

# Efecto de la subnutrición sobre la secreción de insulina: estudio en la etapa fetal

Effect of undernutrition on insulin secretion: a study in the fetal period

MARTÍN, M. A., ÁLVAREZ, C. y PASCUAL-LEONE, A. M.

Instituto de Bioquímica (Centro Mixto CSIC-UCM). Facultad de Farmacia. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid. Spain. Phone/Fax: 34 1 5438649. E-mail address: apascual@eucmvx.sim.ucm.es

## RESUMEN

La subnutrición de las madres durante la gestación puede provocar alteraciones en el desarrollo del páncreas endocrino de los fetos. En este trabajo se estudia el efecto que provoca la restricción en un 65% de la ingesta en las madres durante tres períodos distintos de la gestación: a) ratas gestantes subnutridas sólo durante el primer tercio de la gestación (0-7), b) ratas gestantes subnutridas sólo durante el segundo tercio de la gestación (7-14) y c) ratas gestantes subnutridas sólo durante el último tercio de la gestación. En el día 21.5 de preñez se evalúan parámetros básicos como peso corporal, glucemia, insulinemia y contenido de insulina pancreática tanto en las madres como en los fetos. De los resultados obtenidos se concluye que el período clave de subnutrición en el desarrollo del páncreas fetal es la última etapa de la gestación. Finalmente, y una vez establecida la importancia de esta etapa, se realiza un estudio *in vitro* sobre la respuesta insulino-secretora de los fetos procedentes de madres subnutridas durante el último tercio de la gestación. Dicha respuesta lejos de encontrarse disminuida parece mostrar un aumento de la funcionalidad de las células b fetales como consecuencia de la subnutrición de la madre.

**Palabras clave:** Período fetal. Secreción de insulina. Subnutrición.

## ABSTRACT

Mother's undernutrition during pregnancy may alter the normal development of the fetal endocrine pancreas. The present work shows the effect of 65% restriction in mother's intake during the initial, middle and final third of pregnancy. At day 21.5 of pregnancy, body weight, blood glucose and insulin as well as pancreatic insulin were determined both in mothers and fetuses. From these data it is concluded that subnutrition during the final third of gestation is critical for the development of fetal pancreas. The insulin-secretory response of the fetuses from undernourished mothers was determined *in vitro*. This response not only did not decrease but appeared to show an increase in the functionality of the fetal cells as a result of the maternal subnutrition.

**Key words:** Fetal period. Insulin secretion. Subnutrition.

Recibido: 28-11-96

Aceptado: 11-12-96

BIBLID [0004-2927(1996) 37:4; 921-931]

## INTRODUCCIÓN

La alteración de la homeostasis glucídica en las madres gestantes tiene consecuencias decisivas en el desarrollo de los fetos, especialmente en su páncreas. Una alteración del estado nutricional de las madres puede por tanto provocar cambios funcionales y estructurales en el páncreas endocrino de los fetos. Varios estudios en este campo han mostrado que la subnutrición produce una disminución de la respuesta insulino secretora de las células b a su estímulo fisiológico (1). Dahri y cols. (2) suministrando una dieta baja en proteínas a las madres durante toda la gestación encontraron en los fetos en el día 21 de gestación, una reducción de la talla y la proliferación de sus células b y un menor contenido de insulina pancreática. No obstante, es sabido que subnutrir durante toda la gestación impide el incremento de reservas energéticas que ocurre en la etapa previa al último tercio de la gestación (3) y puede llevar a la reabsorción de los fetos (4,5); además, debido a que la diferenciación del páncreas fetal en la rata no tiene lugar antes del día 14-15 de gestación (6-8), establecer un modelo de subnutrición sólo durante la última semana de la preñez puede ser un protocolo interesante para investigar.

Aunque la última etapa de la gestación es la de mayor importancia para el crecimiento del feto, la imposibilidad de un adecuado incremento de las reservas energéticas en la madre durante los dos primeros tercios de la gestación, la compromete durante la última fase, y ello ha de repercutir incluso en la disponibilidad de sustratos al feto (9).

Por tanto, aunque era de esperar que la subnutrición comenzada al final de la gestación llevara a una alteración de la homeostasis glucídica en los animales, decidimos comprobar experimentalmente en que período de la gestación la subnutrición altera más las condiciones del páncreas de las madres y crías subnutridas. Para ello estudiamos el efecto que provocaba restringir la alimentación en los distintos tercios de la gestación —primera (0-7), segunda (7-14) y tercera semana (14-21)— sobre parámetros básicos de la función pancreática de las madres subnutridas y sus fetos. Posteriormente, y una vez establecido como período clave de subnutrición la última etapa de la gestación, se estudió la respuesta insulino-secretora *in vitro* de islotes aislados de fetos procedentes de madres subnutridas durante el último tercio de la gestación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Animales y dieta*

A lo largo del trabajo se han utilizado ratas de la raza wistar criadas en nuestro propio laboratorio con un estricto control de temperatura y sometidas a un ciclo artificial de luz/oscuridad automático (de 0700 a 1900). El inicio de la gestación fue establecido mediante la observación, por frotis, de la presencia de espermatozoides en la vagina de la rata el día siguiente de su apareamiento con el macho. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar de laboratorio (19g de proteínas, 56g de carbohidratos, 3.5g de lípidos, 4.5g de celulosa por cada 100g y una mezcla de sales y vitaminas).

Para establecer la pauta de subalimentación se calculó el alimento ingerido diariamente por las ratas preñadas alimentadas *ad libitum* y se suministró a las gestantes subnutridas el 35% del valor obtenido en los controles. Según este modelo se establecieron cuatro grupos experimentales: a) animales gestantes alimentados *ad libitum* (C), b) animales gestantes subnutridos sólo durante la primera semana de la gestación (0-7), c) animales gestantes subnutridos sólo durante la segunda semana de la gestación (7-14) y d) animales gestantes subnutridos sólo durante la última semana de la gestación (14-21).

En el día 21.5 de gestación se les practicó a las madres gestantes una cesárea bajo anestesia (4mg de pentobarbital/100g de peso corporal) y se obtuvo la sangre de los fetos tras una incisión en la arteria axilar; el suero fue separado y guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Los páncreas fetales fueron extraídos y homogeneizados para la determinación del contenido insulínico (ver más adelante). La sangre de las madres gestantes se tomó de la cola del animal y el páncreas fue obtenido tras el sacrificio de la rata en el día 21.5 de gestación.

Todos los estudios se han realizado de acuerdo con los principios y procedimientos recogidos en el National Institute of Health Guidelines para el cuidado y uso de los animales de experimentación.

### *Aislamiento y cultivo de islotes fetales*

Los islotes fetales (día 21.5 de gestación de la madre) fueron obtenidos siguiendo el método de Hellerström y cols. (10). En resumen, de 20-24 páncreas son depositados y troceados en una solución de Hank estéril (Hank's balanced salt solution, ICN, España) suplementado con 5-7mg de colagenasa (Boehringer Mannheim, Alemania). El vial se agita durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y una vez digerido el tejido se lava tres veces con solución de Hank esteril. El precipitado se resuspende en medio de cultivo (RPMI-1640 -ICN,

España- suplementado con L-glutamina 200mM, penicilina y estreptomicina y suero de vaca fetal en una proporción del 10%) y se transfiere a las placas de cultivo. Los islotes son mantenidos a 37 °C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, renovándose el medio cada 48 horas. Después de 7-8 días de cultivo los islotes son individualmente obtenidos de los platos, limpiados y transferidos a los viales de incubación.

### *Incubación estática de los islotes*

Para el estudio de la función secretora de las células b, grupos de 7 islotes fueron incubados durante 90 minutos a 37 °C en pocillos que contenían 1ml de KRB (10) equilibrado con una mezcla de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95%:5%) y suplementado con 5.0mg/ml de albúmina bovina (fracción V; Sigma, St. Louis, MO). Al medio de incubación se adicionaron los distintos secretagogos a evaluar: a) glucosa 2.8mM, b) glucosa 2.8mM y arginina 19mM, c) glucosa 16.7mM y d) glucosa 16.7mM y arginina 19mM. Al final del período de incubación alícuotas del medio fueron guardadas a -20 °C hasta la valoración de la insulina por radioinmunoanálisis que se describe posteriormente.

### *Extracción de la insulina de los islotes*

Grupos de 20 islotes fueron sonicados en una mezcla de ácido-alcohol (1.5ml de HCL 12M/100ml de etanol) y guardados a -20 °C para la determinación del contenido insulínico por radioinmunoanálisis como se describe a continuación.

### *Determinación de la glucosa y la insulina*

La glucosa se analizó por el método de la glucosa-oxidasa (Boehringer Mannheim, Alemania). Se mide en el sobrenadante que se obtiene después de desproteinizar la sangre con una mezcla de Ba(OH)<sub>2</sub>-ZnSO<sub>4</sub>.

El contenido de insulina total de los páncreas se determinó siguiendo el método de Best y cols. (11). El páncreas total fue mezclado y ultrasonificado en ácido etanol (1.5ml de HCl 12M/100ml de etanol) en un porcentaje de 10ml/g en el caso del páncreas de las madres gestantes y de 0.5ml total en el caso de los fetos. Los homogenados se mantuvieron toda la noche a 4 °C y posteriormente se centrifugaron y el sobrenadante se guardó a -20 °C hasta su posterior análisis.

La insulina inmunorreactiva en las muestras de suero y de páncreas y en

los extractos de islotes fue valorada con insulina purificada de rata como estándar (INCSTAR, USA), anticuerpos de insulina de cobaya e insulina porcina, marcada con  $I^{125}$ . Este método permite determinar 3iU/ml (0.12ng ml) con un coeficiente de variación del 10%.

### *Cálculos estadísticos*

Los resultados obtenidos se han expresado como la media aritmética de cada serie de valores y su error estándar (ES). Para determinar el grado de significación estadística de la diferencia de dos medias se utilizó la t de Student. Cuando se compararon cuatro poblaciones el grado de significación estadística se determinó mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguida de un test de diferencias significativas (12).

## RESULTADOS

### *Características de las madres gestantes y sus fetos en el día 21 de gestación (Figs. 1,2)*

#### *Madres gestantes*

El cálculo del incremento de peso corporal ganado por las madres durante la gestación mostró que las madres subnutridas no incrementaron de peso durante la semana que duró la restricción; sin embargo las madres que fueron subnutridas durante la primera semana de la gestación al final de ésta alcanzan el peso corporal de las madres control, hecho que no se observa en ninguno de las otros dos casos, subnutridas en el segundo o en el último tercio (Fig. 1). Los resultados aparecen expresados como el incremento de peso que experimentan los animales a lo largo de la gestación en relación al peso que tenían en el momento de la concepción, siendo el peso medio de los cuatro grupos muy similar (210-230g). Tanto la glucemia como la concentración de insulina en plasma y páncreas fueron similares en todos los grupos.

#### *Fetos*

En todos los casos, comparando con los animales control, la subnutrición de las madres, durante la primera, segunda o tercera semana, provocó una disminución del peso corporal de los fetos a término; mientras, el peso del páncreas solo fue significativamente inferior en los fetos procedentes de

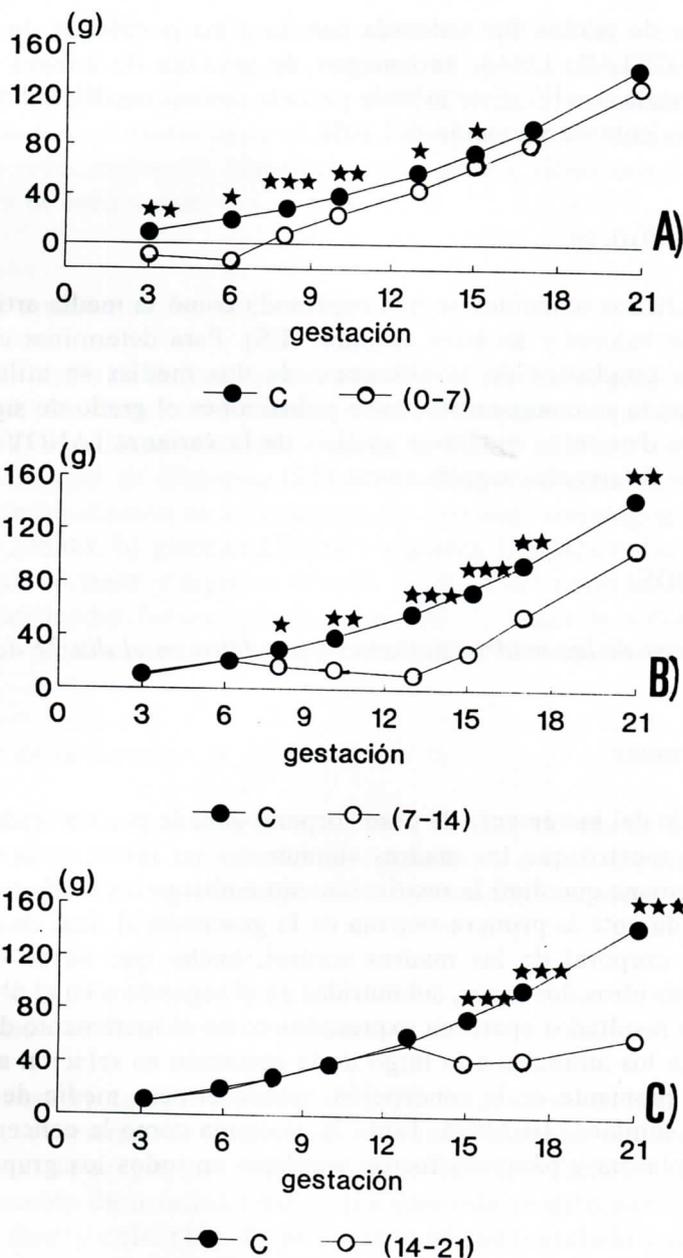


Fig. 1.—Incremento de peso corporal de ratas preñadas subnutridas durante el primer (0-7) (A), segundo (7-14) (B) y último (14-21) (C) tercio de la gestación.

Media  $\pm$  ES. Número de datos: 12.

- ☆  $p < 0.05$  relativa al grupo C
- ☆☆  $p < 0.01$  relativo al grupo C
- ☆☆☆  $p < 0.001$  relativo al grupo C

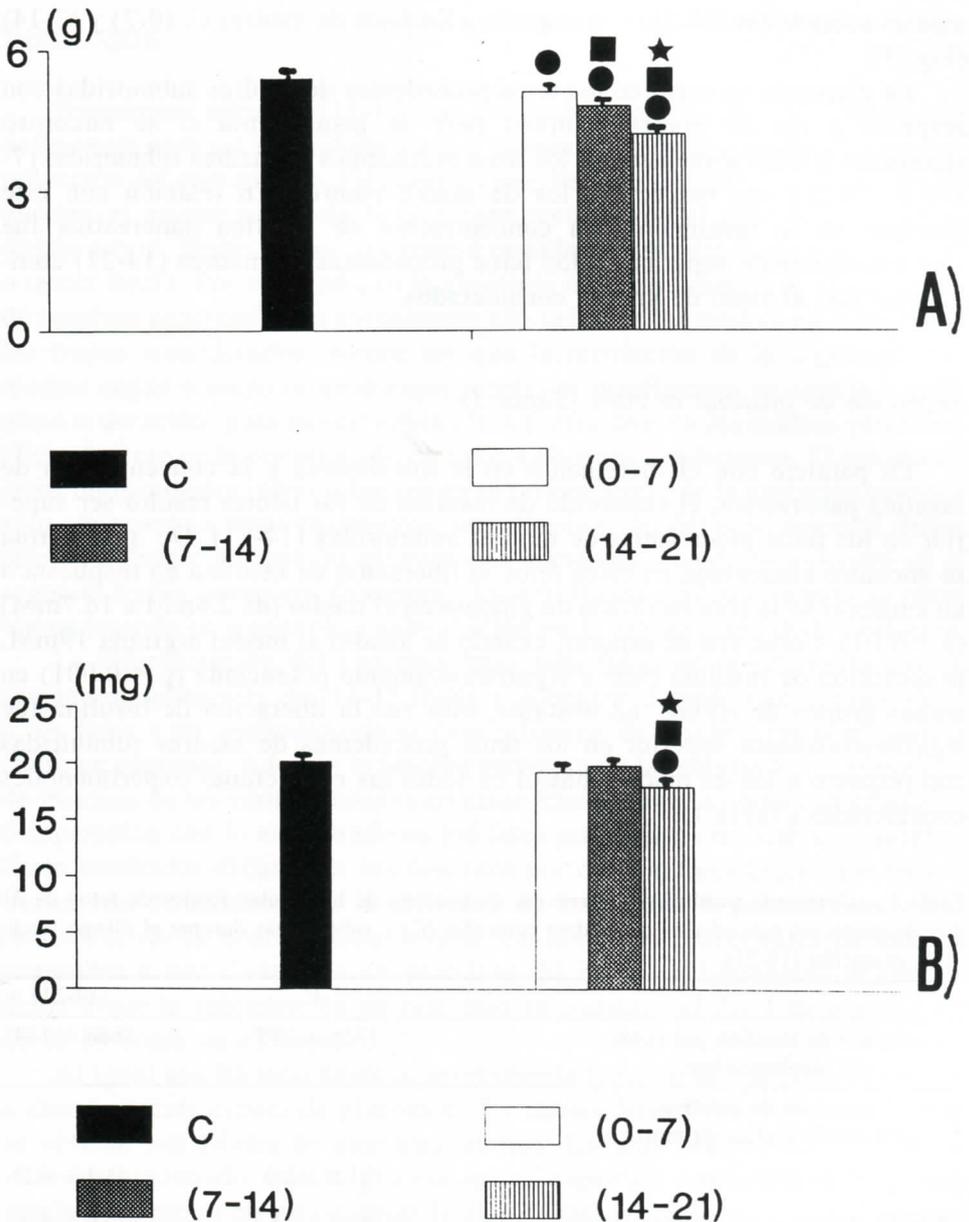


Fig. 2.—Peso de cuerpo (A) y páncreas (B) de fetos de 21 días de gestación procedentes de madres subnutridas durante el primer (0-7), segundo (7-14) y último (14-21) tercio de la gestación y madres controles (C).

Media  $\pm$  ES. Número de datos: 12.

- ★  $p < 0.05$  relativa al grupo C
- ★★  $p < 0.05$  relativo al grupo (0-7)
- ★★★  $p < 0.05$  relativa al grupo (7-14)

madres subnutridas (14-21) con respecto a los fetos de madres C, (0-7) y (7-14) (Fig. 2).

La glucemia no varió en los fetos procedentes de madres subnutridas con respecto a los de madres control pero la insulinemia si se encontró significativamente aumentada en los fetos procedentes de madres subnutridas (7-14) y (14-21) con respecto a los de madre control. En relación con este aumento en la insulinemia, la concentración de insulina pancreática fue significativamente superior en los fetos procedentes de madres (14-21) comparados con el resto de grupos considerados.

### *Secreción de insulina in vitro (Tabla 1)*

En paralelo con el incremento en la insulinemia y la concentración de insulina pancreática, el contenido de insulina de los islotes resultó ser superior en los fetos procedentes de madres subnutridas (14-21). De igual forma se encontró aumentada en estos fetos la liberación de insulina en respuesta a un aumento de la concentración de glucosa en el medio (de 2.8mM a 16.7mM) ( $p < 0.01$ ). Como era de esperar, cuando se añadió al medio arginina 19mM, la secreción de insulina estuvo significativamente potenciada ( $p < 0.001$ ) en ambos grupos de islotes. no obstante, otra vez la liberación de insulina fue significativamente superior en los fetos procedentes de madres subnutridas con respecto a los de madre control en todas las condiciones experimentales consideradas (Tabla 1).

Tabla 1.—Contenido insulínico y secreción de insulina de los islotes fetales de fetos de 21 días de gestación procedentes de madres controles (C) y subnutridas durante el último tercio de la gestación (14-21).

	C	(14-21)
Contenido de insulina por islote ( $\mu$ U insulina/islote)	1736 $\pm$ 185	3668 $\pm$ 124 <sup>c</sup>
Liberación de insulina ( $\mu$ U insulina/islote/90 min)		
2.8mM glucosa	21.5 $\pm$ 2.3	43.3 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>
2.8mM glucosa + 19mM arginina	83.7 $\pm$ 31.3	275.6 $\pm$ 4.9 <sup>c</sup>
16.7mM glucosa	47.8 $\pm$ 9.1	113.8 $\pm$ 9.9 <sup>b</sup>
16.7mM glucosa + 19mM arginina	140.8 $\pm$ 10.4	246.5 $\pm$ 7.5 <sup>c</sup>

Los datos aparecen expresados como media  $\pm$  ES. Número de datos: 12.

<sup>a</sup> $p < 0.05$  relativo al grupo C.

<sup>b</sup> $p < 0.01$  relativo al grupo C.

<sup>c</sup> $p < 0.001$  relativo al grupo C.

## DISCUSIÓN

Numerosos estudios (13-15) han mostrado que someter a las ratas a una deficiencia proteica en la dieta o a una disminución de la comida provoca una reducción del crecimiento. En nuestro caso, las madres que fueron subnutridas durante el primer tercio de la gestación recuperaron el peso corporal en el último tercio, hecho que no se observa cuando se subnutre durante el segundo o tercer tercio. Por otro lado, ni la glucemia ni la insulinemia ni el contenido de insulina pancreática se encontraron afectados en las madres en ninguna de las etapas considerados; parece ser que la restricción de la ingesta de las madres según nuestro modelo experimental es insuficiente, en cuanto a magnitud o duración, para incidir sobre estos parámetros en las madres gestantes, ello repercute en la consecución de fetos en buenas condiciones. El estudio de estos fetos muestra como subnutrir en el primer tercio de la gestación provoca sólo, en cuanto a estos parámetros, una disminución del peso corporal de los fetos a término; aunque las alteraciones aumentan cuando se subnutre en el segundo tercio, como era de esperar, los resultados más interesantes se obtuvieron cuando se comenzó la subnutrición en la última etapa de la gestación.

La diferenciación del páncreas fetal tiene lugar en la rata en la tercera semana de gestación, día 14-15 (6-8), y subnutrir durante este período llevó a los fetos a un aumento de la concentración de insulina tanto en plasma como en páncreas. Además la función secretora de las células b y el contenido de insulina de los islotes aislados en estos fetos estuvo también aumentado en comparación con lo encontrado en los fetos procedentes de madres controles. Estos resultados difieren de los descritos por otros autores (2,16) que encontraron una disminución de la actividad de las células b pancreáticas y una reducción de la proliferación celular en los fetos procedentes de madres sometidas a una dieta baja en proteínas. Si bien las diferencias se pueden deber a que la subnutrición en este caso se comenzó el día 1 de gestación y no el 14 como en el nuestro.

Al igual que ha sido descrito previamente (17,18), la respuesta insulínica a altas concentraciones de glucosa de los islotes fetales fue menor que la que se obtiene con islotes de animales adultos. Un gran número de estudios *in vitro* han mostrado que la glucosa no es capaz de producir una respuesta insulino secretora en los páncreas fetales de rata y humanos (8); sin embargo, en este estudio los fetos procedentes de madres subnutridas presentaron una mayor respuesta insulino secretora a la glucosa que los procedentes de madre control. Este aumento en la respuesta de los islotes de fetos de madres subnutridas fue similar a lo encontrado en ratas gestantes infundidas con glucosa durante la última semana de la gestación (19); los fetos de dichas madres presentaron un aumento de la concentración de insulina en plasma y páncreas y una elevada respuesta *in vitro* a la glucosa. En el mismo sentido,

una diabetes gestacional ligera en la madre produce modificaciones estructurales y funcionales en el páncreas fetal tales como aumento del tejido endocrino, aumento del porcentaje de células b (20) y alto contenido insulínico (21). Aunque las madres subnutridas durante el último tercio de la gestación son normoglucémicas, se podría especular que la subnutrición esta afectando de alguna forma el metabolismo glucídico de las madres y como consecuencia produciendo modificaciones estructurales y funcionales similares en el páncreas fetal.

Contrariamente, Dahri y cols. (6) habían mostrado que subnutrir durante toda la gestación provoca una disminución de la funcionalidad del páncreas fetal acompañado de alteraciones estructurales. La diferencia se puede encontrar en la duración de la subnutrición durante toda la gestación. Al igual que una diabetes gestacional severa provoca graves alteraciones de la homeostasis glucídica materna y, en consecuencia, un pobre desarrollo del páncreas (22) y una diabetes gestacional ligera con media alteración de la tolerancia a la glucosa provoca un aumento del desarrollo de las células b fetales (20), la mayor o menor duración de la subnutrición puede provocar mayores o menores alteraciones del metabolismo glucídico y repercutir así de forma distinta en la estructura y funcionalidad del páncreas.

En conclusión, con los resultados obtenidos en este estudio sobre la influencia de la subnutrición durante la gestación en el desarrollo del páncreas fetal se pone de manifiesto la importancia de considerar los cambios en la secreción de insulina en los fetos junto con aquellos que tienen lugar en la homeostasis glucídica de la madre gestante.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la DGICYT (Dirección General de Investigación, Científica y Tecnológica), Ministerio de Educación y Ciencia, España, ref. PM 92-0249.

## REFERENCIAS

- (1) RAO, RH.: *Endocr Rev* (1988), **9**:67-87.
- (2) DARHI, S., SNOECK, A., REUSENS-BILLEN, B., REMACLE, C., HOET, J. J.: *Diabetes* (1991), **40**(Suppl.2):115-120.
- (3) LÓPEZ LUNA, P., MUÑOZ, T., HERRERA, E.: *Life Sciences* (1986), **39**:1389-1393.
- (4) POND, W. G., MERSMANN, H. J.: *Nutr Reports Internat* (1988), **37**:1167-1177.
- (5) GALLER, J. R., PROPERT, K. J.: *Nutr Reports Inter* (1981), **24**:885-892.
- (6) PICTET, R. L., RALL, L., DE GASPARO, M.: In: Camerini-Davalos RA, Cole HS, eds. *Early diabetes in early life*. New York: Academic Press (1975), 25-29.
- (7) HELLERSTRÖM, C., SWENNE, I., ANDERSSON, A.: In: Lefebvre PJ, Pipeleers DG,