirme formar parte de su equipo de investigación.

Gracias al Dr. Francisco Alarcón, por sus conocimientos, su disponibilidad y su paciencia.

Gracias al Dr. Manuel Castillo Rivera, al Dr. Fulgencio Espejel Carrasco, al Dr. Héctor Escalona Buendía y al Físico Hugo Tudón, por enseñarme y facilitarme herramientas imprescindibles para la realización de este proyecto.

Gracias a mis compañeros de maestría Adriana, Berna, Juanita, Josué, Javier e Isaac, por dejarme compartir esta parte de mi vida con todos ustedes. Gracias por las extraordinarias experiencias que me han regalado, por su grandiosa amistad y cariño, y por su paciencia y apoyo en los momentos difíciles.

Gracias a Ingrid y Yolanda, por su apoyo y compañía en todo este camino, tienen un lugar muy especial en mi corazón, nunca olvidaré todo lo que han hecho por mí.

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i	Calcio citosólico
5-HT	Serotonina, 5-hidroxitriptamina
5-HT_{1A}	Receptores de serotonina 1A, 1B, 2C
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindol acético
AC	Adenilato ciclasa
AGL	Ácidos grasos libres
AgRP	Proteína relacionada con Agouti
AKT/PKB	Proteína cinasa B (mejor conocida como AKT)
ANOVA	Análisis de varianza
Apo AIV	Apolipoproteína AIV
ARC	Núcleo arcuato
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BPN	Bajo peso al nacimiento y grupo con bajo peso al nacimiento
BPN+HL	Grupo con bajo peso al nacimiento alimentado con dieta hiperlipídica
C	Grupo control
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CART	Transcrito regulado por anfetamina y cocaína
CCK	Colecistocinina
cDNA	DNA complementario
CMN SXXI-IMSS	Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro social
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
D.E.	Desviación estándar
DEPC	Dietilpirocarbonato
DM	Diabetes mellitus
DMH	Núcleo hipotalámico dorsomedial
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
GHSR-1a	Receptor secretagogo de la hormona del crecimiento 1a
HCl	Ácido clorhídrico
HClO₄	Ácido perclórico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HL	Hiperlipídica
HOMA	Modelo de evaluación de la homeostasis
HOMA-IR	Evaluación de sensibilidad a la insulina utilizando el HOMA
HPLC-EC	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico
ICV	Intracerebroventricular
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1

IMC	Índice de masa corporal
IRS	Sustrato del receptor de insulina
Kcal	Kilocalorías
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LHA	Área hipotalámica lateral
LSH	Lipasa sensible a hormonas
MC4R	Receptor 4 de melanocortina
MgCl₂	Cloruro de magnesio
α-MSH	Hormona estimuladora de melanocitos α
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Nicotinamida adenina nucleótido
NaOH	Hidróxido de sodio
NPY	Neuropéptido Y
NTS	Núcleo del tracto solitario
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Pares de bases
PDE3	Fosfodiesterasa 3
PGC-1α	Coactivador 1 alfa del receptor gama activado por proliferadores peroxisomales
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC “novel”	Proteína cinasa C-0
PLC	Fosfolipasa C
POMC	Proopiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular
PYY	Péptido YY
R	Grupo con restricción del alimento
RCIU	Retardo en el crecimiento intrauterino
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa reversa
SNC	Sistema nervioso central
SR-B1	Receptor scavenger clase B tipo 1
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tris-Borato-EDTA
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
VMH	Núcleo ventromedial
Y1, Y2, Y4, Y5, Y6	Receptores de NPY

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
1.1 DM tipo 2.....	1
1.1.1 Patogénesis	2
1.1.2 Epidemiología.....	2
1.1.3 Factores de riesgo	3
1.2 Bajo peso al nacimiento y recuperación del crecimiento o “catch-up growth” asociados a diabetes mellitus tipo 2.....	4
1.3 Programación del desarrollo	7
1.4 Modelos animales de diabetes asociados a bajo peso al nacimiento o retardo en el crecimiento uterino	8
1.5 Áreas hipotalámicas involucradas en la regulación del balance energético. Control neuroendocrino de la alimentación.	9
1.6 La grelina en el control de la conducta alimenticia	12
1.6.1 Acción de la grelina mediada por el receptor GHSR-1a	13
1.7 El NPY en la regulación del apetito	13
1.8 El papel de la leptina en el balance energético	14
1.9 Inactivación de la grelina por acción de la leptina en neuronas que sintetizan NPY	15
1.10 Vía serotoninérgica en la regulación de la alimentación	16
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo general.....	21
4.2 Objetivos particulares	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
5.1 Animales de experimentación.....	22
5.2 Aspectos éticos	22
5.3 Tipo de alimentación	23
5.4 Inducción de desnutrición materna	24
5.5 Manejo de las crías al nacimiento.....	25
5.6 Prueba de tolerancia a la glucosa y determinación de parámetros bioquímicos.....	26

5.7	Obtención de plasma y tejidos de los grupos de trabajo.....	26
5.8	Detección de insulina y grelina en plasma.....	27
5.9	Prueba de resistencia a la insulina a través del Homeostasis Model Assessment (HOMA)	27
5.10	Cuantificación de 5-HT en hipotálamo.....	27
5.11	Expresión del mRNA de los receptores 5-HT _{1A} , GHSR-1a y Y1 en hipotálamo	28
5.12	Aislamiento del RNA total de hipotálamo.....	29
5.13	Condiciones para realizar la RT-PCR.....	30
5.14	Análisis estadístico	32
6.	RESULTADOS.....	33
6.1	Peso corporal de las madres durante la gestación.....	33
6.2	Seguimiento del peso corporal desde el nacimiento hasta las 28 semanas de edad .	34
6.3	Ingesta de dieta hiperlipídica después de bajo peso al nacimiento.....	35
6.4	Cambios metabólicos de animales con BPN alimentados con HL	37
6.5	Concentración de glucosa plasmática.....	37
6.6	Niveles de insulina en plasma y evaluación de resistencia a la insulina	39
6.7	Concentración de grelina plasmática y expresión de los receptores GHSR-1a y Y1 en hipotálamo de ratas con BPN y dieta HL.....	41
6.8	Concentración de 5-HT y expresión del mRNA del receptor 5-HT _{1A} en hipotálamo de ratas con BPN y dieta HL	42
7.	DISCUSIÓN.....	44
8.	CONCLUSIONES.....	58
9.	REFERENCIAS	59
10.	ANEXOS	77
10.1	Principio del método enzimático colorimétrico para la cuantificación de colesterol en plasma.	77
10.2	Principio del método enzimático colorimétrico para la cuantificación de triglicéridos en plasma.....	77
10.3	Detección de insulina y grelina en plasma por el método de ELISA	78
10.3.1	Cuantificación de insulina en plasma	79
10.3.2	Cuantificación de grelina en plasma.....	80
10.4	Cuantificación de 5-HT en hipotálamo.....	81

10.5	Cuantificación de proteínas por el método del BCA	82
10.6	Cuantificación del RNA total	83
10.7	Determinación de la integridad del RNA total	83
10.8	Expresión del mRNA de los receptores 5-HT _{1A} , GHSR-1a y Y1	84

RESUMEN

Estudios en humanos y animales sugieren que, en algunos casos, la diabetes en la edad adulta puede programarse durante el desarrollo prenatal. Se ha demostrado que la interacción entre el ambiente prenatal y posnatal aumenta la susceptibilidad a desarrollar obesidad inducida por la dieta, desencadenando finalmente diabetes mellitus (DM) tipo 2. Una causa es el bajo peso al nacimiento (BPN), siendo uno de los principales factores que interviene en algunos problemas de salud a largo plazo y puede predisponer al organismo a desarrollar obesidad asociada a resistencia a la insulina y promover el desarrollo de DM tipo 2.

En este contexto surge la pregunta: ¿De qué manera influyen la desnutrición prenatal y una dieta hiperlipídica en las alteraciones que ocurren a nivel del sistema nervioso central que producen cambios metabólicos asociados al desarrollo de DM tipo 2? Para intentar responder esta pregunta, este estudio fue diseñado para determinar los niveles de expresión del mRNA de algunos de los receptores que regulan la ingesta de alimento, serotonina (5-HT_{1A}), grelina (GHSR-1a) y neuropéptido Y (Y1), en el hipotálamo de crías nacidas de madres con restricción calórica. Asimismo examinamos si una dieta hiperlipídica después del destete puede alterar la expresión de los transcritos de estos genes como parte de la programación uterina que lleve al desarrollo de la DM tipo 2. Veinte hembras preñadas, con 12 días de gestación, se dividieron en dos grupos: el grupo control (C) se alimentó *ad libitum* y al grupo con restricción de alimento (R) se le redujo la cantidad de alimento al 50%, comparado con el grupo C. Las crías fueron amamantadas por sus madres hasta los 21 días de edad posnatal. Después del destete, las crías del grupo C se alimentaron con dieta control y las crías del grupo R se alimentaron con una dieta hiperlipídica (60% lípidos, 20% carbohidratos, 20% proteínas). Para el estudio en cuestión se utilizaron de 6 a 10 machos para los grupos C y BPN para las edades de 2, 12 y 28 semanas. La evolución del peso corporal y la ingesta de alimento se registraron durante este periodo. Se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa y se midieron los niveles de insulina y grelina en plasma por ELISA, y 5-HT en hipotálamo por HPLC-EC. En el tejido hipotalámico se analizó la

expresión de genes por RT-PCR. Las crías del grupo BPN alimentadas con dieta hiperlipídica mostraron recuperación en el crecimiento a partir de las 2 semanas e hiperfagia a partir de las 4 semanas de edad en relación con el grupo C ($p<0.05$). A las 12 semanas de edad, ambos grupos respondieron de manera normal a una carga de glucosa oral, pero a las 28 semanas de edad, el grupo BPN mostró concentraciones basales de 250 mg/dL, así como intolerancia a la glucosa, comparado con el grupo C. No se encontraron modificaciones significativas en las concentraciones de insulina, grelina y 5-HT en ambos grupos. Los mRNA de los tres receptores evaluados aumentaron su expresión en el hipotálamo a las 2 semanas en el grupo BPN y disminuyeron a las edades de 12 y 28 semanas. Asimismo, la expresión de los receptores GHSR-1a y 5-HT_{1A} disminuyó a las 28 semanas de edad.

Los resultados sugieren que los cambios adaptativos durante el desarrollo prenatal, en respuesta a la manipulación de la dieta materna, seguido de un ambiente nutricional hiperlipídico después del destete, pueden tener consecuencias a largo plazo sobre la regulación de la ingesta de alimento a nivel del sistema nervioso central, alterando el metabolismo y llevando al desarrollo de obesidad y DM tipo 2.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La diabetes mellitus (DM) es un desorden endocrino caracterizado por la disminución en la sensibilidad de los tejidos periféricos a la acción de la insulina y/o defectos en la secreción de la misma, lo que trae como consecuencia trastornos en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, provocando finalmente la alteración directa o indirecta de los diversos aparatos o sistemas del organismo (ADA, 2004). La DM se clasifica en cuatro tipos principales: 1) La DM tipo 1 se caracteriza por la deficiencia absoluta de insulina debido a una alteración autoinmune y destrucción de las células β pancreáticas; 2) La DM tipo 2 es causada por una combinación de resistencia al efecto de la insulina, con una inadecuada respuesta compensadora; 3) La diabetes gestacional se caracteriza por hiperglucemia, que aparece en el curso del embarazo. Hay mayor riesgo en el embarazo y parto y puede desencadenar diabetes clínica; 4) Otros tipos específicos de diabetes, incluyen pacientes con defectos genéticos en la función de las células β pancreáticas; otros con defectos genéticos de la acción de la insulina; otros con patologías pancreáticas o endocrinopatías. También algunos fármacos o tóxicos pueden producir diabetes secundaria; agentes infecciosos y por último, algunas otras enfermedades como los Síndromes de Down, Klinefelter o Turner. En estos casos se habla de diabetes secundaria, mientras los tipo 1 y 2 son primarios. Del total de las personas con DM, el 90-95% presentan DM tipo 2 (FMD, 2010).

1.1 DM tipo 2

La DM tipo 2 es causada por la combinación de resistencia a la acción de la insulina y una inadecuada secreción de ésta como respuesta compensatoria a la resistencia a la insulina. Es un grupo heterogéneo de pacientes, la mayoría obesos y/o con distribución de grasa predominantemente abdominal, con fuerte predisposición genética no bien definida (multigénica). La presencia de la obesidad incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, las cuales ocupan las principales causas de muerte, siendo la DM tipo 2 y la hipertensión las principales consecuencias de la obesidad (Taubes, 1998).

1.1.1 Patogénesis

La DM tipo 2 se caracteriza por la aparición de resistencia a la insulina. La secreción deficiente de la insulina y los defectos en la acción de la insulina frecuentemente coexisten en el mismo paciente (ADA, 2008). La resistencia a la insulina se define como un defecto en la transducción de la señal de esta hormona en diferentes tejidos diana; esta resistencia implica una menor capacidad de la hormona para ejercer sus efectos en los tejidos periféricos, tales como músculo, hígado y tejido adiposo. Esto provoca que en las células β pancreáticas aumente la secreción de insulina, lo que causa hiperinsulinemia. Finalmente, las células β pancreáticas disminuyen su capacidad para mantener un nivel elevado de síntesis y secreción de insulina apareciendo la hiperglucemia postprandial, alteraciones de la tolerancia a la glucosa en ayuno y desarrollo de DM tipo 2. La hiperglucemia crónica por sí misma reduce la sensibilidad y la secreción de la insulina a través de mecanismos aún no bien conocidos, pero parte de ellos involucran a las células β pancreáticas con cambios quizá en la expresión de genes que codifican proteínas clave en la secreción de insulina (Polonsky *et al.*, 1988; DeFronzo *et al.*, 1992; Kahn *et al.*, 1993; DeFronzo, 2004).

Por otra parte, en los pacientes obesos la producción de ácidos grasos libres (AGL) aumenta; esto ocasiona que disminuya la utilización de glucosa como fuente primaria de energía, disminuyendo su captación periférica, lo que condiciona la aparición de resistencia a la insulina e hiperinsulinismo secundario. Así, la obesidad está asociada con la generación de la resistencia a la insulina, llegando a producir DM tipo 2 (Reaven, 1988; Kahn *et al.*, 2006).

1.1.2 Epidemiología

La DM tipo 2 se considera actualmente como uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. La prevalencia en el año 2000 se estimó en 2.8% y para el 2030 será del 4.4%. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que el número de personas con DM tipo 2 se incrementará de 171 millones que había en el año 2000 a 366 millones en el 2030 (Wild *et al.*, 2004), habiendo actualmente más de 246 millones de personas con DM tipo 2 en todo el mundo (FMD, 2010). La prevalencia de la DM en la población

mexicana es de 10.7% en personas entre los 20 y 69 años, fluctuando entre 6.5 y 10 millones y se calcula que al menos 2 millones de personas no han sido diagnosticadas. Para 2005 se calculó una incidencia de 400 mil nuevos casos por año (FMD, 2010).

1.1.3 Factores de riesgo

Los factores genéticos son importantes en el desarrollo de la resistencia a la insulina, ya que son similares entre familiares y dentro de grupos étnicos (Kahn *et al.*, 1993; Vaag *et al.*, 1995; Polonsky *et al.*, 1998; Mancillas *et al.*, 2002). Asimismo, se presentan factores adquiridos o ambientales, como es el consumo de dietas hipercalóricas y poca actividad física (Heemskert *et al.*, 1995). Por lo tanto, variaciones en el estilo de vida, como disminución en la actividad física y aumento en la ingesta de alimento, están asociadas con cambios en la sensibilidad a la insulina, siendo la obesidad el factor de riesgo más crítico en enfermedades metabólicas (Oken y Gillman, 2003).

De esta forma, el incremento en la incidencia de la DM tipo 2 se ha visto asociado en gran medida a la presencia de obesidad. La OMS define a la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo que puede ser perjudicial para la salud, su medición es a través del cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC), siendo mayor o igual a 30 (Seidell, 1999; Konturek *et al.*, 2005). En México la prevalencia de la obesidad en la población adulta, en la cifra obtenida a través de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2006), fue de 30%, siendo mayor en mujeres (34.5%) que en hombres (24.2%); el problema se incrementa si se agrega el sobrepeso, siendo el 70% de la población afectada (SSA, 2007). Por lo tanto, es de interés en este trabajo conocer las condiciones y factores en el ambiente fetal y neonatal que pueden predisponer a enfermedades en la vida adulta, como es el desarrollar obesidad hasta DM tipo 2 (Oken y Gillman, 2003).

1.2 Bajo peso al nacimiento y recuperación del crecimiento o “catch-up growth” asociados a diabetes mellitus tipo 2

La nutrición materna es uno de los principales determinantes del peso al nacer y del retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU, peso al nacer para la edad gestacional <2.5 kg en neonatos a término) (Kramer, 1987; González-Cossío *et al.*, 1997). El crecimiento y desarrollo fetal e infantil constituyen los periodos de mayor plasticidad celular (diferenciación y maduración) en tejidos y órganos (Ozanne *et al.*, 2004), que son determinados por la exposición a factores ambientales, función útero-placentaria (Godfrey, 2002), vulnerabilidad genética y ambiente intrauterino y posnatal en el que se desenvuelve el individuo (Charmandari *et al.*, 2005). Cuando las circunstancias son óptimas, ninguno de estos factores es limitante en el crecimiento y desarrollo fetal.

Una de las hipótesis para explicar este fenómeno es la del “fenotipo ahorrador”, propuesta por Barker, fundamental para la perspectiva de curso de vida (Hales y Barker, 1992) (Figura 1). Este concepto se refiere a los mecanismos de adaptación que realizan los sujetos durante la vida intrauterina en un periodo crítico del desarrollo en que, para mantener la sobrevivencia frente a condiciones nutricionales adversas, disminuye la sensibilidad a la insulina, lo cual condiciona a individuos con RCIU o bajo peso al nacimiento (BPN) a presentar en la vida adulta DM tipo 2, dislipidemias e hipertensión, entre otras patologías (Jaquet *et al.*, 2002) (Figura 2).

El mecanismo biológico de esta asociación se basa en que la desnutrición uterina ocasiona deficiencia en la producción de células β pancreáticas, debido a la reducción en la concentración del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) en respuesta a la hipoglucemia fetal. Una vez fuera del ambiente materno, si las condiciones cambian y existe una sobreoferta alimentaria, los portadores de este fenotipo ahorrador, independientemente de la causa que determinó el retraso del crecimiento fetal, estarían en riesgo de desarrollar DM tipo 2 (Soto y Mericq, 2005).

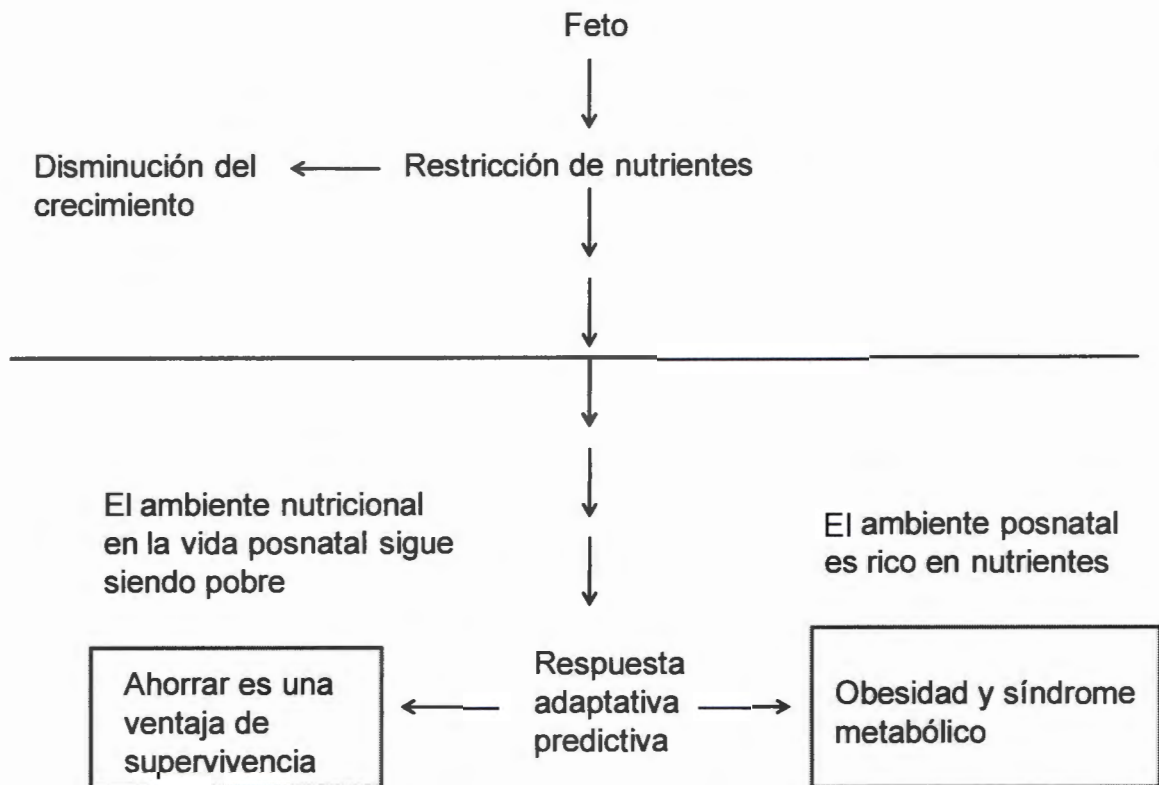


Figura 1. Hipótesis del fenotipo ahorrador. La exposición del organismo en desarrollo a un nivel bajo de nutrición promueve el ahorro metabólico con el fin de garantizar su supervivencia. En un entorno posnatal en el que los nutrientes son escasos, este ahorro metabólico continúa siendo un rasgo de supervivencia, pero si los nutrientes están presentes en exceso, el estado ahorrador promoverá la obesidad y el síndrome metabólico.



Figura 2. Mecanismos de adaptación fetal a la desnutrición intrauterina. El feto puede programar su metabolismo de tal forma que le confiera ventajas de supervivencia, condición que mantiene en la vida posnatal.

El vínculo entre el BPN y el subsecuente desarrollo de intolerancia a la glucosa ha sido relacionado en diversas poblaciones. Estudios epidemiológicos han encontrado una asociación entre el BPN y el incremento en el riesgo de desarrollar intolerancia a la glucosa y DM tipo 2 en la vida adulta (Godfrey y Barker, 2001). Algunos estudios epidemiológicos retrospectivos originales fueron realizados en sujetos en la sexta década de vida y demostraron que las personas que presentaron BPN tienen mayor predisposición a desarrollar hipertensión arterial (Barker *et al.*, 1989; Barker *et al.*, 1990), DM tipo 2 (Hales *et al.*, 1991), dislipidemia y obesidad (Barker *et al.*, 1993).

Una de las variables biológicas que más impacto tiene en el BPN es la capacidad de recuperación, dependiendo de la magnitud de la recuperación del crecimiento o "catch-up growth". En 1963, Tanner planteó una teoría para explicar la recuperación del crecimiento: sugirió que el organismo desarrolla una "representación" del crecimiento en el sistema

nervioso central (SNC) y es capaz de detectar las diferencias entre el crecimiento corporal programado y el alcanzado, desencadenándose los mecanismos para la recuperación del crecimiento (Wi y Boersma, 2002).

1.3 Programación del desarrollo

Durante el desarrollo en los mamíferos se requiere establecer un grado de autonomía durante la vida fetal para conseguir independizarse y sobrevivir después del nacimiento. Sin embargo, pasa a través de periodos críticos durante los cuales puede ser influenciado por aspectos del ambiente intrauterino dependiendo, entre otros factores, de la nutrición y del metabolismo materno. Por lo tanto, el desarrollo de mecanismos homeostáticos es necesario para garantizar su existencia (Hoet y Hanson, 1999). El término programación se refiere al proceso mediante el cual estímulos o traumatismos aplicados durante periodos críticos o sensibles del desarrollo pueden tener efectos persistentes o duraderos en la estructura o función de un organismo, incrementando la susceptibilidad para el desarrollo de enfermedades en la vida adulta, como sucede en la desnutrición (Godfrey y Barker, 2000). La programación tiene mayor importancia durante etapas críticas del desarrollo, en las cuales existen periodos de máxima demanda de nutrientes, como sucede en la última etapa de la gestación o al inicio de la lactancia. La aparición y la gravedad de diferentes condiciones mórbidas depende de la vulnerabilidad genética de los individuos, de la exposición a factores ambientales adversos y al periodo durante el cual el evento estresante ocurre (Charmandari *et al.*, 2005). La vida prenatal, la niñez y la adolescencia son periodos críticos que se caracterizan por un alto grado de plasticidad (Khazipov y Luhmann, 2006), por lo que la exposición a un estímulo estresante puede tener consecuencias de orden organizacional, causando alteraciones persistentes en la función del organismo.

En muchas especies animales la influencia ambiental llega al feto a través de la circulación madre-placenta o a la descendencia, a través de la lactancia, desarrollándose así adaptaciones fisiológicas que incrementan la supervivencia del individuo en ese ambiente. Estas respuestas adaptativas predictivas (Gluckman y Hanson, 2004) no tienen un valor adaptativo inmediato, por lo que la adaptación es a largo plazo, con el objeto de garantizar

la supervivencia por lo menos hasta la edad reproductiva. Las respuestas adaptativas predictivas causan cambios persistentes en el funcionamiento del organismo, probablemente por procesos epigenéticos potencialmente transmisibles de una generación a otra. Siendo factores esenciales para la supervivencia de los individuos, es de esperarse que la nutrición, el metabolismo, el crecimiento, la reproducción y las respuestas al estrés sean los aspectos más sensibles a la programación.

1.4 Modelos animales de diabetes asociados a bajo peso al nacimiento o retardo en el crecimiento uterino

Existen estudios en modelos animales que se han relacionado a nivel fisiológico y molecular entre la DM tipo 2-RCIU y la DM tipo 2-BPN derivado del ambiente fetal. La restricción calórica materna del 50% en ratas, a los 15 días de gestación, causa en las crías BPN así como disminución en el número de islotes de Langerhans, disminuyendo por tanto la cantidad de células β pancreáticas, mostrándose desde el primer día posnatal (Garofano *et al.*, 1999).

Asimismo, la restricción calórica del 70% durante la gestación en ratas lleva al RCIU en las crías, además de hipertensión, hiperinsulinemia e hiperfagia en la vida adulta (Vickers *et al.*, 2000). Los primeros estudios en este modelo examinaron el desarrollo del páncreas, encontrándose disminución en la masa de los islotes, pérdida de vascularización y bajo contenido de insulina. Estos islotes también mostraron defecto en la secreción en respuesta a la glucosa y aminoácidos en la vida fetal, así como daño en la secreción de la insulina en la vida adulta (Merezak *et al.*, 2004); a los 15 meses de edad mostraron intolerancia a la glucosa y a los 17 meses DM tipo 2 (Ozanne *et al.*, 2003).

Por otra parte, en el modelo de insuficiencia útero-placentaria, que consiste en ligar ambas arterias uterinas para disminuir el flujo sanguíneo hacia el feto y por lo tanto restringir el aporte de nutrientes, las crías mostraron disminución de los niveles de IGF-1 en la vida posnatal, crecimiento acelerado, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina,

disminución de las células β pancreáticas; a los 6 meses de edad, desarrollo de obesidad, hiperglucemia, hiperinsulinemia y DM tipo 2 (Simmons *et al.*, 2001).

De la misma manera, las crías nacidas de madres con restricción de proteínas durante la gestación presentan disminución del 15% en el peso al nacer, en comparación con crías control. En este modelo, la restricción del crecimiento se origina por la restricción de proteínas en una dieta isocalórica durante la gestación, la cual se compone de 8% de proteínas comparado con el 20% de la dieta del control (Fernández-Twinn *et al.*, 2003). Además, estudios recientes en diversos modelos han mostrado que el vínculo entre BPN y desórdenes metabólicos pueden ser causados por una exposición excesiva de glucocorticoides *in utero*. Las madres tratadas con dexametasona durante la preñez provocan en la descendencia BPN, hiperglucemia, hiperinsulinemia e hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Doyle *et al.*, 2003).

Por otro lado, el BPN no se observa en crías de madres alimentadas con una dieta hiperlipídica, sin embargo, las crías tienen mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y DM tipo 2, ya que también aumenta el riesgo de desarrollar hiperinsulinemia y mayor adiposidad (Khan *et al.*, 2005).

1.5 Áreas hipotalámicas involucradas en la regulación del balance energético. Control neuroendocrino de la alimentación.

Se ha propuesto que la regulación del peso corporal se debe a la interacción entre el tejido adiposo y el SNC. En particular, el área cerebral que participa en la regulación de la ingesta de alimento es el hipotálamo, siendo el área hipotalámica lateral (LHA) (Bernardis y Bellinger, 1996), considerada como el centro del “hambre o alimentación”. Por su parte, el núcleo ventromedial hipotalámico (VMH) es considerado el centro de la “saciedad” (Dockray, 2003). Además, el núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo arcuato (ARC) son áreas en donde diversas hormonas, liberadas del estómago y del tejido adiposo, convergen para regular la ingesta del alimento y la homeostasis del gasto energético (Funahashi *et al.*, 2000) (Figura 3).

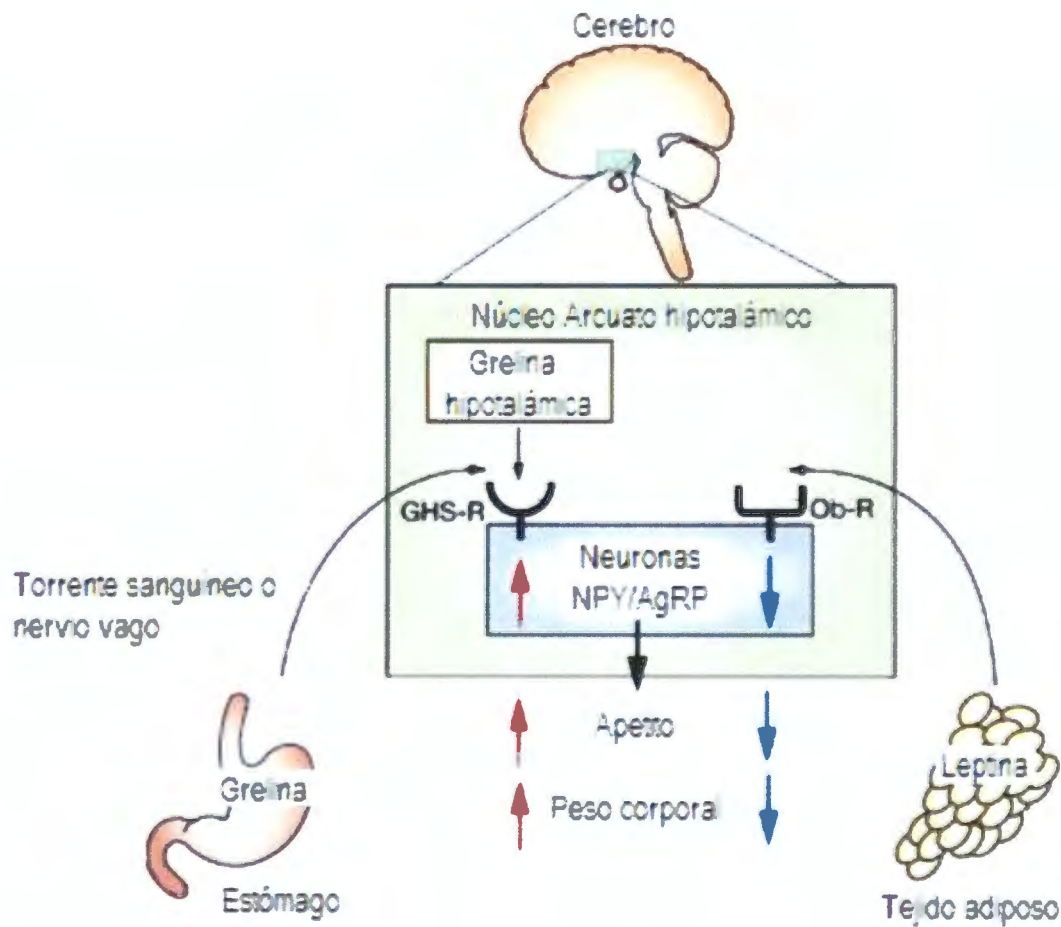


Figura 3. Regulación central de la ingesta de alimento en el hipotálamo. La grelina, liberada del estómago vacío, activa neuronas que sintetizan NPY y AgRP en el ARC para estimular la ingesta de alimento y promover la ganancia de peso corporal. Por su parte, la leptina, que es liberada por el tejido adiposo, regula el sistema responsable de la saciedad, inhibiendo la ruta grelina-NPY/AgRP y propiciando la pérdida de peso corporal.

En el ARC hay dos tipos distintos de neuronas que son importantes en el control de la ingesta: las neuronas que sintetizan proopiomelanocortina (POMC), activadas por hormonas anorexigénicas y que liberan la hormona estimulante de melanocitos alfa (α -MSH) en el centro de la saciedad y las neuronas activadas por los péptidos orexigénicos, tales como la grelina, que liberan al neuropéptido Y (NPY) y a la proteína relacionada con Agouti (AgRP) en el centro del hambre (Currie *et al.*, 2005) (Figura 4). Asimismo, el NPY y el AgRP se expresan en el área medial del ARC (Hahn *et al.*, 1998), mientras que la POMC y el transcrito regulado por anfetamina y cocaína (CART) lo hacen en el área lateral del mismo núcleo (Elias *et al.*, 1998).

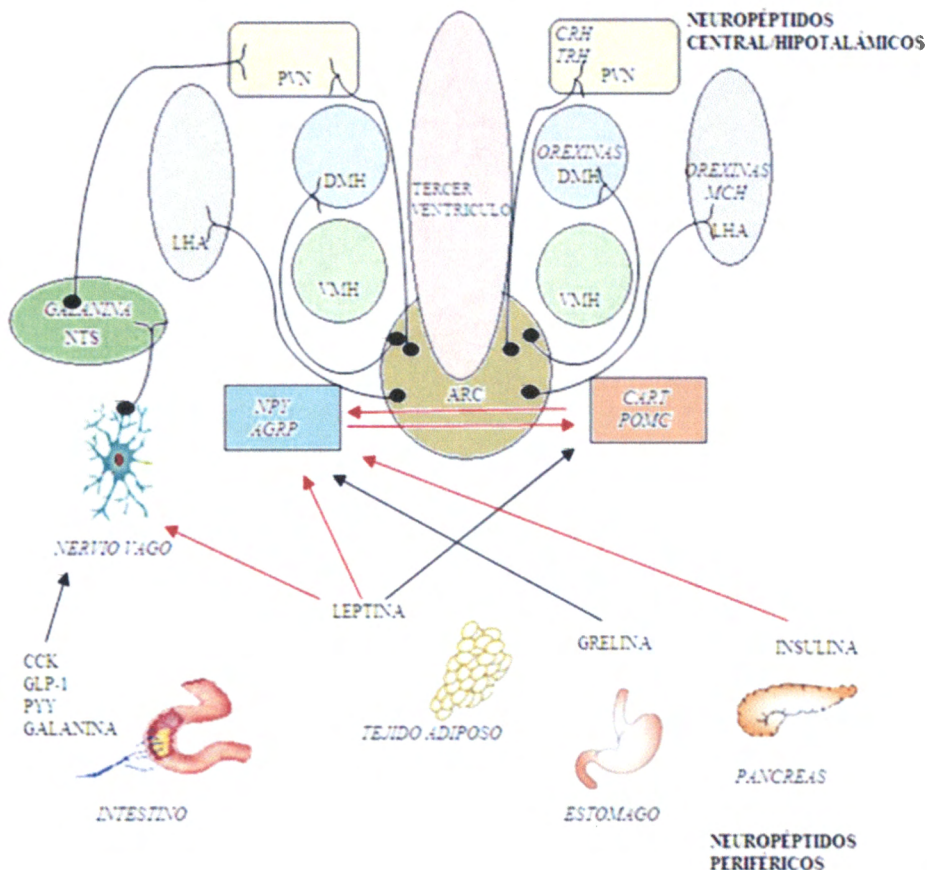


Figura 4. Interrelaciones entre diversos péptidos reguladores del apetito y sus principales sitios de síntesis y acción. En la parte superior se muestra la ubicación de los núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación del apetito. La parte inferior muestra los órganos periféricos y sus neuropéptidos secretados. Las flechas negras indican un efecto estimulador y las flechas rojas indican un efecto inhibitorio de péptidos periféricos, tanto en los núcleos hipotalámicos como en la secreción de neuropéptidos. NTS: núcleo del tracto solitario, DMH: núcleo hipotalámico dorsomedial, TRH: hormona liberadora de tirotropina.

El ARC integra respuestas aferentes de los nervios, principalmente a nivel vagal y humoral, tales como los péptidos orexigénicos grelina y orexinas. Las orexinas son producidas en el LHA, por lo que tienen una relación directa con el centro de la sensación del hambre y, por consiguiente, con la regulación del apetito. Las orexinas se clasifican en Orexina A y Orexina B, y se ha observado que tienen una influencia directa en la obesidad (Rodgers *et al.*, 2002).

1.6 La grelina en el control de la conducta alimenticia

La grelina es una hormona secretada en el estómago (Kojima *et al.*, 1999; Rindi *et al.*, 2004) y está implicada en procesos patológicos como la obesidad (Rubino *et al.*, 2005). La grelina se secreta aproximadamente una o dos horas antes de comer y su concentración alcanza su pico máximo justo antes de comer, disminuyendo drásticamente una hora después, lo que implica su papel en la percepción del hambre (Cummings *et al.*, 2001). El contenido de grelina en el SNC es bajo (Hosoda *et al.*, 2000), sin embargo, por medio de análisis inmunohistoquímico se han identificado neuronas productoras de la hormona en el ARC (Kojima *et al.*, 1999).

Se ha propuesto que la secreción de grelina a nivel periférico se encuentra inhibida en la obesidad, pero se revierte después de la disminución de peso (Micic *et al.*, 1999). Se postula que esta disminución de los niveles de grelina responde a un estado adaptativo ante una situación de balance energético positivo crónico (Hansen *et al.*, 2002). Así, la grelina estimula la ingesta de alimento y se correlaciona de manera inversa con el peso corporal. A la vez, sus concentraciones se elevan en sujetos que se someten a procesos de pérdida de peso (Cummings *et al.*, 2002).

La administración intracerebroventricular (ICV) de grelina favorece el incremento en la expresión del mRNA tanto del NPY como de AgRP, y la administración previa de anticuerpos y antagonistas del NPY inhiben en forma significativa la ingesta inducida por grelina (Nakazato *et al.*, 2001). Dado que la administración de grelina no modifica la expresión del mRNA de POMC, los efectos orexigénicos dependientes de grelina se

encuentran mediados por la respuesta de las neuronas que expresan NPY y AgRP en el ARC.

1.6.1 Acción de la grelina mediada por el receptor GHSR-1a

Cuando la grelina se administra de manera directa en el SNC, las neuronas expresan en forma muy temprana factores de transcripción, en especial en las zonas encargadas de regular el apetito, tales como el ARC y VMH (Nakazato *et al.*, 2001), lo que sugiere que la grelina puede contribuir a la homeostasis energética regulada por vía central. Esta distribución coincide con la del receptor de grelina (receptor secretagogo de la hormona del crecimiento, GHSR-1a) (Guan *et al.*, 1997). El mRNA del GHSR-1a se expresa en el 94% de las neuronas del ARC que expresan NPY, 8% de las células que expresan POMC, 30% en aquellas que expresan somatostatina y en 20-25% de células que expresan mRNA de hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH) (Willesen *et al.*, 1999). Además, la grelina y el GHSR-1a se expresan en los islotes pancreáticos y la grelina inhibe la liberación de insulina inducida por la glucosa (Kageyama *et al.*, 2005).

1.7 El NPY en la regulación del apetito

El NPY es un péptido orexigénico que se sintetiza en neuronas del ARC (Tatemoto y Mutt, 1980; Tatemoto *et al.*, 1982; Clark *et al.*, 1984; Stanley y Leibowitz, 1984). La administración ICV del NPY da como resultado hiperfagia y aumento del peso corporal (Stanley *et al.*, 1986; Zarjevski *et al.*, 1993); disminuye el gasto de energía, estimula episodios de alimentación y aumenta la ingesta de alimento, la duración y la frecuencia de la misma (Bivens *et al.*, 1998). Así, el NPY es considerado un regulador importante del balance energético (Kanatani *et al.*, 2001). En el PVN, el NPY estimula la ingesta de alimento con efecto preferencial sobre la ingesta de carbohidratos, efecto demostrado al inyectar NPY en el PVN (Stanley *et al.*, 1989). Cuando el NPY es inyectado continuamente, se estimula tanto la ingesta de dietas altas en carbohidratos como dietas altas en lípidos, aunque el efecto sobre la ingesta de lípidos es corta (2 días), mientras que

la ingesta de carbohidratos se observa aún después de los 9 días de la inyección (Beck *et al.*, 1992).

Actualmente se han descrito cinco subtipos distintos de receptores del NPY (Y1, Y2, Y4, Y5, Y6). De éstos, el receptor Y1 tiene un papel importante en la regulación del consumo de alimento (Blomqvist y Herzog, 1997; Kanatani *et al.*, 2001), mientras que el receptor Y5 no sólo media la respuesta al alimento (Hwa *et al.*, 1999), sino también contribuye a la homeostasis de la energía (Mashiko *et al.*, 2003). Esto sugiere que el NPY es más importante en el estímulo de la ingesta cuando las reservas energéticas están gravemente comprometidas, es decir, cuando se reducen las señales de adiposidad. Lo anterior implica que la alimentación inducida por el NPY está mediada por la interacción de más de un receptor (Iyengar *et al.*, 1999).

1.8 El papel de la leptina en el balance energético

Otra hormona que participa en el control de la alimentación es la leptina, la cual se expresa en el tejido adiposo y presenta concentraciones proporcionales a la masa de adipocitos. La administración periférica de leptina causa reducción en la ingesta de alimento, disminución del peso corporal e incremento en el gasto energético, efecto que es opuesto al de la grelina, (Friedman y Halaas, 1998). Esos efectos son mediados por la inhibición de las neuronas orexigénicas y estimulación de las neuronas anorexigénicas (Sahu, 2003). Así, la leptina inhibe la ingesta dependiente de grelina, la cual revierte en forma sustancial los efectos anorexigénicos de la leptina, indicando que la grelina puede antagonizar la acción de la leptina en la regulación del sistema NPY-AgRP (Hosoda *et al.*, 2002). Otras hormonas que tienen efecto anorexigénico, además de la leptina, son: colescistocinina (CCK), péptido YY (PYY), oxintomodulina y otras que ejercen un papel fisiológico en la regulación de la saciedad (Bray, 2000).

Se ha observado que en la obesidad existe un defecto en el receptor de leptina en el SNC; por ese motivo, el transportador de leptina se satura y no hay paso al cerebro, lo cual favorece la obesidad. Esto se llama síndrome de resistencia a la leptina. Aunque no se

conoce con exactitud el mecanismo responsable, diversos trabajos sugieren la posibilidad de que la leptina ejerza este efecto a nivel cerebral a través de mediadores como el NPY, la α -MSH, el AgRP o la hormona liberadora de corticotropina (CRH), entre otros.

1.9 Inactivación de la grelina por acción de la leptina en neuronas que sintetizan NPY

Las neuronas que sintetizan NPY en el ARC son el principal sistema a través del cual la grelina ejerce sus efectos orexigénicos y la leptina sus efectos anorexigénicos. La forma de cómo interactúan estas dos hormonas y cuáles son los mecanismos de señalización en neuronas que sintetizan NPY aún no ha quedado establecido. Sin embargo, se han determinado posibles mecanismos de señalización de la grelina y la leptina, así como su interacción con neuronas que sintetizan NPY del ARC. En un estudio realizado con ratas, se aislaron neuronas del ARC y se monitoreó su actividad midiendo las concentraciones de calcio citosólico ($[Ca^{2+}]_i$). El $[Ca^{2+}]_i$ aumentó en neuronas productoras de NPY después de la administración de grelina; este incremento fue suprimido por inhibidores de fosfolipasa C (PLC), adenilato ciclasa (AC) y AMP cíclico (cAMP). La coadministración de leptina causó supresión del $[Ca^{2+}]_i$ inducida por grelina en neuronas del ARC. Estos resultados indican que la gran mayoría de la actividad de la grelina es inhibida por la leptina en el ARC en neuronas que sintetizan NPY (Kohno *et al.*, 2007) (Figura 5).

Actualmente los sistemas de neurotransmisión y neuropéptidos con efecto orexigénico y anorexigénico a nivel SNC son objeto de un amplio estudio, ya que los mecanismos de neurotransmisión que participan en el control de la ingesta de alimento son aún desconocidos (Spiegelman y Flier, 2001).

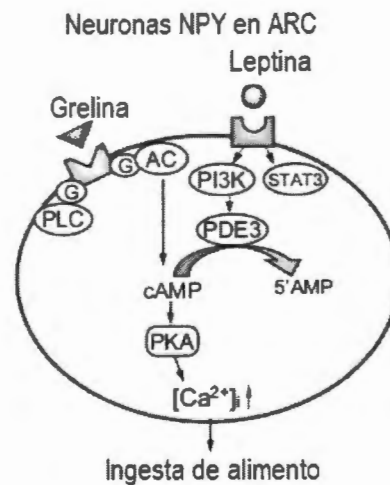


Figura 5. Modelo propuesto para la señalización “cross talk” entre la grelina y la leptina en neuronas NPY del ARC. La grelina incrementa el $[Ca^{2+}]_i$ por mecanismos dependientes de las rutas adenilato ciclasa-cAMP-PKA y PLC. La leptina suprime el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la grelina a través de la ruta PI3K y la ruta mediada por PDE3. Esta interacción puede jugar un papel importante en la regulación de la actividad de neuronas NPY, por lo tanto, en el comportamiento alimenticio. PKA: proteína cinasa A, PI3K: fosfoinositol 3 cinasa, PDE3: fosfodiesterasa 3.

1.10 Vía serotoninérgica en la regulación de la alimentación

Un sistema de neurotransmisión involucrado en el control de la alimentación es el sistema de serotonina (5-HT). La 5-HT es el principal mediador inhibitorio del PVN, que regula la saciedad. Este efecto es altamente específico para los carbohidratos y requiere co-factores centrales y periféricos para tener efecto sobre la ingesta de otros nutrientes (proteínas y lípidos). La hiperserotoninergia produce anorexia y la hiposerotoninergia conduce a un aumento de peso (Kaye *et al.*, 1984; Kaye *et al.*, 2005).

En el núcleo dorsal del Rafe tienen efecto fármacos utilizados para el tratamiento de la obesidad, tales como dexfenfluramina y sibutramina, debido a que este sistema ha sido implicado en la percepción de la saciedad, estimándose que la 5-HT proporciona un

mecanismo viable para el control del peso corporal (Halford *et al.*, 2007). Los estudios con fármacos agonistas y antagonistas, así como la investigación en animales genéticamente modificados, ha permitido saber que, de los 14 subtipos de receptores serotoninérgicos, sólo los subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C} y 5-HT₆ son de interés en el estudio de la regulación de la ingesta de alimento. Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos implicados en un estado de obesidad que lleva al desarrollo de DM tipo 2 aún no se conocen (Dourish, 1995; Vickers y Dourish, 2004).

El mantenimiento de la homeostasis energética requiere de señales serotoninérgicas intactas. Hallazgos recientes determinaron que la leptina aumenta el recambio de 5-HT, lo que implica que al menos una parte del efecto reductor del peso corporal por la leptina está mediado por 5-HT. Algunos estudios han sugerido que un aumento en la señal del receptor 5-HT_{2C} suprime la ingesta de alimento, mientras que fármacos antagonistas tienen un efecto opuesto (Xu *et al.*, 2008) (Figura 6).

Se ha sugerido que el aumento en la estimulación de los receptores presinápticos 5-HT_{1A} tiene efecto orexigénico, ya que los agonistas con acción directa 5-HT_{1A} producen disminución de la liberación de 5-HT, lo cual puede ser la causa del aumento en la ingesta de alimento. La disminución del metabolito ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) en el líquido cefalorraquídeo es un marcador de las disorexias (anorexia-bulimia-alcoholismo). En ratas alimentadas con una dieta alta en grasas (40%) durante una semana, disminuye la liberación de 5-HT y aumenta el catabolismo de 5-HT, con una producción mayor de 5-HIAA, tanto en hipotálamo como en hipocampo. Sin embargo, con la misma dieta durante 6 semanas, se bloquea completamente la liberación de 5-HT, pero sin cambios en el 5-HIAA. Además, se ha observado hiperleptinemia y aumento en el sustrato del receptor de insulina (IRS) 1 y 2. Lo anterior demuestra la participación de la 5-HT en la modulación de la ingesta de alimento (Blundell *et al.*, 1995).

En este trabajo se considera importante determinar las alteraciones en la expresión del receptor 5-HT_{1A} en el transcurso del desarrollo de la DM tipo 2, cursando por recuperación del crecimiento y obesidad en individuos desarrollados en un ambiente intrauterino con

restricción de alimento y con BPN, ya que la regulación de la liberación de 5-HT y la regulación de la ingesta de alimento mediante 5-HT inhiben la producción de NPY en el hipotálamo (Banas *et al.*, 2009).

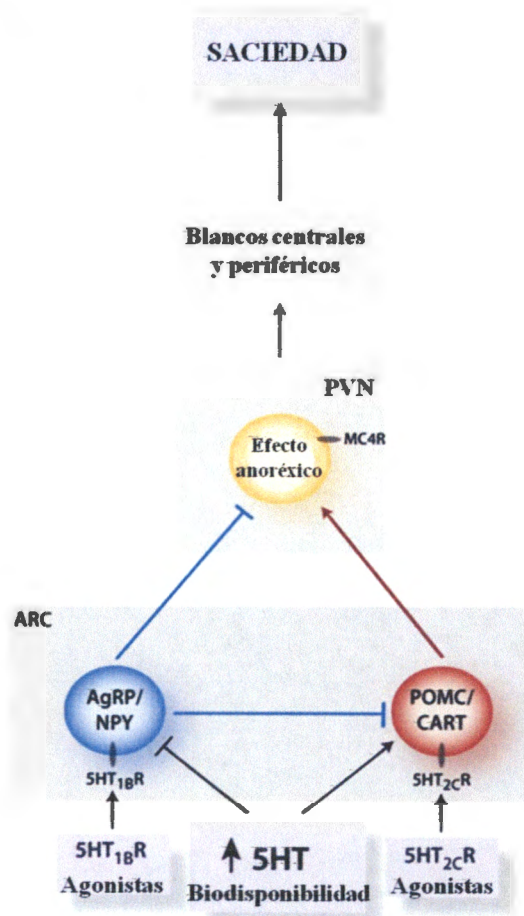


Figura 6. Modelo propuesto para la modulación de la ingesta de alimento a través de la vía serotoninérgica. El aumento de la biodisponibilidad de 5-HT (debido a la ingesta de alimento o a compuestos farmacológicos como fenfluramina o sibutramina) o por agonistas de receptores 5HT_{2C} y 5HT_{1B} modula el disparo de neuronas que sintetizan POMC/CART y AgRP/NPY en el ARC. La 5-HT a través del receptor 5-HT_{2C} despolariza neuronas POMC anorécticas, provocando la liberación de α-MSH, que a su vez activa a neuronas de segundo orden que expresan el receptor 4 de melanocortina (MC4R) principalmente en el PVN. La activación concomitante del receptor 5HT_{1B} expresado en neuronas orexigénicas que sintetizan AgRP/NPY en el ARC causa la hiperpolarización de la membrana, con la subsiguiente inhibición de la liberación de neuropéptidos. La 5-HT inhibe la liberación de AgRP/NPY mediante la activación de receptores 5HT_{1B}, potenciando así la anorexigénesis a través de las neuronas POMC/CART, lo que promueve la señalización neuroendocrina de la saciedad y el cese de la ingesta de alimento.

2. JUSTIFICACIÓN

Se ha establecido que la función de un órgano o un tejido específico puede ser programada *in utero* por efecto de un estímulo en etapas fetales o neonatales, lo que se ha definido como programación del desarrollo. La restricción del alimento en la etapa fetal de un organismo induce cambios neuroendocrinos que desencadenan una mayor ingesta de alimento en la vida posnatal, programando así procesos metabólicos alterados en la vida adulta. Los mecanismos orexigénicos involucrados en el control de la alimentación a nivel de hipotálamo en individuos con recuperación del crecimiento hasta la vida adulta son determinantes para el desarrollo de obesidad, estado en el cual se desencadena resistencia a la insulina secundaria a una hiperglucemia, lo que lleva a desarrollar DM tipo 2 (Reaven, 1988; Montemayor y Montes, 2004; Kahn *et al.*, 2006). En este contexto surge la siguiente pregunta: ¿De qué manera influyen la desnutrición prenatal y una dieta hiperlipídica en las alteraciones que ocurren a nivel del sistema nervioso central que producen cambios metabólicos asociados al desarrollo de DM tipo 2? Para poder contestar esta pregunta, en el presente trabajo se utilizó a la rata como modelo biológico para evaluar los cambios en las concentraciones de hormonas reguladoras de la ingesta de alimento, como es la grelina y la insulina, así como su relación con el sistema serotoninérgico. Asimismo, se evaluó la expresión de los receptores 5-HT_{1A}, GHSR-1a y Y1 durante la etapa neonatal, juvenil y adulta, como parte de la programación uterina después de presentar BPN. Evaluar estos cambios en etapas tempranas del desarrollo permitirá conocer las posibles alteraciones a nivel central que inciden en el metabolismo y que lleven al desarrollo de DM tipo 2 en la vida adulta, ya que el desarrollo y crecimiento en la etapa neonatal constituye el periodo de mayor plasticidad celular.

3. HIPÓTESIS

La desnutrición prenatal, seguida del crecimiento recuperado posnatal y una dieta hiperlipídica, causa alteraciones metabólicas que culminan en obesidad y DM tipo 2 en la vida adulta. Esto a través de mecanismos que implican aumento en la expresión de receptores orexigénicos (GHSR-1a, Y1) y anorexigénicos (5-HT_{1A}) a nivel central, así como aumento en los niveles de sustancias orexigénicas (grelina) y disminución de las anorexigénicas (5-HT), con aumento en los niveles de insulina.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Demostrar que el desarrollo de DM tipo 2, asociado con BPN y dieta hiperlipídica posnatal, depende de la desregulación de hormonas, de péptidos orexigénicos y de neurotransmisores en el cerebro de rata.

4.2 Objetivos particulares

1. Inducir obesidad y DM tipo 2 en ratas a través de un modelo de bajo peso al nacimiento generado por restricción calórica durante la gestación y suplementado con una dieta hiperlipídica posnatal.
2. Evaluar el peso corporal y los cambios metabólicos (glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL, urea, creatinina y nitrógeno ureico) en el modelo de estudio.
3. Realizar pruebas de tolerancia a la glucosa y evaluar la resistencia a la insulina en la edad adulta (12 y 28 semanas).
4. Cuantificar mediante RT-PCR la expresión de los receptores 5-HT_{1A}, GHSR-1a y Y1 en hipotálamo del modelo experimental de DM tipo 2 en edad neonatal y adulta.
5. Cuantificar la concentración de 5-HT en el hipotálamo, así como la concentración plasmática de insulina y de grelina en ratas en edad neonatal y adulta, así como con DM tipo 2.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague Dawley, 20 machos y 20 hembras nulíparas de 3 meses de edad, con un peso de 200-250 g. Los animales se mantuvieron en el bioterio perteneciente al CMN SXXI-IMSS.

Las ratas se dejaron en un periodo de aclimatación en su caja habitación durante 2 semanas. Se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio, temperatura ambiente (TA) de $22\pm 2^{\circ}$ C, humedad relativa de 60%, ciclos normales de luz-oscuridad de 12 horas (la luz se encendió a las 07:00 horas). El alimento y agua fueron *ad libitum*.

Cada hembra se colocó con un macho de fertilidad probada. En los días posteriores se determinó el primer día de gestación, ya sea por frotis vaginal verificando la presencia de espermatozoides o identificando el tapón vaginal. Las hembras en gestación se asignaron aleatoriamente a los distintos grupos de trabajo.

5.2 Aspectos éticos

El protocolo fue sometido a evaluación por el Comité de Ética a Nivel Nacional del CMN SXXI-IMSS. Las ratas de experimentación se trataron de acuerdo a las normas internacionales de cuidados y manejo en animales de experimentación (American Veterinary Medical Association, 2001), los cuales estuvieron en vigilancia en el Bioterio del CMN SXXI-IMSS de acuerdo con las disposiciones generales del Reglamento de la Ley General de Salud y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Los animales tuvieron un área asignada bajo las condiciones ambientales de control de temperatura, humedad relativa del 60% y ciclos de luz-oscuridad (Capítulo 6, NOM-062-

ZOO-1999). Las hembras en gestación se colocaron en jaulas individuales (Capítulo 5, NOM-062-ZOO-1999). Al comienzo de la segunda semana de gestación al grupo experimental se le restringió el alimento al 50% respecto del grupo Control, la ingesta de agua fue *ad libitum* (5.1.3.1, NOM-062-ZOO-1999). Al nacimiento de las crías, las madres con restricción alimentaria fueron nuevamente alimentadas *ad libitum*, para evitar que al nacimiento de sus crías se las comieran. La eutanasia que se realizó a los animales fue por el método físico de decapitación, ya que mediante este método se obtiene el tejido cerebral íntegro sin influencia de fármacos anestésicos (Capítulo 9, de la NOM-062-ZOO-1999). El manejo con respecto a la disposición final de productos biológicos se determinó de acuerdo con lo establecido en la NOM-087-ECOL-1995.

5.3 Tipo de alimentación

Se empleó la dieta control “Formulab diet 5008” (Agribrans Purina México, S.A. de C.V.) para determinar el grupo control y experimental de las ratas madre. Para los grupos experimental y control de las crías se empleó una dieta hiperlipídica (HL, alimento BASAL PURIFIED DIET W/60% ENERGY FROM FAT, BLUE, de la marca LabDiet dieta especial TESTDIET, clave 58G9) y la dieta 5008, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA DIETAS

COMPOSICIÓN QUÍMICA	Dieta control mg%	Kcal/%	Dieta hiperlipídica (HL) (mg%)	Kcal/%
Proteínas	23.5	26.85	26.2	20
Grasas	6.5	16.71	34.9*	60
Carbohidratos	38.32	56.44	26.3	20
Total		100		100
Kcal/g	4.15		5.24	

* Análisis de colesterol en manteca de cerdo = 0.95 mg/g.

Dieta control

Vitaminas: caroteno, vitamina K, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, ácido fólico, piridoxina, biotina, vitamina B₁₂, vitamina A, vitamina D₃, vitamina E, ácido ascórbico.

Minerales: calcio, fósforo, potasio, magnesio, azufre, sodio, cloro, flúor, hierro, zinc, manganeso, cobre, cobalto, yodo, cromo, selenio.

Carbohidratos: almidón, glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa.

Dieta HL

Vitaminas: vitamina K, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, cloruro de colina, ácido fólico, pirodoxina, biotina, vitamina B₁₂, vitamina A, vitamina D₃, vitamina E, ácido ascórbico.

Minerales: calcio, fósforo, potasio, magnesio sodio, cloro, flúor, hierro, zinc, manganeso, cobre, cobalto, yodo, molibdeno, selenio.

Carbohidratos: sacarosa.

5.4 Inducción de desnutrición materna

A los 11 días de gestación las hembras se dividieron en dos grupos: el grupo control (C) y el grupo con restricción del alimento (R). Al grupo C se le colocó una cantidad de alimento conocida en gramos; al día 12 de gestación se midió la diferencia de alimento consumido y a partir de éste se alimentó al grupo R con el 50% de alimento consumido por el grupo C. Ambos grupos se alimentaron con la dieta control. La ingesta de agua fue *ad libitum*. A ambos grupos se les evaluó el peso corporal al inicio de la gestación, así como antes y después del tratamiento con la dieta, para verificar la desnutrición materna (considerándose una disminución de 10% del peso corporal como desnutrición) (Figura 7).

5.5 Manejo de las crías al nacimiento

Al nacimiento de las crías, las madres del grupo R fueron alimentadas de manera normal. Las crías fueron pesadas y seleccionadas por sexo. Se homogeneizaron en camadas de 8-9 en cajas separadas por camada y se alimentaron por lactancia hasta los 21 días de edad posnatal. Para este estudio se seleccionaron los machos. Después del destete los machos del grupo C se alimentaron con la dieta control y los machos del grupo R se alimentaron con la dieta HL.

Para el estudio en cuestión se utilizaron 60 ratas, conformando el grupo C de 30 ratas y el grupo producto de la desnutrición materna (BPN) de 30 ratas. En cada grupo se hicieron 3 cortes de edad (2, 12 y 28 semanas de edad, $n=6-10$ para cada subgrupo). La ingesta de alimento se registró diariamente y el peso corporal fue medido semanalmente durante el experimento, considerando un aumento de 20% del peso corporal como obesidad (Figura 7).

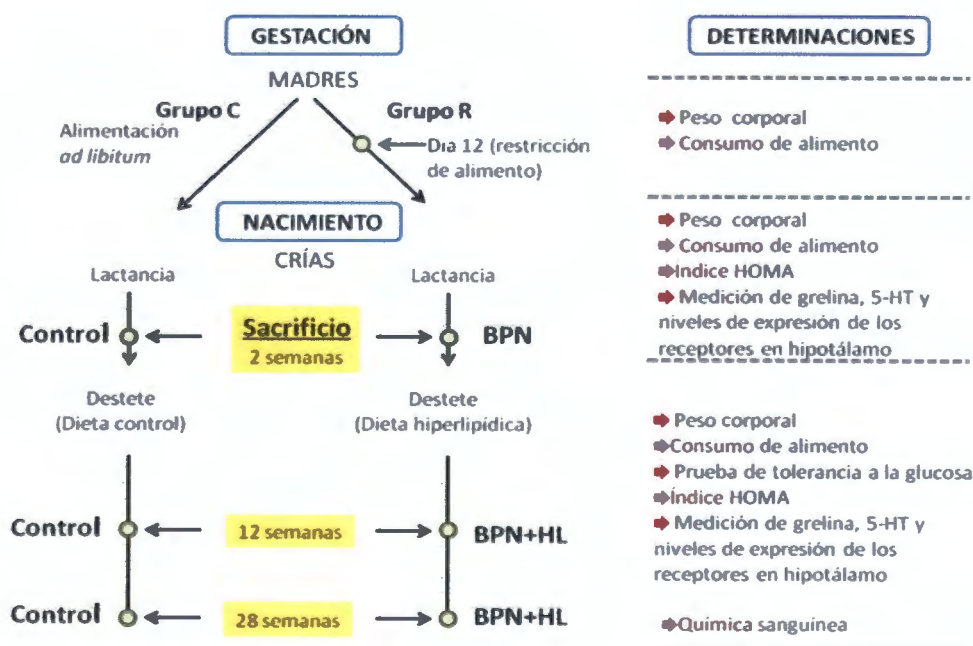


Figura 7. Diseño experimental.

5.6 Prueba de tolerancia a la glucosa y determinación de parámetros bioquímicos

A los grupos control y BPN+HL de 12 y 28 semanas de edad se les realizó la prueba de tolerancia a la glucosa. Para ello se les administraron 2 g/kg de peso de glucosa por vía oral con ayuno previo de 12 horas. Se obtuvieron muestras de sangre de la vena de la cola de cada uno de los animales. Las concentraciones de glucosa se determinaron cada 30 min postcarga durante 2 horas empleando un glucómetro (Micro-Draw Advanced).

A los grupos control y BPN+HL de 28 semanas de edad se les determinaron las concentraciones de colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad (HDL), urea, creatinina y nitrógeno ureico en plasma obtenido después de centrifugar las muestras sanguíneas a 1 792 x g (4 000 rpm) durante 15 min a 4° C. Para esto se utilizaron métodos enzimáticos y colorimétricos (Anexo 11.1 y 11.2). Las concentraciones se determinaron en un analizador Hitachi.

5.7 Obtención de plasma y tejidos de los grupos de trabajo

Una vez que las ratas tuvieron las edades de corte (2, 12 y 28 semanas de edad), fueron sometidas a 12 horas de ayuno con la finalidad de estar en el punto de equilibrio de los sistemas; se sacrificaron por decapitación, se recolectó la sangre en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante y se obtuvo el plasma centrifugándose a 1 792 x g (4 000 rpm) a 4° C durante 15 min. Las muestras de plasma se congelaron a -20° C hasta el día del ensayo. A partir de éstas se realizó la medición de grelina e insulina mediante la técnica de ELISA.

De esta población de estudio se llevó a cabo la disección del cerebro a 4° C y se extrajo el hipotálamo, las muestras se congelaron en N₂ líquido por inmersión en tubos Eppendorf y se conservaron a -70° C para la cuantificación de 5-HT por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico (HPLC-EC) y la evaluación de la

expresión de receptores por la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa reversa (RT-PCR).

5.8 Detección de insulina y grelina en plasma

Se determinaron por duplicado las concentraciones plasmáticas de insulina y grelina en los grupos control y BPN de 2 semanas de edad; control y BPN+HL de 12 y 28 semanas de edad, mediante el método de ELISA, basado en la técnica inmunoenzimática cuantitativa de sandwich y procediendo de acuerdo al protocolo establecido por LINCO Research y Millipore (Anexo 11.3).

5.9 Prueba de resistencia a la insulina a través del Homeostasis Model Assessment (HOMA)

Para la estimación de la sensibilidad a la insulina se utilizó el HOMA (HOMA-IR) a las 2 semanas de edad de los grupos control y BPN y a las 12 y 28 semanas de edad en los grupos control y BPN+HL. Para realizar el HOMA-IR se requirieron los valores de glucemia (en mg/dL) e insulina (en $\mu\text{U/mL}$), aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Resistencia a la insulina (HOMA-IR)} = \frac{\text{Insulina en ayuno } (\mu\text{U/mL}) \times \text{Glucosa en ayuno (mg/dL)}}{405}$$

5.10 Cuantificación de 5-HT en hipotálamo

Las concentraciones de 5-HT se cuantificaron en muestras de tejido hipotalámico de los grupos control y BPN de 2 semanas de edad, control y BPN+HL de 12 y 28 semanas de edad. Se determinó la concentración de 5-HT por HPLC-EC según la técnica de Peat y Gibb (1983). Se utilizó una bomba marca Waters modelo 515 acoplada a un detector electroquímico marca Waters 2465 a 800 mV. Para la separación se utilizó una columna Atlantis T3 5 μm , 2.1 cm x 100 mm y una pre-columna Atlantis T3 5 μm , 2.1 x 10 mm. La composición de la fase móvil fue: EDTA (0.02 g/L), ácido cítrico (10.5 g/L), ácido

octansulfónico (0.02 g/L), cloruro de sodio (NaCl-0.135 g/L), metanol (3%), hidróxido de sodio (NaOH), pH = 3.1. La fase móvil fue preparada en agua libre de pirógenos, filtrada y desgasificada a través del sistema de purificación de Milli-Q Plus y bombeada a una velocidad de flujo de 0.2 mL/min. La sensibilidad del detector fue de 5 nA y el potencial del electrodo fue de 800 mV. La columna se mantuvo a una temperatura de 30° C.

Para el análisis por HPLC, se concentraron tres muestras para obtener un mínimo de 10 mg de tejido. Cada muestra del tejido hipotalámico se homogeneizó en 30 µL de ácido perclórico (HClO₄) 0.1 M + Metabisulfito de sodio 4 mM por cada 10 mg de tejido, usando un homogeneizador manual (Motor Cordles, KONTES GLASS COMPANY®) y se centrifugaron a 11 200 x g (10 000 rpm) a 4° C durante 15 min. Se inyectaron 10 µL de sobrenadante en el sistema HPLC. Los botones se congelaron para la posterior cuantificación de proteínas.

La cuantificación de la concentración se hizo integrando el área bajo la curva de los picos de 5-HT, que se detectaron con el detector electroquímico (Anexo 11.4). Para la curva patrón de 5-HT se usó el estándar 8-hidroxitriptamina marca SIGMA. Se inyectaron concentraciones conocidas del estándar desde 10 pg/10 µL hasta 320 pg/10 µL. El límite de detección del sistema cromatográfico fue de 10 pg/10 µL. Como la 5-HT es inestable, se mantuvo oculto de la luz y en refrigeración. La cuantificación de proteínas se realizó por medio del método del ácido bicinconínico (BCA) (Anexo 11.5).

5.11 Expresión del mRNA de los receptores 5-HT_{1A}, GHSR-1a y Y1 en hipotálamo

Para determinar la expresión de los genes *Htr1a*, *Npy1r*, *Ghsr1a*, así como para el gen constitutivo y de normalización *Tubb3*, se utilizó la técnica de RT-PCR. Mediante esta técnica se logró obtener una cadena complementaria de DNA (cDNA) a partir de mRNA de muestras de tejido hipotalámico, las cuales fueron sometidas a la acción de la enzima Transcriptasa Reversa. En la Tabla 2 se muestran los oligonucleótidos utilizados para la prueba. Una vez elegidos los oligonucleótidos, se trabajaron las muestras de tejido

hipotalámico de los grupos control y BPN de 2 semanas de edad, control y BPN+HL de 12 y 28 semanas de edad (n=6-10).

Tabla 2. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES HIPOTALÁMICOS

Gen	Secuencia	Producto de PCR pares de bases (PB)
Htr1a (NM_012585)	F 5'-GTCCATTGGCTTTCTCATCT-3' R 5'-CATCCTGGCTGTCCGTTTCAG-3'	297
Npy1r (Coppola <i>et al.</i> , 2004)	F 5'-TCTTCTCTGCCCTTCGTGATC-3' R 5'-TGAACGCCGCAAGTGATACA-3'	73
Ghsr1a (Burdyga <i>et al.</i> , 2006)	F 5'-GCGCTCTTCGTGGTGGGCATCT-3' R 5'-GTGGCGCGGCATTTCGTGGT-3'	449
Tubb3 (Dennis <i>et al.</i> , 2002)	F 5'-TCAGCGTGGTGCCCTCAC-3' R 5'-GTGAGCTCAGGCACCGCT-3'	370

5.12 Aislamiento del RNA total de hipotálamo

Tres muestras de cada tratamiento fueron combinadas hasta juntar aproximadamente 30 mg de tejido hipotalámico. El tejido se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 400 µL del reactivo de TRIzol® (Chomczynski y Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993; Gibco BRL, Life Technologies, New York, NY). Las muestras de tejido se homogeneizaron completamente con un homogeneizador manual (Motor Cordles, KONTES GLASS COMPANY®) y se incubaron durante 5 min a TA 20-25° C. Se agregaron 80 µL de cloroformo al 100% y se agitaron las muestras de forma manual por 15 seg. Se incubaron por 3 min y se centrifugaron a 18 928 x g (13 000 rpm) durante 15 min a TA 20-25° C. Después de centrifugar, la mezcla se separó en una fase inferior roja (fenol/cloroformo), una interfase blanca y una fase acuosa superior incolora donde permanece el RNA. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y estéril. Para precipitar el RNA se agregaron 200 µL de isopropanol al 100% frío (Sigma Chemical Co. St. Louis

MO). Se agitó por inversión y se incubó por 24 horas a -20°C . Las muestras se centrifugaron a $18\,928 \times g$ ($13\,000\text{rpm}$) durante 10 min y se decantó el sobrenadante. Se agregaron $400\,\mu\text{L}$ de etanol al 75% en H_2O -dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma Chemical Co. St. Louis MO), las muestras se agitaron hasta desprender el botón y se centrifugaron a $6\,300 \times g$ ($7\,500\text{rpm}$) durante 10 min a 4°C . Se desechó el sobrenadante y el RNA se secó cuidadosamente por no más 10 min. El RNA se resuspendió en $30\,\mu\text{L}$ de H_2O estéril con DEPC (0.1% v/v), pipeteando repetidamente. Las muestras de RNA se guardaron a -70°C . (Anexo 11.6 y 11.7 para más detalle de la cuantificación y determinación de la integridad del RNA total).

5.13 Condiciones para realizar la RT-PCR

Para poder realizar la técnica de retrotranscripción a partir de $2\,\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de muestra de RNA se utilizó el kit ThermoScripTM RT-PCR System (Invitrogen).

Se preparó una mezcla maestra o “Mix” para cada reacción:

- $1\,\mu\text{L}$ de Oligo (dT)₂₀ $50\,\mu\text{M}$
- $2\,\mu\text{L}$ de mezcla de dNTP $10\,\text{mM}$
- $4\,\mu\text{L}$ de buffer de síntesis de cDNA 5X
- $1\,\mu\text{L}$ de solución DTT $0.1\,\text{M}$
- $1\,\mu\text{L}$ de solución inhibidora de RNAsas “RNAsaOUT”
- $1\,\mu\text{L}$ de ThermoScriptTM RT
- $5\,\mu\text{L}$ de H_2O -DEPC

Se colocaron $15\,\mu\text{L}$ del Mix y se agregaron los μL necesarios de RNA para obtener una concentración final de $2\,\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se ajustó la cantidad requerida con H_2O -DEPC hasta llegar a $20\,\mu\text{L}$. Las muestras se incubaron a 50°C durante 60 min y finalmente a 85°C durante 5 min. Terminada la reacción anterior se adicionó $1\,\mu\text{L}$ de RNAsa H y se incubó a 37°C durante 20 min para detener la reacción.

Una vez obtenido el cDNA a partir de la reacción anterior, se utilizaron las muestras correspondientes para poder realizar la técnica de PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos para Htr1a, Npy1r, Ghsl1a y Tubb3. Finalmente se hizo una reacción de PCR normal partiendo de la siguiente mezcla para cada muestra. La PCR se realizó mediante una co-amplificación para los genes Htr1a, y Ghsl1a y otra co-amplificación para los genes Npy1r y Tubb3.

- 5 μ L de Buffer para PCR menos Mg 10X
- 1.5 μ L de MgCl₂ 50 mM
- 1 μ L de mezcla de dNTP 10 mM
- 1 μ L de oligo sentido para Htr1a o Ghsl1a o Npy1r o Tubb3
- 1 μ L de oligo antisentido para Htr1a o Ghsl1a o Npy1r o Tubb3
- 0.2 μ L de DNA Taq polimerasa Platinum®
- 2 μ L de cDNA de la muestra problema
- 36.3 μ L de H₂O-DEPC

Cada tubo se introdujo en el termociclador (Eppehdorf, epgradient S) y se inició la PCR mediante una desnaturalización a 95° C durante 5 min. Se realizaron 35 ciclos designados para la reacción con las siguientes condiciones:

- 95° C durante 1 min (desnaturalización)
- 60° C durante 1 min (alineamiento)
- 72° C durante 1 min (elongación)
- 72° C durante 7 min (final de la elongación)
- 4° C ∞

Los productos de PCR se cargaron en geles de agarosa al 2%, preparada con TBE 1X y 1 μ L de bromuro de etidio (10 mg/mL), montados en electroforesis horizontal de 20 pozos en buffer de TBE 1X y utilizando marcadores de DNA de 100 PB. La electroforesis se corrió a

90 Voltios durante 60 min. Las imágenes de los geles se visualizaron y almacenaron en el visualizador de imágenes con software analizador de imágenes (Gel Logic 200 Imaging system Kodak) (Anexo 11.8).

5.14 Análisis estadístico

Las bases de datos se crearon en Excel y el análisis estadístico se realizó utilizando el programa NCSS 2000. Los datos se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar (D.E.). Los datos del peso corporal de las madres y de las crías, ingesta de alimento y curvas de tolerancia a la glucosa se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas. El perfil lipídico de los machos se analizó mediante la prueba “t” de Student. La expresión de receptores, los niveles de hormonas y de 5-HT, y la prueba de resistencia a la insulina se analizaron por ANOVA de dos vías, con las edades y la condición experimental como factores, seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. El nivel de significancia estadística se consideró con una $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Peso corporal de las madres durante la gestación

El desarrollo del modelo de ratas con BPN se obtuvo por desnutrición materna durante los últimos 9 días de gestación. Al inicio y a los 11 días de gestación se puede apreciar que la alimentación *ad libitum* no modificó la ganancia de peso en el grupo R (Tabla 4). Sin embargo, la restricción del 50% de alimento (Tabla 3) que las ratas del grupo R tuvieron a partir del día 12 de gestación modificó la ganancia de peso, disminuyendo significativamente 10.5% con respecto al grupo C ($p<0.05$) (Tabla 4). De esta manera se demuestra que la restricción de alimento en los últimos 9 días de gestación reduce el peso corporal de las madres, confirmándose así un estado de desnutrición materna.

Tabla 3. CONSUMO DE ALIMENTO DURANTE LA GESTACIÓN

Tratamiento	Días de gestación				
	12	13	15	17	19
C	20.1 ± 0.40	29.8 ± 0.55	30 ± 1.41	26.6 ± 1.52	23.8 ± 0.45
R	10	14.8	15	13.30	12

Consumo de alimento(g)/animal/día en el grupo R al 50% respecto al grupo C. Datos expresados con la media ± D.E; n=10 por grupo.

Tabla 4. PESO MATERNO DURANTE LA GESTACIÓN

Periodo	Peso materno (g)	
	Grupo C	Grupo R
Peso al inicio de la gestación (g)	202.4 ± 12.8	205.2 ± 8.7
Peso antes de la restricción calórica	234 ± 4.08	236 ± 3.7
Peso al final de la gestación	339.4 ± 15.4	303.8 ± 8.6 *

Media ± DE; n=10 por grupo. * $p<0.05$ vs. Control. ANOVA de medidas repetidas, Tukey Kramer.

6.2 Seguimiento del peso corporal desde el nacimiento hasta las 28 semanas de edad

El peso corporal de los grupos de estudio se registró desde el nacimiento hasta las 28 semanas de edad. El peso de las crías del grupo BPN se redujo 17.9% con respecto al control, mostrando diferencias significativas ($p<0.05$). En la primera semana posnatal, el peso del grupo BPN se mantuvo por debajo del grupo control, siendo 22.2% menor ($p<0.05$). Estas diferencias de peso entre los grupos desaparecieron en la segunda semana, ya que el peso incrementó 12.5% en el grupo BPN ($p<0.05$), indicando recuperación en el crecimiento. El peso de las ratas del grupo BPN a las 12 semanas de edad, cuando ya estaban siendo alimentadas con la dieta HL, permaneció arriba, incrementándose 22.8 % ($p<0.05$). A las 28 semanas de edad estas discrepancias en el peso se mantuvieron, aumentando 22.3% (Figura 8 y Tabla 5). Asimismo, se puede observar que a las edades de 12 y 28 semanas el grupo BPN presenta un sobrepeso por arriba del 22%, comparado con el grupo control ($p<0.05$). De esta manera se confirmó un estado de obesidad (considerado como un aumento del 20% del peso corporal comparado con el grupo control) en las ratas con BPN.

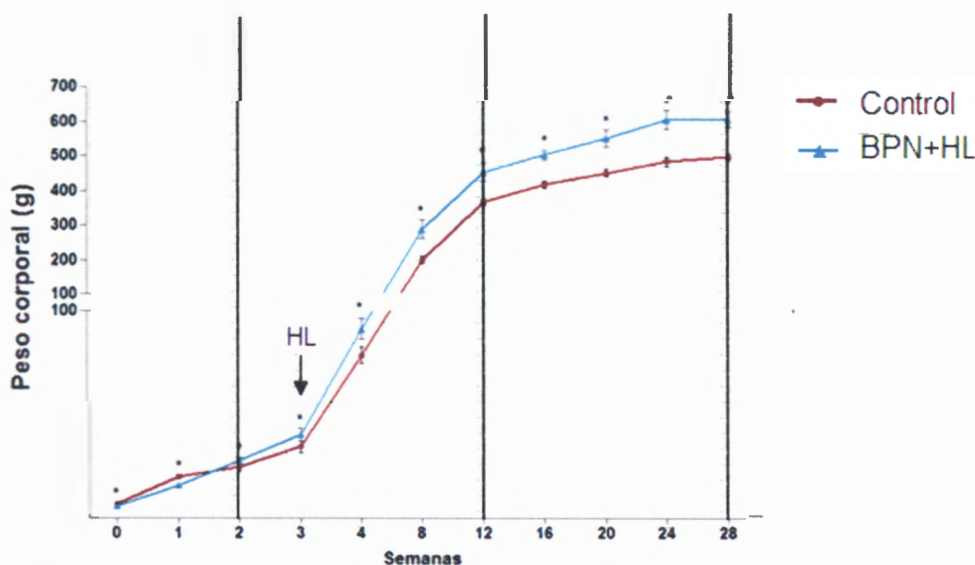


Figura 8. Cambios en el peso corporal en animales con BPN alimentados con dieta HL. Los datos se expresaron con la media $\pm$ D.E. $n=6-10$; * $p<0.05$ vs Control. ANOVA de medidas repetidas, Tukey Kramer.

Tabla 5. CAMBIOS DEL PESO CORPORAL EN PORCIENTO

Edad (semanas)	Grupo	Peso corporal (g)	Diferencia en % Control/tratamiento
Nacimiento	Control	6.7 ± 0.4	
	BPN	5.5 ± 0.4 *	↓ 17.9
1	Control	19.8 ± 1.1	
	BPN	15.4 ± 1.4 *	↓ 22.2
2	Control	24.8 ± 2.3	
	BPN	27.9 ± 1.8 *	↑ 12.5
12	Control	368.9 ± 10.1	
	BPN+HL	453.2 ± 26.4 *	↑ 22.8
28	Control	498 ± 12.6	
	BPN+HL	609.2 ± 28.1 *	↑ 22.3

Media ± DE; n=6-10. * $p < 0.05$ vs. Control. ANOVA de medidas repetidas, Tukey Kramer.

6.3 Ingesta de dieta hiperlipídica después de bajo peso al nacimiento

Después del destete a los 21 días, el grupo control se alimentó con una dieta control y el grupo con BPN se alimentó con una dieta HL. A partir de la semana 4 y hasta las 28 semanas de edad, las ratas alimentadas con la dieta HL consumieron más alimento comparados con las ratas control. Las diferencias en el consumo de alimento/g fueron significativas ($p < 0.05$; Figura 9 y Tabla 6).

Cuando la ingesta de alimento se expresó en términos de calorías consumidas (kilocalorías, kcal), las diferencias significativas fueron evidentes desde la semana 4 y hasta el final del tratamiento. Las diferencias en la ingesta energética por día fueron significativas ($p < 0.05$; Figura 9, Tabla 6). Estos datos reflejan un estado de hiperfagia en las ratas con BPN+HL.

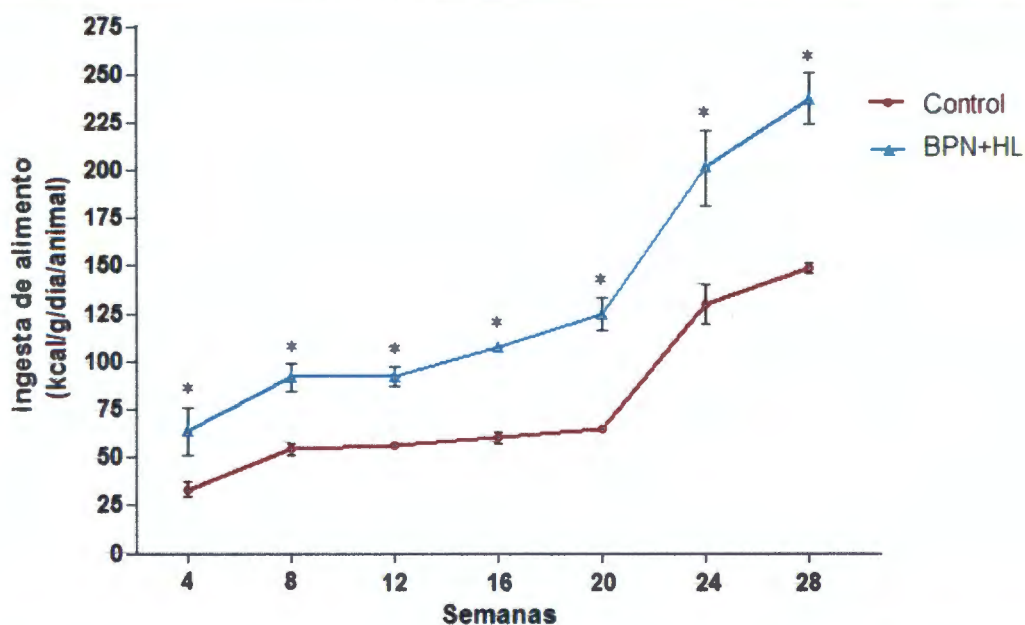


Figura 9. Cambios en la ingesta de alimento en animales con BPN alimentados con dieta HL. Los datos se expresaron con la media $\pm$ D.E. $n=6-10$; * $p<0.05$ vs Control. ANOVA de medidas repetidas, Tukey Kramer.

Tabla 6. INGESTA DE ALIMENTO

Edad (semanas)	Grupo	g/día	kcal/día
4	Control	7.9 $\pm$ 0.9	32.7 $\pm$ 3.5
	BPN+HL	11.8 $\pm$ 1.7 *	62.9 $\pm$ 8.9 *
8	Control	12.4 $\pm$ 0.8	51.7 $\pm$ 3.5
	BPN+HL	17.6 $\pm$ 1.0 *	92.7 $\pm$ 5.5 *
12	Control	13.2 $\pm$ 0.5	54.8 $\pm$ 2.0
	BPN+HL	17.8 $\pm$ 0.8 *	93.8 $\pm$ 4.3 *
16	Control	14.5 $\pm$ 0.7	60.2 $\pm$ 3.0
	BPN+HL	20.5 $\pm$ 0.3 *	107.8 $\pm$ 1.6 *
28	Control	35.9 $\pm$ 0.6	148.92 $\pm$ 2.5 *
	BPN+HL	45.1 $\pm$ 2.6 *	237.26 $\pm$ 13.6 *

Media $\pm$ D.E.; $n=6-10$. * $p<0.05$ vs. Control. ANOVA de medidas repetidas, Tukey Kramer

6.4 Cambios metabólicos de animales con BPN alimentados con HL

Se realizó una química sanguínea en el grupo BPN+HL a las 28 semanas de edad para evaluar si existía dislipidemia o disfunción renal. Se encontró que los niveles de colesterol y triglicéridos aumentaron significativamente ($p<0.05$), 1.5 y 1.8 veces respectivamente con respecto al control. En contraste, los marcadores de disfunción renal no mostraron cambios (Tabla 7).

Tabla 7. CAMBIOS METABÓLICOS EN RATAS DE 28 SEMANAS DE EDAD

Variable (mg/dL)	Control	BPN+HL	<i>p</i>	Valores de referencia (mg/dL) (Mancebo <i>et al.</i> , 2002)
Colesterol	77±13	118±11*	0.05	54.8-102.4
Triglicéridos	121±36	227±65*	0.05	47.3-147.5
HDL	64±11	54±18	0.2	35-85
Urea	42±7	46±13	0.75	17.4-55.8
Creatinina	0.46±0.07	0.58±0.16	0.3	0.46-0.62
Nitrógeno ureico	20±3	21±6	0.8	7.0-25.7

Datos expresados con la media ± D.E; $n=6-10$. * $p<0.05$ vs Control. "t" de Student.

6.5 Concentración de glucosa plasmática

Para evaluar el metabolismo de los carbohidratos en sangre se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en los subgrupos de 12 y 28 semanas de edad, ya que a ambas edades el grupo BPN+HL presentó obesidad. Para este estudio se eligieron los criterios de la ADA, que son compartidos por la OMS y por el grupo de expertos mexicanos en diabetes de la SSA (ECDCDM, 1997; WHO, 1999; SSA, 2000).

A las 12 semanas de edad, los niveles de glucosa entre los dos grupos no fueron significativamente diferentes. Ambos grupos mostraron una respuesta normal a la carga de

glucosa, ya que los valores normales después de 1 hora se consideran por debajo de 200 mg/dL; después de las 2 horas postcarga los niveles de glucosa se consideran normales menores a 140 mg/dL (Figura 10).

A las 28 semanas los niveles basales de glucosa, 1 y 2 horas postcarga en el grupo control fueron de 78.83 ± 7.33 ; 129.83 ± 27.9 y 89 ± 8.55 mg/dL, respectivamente. Estos datos muestran la respuesta normal a la carga de glucosa oral. Sin embargo, en el grupo BPN+HL la glucosa sanguínea basal se encontró en 328.83 ± 34.6 mg/dL y a las 2 horas postcarga en 374.3 ± 79.3 mg/dL. Ambos valores fueron 4.2 veces mayores que los niveles del control ($p < 0.05$). Esta condición de hiperglucemia diagnostica a los animales de este grupo como diabéticos, ya que los niveles de glucosa se encuentran por arriba de 200 mg/dL a lo largo de toda la prueba (Figura 11). Estos datos sugieren que a esta edad el grupo BPN+HL cursa con un estado de resistencia a la insulina.

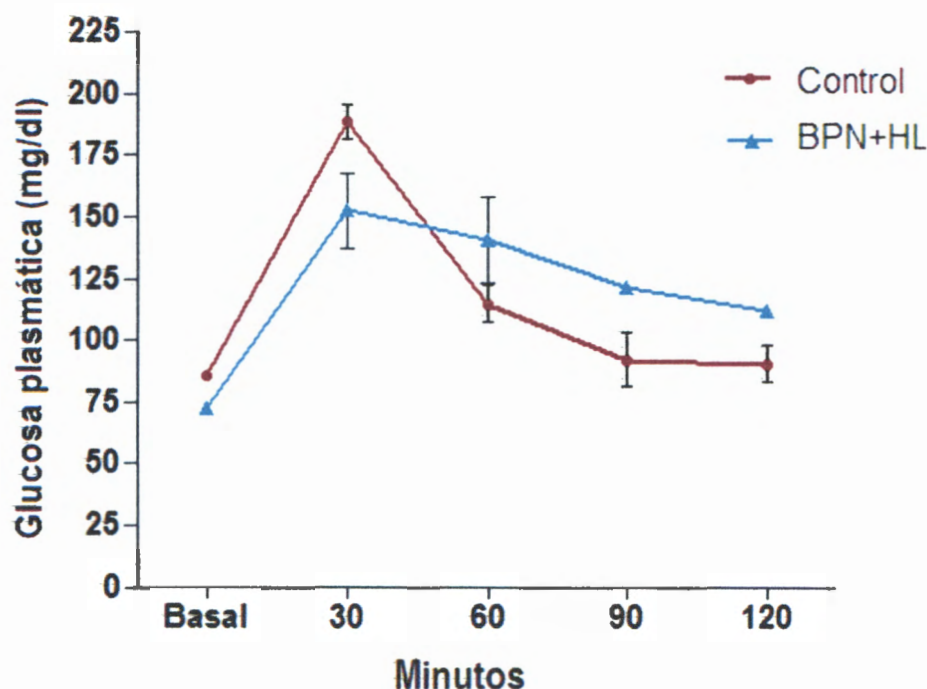


Figura 10. Curva de tolerancia a la glucosa en los grupos control y con BPN+HL (estado de obesidad) a las 12 semanas de edad. Los datos se expresaron con la media $\pm$ D.E. $n=6$. ANOVA de medidas repetidas, Tukey Kramer.

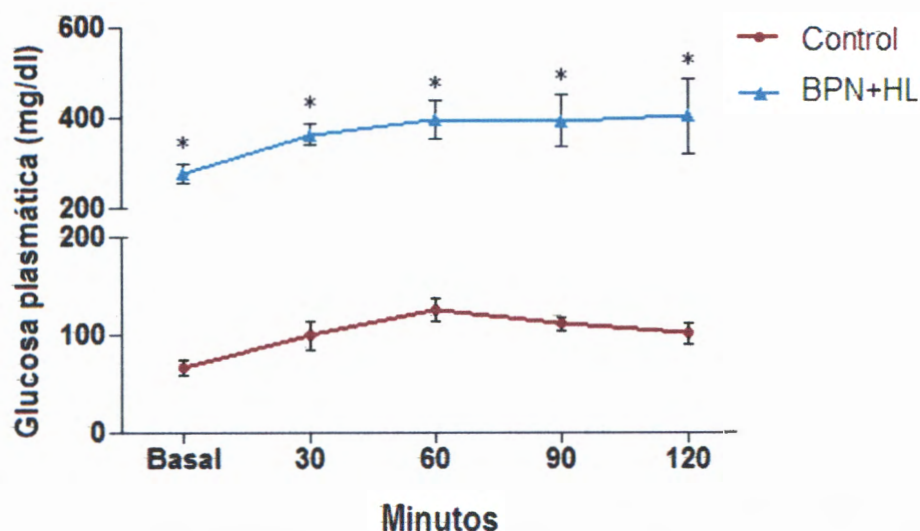


Figura 11. Curva de tolerancia a la glucosa en los grupos control y con BPN+HL (estado diabético) a las 28 semanas de edad. Los datos se expresaron con la media $\pm$ D.E. $n=6$; * $p<0.05$ vs Control. ANOVA de medidas repetidas, Tukey Kramer.

6.6 Niveles de insulina en plasma y evaluación de resistencia a la insulina

A las 2 semanas de edad no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de insulina plasmática (Control 0.269 ± 0.01 vs BPN 0.268 ± 0.02 ng/mL); de forma similar, cuando las ratas se alimentaron con la dieta HL no se modificó el patrón de secreción de insulina, ya que a las 12 y 28 semanas de edad continuaron sin mostrar diferencias significativas en las concentraciones de insulina plasmática (semana 12: Control 0.547 ± 0.17 vs BPN+HL 0.727 ± 0.48 ng/mL; semana 28: Control 1.51 ± 0.7 vs BPN+HL 0.97 ± 0.7 ng/mL).

La Tabla 8 muestra los valores correspondientes a la concentración plasmática de glucosa e insulina en ayuno, tanto del grupo control como de los grupos BPN y BPN+HL. Para evaluar la resistencia a la insulina por medio del HOMA-IR las concentraciones de insulina se expresaron en $\mu\text{U/mL}$.

Tabla 8. GLUCEMIA E INSULINEMIA EN AYUNO DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS

Edad (semanas)	Grupo	Glucemia (mg/dL)	Valor de <i>p</i>	Insulina basal (μU/mL)	Valor de <i>p</i>
2	Control	84.3 ± 1.2		5.93x10 ⁻¹²	
	BPN	91 ± 2.1	NS	5.90x10 ⁻¹²	NS
12	Control	85.5 ± 1.3		1.2x10 ⁻¹¹	
	BPN+HL	72.25 ± 1.25	NS	1.6x10 ⁻¹¹	NS
28	Control	78.83 ± 7.33		3.31x10 ⁻¹¹	
	BPN+HL	328.83 ± 34.6	<0.05	2.13x10 ⁻¹¹	NS

Media ± D.E; n=6-10 **p*<0.05 vs Control. ANOVA de dos vías, Tukey Kramer. NS=no significativo.

Con relación a la concentración de la glucosa plasmática en ayuno, se observa que a la edad de 2 y 12 semanas no hay diferencias significativas. Sin embargo a la edad de 28 semanas si se observan diferencias significativas, tal como se espera encontrar entre un grupo de animales diabéticos, con respecto al control (Control 78.83 ± 7.33 vs BPN+HL 328 ± 34.6; *p*<0.05). Respecto a la concentración de insulina plasmática en ayuno no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos a las 3 edades. En la Figura 12 se observa que el grupo BPN+HL a las 28 semanas de edad muestra valores del HOMA-IR superiores al control (*p*<0.05), siendo 2.7 veces menos sensible al efecto de la insulina, por lo que a esta edad este grupo es resistente a la insulina.

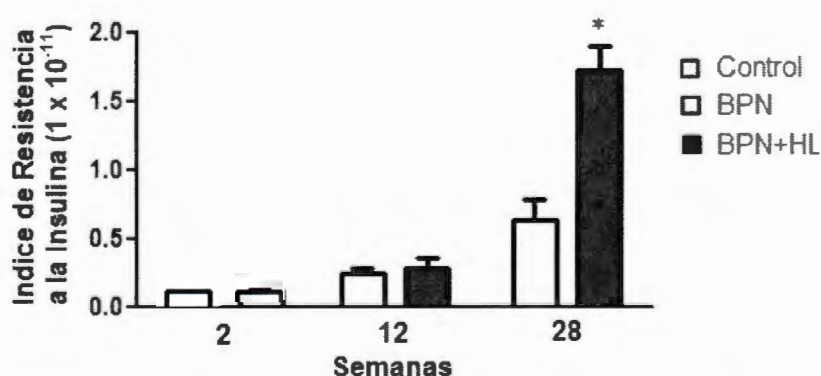


Figura 12. HOMA IR en animales con BPN alimentados a partir de la semana 3 y hasta las 28 semanas con una dieta HL. Los datos se expresaron con la media ± D.E. n=6-10; **p*<0.05 vs Control. ANOVA de dos vías, Tukey Kramer.

6.7 Concentración de grelina plasmática y expresión de los receptores GHSR-1a y Y1 en hipotálamo de ratas con BPN y dieta HL

Las concentraciones de grelina plasmática a las 2 semanas de edad en el grupo control y el grupo BPN no fueron significativamente diferentes (Figura 13B); sin embargo se encontró un aumento en la expresión del receptor GHSR-1a en el grupo BPN ($p<0.05$) (Figura 13A). A las 12 y 28 semanas de edad, las concentraciones plasmáticas de grelina en el grupo BPN+HL no fueron diferentes a las del control (Figura 13B). Sin embargo, los niveles de expresión del receptor GHSR-1a en el grupo BPN+HL disminuyeron a las semanas 12 y 28 de edad, manteniendo niveles similares en ambas edades. A pesar de que los niveles de expresión del receptor disminuyeron a la edad de 12 semanas, éstos no fueron significativos respecto al control de la misma edad. No así a las 28 semanas de edad, ya que en este caso, el grupo control mostró un aumento en la expresión del receptor GHSR-1a, mientras el grupo BPN+HL mantuvo bajo estos valores ($p<0.05$) (Figura 13A).

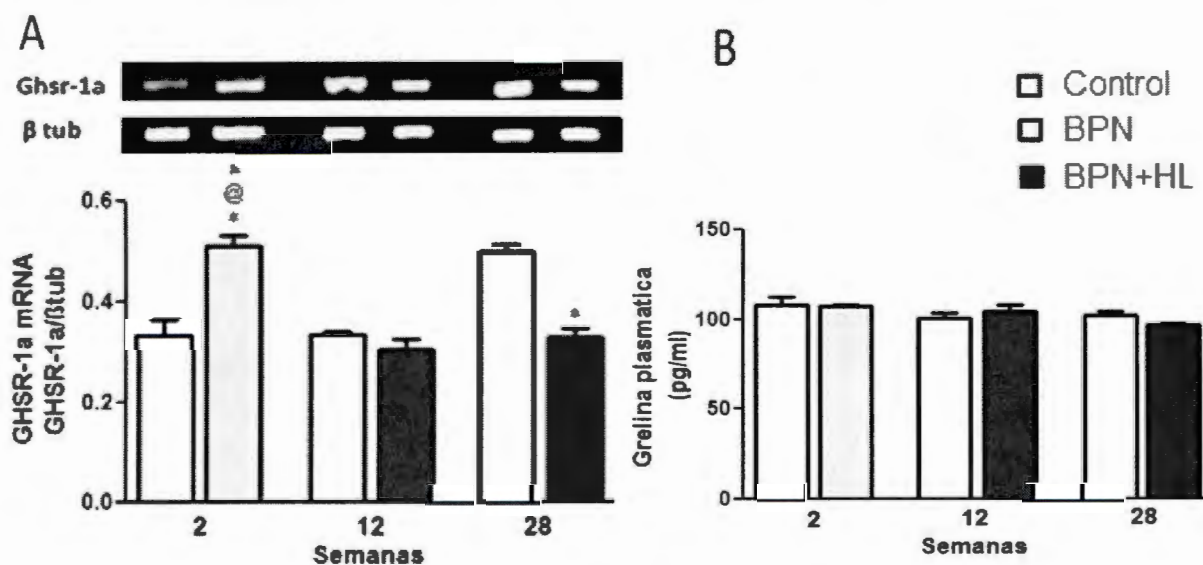


Figura 13. Cambios en la expresión del GHSR-1a y grelina plasmática. A) Expresión del GHSR-1a por RT-PCR y B) Niveles de grelina plasmática. Los datos se expresaron con media $\pm$ D.E. $n=6-10$. * $p<0.05$ vs su respectivo Control; @ $p<0.05$ vs BPN+HL de 12 semanas; # $p<0.05$ vs BPN+HL de 28 semanas. ANOVA de dos vías, Tukey Kramer.

En cuanto a los niveles de expresión del receptor Y1, se encontró que a las 2 semanas de edad su expresión aumentó en el grupo BPN ($p<0.05$). Por el contrario, estas diferencias no se mantienen cuando los animales son alimentados con la dieta HL a las 12 y 28 semanas de edad, ya que disminuyen y se mantienen desde las 12 hasta las 28 semanas. Aunque los niveles de expresión del receptor Y1 tienden a disminuir con la edad y con la dieta, estas diferencias no son significativas comparadas con el control de la misma edad (Figura 14).

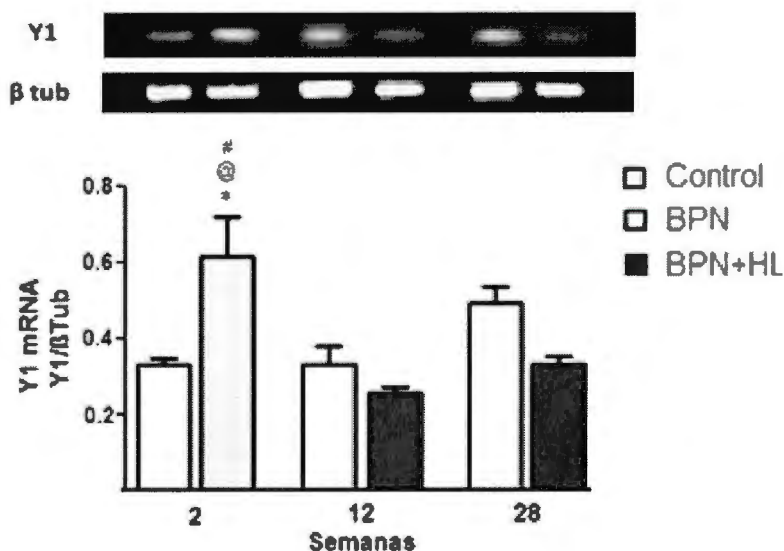


Figura 14. Cambios en la expresión del receptor Y1 por RT-PCR. Los datos se expresaron con media $\pm$ D.E. $n=6-10$. * $p<0.05$ vs su respectivo Control; @ $p<0.05$ vs BPN+HL de 12 semanas; # $p<0.05$ vs BPN+HL de 28 semanas. ANOVA de dos vías, Tukey Kramer.

6.8 Concentración de 5-HT y expresión del mRNA del receptor 5-HT_{1A} en hipotálamo de ratas con BPN y dieta HL

Las concentraciones de 5-HT en hipotálamo de los grupos control y BPN a las 2 semanas no mostraron diferencias significativas (Control 13.41 ± 4.6 vs BPN 9.91 ± 3.77 pg/ μ g de proteína) (Figura 15B). No obstante, a esta edad los niveles de expresión del receptor 5-HT_{1A} aumentaron en el grupo BPN ($p<0.05$) (Figura 15A). A la edad de 12 semanas, el grupo BPN+HL no mostró diferencias significativas en los niveles de 5-HT en hipotálamo

(Figura 15B), pero sí hubo una disminución en la expresión del receptor 5-HT_{1A} en el grupo BPN+HL ($p<0.05$) (Figura 15A). Por otra parte a la edad de 28 semanas, el grupo BPN+HL no mostró diferencias significativas en las concentraciones de 5-HT en hipotálamo (Figura 15B); de forma similar, la expresión del receptor 5-HT_{1A} disminuyó en el grupo BPN+HL ($p<0.05$) (Figura 15A).

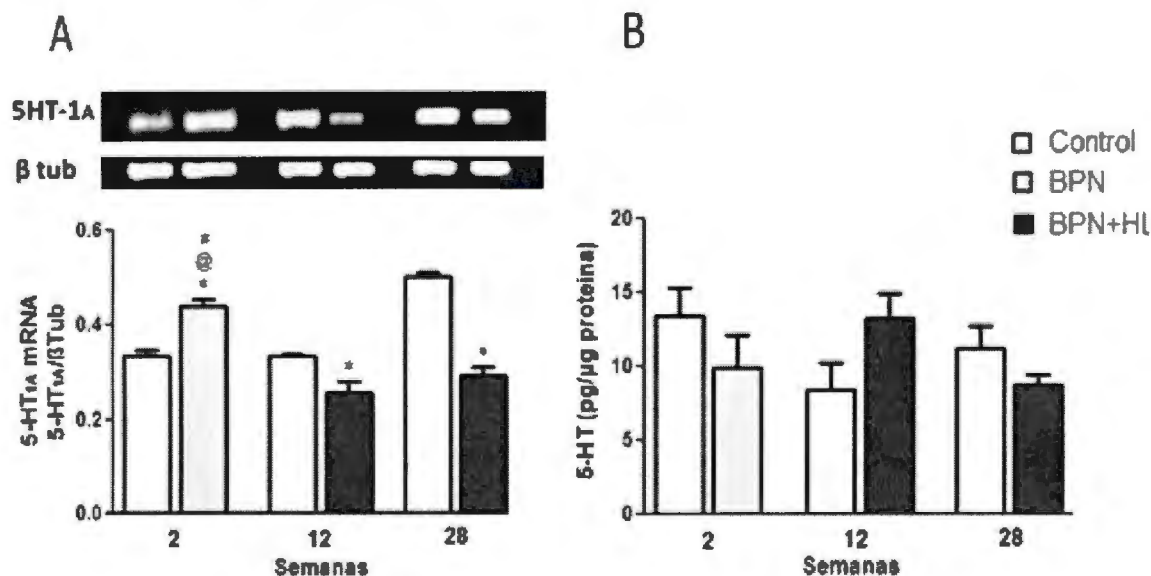


Figura 15. Cambios en la expresión del receptor 5-HT_{1A} y 5-HT en hipotálamo. A) Expresión del receptor 5-HT_{1A} por RT-PCR y B) Niveles de 5-HT en hipotálamo. Los datos se expresaron con media $\pm$ D.E. $n=6-10$. * $p<0.05$ vs su respectivo Control; @ $p<0.05$ vs BPN+HL de 12 semanas; # $p<0.05$ vs BPN+HL de 28 semanas. ANOVA de dos vías, Tukey Kramer.

7. DISCUSIÓN

La DM tipo 2 y la obesidad son enfermedades multifactoriales que frecuentemente coexisten en el mismo individuo y en las que se ha demostrado la presencia de más de un componente genético, común o diferente para ambas. Sin embargo, las condiciones nutricionales inadecuadas favorecen el desarrollo de estas patologías. En las últimas décadas, diversas áreas de investigación han sugerido que los eventos implicados en el desarrollo fetal tienen efectos a largo plazo e influyen en la salud durante la vida adulta (Levitt *et al.*, 2000; Eriksson *et al.*, 2002; Painter *et al.*, 2007). Actualmente se conocen factores ambientales, como la dieta, que pueden influir en la expresión de genes *in utero* y establecer patrones fisiológicos y estructurales relacionados con la supervivencia del individuo. La programación fetal de la diabetes puede darse desde alteraciones permanentes de una o más vías relevantes durante el desarrollo embrionario y perinatal. Algunos de éstos no sólo influyen en el sujeto sino también producen efectos que alteran la programación de generaciones futuras (Hall, 2007).

En este trabajo se utilizó un modelo experimental de diabetes y se evaluó el efecto de la restricción de alimento al 50% en la etapa prenatal (Anguita *et al.*, 1993). Está demostrado que la restricción de nutrientes en la rata, durante los últimos 9 días de gestación conduce al BPN, con la posterior recuperación del crecimiento, y desarrollo de obesidad y DM tipo 2 (Jiménez-Chillaron *et al.*, 2005; Simmons *et al.*, 2001). Por ello que se le considera un modelo experimental adecuado para el estudio de la programación intrauterina implicado en el desarrollo de la DM tipo 2 y los procesos metabólicos tempranos que conducen al desarrollo de la misma.

Los resultados de este trabajo demostraron que la restricción calórica a la que se somete a las hembras a partir de los 12 días de gestación causa disminución de su peso corporal hasta el día del parto. En esta condición, se supone que el feto limita el uso de nutrientes disminuyendo su metabolismo, y reduciendo el ritmo de crecimiento, todo esto como una adaptación a la desnutrición (Zambrano *et al.*, 2006). Los datos de este trabajo muestran

que el consumo de una dieta restringida durante la gestación ocasionó que las crías presentaran un peso corporal al nacimiento significativamente menor que el de las crías control. De esta manera se confirma que la restricción del alimento durante la vida *in utero* lleva al desarrollo del BPN.

Una característica importante del modelo estudiado es la ganancia de peso corporal, que conduce a la recuperación del crecimiento en la vida posnatal temprana (Bieswal *et al.*, 2006). En este trabajo, las crías con BPN y alimentadas con la dieta HL al destete, recuperaron e incluso superaron el peso alcanzado por el grupo control. El aumento acelerado del peso corporal comenzó a las 2 semanas de edad, durante la lactancia, de modo que las crías desnutridas durante la gestación superaron en peso al grupo control a partir del destete (Beltrand *et al.*, 2009). La recuperación del crecimiento a esta edad representó un fenómeno de adaptación modulado por una respuesta fisiológica y el proceso de compensación que siguió después de la deficiencia inducida por el ambiente fetal indicó la trayectoria para restaurar la composición corporal. Estos datos demuestran que el BPN es seguido por un crecimiento acelerado a fin de restablecer el tamaño corporal, los depósitos de grasa y la composición corporal que fueron alterados durante la vida fetal, como ha sido propuesto por Beltrand y colaboradores (2009). Este crecimiento acelerado apareció en la vida temprana y es de larga duración, ya que a partir de la semana 2 y hasta las 28 semanas de edad estuvo presente la mayor ganancia de peso.

La recuperación del crecimiento que presentó el grupo BPN a las 2 semanas de edad puede favorecer la programación de desarrollar obesidad y DM tipo 2 en la vida adulta (Kanaka-Gantenbien, 2010). Este fenómeno varía y es dependiente de la composición de la dieta en la vida posnatal; considerando que este grupo fue alimentado con una dieta HL, se puede deducir que es un grupo con alto riesgo de desarrollar anormalidades metabólicas inducidas por la desnutrición fetal.

En ratas, se ha observado que cuando las madres son sometidas a restricción de alimento al 50% durante las primeras 2 semanas de gestación, y posteriormente sus crías consumen una dieta HL en la vida posnatal, éstas presentan un estado de obesidad a las 6 semanas de edad

(Jones *et al.*, 1984; Anguita *et al.*, 1993). La obesidad en roedores también puede ser programada por el consumo de dietas hipoproteínicas (Bellinger *et al.*, 2004) o hiperproteínicas (Daenzer *et al.*, 2002). Estos datos apoyan la hipótesis de que las alteraciones intrauterinas en la disponibilidad de los nutrientes pueden inducir alteraciones metabólicas en la vida posnatal. Es posible que el desarrollo de alteraciones metabólicas se presenten desde la etapa juvenil, ya que a las 12 y 28 semanas de edad, los grupos BPN+HL se consideraron obesos, puesto que presentaron un aumento de peso mayor del 20% comparado con el grupo control. Estos resultados concuerdan con la recuperación del crecimiento observado en otros estudios en modelos animales (Ozanne *et al.*, 2004; Ozanne y Hales, 2004), lo cual indica que la restricción de nutrientes *in utero* tuvo un efecto importante sobre el crecimiento posnatal. Estos hallazgos sugieren que uno de los efectos de la desnutrición uterina, y que se manifiestan en la etapa neonatal, es la sobrealimentación, misma que puede ser provocada por una desregulación permanente de los principales núcleos hipotalámicos que regulan la ingesta de alimento, el peso corporal y el metabolismo. Sin embargo, los mecanismos de programación fetal que podrían estar alterados y participar en esta sobrealimentación aún se desconocen.

En este estudio se observó que la restricción de calorías durante la gestación, seguida de dieta HL derivó en hiperfagia. El aumento crónico de la ingesta de alimento en el grupo BPN+HL fue significativo desde la semana 4 hasta las 28 semanas de edad, comparado con el grupo control, no expuesto a restricción de calorías *in utero*. Probablemente, los centros neuroendocrinos reguladores de la ingesta de alimento en estas ratas hiperfágicas no controlaron la tasa de ganancia de peso corporal, por lo que aumentaron significativamente la ingesta de alimento, y quizá redujeron la eficiencia en la conversión de su alimento en masa corporal o menor gasto de energía. Esos resultados apoyan la hipótesis de Wells (2007), pues es posible que el grupo con BPN se haya preparado para un medio adverso, adquiriendo adaptaciones para una vida fetal con carencias. Después creció en un medio con abundancia de nutrientes al que no estaba acostumbrado. Sin embargo, las respuestas predictivas adaptativas que desarrollaron no fueron adecuadas y mostraron mala

adaptación, ya que desarrollaron obesidad y diversas alteraciones fisiológicas que influyeron en su desempeño metabólico.

Estudios previos sugieren que el tipo de manipulación de la dieta materna durante la gestación puede dar como resultado diferentes fenotipos, ya sea hipofágico o hiperfágico, cuando las crías son alimentadas con una dieta HL. Se ha reportado que las hembras gestantes alimentadas con una dieta baja en proteínas, tienen crías que presentan hipofagia al ser alimentadas con dieta HL después del destete (Sellayah *et al.*, 2008). Sin embargo, las crías de madres con desnutrición gestacional severa (restricción del 70% de la ingesta normal de alimento) presentan hiperfagia hasta la vida adulta, al ser alimentadas con una dieta HL (Vickers *et al.*, 2000). El mecanismo por el cual la hiperfagia es consecuencia de la programación fetal aún no está claro. Sin embargo, es probable que el aumento del apetito refleje la recuperación del crecimiento, derivada de la programación fetal causada por la desnutrición y que la hiperfagia se produzca como consecuencia del consumo de una dieta HL. Además, el grado de desnutrición, así como el periodo en que se presenta y el tipo de nutriente restringido, ya sea proteínas, iones o calorías, son causa del desarrollo de diversos fenotipos. Se ha observado que la restricción de calorías es más potente que la restricción de proteínas para el desarrollo de la obesidad, sin la administración de la dieta HL. De hecho, los estudios en ratas demuestran que las crías con BPN producto de la restricción nutricional de las madres, presentan crecimiento rápido y aumento de peso en la vida posnatal si se proveen de la nutrición adecuada (Zambrano *et al.*, 2005).

La obesidad que presentó el grupo BPN+HL desencadenó cambios metabólicos, pues a la 12 semanas de edad mostró concentraciones de glucosa plasmática ligeramente mayores que el control durante la prueba de tolerancia a la glucosa. Esto sugiere que, en esta edad, se presentó una alteración en el metabolismo de la glucosa. Asimismo, a la edad de 28 semanas, el grupo BPN+HL presentó, además del aumento en el peso corporal, cambios metabólicos significativos, mostrados por hiperglucemia durante el transcurso de la prueba de tolerancia a la glucosa.

En términos generales, se sabe que la obesidad se caracteriza por hiperinsulinemia basal en ayuno y por una respuesta secretora de insulina durante la curva de tolerancia a la glucosa oral. Por esta razón, se valoró el índice HOMA-IR, el cual es utilizado para determinar la resistencia a la insulina. Los resultados indicaron que el índice HOMA-IR fue superior en el grupo BPN+HL a la edad de 28 semanas, lo que explica que este grupo presentara hiperglucemia durante el transcurso de la prueba. Estos resultados sugieren que la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina está disminuida en este grupo, en comparación con el grupo control de la misma edad. En este caso, el grupo BPN+HL fue 2.7 veces menos sensible al efecto de la insulina. Frente a un estado de obesidad se empieza a gestar un estado de resistencia a la insulina periférica, la cual no puede limitar el flujo de ácidos grasos procedentes del tejido adiposo y que llegan de manera constante al hígado, lo que condiciona la mayor liberación de glucosa hepática. Probablemente los ácidos grasos libres estimulen la liberación de glucosa hepática a través del incremento en la producción de adenosina trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), así como en la actividad de la enzima piruvato carboxilasa inducida por acetil-CoA (Bergman y Mittelman, 1998; Chen *et al.*, 1999).

En la resistencia a la insulina se presenta mayor liberación de AGL hacia el plasma. Al respecto, se ha mencionado que al estar expandido el tejido adiposo la lipólisis estaría facilitada, ya que la lipasa sensible a hormonas (LSH), que es inhibida por la insulina, constituye la etapa limitante de la lipólisis (Van Harmelen *et al.*, 1997). Por otra parte, una situación que acentúa lo anterior y agrava la liberación de ácidos grasos surge a partir de estudios *in vitro* efectuados en pacientes diabéticos; en ellos, la LSH del tejido visceral responde menos a la inhibición por insulina. Lo anterior no se explica por una menor capacidad de unión y fosforilación del receptor de insulina, sino por la disminución en la expresión del IRS-1, lo que empeora la transducción de la señal de la insulina (Zierath *et al.*, 1998).

Estos aspectos fortalecen la relevancia de los ácidos grasos liberados por el compartimento visceral sobre el empeoramiento del metabolismo hepático de la glucosa. La información

que existe actualmente ha permitido postular que este fenómeno de inhibición, ocasionado por el incremento de los ácidos grasos, sería disparado por los diacilglicéridos citosólicos (Newton, 1997). El mecanismo plantea que éstos serían capaces de estimular una Proteína Cinasa C "*novel*" (PK-C 0) altamente expresada en músculo esquelético (De Fea y Roth, 1997; Griffin *et al.*, 1999). Uno de los sustratos de esta enzima es IRS-1, al que fosforila en residuos de serina en lugar de tirosina, como ocurre en condiciones fisiológicas. Al actuar enzimas serina-cinasa sobre estos sustratos, la actividad de ellos se reduce, situación que empeora la captación de glucosa por el músculo esquelético.

La resistencia a la insulina es determinante para el diagnóstico de la DM tipo 2 (DeFronzo, 1997; Randle *et al.*, 1963); esto fue demostrado en el grupo BPN+HL, que presentó diabetes a la edad de 28 semanas. Estos resultados concuerdan con otros trabajos realizados en animales que fueron alimentados con dieta HL y que desarrollaron obesidad y resistencia a la insulina (Bieswal *et al.*, 2006).

Al igual que en otras alteraciones, la resistencia a la insulina depende de la manipulación de las condiciones de alimentación intrauterina (Bieswal, 2006). Los animales con restricción de calorías en la vida intrauterina presentan mayor resistencia a la insulina, lo que demuestra su asociación con la obesidad. Sin embargo, es probable que estos resultados dependan de la composición de la dieta.

Otros estudios han demostrado que ratas alimentadas con una dieta HL después del destete, suprimen la aparición de enzimas lipogénicas, lo que lleva a la alteración de la sensibilidad a la insulina (Issad *et al.*, 1988). Además, los lípidos tienen un poder saciante menor que los otros macronutrientes (proteínas y carbohidratos) (Blundell *et al.*, 1996). Se sabe que la dieta a base de lípidos va seguida de una ingesta mayor, en comparación con las dietas a base de carbohidratos (Blundell *et al.*, 1993; Alfenas y Mattes, 2003). La absorción intestinal de lípidos estimula la producción en el intestino delgado y en el ARC de apolipoproteína A-IV (apo A-IV), una glucoproteína que podría estar implicada en la inhibición central de la ingesta de alimento. El consumo crónico de una dieta HL reduce la

respuesta de la apo A-IV a los lípidos, lo que podría explicar en parte por qué este tipo de dietas predisponen a la hiperfagia y la obesidad (Liu *et al.*, 2001; Tso *et al.*, 2001).

En humanos obesos existe una tasa elevada de lipólisis, la cual provoca el aumento en la liberación de AGL al sistema portal, frente a los cuales el SNC ajusta la ingesta para restablecer el tamaño de los depósitos grasos. Diversas hormonas interactúan en este sistema, por lo que en este trabajo se estudió la grelina e insulina como “señales de adiposidad” para el control central y a largo plazo del peso corporal. Los cambios en los niveles plasmáticos de insulina reflejarían cambios en el estado energético y de adiposidad.

Por otra parte, existen reportes contradictorios sobre el desarrollo de la hiperfagia después de la desnutrición fetal (Vickers *et al.*, 2000; Desai *et al.*, 2005.; Dahri *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1984). El periodo posnatal temprano ha sido identificado como la etapa crítica del desarrollo de núcleos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta de alimento, del peso corporal y del metabolismo (Bouret *et al.*, 2004; Bouret y Simerly, 2004). De hecho, se ha postulado que la sobrealimentación induce alteración permanente en los centros hipotalámicos que regulan la ingesta de alimento (Plagemann *et al.*, 2000; Cripps *et al.*, 2005). Debido a estas observaciones, este trabajo se enfocó en el estudio del efecto del BPN más la influencia de la dieta HL en las posibles alteraciones de grelina y NPY a nivel periférico, así como 5-HT a nivel del SNC, provocadas por la desnutrición intrauterina. Asimismo, se avaluó el nivel de expresión de los receptores GHSR-1a, Y1 y 5-HT_{1A} en el hipotálamo.

Se ha sugerido que la grelina regula el comportamiento alimenticio, particularmente en el desencadenamiento del inicio de la ingesta. Sus efectos orexigénicos parecen estar mediados, al menos en parte, por la estimulación de las neuronas NPY/AgRP en el hipotálamo, de manera opuesta y competitiva con la leptina. La grelina ejerce su efecto a través del receptor GHSR-1a en el hipotálamo (Torsello *et al.*, 2000). Se sabe que la existencia de cambios relevantes en los niveles plasmáticos de grelina se relacionan con la ingesta de alimento, por medio de la regulación de mecanismos centrales relacionados con

el apetito (Asakawa *et al.*, 2001); por ello, la grelina se ha propuesto como una hormona importante que regula el balance energético (Bagnasco *et al.*, 2002; Kalra *et al.*, 2003).

Los resultados de este trabajo muestran que, contrario al incremento esperado, los niveles plasmáticos de grelina no se modificaron en el grupo BPN a la edad de 2 semanas. Sin embargo, la expresión del receptor GHSR-1a en el hipotálamo sí se incrementó. Es posible que la recuperación en el peso de las crías con BPN a las 2 semanas de edad haya sido debido a una mayor ingesta de leche materna. Aunque no se midió la cantidad de alimento consumido a esa edad, es probable que consumieran más leche que las crías control. Esto podría explicarse por un aumento en la señal de la grelina por efecto del incremento en el número de sus receptores.

Por otra parte, el grupo BPN+HL a las 12 semanas de edad, además de presentar hiperfagia, desarrollaron obesidad, y a las 28 semanas manifestaron obesidad y DM tipo 2. Contrario a lo esperado, las concentraciones de grelina plasmática no se modificaron en el grupo experimental, comparado con el grupo control. En este caso, ni la desnutrición uterina ni la alimentación con la dieta HL modificó el patrón de secreción de grelina ante el aumento de peso, la hiperfagia y la presencia de DM tipo 2. Se ha demostrado que los niveles plasmáticos de grelina están alterados, tanto en pacientes obesos como diabéticos, así como en personas que han presentado una importante pérdida de peso corporal (Tschöp *et al.*, 2001). Sin embargo, existen evidencias de que la expresión de grelina en el estómago disminuye en respuesta a una dieta hiperlipídica (Moesgaard *et al.*, 2004), lo que comprueba que existe una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de grelina y el porcentaje de grasa o peso corporal. En el presente trabajo, si bien no se observó disminución en la concentración plasmática de grelina, sí se observó disminución en la expresión del receptor GHSR-1a en el hipotálamo a las 28 semanas de edad. Esto podría ser debido a la ingesta de la dieta HL.

Los resultados obtenidos en los niveles de grelina en este trabajo son similares a lo reportado por otros autores, quienes han encontrado que las concentraciones plasmáticas de grelina no difieren entre el grupo de ratas tratadas con dieta HL por 6 meses y el grupo

control, alimentado con una dieta normal en el contenido de grasas. Esto a pesar de que las ratas del grupo alimentado con la dieta HL presentaron tanto aumento de peso como hiperfagia (Priego *et al.*, 2009).

Un aspecto que debe ser considerado en este sentido son las hormonas sexuales, pues se ha observado que las hembras alimentadas con dieta HL presentan niveles mayores de grelina plasmática comparadas con los machos alimentados con la misma dieta. En este estudio se trabajó con ratas macho. Es posible que estas diferencias se deban a que las células X/A en las glándulas oxínticas del estómago expresan el receptor α de estrógenos, y los estrógenos en el estómago estimulan directamente la expresión y producción de grelina en la rata (Zhao y Sakai, 2008). Estas diferencias en los niveles de grelina se han descrito previamente en humanos, donde las mujeres presentan niveles significativamente más elevados de grelina circulante en comparación con los hombres (Greenman *et al.*, 2004).

Evidencias recientes muestran que la grelina, además de ejercer un efecto sobre la conducta alimenticia, también juega un papel en la fisiopatología de la obesidad y DM tipo 2. Debido a que la insulina es un inhibidor potente de la secreción de grelina, niveles bajos de grelina plasmática se han asociado con niveles elevados de insulina en ayuno y resistencia a la insulina (Lippl *et al.*, 2004; Kamegai *et al.*, 2004), esta última condición se observó en el grupo BPN+HL a las 28 semanas de edad. Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo en relación a las concentraciones de insulina y grelina no concuerdan del todo con los datos de la bibliografía, pues no se observó aumento de insulina, aunque sí una leve tendencia a la disminución en la grelina en las ratas BPN+HL. Además, al existir resistencia a la insulina en el grupo BPN+HL a las 28 semanas de edad se suprimió la glucogénesis hepática, por lo que posiblemente la grelina contribuyó a la sobre regulación de la gluconeogénesis. Se ha propuesto que la gluconeogénesis se debe a la reducción de la activación de una proteína cinasa B, también conocida como AKT (AKT/PKB) y aumento de la expresión del coactivador 1 alfa del receptor gama activado por proliferadores peroxisomales (PGC-1 α), el cual funciona como un regulador central de la gluconeogénesis uniéndose a varios factores, antes del proceso de varios genes que codifican enzimas

gluconeogénicas (Yoon *et al.*, 2001; Puigserver *et al.*, 2003), lo que exacerbó la hiperglucemia.

Se ha propuesto que el bloqueo de la acción de la grelina en los islotes pancreáticos aumenta la liberación de insulina inducida por glucosa y mejora la condición diabética, debido a que del 30 al 40% de los pacientes no controlados adecuadamente requieren de inyecciones subcutáneas de insulina para alcanzar la normoglucemia. Esto se debe a que la grelina y el GHSR-1a se expresan en el páncreas, y ejercen su función de forma elemental en el metabolismo de la glucosa y liberación de la insulina. Diversos trabajos han mostrado que tanto la grelina endógena como exógena suprime la liberación de insulina inducida por glucosa (Dezaki *et al.*, 2004; Dezaki *et al.*, 2006; Esler *et al.*, 2007; Dezaki *et al.*, 2008). Además, en los humanos la alteración del metabolismo glucídico y lipídico puede conducir a una amplia variedad de trastornos macro y microvasculares (Ohkubo *et al.*, 1995), donde la hiperlipidemia representa un factor de riesgo para estas complicaciones. En este trabajo se demostró que el grupo BPN+HL a las 28 semanas de edad, no solamente tiene alterado el metabolismo de la glucosa, sino que también presenta hiperlipidemia.

La obesidad y la DM tipo 2 del grupo BPN+HL a la edad de 28 semanas compartió varias características con la obesidad en los humanos, tales como hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Esto lo convierte en un modelo que representa más claramente los cambios fisiológicos en respuesta a la dieta, observados en la obesidad humana, que en los modelos animales genéticamente obesos (Moraes *et al.*, 2003). En este sentido, la grelina juega un papel importante, ya que activa a neuronas AgRP en el ARC para antagonizar MC4R. La inhibición de la señalización de MC4R reduce la expresión hepática del receptor scavenger clase B tipo 1 (SR-B1), disminuyendo la captación del colesterol asociado a HDL y por lo tanto aumenta su concentración en circulación (Tung y Yeo, 2010). Así, la hiperinsulinemia se correlaciona negativamente con el HDL y positivamente con el colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la proporción colesterol/HDL. Lo anterior sugiere que el feto con restricción de nutrientes y una sobrealimentación después del nacimiento puede aumentar el riesgo de desarrollar obesidad, dislipidemias y DM tipo 2 en la vida adulta.

Por otra parte, en el grupo BPN+HL a la edad de 28 semanas no se observaron alteradas las concentraciones de urea, creatinina y nitrógeno ureico, por lo que, hasta este momento, podemos deducir que no existieron complicaciones renales propias de daño microvascular. Además, los cambios en el receptor hipotalámico de grelina con respecto a la edad y diabetes son desconocidos. En el grupo BPN el mayor nivel de expresión del GHSR-1a se observó a la edad de 2 semanas. Esto coincidió con la recuperación del crecimiento dado por el peso corporal en esta edad, función relacionada con la grelina, a pesar de que a nivel plasmático las concentraciones de dicha hormona no se modificaron. A la edad de 28 semanas disminuyó la expresión del GHSR-1a, por lo tanto, se sugiere que la expresión del GHSR-1a en el hipotálamo se relaciona de manera inversa con la obesidad. La expresión del GHSR-1a puede ser un blanco farmacológico en el tratamiento de la DM tipo2, ya que se ha propuesto que los antagonistas de dicho receptor disminuyen las concentraciones plasmáticas de glucosa en el ayuno y mejoran la tolerancia a la glucosa, lo que promueve la liberación de insulina y aumento de sensibilidad a la misma (Dezaki *et al.*, 2006; Esler *et al.*, 2007). Este receptor probablemente se encuentre sobre expresado a nivel del páncreas e hígado y no en el hipotálamo.

Por otra parte, el NPY se ha identificado como un potente agente orexigénico sintetizado por las neuronas del ARC. La concentración plasmática de NPY en humanos varía desde 0.25 hasta 129 pmol/L (Corder y Lowry, 1985; Grouzmann *et al.*, 1989). Igualmente, la medición de la concentración de NPY en la rata varía en la literatura desde 25 hasta 3000 pmol/L. Probablemente porque el NPY no sólo ejerce su efecto en el hipotálamo, sino también en el sistema nervioso periférico, debido a sus diversas acciones biológicas, en las que se incluye la regulación cardiovascular, cognición, estrés, modulación del sistema neuroendocrino y regulación del apetito, por lo que podría modular diversas acciones biológicas a través de sus diferentes receptores.

Hasta la fecha no existen estudios que demuestren el patrón de secreción de NPY a las 2 semanas de edad. En el presente trabajo no se midieron las concentraciones del NPY en plasma, sin embargo, se esperaría que los niveles de NPY en hipotálamo se elevaran a las 2 semanas de edad en las crías del grupo con BPN, ya que desde la vida posnatal temprana

aumentaron su peso corporal. De forma similar, se esperaría que el nivel de expresión del NPY en el hipotálamo aumentara a las 12 y 28 semanas de edad en el grupo BPN+HL, ya que se sabe que el NPY obstaculiza la capacidad de la insulina para suprimir la producción de glucosa endógena a través de inervaciones eferentes simpáticas provenientes del PVN hacia el hígado (Kalsbeek *et al.*, 2004), disminuyendo la sensibilidad a la insulina hepática (Singhal *et al.*, 2007; Marks y Waite, 1997) y la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (van den Hoek *et al.*, 2004), situación que se hace evidente en el grupo BPN+HL a las 28 semanas de edad, ya que presentan hiperglucemia, resistencia a la insulina y alteración en el metabolismo de lípidos. Sin embargo, existen estudios en los que no se han encontrado diferencias significativas en las concentraciones de NPY en plasma de ratas alimentadas con dieta HL comparadas con el control (Wang *et al.*, 2007). Esto sugiere que los niveles de NPY en plasma a nivel periférico no son sensibles a los cambios nutricionales ni a la ingesta de alimento. Asimismo, se ha reportado que dietas HL, altas en grasas saturadas, producen sobre regulación en la expresión del NPY en comparación con dietas HL altas en grasas insaturadas, o bien, con dietas equilibradas (Huang *et al.*, 2004).

En este trabajo, se observó que la expresión de receptor Y1 fue mayor en la edad de 2 semanas, momento en que se manifestó la recuperación del peso corporal sin influencia de la dieta HL. Por el contrario, se encontró que la expresión de este receptor disminuyó significativamente a las 12 y 28 semanas de edad en el grupo BPN+HL. Esta disminución podría ser el resultado de una regulación negativa en caso de que los niveles de NPY se encontraran elevados a las 12 y 28 semanas de edad. Esto sugeriría que la programación temprana de la ganancia de peso corporal y de la hiperfagia es consecuencia de la regulación alterada de la ingesta de alimento. Estas alteraciones se pueden atribuir a cambios en los niveles de expresión del receptor Y1 hipotalámico involucrado en la regulación del gasto energético, potenciado por la ingesta de la dieta HL observada en la edad adulta, lo que podría significar que la disminución en la expresión del receptor Y1 está asociada a la inducción de obesidad y diabetes. De ser cierta esta hipótesis, y debido a que el nivel de expresión del receptor Y1 aumentó significativamente a la edad de 2 semanas en el grupo BPN, podríamos suponer que su efecto podría representar la capacidad

que tienen las crías a aumentar su peso corporal, dado por la posible hiperfagia que pudieron haber presentado estos animales y como consecuencia de la programación intrauterina.

Con respecto a la 5-HT, se sabe que éste es un neurotransmisor que contribuye a la regulación del apetito. Diversas observaciones sugieren que la 5-HT puede estar involucrada en el control de la ingesta de alimento como una señal de saciedad (Lawton *et al.*, 1995). En el grupo BPN, los niveles de 5-HT tendieron a ser menores que en el grupo control a las 2 semanas de edad. Esta disminución en los niveles de 5-HT podría estar relacionada con la recuperación del crecimiento que se observó en este grupo, favoreciendo la ingesta de alimento a esta edad. La disminución en el nivel de 5-HT se acompañó del aumento en la expresión del receptor 5-HT_{1A}, el cual es uno de los subtipos de receptores serotoninérgicos que está relacionado con el control de la ingesta de alimento (De Vry y Schreiber, 2000; Drevets *et al.*, 1999; Goodnick *et al.*, 1995). El aumento en la expresión del receptor 5-HT_{1A} puede interpretarse también como parte de las alteraciones en los mecanismos de control de la ingesta de alimento, inducidas por el BPN.

Existen estudios que indican que la estimulación de los receptores 5-HT_{1A} somatodendríticos inhibe el disparo en neuronas serotoninérgicas, disminuyendo así la liberación de 5-HT. Estas diferencias entre ambos grupos de animales puede deberse a la programación *in utero* reportada por varios estudios. Por lo tanto, se puede relacionar un nivel menor de 5-HT con un aumento en la expresión de receptor 5-HT_{1A}. Asimismo, a las 12 semanas de edad la expresión del receptor 5-HT_{1A} del grupo BPN+HL disminuyó con respecto al control. Esto puede deberse a que, en esta edad, el control de la ingesta de alimento ya está alterado debido a que los receptores serotoninérgicos hipotalámicos no responden de manera adecuada a la 5-HT, al encontrarse disminuida su expresión. De esta forma, se puede entender el por qué a las 12 semanas los animales del grupo BPN+HL ya presentan tanto hiperfagia como obesidad, pues la 5-HT no puede inhibir la ingesta de alimento en un estado de obesidad ya desarrollado. En cuanto a la edad de 28 semanas, la presencia de alteraciones metabólicas e hiperglucemia son concordantes con la disminución, tanto de la concentración de 5-HT como de la expresión del receptor 5-HT_{1A}

hipotalámico. Se sabe que la 5-HT regula la ingesta de alimento a través de la inhibición de la expresión del NPY, disminuyendo así el hambre (Halford y Blundell, 2000); sin embargo, al estar disminuida la 5-HT no puede ejercer su efecto anorexigénico, contribuyendo así a la hiperfagia con la consecuente obesidad. Además, la disminución de la 5-HT contribuye a la reducción en la secreción de insulina, lo que provocó hiperglucemia. Esto sugiere que la 5-HT y su receptor 5-HT_{1A} están relacionados con la pérdida de la regulación de la ingesta de alimento, lo cual lleva a las alteraciones metabólicas observadas en este trabajo por efecto de la programación fetal por restricción del alimento. Estos resultados son congruentes con lo reportado en otro estudio en el que se observó que la ingesta de glucosa está relacionada con una menor respuesta a la 5-HT en el hipotálamo de ratas obesas, comparada con ratas de peso normal.

La disminución observada en los niveles de 5-HT a las 28 semanas de edad en las ratas con BPN+HL, es similar a lo reportado por Sandrini *et al.*, (1997), quienes asocian la diabetes con la disminución en la concentración de 5-HT en el cerebro de la rata. Asimismo, se ha reportado que en un estado patológico como la diabetes, los niveles de expresión del receptor 5-HT_{1A} se encuentran disminuidos, como se observó en este estudio.

Es importante enfatizar que en este estudio se evaluaron los receptores 5-HT_{1A} hipotalámicos, los cuales son postsinápticos. Por lo tanto, al disminuir su expresión a las 12 y 28 semanas de edad, es probable que la 5-HT no pueda ejercer su efecto anorexigénico en el hipotálamo. Este mecanismo, aunado a las alteraciones en los receptores de grelina y NPY, podrían contribuir, tanto a la hiperfagia desde etapas tempranas del desarrollo en individuos con BPN, como el desencadenamiento de la DM tipo 2 observada en los animales con BPN+HL en etapa adulta.

8. CONCLUSIONES

1. La interacción entre la desnutrición fetal y los factores posnatales, tales como el bajo peso al nacimiento, recuperación en el crecimiento y el consumo de la dieta hiperlipídica, representan factores de riesgo potenciales para el desarrollo de obesidad y DM tipo 2 en la vida adulta.
2. La lactancia es un periodo crítico para la programación de desórdenes metabólicos, ya que la recuperación en el crecimiento, que ocurre a la segunda semana de edad posnatal, después de la desnutrición fetal, favorece la hiperfagia en ratas con bajo peso al nacimiento, promoviendo a esta edad la ganancia de peso corporal y probablemente la programación de la obesidad y DM tipo 2 en la vida adulta.
3. La desnutrición fetal y la alimentación con dieta HL no modifican significativamente el patrón de secreción de grelina por el estómago ni la síntesis de 5-HT en el hipotálamo ante el aumento de peso, hiperfagia, obesidad y la presencia de DM tipo 2. Probablemente estos efectos están dados por la regulación de numerosos péptidos orexigénicos y neurotransmisores y por su interacción a nivel central.
4. La programación fetal causada por la desnutrición materna induce, a las dos semanas de edad, aumento en la expresión de los receptores GHSR-1a, 5-HT_{1A} y Y1, en un estado de recuperación del crecimiento. Este patrón de expresión desaparece en estados patológicos tales como obesidad y DM tipo 2 (12 y 28 semanas de edad en la rata), en cuyos casos su expresión está disminuida.
5. La desnutrición durante el desarrollo fetal y el consumo de una dieta hiperlipídica desde etapas tempranas de la vida, llevan a cambios desfavorables en los niveles de insulina, así como a la expresión desregulada dependiente de la edad de receptores y neurotransmisores relacionados con el balance energético, además de cambios en las concentraciones de lípidos. Estos cambios observados predisponen a un organismo a desarrollar obesidad y DM tipo 2 en la vida adulta.

9. REFERENCIAS

- ADA. (2004). American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 27(1): S5-S10
- ADA. (2008). American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 31(1):S55-S60.
- Alfenas RC, Mattes RD. (2003). Effect of fat sources on satiety. *Obes Res* 11(2):183-187.
- American Veterinary Medical Association. (2001). AVMA Guidelines for Complementary and Alternative Veterinary Medicine. *J Am Vet Med Assoc* 218(11):1731.
- Anguita RM, Sigulem DM, Sawaya AL. (1993). Intrauterine food restriction is associated with obesity in young rats. *J Nutr* 123(8):1421-1428.
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N. (2001). Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120(2):337-345.
- Bagnasco M, Kalra PS, Kalra SP. (2002). Ghrelin and leptin pulse discharge in fed and fasted rats. *Endocrinology* 143(2):726-729.
- Banas SM, Rouch C, Kassis N, Markaki EM, Gerozissis K. (2009). A dietary fat excess alters metabolic and neuroendocrine responses before the onset of metabolic diseases. *Cell Mol Neurobiol* 29(2):157-168.
- Barker DJP, Ball AR, Osmond C, Simonds SJ. (1990). Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 301(6746):259-262.
- Barker DJP, Hales CN, Fall CHD, Osmond C, Phipps K, Clark PM. (1993). Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36(1):62-67.

- Barker DJP**, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. (1989). Growth *in utero*, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298(6673):564-567.
- Beck B**, Stricker-Krongrad A, Nicolas JP, Burlet C. (1992). Chronic and continuous intracerebroventricular infusion of neuropeptide Y in Long-Evans rats mimics the feeding behaviour of obese Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16(4):295-302.
- Bellinger L**, Lilley C, Langley-Evans SC. (2004). Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. *Br J Nutr* 92(3):513-520.
- Beltrand J**, Nicolescu R, Kaguelidou F, Verkauskiene R, Sibony O, Chevenne D, Claris O, Lévy-Marchal C. (2009). Catch-up growth following fetal growth restriction promotes rapid restoration of fat mass but without metabolic consequences at one year of age. *PLoS One* 4(4):e5343.
- Bergman RN**, Mittelman SD. (1998). Central role of the adipocyte in insulin resistance. *J Bas Clin Phys Pharm* 9(2-4):205-221.
- Bernardis LL**, Bellinger LL. (1996). The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 20(2):189-287.
- Bieswal F**, Ahn MT, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, Remacle C. (2006). The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity* 14(8):1330-1343.
- Bivens CLM**, Thomas WJ, Stanley GB. (1998). Similar feeding patterns are induced by perifornical neuropeptide Y injection and by food deprivation. *Brain Res* 782(1-2):271-280.
- Blomqvist AG**, Herzog H. (1997). Y-receptor subtypes—how many more? *Trends Neurosci* 20(7):294-298.
- Blundell JE**, Burley VJ, Cotton JR, Lawton CL. (1993). Dietary fat and the control of energy intake: evaluating the effects of fat on meal size and postmeal satiety. *Am J Clin Nutr* 57(5 Suppl):772S-777S.

- Blundell JE**, Lawton CL, Cotton JR, Macdiarmid JI. (1996). Control of human appetite: implications for the intake of dietary fat. *Annu Rev Nutr* 16:285-319.
- Blundell JE**, Lawton CL, Halford JC. (1995). Serotonin, eating behavior, and fat intake. *Obes Res* 3(4 Suppl):471S-476S.
- Bouret SG**, Draper SJ, Simerly RB. (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304(5667):108-110.
- Bouret SG**, Simerly RB. (2004). Minireview: leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology* 145(6):2621-2626.
- Bray GA**. (2000). Afferent signals regulating food intake. *Proc Natur Soc* 59(3):373-384.
- Burdyga G**, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ. (2006). Ghrelin receptors in rat and human nodose ganglia: putative role in regulating CB-1 and MCH receptor abundance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(6):G1289-G1297.
- Charmandari E**, Tsigos C, Chousos G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 67:259-284.
- Chen X**, Iqbal N, Boden G. (1999). The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. *J Clin Invest* 103(3):365-372.
- Chomczynski P**, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-159.
- Chomczynski P**. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15(3):532-537.
- Clark JT**, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115(1):427-429.

- Coppola JD**, Horwitz BA, Hamilton J, McDonald RB. (2004). Expression of NPY Y1 and Y5 receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus of aged Fischer 344 rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(1):R69-R75.
- Corder R**, Lowry PJ. (1985). An immunoradiometric assay for the measurement of neuropeptide Y in plasma. *Peptides* 6(6):1195-1200.
- Cripps RL**, Martin-Gronert MS, Ozanne SE. (2005). Fetal and perinatal programming of appetite. *Clin Sci* 109(1):1-11.
- Cummings DE**, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50(8):1714-1719.
- Cummings DE**, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP. (2002). Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 346(21):1623-1630.
- Currie PJ**, Mirza A, Flud R, Park D, Vasselli JR. (2005). Ghrelin is an anorexigenic and metabolic signaling peptide in the arcuate and paraventricular nuclei. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289(2):R353-R358.
- Daenzer M**, Ortmann S, Klaus S, Metges CC. (2002). Prenatal high protein exposure decreases energy expenditure and increases adiposity in young rats. *J Nutr* 132(2):142-144.
- Dahri S**, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, Hoet JJ. (1991). Islet function in offspring of mothers on low protein diet during gestation. *Diabetes* 40(Suppl 2):115-120.
- De Fea K**, Roth RA. (1997). Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry* 36(42):12939-12947.
- De Vry J**, Schreiber R. (2000). Effects of selected serotonin 5-HT(1) and 5-HT(2) receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. *Neurosci Biobehav Rev* 24(3):341-353.

- DeFronzo RA**, Bonadonna RC, Ferrannini E. (1992). Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 15(3):318-368.
- DeFronzo RA**. (1997). Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for indentifying diabetes genes. *Diabetes reviews* 5:177-269.
- DeFronzo RA**. (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 88(4):787-835.
- Dennis K**, Uittenbogaard M, Chiaramello A, Moody SA. (2002). Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat neuron-specific Class III beta-tubulin gen. *Gene* 294(1-2):269-277.
- Desai M**, Gayle D, Babu J, Ross MG. (2005). Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(1):R91-R96.
- Dezaki K**, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, Yada T. (2004). Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in β -cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes* 53(12):3142-3151.
- Dezaki K**, Sone H, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H, Hosoda H, Kangawa K, Yada T. (2006). Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes* 55(12):3486-3493.
- Dezaki K**, Sone H, Yada T. (2008). Ghrelin is a physiological regulator of insulin release in pancreatic islets and glucose homeostasis. *Pharmacol Ther* 118(2):239-249.
- Dockray GJ**. (2003). Luminal sensing in the gut; an overview. *J Physiol Pharmacol* 54(Suppl 4):9-17.
- Dourish CT**. (1995). Multiple serotonin receptors: opportunities for new treatments for obesity? *Obes Res* 3(Suppl 4):449S-462S.

- Doyle LW**, Faber B, Callanan C, Morley R. (2003). Blood pressure in late adolescence and very low birth weight. *Pediatrics* 111(2):252-257.
- Drevets WC**, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, Huang Y, Gautier C, Mathis C. (1999). PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry* 46(10):1375-1387.
- ECDCDM**. (1997). Report of the Export Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 20(7):183-197.
- Elias CF**, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21(6):1375-1385.
- ENSANUT**. (2006). Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Eriksson JG**, Forsen T, Tuomilehto J, Jaddoe VW, Osmond C, Barker DJ. (2002). Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. *Diabetologia* 45(3):342-348.
- Esler WP**, Rudolph J, Claus TH, Tang W, Barucci N, Brown SE, Bullock W, Daly M, Decarr L, Li Y, Milardo L, Molstad D, Zhu J, Gardell SJ, Livingston JN, Sweet LJ. (2007). Small-molecule Ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinology* 148(11):5175-5185.
- Fernández-Twinn DS**, Ozanne SE, Ekizoglou S, Doherty C, James L, Gusterson B, Hales CN. (2003). The maternal endocrine environment in the low model of intra-uterine growth restriction. *Br J Nutr* 90(4):815-822.
- FMD**. (2010). Federación Mexicana de Diabetes. <http://www.fmdiabetes.org>
- Friedman JM**, Halaas JL. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395(6704):763-770.
- Funahashi H**, Hori T, Shimoda Y, Mizushima H, Ryushi T, Katoh S, Shioda S. (2000). Morphological evidence for neural interactions between leptin and orexin in the hypothalamus. *Regul Pept* 92(1-3):31-35.

- Garofano A**, Czernichow P, Bréant B. (1999). Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period. *Diabetologia* 42(6):711-718.
- Gluckman PD**, Hanson MA. (2004). Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatr Res* 56(3):311-7.
- Godfrey KM**, Barker DJ. (2000). Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 71(5 Suppl):1344S-1352S.
- Godfrey KM**, Barker DJ. (2001). Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr* 4(2B):611-624.
- Godfrey KM**. (2002). The role of the placenta in fetal programming-a review. *Placenta* 23 (Suppl A):S20-S27.
- González-Cossío T**, Peterson KE, Sanín LH, Fishbein E, Palazuelos E, Aro A. (1997). Decrease in birth weight in relation to maternal bone lead burden. *Pediatrics* 100(5):856-862.
- Goodnick PJ**, Henry JH, Buki VM. (1995). Treatment of depression in patients with diabetes mellitus. *J Clin Psychiatry* 56(4):128-136.
- Greenman Y**, Golani N, Gilad S, Yaron M, Limor R, Stern N. (2004). Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. *Clin Endocrinol* 60(3):382-388.
- Griffin ME**, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. (1999). Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48(6):1270-1274.
- Grouzmann E**, Comoy E, Bohuon C. (1989). Plasma neuropeptide Y in concentrations in patients with neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 68(4):808-813.
- Guan XM**, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. (1997). Distribution of mRNA encoding the

growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48(1):23-29.

Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. (1998). Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1(4):271-272.

Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 303(6809):1019-1022.

Hales CN, Barker DJ. (1992). Type 2 (non insulin dependent) diabetes: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35(7):595-601.

Halford JC, Blundell JE. (2000). Separate systems for serotonin and leptin in appetite control. *Ann Med* 32(3):222-232.

Halford JC, Harrold JA, Boyland EJ, Lawton CL, Blundell JE. (2007). Serotonergic drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Drugs* 67(1):27-55.

Hall JG. (2007). The importance of the fetal origins of adult disease for geneticists. *Clin Genet* 72(2):67-73.

Hansen TK, Dall R, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Christiansen JS. (2002). Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol* 56(2):203-206.

Heemskert JW, Feijge MA, Simoninis MA, Hornstra G. (1995). Effects of dietary fatty acids on signal transduction and membrane cholesterol content in rat platelets. *Biochim Biophys Acta* 1255(1):87-97.

Hoet JJ, Hanson MA. (1999). Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol* 514(Pt3):617-627.

Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. (2002). Ghrelin and the regulation of food intake and energy balance. *Mol Interv* 2(8):494-503.

- Hosoda H**, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. (2000). Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 279(3):909-913.
- Huang XF**, Xin X, McLennan P, Storlien L. (2004). Role of fat amount and type in ameliorating diet-induced obesity: insights at the level of hypothalamic arcuate nucleus leptin receptor, neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA expression. *Diabetes Obes Metab* 6(1):35-44.
- Hwa JJ**, Witten MB, Williams P, Ghibaudi L, Gao J, Salisbury BG, Mullins D, Hamud F, Strader CD, Parker EM. (1999). Activation of the NPY Y5 receptor regulates both feeding and energy expenditure. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 277(5-2):R1428-R1434.
- Issad T**, Coupe C, Pastor-Anglada M, Ferre P, Girard J. (1988). Development of insulin-sensitivity at weaning in the rat: role of the nutritional transition. *Biochem J* 251(3):685-690.
- Iyengar S**, Li DL, Simmons RM. (1999). Characterization of Neuropeptide Y-Induced Feeding in Mice: Do Y1-Y6 Receptor Subtypes Mediate Feeding? *J Pharmacol Exp Ther* 289(2):1031-1040.
- Jaquet D**, Tregouet DA, Godefroy T, Nicaud V, Chevenne D, Tiret L, Czernichow P, Levy-Marchal C. (2002). Combined effects of genetic and environmental factors on insulin resistance associated with reduced fetal growth. *Diabetes* 51(12):3473-3478.
- Jiménez-Chillaron CJ**, Hernández-Valencia M, Reamer C, Fisher S, Joszi A, Hirshman M, Oge A, Walrond S, Przybyla R, Boozer C, Goodyear LJ, Patti ME. (2005). Beta-cell secretory dysfunction in the pathogenesis of low birth weight associated diabetes. *Diabetes* 54(3):702-711.
- Jones AP**, Simson EL, Friedman MI. (1984). Gestational undernutrition and the development of obesity in rats. *J Nutr* 114(8):1484-1492.
- Kageyama H**, Funahashi H, Hirayama M, Takenoya F, Kita T, Kato S, Sakurai J, Lee EY, Inoue S, Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Shioda S. (2005). Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas. *Regul Pept* 126(1-2):67-71.

- Kahn SE**, Hull R, Utzschneider KM. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444(7121):840-846.
- Kahn SE**, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, Neifing JL, Ward WK, Beard JC, Palmer JP. (1993). Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 42(11):1663-1672.
- Kalra SP**, Bagnasco M, Otukonyong EE, Dube MG, Kalra PS. (2003). Rhythmic reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity. *Regul Pept* 111(1-3):1-11.
- Kalsbeek A**, La Fleur S, Van Heijningen C, Buijs RM. (2004). Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci* 24(35):7604-7613.
- Kamegai J**, Tamura H, Shimizu S, Ishii S, Sugihara H, Oikawa S. (2004). Effects of insulin, leptin, and glucagon on ghrelin secretion from isolated perfused rat stomach. *Regul Pept* 119(1-2):77-81.
- Kanaka-Gantenbein C**. (2010). Fetal origins of adult diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1205:99-105.
- Kanatani A**, Hata M, Mashiko S, Ishihara A, Okamoto O, Haga Y, Ohe T, Kanno T, Murai N, Ishii Y, Fukuroda T, Fukami T, Ihara M. (2001). A typical Y1 receptor regulates feeding behaviors: Effects of a potent and selective Y1 antagonist, J-115814. *Mol Pharmacol* 59(3):501-505.
- Kaye WH**, Ebert MH, Raleigh M, Lake R. (1984). Abnormalities in CNS monoamine metabolism in anorexia nervosa. *Arch Gen Psychiatry* 41(4):350-355.
- Kaye WH**, Frank GK, Bailer UF, Henry SE, Meltzer CC, Price JC, Mathis CA, Wagner A. (2005). Serotonin alterations in anorexia and bulimia nervosa: new insights from imaging studies. *Physiol Behav* 85(1):73-81.

- Khan IY**, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, Taylor PD. (2005). A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(1):R127-R133.
- Khazipov R**, Luhmann HJ. (2006). Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. *Trends Neurosci* 29(7):414-418.
- Kohno D**, Nakata M, Maekawa F, Fujiwara K, Maejima Y, Kuramochi M, Shimazaki T, Okano H, Onaka T, Yada T. (2007). Leptin suppresses ghrelin-induced activation of neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus via phosphatidylinositol 3-kinase- and phosphodiesterase 3-mediated pathway. *Endocrinology* 148(5):2251-2263.
- Kojima M**, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762):656-660.
- Konturek PC**, Konturek JW, Czesnikiewicz-Guzik M, Brzozowski T, Sito E, Konturek SJ. (2005). Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanism and clinical implications. *J Physiol Pharmacol* 56(Suppl 6):5-25.
- Kramer MS** (1987). Determinants of low birth weight: Methodological assessment and meta-analysis. *Bull World Health Organ* 65(5):663-737.
- Lawton CL**, Wales JK, Hill AJ, Blundell JE. (1995). Serotonergic manipulation, meal-induced satiety and eating pattern: effect of fluoxetine in obese female subjects. *Obes Res* 3(4):345-356.
- Levitt NS**, Lambert EV, Woods D, Hales CN, Andrew R, Seckl JR. (2000). Impaired glucose tolerance and elevated blood pressure in low birth weight, nonobese, young south African adults: early programming of cortisol axis. *J Clin Endocrinol Metab* 85(12):4611-4618.
- Lippl F**, Kircher F, Erdmann J, Allescher HD, Schusdziarra V. (2004). Effect of GIP, GLP-1, insulin and gastrin on ghrelin release in the isolated rat stomach. *Regul Pept* 119(1-2):93-98.

- Liu M**, Doi T, Shen L, Woods SC, Seeley RJ, Zheng S, Jackman A, Tso P. (2001). Intestinal satiety protein apolipoprotein AIV is synthesized and regulated in rat hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(5):R1382-R1387.
- Mancebo A**, Scull I, González Y, Arteaga ME, González BO, Fuentes D, Hernández O, Correa M. (2002). Ensayo de toxicidad a dosis repetidas (28 días) por vía oral del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* en ratas Sprague Dawley. *Rev Toxicol* 19:73-78.
- Mancillas AL**, Gómez PFJ, Rull AAJ. (2002). Diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus. *Rev Endocrinol Nutric* 10(2):63-68.
- Marks JL**, Waite K. (1997). Intracerebroventricular neuropeptide Y acutely influences glucose metabolism and insulin sensitivity in the rat. *J Neuroendocrinol* 9(2):99-103.
- Mashiko S**, Ishihara A, Iwaasa H, Sano H, Oda Z, Ito J, Yumoto M, Okawa M, Suzuki J, Fukuroda T, Jitsuoka M, Morin NR, Macneil DJ, Van Der Ploeg L, Ihara M, Fukami T, Kanatani A. (2003). Characterization of neuropeptide Y (NPY) Y5 receptor-mediated obesity in mice: Chronic intracerebroventricular infusion of D-Trp34NPY. *Endocrinology* 144(5):1793-1801.
- Merezak S**, Reusens B, Renard A, Goosse K, Kalbe L, Ahn MT, Tamarit-Rodriguez J, Remacle C. (2004). Effect of maternal low-protein diet and taurine on the vulnerability of adult Wistar rat islets to cytokines. *Diabetologia* 47(4):669-675.
- Micic D**, Casabiell X, Gualillo O, Pombo M, Dieguez C, Casanueva FF. (1999). Growth hormone secretagogues: the clinical future. *Horm Res* 51(Suppl 3):29-33.
- Moesgaard SG**, Ahren B, Carr RD, Gram DX, Brand CL, Sundler F. (2004). Effects of high-fat feeding and fasting on ghrelin expressions in the mouse stomach. *Regul Pept* 120(1-3):261-267.
- Montemayor OD**, Montes VJ. (2004). Diabetes mellitus tipo 2 en niños y adolescentes: un problema emergente. *Med Univer* 6(24):204-211.
- Moraes RC**, Blondet A, Birkenkamp-Demtroeder K, Tirard J, Orntoft TF, Gertler A, Durand P, Naville D, Begeot M. (2003). Study of the alteration of gene expression

in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology* 144(11):4773-4782.

Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409(6817):194-198.

Neu A, Willasch A, Ehehalt S, Kehrner M, Hub R, Ranke MB. (2001). Diabetes incidence in children of different nationalities: an epidemiological approach to the pathogenesis of diabetes. *Diabetologia* 44(Suppl 3):21-26.

Newton AC. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 9(2):161-167.

Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E. (1995). Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. A randomized prospective 6-years study. *Diabetes res Clin Pract* 28(2):103-117.

Oken E, Gillman MW. (2003). Fetal origins of obesity. *Obes Res* 11(4):496-506.

Ozanne SE, Hales CN. (2004). Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 427(6973):411-412.

Ozanne SE, Lewis R, Jennings BJ, Hales CN. (2004). Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet. *Clin Sci* 106(2):141-145.

Ozanne SE, Olsen GS, Hansen LL, Tingey KJ, Nave BT, Wang CL, Hartil K, Petry CJ, Buckley AJ, Mosthaf-Seedorf L. (2003). Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J Endocrinol* 177(2):235-241.

Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PM, de Groot E, Stok WJ, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP, Roseboom TJ. (2007). Maternal nutrition during gestation and carotid arterial compliance in the adult offspring: the Dutch famine birth cohort. *J Hypertens* 25(3):533-540.

- Peat MA, Gibb JW.** (1983). High-performance liquid chromatographic determination of indoleamines, dopamine, and norepinephrine in rat brain with fluorometric detection. *Anal Biochem* 128(2):275-280.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rohde W, Dorner G.** (2000). Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr* 130(10):2582-2589.
- Polonsky KS, Given BD, Van Cauter E.** (1998). Twenty-four-hour profiles and patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 81(2):442-448.
- Priego T, Sanchez J, Picó C, Palou A.** (2009). Sex-associated differences in the leptin and ghrelin systems related with the induction of hyperphagia under high-fat diet exposure in rats. *Horm Behav* 55(1):33-40.
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM.** (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature* 423(6939):550-555.
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA.** (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbance of diabetes mellitus. *Lancet* 1(7285):785-789.
- Reaven GM.** (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37(12):1595-1607.
- Rindi G, Torsello A, Locatelli V, Solcia E.** (2004). Ghrelin expression and actions: a novel peptide for an old cell type of the diffuse endocrine system. *Exp Biol Med* 229(10):1007-1016.
- Rodgers RJ, Ishii Y, Halford JC, Blundell JE.** (2002). Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides* 36(5):303-325.
- Rubino F, Zizzari P, Tomasetto C, Bluett-Pajot MT, Forgione A, Vix M.** (2005). The role of the small bowel in the regulation of circulating ghrelin levels and food intake in the obese Zucker rat. *Endocrinology* 146(4):1745-1751.

- Sahu A.** (2003). Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* 24(4):225-253.
- Sandrini M, Vitale G, Vergoni AV, Ottani A, Bertolini A.** (1997). Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the rat brain. *Life Sci* 60(16):1393-1397.
- Seidell JC.** (1999). Obesity: a growing problem. *Acta Paediatr Suppl* 88(428):46-50.
- Sellayah D, Sek K, Anthony FW, Watkins AJ, Osmond C, Fleming TP, Hanson MA, Cagampang FR.** (2008). Appetite regulatory mechanisms and food intake in mice are sensitive to mismatch in diets between pregnancy and postnatal periods. *Brain Res* 27(1237):146-152.
- Simmons RA, Templeton LJ, Gertz SJ.** (2001). Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* 50(10):2279-2286.
- Singhal NS, Lazar MA, Ahima RS.** (2007). Central resistin induces hepatic insulin resistance via neuropeptide Y. *J Neurosci.* 27(47):12924-12932.
- Soto N, Mericq V.** (2005). Restricción del crecimiento fetal e insulinoresistencia. Nuevos hallazgos y revisión de literatura. *Rev Méd Chile* 133(1):97-104.
- Spiegelman BM, Flier JS.** (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104(4):531-543.
- SSA.** (2000). México "Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes" *Diario Oficial de la Federación, México.*
- SSA.** (2007). Dirección de vigilancia epidemiológica de enfermedades no transmisibles. Boletín 3. México D.F.
- Stanley BG, Anderson KC, Grayson MH, Leibowitz SF.** (1989). Repeated hypothalamic stimulation with neuropeptide Y increases daily carbohydrate and fat intake and body weight gain in female rats. *Physiol Behav* 46(2):173-177.

- Stanley BG**, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: A powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7(6):1189-1192.
- Stanley BG**, Leibowitz SF. (1984). Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci* 35(26):2635-2642.
- Tatemoto K**, Carlquist M, Mutt V. (1982). Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296(5858):659-660.
- Tatemoto K**, Mutt V. (1980). Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature* 285(5764):417-418.
- Taubes G**. (1998). As obesity rates rise, experts struggle to explain why. *Science* 280(5368):1367-1368.
- Torsello A**, Locatelli V, Melis MR, Succu S, Spano MS, Deghenghi R. (2000). Differential orexigenic effects of hexarelin and its analogs in the rat hypothalamus: indication for multiple growth hormone secretagogue receptor subtypes. *Neuroendocrinology* 72(6):327-332.
- Tschöp M**, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. (2001). Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50(4):707-709.
- Tso P**, Liu M, Kalogeris TJ, Thomson AB. (2001). The role of apolipoprotein A-IV in the regulation of food intake. *Annu Rev Nutr* 21:231-254.
- Tung YC**, Yeo GS. (2010). Central melanocortin signaling regulates cholesterol. *Nat Neurosci* 13(7):877-882.
- Vaag A**, Henriksen JE, Madsbad S, Holm N, Beck-Nielsen H. (1995). Insulin secretion, insulin action and hepatic glucose production in identical twins discordant for non-insulin diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* 95(2):690-698.

- van den Hoek AM**, Voshol PJ, Karnekamp BN, Buijs RM, Romijn JA, Havekes LM, Pijl H. (2004). Intracerebroventricular neuropeptide Y infusion precludes inhibition of glucose and VLDL production by insulin. *Diabetes* 53(10):2529-2534.
- Van Harmelen V**, Lönnqvist F, Thörne A, Wennlund A, Large V, Reynisdottir S, Arner P. (1997). Noradrenaline-induced lipolysis in isolated mesenteric, omental and subcutaneous adipocytes from obese subjects. *Int J Obesity* 21(11):972-979.
- Vickers MH**, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(1):E83-E87.
- Vickers SP**, Dourish CT. (2004). Serotonin receptor ligands and the treatment of obesity. *Curr Opin Investig Drugs* 5(4):377-388.
- Wang C**, Yang N, Wu S, Liu L, Sun X, Nie S. (2007). Difference of NPY and its receptor gene expressions between obesity and obesity resistant rats in response to high-fat diet. *Horm Metab Res* 39(4):262-267.
- Wells JC**. (2007). The thrifty phenotype as an adaptative maternal effect. *Biol Rev Camb Philos Soc* 82(1):143-172.
- Wi JM**, Boersma B. (2002). Catch-up growth: definition, mechanisms, and models. *J Pediatr Endocrinol Metab* 15(Suppl 5):1229-1241.
- Wild S**, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care* 27(5):1047-1053.
- Willesen MG**, Kristensen P, Romer J. (1999). Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70(5):306-316.
- World Health Organization**. Diabetes mellitus Fact sheet No. 138, Nov 1999. <http://www.who.int/inf-fs/en/fact138.html>

- Xu Y**, Jones JE, Kohno D, Williams KW, Lee C, Cho M, Anderson JG, Heisler LK, Zigman JM, Lowell BB, Elmquist JK. (2008). 5-HT₂CRs Expressed by Pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. *Neuron* 60(4):582-589.
- Yoon JC**, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413(6852):131-138.
- Zambrano E**, Bautista CJ, Deás M, Martínez-Samayoa PM, González-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz PW. (2006). 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. *J Physiol* 571(Pt 1):221-230.
- Zambrano E**, Rodríguez-González GL, Guzmán C, García-Becerra R, Boeck L, Díaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW. (2005). A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 563(Pt 1):275-284.
- Zarjevski N**, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. (1993). Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133(4):1753-1758.
- Zhao Z**, Sakai T. (2008). Characteristic features of ghrelin cells in the gastrointestinal tract and the regulation of stomach ghrelin expression and production *World J Gastroenterol* 14(41): 6306-6311.
- Zierath JR**, Livingston JN, Thörne A, Bolinder J, Reynisdottir S, Lönnqvist F, Arner P. (1998). Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signalling through the insulin receptor substrate-1 pathway. *Diabetologia* 41(11):1343-1354.

10. ANEXOS

10.1 Principio del método enzimático colorimétrico para la cuantificación de colesterol en plasma.

Este método se basa en la determinación de la Δ^4 -colestenoona tras el desdoblamiento enzimático de los ésteres de colesterol por la colesterol-esterasa, después de la transformación del colesterol por la colesterol-oxidasa, así como la medición subsiguiente del peróxido de hidrógeno formado a través de la reacción de Trinder. Bajo la acción catalítica de las peroxidasas, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4-aminofenazona y fenol para formar un colorante rojo. La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de colesterol y se mide fotométricamente. El analizador calcula automáticamente la concentración en cada muestra. La sensibilidad analítica es de 0,08 mmol/l (3 mg/dL).

10.2 Principio del método enzimático colorimétrico para la cuantificación de triglicéridos en plasma.

Este método emplea una lipasa lipoproteínica obtenida de microorganismos para hidrolizar completa y rápidamente triglicéridos a glicerol, con la oxidación subsiguiente a dihidroxiacetonafofato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno formado reacciona bajo la acción catalítica de la peroxidasa con la 4-aminofenazona y 4-clorofenol para formar un colorante rojo en una reacción de punto final. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos y se mide fotométricamente. El analizador calcula automáticamente la concentración en cada muestra. La sensibilidad analítica es de 0,05 mmol/l (4 mg/dL).

10.3 Detección de insulina y grelina en plasma por el método de ELISA

Este ensayo de ELISA es una técnica cuantitativa de Sandwich basada en: 1) la captura de moléculas de insulina/grelina (Forma activa) en la muestra por IgG anti-insulina/grelina y la inmovilización del complejo resultante en los pozos de una placa de microtitulación recubiertos por una cantidad predeterminada de anticuerpos, 2) y la unión simultánea de un segundo anticuerpo biotinilado contra insulina/grelina, 3) lavado de los anticuerpos no unidos, seguida de la conjugación de la peroxidasa de rábano picante a los anticuerpos inmovilizados biotinilados, 4) lavado de la enzima libre, y 5) la cuantificación de los conjugados inmovilizados anticuerpo-enzima por la actividad de la peroxidasa de rábano picante en presencia del sustrato 3,3', 5,5'-tetra-metilbenzidina. La actividad enzimática se mide espectrofotométricamente por el aumento de la absorbancia a 450 nm, corregido de la absorbancia a 590nm, después de la acidificación de los productos formados.

A cada placa se le agregó 10 µL de cada estándar (0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 y 30 ng/mL), 10 µL de controles de calidad 1 y 2, y 10 µL de muestra por pozo por duplicado. Se agregó 50 µL de antisuero de insulina o grelina a todos los pozos utilizados. Las placas se cubrieron e incubaron por 2 horas a TA de 20-25° C en agitación constante. Cada placa se decantó y lavó con 300 µL de buffer de lavado por pozo 3 veces. A todos los pozos se les agregó 100 µL de anticuerpo biotinilado. Las placas se cubrieron e incubaron por 1 hora a TA 20-25° C en agitación constante. Cada placa se decantó y con 300 µL buffer de lavado por pozo 3 veces. Se agregó 100 µL de conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano prediluido. Las placas se cubrieron e incubaron por 30 min a TA 20-25° C en agitación constante. Cada placa se decantó y lavó con 300 µL buffer de lavado por pozo 6 veces. Se agregó 100 µL de sustrato 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina. Las placas se cubrieron e incubaron por 15 min a TA 20-25° C en agitación constante y en la oscuridad. Se agregaron 100 µL de solución de paro de ácido clorhídrico (HCl 0.3 M) por pozo y se determinó la D.O a 450 nm y después de 5 min se determinó la D.O. a 590 nm de cada placa, utilizando un lector para placas para ELISA (LabSystem, MULTISKAN EX). La concentración de hormonas en plasma se

determinó interpolando el promedio de las absorbancias por cada muestra dentro de la curva estándar generada para cada hormona.

10.3.1 Cuantificación de insulina en plasma

Para la determinación de la concentración de insulina en plasma de los grupos control y provenientes de desnutrición materna, grupo BPN a las 2 semanas de edad y después de haber sido alimentadas con la dieta HL a las 12 y 28 semanas de edad se realizó una curva patrón de 0.2–10 ng/mL (Figura 16), para lo cual se utilizó el estuche comercial de Millipore para insulina, No. Cat. EZRMI-13K. La sensibilidad analítica es de 0.2 ng/mL (35 pM) y la especificidad del 100% para insulina de rata. Las concentraciones de los controles de calidad fueron de 0.67–1.40 ng/mL y de 1.94–4.03 ng/mL.

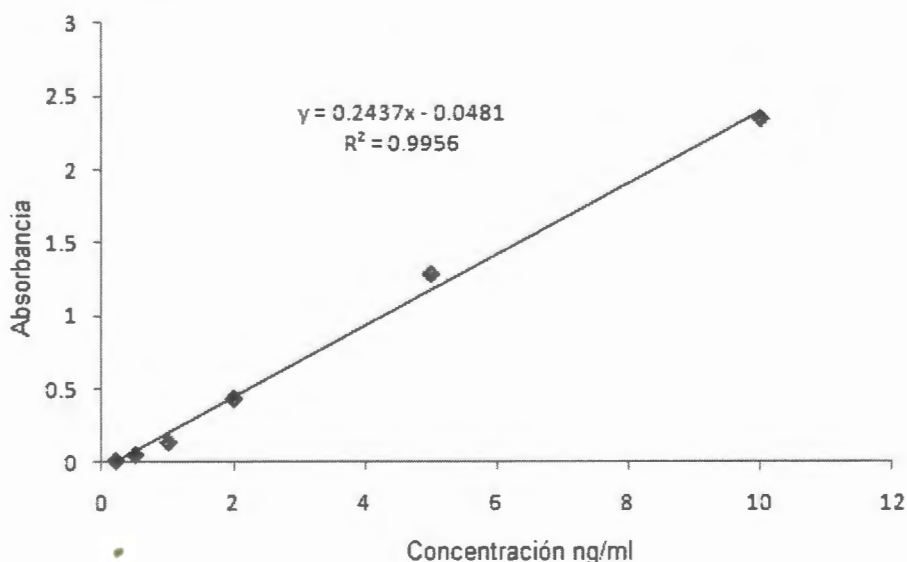


Figura 16. Curva-patrón para insulina de 0.2–10 ng/mL

10.3.2 Cuantificación de grelina en plasma

Para la determinación de la concentración de grelina en plasma de ratas macho de los grupos control y provenientes de desnutrición materna, grupo BPN a las 2 semanas de edad y después de haber sido alimentadas con la dieta HL a las 12 y 28 semanas de edad se realizó una curva patrón de 25–2000 pg/mL (Figura 17), para lo cual se utilizó el estuche comercial LINCO Research para grelina, No. Cat. EZRGRA-90K. La sensibilidad analítica es de 6 pg/mL y la especificidad del 100% para grelina de rata. Las concentraciones de los controles de calidad fueron de 31–65 pg/mL y 256–533 pg/mL.

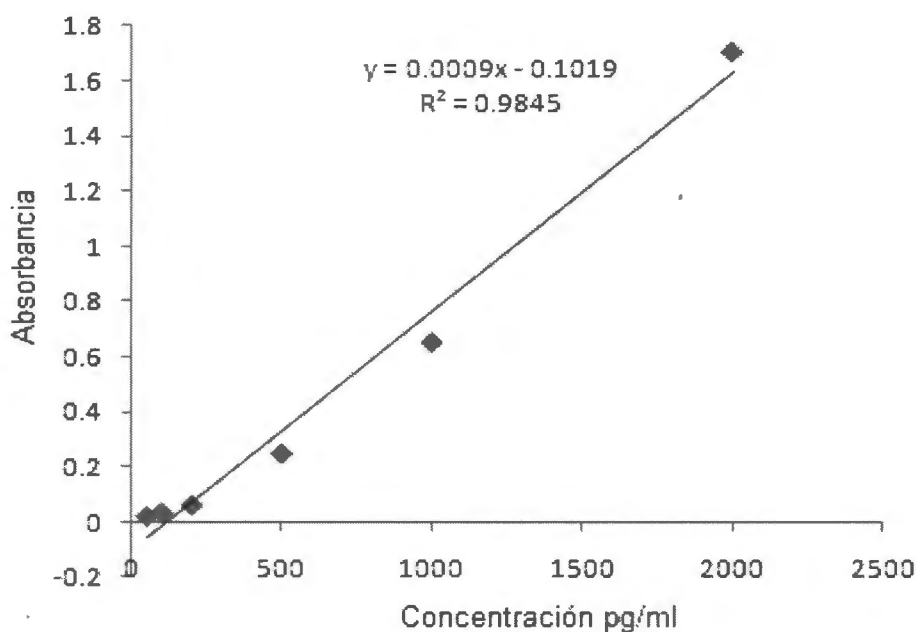


Figura 17. Curva-patrón para la grelina de 25–2000 pg/mL

10.4 Cuantificación de 5-HT en hipotálamo

Para obtener la cantidad de 5-HT generada en el hipotálamo de ratas control y provenientes de la desnutrición materna a las edades de 2, 12 y 28 semanas de edad, se integró el área bajo la curva de los picos correspondientes de los estándares de distintas concentraciones. En la Figura 18 se observa un cromatograma representativo obtenido con el detector EC, en el que se aprecia la 5-HT con un tiempo de retención aproximado de 10 minutos. Para poder cuantificar la concentración equivalente del área bajo la curva, se realizó una curva patrón para 5-HT (Figura 19).

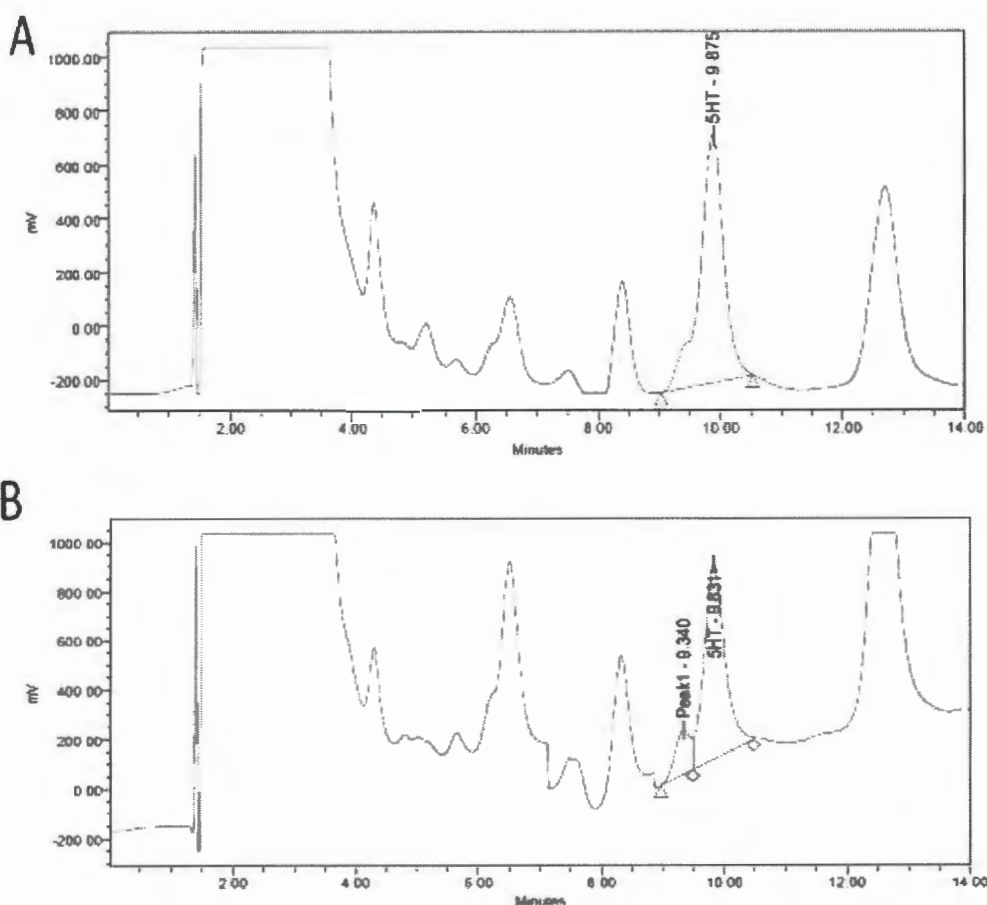


Figura 18. Cromatograma electroquímico (800 mV). Cromatogramas representativos de A) Animal control a las 2 semanas de edad y B) Animal con BPN a las 2 semanas de edad. Los picos corresponden a la 5-HT en hipotálamo.

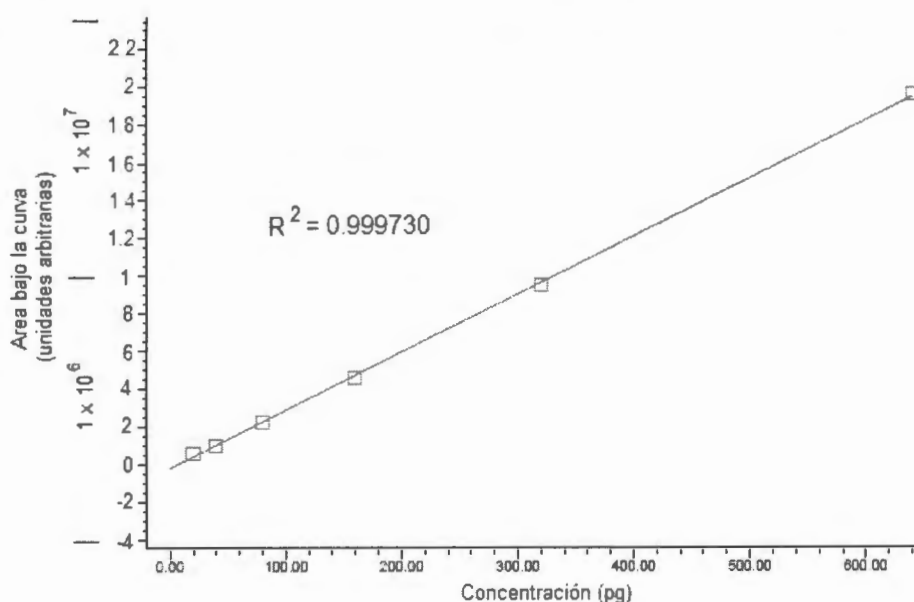


Figura 19. Curva-patrón para la 5-HT de 20–640 pg.

10.5 Cuantificación de proteínas por el método del BCA

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el BCA™ Protein Assay Kit de PIERCE. Se descongelaron los botones y se lavaron 3 veces con buffer PBS. Finalmente se adicionaron 60 µL de PBS por cada 10 µg de tejido pesado inicialmente. Las muestras se centrifugaron a 18 928 x g (13 000 rpm) a 4 °C durante 10 min. Se utilizó una microplaca para el análisis. En cada pozo se adicionaron 20 µL de H₂O desionizada estéril y 5 µL de la muestra problema. Cada muestra se analizó por duplicado. Además, se colocaron 25 µL de los estándares de albúmina (BSA) (25–2,000 µg/mL) para la realización de la curva patrón. Adicional a cada pozo se le agregaron 200 µL de la mezcla de reactivo (relación 1:50). La placa se cubrió y se incubó a TA durante 30 min. Se midió la absorbancia a 562 nm.

El BCA es una sal sódica capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu¹⁺ en medio alcalino. Así se cuantifica el ion cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu²⁺ en medio alcalino.

10.6 Cuantificación del RNA total

Una vez extraído el hipotálamo, se aisló el RNA por el método de TRIZOL® y se determinó la pureza y la concentración del RNA por medio de espectrofotometría. Se cuantificó utilizando un equipo automatizado nano-Drop (modelo ND-1000 spectrophotometer), las concentraciones se obtuvieron en ng/μL. Las muestras de RNA se leyeron a una longitud de onda de 260 y 280 nm para obtener el grado de pureza y obtener el cociente: $A_{260}/A_{280}=1.8-2.0$. Siendo los valores anteriores indicadores de RNA libre de proteínas.

10.7 Determinación de la integridad del RNA total

Para determinar la integridad del RNA total extraído, las muestras se sometieron a electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en condiciones no desnaturalizantes, para lo cual se mezclaron 2 g de agarosa (Invitrogen) en 100 mL de buffer TBE 1X (Tris-borato 0.089 M, pH 8.3 y EDTA 0.02 mM) y 1 μL de bromuro de etidio (10 mg/mL). Se mezclaron 2 μL de muestra y 3 μL de buffer de carga (azul de bromofenol 0.05%, 0.05% Xilen cianol, 30% glicerol en ddH₂O-DEPC) y se colocaron en los pozos del gel. La electroforesis se corrió a 90 Voltios durante 60 min. Los fragmentos de RNA se visualizaron mediante un transiluminador (Gel Logic 200 Imaging system Kodak) con radiación UV a 260 nm. La integridad del RNA se determinó observándose las bandas ribosomales 28S y 18S (Figura 20).

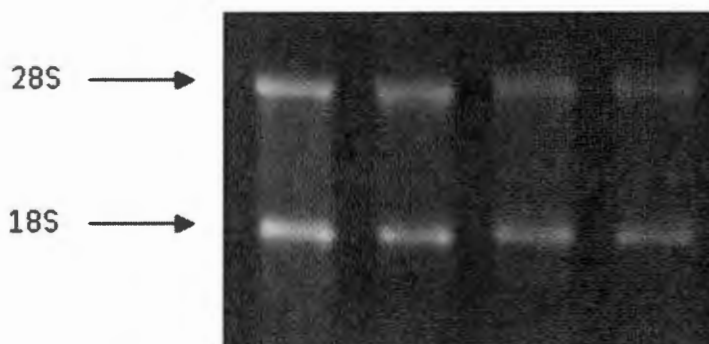


Figura 20. Integridad del RNA de tejido hipotalámico de ratas macho. El RNA total se analizó en geles de agarosa al 2%, marcado con bromuro de etidio, separación a 75 Voltios por 60 minutos.

10.8 Expresión del mRNA de los receptores 5-HT_{1A}, GHSR-1a y Y1

Para determinar el efecto de la restricción del alimento en la gestación y el posterior consumo de la dieta HL sobre la expresión en los niveles de expresión del mRNA de los receptores 5-HT_{1A}, GHSR-1a y Y1 en el hipotálamo de los grupos de trabajo, se aisló el RNA total y se consideró la concentración de 2 µg para realizar la obtención de cDNA y la reacción de RT-PCR. Para establecer condiciones óptimas para la reacción de los oligos, se realizó un gradiente de temperaturas para determinar la temperatura de alineamiento. Se determinó que para los cuatro oligos (incluyendo el de normalización), la temperatura de 60° C era la adecuada. Para el análisis se combinaron tres muestras de tejido hipotalámico. En la Figura 21 se muestra un gel representativo del corrimiento de los productos de la PCR.

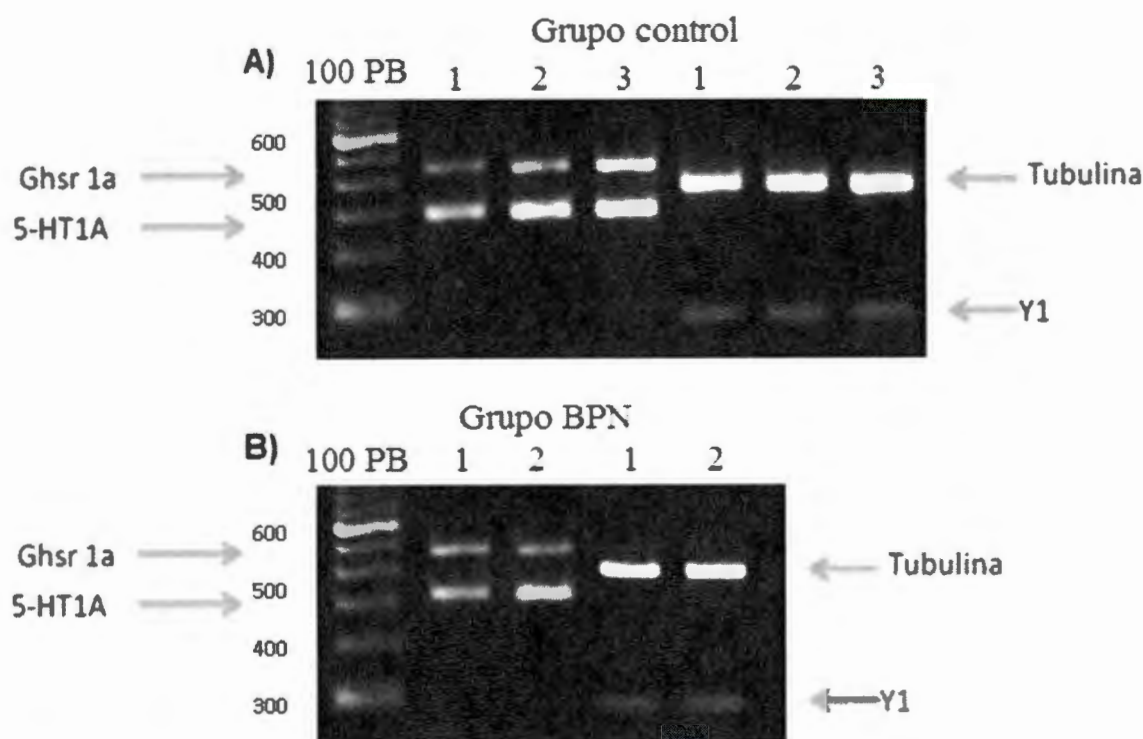


Figura 21. Gel representativo de los productos de PCR de animales de 2 semanas de edad. A) Genes que codifican para los receptores GHSR-1a (449 PB), Y1 (73 PB), 5-HT_{1A} (297 PB) y el gen constitutivo de tubulina (370 PB) del grupo control. B) Genes que codifican para los receptores GHSR-1a (449 PB), Y1 (73 PB), 5-HT_{1A} (297 PB) y el gen constitutivo de tubulina (370 PB) del grupo con BPN.