



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**

**Efecto del consumo crónico de sacarosa sobre el  
metabolismo de ratas adultas sometidas a  
privación materna y crianza artificial en el  
periodo postnatal pre-destete**

**Tesis para obtener el grado de  
Maestría en ciencias fisiológicas**

**Presenta:**

**L.N. Andrea Tuxpan Mancilla**

**Director de tesis:**

**D.C. Jorge L. Valente Flores Hernández**

**Codirector de tesis:**

**D.C. Angel Ismael Melo Salazar**



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**

**Laboratorio de Neuromodulación**



**Maestría en Ciencias Fisiológicas**

**Efecto del consumo crónico de sacarosa sobre el  
metabolismo de ratas adultas sometidas a privación  
materna y crianza artificial en el periodo postnatal pre-  
destete**

**Tesis que para obtener el grado de**

**Maestra en Ciencias Fisiológicas**

**Presenta**

**LN. Andrea Tuxpan Mancilla  
CVU. 774734**

**Director de Tesis**

**DC. Jorge Luis Valente Flores Hernández  
CVU. 11490**

**Asesores:**

**DC. José Ramón Eguibar Cuenca  
DC. Fabián Galindo Ramírez  
M en C. Aida Ortega Cambrani**

**Diciembre 2018**

# INDICE GENERAL

## Contenido

1.INTRODUCCIÓN.....	5
2. CONDUCTA MATERNA .....	9
3.MODELO DE SEPARACION MATERNA TOTAL Y CRIANZA ARTIFICIAL.....	11
4. TEORÍA DE LA PROGRAMACIÓN METABÓLICA EN EL DESARROLLO.....	16
5. MODELOS ANIMALES DE PROGRAMACIÓN METABÓLICA.....	19
7. HORMONAS REGULADORAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO.....	28
7.1 LEPTINA.....	28
7.2 INSULINA.....	33
7.3 ADIPONECTINA.....	37
8. JUSTIFICACIÓN .....	39
10. HIPÓTESIS .....	41
11. OBJETIVOS .....	42
11.1 OBJETIVO GENERAL .....	42
11.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
12. METODOLOGÍA.....	43
12. 2 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	43
12. 3 CRIANZA ARTIFICIAL DE RATAS.....	47
12.4 PREPARACIÓN DE LA FÓRMULA LÁCTEA .....	49
12. 5 INGESTA DE AGUA CON SACAROSA.....	50
12.6 MEDICIÓN DEL PESO CORPORAL, LA INGESTA Y LAS CALORIAS.....	50
12. 7 EXTRACCIÓN DE SUERO.....	52
12. 8 DISECCIÓN DE TEJIDO ADIPOSO.....	52
12.9 QUÍMICA SANGUÍNEA.....	53
12.10 DETERMINACIÓN DE HORMONAS .....	54
12.11 CONCETRACIÓN DE LEPTINA.....	55
12.12 CONCETRACIÓN DE INSULINA .....	56
12.13 CONCETRACIÓN DE ADIPONECTINA.....	56
12.14 MEDIDA DEL TAMAÑO DE LOS ADIPOCITOS.....	56
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	57
14. RESULTADOS .....	58

15. RESUMEN DE RESULTADOS.....	90
16. DISCUSIÓN.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
17. CONCLUSIONES.....	106
18. BIBLIOGRAFÍA.....	107

## RESUMEN

Estudios en humanos y en modelos animales sugieren que los orígenes de la obesidad y los trastornos metabólicos, no solo son consecuencia de los factores de riesgo tradicionales en adultos, sino también en la interacción entre la carga genética con el ambiente durante períodos críticos de desarrollo, como el período prenatal y/o postnatal inmediato. Se han diseñado varios modelos animales para estudiar la programación metabólica pero han sido enfocados, principalmente, en la desnutrición materna, encontrando hiperleptinemia, hiperinsulinemia, aumento del tejido adiposo. Además, también se ha encontrado que ratas que fueron privados del cuidado materno a través del modelo de crianza artificial (CA) en el periodo de postnatal pre-destete, muestran un incremento en la grasa epididimal y esteatosis hepática. Estos datos sugieren que el cuidado materno podría ser un factor más en la programación metabólica temprana. Para evaluar lo anterior, crías macho de 4 a 22 días de edad fueron: 1) Criadas en el sistema de CA, sin madre ni hermanos (CA-Aislado), 2) CA con estimulaciones corporales (CA-Táctil), y 3) Criadas por su madre (CM). A los 3 meses de edad (90 DPN) fueron expuestos a un segundo reto de agua con sacarosa al 5% durante 6 semanas y se cuantificó la ingesta de alimento, de agua, y el peso corporal cada semana. Posteriormente se obtuvieron muestras de tejido adiposo de 5 compartimentos, y se midió glucosa, colesterol y triglicéridos en suero, así como concentración de hormonas como insulina, leptina y adiponectina. Se obtuvo que la crianza artificial modifica negativamente algunos parámetros medidos como: Ingesta de agua total ( $p= 0.004$ ), triglicéridos ( $p<0.001$ ), leptina ( $p<0.001$ ), insulina ( $p<0.001$ ), adiponectina ( $p<0.001$ ), IRI ( $p<0.001$ ), índice de

adiposidad ( $p < 0.001$ ), Tejido adiposo retroperitoneal ( $p = 0.021$ ), área del adipocito ( $p < 0.001$ ). De la misma manera se obtuvo que la ingesta de sacarosa tuvo efecto en: ingesta de agua total ( $p < 0.001$ ), ingesta de alimento total ( $p < 0.001$ ), calorías totales ( $p < 0.001$ ), triglicéridos ( $p < 0.001$ ), área del adipocito ( $p < 0.001$ ). Se obtuvieron interacciones (crianza x tratamiento) estadísticamente significativas para las variables: Triglicéridos ( $p < 0.001$ ), insulina ( $p = 0.013$ ), IRI ( $p = 0.013$ ), tejido adiposo retroperitoneal ( $p = 0.031$ ). Esto sugiere que la CA podría ser propuesta como un modelo de programación metabólica y que la estimulación táctil no previene los efectos de la crianza artificial.

Palabras clave: Crianza artificial, programación metabólica, sacarosa, metabolismo

## 1. INTRODUCCIÓN

Estudios en humanos y datos obtenidos en modelos animales han sugerido que los orígenes de la obesidad y los trastornos metabólicos, no solo son consecuencia de los factores de riesgo tradicionales en adultos (malos hábitos de alimentación y estilos de vida sedentarios, etc.), sino también en la interacción entre la carga genética con el ambiente durante períodos críticos de desarrollo, como el período prenatal y/o postnatal temprano (Taylor y Poston, 2007; Mulchand y Srinivasan, 2011). Al respecto, se ha propuesto la existencia de una predisposición a sufrir trastornos metabólicos y cardiovasculares en etapa adulta en individuos que sufren estrés crónico, ingesta excesiva de hidratos de carbono o desnutrición/malnutrición en etapas críticas del desarrollo (Elford y cols., 1992; Taylor y Poston, 2007; Cervantes-Rodríguez y cols., 2014). Lo anterior se ha sugerido por la evidencia del cambio demográfico de población hacia un fenotipo de trastornos metabólicos y/u obesidad en un tiempo relativamente corto (una a dos generaciones) que hace susceptible el papel genético y favorece el de los mecanismos epigenéticos [cambios en la expresión génica sin alterar (mutaciones) la secuencia de los genes] (Manuela-Belén y cols., 2007; Sánchez-Serrano y Lamas, 2011). Este conocimiento ha generado la hipótesis de la *programación del desarrollo*, ahora conocida como *los orígenes en el desarrollo de la salud y la enfermedad* (Duran, 2004; Mc Millen y Robinson, 2005). Distintos modelos animales que se han enfocado en aspectos nutricionales, han mostrado la importancia de la participación de la restricción proteica durante la gestación y/o lactancia en el desarrollo de diversos parámetros metabólicos relacionados con la obesidad (Taylor y Poston, 2007). Por ejemplo, se ha reportado en la rata que crías recién nacidas de madres que sufrieron desnutrición durante la gestación pueden presentar

alteraciones en el peso (Bautista y cols., 2009; Zambrano y cols., 2005). Incluso, cuando estas crías son sometidas a ingesta continua de sacarosa, como un segundo reto en la vida adulta, presentan altos niveles de insulina, colesterol, leptina e incremento en la cantidad de tejido adiposo (Cervantes-Rodríguez y cols., 2014). Los mecanismos propuestos implicados en la teoría de la programación, aún no son claros y se requiere de mayor investigación para apoyar dicha hipótesis, e incluso evidenciar otros posibles factores involucrados en los orígenes de los trastornos metabólicos y cardiovasculares.

Un aspecto a considerar de los datos anteriormente descritos es el efecto secundario de la desnutrición/malnutrición de la madre en modelos animales, sobre las conductas sociales, como la conducta materna, y cómo estas pueden afectar el desarrollo de la progenie. Se sabe que ratas madres que son desnutridas durante la gestación y/o lactancia manifiestan alteraciones en el despliegue de su conducta materna (proporcionan poco lamido corporal a las crías), la cual es la principal interacción social de la progenie durante este período (Galler y Tonskiss, 1991; González-Mariscal y Melo, 2013). Incluso, se ha reportado en roedores que la separación materna parcial (modelo de estrés crónico temprano), podría también estar implicado en el desarrollo de la programación metabólica (Moyer-Mileur y cols., 2010). Para el estudio de problemas de desarrollo en períodos críticos se han utilizado varios modelos animales como: la separación materna repetida, el destete precoz, y la privación materna total a través de la crianza artificial (Matthews y Robbins, 2003; Melo, 2015; Lomanowska y Melo, 2016; Palomboy cols., 2010).

En humanos se ha encontrado que cuando el cuidado materno es inadecuado o negligente o incluso estresante, como por ejemplo en maltrato infantil o abuso sexual, el desarrollo y crecimiento de la progenie se altera desfavorablemente a nivel del sistema nervioso central (González-Mariscal y Melo, 2013; Teicher y cols., 2003). Además, se ha encontrado una correlación entre la pérdida de los padres en la infancia con un incremento en el índice de masa corporal (Alciati y cols., 2011) y desórdenes alimenticios (Wonderlich y cols., 1994). Estos datos sugieren que además de problemas de nutrición temprana, los cuidados maternos que recibe la progenie en este período incluyendo la leche materna, podrían participar en el desarrollo de la programación metabólica y/o alteraciones conductuales, que conlleve a sufrir trastornos metabólicos.

## **2. CONDUCTA MATERNA**

El desarrollo socio-afectivo de los individuos, constituye uno de los pilares fundamentales en todo el desarrollo del ser humano. Para la mayoría de los mamíferos altriciales cuyas crías nacen inmaduras (no oyen, no ven, no coordinan sus movimientos, no pueden conseguir su alimento, ni regular su temperatura corporal), la privación de cuidados maternos, provoca efectos contraproducentes en el desarrollo físico, cognitivo, afectivo y social de la progenie, con base en ello, se concibe como un pilar fundamental la relación madre-hijo (Rosenblatt y Lehrman, 1963; Melo, 2015; Moreno y cols., 2011).

La conducta materna (CM) consiste en la expresión de una serie de patrones motores y eventos somato-sensoriales por parte de la madre durante la gestación, el parto y la lactancia. Esto con la finalidad de proveer de nutrientes,

de protección, de calor y de los estímulos sensoriales (estímulos táctiles, auditivos y odoríferos), hormonales (a través de la leche materna) y sociales (interacción madre-hijos y entre los hermanos) necesarios para el crecimiento, desarrollo y maduración de la progenie. En la rata, la CM se inicia al final de la gestación con la construcción del nido (Dos o tres días antes del parto la hembra acarrea paja, o aserrín, con el hocico y las patas delanteras y después lo acomoda alrededor de su cuerpo) y continúa después del parto y declina cuando la progenie comienza a regular su temperatura corporal durante el período postnatal pre-destete (del nacimiento al día postnatal 21-22).

Durante el parto, la madre favorece la expulsión de las crías del canal de parto mientras lame su región ano-genital y corporal, y después se come las membranas amnióticas y la placenta (placentofagia), y agrupa a las crías en el nido, o las acarrea si se alejan, se coloca sobre ellas adoptando la postura de amamantamiento. Durante este último evento, la hembra lame el cuerpo y la región ano-genital de las crías para estimular la micción y la defecación, y se inicia el periodo de lactancia. (Rosenblatt y Lehrman, 1963; Melo y Fleming 2006; Ugarte y cols., 2013; González-Mariscal y Melo, 2013).

En todas las especies de mamíferos el amamantamiento es el componente conductual más importante de la CM, pues está involucrado directamente en proveer de alimento a la progenie. La leche materna también contiene factores bioactivos que incrementan el sistema inmune inmaduro de la cría, brindando protección contra infecciones y otros factores que ayudan a la digestión, absorción de nutrientes y al su neuro desarrollo, tales como, inmunoglobulinas, lipasa estimulada por las sales biliares y ácidos grasos polinsaturados de cadena larga entre otros. (Melo, 2015; Bautista, 2015; OMS 2009).

Para el estudio de la participación de los factores ambientales involucrados en la expresión de la CM se han utilizado diversos modelos animales como: “manipulación” o “handling”, destete temprano, separación materna parcial o repetida (SMP) y privación materna total y crianza artificial (CA) (Melo, 2015; Lomanowska y Melo, 2016). Este último modelo animal ha sido útil para evaluar la participación específica de cada una de las señales o estímulos que provienen de la madre, y de los hermanos de camada, durante el período postnatal pre-destete, sin causar estrés crónico ni desnutrición (Lomanowska y cols., 2011; Lomanowska y Melo, 2016).

### **3. MODELO DE SEPARACION MATERNA TOTAL Y CRIANZA ARTIFICIAL**

Los primeros estudios que dieron origen al paradigma de crianza artificial (CA) fueron los relacionados a la nutrición de las crías en el periodo de lactancia. Esta técnica permitía controlar la cantidad y composición de la formula láctea que recibía cada cría, permitiendo así estudiar los efectos de la desnutrición o sobre nutrición en este periodo (Patel y Hiremagalur, 1992; Hall, 1975; Smart y cols., 1983). Estos estudios también mostraron que las crías que recibían diariamente estímulos táctiles durante las primeras 3 semanas de vida difirieron significativamente en características fisiológicas y del comportamiento en la vida adulta, comparado con crías que no recibieron estimulaciones táctiles (Lenz y cols., 2007; Pérez-Torrero, 2015). El mayor uso de dicho modelo ha sido para evaluar la participación de la conducta materna sobre el desarrollo de las crías (Lomanowska y Melo, 2016).

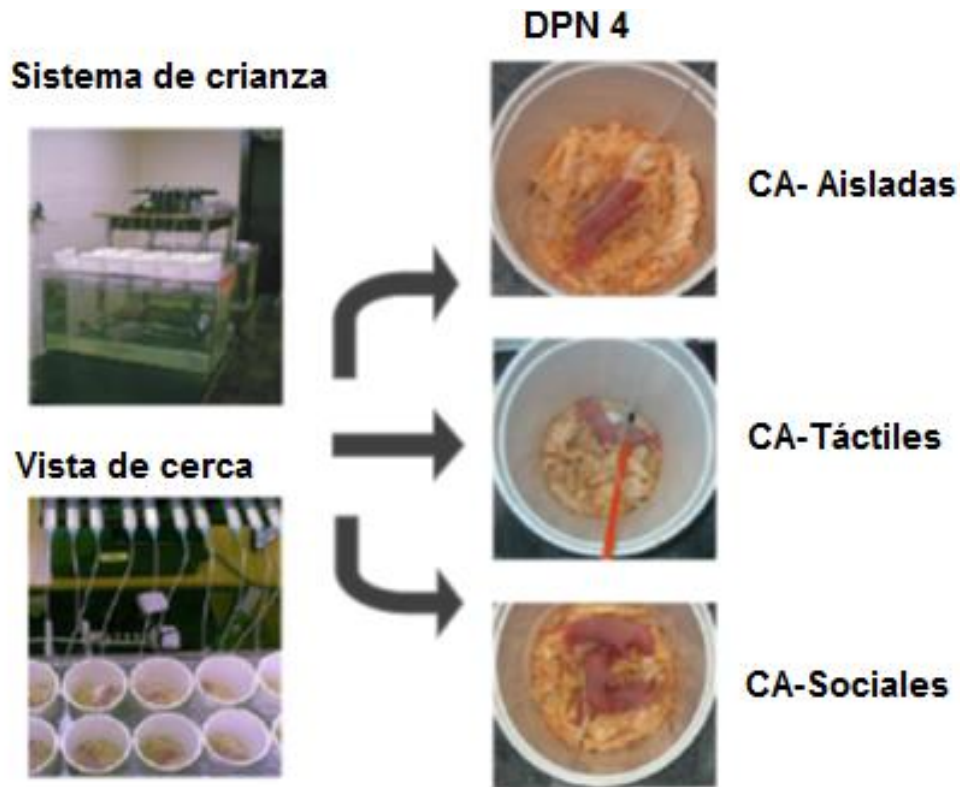
Se han utilizado diferentes protocolos de separación, en la que se varía el número de días de separación de las crías y de la etapa de desarrollo que se encuentran estas, dentro de estos protocolos, los más utilizados son la separación materna parcial y separación materna total. La separación materna parcial consiste en separar a las crías del ambiente materno de 3, 6 o 24 horas diarias durante los primeros 10 a 14 días de vida. En cuanto a la separación materna total consiste en separar a las crías totalmente del nido a partir del día 3 ó 4 de vida hasta el destete, manteniéndolas dentro de un sistema de crianza artificial para proveerles calor, protección y nutrimentos (Melo, 2015; Lomanowska y Melo, 2016). Este paradigma utiliza el sistema de “crianza artificial” de Hall (1975) que consiste en separar a las crías del nido y criarlas sin la madre dentro de una incubadora, donde se les provee de calor, protección y alimentación. Una vez que se separan a las crías del nido se les implanta un catéter en el estómago o en la mejilla, que a su vez está conectado a una jeringa que contiene una fórmula láctea con macro y micronutrimentos similares a los de la leche materna de rata (Messer y cols., 1969). En general, las formulas artificiales de leche han mostrado ser una alternativa nutricional que satisface las necesidades de las crías (Auestad y cols., 1989). La jeringa se conecta durante las 24 horas del día a una bomba de infusión Harvard que suministrar leche por 10 minutos cada hora (figura 1), esta técnica permite la privación crónica del cuidado materno sin comprometer el estado nutricional. También las crías reciben estimulación ano-genital dos veces al día con un pincel de cerdas finas, con la finalidad de simular el lamido que provee la madre para estimular la micción y defecación (Melo, 2006).

Con respecto a la fórmula láctea empleada en esta técnica de crianza artificial, hay claras diferencias entre esta y la leche de rata, como la falta de hormonas y factores de crecimiento, lo que sucede con las fórmulas para bebé en humanos (Savino y cols., 2009). Otra diferencia es que la composición de la fórmula láctea sigue siendo la misma a través del desarrollo de las crías, donde las concentraciones de macro y micro nutrientes no cambian, como lo reportan en animales alimentados por la madre. También se conoce que el tipo de proteína utilizada varía en cada tipo de fórmula, en algunos estudios han utilizado caseína, otros suero de leche o proteína de soya. (Auestad y cols., 1989; Dymysza y cols., 1964; Messer y cols., 1969).

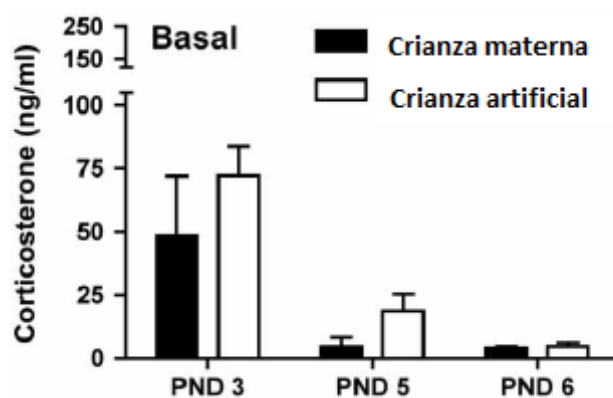
Se ha propuesto que este modelo de separación materna total no es un modelo de estrés crónico, ya que Lomanowska y colaboradores en el 2011, reportaron que al medir concentraciones basales de corticosterona un día después de iniciar la crianza artificial, en los días 3, 5 y 6 postnatal, no se encontraron diferencias significativas respecto al grupo criado por su madre, aunque esta concentración fue más alta al 3 DPN y la más baja fue a las 6 DPN. Sin embargo existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes edades (Figura 2) (Lomanowska y cols., 2011).

Uno de los beneficios principales de este paradigma es que es posible estudiar el papel de cada una de las variables que participan en la interacción madre-hijo, por lo que esta técnica permite no solo evaluar la participación global de los factores o señales sensoriales y sociales provenientes de la madre y de los compañeros de camada, sino también de determinar experimentalmente, cual o cuales de las señales involucradas participan en el desarrollo de determinados sistemas neuroendocrinos o conductuales (Melo, 2015; Lomanowska y Melo,

2016). Los primeros trabajos que estudiaron los efectos de la separación materna en ratas mostraron que estas se afectaban en características conductuales como agresividad, ansiedad, depresión y conductas maternas anormales, déficit en el aprendizaje social, déficit en la expresión de la conducta sexual en machos (Levine, 2001; Melo, 2015; Lomanowska y Melo, 2016). Además se ha reportado que la adición de estímulos sensoriales, previene parcialmente algunos de los efectos negativos sobre la conducta materna (González y Fleming, 2002; González y cols., 2001; Lenz y cols., 2007). El modelo de crianza artificial se sugiere tiene validez como un modelo animal de la atención institucional debido a que se pueden replicar algunos de los aspectos en los niños que viven en orfanatos, por ejemplo el aislamiento social. Nelson y colaboradores reportaron en un estudio realizado en Bucharest Rumania, que los niños que vivieron en orfanatos del nacimiento hasta los dos años de edad, muestran alteraciones neurológicas tales como, coeficiente intelectual más bajo, actividad eléctrica cerebral deficiente y una reducción del volumen cerebral, así como menos habilidades para relacionarse respecto a los niños que nunca vivieron en orfanatos o niños que crecieron en hogares de acogida. (Nelson y cols., 2013; Almas y cols., 2012)



**Figura 1. Esquema del sistema de crianza artificial (CA).** La fórmula de leche se administra con una bomba de infusión, mientras que las crías se encuentran en botes individuales que están en contacto con agua caliente dentro de un acuario. Las crías CA-Aisladas, reciben mínima estimulación táctil en la región ano-genital, mientras que las crías CA-Táctiles reciben simulación de lamido materno adicional como estimulación táctil a lo largo de su cuerpo. Las Crías CA-Sociales son alojadas con dos de sus compañeros de camada recién alimentadas que se reemplazan cada 12 horas, todos los días. **Modificado de**



**Figura 2. Concentración basal de corticosterona al 3, 5 y 6 DPN después de 1 día de crianza artificial.** No hubo diferencias entre los grupos de crianza artificial en comparación con el grupo criado por su madre. **Modificado de Lomanowska y cols. ,201**

#### **4. TEORÍA DE LA PROGRAMACIÓN METABÓLICA EN EL DESARROLLO**

Investigaciones científicas han demostrado que la salud está íntimamente relacionada con la calidad de vida en las primeras etapas del crecimiento. El ambiente perinatal subóptimo puede programar la predisposición para el desarrollo de enfermedades crónicas, incluyendo la alteración del metabolismo de hidratos de carbono y de lípidos. En el campo de la biología del desarrollo se ha propuesto que los estímulos positivos o adversos endógenos (señalización hormonal) o exógenos (ambiente), durante etapas tempranas de la vida tienen efectos permanentes a través de un proceso de programación que se expresan en etapas posteriores de la vida (Perea-Martínez, 2012).

Aportaciones llevadas a cabo respecto a este fenómeno, fueron basadas en observaciones epidemiológicas, realizadas por la aparición de obesidad y problemas metabólicos, principalmente relacionados con diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares en individuos concebidos durante el llamado *Invierno de hambre Holandés*. A este periodo se le conoce como el periodo de hambruna ocurrido durante la ocupación alemana de los países bajos durante la Segunda Guerra Mundial, de noviembre de 1944 a mayo de 1945. Durante estos seis meses, las raciones de alimento se redujeron de aproximadamente 1800 Kcal/día a 600 Kcal/día y posteriormente al terminar la invasión, aumentaron a 1700 Kcal/día (Schulz, 2010; Roseboom, 2006); interesantemente el peso de estos sujetos que padecieron este periodo de hambruna no pareció afectado por dicho “reto” en su desarrollo, pues aunque esta exposición fue en los dos primeros trimestres de la gestación, los efectos se observaron hasta la adultez temprana, donde se encontró una clara relación

ya que ellos presentaron un riesgo dos veces mayor de sufrir problemas metabólicos en la vida adulta (Roseboom, 2006, Ravelli, 1976)

Fue hasta 1986 cuando el Dr. David Barker de la Universidad de Southampton, Inglaterra, propuso la idea de una correlación entre el bajo peso al nacimiento y el riesgo a enfermedades coronarias en la vida adulta (Barker y cols., 1989). Este fue el inicio de varios estudios epidemiológicos y con modelos animales, encaminados a identificar la relación que existe entre la talla y peso del neonato con la hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, obesidad, dislipidemias e intolerancia a la glucosa (Barker 1998). Entonces surge el término: “hipótesis en los orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD)”, por sus siglas en inglés, antes conocido como “programación del desarrollo”, que propone que la fisiología y el metabolismo fetal y neonatal pueden ser alterados por cambios durante una ventana de tiempo crítica del desarrollo, como la gestación y la lactancia (Barker y cols., 1989; Mc Millen y Robinson, 2005; Durán, 2004).

El primer principio importante de esta hipótesis es que existen ventanas de tiempo críticas en un período temprano de la vida, cuando los órganos son vulnerables a cambios tales como la disminución de la oxigenación, el suministro de nutrientes y la alteración en la exposición a las hormonas (Nathanielsz, 2006). Dichos cambios pueden inducir respuestas fisiológicas/metabólicas permanentes que se asocian con el desarrollo de enfermedades en el adulto. El feto metabólicamente programado presenta modificaciones permanentes en la estructura y fisiología de órganos, así como alteraciones en la expresión de genes involucrados en su propio metabolismo,

por lo que el fenotipo del adulto es la suma de los factores genéticos, así como de la influencia del ambiente fetal y posnatal (Mc Millen y Robinson, 2005).

Otras aportaciones fueron las observaciones realizadas en el Reino Unido y en Suecia en 1934, donde encontraron que la tasa de mortalidad se veía incrementada en un grupo específico de edad, por lo que analizaron la fecha de nacimiento de estos individuos y el día de defunción, así como, las causas de su muerte las cuales fueron por isquemia del corazón (Srinivasan y Mulchand, 2008). Esta hipótesis, que podía ser explicada por una relación entre una pobre nutrición en el período fetal y posnatal temprano y la presencia posterior de enfermedad cardiovascular, fue apoyada por un estudio en hombres de Inglaterra de 64 años de quienes se tenía su historia de peso al nacer y a quienes se les practicó una prueba de tolerancia a la glucosa posteriormente. (Bruce y Hanson, 2010). Este experimento permitió concluir que existía una relación inversa entre la presencia de intolerancia a la glucosa o diabetes y el bajo peso al nacer, relación que se mantuvo a lo largo de todos los pesos obtenidos al nacimiento ya que se notó que los individuos que nacieron con peso menor a 2.5 Kg, tenían siete veces más probabilidad de sufrir intolerancia a la glucosa o diabetes que aquellos con peso mayor a 4.5 Kg (Fall, 1995; Stocker y Cawthorne 2008).

Posteriormente surgió una nueva teoría conocida como genotipo-fenotipo ahorrador: la cual propone que una deficiente nutrición fetal puede alterar y/o adaptar el desarrollo de diferentes tejidos, entre ellos, el páncreas y que frente a un ambiente de abundancia en la vida adulta, darán lugar a la aparición de intolerancia a la glucosa, así como problemas metabólicos (Manuela-Belén y cols., 2007; Sánchez-Serrano y Lamas, 2011).

De esta manera se refuerza la idea de que los problemas metabólicos que se padecen en la vida adulta, podrían estar fuertemente vinculados desde la vida temprana, esto por un ambiente de privación nutricional o lo contrario un exceso de ellos. Estos hallazgos han sido reproducidos en diversos modelos mostrando que esta relación existe; sin embargo, las bases moleculares son desconocidas y los papeles relativos que juegan los genes y los factores ambientales son muy debatidos (Nathanielsz, 2006). Hasta el momento podemos concluir que los orígenes de las enfermedades crónicas no está estrictamente limitada por los genes heredados y/o la vida sedentaria si no por las experiencias durante la vida temprana las cuales pueden contribuir a la programación metabólica, conduciendo a enfermedades en la vida adulta. El surgimiento de este nuevo campo de la programación del desarrollo ofrece, por lo tanto, una ruta adicional para explicar la etiología de las enfermedades crónicas de aparición en la edad adulta y nos permite seguir investigando en un campo más específico las causas y raíces de estas enfermedades.

## **5. MODELOS ANIMALES DE PROGRAMACIÓN METABÓLICA**

Diversos modelos animales han sido diseñados para estudiar los efectos de la programación del metabolismo durante el desarrollo. Ésta se puede definir como el proceso a través del cual los retos nutricionales o de otro tipo de reto ambiental (p.e., estrés), que ocurren durante una ventana crítica de desarrollo fetal o neonatal provocan cambios que pueden persistir por largo tiempo en el fenotipo de la descendencia (Mulchand, 2011; Cervantes-Rodríguez y cols., 2014). Los principales modelos se enfocan en los efectos de la nutrición

materna como inductor de programación metabólica en la progenie, algunos de estos son, la restricción de proteína durante la gestación y/o lactancia, y exposición a las crías a dietas altas en hidratos de carbono o lípidos en el periodo de amamantamiento restricción calórica del 50 y 30 por ciento, así como exposición sacarosa o dietas altas en grasa en la vida en la etapa adulta como un segundo reto, simulando malos hábitos de alimentación (Patel y Srinivasan, 2006 ). La mayoría de estos estudios tienen como resultado altas concentraciones séricas de insulina, triglicéridos, colesterol, leptina, aumento en los depósitos de tejido adiposo y en el tamaño del adipocito, lo que sugiere que la programación metabólica predispone a manifestación de enfermedades cardiovasculares y/o metabólicas (Nathanielsz, 2006; Cervantes-Rodríguez y cols., 2014; Mela y cols., 2012). Se ha propuesto que las variaciones en el suministro de nutrimentos durante el desarrollo temprano, pueden ser una señal de procesos adaptativos de la programación que predisponer a la obesidad en adultos (Barker y cols., 1989; Mulchand, 2011). En cuanto a los modelos animales de restricción de proteína en la dieta de madres gestantes, los resultados son contradictorios, p.e., algunos estudios han encontrado que el peso al nacer en las crías es bajo (Zambrano y cols., 2005), sin embargo, otros estudios han reportado un incremento en el peso al nacer o ningún efecto (Bautista y cols., 2009; Cervantes-Rodríguez y cols., 2014). Por el contrario, varios modelos animales se han implementado para estudiar los efectos del exceso de alimentos ricos en grasa (HFD, por sus siglas en ingles *high fat diet feeding mothers*) durante la gestación y la lactancia para desarrollar obesidad materna. Como resultado, las crías provenientes de estas madres, son más pesadas, desarrollan hiperglucemia, hiperleptinemia y tiene mayor contenido de

tejido adiposo y esteatosis hepática al destete, comparadas con las crías de madres control (Taylor y Poston, 2007; Bautista y cols., 2009).

Otro modelo animal usado para estudiar la programación del desarrollo en el metabolismo es la separación materna parcial (SMP), éste consiste en apartar a la rata madre de la camada por períodos de 3, 6 ó 24 horas al día, durante el período hiporesponsivo al estrés (del dpn 4 al 14). Este procedimiento ha sido considerado más como un modelo de estrés crónico temprano que, como un modelo de separación materna *per se* (Kuhn y Schanberg, 1998; Ogawa y cols., 1994). Los principales efectos, a largo plazo, se han encontrado en los sistemas cognitivos, neuroendócrinos, emocionales, neurobiológicos y conductuales (Melo, 2015; González-Mariscal y Melo, 2017). De manera interesante, recientemente se ha propuesto que este modelo también tiene efectos sobre la programación metabólica en la progenie, sin embargo existe poca evidencia al respecto, y mucho menos se sabe acerca de los mecanismos implicados en dichos procesos. Por ejemplo, se ha encontrado que la SMP de 24 horas durante el periodo postnatal pre-destete, reduce el peso corporal y los niveles circulantes de leptina en ratas con una dieta estándar de laboratorio, cuando son adultos (Viveros y cols., 2010; Mela y cols., 2012). Estos resultados sugieren que el paradigma de SMP es un modelo que podría ser útil para evaluar la participación de la experiencia temprana en la programación metabólica de la progenie, independientemente de la experiencia de dietas hiper o hipocalóricas/lipídicas. Sin embargo, debido a que a dicho paradigma se le ha implicado como un modelo de estrés crónico, aunado a una posible desnutrición y/o deshidratación, la interpretación de los resultados es controversial. De modo similar, crías que sufrieron SMP y que fueron sometidas

a una dieta alta en grasa al destete como un segundo reto, presentan ganancia de peso, una ingesta mayor de calorías, aumento de niveles de insulina, los niveles de triglicéridos y en los niveles de leptina, en comparación con los grupos controles (Mela y cols., 2012). También se ha encontrado que crías que sufrieron SMP y estrés en el periodo postnatal pre-destete, presentan perturbaciones en la calidad del crecimiento y específicamente en el aumento de los depósitos de tejido adiposo abdominal, el desarrollo de obesidad y otros efectos sobre el metabolismo (Moyer-Mileur y cols., 2010).

Con la finalidad de determinar los mecanismos implicados en estos procesos, así como de proponer estrategias de prevención y de reversión de los efectos negativos de experiencias adversas tempranas, se ha utilizado la técnica del reemplazo de estímulos táctiles sensoriales. Por ejemplo, en humanos se ha encontrado que la técnica del “canguro” o “skin-to-skin” en infantes prematuros y de bajo peso corporal durante los primeros días de vida, aceleran el crecimiento y desarrollo de éstos (Field y cols., 2010). En los modelos animales de separación materna parcial y privación materna a través de la crianza artificial (Melo y Fleming 2006, Lomanowska y Melo, 2016), el reemplazo de estímulos sensoriales (táctiles) con un pincel de cerda finas (5-8 veces al día) o sociales (se colocan 1-2 crías de madres donadoras dentro del recipiente de aislamiento) durante el aislamiento previene la mayoría de los efectos del aislamiento (Gonzalez y cols., 2002; Lovic y Fleming, 2015; Melo y cols., 2006, 2009; Ver Lomanowska y Melo, 2016).

Estos efectos también han sido replicados en el paradigma de SMP, p.e, la estimulación mecánica táctil previene la hiperinsulinemia y el incremento de corticosterona inducida por la SMP, la hipoxia y la hiperoxia (Moyer-Mileur y

cols., 2010). Estos datos sugieren que los estímulos sensoriales, específicamente los táctiles, durante el periodo postnatal pre-destete, son críticos para el desarrollo de los neonatos, y podrían participar en la programación metabólica de éstos.

## **6. GENERALIDADES DE TEJIDO ADIPOSO**

En los mamíferos, existen dos tipos principales de tejido adiposo, blanco y marrón o también llamado pardo, este se desarrolla de forma embrionaria, aunque en humanos se pensaba que el tejido adiposo marrón estaba restringido a un depósito interescapular en bebés y adultos expuestos crónicamente a un frío extremo. Pruebas más recientes sugieren que los adipocitos marrones, poseen características tanto de adipocitos marrones como blancos (Zwick y cols., 2018). Los adipocitos marrones, con un diámetro promedio, son más pequeños que los adipocitos del tejido adiposo blanco, la grasa parda deriva su color de la extensa vascularización y la presencia de muchas mitocondrias densamente empacadas, este atravesado por muchos más vasos sanguíneos que la grasa blanca, estos vasos sanguíneos ayudan a suministrar combustible para el almacenamiento y la oxidación, y dispersan el calor generado por las numerosas mitocondrias a otras partes del cuerpo (Do Nascimento y cols., 2009).

Por otro lado el tejido adiposo blanco que se compone principalmente de adipocitos grandes que albergan una gota de lípidos y una cantidad notablemente menor de mitocondrias que los adipocitos marrones (Ottaviani y cols., 2011) se distribuye por todo el cuerpo en varios depósitos distintos en

humanos. Los sitios incluyen: omental, mesentérico, retroperitoneal, gonadal y pericárdico, infiltrándose, casi toda la región por vía subcutánea, órganos y vísceras huecas de la cavidad abdominal o mediastino y varios grupos musculares, para los cuales ofrece protección mecánica, suaviza el impacto de los choques y permite un deslizamiento adecuado de paquetes de músculos, uno sobre otro, sin comprometer su integridad funcional (Zwick y cols., 2018 ).

El tejido adiposo blanco es un órgano metabólicamente dinámico que es el sitio principal de almacenamiento de energía en exceso, pero sirve como un órgano endocrino capaz de sintetizar una serie de compuestos biológicamente activos que regulan la homeostasis metabólica (Do Nascimento y cols., 2009). Este tejido está compuesto no solo de adipocitos, sino también de otros tipos de células llamadas fracción estroma-vascular, que comprende células sanguíneas, células endoteliales, pericitos y células precursoras de tejido adiposo, entre otros (Ottaviani y cols., 2011).

La adipogénesis se refiere a la diferenciación de los pre-adipocitos en células grasas maduras, es decir, el desarrollo de tejido adiposo, que varía según el sexo y la edad. Los adipocitos se diferencian de las células precursoras estrelladas o fusiformes de origen mesenquimatoso. Los pre-adipocitos dentro del tejido adiposo pueden diferenciarse en adipocitos maduros a lo largo de la vida, permitiendo así la expansión hiperplásica del tejido adiposo cuando se necesitan mayores requisitos de almacenamiento (Coelho y cols., 2013). Además, los adipocitos maduros pueden expandirse en tamaño para adaptarse a las mayores necesidades de almacenamiento y en situaciones de sobrealimentación se vuelven hipertróficas. Como resultado, el número de adipocitos y la morfología se transforman en respuesta al balance energético a

través de los procesos bioquímicos involucrados en la captación de lípidos, la esterificación, la lipólisis y la diferenciación de los pre-adipocitos (Ottaviani y cols., 2011).

La lipoproteína lipasa (LPL) tiene su sitio de acción fisiológica en la superficie luminal de las células endoteliales capilares, donde la enzima hidroliza el componente triacilglicerol (TAG) de las partículas de lipoproteína circulantes, quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad para proporcionar ácidos grasos libres y 2-monoacilglicerol para la utilización de tejidos (Bernlohr 2002).

La mayoría de los triacilgliceroles plasmáticos son proporcionados por los lípidos de la dieta, que se secretan del intestino en forma de quilomicrón o del hígado en forma de VLDL, liberados en circulación como ácidos grasos no esterificados por lipoproteínas lipasa, son captados por el tejido adiposo blanco (Bernlohr, 2002; Coelho y cols., 2013). La actividad de la LPL se puede alterar de manera específica para el tejido, lo cual es fisiológicamente importante porque dirige la utilización de los ácidos grasos, según las demandas metabólicas, de los tejidos individuales, de modo que la degradación de las lipoproteínas ricas en triacilglicerol se puede dirigir a sitios específicos (Diez, 2003). Por otro lado, la concentración de insulina en plasma parece ser más importante que la prolactina para controlar la actividad de la LPL y el depósito de lípidos en tejido adiposo blanco durante la lactancia y después del destete. La insulina aumenta la expresión del gen LPL y la actividad en adiposo blanco (Bullo, 2003).

La lipogénesis de *novo* es una vía importante para convertir el exceso de carbohidratos ingeridos en triacilglicerol para ser almacenado en el tejido adiposo blanco. Factores fisiológicos como la dieta y el ayuno regulan esta ruta

metabólica, que también se modifica en condiciones patológicas (Coelho y cols., 2013). En los humanos, La lipogénesis ocurre preferentemente en el tejido adiposo pero también el hígado es responsable de la conversión del exceso de carbohidratos en la dieta en ácidos grasos, a través de la lipogénesis de *novo* (Bullo, 2003). En modelos experimentales las ratas obesas tienen una alta tasa de *novo* de tejido adiposo blanco y de lipogénesis hepática en comparación con las magras. El efecto de los glucocorticoides sobre la lipogénesis de *novo* es controvertido, un estudio previo mostró que, *in vivo*, esta hormona causa una disminución en la actividad de las enzimas lipogénicas en el tejido adiposo blanco, es bien sabido que la insulina es la hormona lipogénica más importante (Gray y Vidal-Puig, 2007).

El tejido adiposo se considera como el órgano de almacenamiento más grande del cuerpo para obtener energía en forma de triacilgliceroles, que se movilizan a través de la vía de la lipólisis para proporcionar combustible a otros órganos. La liberación de ácidos grasos no esterificados (NEFA) es una función específica para el tejido adiposo; de hecho, no se sabe de ningún otro tejido en el cuerpo de los mamíferos que movilice NEFA y los libere a la circulación para que otros tejidos lo absorban (Diez, 2003). La lipasa sensible a hormona (HSL) existe en dos formas: una forma activa fosforilada y una forma inactiva (o menos activa) no fosforilada, y esta interconversión está regulada por la acción hormonal. La fosforilación de HSL da como resultado un aumento de la actividad hidrolítica, la translocación de HSL desde el citosol a la superficie de la gota de lípidos y una mayor degradación de TAG en la célula (Zwick y cols., 2018). Junto con la insulina y las catecolaminas, la lipólisis es estimulada, bajo estricta regulación, por las catecolaminas, el glucagón, la hormona

adrenocorticotrófica (ACTH), la hormona del crecimiento, la testosterona, el péptido natriurético auricular y la leptina (Frühbeck y cols., 2001).

A través del descubrimiento de la capacidad de segregar hormonas, se ha atribuido gran importancia al papel del tejido adiposo. El tejido adiposo blanco puede representar el tejido endocrino más grande de los humanos, se basa en la capacidad de las células grasas de segregar numerosas hormonas, factores de crecimiento, enzimas, citoquinas, factores del complemento y proteínas de la matriz (tabla 1) (Coelho y cols., 2013; Zwick y cols., 2018). El tejido adiposo también expresa receptores para la mayoría de estos factores que están implicados en la regulación de muchos procesos, incluida la ingesta de alimentos, el gasto de energía, la homeostasis del metabolismo, la inmunidad y la sangre. Los datos experimentales sugieren que existen algunas diferencias, con respecto a la síntesis y secreción de adipocinas, entre la grasa visceral y el tejido adiposo subcutáneo, ya que la grasa visceral parece ser más activa. La reducción de la grasa visceral, por lo tanto, podría ser una medida preventiva esencial de enfermedades metabólicas (Ottaviani y cols., 2011; Gray y Vidal-Puig, 2007).

**Tabla 1. Factores secretados por el tejido adiposo**

Molécula	Función/efecto
Leptina	Señales al cerebro sobre las reservas de grasa corporal. Regulación del apetito y gasto energético.
Adiponectina	Juega un papel protector en la patogénesis de la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular
Resistina	Se sugiere que tiene un efecto sobre a resistencia a la insulina
TNF- $\alpha$	Afecta la señalización del receptor de insulina, posible causa del desarrollo de resistencia a la insulina en la obesidad
IL-6	Pro-inflamatoria, metabolismo de glucosa y lípidos
Angiotensinógeno	Precursor de Angiotensina II, regula presión sanguínea
Adiposina	Relación potencial entre la vía del complemento y el metabolismo del tejido adiposo.
Glicerol	Componente estructural de las principales clases de lípidos biológicos y precursor gluconeogénico.
AGL	Oxidado en los tejidos para producir energía local. Servir como sustrato para triglicéridos y síntesis molecular estructural.
IGF-1	Estimula la proliferación de una amplia variedad de células y medía muchas células y muchos de los efectos de la hormona del crecimiento.

TNF- $\alpha$  –Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , IL-6 – interleucina-6, PAI-1 – plasminogen activator inhibitor 1, AGL – Ácidos Grasos Libres, IGF-1 –Factor de crecimiento similar a la insulina

## **7. HORMONAS REGULADORAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO**

### **7.1 LEPTINA**

En 1953, se propuso la teoría lipostática en la que sugería que el hipotálamo controla el consumo de alimentos para regular las reservas de grasa corporal, con el tiempo, se aceptó que los cambios en el peso corporal de un adulto se determinan principalmente por los cambios en la masa grasa corporal. Modelos animales con ratones genéticamente obesos demostraron la presencia de un factor en la regulación por retroalimentación del contenido de grasa corporal. En 1994, el grupo de Friedman, identificó este factor circulante como una

proteína ob que ahora se conoce más comúnmente como leptina (Zhang y cols., 1994)

La leptina es un péptido glucosilado de 16 KD, está constituido por 167 aminoácidos y tiene un puente disulfuro necesario para su actividad biológica. El primero sitio de producción de leptina, es el tejido adiposo blanco, pero también es expresado en otros órganos, como en el estómago, pulmones, placenta, posiblemente en el cerebro y en la leche materna de mamífero (Fruhbeck, 2001). En el tejido adiposo de roedor, la expresión de la leptina se hace evidente después de la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos que coinciden con las etapas iniciales de la acumulación de lípidos en las células. La tasa de aumento en la expresión es proporcional al tejido adiposo blanco y, aunque la expresión de leptina varía entre los diferentes depósitos de grasa, muestra una fuerte correlación con el tamaño de los adipocitos (Zavala, 2008). La liberación de esta hormona es pulsátil y existen oscilaciones diurnas independientemente de los cambios relacionados con el peso, en los humanos, las concentraciones de leptina son más altas durante la noche que durante el día, y también se correlaciona con el índice glucémico de los alimentos, por el contrario, el ayuno o la exposición al frío, inhiben la producción y liberación de leptina; el aumento de la expresión de leptina y la secreción de los adipocitos se ha relacionado con la estimulación de insulina, la captación de glucosa celular y la disponibilidad de sustratos de energía, todos los cuales son indicativos de un estado anabólico. La activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos o la elevación de AMPc intracelular inhiben la expresión de leptina, al igual que la exposición a ácidos grasos libres, cada uno de los cuales puede ser indicativo de un estado de movilización de energía (Harris, 2014).

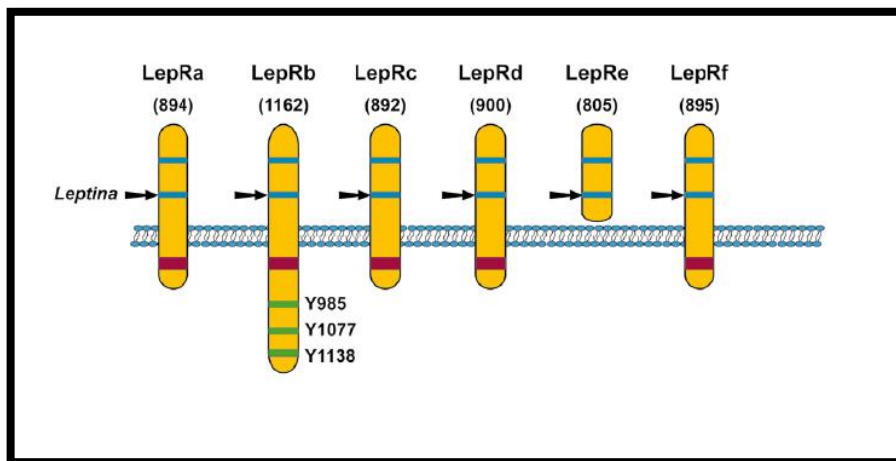
Los niveles de leptina circulantes reflejan el estado de las reservas de energía del cuerpo, la señalización de leptina permite el gasto de energía en los procesos de reproducción y crecimiento y, la caída en los niveles de leptina cuando las reservas de energía son inadecuadas (por ejemplo, durante la inanición) aumenta el apetito y disminuye la utilización de la energía. Por el contrario, cuando los depósitos de energía son adecuados, los altos niveles de leptina disminuyen el impulso para comer y permiten la utilización de la energía (Bates y Myers, 2003). Por lo tanto, los individuos obesos tienen niveles elevados de leptina circulante que no logran mediar en la pérdida de peso, lo que indica que en la mayoría de los seres humanos la obesidad representa una forma de resistencia a la leptina, Se han postulado varios mecanismos que subyacen a la resistencia a la leptina, incluidos los defectos en el acceso de la leptina al cerebro, la señalización de LRB y las vías o neuronas que median la acción de la leptina río abajo, sin embargo no hay resultados concluyentes (Buettner 2008; Harris, 2014 ).

Existen múltiples isoformas del receptor de leptina (ObRa-ObRf), tienen la estructura de los receptores de citoquinas de clase I, los diferentes subtipos de receptores tienen secuencias intracelulares de diferente longitud y ObRb es el único receptor que incluye los dominios de unión necesarios para la señalización de JAK-STAT. Se ha demostrado que este receptor de forma larga (ObRb) activa los transductores de señal de los factores de transcripción y el activador de transcripción (STAT), además de fosforilar la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) 1 y 2 y el aumento del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) y la PI 3-quinasa asociada a IRS-2. La interrupción del sitio de unión de STAT3 en ObRb da

como resultado una hiperfagia, un gasto energético reducido y un grado de obesidad equivalente al de los ratones deficientes en ObRb, este receptor se expresa también en diversos núcleos neuronales del sistema nervioso central, incluyendo los núcleos hipotalámicos arcuato (ARC), dorsomedial (DMH), paraventricular, ventromedial (VHM) y lateral, el núcleo de rafe, el hipocampo, la amígdala, el área ventral tegmental, el área de postrema y el núcleo del tracto solitario (Goldenberg, 2014). Estos núcleos hipotalámicos, que forman el llamado "centro de saciedad", son sitios cruciales de la acción de la leptina, dentro de estos núcleos, el ARNm de LRb se expresa más altamente en el ARC, donde se encuentra en al menos dos poblaciones distintas de neuronas, una población sintetiza el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con agouti (AgRP) y la otra sintetiza pro-opiomelanocortina (POMC), este procesa para producir el potente péptido anoréxico (supresor del apetito), una hormona estimulante de melanocitos (αMSH) y NPY es una hormona orexigénica (estimulante del apetito). La leptina actúa a través de LRb estimula la producción de neuropéptidos anoréxicos y suprime los niveles de péptidos orexigénicos. Las propiedades neuroquímicas de las neuronas en el DMH, VHM y en otros lugares (incluido el tronco del encéfalo) que expresan el ARNm de LRb son poco conocidas (Granado y cols., 2012).

Además de su papel en la gestión del equilibrio energético, existe evidencia de que la leptina desempeña un papel en el desarrollo neonatal de estos núcleos del hipotálamo que participan en la regulación central del equilibrio energético (Stocker y Cawthorne, 2008). Un aumento de las concentraciones postnatal en la leptina plasmática ocurre en roedores durante el período de amamantamiento y podría servir como una señal clave de desarrollo para que

el hipotálamo ejerza influencia sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal subsiguientes a lo largo de la vida. Durante este período, los niveles de leptina materna se suprimen, lo que permite una modulación positiva en el apetito en la madre. Por lo tanto, la leptina juega un papel importante durante el período de amamantamiento tanto en el equilibrio energético como en el metabolismo materno infantil. En experimentos cuando las ratas neonatales recibieron leptina por vía oral, es absorbida por el epitelio gástrico inmaduro del neonato y puede ejercer sus efectos al disminuir la producción de leptina endógena y la señalización a través del receptor de leptina en el intestino, y desempeñar un papel potencial en el control a corto plazo de la ingesta de alimentos durante la lactancia. Cuando se alimentó a estos cachorros con alimento sólido alta en grasas durante el destete, las ratas que recibieron leptina oral durante el período de amamantamiento cuando adultos mostraron una reducción del peso corporal y del tejido adiposo (Stocker y Cawthorne, 2008; Granado y cols., 2012; Bouret y cols., 2006).



**Figura 3. Las distintas isoformas del receptor de leptina.** Son codificadas por un único gen (*LEPR*) que da origen a 6 isoformas (LepRa a LepRf). Todas ellas tienen distinto número de aminoácidos (señalado entre paréntesis) y comparten los dominios extracelular y transmembrana, La excepción es LepRe, que carece del dominio transmembrana y se encuentra soluble en la circulación. LepRb es la isoforma más larga y es la única que tiene los elementos estructurales necesarios para la activación de cascadas de señalización intracelular, en particular los residuos de tirosina (Y) 985, 1077 y 1138, esenciales para la interacción con otras proteínas intracelulares. Modificado de Goldenberg 2014

## 7.2 INSULINA

La insulina consiste en 51 aminoácidos con un peso molecular de 5,8 kDa, formada por la cadena "A" de 21 aminoácidos y la cadena "B" de 30 aminoácidos unida por enlaces disulfuro. La cadena A contiene varias regiones que son importantes para la unión del receptor. La insulina almacenada en células  $\beta$  del páncreas se empaqueta en "gránulos" densamente agrupados, sin embargo, el gen de la insulina codifica un precursor de 110 aminoácidos conocido como preproinsulina. Al igual que con otras proteínas secretadas, la preproinsulina contiene un péptido señal N-terminal hidrofóbico, que interactúa con las partículas de reconocimiento de señal de ribonucleoproteína citosólica (SRP). La SRP facilita la translocación de preproinsulina a través de la

membrana del retículo endoplásmico rugoso hacia la luz y después al aparato de Golgi, donde la proinsulina entra en las vesículas secretoras inmaduras y se escinde para producir insulina y péptido C y se almacena en otros gránulos (Shibasaki, 2004).

Aunque la biosíntesis de la insulina está controlada por múltiples factores, el metabolismo de la glucosa es el evento fisiológico más importante que estimula la transcripción del gen de la insulina y la traducción del ARNm (Nystrom y Quon, 1999). La insulina es una hormona importante requerida para el metabolismo normal, las células  $\beta$  detectan cambios en la concentración de glucosa en plasma produciendo una respuesta al liberar las cantidades correspondientes de insulina. Para detectar el estado nutricional, las células  $\beta$  se agrupan en islotes que se conectan estratégicamente a la vasculatura. Los capilares que rodean los islotes muestran un número notable de pequeños poros llamados fenestras que permiten un mayor intercambio de nutrientes entre la circulación y los tejidos circundantes. Esta estructura mejora la permeabilidad, permitiendo el acceso sin restricciones de nutrientes para que las células  $\beta$  puedan detectar el estado nutricional rápidamente, también permiten una rápida difusión de la insulina en la sangre. Además de la glucosa, algunos aminoácidos y ácidos grasos también regulan la secreción de insulina (De Meyts, 2004).

Las células  $\beta$  no parecen contener receptores de glucosa unidos a la membrana, el transportador de glucosa 2 (GLUT2), expresado constitutivamente en células  $\beta$ , es el primer sensor de glucosa, a diferencia de GLUT4, que se expresa principalmente en miocitos y adipocitos, la movilización de GLUT2 a la membrana plasmática es independiente de la insulina y la

proteína transportadora muestra una baja afinidad de sustrato, lo que garantiza una alta afluencia de glucosa (Fu y cols., 2013). Después de ingresar a las células  $\beta$ , la glucosa es fosforilada por la enzima glucoquinasa, esta es el paso limitante de la velocidad en el metabolismo de la glucosa de las células  $\beta$  y se considera un importante sensor de glucosa. El punto final de la glucólisis es el piruvato que luego se oxida a través del ciclo del ácido tricarboxílico por las mitocondrias en las células  $\beta$  para producir ATP. La oxidación del piruvato a través del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) por las mitocondrias es la principal vía de señalización acoplada a la “liberación de insulina dependiente del canal de potasio sensible a ATP (KATP)”, que aumenta la relación intracelular ATP / ADP, lo que secuencialmente conduce al cierre de los canales KATP, despolarización de la membrana plasmática, apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y activación eventual de la exocitosis de gránulos que contienen insulina (Huang y Arvan, 1995; Kieffer, 1997).

Por otro lado el receptor de insulina pertenece a una subfamilia de receptores tirosina quinasa, este receptor es una proteína tetramérica que consisten en dos subunidades A y dos B, la unión de la insulina a la subunidad A, conduce a la desrepresión de la actividad de la quinasa en la subunidad B seguida de una transfosforilación de las subunidades B y un cambio conformacional que aumenta aún más la actividad de la quinasa. Se han identificado al menos nueve sustratos intracelulares de las cinasas receptoras de insulina, cuatro de ellos pertenecen a la familia de proteínas del sustrato receptor de insulina (IRS). Las tirosinas fosforiladas en estos sustratos actúan como "sitios de acoplamiento" para proteínas que contienen dominios SH2 (Src-homología-2). Muchas de estas proteínas SH2 son moléculas adaptadoras, como la

subunidad reguladora PI (3) K y Grb2, la unión del sustrato a estas proteínas SH2 puede regular sus actividades, o en algunos casos su ubicación subcelular (Saltiel y Kahn, 2001).

Por otro lado, la insulina también estimula el crecimiento y la diferenciación celular, y promueve el almacenamiento de sustratos en el tejido adiposo, el hígado y los músculos mediante la estimulación de la lipogénesis, la síntesis de glucógeno y proteínas y la inhibición de la lipólisis. Los efectos de la exposición crónica a ácidos grasos son un poco menos claros, pero parecen implicar un aumento de la lipólisis en el tejido adiposo blanco como resultado de la resistencia a la insulina, un proceso que se amplifica con el aumento de peso corporal y la acumulación continua de tejido adiposo dando como resultados niveles elevados de circulación de ácidos grasos libres que tienen un efecto negativo (Fridlyand, 2004). Además, la acumulación de tejido adiposo conduce a una mayor secreción de citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6, entre otras, se ha mostrado que la expresión de TNF-  $\alpha$  aumenta en la grasa abdominal y el tejido muscular de las personas obesas, el grado de expresión de TNF-  $\alpha$  se correlaciona positivamente con el grado de obesidad y los niveles de insulina plasmática, produciendo una inflamación crónica de baja intensidad, la inflamación inhibe la actividad de señalización de la insulina en los adipocitos y hepatocitos. (Le Roith y Zick, 2001). Además, se acepta que la leptina ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de insulina. Las deficiencias de leptina se asocian con hiperinsulinemia tanto en ratones como en humanos, por el contrario la resistencia a la leptina en las células  $\beta$  puede contribuir a la producción excesiva de insulina por células beta (Ye, 2013).

### **7.3 ADIPONECTINA**

La adiponectina es una proteína de 30 kDa con una estructura terciaria, se divide en tres dominios: el dominio N-terminal, que tiene una gran variación en los aminoácidos entre las especies, el dominio tipo colágeno y el dominio globular de la región C-terminal. Esta estructura terciaria de la adiponectina revela sorprendentes similitudes con la familia del factor de necrosis tumoral (Wang y Scherer, 2016).

La adiponectina se expresa específicamente en el tejido adiposo en los adipocitos completamente diferenciados, tres importantes depósitos de tejido adiposo son reconocidos como productores de esta proteína: subcutánea, visceral y perivascular, aunque también puede ser secretada por cardiomiocitos, hepatocitos y placenta en concentraciones más bajas. Es interesante observar que los compartimentos de grasa visceral son en gran parte responsables de la secreción de adiponectina, en comparación con los depósitos subcutáneos (Bacha y cols., 2004). Los niveles de adiponectina muestran un fuerte dimorfismo sexual con las hembras que promedian el doble de los niveles observados en los machos (Combs, 2003).

El papel de la adiponectina está mediado por receptores conocidos como receptores de adiponectina 1 y 2 (Adipor1 y Aipor2). Estos receptores tienen siete porciones transmembrana, pero son funcionalmente diferentes de los receptores acoplados a la proteína G, particularmente porque tienen una polaridad opuesta (es decir, el extremo N se enfrenta al compartimento intracelular). Aunque en proporciones relativas, Adipor1 y Adipor2 pueden

variar de tejido a tejido y, en general, se expresan simultáneamente (Yamauchi T y cols., 2003).

La adiponectina funciona de manera autocrina y paracrina en el tejido adiposo, y de manera endocrina en los tejidos distales. Los efectos autocrinos se ilustran por su papel en la diferenciación de los adipocitos. (Wang y Scherer, 2016). En experimentos, en donde se induce la expresión en exceso de adiponectina, se ha mostrado que se acelera la diferenciación celular de los adipocitos, lo que llevó a un aumento de la acumulación de lípidos y una actividad de transporte de glucosa, estos hallazgos sugieren que la adiponectina suprime la producción de glucosa y / o estimula la asimilación de la glucosa independientemente de los niveles de insulina, por lo que la adiponectina promueve la diferenciación de los adipocitos y aumenta la sensibilidad a la insulina (Balsan, 2015).

Los niveles plasmáticos de adiponectina disminuyen significativamente en pacientes obesos y se correlacionan negativamente con el IMC. Las personas con DM2 tienen concentraciones más bajas de adiponectina en plasma en comparación con las personas sin diabetes, independientemente del IMC. En muchos estudios, los niveles plasmáticos de adiponectina fueron más bajos en pacientes con enfermedad coronaria. Además de que la adiponectina inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas en las células endoteliales, disminuyendo su capacidad para activarse en respuesta a varios estímulos inflamatorios (Oh y cols., 2007).

## 8. JUSTIFICACIÓN

Se ha propuesto que en la mayoría de los mamíferos incluyendo humanos, las experiencias sociales y sensoriales provenientes, principalmente, del cuidado materno, durante los períodos críticos del desarrollo (p.e., períodos prenatal y postnatal temprano), tienen efectos sobre procesos neuroendócrinos, cognitivos, emocionales, fisiológicos y conductuales del individuo (Melo, 2015; Harlow y cols., 1965). Además de las experiencias antes mencionadas, se ha propuesto la idea de que los orígenes de las enfermedades crónicas no están estrictamente limitadas por los genes heredados y/o la vida sedentaria sino por las experiencias durante la vida temprana las cuales pueden contribuir a la programación metabólica conduciendo a enfermedades en la vida adulta, esto por un ambiente de privación nutricional un exceso de estos (Barker y cols., 1989; Taylor y Poston, 2007; Mc Millen y Robinson, 2005; Duran, 2004). Recientemente se ha mostrado, en modelos animales, que ratas macho adultas que fueron sometidas a restricción de proteína durante el período intrauterino presentan incremento en el índice de adiposidad o porcentaje de grasa corporal, además, cuando estas ratas fueron expuestas a ingesta crónica (10 semanas) de sacarosa al 5%, como un segundo reto, simulando malos hábitos de alimentación, presentan un incremento en los niveles de triglicéridos, insulina, colesterol y leptina en suero y un incremento en el tamaño de los adipocitos (Cervantes-Rodriguez y cols., 2014). Datos similares han sido reportados en crías de madres que fueron desnutridas durante la lactancia (Zambrano y cols., 2006). Por otro lado, se ha propuesto que entre los factores etiológicos de estos trastornos metabólicos en el humano no solo se encuentra el aspecto nutricional sino también debido a la falta del cuidado materno, ya

que ha encontrado una relación entre la pérdida de padres (por muerte o divorcio) en edades tempranas con el desarrollo de obesidad en la etapa adulta (Alciati y cols., 2011). Por lo que se ha sugerido que esta situación de ausencia del cuidado parental pueda causar además de la privación de los estímulos sensoriales y sociales también la falta de estímulos hormonales, provenientes de la leche materna, estudios epidemiológicos sugieren que el período de lactancia es un momento crucial para determinar el aumento de peso a largo plazo y la obesidad. Se ha mostrado una mayor tendencia a la obesidad en la edad adulta entre los lactantes que fueron alimentados con fórmula en lugar de ser amamantados. Esto involucra al período de amamantamiento como un factor importante para en la regulación posterior del apetito, ya que, la leptina está presente en la leche materna, pero no en la fórmula infantil y se ha demostrado que tiene un efecto positivo sobre la saciedad y la regulación del equilibrio energético (Savino y cols., 2010).

Por otro lado, desde 1969 Messer y colaboradores, encontraron que ratas que fueron privadas del cuidado materno a través del modelo de crianza artificial (CA), mostraban un incremento en la grasa epididimal y un alto porcentaje de grasa en el hígado (Smart y cols., 1983; Messer y cols., 1969). Sin embargo se desconoce si otros parámetros metabólicos son afectados en estos animales. Similares resultados se encontraron en el modelo de separación materna parcial (tiempo 3-6 h/día) durante los primeros 12-14 DPN, procedimiento que causa estrés crónico temprano. Es decir las ratas presentan en etapa juvenil (post-destete) alteración en los niveles de glucosa, corticosterona, aumento de tejido adiposo e insulina. No obstante, si durante el aislamiento se les provee a dichas crías de estímulos táctiles simulando los lamidos de la madre, algunos

de los efectos como altas concentraciones de insulina se previenen (Moyer-Mileur y cols., 2010).

Todos estos datos sugieren que también la experiencia del cuidado materno en el periodo de amamantamiento podría participar en la programación metabólica temprana. Así con todo lo ya mencionado sugerimos que el modelo de privación materna bajo el sistema de CA podría ser adecuado para estudiar la interrelación entre la relación madre/cría y el desarrollo del metabolismo en este periodo crítico del desarrollo.

## **10. HIPÓTESIS**

- 1) La privación materna y crianza artificial durante el periodo postnatal pre-destete induce un efecto negativo en el metabolismo de las ratas macho adultas
- 2) El consumo de sacarosa crónica como un segundo reto exacerba los efectos negativos programados durante la crianza artificial
- 3) La crianza artificial con estimulación táctil durante el aislamiento previene los efectos de la privación materna y crianza artificial.

## **11. OBJETIVOS**

### **11.1 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar si la crianza artificial durante el periodo postnatal pre-destete produce un efecto negativo sobre el metabolismo de las ratas macho adultas y si la exposición a un segundo reto exacerba los efectos programados en la crianza artificial

### **11.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la concentración de glucosa, triglicéridos colesterol total, insulina, leptina, adiponectina y además el tejido adiposo, después del consumo crónico de agua con sacarosa o sin sacarosa en ratas macho adultas que fueron sometidas a crianza artificial y a la crianza materna.
2. Calcular el consumo de agua con y sin sacarosa así como la ingesta de alimento y las calorías totales consumidas
3. Evaluar los mismos parámetros metabólicos mencionados en los dos anteriores objetivos, en los animales que recibieron estimulación táctil (grupo CA-Táctil) durante la crianza artificial.

## **12. METODOLOGÍA.**

### **12.1 SUJETOS**

Se usaron ratas de la cepa Wistar proporcionadas por el Bioterio del Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA) CINVESTAV-Laboratorio Tlaxcala, Universidad Autónoma de Tlaxcala ubicado en Ixtacuixtla, Tlaxcala. A cargo del Médico veterinario Rosario Chirino Vargas 1079105. Las ratas fueron alojadas en cajas de Acrílico medianas y mantenidas en ciclos de luz/oscuridad de 12/12, la luz se encendía a las 12:00 hrs. La humedad y la temperatura se mantuvieron entre 40%-50% y 23°-24°C, respectivamente. Fueron alimentadas con una dieta especial para roedores (nutricubos) y agua ad libitum. Previamente se tomó un curso para el manejo y vías de administración para el cuidado y uso de animales de laboratorio; basada en la NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Posteriormente fueron alojadas bajo las mismas condiciones en el bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a cargo del médico veterinario Francisco Ramos Collazo 6512572.

### **12. 2 DESARROLLO EXPERIMENTAL**

En el día del parto, la camada se ajustó a 8 crías (cinco machos y tres hembras). En el día postnatal (DPN) 4, tres machos se retiraron del nido, a dos de ellas se les implantó un catéter (PE-10, Corning Clay-Adams) en la mejilla derecha y se alojaron dentro de un sistema de crianza artificial y fueron alimentadas con una formula láctea para roedores. Una de ellas se mantuvo completamente aislada dentro de un recipiente (grupo CA) y recibió dos

períodos de estimulación ano-genitales con un pincel de cerdas finas (40 segundos por período) para inducir el reflejo de micción y defecación, a las 09:00 y 18:00 horas. La segunda cría fue alojada bajo las mismas condiciones y estimulaciones ano-genitales, pero también recibió 5 estimulaciones táctiles corporales de manera céfalo-caudal, con un pincel de cerdas finas durante 90 segundos (grupo CA-Táctil). La tercera cría se identificó con un marcador de tinta permanente y se regresó al nido para ser criada por su madre (Grupo CM) (Figura 4). La crianza en todos los grupos se realizó del DPN 4 al 22, y a partir del día 18, las crías CA recibieron una mezcla de alimento para rata con la fórmula láctea para favorecer la transición de alimentación líquida a sólida. Después del destete las crías se alojaron en una caja de acrílico junto con un conspecífico del mismo grupo, misma edad y sexo, y se mantuvieron dentro del bioterio. A los 90 DPN (adultos) a las ratas de los 3 grupos se les proveyó de agua simple o agua con sacarosa al 5% durante 6 semanas. Al final de dicho período se tomaron las muestras biológicas y se siguió el procedimiento específico para la medición de los parámetros propuestos (figura 5). Esta última parte se realizó en el Instituto Nacional de ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) en el laboratorio de Biología de la reproducción a cargo de la Dra Elena Zambrano.



**C) Criado por su madre (CM)**

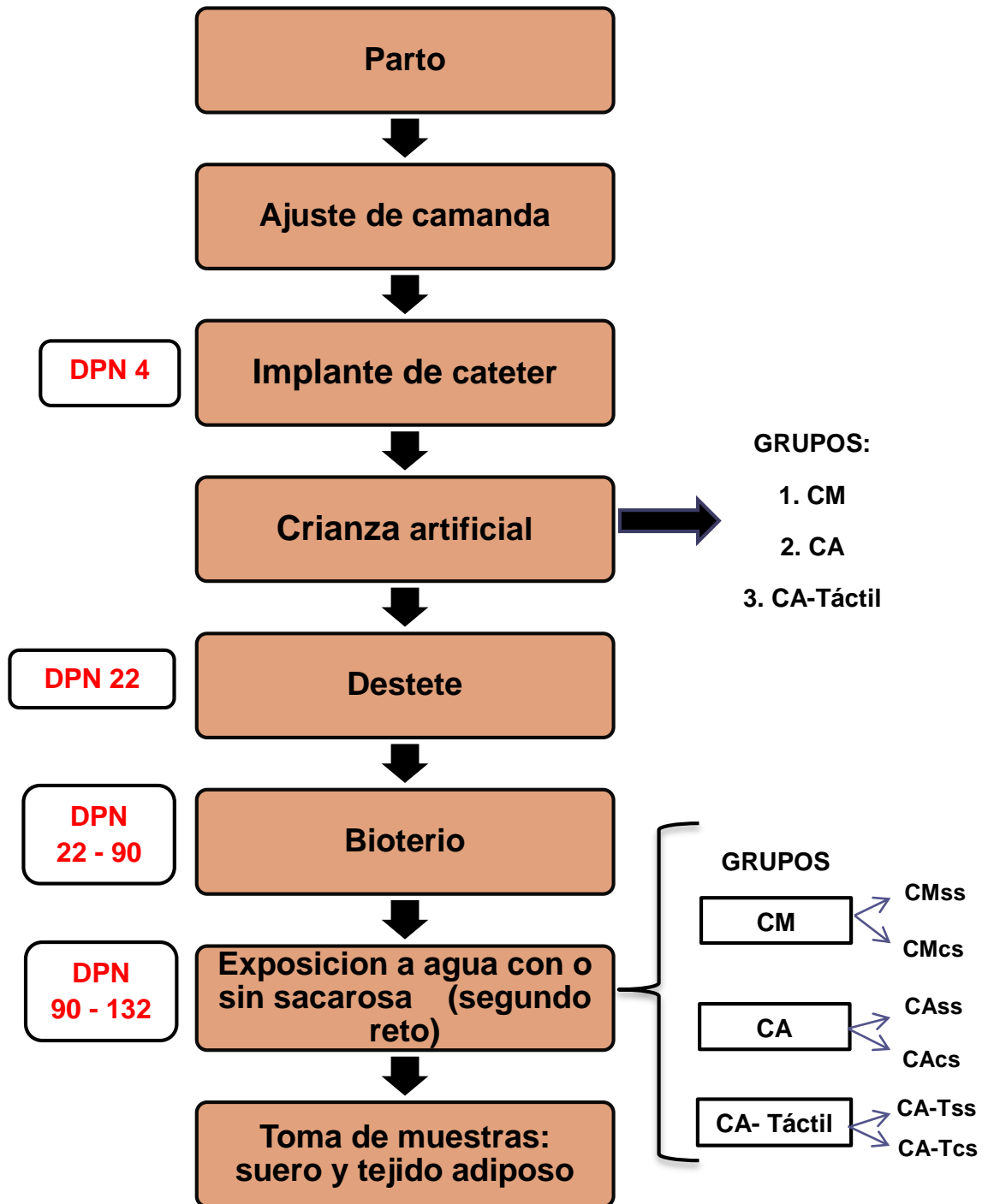


**B) Crianza artificial (CA)**



**A) Crianza artificial – estimulación táctil (CA-T)**

**Figura 4. Grupos experimentales.** A) Grupo criado por su madre, el cual se mantiene en el nido materno bajo condiciones de bioterio. B) Grupo crianza artificial, el cual se mantiene en el sistema de crianza artificial, que consiste en una incubadora tipo acuario en el cual se mantienen a las crías en recipiente de plástico aisladas. C) Grupo crianza artificial más estímulos táctiles, las crías se mantienen en recipientes de plástico asilados dentro del sistema de crianza artificial pero se le agrega estimulaciones táctiles con un pincel de cerdas finas simulando los lamidos de la madre



DPN= días post natales; CA=crianza artificial; CM= crianza materna; CA-T= crianza artificial más estímulo táctil; ss= sin sacarosa; cs= con sacarosa

**Figura 5. Desarrollo Experimental**

### **12. 3 CRIANZA ARTIFICIAL DE RATAS**

En el DPN 4 las crías macho se retiraron del nido y fueron anestesiados con lidocaína local en la mejilla y se les implantó en la mejilla un catéter de polietileno (PE-10 Corning Clay-Adams). El catéter de polietileno PE-10 se conectó a otro catéter de mayor calibre (PE-50 Corning Clay-Adams) y éste a su vez se conectó a una jeringa de plástico (BD) de 10 ml con fórmula láctea tibia, la cual estuvo montada sobre una bomba de infusión Harvard Mod. PH2000. Esta última se programó para infundir fórmula láctea durante 10 minutos cada hora durante las 24 h del día. El volumen, y la velocidad de infusión, de la leche se calcularon según el peso promedio de todas las crías con ayuda de una báscula analítica. En el primer día de aislamiento (DPN 4), las crías recibieron un volumen de leche igual al 33% de su peso corporal promedio, el volumen se incrementó 1% cada día. Por las mañana las crías se desconectaron de la bomba y se pesaron, los catéteres se limpiaron con agua caliente, las jeringas se reemplazaron por otras nuevas con fórmula láctea tibia, y finalmente, las crías se reconectaron a la bomba de infusión

Las ratas macho implantadas fueron colocadas dentro de recipientes individuales de plástico (15 cm de altura x 10 cm de diámetro) con el piso previamente cubierto de aserrín estéril. Estos recipientes fueron sumergidos dentro de un contenedor de vidrio tipo pecera (25 cm de alto, 75 cm de frente y 32 cm de fondo) con agua a una temperatura 38-40°C para mantenerlos calientes. La temperatura del agua se redujo gradualmente hasta 31-32°C, de acuerdo a la edad de las crías. El cuarto de crianza artificial se mantuvo con temperatura y humedad controlada (24 ±1°C y 46-48%, respectivamente). Además se mantuvieron en un ciclo de 12 horas luz/oscuridad, la luz se

encendía a las 12:00 horas. En el DPN 22, las crías fueron destetadas (Figura 6).



**Figura 6. Sistema de crianza artificial**

## 12.4 PREPARACIÓN DE LA FÓRMULA LÁCTEA

La descripción de la fórmula láctea para rata fue provista por la Universidad de Iowa, Estados Unidos de América (Messer y cols., 1969) la cual contiene: ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, KCl y MgCl<sub>2</sub>, además aminoácidos como metionina, triptófano y otros nutrimentos como vitamina mix, fosfato de calcio tribásico y ácido deoxicólico marca (Sigma-Aldrich EUA), leche evaporada (Carnation Clavel™), agua estéril, proteína de aislado de soya y aceite de maíz. Se preparó diariamente en función de la cantidad requerida.

**Tabla 2. Composición nutrimental de la fórmula láctea para rata**

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad</b>
<b>leche evaporada</b>	250 ml
<b>Proteína de soya</b>	17.5 g
<b>Vitamina mix</b>	2.5 g
<b>Aceite de maíz</b>	32.5 ml
<b>Hidratos de carbono</b>	19%
<b>Proteínas</b>	17%
<b>Lípidos</b>	62%

## 12. 5 INGESTA DE AGUA CON SACAROSA

A los 90 días postnatales, las ratas macho (grupos: CA, CA-Táctil y CM) fueron expuestas a ingerir agua con sacarosa o sin sacarosa durante un periodo de seis semanas continuas, hasta los 134 días postnatales. La concentración de agua con sacarosa utilizada fue al 5%, se utilizó sacarosa de mesa (50% glucosa, 50% fructosa) con un valor calórico de 3.9 kcal/g.

Se formaron los siguientes grupos:

- **Grupo (CMcs)** : Crianza materna + agua con sacarosa
- **Grupo (CMss)**: Crianza materna + agua sin sacarosa
- **Grupo (CAcs)** : Crianza artificial + agua con sacarosa
- **Grupo (CAss)**: Crianza artificial + agua sin sacarosa
- **Grupo (CA-Tcs)**: Crianza artificial con estimulación táctil + agua con sacarosa
- **Grupo (CA-Tss)**: Crianza artificial con estimulación táctil + agua sin sacarosa

En este protocolo se tomó el peso corporal semanalmente, y se registró diariamente la ingesta de agua y de alimento.

## 12.6 MEDICIÓN DEL PESO CORPORAL, LA INGESTA Y LAS CALORIAS

La ingesta y el peso corporal de cada rata fue registrada de forma individual.

Dicha determinación se realizó, siempre a la misma hora (9:00 h) con la finalidad de asegurar de que no tuviera variaciones este análisis por la hora y el equipo se utilizó una báscula digital ADIR® modelo 1676 (Capacidad 5000 g x 1 g). Para el caso del peso corporal se realizó al inicio de cada semana,

colocando una caja de acrílico con aserrín y después de tararla se colocó a la rata y se registró el peso. Para la ingesta de alimento se colocó una cantidad de alimento inicial, la cual fue registrada en la bitácora diariamente, al día siguiente se pesó la cantidad final y se compensaba la cantidad de alimento ingerido con más pellets. Los cálculos para determinar el alimento ingerido fueron realizados de la siguiente manera:

$$\text{Ingesta diaria} = \text{AI} - \text{AF}$$

Dónde:

AI= Alimento inicial (gramos de alimento el día anterior a la determinación)

AF = Alimento final (gramos de alimento en el día de la determinación)

Para la medición de ingesta de agua con y sin sacarosa se realizó de la misma manera, se colocó la cantidad de agua inicial la cual fue registrada en la bitácora diariamente y al día siguiente se midió con una probeta graduada de 250 ml la cantidad final la cual se desechó y se volvió a poner una cantidad de agua inicial. Los cálculos para determinar el alimento ingerido fueron realizados de la siguiente manera:

$$\text{Ingesta diaria de agua con y sin sacarosa} = \text{AGI} - \text{AGF}$$

Dónde:

AGI= Agua inicial (mililitros de agua el día anterior a la determinación)

AGF = Agua final (mililitros de agua en el día de la determinación)

En cuanto al cálculo de calorías se realizó de acuerdo al consumo por rata, utilizando los registros de agua y de alimento, se calculó de la siguiente manera

$$\text{Calorías de agua con sacarosa} = \text{mililitros consumidos} \times 3.9 \text{ kcal}$$

Calorías de agua sin sacarosa = mililitros consumidos x 0 kcal

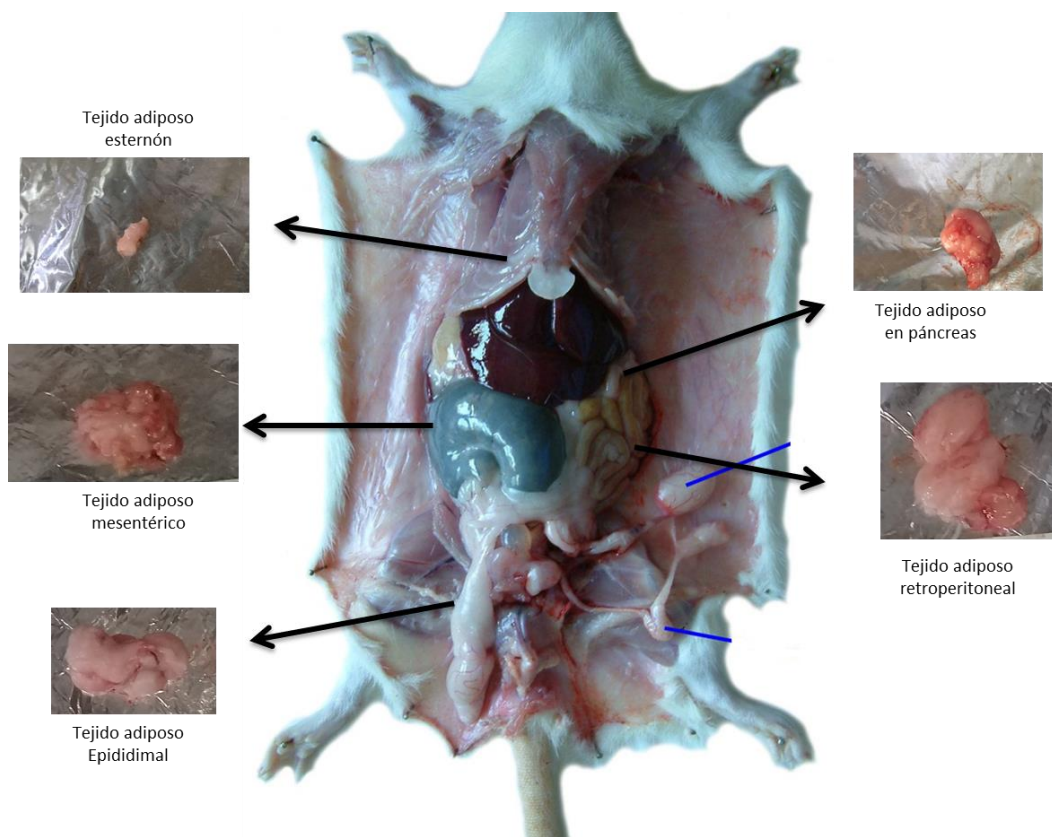
Calorías de alimento = gramos de alimento consumido x 3.4 kcal (Martínez-Moreno y cols., 2009)

## **12. 7 EXTRACCIÓN DE SUERO**

Se retiró el alimento y el agua de 4 a 6 horas antes de la decapitación rápida con guillotina especial para roedor. Se colectó la sangre en tubos roscados de 15 ml, 120 x 17 mm de fondo cónico, sin anticoagulante, previo a centrifugar la sangre, se dejó formar un coágulo por 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente se colocaron las muestras en una centrifuga Beckman Coulter a 1500xg por 20 min, a 4 grados centígrados. El suero fue extraído con pipetas Tranfer Simport (capacidad de 7mL, 15.5 cm de longitud código SIMPO00060) y se colocó en microtubos de 1.5 mL de fondo cónico Eppendorf para ser almacenado a -20 °C hasta el día de su análisis.

## **12. 8 DISECCIÓN DE TEJIDO ADIPOSO**

Después de la recolección de sangre se procedió a la disección del cuerpo de cada rata de forma inmediata, se hizo una incisión abdominal en dirección de la línea media y se disecaron 5 compartimentos de tejido adiposo en el siguiente orden: tejido adiposo en esternón, tejido adiposo en páncreas, tejido adiposo mesentérico, tejido adiposo epididimal, tejido adiposo retroperitoneal. Cada tejido fue pesado en una balanza digital analítica shimadzu modelo atx124 y fue registrado en la bitácora. Posteriormente se calculó el índice de adiposidad de la siguiente manera: Tejido adiposo total (g) dividido por el peso corporal (g) multiplicado por cien.



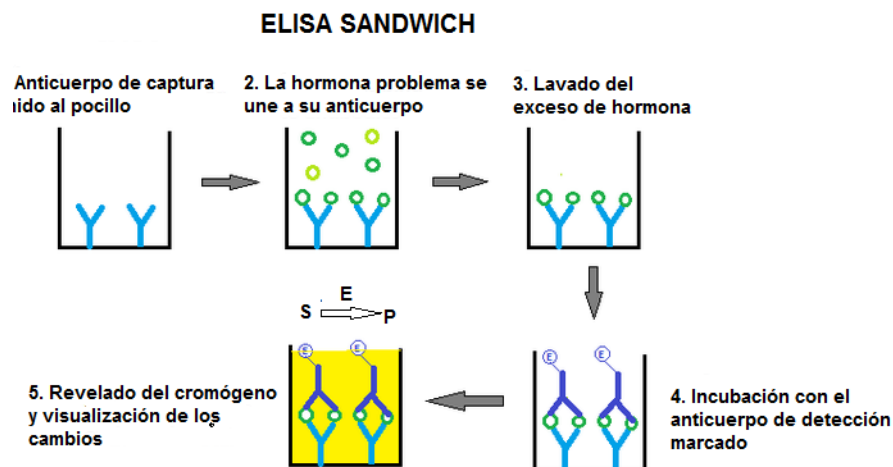
**Figura 7. Disección de tejido adiposo.** Disección del tejido adiposo en 5 depósitos: esternón, mesentérico, epididimal, páncreas y retroperitoneal.

## 12.9 QUÍMICA SANGUÍNEA

El suero conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , fue descongelado a temperatura ambiente durante 15 min previos al inicio del análisis, una vez descongelado se adicionaron 10  $\mu\text{l}$  del suero en las cubetas del equipo, el cual procesó las muestras automáticamente. La medición de la concentración sanguínea de glucosa, colesterol total y triacilglicéridos se procesaron con reactivos de la marca Beckman Coulter en el equipo UniCel DxC 600 Synchron Clinical System de Beckman Coulter, por métodos colorimétricos.

## 12.10 DETERMINACIÓN DE HORMONAS

La medición de la concentración de leptina, insulina y adiponectina se realizó mediante el método de ELISA en sándwich (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) el cual está diseñado para medir la cantidad de la unión diana entre un par de anticuerpos coincidentes. Un anticuerpo específico para el objetivo se pre-recubrió en los pozos de la microplaca suministrada. Luego se agregan muestras, patrones o controles a estos pozos y se unen al anticuerpo inmovilizado (captura). El sandwich se forma mediante la adición del segundo anticuerpo (detector), se agrega una solución de sustrato que reacciona con el complejo enzima-anticuerpo-diana para producir una señal medible. La intensidad de esta señal es directamente proporcional a la concentración del objetivo presente en la muestra original



**Figura 8. Fundamento de ELISA en sándwich**

El procedimiento de este ensayo de ELISA en sandwich se realizó como en la siguiente secuencia: 1) captura de moléculas de la hormona de muestras (insulina, leptina, adiponectina) a los pozos de una placa de microtitulación

recubierta por cantidad pretendida de anticuerpos monoclonales de ratón anti-hormona de rata y la unión de anticuerpos policlonales biotinilados a la hormona capturada

2) Eliminación de materiales no unidos de muestras

3) Unión de peroxidasa en rabano a los anticuerpos biotinilados inmovilizados

4) Eliminación de conjugados enzimáticos libres

5) Cuantificación de conjugados anticuerpo-enzima inmovilizados mediante monitorización de actividades de peroxidasa de rábano en presencia del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. La actividad de la enzima se midió espectrofotométricamente (SpectraMax® Plus 384) mediante la mayor absorbancia a 450 nm, corregida desde la absorbancia 590 nm, después de la acidificación de los productos formados. Dado que el aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de hormona capturada en la muestra desconocida, esta última pudo derivarse por interpolación de una curva de referencia generada en el mismo ensayo con patrones de referencia de concentraciones conocidas de la hormona a medir de rata, esto se realizó mediante SoftMax Pro 7 Software.

### **12.11 CONCENTRACIÓN DE LEPTINA**

Para la cuantificación de la concentración de leptina se utilizaron 100µl de suero de los diferentes grupos de estudio, se corrieron las muestras con un kit para rata con número de catálogo KRC2281 de Invitrogen, con una sensibilidad de <20 pg/mL, se corrió siguiendo las indicaciones dentro del estuche.

### **12.12 CONCETRACIÓN DE INSULINA**

Para determinar la concentración de Insulina se utilizó 10µl de suero de cada animal de los diferentes grupos de estudio, se utilizó un kit para rata con número de catálogo EZRMI-13K de EMD Millipore, este kit contiene un anticuerpo específico para insulina con una sensibilidad de 0.1 ng/mL y se siguieron las pautas del inserto.

### **12.13 CONCETRACIÓN DE ADIPONECTINA**

La cuantificación de concentración de adiponectina se utilizó 10 µl de suero de cada muestra y se utilizó un kit de ELISA para rata con número de catálogo KRP0041 de Invitrogen este kit contiene un anticuerpo específico para insulina con una sensibilidad de 50 pg/mL y se siguieron las pautas del inserto.

### **12.14 MEDIDA DEL TAMAÑO DE LOS ADIPOCITOS**

Se fijó una muestra de tejido adiposo retroperitoneal en formaldehído neutral a temperatura ambiente. La muestra se impregnó en parafina, y se cortaron secciones en serie de 6 mm usando un micrótopo y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se obtuvieron fotografías con un aumento de 20x usando un microscopio óptico (LEICA ICC 50 HD). El área de los adipocitos se midió usando el software AxionVision Real 4.8 y se expresa como µm<sup>2</sup>. Se calculó el área promedio de los adipocitos para cada rata dentro de cada grupo

### **13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se graficó la media  $\pm$  el error estándar de la media de los datos obtenidos de cada parámetro medido y se compararon utilizando el programa estadístico sigmaPlot 11.0 mediante el análisis estadístico ANOVA de dos factores; tomando como variables independientes tipo de crianza (CM, CA y CA-T) y tipo de tratamiento (con sacarosa y sin sacarosa), las variables dependientes comparadas son: ingesta de agua y de alimento, calorías totales, peso corporal, concentración de glucosa, triglicéridos, colesterol, leptina, insulina, adiponectina e índice de adiposidad, seguido de la prueba Tukey. Se consideró una significancia de  $p < 0.05$ . También se utilizó un análisis no paramétrico, Kruskal-Wallis para la comparación entre las áreas de los adipocitos y se aplicó una prueba t de Student para la comparación entre los compartimentos de tejido adiposo.

## 14. RESULTADOS

Los siguientes resultados se obtuvieron de 46 ratas macho de la cepa wistar en las cuales se midieron los parámetros propuestos a los 132 días de edad. Estas ratas se dividieron en 6 grupos como se explicó en la metodología, quedando de la siguiente manera: criadas por su madre con sacarosa (CMcs n=8), criadas por su madre sin sacarosa (CMss n=8), criadas artificialmente con sacarosa (CAcs n=9), criadas artificialmente sin sacarosa (CAss n=6)

### EFFECTOS DE LA CRIANZA ARTIFICIAL MAS UN SEGUNDO RETO

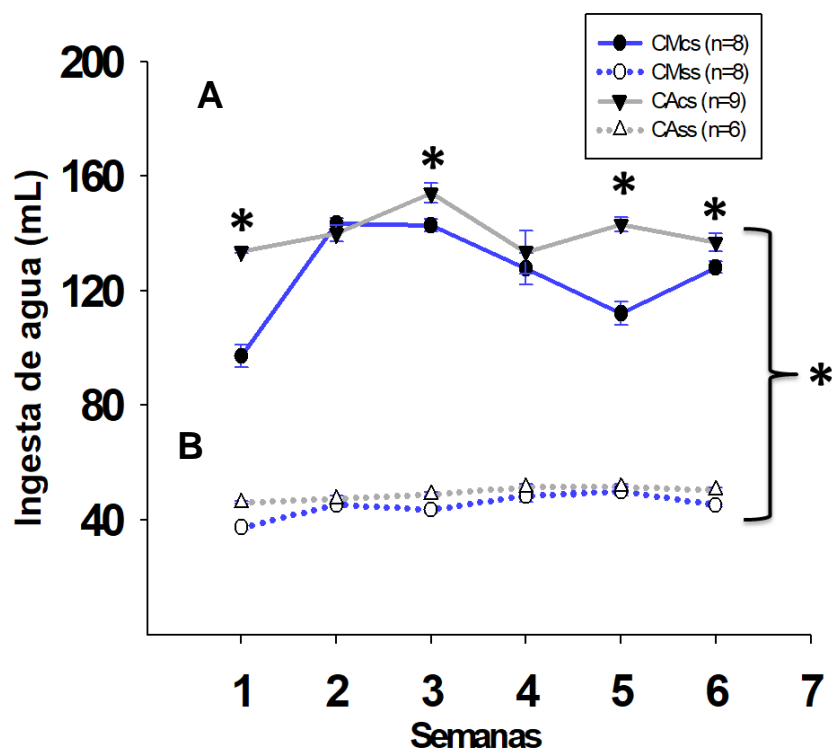
#### 14.1 Ingesta de agua

Los siguientes resultados se obtuvieron de la comparación entre los grupos que consumieron agua con sacarosa (**Figura 9 A**) y los que consumieron agua sin sacarosa (**Figura 9 B**) de los animales criados por su madre y criados artificialmente a lo largo de las seis semanas que duró el segundo reto. Se presentó un consumo de agua significativamente mayor de aquellos grupos que estuvieron expuestos a sacarosa (ANOVA de dos factores F tratamiento= 607.816,  $p < 0.001$ , GL=41)

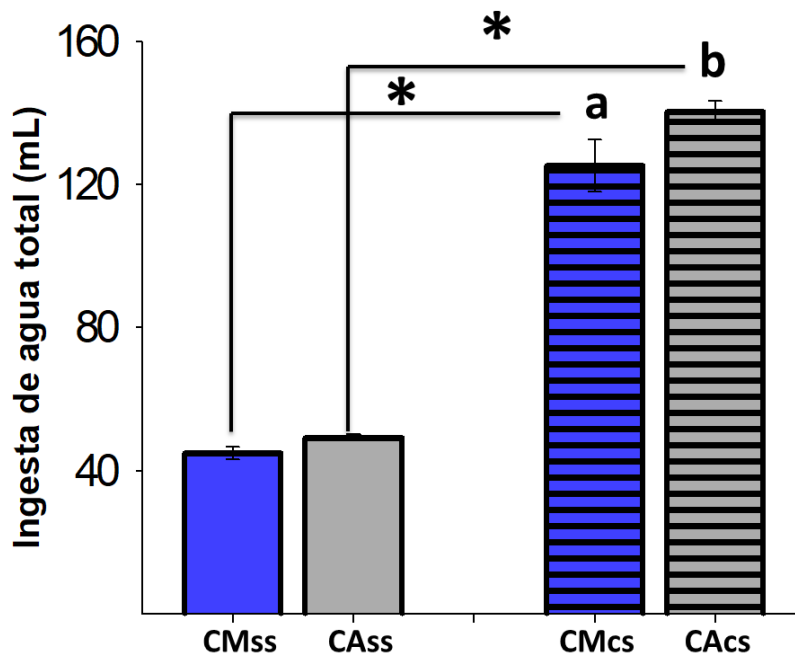
Durante la semana uno, tres, cinco y seis, el grupo criado artificialmente mostró un consumo de agua con sacarosa mayor respecto al grupo criado por su madre (**Figura 9 A**) (ANOVA de dos factores F crianza= 43.513,  $p < 0.001$ , GL=41 seguido de prueba Tukey semana 1  $p < 0.001$ , semana 3  $p = 0.004$ ,

semana 5  $p < 0.001$ , semana 6  $p = 0.005$ ). Sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas de los grupos de crianza en el consumo de agua sin sacarosa.

El consumo de agua total, se obtuvo del promedio del consumo diario de agua con y sin sacarosa por cada rata, para cada grupo. La ingesta de agua fue mayor en aquellos grupos que ingirieron agua con sacarosa respecto a los que consumieron agua sin sacarosa (ANOVA de dos factores  $F = 685.28$ ,  $p < 0.001$ ,  $GL = 35$ , **Figura 10**). Las ratas con crianza artificial consumieron 16% más de agua con sacarosa respecto a las ratas criadas por su madre que consumieron agua con sacarosa (Tukey,  $p = 0.036$ ).



**Figura 9. Promedio de la ingesta de agua por semana** de **A)** los animales con crianza materna que ingirieron agua con sacarosa (CMcs  $n=8$ ), crianza artificial que ingirieron agua con sacarosa (CAcs  $n=9$ ) y **B)** comparación de los animales con crianza materna que ingirieron agua sin sacarosa (CMss  $n=8$ ), crianza artificial que ingirieron agua sin sacarosa (CAss  $n=6$ ). Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. Datos fueron graficados como la Media  $\pm$  EEM



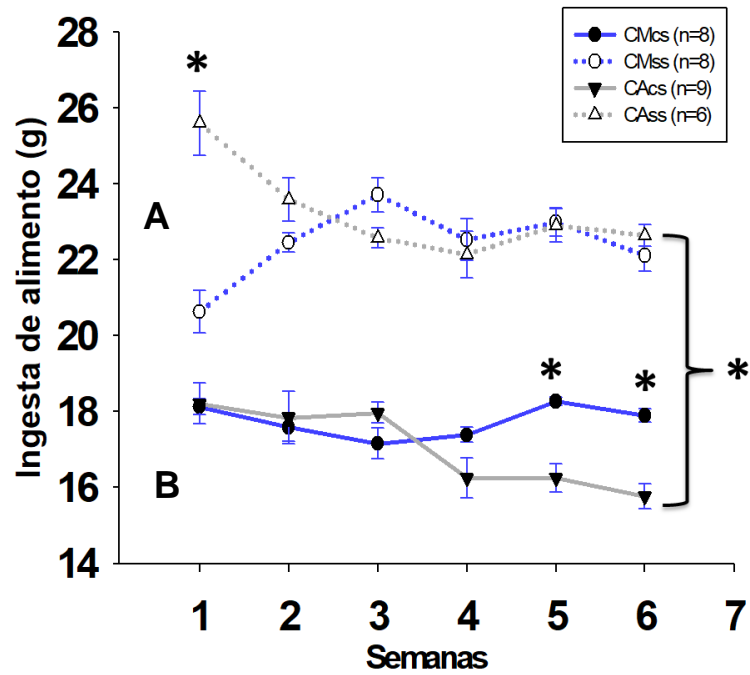
**Figura 10. Promedio de la ingesta de agua total** de: grupo con crianza artificial sin sacarosa (CMss =8), grupo con crianza artificial sin sacarosa (CAss =6); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs =8), grupo con crianza artificial con sacarosa (CAcs n=9). Datos fueron graficados como la Media  $\pm$  EEM. Las ratas que consumieron agua con sacarosa del grupo con crianza artificial consumieron 16% más de agua respecto a las ratas criadas por su madre. Las barras con letra diferente son estadísticamente significativas.

## 14.2 Ingesta de alimento

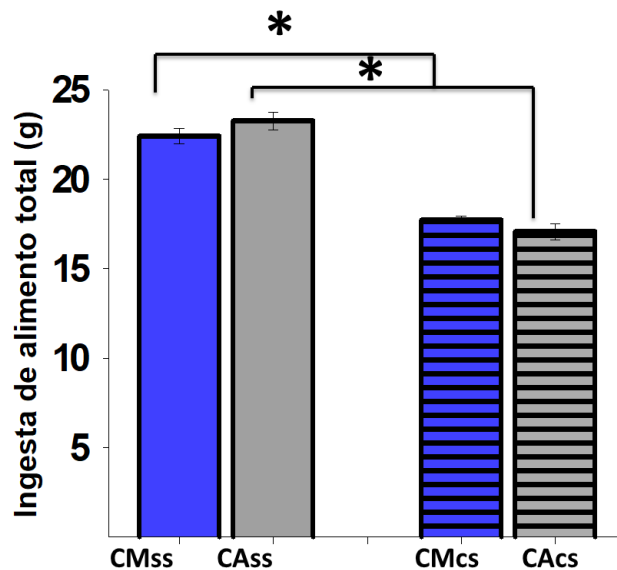
Los siguientes resultados se obtuvieron de la comparación entre los grupos que consumieron agua con sacarosa (**Figura 11 B**) y la comparación entre los grupos que consumieron agua sin sacarosa (**Figura 11 A**) de los animales criados por su madre y criados artificialmente a lo largo de las seis semanas que duró el segundo reto. Se presentó un consumo de alimento significativamente menor de aquellos grupos que estuvieron expuestos a sacarosa respecto a los grupos que consumieron agua sin sacarosa (ANOVA de dos factores,  $F_{\text{tratamiento}} = 350.811$ ,  $p < 0.001$ ,  $GL = 35$ ).

En la semana uno se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que consumieron agua sin sacarosa (Tukey  $p < 0.001$ ). En cambio, en la semana cinco y seis las ratas con crianza artificial que consumieron sacarosa mostraron un consumo significativamente menor de alimento respecto a las ratas criadas por su madre (Tukey semana cinco  $p < 0.001$ , semana seis  $p < 0.001$ ).

El consumo de alimento total (**Figura 12**), se obtuvo del promedio del consumo diario de agua con y sin sacarosa para cada grupo, encontrando diferencias significativas solo entre los tratamientos. (ANOVA de dos factores,  $F = 350.811$ ,  $p < 0.001$ ,  $GL = 35$ ). Es decir, los animales de ambos grupos de crianza que consumieron agua con sacarosa ingirieron menos alimento que aquellos que consumieron agua sin sacarosa ( $p < 0.001$  para cada grupo comparado).



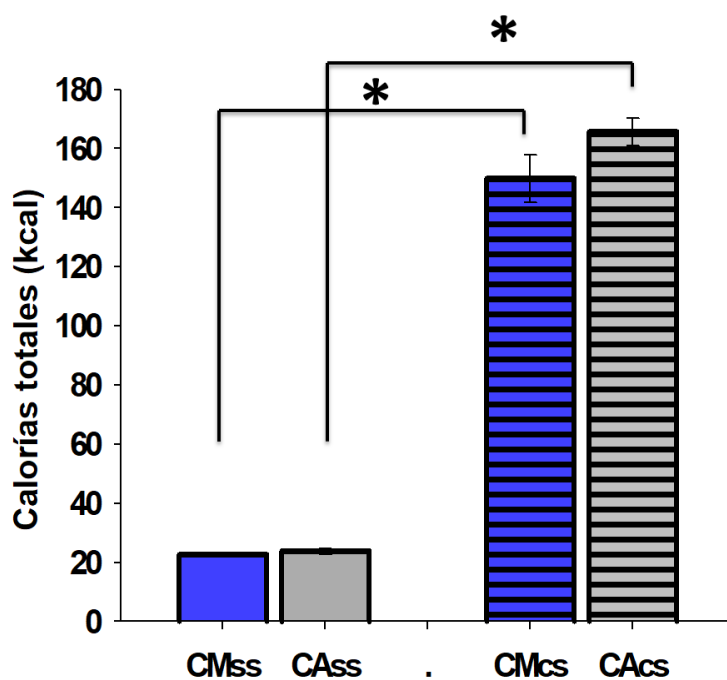
**Figura 11. Promedio de la ingesta de alimento por semana de A) los animales con crianza materna que ingirieron agua sin sacarosa (n=8), crianza artificial que ingirieron agua sin sacarosa (n=9) y B) comparación de los animales con crianza materna que ingirieron agua con sacarosa (n=8), crianza artificial que ingirieron agua con sacarosa (n=6). Datos fueron graficados como la Media  $\pm$  EEM .Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.**



**Figura 12. Promedio de la ingesta total de alimento de los grupos diferentes grupos de crianza que consumieron agua con sacarosa y sin sacarosa durante las seis semanas del segundo reto de: grupo con crianza artificial sin sacarosa (CMss n=8), grupo con crianza artificial sin sacarosa (CAss n=6); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8), grupo con crianza artificial con sacarosa (CAcs n=9). Datos fueron graficados como la Media  $\pm$  EEM .Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas**

### 14.3 Ingesta de calorías totales

Todas las ratas que consumieron agua con sacarosa mostraron un aumento en el consumo de agua respecto a los que consumieron agua sin sacarosa. Dado que el consumo de sacarosa por si sola incrementa las calorías consumidas, evidentemente los grupos que consumieron sacarosa, consumieron más calorías con una diferencia significativa (ANOVA de dos factores F tratamiento= 807.447  $p < 0,001$ , GL=23). Al hacer la comparación entre los grupos de crianza, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con crianza artificial respecto al grupo criado por su madre (**Figura 13**).

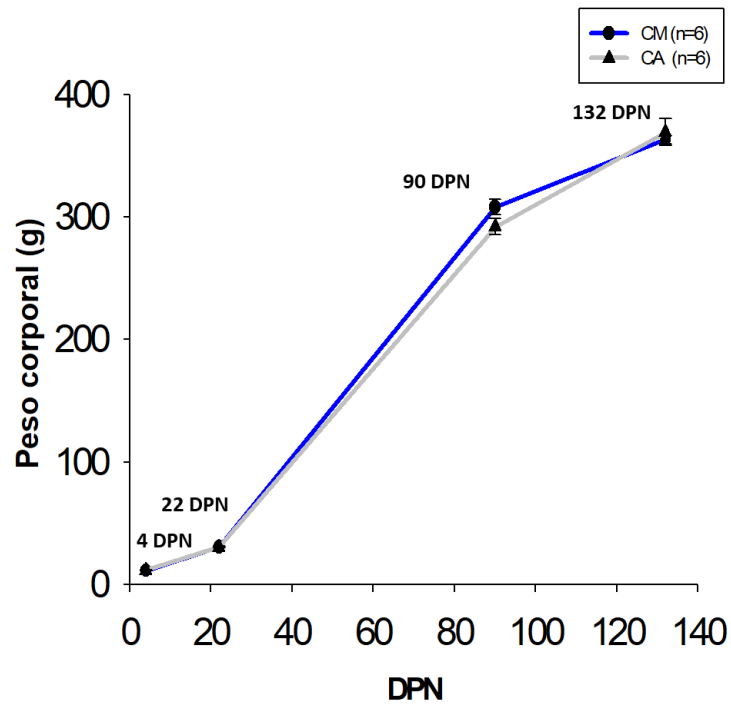


**Figura 13. Promedio de calorías totales consumidas** durante las seis semanas del segundo reto de: grupo con crianza artificial sin sacarosa (CMss n=8), grupo con crianza artificial sin sacarosa (CAss n=8); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8), grupo con crianza artificial con sacarosa (CAcs n=9) Resultados son expresados como la Media  $\pm$  EEM. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas

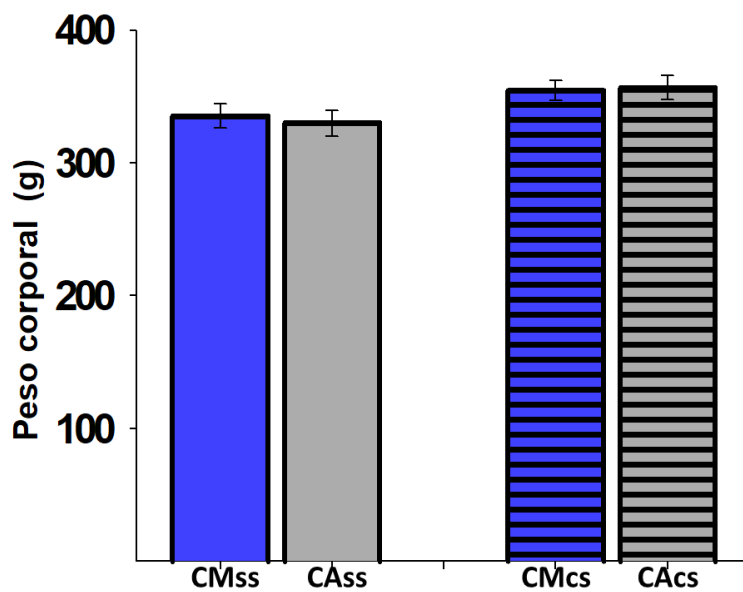
## 14.4 Peso corporal

Las ratas que fueron criadas por su madre y las ratas que fueron sometidas a crianza artificial no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al peso corporal a lo largo de las fases del experimento (**Figura 14**). Específicamente, al inicio de la crianza artificial (4DPN), al destete (22DPN), al inicio del segundo reto (90 DPN), y al finalizar el segundo reto (132 DPN).

Durante la exposición a la ingesta de agua con sacarosa (segundo reto), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (**Figura 15**), sin embargo, los animales de crianza artificial que consumieron agua con sacarosa presentaron un aumento de peso corporal del 10.6% respecto al mismo grupo que consumió agua sin sacarosa. Asimismo, las ratas criadas por su madre que consumieron agua con sacarosa presentó un aumento de peso corporal del 10.5% respecto al mismo grupo pero que consumió agua sin sacarosa



**Figura 14. Peso corporal a lo largo del diseño experimental.** No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos cuidado materno (CM) y crianza artificial (CA) durante los días 4 postnatal (inicio de crianza artificial), 22 postnatal (destete), 90 postnatal (inicio del segundo reto), 132 postnatales (final del segundo reto) (n= 6 por grupo).



**Figura 15. Promedio del peso corporal total del 90 DPN al 132 DPN** de los siguientes grupos: grupo con crianza artificial sin sacarosa (CMss n= 8), grupo con crianza artificial sin sacarosa (CAss n=6); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8), grupo con crianza artificial con sacarosa (CAcs n=9). Los animales de crianza artificial que consumieron agua con sacarosa presentaron un aumento de peso corporal del 10.6% respecto al mismo grupo que consumió agua sin sacarosa. Asimismo, las ratas criadas por su madre que consumieron agua con sacarosa presentó un aumento de peso corporal del 10.5% respecto al mismo grupo pero que consumió agua sin sacarosa. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

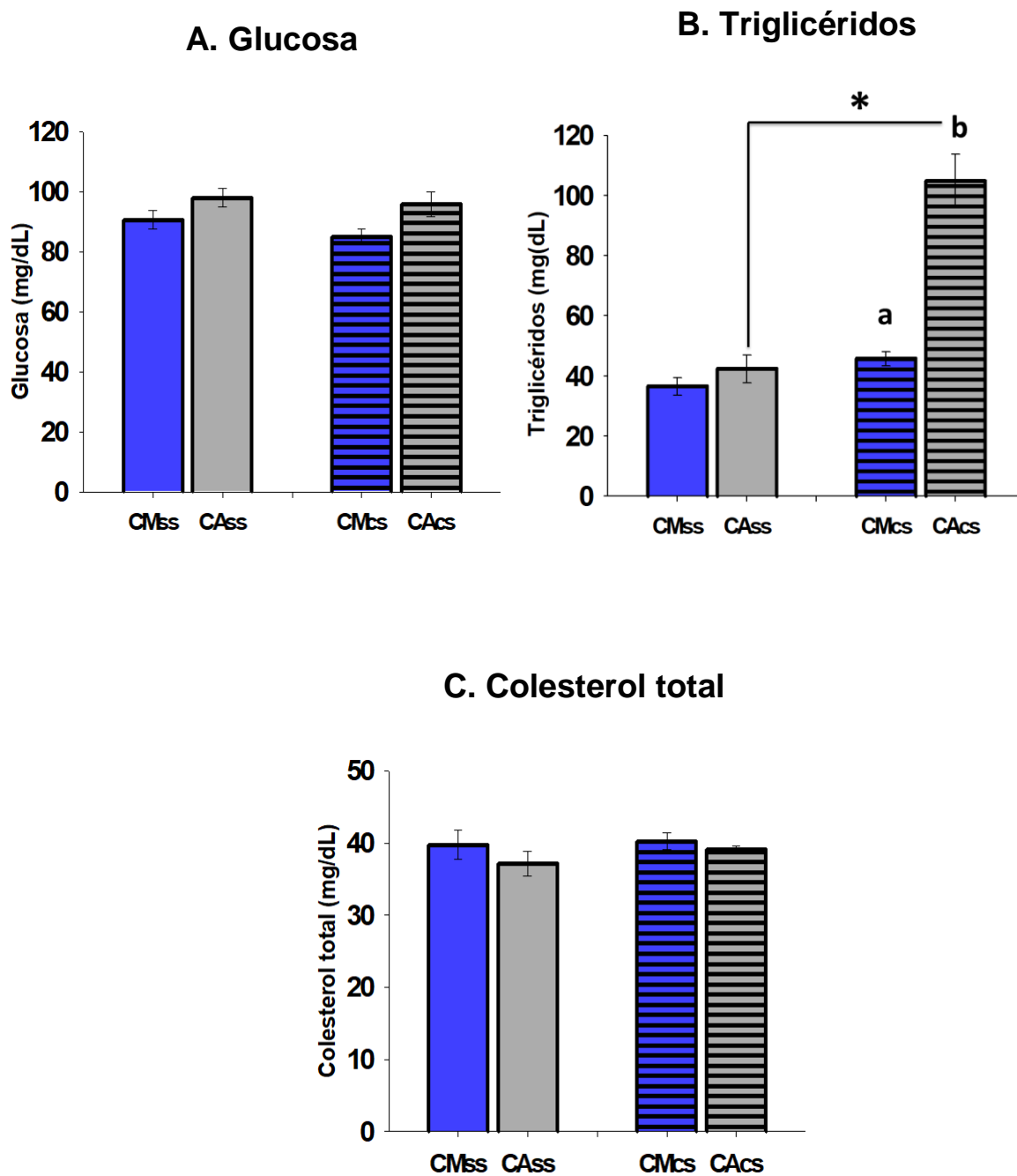
## 14.5 Química sanguínea

Los parámetros que se midieron de la química sanguínea fueron: concentración de glucosa (**Figura 16A**), concentración de triglicéridos (**Figura 16B**) y colesterol total (**Figura 16C**).

En cuanto a las concentraciones de glucosa, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, pero se muestra un aumento de la concentración de glucosa en los animales de crianza artificial en ambos tratamientos.

No se encontraron diferencias en la concentración sérica de triglicéridos entre el grupo de crianza artificial y el de crianza materna que consumieron agua sin sacarosa. Sin embargo la ingestión de sacarosa en los animales criados artificialmente, incrementó significativamente los niveles de triglicéridos en comparación con los animales criados por su madre que consumieron sacarosa (ANOVA de dos factores  $F_{\text{crianza}} = 16.935$ ,  $p < 0.001$ ,  $F_{\text{tratamiento}} = 51.951$ ,  $p < 0.001$ ,  $GL = 45$ , seguido de prueba Tukey  $p < 0.001$ ). Existe una diferencia estadísticamente significativa entre los animales criados artificialmente con diferentes tratamientos (Tukey,  $p < 0.001$ ).

No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la concentración de colesterol total.



**Figura 16. Química sanguínea tomada a los 132 DPN. A.** Concentración de glucosa, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas **B.** Concentración de triglicéridos, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. **C.** Colesterol total no se obtuvieron diferencias significativas. Grupos: con crianza materna sin sacarosa (CMss n=8), crianza artificial sin sacarosa (CAss n=6); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8), crianza artificial con sacarosa (CAcs n=9). Resultados son expresados como la Media  $\pm$  EEM.

## 14.6 Hormonas reguladoras del metabolismo energético

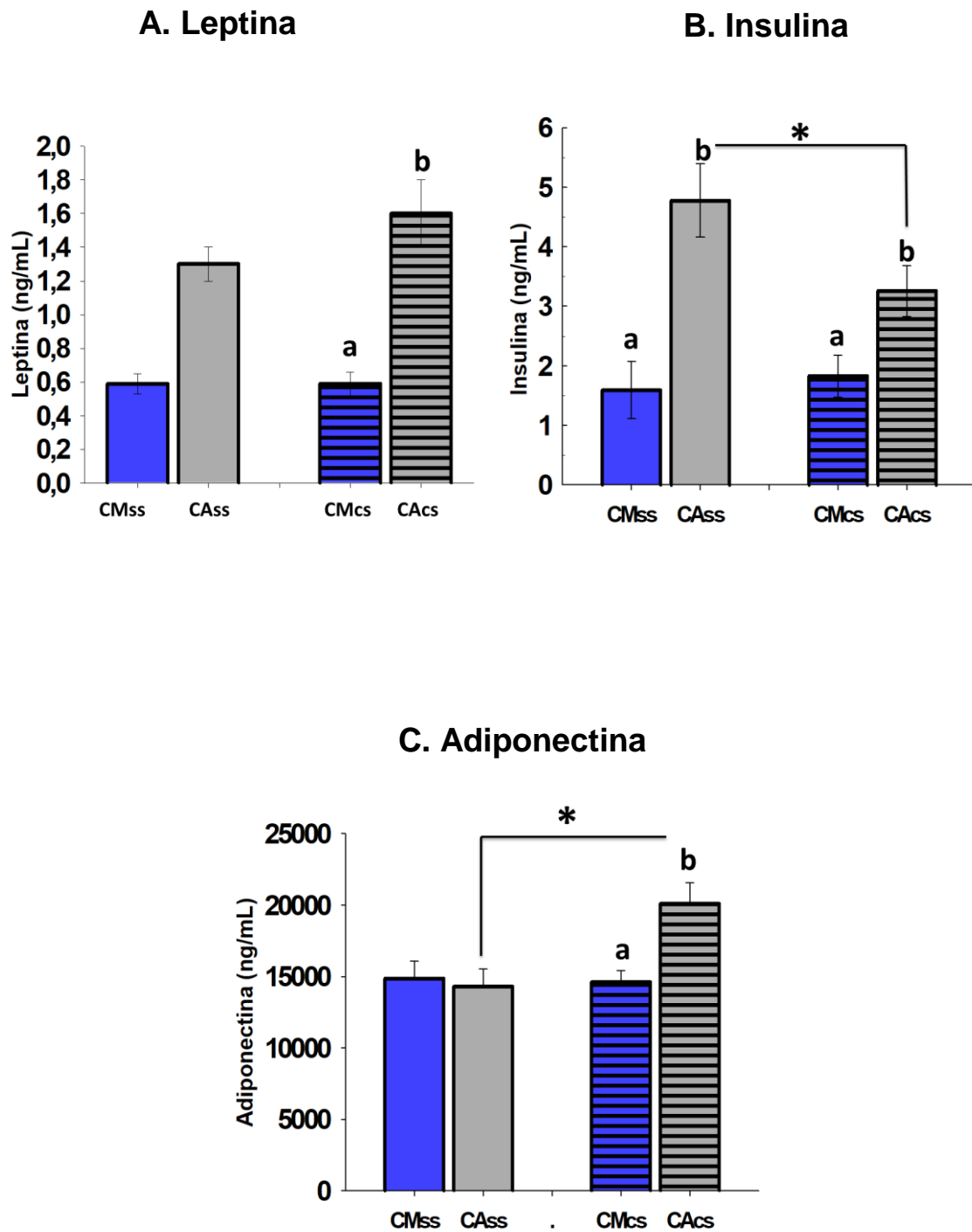
Las hormonas que se midieron en el suero de las ratas de los diferentes grupos fueron: leptina (**Figura 17A**), insulina (**Figura 17B**), y adiponectina (**Figura 17C**).

En la concentración sérica de leptina no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de crianza artificial que ingirió agua sin sacarosa respecto a los criados por su madre en este mismo tratamiento (**Figura 17A**). En contraste el grupo de crianza artificial que ingirió agua con sacarosa mostró niveles significativamente mayores de leptina respecto al grupo criado por su madre del mismo tratamiento (ANOVA de dos factores  $F_{\text{crianza}} = 16.089$ ,  $p < 0.001$ ,  $GL = 45$  seguido de prueba Tukey  $p = 0.023$ )

La concentración de insulina de los animales que consumieron agua sin sacarosa, es mayor en los animales con crianza artificial respecto a los animales criados por su madre y de la misma manera en los animales que consumieron agua con sacarosa (Tukey  $p < 0.001$ ). También existe una diferencia estadísticamente significativa entre aquellos criados artificialmente con diferente tratamiento (ANOVA de dos factores,  $F = 14.103$ ,  $p < 0.001$   $GL = 45$ , seguido de la prueba Tukey  $p < 0.001$ , **Figura 17B**).

Los resultados de la hormona adiponectina mostraron que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos criados por su madre y criados artificialmente que consumieron agua sin sacarosa. Por otro lado se encontraron diferencias significativas entre los grupos que ingirieron sacarosa así los animales con crianza artificial mostraron concentraciones séricas de

adiponectina más elevados respecto a los animales con crianza materna (ANOVA de dos factores  $F= 14.236$ ,  $p<0.001$ , GL: 45, seguido de prueba Tukey  $p= 0.005$  **Figura 17C**) y respecto a los animales con crianza artificial que consumieron agua sin sacarosa.

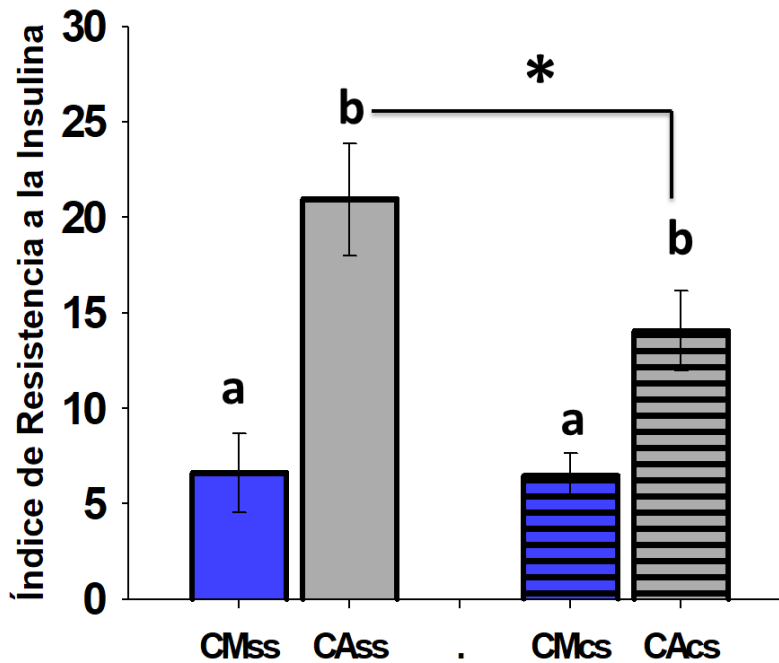


**Figura 17. Promedio de la concentración de hormonas** medidas a los 132 DPN **A.** Concentración de leptina. **B.** Concentración de insulina **C.** Concentración de adiponectina de los grupos: crianza materna sin sacarosa (CMss n=8), crianza artificial sin sacarosa (CAss n=6); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8), crianza artificial con sacarosa (CAcs n=9) Resultados son expresados como la media  $\pm$  EEM. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

## 14.7 Índice de resistencia a la insulina

El índice de resistencia a la insulina (IRI) se obtuvo mediante la fórmula:  $((\text{glucosa} \times \text{insulina}) / 22.5)$  utilizada previamente en ratas (Zambrano y cols., 2006).

Los animales que consumieron agua sin sacarosa presentaron diferencias estadísticamente significativas siendo que los animales con crianza artificial tienen niveles más elevados de IRI respecto a los criados por su madre (ANOVA de dos factores  $F= 17.027$ ,  $p<0.001$  GL= 45 seguido de prueba Tukey,  $p< 0.001$ ). Entre los animales que ingirieron sacarosa, los animales con crianza artificial presentaron niveles más elevados de IRI respecto a los animales con crianza materna (Tukey  $p= 0.022$ ), por otro lado los animales con crianza artificial con sacarosa mostraron niveles menores respecto de los animales con crianza artificial sin sacarosa (Tukey  $p= 0.025$ , **Figura 18**).



**Figura 18. Índice de resistencia a la insulina obtenida con la fórmula**  $((\text{glucosa} \times \text{insulina}) / 22.5)$  de los grupos: crianza materna sin sacarosa (CMss n=8), crianza artificial sin sacarosa (CAss n=6); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8), crianza artificial con sacarosa (CAcs n=9) Resultados son expresados como la media  $\pm$  EEM. Se muestran diferencias estadísticamente significativas.

### 14.8 Tejido adiposo

Se obtuvo el peso del tejido adiposo de los siguientes depósitos: esternal, pancreático, mesentérico, retroperitoneal y epididimal reportando las medias  $\pm$  EEM de cada grupo en ambos tratamientos (**tabla 3**). En los grupos que consumieron agua sin sacarosa se mostraron diferencias significativas en el tejido adiposo del páncreas siendo mayor en los animales con crianza artificial (t de Student \*  $p < 0.05$ ). En los grupos que consumieron agua con sacarosa se presentaron diferencias significativas en el tejido adiposo retroperitoneal y tejido adiposo mesentérico siendo mayor en los animales criados artificialmente (t de Student \*  $p < 0.05$ )

**Tabla 3.** Media  $\pm$  EEM del peso del tejido adiposo disecado de los cinco depósitos por cada grupo en ambos tratamiento. (t de Student \*  $p < 0.05$ )

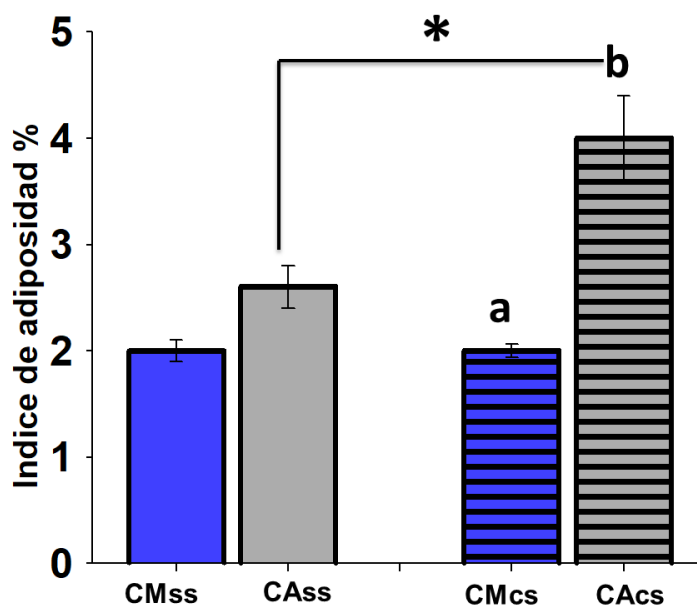
	GRUPOS					
	Agua sin sacarosa			Agua con sacarosa		
Depósitos de tejido adiposo	Crianza materna n=8	Crianza artificial n= 6	p	Crianza materna n=8	Crianza artificial n= 9	p
Esternal	0.0754 $\pm 0.0045$	0.0755 $\pm 0.0060$	0.989	0.0724 $\pm 0.008$	0.0983 $\pm 0.010$	0.091
Pancreático	0.3310 $\pm 0.050$	0.5180 $\pm 0.050$	0.019*	0.4990 $\pm 0.060$	1.0480 $\pm 0.270$	0.085
Retroperitoneal	2.2620 $\pm 0.271$	2.3510 $\pm 0.674$	0.894	1.8280 $\pm 0.125$	4.3830 $\pm 0.756$	0.007*
Mesentérico	1.7110 $\pm 0.322$	1.5500 $\pm 0.178$	0.699	1.4180 $\pm 0.0863$	2.5830 $\pm 0.418$	0.021*
Epididimal	3.7240 $\pm 0.150$	4.1210 $\pm 0.524$	0.425	3.8450 $\pm 0.129$	4.3310 $\pm 0.335$	0.217

Se determinó el índice de adiposidad o porcentaje de grasa corporal (**Figura 19**), por medio de la siguiente fórmula: (Tejido adiposo total (g) / peso de la rata (g)) \* 100), utilizado en ratas previamente (Cervantes-Rodríguez y cols., 2014)

Entre las ratas que ingirieron agua sin sacarosa no se obtuvo diferencias significativas en la crianza materna respecto a las ratas de crianza artificial, sin embargo se puede observar que las ratas de crianza artificial presentaron un porcentaje mayor de grasa. Las ratas que consumieron agua con sacarosa con crianza artificial presentaron un aumento significativamente mayor en el porcentaje de grasa corporal respecto a las ratas de crianza materna (ANOVA de dos factores  $F = 14.236$ ,  $p < 0.001$ ,  $GL = 45$  seguido de Tukey,  $p = 0.005$ ; **Figura 19**) y de la misma manera las ratas de crianza artificial que

consumieron agua con sacarosa presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a las ratas de crianza artificial que consumieron agua sin sacarosa (Tukey,  $p= 0.033$ ).

### Porcentaje de grasa corporal



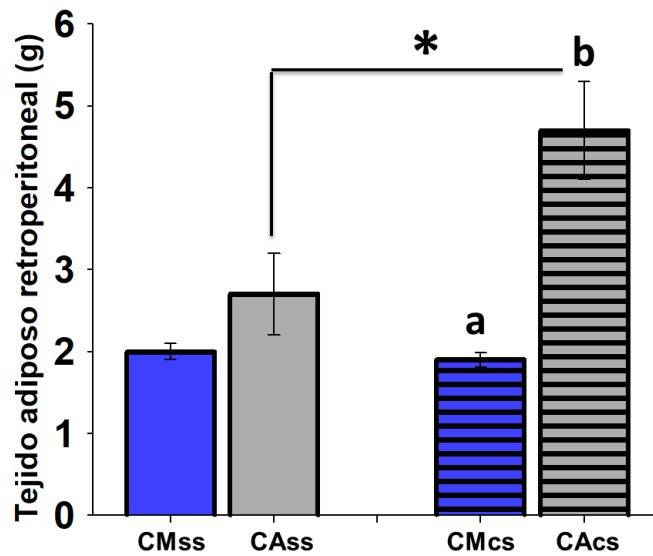
**Figura 19. Porcentaje de grasa corporal o índice de adiposidad** obtenido con la fórmula (tejido adiposo total (g) / peso de la rata (g)) \* 100 de los grupos: crianza materna sin sacarosa (CMss n=6), crianza artificial sin sacarosa (CAss n=8); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8), crianza artificial con sacarosa (CAcs n=9). Resultados son expresados como la media  $\pm$  EEM. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas

## 14.9 Área del tejido adiposo

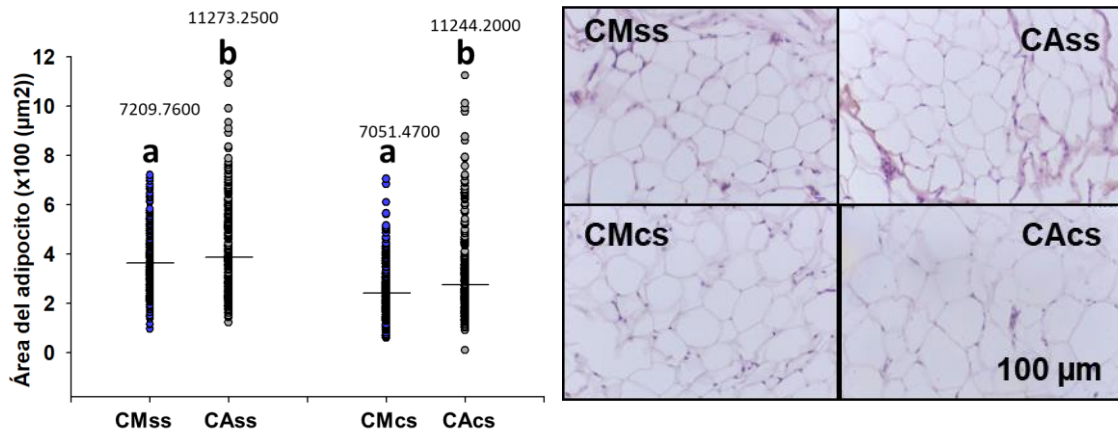
Se utilizaron muestras de tejido adiposo retroperitoneal para obtener el tamaño de los adipocitos. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos que consumieron agua sin sacarosa (**Figura 20A**). La ingesta de agua con sacarosa aumentó significativamente el peso del tejido adiposo retroperitoneal en las ratas con crianza artificial respecto a las ratas con crianza materna (ANOVA de dos factores  $F= 5.986$ ,  $p= 0.021$ ,  $GL= 30$ , seguido de prueba Tukey  $p=0.002$ ). Además, se mostró un aumento de peso de este tejido en las ratas con crianza artificial que consumieron agua con sacarosa respecto a las ratas con crianza artificial que consumieron agua sin sacarosa (Tukey,  $p= 0.015$ ).

En cuanto al área del adipocito (**Figura 20B**) el grupo con crianza artificial que consumió agua sin sacarosa presentó un área significativamente mayor de los adipocitos en comparación con el grupo con crianza materna que consumió agua sin sacarosa (Kruskal-Wallis seguido de método Dunns,  $p< 0.05$ ). También el grupo con crianza artificial que consumió agua con sacarosa muestra un área significativamente mayor de los adipocitos respecto a grupo con crianza materna que consumió agua con sacarosa (método Dunns,  $p< 0.05$ ). Se muestran micrografías representativas del tejido adiposo de cada grupo (**Figura 20C**).

### A. Peso de tejido adiposo retroperitoneal



### B. Área del adipocito



**Figura 20. Área del adipocito. A) peso de tejido adiposo retroperitoneal** de los grupos: crianza materna sin sacarosa (CMss n=8), crianza artificial sin sacarosa (CAss n=6); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8), crianza artificial con sacarosa (CAcs n=9). Resultados son expresados como la media ± EEM. Se muestran diferencias estadísticamente significativas. **B) Dispersión del área del adipocito expresado en μm<sup>2</sup>**, se muestran las áreas de los adipocitos de mayor tamaño de los grupos: crianza materna sin sacarosa 7209,7600 μm<sup>2</sup> (CMss n=8), crianza artificial sin sacarosa 11273.25 μm<sup>2</sup> (CAss n=6); grupo crianza materna con sacarosa 7051.47 μm<sup>2</sup> (CMcs n=8), crianza artificial con sacarosa 11244.2 μm<sup>2</sup> (CAss n=9). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

## **EFFECTO DE LA ESTIMULACIÓN TÁCTIL MAS UN SEGUNDO RETO**

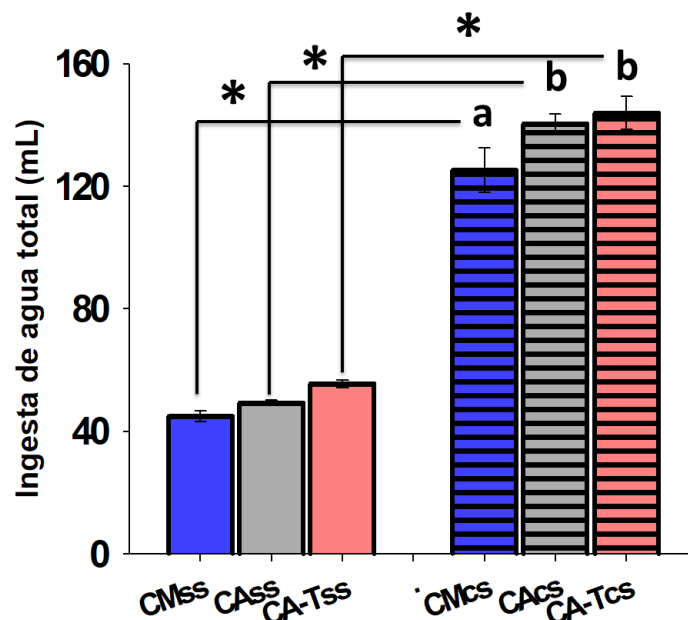
Los siguientes resultados muestran que la estimulación táctil durante el aislamiento no previene los efectos de la privación materna y crianza artificial, por lo que a continuación se muestran los resultados más significativos que descartan la hipótesis. Los resultados de los grupos de crianza artificial y crianza materna se vuelven a presentar para hacer las comparaciones con grupo CA-Táctil. Los grupos que se compararon fueron; grupos que consumieron agua sin sacarosa: Criado por su madre (CMss n=8), criado artificialmente (CAss n=6) y grupo criado artificialmente con estimulación táctil (CA-Tss n=7). Grupos que consumieron agua con sacarosa: Criado por su madre (CMcs n=8), criado artificialmente (CAcs n=9) y grupo criado artificialmente con estimulación táctil (CA-Tcs n=8).

### **14.10 Ingesta total de agua**

El consumo de agua total se obtuvo del promedio del consumo diario de agua con y sin sacarosa por cada rata. Los animales que consumieron agua con sacarosa, presentaron una mayor ingesta de agua respecto a los animales que consumieron agua sin sacarosa (ANOVA de dos factores F tratamiento= 685.28,  $p < 0.001$ , GL=35; **Figura 21**)

Todos los grupos que consumieron agua sin sacarosa no presentaron diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, entre los grupos que consumieron agua con sacarosa, los animales de crianza artificial con

estimulación táctil (CA-Tcs) presentaron un mayor consumo de agua respecto al grupo criado por su madre (Tukey  $p=0.008$ )

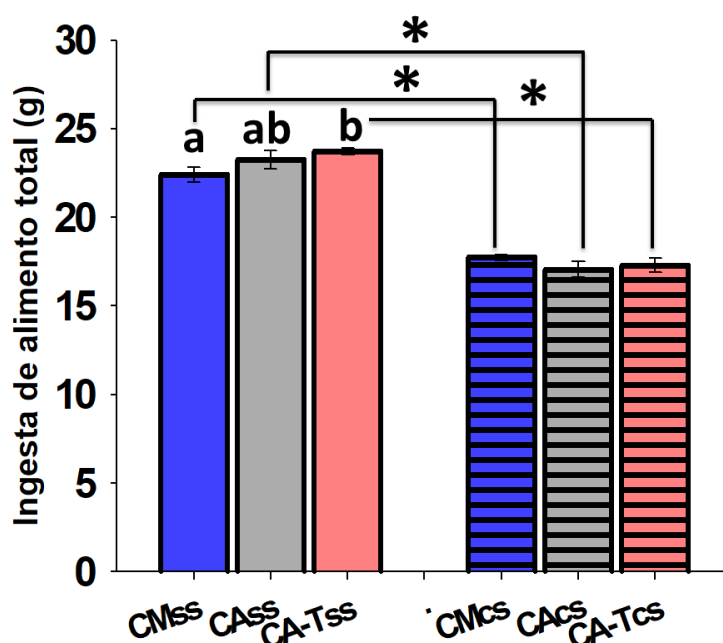


**Figura 21. Promedio de la ingesta total diaria de agua con sacarosa y sin sacarosa (por rata)** durante las seis semanas del segundo reto de: grupo con crianza artificial sin sacarosa (CMss  $n=8$ ), grupo con crianza artificial sin sacarosa (CAss  $n=6$ ), grupo crianza artificial con estimulación táctil sin sacarosa (CA-Tss  $n=7$ ); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs  $n=8$ ), grupo con crianza artificial con sacarosa (CAcs  $n=9$ ), grupo crianza artificial con estimulación táctil con sacarosa (CA-Tcs  $n=8$ ) Las barras que no compartan la misma letra son estadísticamente significativas. Datos son expresados como la media  $\pm$  EEM

### 13.11 Ingesta total de alimento

El consumo de alimento total se obtuvo del promedio del consumo diario de agua con y sin sacarosa por cada rata, para cada grupo, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos. (ANOVA de dos factores Ft tratamiento= 350.811,  $p < 0.001$ ,  $GL=35$ ). Entre los grupos que consumieron agua sin sacarosa, los animales de crianza artificial con estimulación táctil no mostraron diferencias significativas respecto al criado artificialmente, pero consumieron mayor cantidad de alimento respecto al criado por su madre

(Tukey  $p= 0.047$ , **Figura 22**). Los grupos que consumieron agua con sacarosa no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

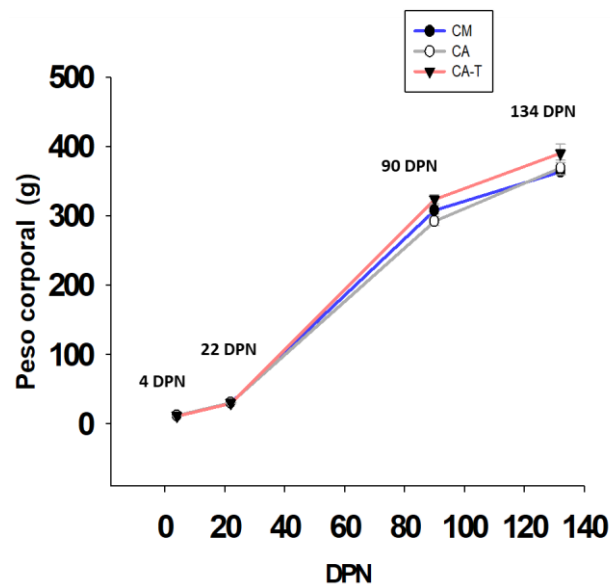


**Figura 22. Promedio de la ingesta total diaria de alimento consumido** durante las seis semanas del segundo reto de: grupo con crianza artificial sin sacarosa (CMss n=8), grupo con crianza artificial sin sacarosa (CAss n=6), grupo crianza artificial con estimulación táctil sin sacarosa (CA-Tss n=7); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8), grupo con crianza artificial con sacarosa (CACS n=9), grupo crianza artificial con estimulación táctil con sacarosa (CA-Tcs n=8). Barras que no compartan la misma letra son estadísticamente significativas. Datos son expresados como la media  $\pm$  EEM

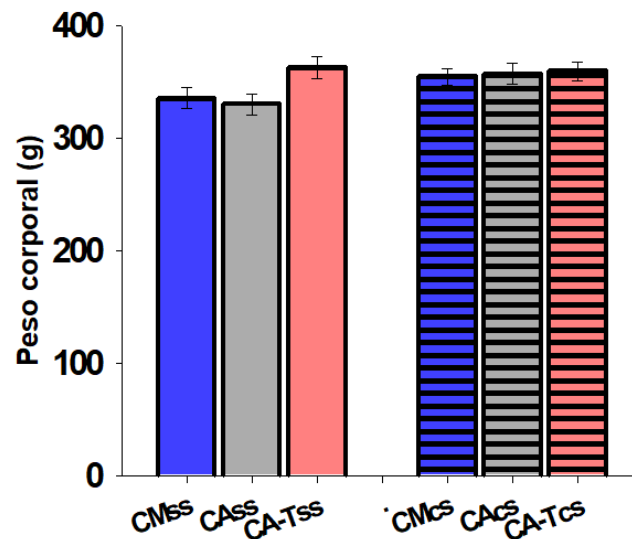
### 14.12 Peso corporal total

Durante las fases del experimento, específicamente, al inicio de la crianza artificial (4DPN), al destete (22DPN), al inicio del segundo reto (90 DPN), y al finalizar el segundo reto (132 DPN) (**Figura 23**), las ratas que fueron criadas por su madre y las ratas que fueron sometidas a crianza artificial no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al peso corporal a lo largo

de las fases del experimento. Y tampoco se encontraron diferencias en el peso corporal total (**Figura 24**)



**Figura 23. Peso corporal a lo largo del diseño experimental.** Comparación entre los grupos cuidado materno (CM), crianza artificial (CA) y criado artificialmente con estimulación táctil (CA-T) durante los día 4 postnatal (DPN), 22 postnatal, 90 postnatal, 132 postnatal. (n= 6 por grupo). No se obtuvieron diferencias significativas.



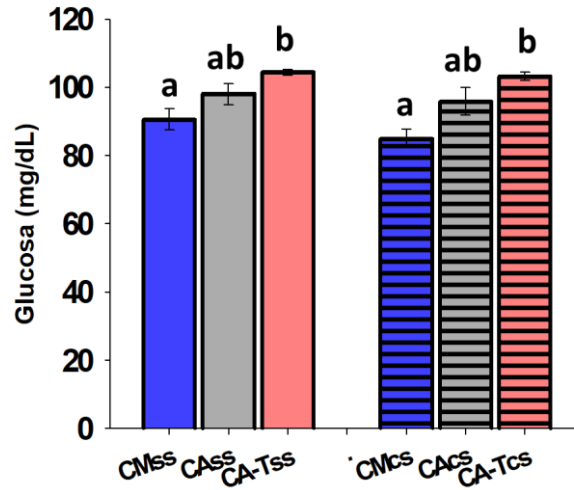
**Figura 24. Promedio del peso corporal del 90 DPN al 134 DPN:** grupo con crianza artificial sin sacarosa (CMss N=8) vs grupo con crianza artificial sin sacarosa (CAss n=6) vs grupo crianza artificial con estimulación táctil sin sacarosa (CA-Tss n= 7); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8) vs grupo con crianza artificial con sacarosa (CAcs n=9) vs grupo crianza artificial con estimulación táctil con sacarosa (CA-Tcs n=8). Datos son expresados como la media  $\pm$  EEM

### 13.13 Química sanguínea

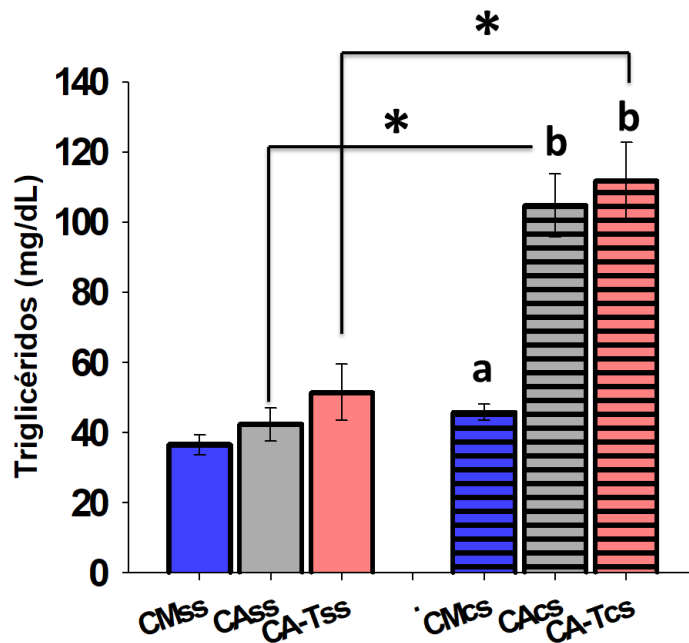
La concentración de glucosa en suero (**Figura 25A**) de los grupos que consumieron agua sin sacarosa fue significativamente mayor, en los animales de crianza artificial con estimulación táctil respecto a los animales criados por su madre (ANOVA de dos factores F crianza= 15.81,  $p < 0.001$ , GL= 45, seguido de prueba Tukey  $p = 0.005$ ), pero similar a los criados artificialmente sin estimulación táctil. Por otro lado en los grupos que consumieron agua con sacarosa la crianza artificial con estimulación táctil presentó concentraciones de glucosa significativamente mayores, respecto a los animales criados por su madre (Tukey  $p < 0.001$ ), y no presentó diferencias respecto a los animales criados artificialmente.

Para la concentración de triglicéridos en los grupos que consumieron agua sin sacarosa, no se presentaron diferencias significativas. Entre los grupos que consumieron agua con sacarosa, los animales de crianza artificial con estimulación táctil presentaron niveles de triglicéridos mayores respecto a los criados por su madre (Anova de dos factores F crianza= 16.935,  $p < 0.001$ , GL=45, prueba Tukey  $p < 0.001$ ) y similares a los animales criados artificialmente sin estimulación táctil. Por otro lado, también se mostró que el consumo de agua con sacarosa aumentó las concentraciones de triglicéridos de los criados artificialmente con estimulación táctil respecto al grupos que consumieron agua sin sacarosa de crianza artificial con estimulación táctil (ANOVA de dos factores F tratamiento= 51.951,  $p < 0.001$ , GL= 4) (**Figura 25B**).

### A. Glucosa



### B. Triglicéridos



**Figura 25. Química sanguínea tomada a los 132 DPN. A.** Concentración de glucosa. **B.** Concentración de triglicéridos de los grupos: con crianza materna sin sacarosa grupo con crianza artificial sin sacarosa (CMss n=8), grupo con crianza artificial sin sacarosa (CAss n=6), grupo crianza artificial con estimulación táctil sin sacarosa (CA-Tss n=7); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8), grupo con crianza artificial con sacarosa (CACS n=9), grupo crianza artificial con estimulación táctil con sacarosa (CA-Tcs n=8). Barras que no compartan la misma letra son estadísticamente significativas. Datos son expresados como la media  $\pm$  EEM

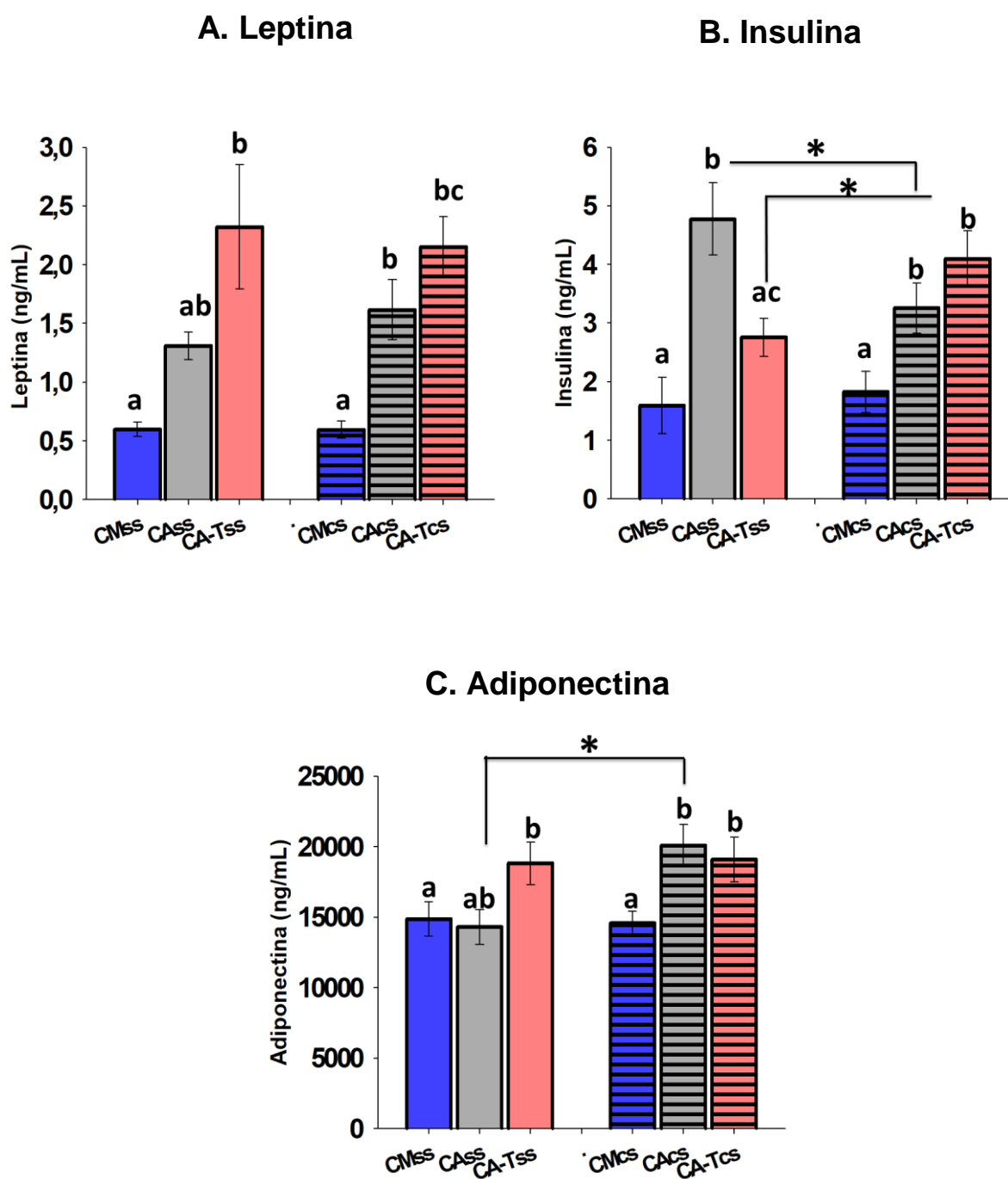
#### 14.14 Hormonas reguladoras del metabolismo energético

En los grupos que consumieron agua sin sacarosa, los animales de crianza artificial con estimulación táctil presentó una concentración de leptina significativamente mayor respecto a los animales con crianza materna (ANOVA de dos factores  $F_{\text{crianza}} = 16.089$ ,  $p < 0.001$ ,  $GL = 45$ , **Figura 26A**). De la misma manera en los grupos que consumieron agua con sacarosa, la crianza artificial con estimulación táctil presentó una concentración mayor de leptina respecto a los animales criados por su madre (Tukey,  $p < 0.001$ ) (**Figura 26A**), pero no respecto al grupo criado artificialmente.

Los niveles de insulina (**Figura 26B**) en los grupos que consumieron agua sin sacarosa, fue significativamente más bajos en los animales de crianza artificial con estimulación táctil respecto a los criados artificialmente sin estimulación táctil (ANOVA de dos factores  $F_{\text{crianza}} = 14.103$ ,  $p < 0.001$ ,  $GL = 45$ , seguido de Tukey  $p = 0.016$ ) pero no hubo diferencias respecto a los criados por su madre. Por otro lado, en los grupos que consumieron agua con sacarosa, la concentración sérica de insulina fue significativamente más alta en los animales de crianza artificial con estimulación táctil respecto a los animales criados por su madre (Tukey  $p = 0.002$ ), pero no fue diferente a los criados artificialmente sin estimulación táctil. La ingesta de agua con sacarosa aumentó la concentración de esta hormona en los criados artificialmente con estimulación táctil respecto a los animales del mismo grupo pero que consumieron agua sin sacarosa (Tukey  $p = 0.046$ )

Para la concentración de adiponectina (**Figura 26C**) los grupos que consumieron agua sin sacarosa, los animales de crianza artificial con estimulación táctil presentaron un aumento significativo de adiponectina

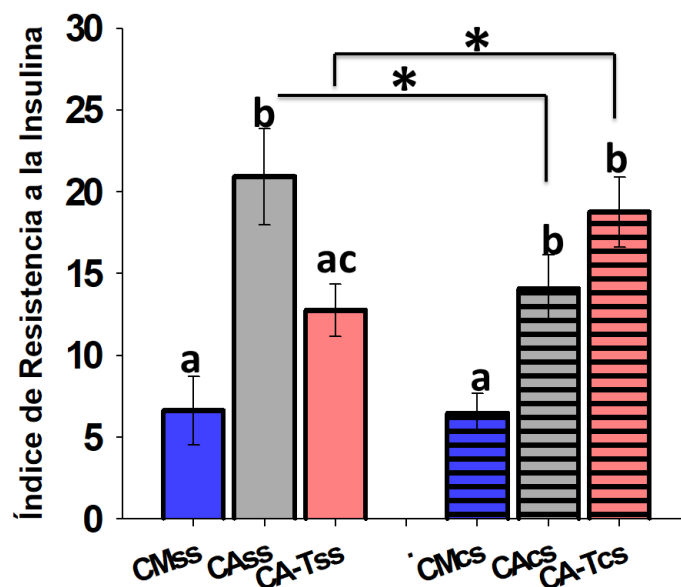
respecto al grupo criado por su madre (ANOVA de dos factores F crianza= 14.236,  $p < 0.001$ , GL=45 seguido de Tukey  $p = 0.018$ ); los grupos que consumieron agua con sacarosa los animales criados artificialmente con estimulación tuvieron mayor concentración de esta hormona respecto al grupo criado por su madre pero similar al grupo criado artificialmente (Tukey  $p < 0.001$ )



**Figura 26. Promedio de la concentración de hormonas medidas a los 132 DPN. A.** Concentración de leptina. **B.** Concentración de insulina **C.** Concentración de adiponectina de los grupos: crianza materna sin sacarosa (CMss n=8), grupo con crianza artificial sin sacarosa (CAss n=6), grupo crianza artificial con estimulación táctil sin sacarosa (CA-Tss n=7); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8), grupo con crianza artificial con sacarosa (CACS n=9), grupo crianza artificial con estimulación táctil con sacarosa (CA-Tcs n=8). Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. Datos son expresados como la media  $\pm$  EEM

## 14.14 Índice de resistencia a la insulina (IRI)

Entre los animales que consumieron agua sin sacarosa se encontró que los animales de crianza artificial con estimulación táctil tienen niveles significativamente menores de IRI respecto a los criados artificialmente (ANOVA de dos factores F crianza= 17.027,  $p < 0.001$ , GL=45, seguido de Tukey  $p = 0.033$ ). La ingesta de agua con sacarosa aumentó el IRI de los animales de crianza artificial con estimulación táctil respecto a los animales criados por su madre (Tukey,  $p < 0.001$ ) y no fue significativamente diferente respecto a los animales de crianza artificial sin estimulación táctil, sin embargo en comparación al grupo criados artificialmente con estimulación táctil que tomo agua sin sacarosa, se mostró un aumento estadísticamente significativo (Tukey  $p = 0.045$ ) (Figura 27)

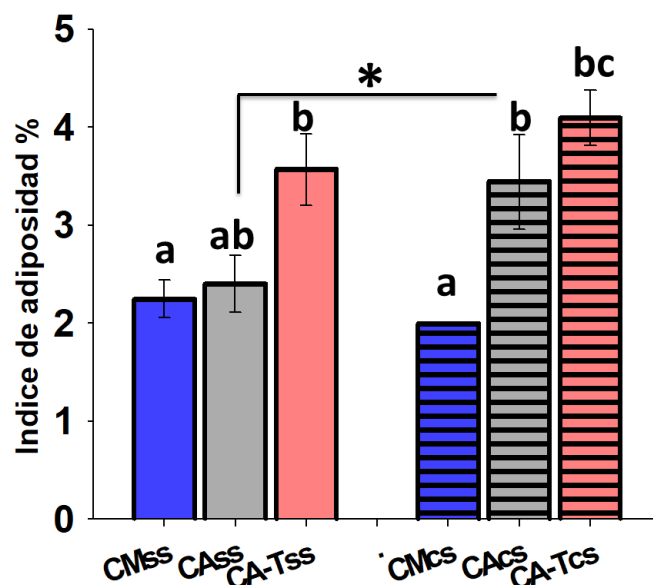


**Figura 27. Índice de resistencia a la insulina** de los grupos: con crianza materna sin sacarosa grupo con crianza artificial sin sacarosa (CMss n=8) vs grupo con crianza artificial sin sacarosa (CAss n=6) vs grupo crianza artificial con estimulación táctil sin sacarosa (CA-Tss n=7); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8) vs grupo con crianza artificial con sacarosa (CACs n=9) vs grupo crianza artificial con estimulación táctil con sacarosa (CA-Tcs

n=8). Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. Datos son expresados como la media  $\pm$  EEM

### **14.15 Índice de adiposidad**

Los resultados del Índices de adiposidad o porcentaje de grasa corporal mostraron que de los grupos que consumieron agua sin sacarosa los animales criados artificialmente con estimulación táctil mostraron un índice de adiposidad significativamente más elevado respecto a los animales criados por su madre (ANOVA de dos factores  $F_{crianza} = 14.236$ ,  $p < 0.001$ ,  $GL = 45$  seguida de Tukey  $p = 0.018$ ). Los animales que consumieron agua con sacarosa, el grupo de crianza artificial con estimulación táctil presentaron un porcentaje significativamente mayor respecto al criado por su madre, pero no significativamente diferente al criado artificialmente sin estimulación táctil (Tukey  $p < 0.001$ ) **(Figura 28)**.



**Figura 28. Índice de adiposidad o porcentaje de grasa corporal** de los grupos: con crianza materna sin sacarosa grupo con crianza artificial sin sacarosa (CMss n=8), grupo con crianza artificial sin sacarosa (CAss n=6), grupo crianza artificial con estimulación táctil sin sacarosa (CA-Tss n=7); grupo crianza materna con sacarosa (CMcs n=8), grupo con crianza artificial con sacarosa (CAcs n=9) , grupo crianza artificial con estimulación táctil con sacarosa (CA-Tcs n=8). Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. Datos son expresados como la media  $\pm$  EEM

#### 14. 16 Interacción (Crianza x tratamiento)

Al hacer el análisis estadístico ANOVA de dos factores, se obtuvo el efecto de las variables independientes (tipo de crianza y tratamiento) sobre las variables dependientes. **(Tabla 4)**

El efecto del tipo de crianza (CM, CA, CA-T) fue estadísticamente significativo para las variables: Ingesta de agua total ( $p= 0.004$ ), triglicéridos ( $p<0.001$ ), leptina ( $p<0.001$ ), insulina ( $p<0.001$ ), adiponectina ( $p<0.001$ ), IRI ( $p<0.001$ ), índice de adiposidad ( $p<0.001$ ), Tejido adiposo retroperitoneal ( $p=0.021$ ), área del adipocito ( $p<0.001$ ).

El efecto del tratamiento (con sacarosa/ sin sacarosa) fue estadísticamente significativo para las variables: ingesta de agua total ( $p < 0.001$ ), ingesta de alimento total ( $p < 0.001$ ), calorías totales ( $p < 0.001$ ), triglicéridos ( $p < 0.001$ ), área del adipocito ( $p < 0.001$ ).

Se obtuvieron interacciones (crianza x tratamiento) estadísticamente significativas para las variables: Triglicéridos ( $p < 0.001$ ), insulina ( $p = 0.013$ ), IRI ( $p = 0.013$ ), tejido adiposo retroperitoneal ( $p = 0.031$ ).

**Tabla 4. Análisis estadístico ANOVA de dos factores**

VARIABLE	Efecto de crianza		Efecto de la sacarosa		INTERACCIÓN (crianza x tratamiento)	
	F	p	F	p	F	p
Ingesta de agua total	6,702	<b>0,004</b>	685,281	<b>&lt;0,001</b>	0,938	0,403
Ingesta de alimento total	0,795	0,461	350,811	<b>&lt;0,001</b>	3,233	0,054
Consumo de calorías totales	3,231	0,087	807,447	<b>&lt;0,001</b>	2,438	0,134
Glucosa	15,810	<b>&lt;0,01</b>	1,577	0,217	0,338	0,716
Triglicéridos	16,935	<b>&lt;0,001</b>	51,951	<b>&lt;0,001</b>	8,345	<b>&lt;0,001</b>
Leptina	16,089	<b>&lt;0,001</b>	0,237	0,629	0,193	0,825
Insulina	14,103	<b>&lt;0,001</b>	0,00154	0,969	4,853	<b>0,013</b>
Adiponectina	16,089	<b>&lt;0,001</b>	0,237	0,629	0,193	0,825
IRI	17,027	<b>&lt;0,001</b>	0,0416	0,839	4,827	<b>0,013</b>
Índice de adiposidad	14,236	<b>&lt;0,001</b>	2,708	0,108	2,044	0,143
Tejido adiposo retro	5,986	<b>0,021</b>	2,185	0,151	5,206	<b>0,031</b>
Área del adipocito	31,820	<b>&lt;0,001</b>	105,123	<b>&lt;0,001</b>	3,505	0,061

## 15. RESUMEN DE RESULTADOS

Variables	Sin sacarosa			Con sacarosa					
	CM (control)	CA	CA-T	CM (control)	CA		CA-T		
Ingesta de agua	-	=	=	-	↑	↑	↑	↑	↑
Ingesta de alimento	-	=	↑	-	↓	=	↓	=	↓
Calorías	-	=	=	-	↑	=	↑	=	↑
Peso corporal	-	=	=	-	=	=	=	=	=
Glucosa	-	=	=	-	=	=	=	=	=
Triglicéridos	-	=	=	-	=	↑	↑	↑	↑
Colesterol	-	=	=	-	=	=	=	=	=
Leptina	-	=	↑	-	=	↑	=	↑	=
Insulina	-	↑	=	-	=	↑	↓	↑	↑
Adiponectina	-	=	↑	-	=	↑	↑	↑	=
IRI	-	↑	=	-	=	↑	↓	↑	↑
Índice adiposidad		=	↑	-	=	↑	↑	↑	=
Tejido adiposo Retro	-	=	N/D	-	=	↑	↑	N/D	N/D
Área del adipocito	-	↑	N/D	-	=	↑	=	N/D	N/D

Para los grupos tratados con sacarosa, se presentan dos columnas para cada tipo de crianza, la columna izquierda (naranja) indica la comparación entre grupos con el mismo tratamiento (con sacarosa) pero diferente tipo de crianza. La columna de la derecha (morado) es la comparación de los grupos con el mismo tipo de crianza pero diferente tratamiento (con/sin sacarosa).

## **16. DISCUSIÓN**

Los resultados del presente trabajo concuerdan parcialmente con las hipótesis anteriormente planteadas y con previos trabajos. Así, se encontró que la privación materna total a través de la crianza artificial (CA) incrementó las concentraciones séricas de insulina, y también el índice de resistencia a la insulina de las crías; además de un incremento del área de los adipocitos del tejido adiposo retroperitoneal. Por otro lado, la exposición al segundo reto (agua con sacarosa) en los animales CA incrementó los triglicéridos, la concentración de adiponectina y el peso del tejido adiposo retroperitoneal y el índice de adiposidad en comparación con los CA que ingirieron agua sin sacarosa. También el segundo reto incrementó las concentraciones de leptina, pero disminuyó los niveles de insulina. En contraste con lo anterior, la hipótesis de que la estimulación táctil durante el aislamiento previene los efectos de la crianza artificial no fue corroborada. Incluso se encontró que dicha estimulación incrementó aún más los efectos del aislamiento en algunos parámetros metabólicos.

### **EFFECTOS DE LA PRIVACIÓN MATERNA Y CRIANZA ARTIFICIAL COMO UN PRIMER RETO**

Aunque el desarrollo temprano de las crías se rige principalmente por códigos genéticos adquiridos en el momento de la concepción, la expresión de dichos códigos genéticos está influenciada por las condiciones ambientales en las que se desarrolla el organismo. El crecimiento fetal y neonatal de los mamíferos es, por lo tanto, un proceso complejo regulado por las interacciones entre el genoma y el medio ambiente (Patel y Srinivasan, 2006).

Las adaptaciones en los tejidos diana debidas a un estímulo nutricional temprano o un insulto en las ventanas críticas del desarrollo de órganos específicos durante las fases tempranas de la vida, que producen alteraciones permanentes en la fisiología y el metabolismo de los órganos diana, se denominan programación metabólica (Savino, 2010). Las consecuencias de este fenómeno se observan en gran medida en la vida a largo plazo (Cervantes-Rodríguez y cols, 2014).

Se ha descrito en investigaciones previas que en algunas especies de mamíferos incluidos los humanos, las experiencias tempranas con la madre, son un importante modulador del desarrollo en las crías y por tanto, perturbaciones de la relación madre-cría que involucran separación materna tienen consecuencias a largo plazo en la fisiología y el comportamiento de las crías (Moyer-Mileur y cols, 2011). En particular, la estimulación de la madre es esencial para la supervivencia de las crías; esto es especialmente evidente en las especies altriciales, como los humanos y roedores, donde las crías nacen en estado inmaduro y dependen completamente de la madre para sobrevivir y continuar su crecimiento y desarrollo (González y Fleming 2002; González y cols., 2001). La estimulación recibida por las crías en el curso de estos comportamientos maternos es una fuente esencial de señales sensoriales, sociales y hormonales (en la leche materna) importantes para la maduración de diversos órganos (Lomanowska y Melo, 2016).

La presente investigación fue diseñada para determinar si la separación materna y crianza artificial durante el periodo postnatal pre-destete produce un efecto negativo sobre el metabolismo de las ratas macho adultas.

La crianza artificial *per se* fue suficiente para producir efectos en algunos parámetros medidos. Los resultados obtenidos muestran que los animales criados artificialmente tienen un área de las células adiposas más grandes en comparación de los animales criados por su madre. Este dato no se ha encontrado reportado anteriormente en este modelo, sin embargo esto sugiere que la crianza artificial tiene efectos sobre la programación del tejido adiposo. Se ha descrito en la literatura que la hipertrofia adipocitaria es una forma no saludable de la expansión del tejido adiposo blanco, debido a que es una fuente de producción excesiva de adipocinas pro-inflamatorias (Perello y Spinedi 2004; Costa y Spinedi 2017). Una posible explicación a este hallazgo es que la mayor diferencia entre la fórmula láctea utilizada en la técnica de crianza artificial y la leche materna de rata, es la falta de factores de crecimiento y hormonas (Patel y Hiremagalur, 1992). Una de estas hormonas importantes es la leptina, ya que en estudios experimentales se ha demostrado que la leptina es transferida de la circulación de la madre a la leche materna y se han identificado en roedores, receptores a leptina en las células epiteliales gástricas. Esto sugiere que la leptina pasa de la leche materna a la circulación de las crías (Savino y cols., 2010). Se ha encontrado que la leptina proveniente de la leche materna de rata, puede influir en la proliferación y diferenciación de los adipocitos en las crías (Yan y cols., 2014)

De igual manera se ha encontrado elevada la concentración de insulina en suero. En la literatura se ha reportado que en modelos animales de programación metabólica relacionado con desnutrición o sobre-nutrición (dietas altas en grasa o en hidratos de carbono) fetal o en periodo de lactancia, la descendencia que recibe el insulto durante estas etapas críticas de desarrollo

tienden a presentar niveles elevados de insulina y esta persiste hasta la etapa juvenil o adultez (Devaskar y Thamocharan, 2007; Patel y Srinivasan, 2006). Aunque el presente estudio no se enfoca principalmente en aspectos nutricionales, se puede descartar que el modelo utilizado sea un modelo de desnutrición, pero no se descarta la posibilidad de que la composición de macronutrientes en la fórmula láctea utilizada (**tabla 2**) podría contribuir a la hiperinsulinemia presentada en los animales criados artificialmente. Se sabe que el desarrollo de los órganos se extiende a la vida postnatal temprana, en roedores los islotes pancreáticos continúan su desarrollo después del nacimiento (Granado y cols., 2012; Patel y Srinivasan, 2006). Los islotes normalmente secretan cantidades crecientes de insulina en respuesta al aumento de las concentraciones de glucosa, pero no secretan ninguna cantidad medible de insulina a concentraciones muy bajas de glucosa, por lo que las crías de rata neonatal que son amamantadas artificialmente con fórmula lácteas altas en hidratos de carbono, presentan adaptaciones a nivel bioquímico en los islotes pancreáticos, que apoyan la capacidad secretora alterada de estos islotes, secretan mayores cantidades de insulina en concentraciones de glucosa basales (Srinivasan, 2003; Patel y Srinivasan, 2006). Otra posible explicación a la hiperinsulinemia podría relacionarse con la hipertrofia del tejido adiposo encontrada en este trabajo. Como ya se mencionó anteriormente, se ha relacionado que la respuesta a la insulina es una función de la medida del tamaño del adipocito, cuanto mayor es el adipocito menor es la sensibilidad tisular de la insulina, con lo que se ha propuesto que la hiperinsulinemia y la insulinoresistencia periférica de la obesidad se debe más a la hipertrofia adipocitaria que al aumento de grasa corporal total o de la

ingesta (Coelho 2013), por otro lado esta hipertrofia se caracteriza por la producción de citosinas pro-inflamatorias como IL-6 (interleucina-6) y TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa) entre otras (Moreno y Martínez, 2002). Por lo que también se ha encontrado un aumento de estas citosinas en el tejido adiposo de ratones obesos en asociación con resistencia a la insulina (Jianping Ye, 2013). Las funciones de las citosinas pro-inflamatorias son complejas, y se ha sugerido en la literatura que puede estar involucrado en varios mecanismos:

1. Inhibición de IRS-1 (sustrato del receptor de insulina 1),
2. Menor expresión del Glucotransportador (GLUT 4).
3. Inhibición de la función PPAR $\gamma$ , este es un receptor nuclear que impulsa la síntesis de lípidos y el almacenamiento de grasa en las células, induce la expresión de enzimas o proteínas en la lipogénesis o el almacenamiento a través de la activación transcripcional; la reducción de la actividad de PPAR $\gamma$  contribuye a la resistencia a la insulina (Jianping Ye, 2013; Saltiel y Kahn, 2001; Wilcox, 2005). En cuanto al índice de resistencia a la insulina calculado con la fórmula antes mencionada, también se mostró es mayor en los animales criados artificialmente; en general, se acepta que la resistencia a la acción de esta hormona se compensa mediante un aumento en su secreción por las células beta pancreáticas, resultando en una llamada “hiperinsulinemia compensadora” (Ye J 2007; 2013; Rojas y cols., 2007).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo tuvo discrepancia con otros autores (Auestad y cols., 1989; Huynh y cols., 2008) en donde la crianza artificial no afecta las concentraciones séricas de insulina respecto a los animales criados por su madre, sin embargo se encontraron algunas similitudes con estos mismos autores, ya que al igual que en el presente trabajo, no se

encontraron diferencias en las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol, glucosa, además del peso corporal entre ambos grupos.

## **EFFECTOS DE LA PRIVACIÓN MATERNA Y CRIANZA ARTIFICIAL Y EXPOSICIÓN A AGUA CON SACAROSA COMO UN SEGUNDO RETO**

En diversos estudios se han utilizado modelos de programación metabólica, los cuales han mostrado una predisposición a hipertensión y resistencia a la insulina, asociado con incremento de las concentraciones de triglicéridos en suero, colesterol y leptina en las crías expuestas a insultos especialmente nutricionales en etapas críticas de desarrollo (Srinivasan, 2003; Patel y Srinivasan, 2006; Cervantes-Rodríguez y cols., 2014; Zambrano, 2006). Sin embargo se ha visto que estos efectos persisten y se exacerban hasta la edad adulta, esto puede deberse a la gran incorporación de una dieta alta en hidratos de carbono, por ejemplo el consumo de bebidas endulzadas con azúcar podría constituir un “segundo reto” para los individuos programados metabólicamente durante el desarrollo (Cervantes-Rodríguez y cols., 2010; Díaz- Aguilar, 2015).

Otros investigadores han demostrado que la descendencia, específicamente varones, está más predispuesta a los efectos adversos en la homeostasis de la glucosa y la insulina que resultan de las exposiciones a desafíos como la mala nutrición materna y el estrés. Este aumento de la susceptibilidad se ha atribuido a la necesidad fisiológica de crecimiento más rápido y, en consecuencia, a una necesidad nutricional más crítica (Zambrano y cols., 2006; 2010).

El presente trabajo, tuvo por objetivo evaluar los efectos del consumo de agua con sacarosa en etapa adulta después de que las crías macho fueron sometidas a privación materna y crianza artificial en el periodo posnatal predestete. Como se mostró en este trabajo, respecto a esta ingesta de agua y de alimento, se encontró que los animales que consumieron sacarosa tuvieron una ingesta mayor de agua y una ingesta menor de alimento, en comparación con los animales que consumieron agua simple, este dato es similar a los reportados por otros trabajos donde las ratas tienen una mayor tendencia por el agua azucarada que por el agua simple (Moreno y cols., 2009; Capaldi, 1990; Sclafani, 1990; Martínez y cols., 2010). Sin embargo un dato notable es que los animales que fueron sometidos a CA ingieren más agua con sacarosa respecto a los animales criados por su madre que también consumieron agua con sacarosa. Esto sugiere que estos animales que no ingieren leche materna, en consecuencia no obtienen las hormonas presentes en esta leche, como es la leptina (Savino y cols., 2008; 2009; 2010). Se ha descrito que esta hormona puede estar implicada en el desarrollo neonatal y la formación de circuitos neuronales durante periodos críticos en el desarrollo del hipotálamo que controlan el apetito y la saciedad así como la adiposidad en etapas posteriores de la vida (Savino y cols., 2009; 2010; Bouret y cols., 2006). Asimismo se ha mostrado en lactantes humanos a los que se les permite lactancia materna desarrollan un mejor control del apetito y las conductas de ingesta de alimentos sólidos en comparación con los bebés alimentados con fórmula (Stocker y Cawthorne, 2008; Cannon y cols., 2015).

Por otra parte, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en el peso corporal entre los animales criados artificialmente y los criados por

su madre, este hallazgo es consistente con previos estudios en modelos de ratas usando agua con sacarosa al 5 y al 30, 10 y al 8 por ciento durante 12 y 10 semanas (Cervantes-Rodríguez y cols., 2010; Díaz- Aguilar, 2015; Toop y cols., 2015; El Hafidi, 2001; Moreno y cols., 2009; Martínez y cols., 2010). Lo anterior sugiere que los roedores regulan, al menos por el periodo del reto impuesto, su ingesta total de energía exitosamente, aumentando su consumo de agua con sacarosa y disminuyendo su consumo de alimento sólido, aunque esta disminución de comida sólida resulta en un aporte menor de proteína y otros nutrimentos en animales que beben agua azucarada. Por otro lado, en los animales criados artificialmente de este trabajo que consumieron agua con sacarosa sí se observó un incremento del índice de adiposidad y del peso del tejido adiposo retroperitoneal y mesentérico estadísticamente significativo, así como también adipocitos con un mayor tamaño respecto a los criados por su madre. Lo anterior sugiere que este aumento de adiposidad es promovido por la dieta alta en sacarosa que está relacionado con el proceso de lipogénesis *de novo*, que se sabe también es sensible a los cambios en la dieta, ya que es estimulada por un consumo alto y de manera crónica de hidratos de carbono simples y por consiguiente su almacenamiento como reserva aumenta la acumulación de tejido adiposo, además, los adipocitos maduros pueden expandirse en tamaño para adaptarse a las mayores necesidades de almacenamiento y en situaciones de sobrealimentación se vuelven hipertróficas (Pagliassotti y cols., 1996). Otro resultado hallado es el incremento de la concentración de triglicéridos en suero que se ha reportado también en otras investigaciones (Cervantes-Rodríguez y cols., 2010; Díaz- Aguilar, 2015; Toop y cols., 2015; El Hafidi, 2001). Los animales criados artificialmente que

consumieron agua con sacarosa, presentaron concentraciones significativamente más elevadas de triglicéridos respecto a los criados por su madre esto puede estar relacionado con el proceso de lipogénesis mencionado anteriormente, ya que en los adipocitos la glucosa es almacenada primordialmente como triglicéridos, cuando esta síntesis y acumulación de ácidos grasos, que se utilizan como reservas de energía sobrepasa el resguardo en los adipocitos produce a niveles elevados de triglicéridos en plasma (Coelho y cols., 2012). Tanto en humanos como en modelos animales se ha mostrado la correlación de la acumulación excesiva de grasa visceral (tejido adiposo mesentérico y retroperitoneal) con la predisposición a, hiperlipidemias (Wajchenberg 2000).

En este trabajo se obtuvieron resultados similares a otros estudios donde la dieta alta en sacarosa utilizada no alteró las concentraciones de glucosa en suero (El Hafidi y cols., 200; Fuente-Martín y cols., 2012; Díaz- Aguilar, 2015), pero promovió un aumento significativo en la concentración de leptina, insulina sérica e índice de resistencia a la insulina, esto puede sugerir que el consumo de agua azucarada estimula la secreción de insulina suficiente para mantener una normoglicemia, por consiguiente los resultados muestran que, el consumo de agua azucarada podría contribuir a hiperinsulinemia en las crías, resultados similares se han reportado en otros modelos experimentales (Cervantes-Rodríguez y cols., 2010; Díaz- Aguilar, 2015; Toop y cols., 2015; El Hafidi, 2001). No obstante esta hiperinsulinemia es mucho menor en comparación a los animales que consumieron agua simple, desconocemos cual es el proceso fisiológico que esté regulando este resultado, sin embargo podemos sugerir que la hiperglicemia que pudo haber estado dada por el consumo de agua

azucarada es compensada a expensas de almacenaje de triglicéridos y de más tejido adiposo, lo que llevaría a una menor secreción de insulina y una menor resistencia a la insulina (Saltiel y Kahn, 2001). No obstante se también se ha descrito en la literatura que la leptina suprime la secreción de leptina en las células  $\beta$  (Perello y Spinedi 2004; Costa y Spinedi 2017). Los presentes resultados sugieren una predisposición a la hiperleptinemia, este hallazgo puede deberse a que la leptina es una adipocina liberada y regulada por tejido adiposo, los niveles de leptina en el tejido adiposo y en el plasma se correlacionan positivamente con la cantidad de grasa corporal y el tamaño de los adipocitos (Manzur y cols., 2010), mientras mayor sean estos depósitos de grasa, mayores niveles de leptina se secretarán. (Granado y cols., 2012).

En cuanto a los niveles de la hormona adiponectina, esta fue significativamente mayor en los animales criados artificialmente, se sabe que la adiponectina es una adipocina secretada por el tejido adiposo, en condiciones normales tanto en humanos como en ratas, se ha mostrado que tiene una relación negativa con la cantidad del tejido adiposo, mientras menor tejido adiposo exista se presentaran mayores concentraciones de esta hormona ( Balsan y cols., 2015; Wang and Schere, 2016), sin embargo también se ha descrito en modelos de ratón que la resistencia a la insulina puede provocar hiperadiponectinemia (Godínez-Gutiérrez y Valerdi-Contreras 2012).

Los resultados del presente trabajo indican un aumento de tejido adiposo, aumento de concentraciones de triglicéridos de insulina y leptina, que desempeñan un papel como hormonas lipogénicas que regulan el metabolismo y el gasto energético (Harris, 2014). Cabe mencionar que todas estas hormonas, fisiológicamente no funcionan de forma aislada, algunos autores

han descrito que la regulación de estas hormonas es a través de un eje adipoinsular (Perello y Spinedi 2004; Costa y Spinedi 2017). Este estudio, sugieren una predisposición a la obesidad en los animales criados artificialmente (M. Lafontan, 2008; Trayhurn, 2016). Lo que podría indicar que la crianza artificial y la exposición a un 5% de agua azucarada podrían actuar de manera sinérgica.

Por otro lado el periodo de amamantamiento (lactancia materna) podría tener un papel importante en la programación de procesos durante la vida temprana. La identificación de hormonas en la leche materna, involucradas en el balance de energía (leptina, adiponectina, grelina, obestatina, factor de crecimiento insulínico) sugieren que el amamantamiento podría modular vías neuroendocrinas en la regulación del peso corporal, además también hay evidencia que propone que el periodo de lactancia materna está involucrado en la programación del tamaño y/o cantidad del tejido adiposo (Ramos-Román, 2018; Fields y cols, 2011) por lo que diversos estudios proponen que la lactancia materna podría tener un efecto benefactor contra el desarrollo de la obesidad en la infancia y a largo plazo. (Savino y cols., 2009; 2010)

En conclusión los resultados en este trabajo sugieren que el desarrollo del metabolismo y del tejido adiposo depende de las condiciones ambientales en las etapas críticas de desarrollo como lo es el periodo posnatal pre-destete. Estos datos pueden aportar más conocimiento al concepto de "programación metabólica" que se producen como consecuencia de la presencia de un factor durante las ventanas críticas del desarrollo que resultan en efectos fisiológicos en órganos específicos que persisten durante toda la vida y causan patología en adultos.

Aunque el posible papel de los factores genéticos en la programación metabólica no puede ser subestimado, los factores ambientales/sociales implicarían un papel importante. Entre los factores ambientales estudiados se encuentran aspectos nutricionales como la desnutrición materna / fetal, restricción calórica etc. Pero hay pocos estudios en donde además de los factores nutricionales otros factores estén involucrados. Por lo que este trabajo al ser un primer acercamiento que mide el efecto de la separación materna y crianza artificial en el metabolismo, en el futuro deben tomarse en cuenta más aspectos neuroendocrinos. Estos datos también brindan nueva información de los parámetros que podrían ser perturbados en animales y humanos separados de su madre. Aún no se comprenden claramente los mecanismos precisos que predisponen un organismo para las enfermedades en edad adulta, debido a una experiencia alterada en los primeros períodos de la vida. Tal comprensión ayudará en el diseño de tratamientos para disminuir la situación epidémica de la obesidad y síndrome metabólico. Es pertinente descifrar las adaptaciones hormonales y metabólicas iniciales que se producen en los tejidos diana antes de la manifestación de la enfermedad. Tales enfoques mecanicistas son una propuesta difícil de investigar en estudios humanos. Para este propósito, los diversos modelos animales descritos anteriormente son herramientas valiosas para comprender los mecanismos involucrados en la programación metabólica de los órganos diana por las experiencias de la vida temprana y las interacciones con los factores de riesgo de la vida adulta (estilo de vida sedentario, alimentación excesiva). Por otro lado, el modelo de rata CA ofrece una oportunidad para evaluar los mecanismos subyacentes que implican adaptaciones en los órganos diana y la interferencia entre ellos. Los resultados

de estos estudios en animales también ayudarían en el análisis de las consecuencias de las prácticas dietéticas alteradas en bebés humanos, lo que puede proporcionar una pista sobre el aumento de la incidencia de la obesidad y otras enfermedades metabólicas.

## **EFFECTO DE LA ESTIMULACIÓN TÁCTIL MAS UN SEGUNDO RETO**

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la estimulación táctil durante el aislamiento no previene los efectos de la privación materna y crianza artificial, por el contrario en casi todos los parámetros medidos la estimulación táctil tuvo también un efecto negativo. Estos hallazgos son diferentes a los reportados en otro trabajo en donde la estimulación táctil disminuye los niveles de insulina en los animales con separación materna parcial (Moyer-Mileur y cols, 2011). También ha sido reportado que la estimulación táctil previene los efectos conductuales, emocionales, cognitivos y neuroendocrinos de la privación materna y crianza artificial (Melo y Fleming, 2006; Ugarte y cols., 2013; González-Mariscal y Melo, 2013; Lomanowska y Melo, 2016).

Una posible explicación de los efectos contrarios de los estímulos táctiles durante el periodo postnatal es que dichos estímulos *per se* no participan en el desarrollo de los sistemas que participan en la regulación metabólica, como ocurre con los procesos antes referidos (p.e., conductuales, cognitivos, emocionales, etc.). El hecho que tanto los animales que se sometieron a crianza artificial como los que se sometieron a crianza artificial y que recibieron los estímulos táctiles hayan tenido efectos similares sobre los parámetros antes referidos, pero que ambos no recibieron leche materna sugiere que “algo” presente en la leche materna, como las hormonas (p.e., leptina) y factores bióticos (enzimas, anticuerpos, etc.) (Ver Melo, 2015) podría estar participando en el desarrollo de dichos procesos metabólicos. Para poder responder a las anteriores dudas se necesitan desarrollar estudios encaminados a evaluar la participación de estas hormonas en dichos procesos.

En conclusión, aun no se tienen claros los mecanismos que pudieran estar involucrados, por los cuales la estimulación táctil no haya tenido un efecto preventivo como se sugería en la tercer hipótesis de este trabajo, por lo que en esta parte se requiere más investigación al respecto.

## 17. CONCLUSIONES

- La crianza artificial en el periodo posnatal pre-destete tiene efectos negativos sobre algunos parámetros metabólicos medidos en ratas macho en etapa adulta
- El modelo de crianza artificial puede ser utilizado como un modelo de programación metabólica
- La ingesta de agua con sacarosa como un segundo reto potencializa algunos de los parámetros metabólicos como son la concentración de triglicéridos, concentración de insulina, índice de resistencia a la insulina, Tejido adiposo retroperitoneal.
- La estimulación táctil no previene ninguno de los efectos de la crianza artificial

## 18. BIBLIOGRAFÍA

- Alciati A, Gesuele F, Casazza G y Foschi D. (2011). The Relationship between Childhood Parental Loss and Metabolic Syndrome in Obese Subjects. *Stress Health*. Feb;29(1):5-13.
- Al-Hashem Fahaid, Ibrahim Ibrahim, Bastaway Nermeen, Rateb Moshira, Haidara Mohamed, Dallak Mohammed, Soskic Sanja, Bin-Jaliah Ismaeel, Isenovic Esmá. (2011). Effect of insulin on adiponectin and adiponectin receptor-1 expression in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes. *Journal of health science*, 57(4) 334-340
- Almas Alisa, Degnan Kathryn, Radulescu Anca, Nelson Charles, Zeanah Charles y Fox Nathan. (2012). Effects of early intervention and the moderating effects of brain activity on institutionalized children's social skills at age 8. *PNAS* vol. 109 suppl. 2
- Auestad Nancy, Korsak Rose A, Bergstrom D. James y Edmond John. (1989). Milk-substitutes comparable to rats milk; their preparation, composition and impact on development and metabolism in the artificially reared rat. *Brit. J. Nutr.* 61:495-518.
- Bacha F, Saad R, Gungor N, Arslanian SA. (2004). Adiponectin in youth: relationship to visceral adiposity, insulin sensitivity, and beta-cell function. *Diabetes Care* 27(2):547-52.
- Balsan Ardenghi Guilherme, Vieira da Costa José Luiz, De Oliveira Marcadenti Aline, Portal Vera Lúcia. (2015). Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Rev Assoc Med Bras* 61(1):72-80
- Barker DJP, Osmond C., Golding J, Kuh D, Wadsworth M E. (1989). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Br. Med.J.* 298:564-7.
- Barker DJ. (1998). In utero programming of chronic disease. *Aug*; 95(2):115-28.
- Bates Sarah H. and Myers Jr. Martin G. (2003). The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* Vol.14 No.10
- Bautista C.J, Montañó S, Ramirez V, Morales A, Nathanielsz PW, Bobadilla NA y Zambrano. (2015). Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. *British Journal of Nutrition*. 115,538-548.
- Bautista C.J. Martínez, Zambrano E. (2009). Obesidad materna: Consecuencias sobre el metabolismo de la Progenie. *Revista de la escuela de medicina "DR. José Sierra Flores" universidad del noreste*. 23:10-14.
- Bernlohr DA, Jenkins AE, Bennaars AA. (2002). Adipose tissue and lipid metabolism. In: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 4th ed. Vence JE, Vence D (eds.). Elsevier Science, Amsterdam, p. 263-89.
- Bouret SG, Simerly RB. (2006). Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clin Genet*: 70: 295–301

- Bruce Jacqueline, Tarullo Amanda R. y Gunnar Megan R. (2009). Disinhibited Social Behavior Among Internationally Adopted Children. *Dev Psychopathol* 21(1): 157–171
- Bruce Kimberley D. y Hanson A. Mark. (2010). The developmental origins, mechanisms and implications of metabolic syndrome. *Soc. Nutr.* 27:648-652.
- Buettner Christoph, Muse Evan D, Cheng Andrew, Chen Linghong, Scherer Thomas, Alessandro Poca, Su Kai, Cheng Bob, Li Xiasong, Harvey-White Judith, Schwartz, Gary J, George Kunos y Luciano Rossetti. (2008). Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3 independent mechanisms. *Nature Medicine* Volume 14, Number 6.
- Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I y Salas-Salvado J. (2003). Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obesity Res* 11: 525–531
- Cannon Anna M, Kakulas Foteini, Hepworth Anna R, Tat Lai Ching, Hartmann Peter E y Geddes Donna T. (2015) The Effects of Leptin on Breastfeeding Behaviour. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12, 12340-12355
- Capaldi, E.D. (1990). Conditioned food preferences. *Psychology of Learning and Motivation*, 28, 1-33.
- Cervantes-Rodriguez M, Martínez-Gómez, M, Cuevas E, Nicolás L, Castelán F. Nathanielsz P.W., Zambrano E, y J. Rodríguez-Antolin. (2014). Sugared water consumption by adult offspring of mothers fed a protein restricted diet during pregnancy results in increased offspring adiposity: the second hit effect. *British Journal of Nutrition* .111, 616–624.
- Coelho Marisa, Oliveira Teresa, Fernandes Rubén. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci*; 9, 2: 191-200
- Combs, T.P., Berg, A.H., Rajala, M.W., et al. (2003). Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52, 268–276.
- Costa- Gi J E y Spinedl E. (2017). La tormentosa relación entre las grasas y el desarrollo de la diabetes mellitus de tipo 2: actualizado. Parte 1. *Rev. Argent Endocrinol Metab.* 54(3):109–123
- De Meyts P. (2004). Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays*. 26(12):1351–62
- Devaskar Sherin U. y Thamocharan Manikkavasagar. (2007). Metabolic programming in the pathogenesis of insulin resistance. *Rev Endocr Metab Disord* 8:105–113
- Díaz-Aguila Yadira, Castelán Francisco, Cuevas Estela, Zambrano Elena, Martínez-Gómez Margarita, Muñoz Alvaro, Rodríguez-Antolín Jorge, Nicolás- Toledo Leticia. (2015). Consumption of sucrose from infancy increases the visceral fat accumulation, concentration of triglycerides, insulin and leptin, and generates abnormalities in the adrenal gland. *Japanese Association of Anatomists*
- Diez JJ e Iglesias P. (2003). The role of the novel adipocyte- derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 148: 293–300.
- Do Nascimento, Oller Cláudia M, Ribeiro Eliane B y Oyama Lila M. (2009). Metabolism and Secretory Function of White Adipose Tissue: Effect of Dietary Fat. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias* 81(3): 453-466

- Durán Pablo. (2004). Nutrición temprana y enfermedades en la edad adulta: Acerca de la “hipótesis de Barker”. Arch. Argnt. Pediatr 102(1).22-34
- Dymsza H. A, Czajka D. M. y Miller A. (1964). Influence of Artificial Diet on Weight Gain and Body Composition of the Neonatal Rat. J. Nutrition,84: '64
- El Hafidi Mohammed, Cuéllar Adela, Ramírez Jorge, Baños Guadalupe. (2001). Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal D9 and D5 desaturase activities. Journal of Nutritional Biochemistry 12, 396–403
- Elford J, Shaper AG, Whincup P. (1992). Early life experience and cardiovascular diseases ecological studies. Journal of epidemiology and community Health 46: 1-11.
- Fall C H, Pandit A N, Law C M C, Yajnik S, Clark PM, Breier B, Osmond C, Shiell AW, Gluckman p D, Barker DJ. (1995). Size at birth and plasma insulin-like growth factor-1 concentrations. Arch Dis Child. Oct; 73(4): 287–293.
- Field T, Diego M, y Hernandez-Reif M. (2010). Potential Underlying Mechanisms for Greater Weight Gain in Massaged Preterm Infants. Infant Behav Dev. June; 34(3): 383–389.
- Fields David A, Gilchrist Janet M, Catalano Patrick M, Gianni Maria L, Roggero Paola M. y Mosca Fabio. (2011).Longitudinal Body Composition Data in Exclusively Breast-Fed Infants: A Multicenter Study. Obesity 19, 1887–1891.
- Fridlyand LE, Philipson LH. (2004). Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic beta-cells? Diabetes. 53(8):1942–8.
- Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzabal F.J y Burrell Ma. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. Am J Physiol 280: E827–E847
- Fu Z, Gilbert ER, Liu D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. Curr Diabetes Rev. Jan 1;9(1):25-53.
- Fuente-Martín E, García-Cáceres C, Granado M. (2012). Early postnatal overnutrition increases adipose tissue accrual in response to a sucrose-enriched diet. Am J Physiol Endocrinol Metab 302:1586–1598
- Galler Janina R y Tonkiss John. (1991). Prenatal protein malnutrition and maternal behavior in spague-dawley rats. The Journal of Nutrition. pp 762-7.
- Godínez-Gutiérrez S, Valerdi-Contreras L. (2012).Obesidad: Resistencia endócrina múltiple. Revista de Endocrinología y Nutrición Vol. 20, No. 4, pp 152-168
- Goldenberg Denisse, Santos José Luis, Hodgson María Isabel, Cortés Victoria A. (2014). Novel physiological and therapeutic implication of leptin. Rev Med 142: 738-747
- Gonzalez A, Lovic, V, Ward G.R, Wainwright P.E, Fleming A.S. (2001). Intergenerational effects of complete maternal deprivation and

- replacement stimulation on maternal behavior and emotionality in female rats. *Developmental Psychobiology*, 38: 11-32.
- Gonzalez A., Fleming A.S. (2002). Artificial rearing causes changes in maternal behavior and c-Fos expression in juvenile female rats. *Behavior neuroscience*, 11: 999–1013.
- González-Mariscal G y Melo A.I. (2013). Parental Behavior. *Neuroscience in the 21 st century*. Cap 68.pp 2069-2100
- González-Mariscal G. y Melo A.I. Bidirectional effects of mother-young contact on the maternal and neonatal brains. En: J.E. Rommy von Bernhardt & K. Muller (Eds).Series. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. BrainPlasticity. Springer. En prensa.
- Granado Miriam, Fuente-Martín Esther, García-Cáceres Cristina, Argente Jesús, Chowen Juillie A. (2012). Leptin in Early Life: A Key Factor for the Development of the Adult Metabolic Profile. *Obes Facts*;5:138–150
- Gray SL, Vidal-Puig AJ. (2007). Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev* 65: 7-12.
- Hall W.G.(1975).Weaning and growth of artificially reared rats. *Science* 190, 1313–1315.
- Harlow HF, Dodsworth RO, Harlow MK (1965) Total social isolation in monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54:90–97
- Harris Ruth B.S. (2014).Direct and Indirect Effects of Leptin on Adipocyte Metabolism. *Biochim Biophys Acta*.March ; 1842(3): 414–423.
- Huang XF, Arvan P. Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. *J Biol Chem*. 1995; 270(35):20417–23.
- Huynh Minh, Luiken Joost J.J.P, Coumans Will and Bell C Rhonda (2008). Dietary Fructose During the Suckling Period Increases Body Weight and Fatty Acid Uptake Into Skeletal Muscle in Adult Rats. *Obesity* 16, 1755–1762
- Kieffer TJ, Heller RS, Leech CA, Holz GG, Habener JF. (1997). Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 46(6): 1087–93.
- Kuhn CM y Schanberg SM.(1998). Responses to maternal separation: mechanisms and mediator. *Int.J. Der. Neurosci*, jun-jul, 16(3-4): 261-70
- Lafontan M y Girard J. (2008). Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism Part I: Heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes & Metabolism* 34, 317–327
- Le Roith D, Zick Y. (2001). Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*. Mar; 24(3):588-97.
- Lenz Kathryn M, Graham MD, Parada Mayte, Fleming Alison, Ashley Manks. (2007). Tactil stimulation during artificial rearing influences adult fuction and morphology in a sexually dimorphic neuromuscular system. *Dev neorobio* Mar: 68(4): 542-557.
- Levine S., (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic– pituitary–adrenal axis in the rat. *Physiology. Behaviot*, 73: 255–260.

- Lomanowska A.M y Melo A.I. (2016). Deconstructing the function of maternal stimulation in offspring development: Insights from the artificial rearing model in rats. *HorM. Behav.* 77; 224-236.
- Lomanowska, A.M., Chatterjee-Chakraborty, M., Steiner, M., Kraemer, G.W., (2011). Effects of motherless rearing on basal and stress-induced corticosterone secretion in rat pups. *Stress* 14, 685–696
- Lovic a Vedran, Fleming Alison S. (2014) Propagation of maternal behavior across generations is associated with changes in non-maternal cognitive and behavioral processes. *Neuroscience*, 3: 799-806.
- Manuela-Belen Silveira Rodriguez, Lourdes Martínez-Piñero y Raffaele Carraro Casier. (2007). Nutrigenomica, obesidad y salud pública. *Rev Esp Salud Publica* 81: 475-487
- Manzur Fernando, Alvear Ciro, Alayón Alicia Norma. (2010). Adipocitos, obesidad visceral, inflamación y enfermedad cardiovascular. *Rev Colomb Cardiol*; 17: 207-213
- Martínez C, González E, García R, Salas G, Constantino-Casas F, Macías L, Gracia I, Tovar C, Durán-de-Bazúa C. (2010). Effects on Body Mass of Laboratory Rats after Ingestion of Drinking Water with Sucrose, Fructose, Aspartame, and Sucralose Additives. *The Open Obesity Journal*, 2, 116-124
- Martínez-Moreno A, López-Espinoza A, Díaz Reséndiz F, Valdés E. (2009). Consumo de soluciones endulzadas en ratas albinas: sabor vs calorías. *Psicothema* Vol. 21,2, pp. 191-198.
- Matthews, K., Robbins, T.W. (2003). Early experience as a determinant of adult behavioural responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 45–55.
- MC Millen C. y Robinson J.S. (2005). Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming. *Physiol Rev* 85: 571–633, 2005.
- Mela V, Llorente-Berzal A.I, Díaz F, Argente J, Viveros M.P, Chowen J.A. (2012). Maternal Deprivation Exacerbates the Response to a High Fat Diet in a Sexually Dimorphic Manner. *Plos One* 7:1-13.
- Melo A.I y Fleming A.S. (2006). La conducta maternal como modelo para estudiar el desarrollo del sistema nervioso. *Revista Cinvestav.* pp 10-15.
- Melo A.I. (2015). Role of sensory, social, and hormonal signals from the mother on the development of offspring. *Perinatal Programming of Neurodevelopment Advances in Neurobiology.* Cap 11, pp 219-248.
- Messer, M., Thoman, E. B., Terrasa, A. G. y Dallman, P. R. (1969). *J. Nutr.* 98,404
- Moreno M.J y Martínez J.A. (2002). El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. *ANALES Sis San Navarra* 2002; 25 (supl. 1): 29-39
- Moreno Riceliana, Maria E. Quintero y Mendez Reselena. (2011). Maternal Effective deprivation and aggressive behavior in initial age. *Revista saber Ular.* 14:1, 35-41.
- Moyer-Mileur J.L, Haley S, Gulliver K, Thomson A, Slater H, Barrett B, Joss-Moore L, Callaway C, McKnight R, Moore B, y Lane RH. (2010). Mechanical-tactile stimulation (MTS) during neonatal stress prevents hyperinsulinemia despite stress-induced adiposity in weanling rat pups. *Early Hum Dev* 87(3): 159–163

- Mulchand S. y Srinivasan P.M. (2011). Programación metabólica en la vida posnatal inmediata. *Ann Nutr Metab* 2011;58(suppl 1):18–28.
- Nathanielsz P.W. (2006) Animal Models That Elucidate Basic Principles of the Developmental Origins of Adult Diseases. *ILAR J.* 47(1):73-82.
- Nelson Charles A, Fox Nathan y Zeanah Charles Jr. (2013). Anguish of the Abandoned Childre. *Scientific American* 63-67
- Nystrom FH y Quon MJ. (199). Insulin signaling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal* 11:563– 574
- Ogawa Tetsuo, Mukuni M, Kuroda Y.(1994). Periodic Maternal Deprivation Alters Stress Response in Adult Offspring: Potentiates the Negative Feedback Regulation of Restraint Stress-Induced Adrenocortical. Response and Reduces the Frequencies of Open Field-Induced Behaviors. *Pharm. Biochem. Behav.* 49(4): 961-967.
- Oh DK, Ciaraldi T, Henry RR. (2007). Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 9(3):282-9.
- Ottaviani E, Malagoli D, Franceschi C. (2011). The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *Gen Comp Endocrinol* 174: 1-4.
- Pagliassotti Michael J, Piper A Prach, Thad A. Koppenhafer y Pan A. David (1996). Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am. J. Physiol.* 271
- Palombo, D.J., Nowoslawski, M., Fleming, A.S. (2010). Motherless rats show deficits in maternal behavior towards fostered pups. *Dev. Psychobiol.* 52, 142–148
- Patel Mulchand S y Hiremagalur Bhargava K. (1992). Artificial Rearing Technique: Its usefulness in Nutrition Research. *J. Nutr.* 122:412-419
- Patel Mulchand S. and Srinivasan Malathi (2006 ). Metabolic programming as a consequence of the nutritional environment during fetal and the immediate postnatal periods. Cambridge University Press 76-90
- Patel s. Mulchand y Hiremagalur (1991). Artificial-Rearing Technique: Its Usefulness in Nutrition Research. American Institute of Nutrition. *J.Nutr.*122:412-419.
- Perea-Martínez Arturo, López-Navarrete Elena, Carbajal-Rodríguez Luis, Rodríguez-Hernández Raymundo. (2012). Alteraciones en la nutrición fetal y en las etapas tempranas de la vida. Su repercusión sobre la salud en edades posteriores. *Acta Pediatr Mex*, 33(1):26-31.
- Perello M y Spinedi E. (2004). Aspectos neuroendocrinos de la obesidad. *Medicina* 64: 257-264
- Pérez-Torrero Esther, Rubio-Navarro Lorena. (2015). Maternal Behavior Their Adjustments and Implicated factors. *Journal of Behavior and Brain Science* pp 40-55.
- Ramos-Román María. (2018) BreastMilk: Apostnatal Link Between Maternal Life Choices and the Prevention of Childhood Obesity. *ClinicalTherapeutics* 1:4
- Ravelli G P, Stein Z A, Susser M W. (1976). Obesity in Young men after exposure in utero and infancy. *N Engl J Med* 295: 349-353
- Rojas J, Bermudez V, Leal E, Bermudez F, Cano R, Acosta L, Finol F, Aparicio D, Faria J, Arraiz N, Rondón N, Reyes F. (2007). Insulinresistencia e

- Hiperinsulinemia como factor de riesgo cardiovascular. *Revista Latinoamericana de Hipertension*. Vol. 2:6
- Roseboom Tessa, De Rooij Susanne, Painter Rebecca. (2006). The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Human Development* 82, 485—491
- Rosenblatt IS y Lehrman DS. 1963. Maternal behavior in the laboratory rat. In: Reingold HL, ed. *Maternal Behavior in Mammals*. New York: Wiley. p 8-57
- Roy Penny, Rutter Michael y Pickles Andrew (2004). Institutional care: associations between overactivity and lack of selectivity in social relationships. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 45:4 pp 866–873
- Saltiel R. Alan y Kahn C. Ronald. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* .vol 414:13
- Sánchez-Serrano Sinthia Lizbeth y Lamas Mónica. (2011). Epigenética: Un nuevo lenguaje un nuevo destino. *Medigraphic* 4: 2. 105-110
- Savino Francesco and Liguori Stefania A. (2008). Update on breast milk hormones: Leptin, ghrelin and adiponectin. *Clinical Nutrition* 27, 42–47
- Savino Francesco, Liguori Stefania A, Fissore Maria F y Oggero Roberto. (2009). Breast milk Hormones and Their Protective Effect on Obesity. *Int J Pediatr Endocrinol*; 2009: 327505
- Schulz Laura C. (2010). The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. *September 28*, 107: 39
- Sclafani, A. (1990). Nutritionally based learned flavor preferences. *Taste, experience & feeding: Development and learning* (pp. 139-156).
- Shibasaki T, Sunaga Y, Seino S. (2004). Integration of ATP, cAMP, and Ca<sup>2+</sup> signals in insulin granule exocytosis. *Diabetes*. 53 (Suppl 3):S59–62
- Smart JL, Stephens D.N y Katz H.B.(1983). Growth and development of rats artificially reared on a high or a low plane of nutrition. *Br. J. Nutr.* 49, 491-506.
- Srinivasan M, Laychock SG, Hill DJ, Patel MS. (2003). Neonatal nutrition: metabolic programming of pancreatic islets and obesity. *Exp Biol Med* (Maywood). Jan; 228(1):15-23.
- Srinivasan M. y Mulchand S. P. (2008). Metabolic programming in the immediate postnatal period. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 19 (4):146-152.
- Stocker Claire J. y Cawthorne Michael A. (2008). The influence of leptin on early life. *Trends Biotechnol.* Oct;26(10):545-51
- Taylor P.D. y Poston L. (2007). Developmental programming of obesity in mammals. *Exp Physiol* 92.2: 287–298.
- Teicher MH, Andersena S.L Polcarib A.C Andersona, Navaltaa C.P, Kim D.M. (2003). The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27:33–44.
- Ugarte A, Cortés M.C, Eguibar J.R. y Melo A.I. (2013). La conducta materna: efectos sobre el desarrollo materno y sobre el desarrollo de la progenie. En: *Biología Celular y Molecular de las Conductas Reproductivas*. Ed. Universidad Autónoma de Tlaxcala

- Viveros María-Paz, Díaz Francisca, Mateo Beatriz. (2010). Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modification in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Hormones and Behaviors* 57: 405-414.
- Wang Zhao V y Scherer E. Philipp (2016). Adiponectin, the past two decades. *Journal of Molecular Cell Biology* , 8(2), 93–100
- Wilcox Gisela. (2005). Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev Vol 26*
- Wonderlich, S., Ukestad, L., & Perzacki, R. (1994). Perceptions of nonshared childhood environment in bulimia nervosa. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 33, 740–747.
- World Health Organization (2009). *Infant and Young Child Feeding*, Switzerland, WHO Press
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* Jun 12;423(6941):762-9.
- Yan Jing, Liu Lin, Zhu Yun, Huang Guowei y Wang Peizhong Peter. (2014). The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis. *BMC Public Health* 2014, 14:1267
- Ye J. (2007). Role of insulin in the pathogenesis of free fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. Mar;7(1):65-74.
- Ye Jianping. (2013). Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med*. 2013 March ; 7(1): 14–24.
- Zambrano E, Bautista C, Déas M, Martínez-Samoya M, Cnzález-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz P. (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* 571.1. pp 221–230
- Zambrano E, Martínez-Samayoa P.M., Rodríguez-González G.L. and Nathanielsz P.W. (2010). Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol* 588.10 , pp 1791–1799
- Zambrano E, Rodríguez G.L, Guzmán C, García-Becerra R, Boeck L, Díaz L, Menjivar M, Larrea F y Nathanielsz P.W.( 2005). A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J. Physiol* 563. pp 275-284.
- Zavala Laya Mireya Helena. (2008). Fisiología de la Leptina en el Control de la Ingesta y Homeostasis Energética como Enfoque Hacia la Prevención de la Obesidad. *Medicrit* 5(2):74-81
- Zhang Yiyang, Proenca Ricardo, Maffei Marguerita, Barone Mariza, Leopold Mori, Friedman Jeffrey M. Positional Cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, Diciembre 372:1
- Zwick Rachel K, Guerrero-Juarez Christian F, Horsley Valerie y Plikus Maksim V.(2018). Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metabolism* 27, January 9