



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

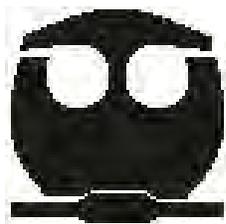
TÍTULO: *“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN
PANCREÁTICA DEL GEN ABC_{A1} EN EL MODELO DE
RATA OBESA”.*

Tesis que para obtener el Grado de Maestro en Ciencias
Bioquímicas, presenta:

EBC. Agustín Federico Vega Crespo

Asesor:

Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta



México DF, Agosto de 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. José Pedraza Chaverri.

Vocal: Dr. Armando Tovar Palacio.

Secretario: Dr. Samuel Canizales Quintero.

Primer Suplente: Dr. José de Jesús García Trejo.

Segundo Suplente: Dr. Sobeida Sánchez Nieto.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio 202 del Edificio F–Bioterio del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y en las instalaciones de Bioterio–Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Asesora:

Dra. Marta Menjívar Iraheta.

Sustentante:

EBC. Agustín Vega Crespo.

Dedicatorias

Dedico este trabajo a mis padres por su apoyo incondicional y perenne a lo largo de toda mi vida, a Nicole por ser mi todo, y a mis perritos: Obi, Chewbacca y Eneas por todo el sacrificio.

Gracias por estar siempre junto a mí.

Agustín.

Agradecimiento

Agradezco:

- A Dios, por su apoyo y guiar mis pasos en cada momento de mi vida.
- A toda mi familia, y en especial a mi madre por su infinito amor y ayuda durante toda mi vida.
- A Nicole por ser la mejor parte de mis días y la luz de mi vida.
- A la Secretaria de Relaciones Exteriores de México, Departamento de Intercambio Académico por el otorgamiento de fondos destinados a mi educación.
- A la Dra. Marta A. Menjívar Iraheta por su amistad, cariño y comprensión al transmitirme conocimientos mucho más allá del plano profesional.
- A las Doctoras Guadalupe Ortiz, Ángeles Granados, Ísela Montufar y Elena Zambrano por su paciencia y apoyo para llevar a término este trabajo.
- A todos mis amigos en México: la Química Náyade y su familia por permitirme ser parte de ella, a María Helena por las pláticas dilectas de las 6 pm, a Adriana por compartir horas de arduo trabajo y Roxana por su apoyo logístico, de veras, gracias por hacerme sentir como en casa.

ÍNDICE

Índice.....	i
Resumen.....	ii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
PROGRAMACIÓN DEL DESARROLLO Y MEDIO AMBIENTE INTRAUTERINO.....	1
SÍNDROME METABÓLICO.....	2
TRANSPORTADORES DE MEMBRANA.....	4
TRANSPORTADOR ABC_{AI}	6
METABOLISMO DE COLESTEROL, ABC_{AI} Y DISFUNCIÓN EN LOS ISLOTES PANCREÁTICOS.....	10
JUSTIFICACIÓN.....	12
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	14
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	15
PERFIL BIOQUÍMICO.....	17
PERFIL HORMONAL.....	18
PRUEBAS MOLECULARES.....	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
3. RESULTADOS.....	24
4. DISCUSIÓN.....	31
5. CONCLUSIONES.....	35
PERSPECTIVAS.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37

RESUMEN

Antecedentes

El crecimiento normal del feto es un proceso ordenado y secuencial que implica una interacción continua de reguladores genéticos que se ve constantemente modificado por los factores del entorno, en donde, estímulos *in útero* establecen una respuesta permanente en el feto lo cual conduce a una ulterior potenciación y susceptibilidad al desarrollo de enfermedades crónico degenerativas complejas. Los roedores alimentados con dietas ricas en grasas durante la gestación y lactancia desarrollan un fenotipo muy similar al síndrome metabólico en el humano en la progeñie con una marcada disminución hipotalámica en la sensibilidad a la leptina. El transportador de membrana ABC_{AI} media el transporte de lípidos a través de la membrana celular en un proceso dependiente de ATP que remueve el exceso de colesterol citosólico y lo fija a la molécula de HDL naciente para su transporte reverso. El transportador ABC_{AI} tiene función tejido específico dependiente con influencia a susceptibilidad a distintas patologías relacionadas con el metabolismo de lípidos. Animales, sometidos a dietas altas en grasa, manifiestan un deterioro progresivo de la función secretora de la célula β pancreática acompañada con una marcada resistencia a la acción de la insulina.

Justificación

Existen pocos datos que expliquen el mecanismo mediante el cual el transportador de membrana ABC_{AI} está directamente involucrado con la liberación de insulina y la homeostasis de la glucosa, de tal manera que una dieta hipercalórica alta en lípidos como programador fetal del desarrollo durante gestación y lactancia en animales de experimentación, ofrece una perspectiva mucho más amplia del papel de transportador ABC_{AI} en la liberación de insulina por parte de la célula β pancreática.

Hipótesis

Una dieta hipercalórica con un alto contenido en lípidos, como factor programador del desarrollo durante la gestación y la lactancia, inducirá una alteración en la expresión pancreática del gen ABC_{AI} con cambios significativos en la concentración plasmática de insulina.

Objetivos

General: evaluar la expresión génica de ABC_{AI} en tejido pancreático durante la lactancia en el modelo de rata obesa.

Específicos

- Determinar la expresión de ABC_{AI} a día 10 y 20 durante la lactancia.
- Asociar patrones de expresión de ABC_{AI} con la concentración de insulina circulante.

Material y Métodos

Se trabajó con hembras adultas de la cepa Hsd: *Sprague Dawley*[®] *SD*[®] entre 90–110 días de edad al momento de la monta y machos adultos de características similares, alojados bajo condiciones controladas de humedad y temperatura con ciclos luz/oscuridad de 12 horas teniendo acceso a agua y a las dietas, control y alta en grasa durante gestación–lactancia, *ad libitum*. El estudio está orientado a los críos machos en lo que respecta a su caracterización molecular y metabólica en donde, la obtención de tejidos y sangre se hace previa decapitación con un ayuno tanto para críos como madres de 4 horas con un perfil de estudio seleccionado que constó de: glucosa, colesterol, triglicéridos, insulina y leptina a más de la evaluación genético molecular por tiempo real.

Resultados

La alimentación grasa constante durante gestación–lactancia aumenta la expresión pancreática de ABC_{A1} en los críos a lo largo de la lactancia mientras que la transición desde o hacia el alimento graso la disminuye presentando un incremento ante la supresión de este esquema nutricional. La asociación entre los patrones de expresión de ABC_{A1} y la concentración de insulina circulantes no son significativas sugiriéndose replicar, ajustar y ampliar el estudio a fin de aumentar la resolución estadística del ensayo coadyuvado a un estudio de co–localización intracelular de insulina sobre célula β y la dosificación protéica del transportador por inmunoblot en tejido pancreático. La alimentación materna con grasa durante lactancia induce en un mayor desarrollo de los críos detectable en base a sus diferencias morfométricas a los días 10 y 20 en donde la transición graso–control en gestación–lactancia retrasa este proceso al compararlo con su grupo control a los intervalos dados. La alimentación materna en base graso condiciona a un incremento de las variables bioquímicas en estudio aumentando la concentración de insulina circulante en los críos así como un incremento en los valores de leptina hacia el término de la lactancia.

Conclusiones

- La expresión pancreática de ABC_{A1} en los críos a lo largo de la lactancia aumenta bajo un régimen nutricional constante con base graso durante gestación–lactancia.
- La transición desde o hacia el alimento graso durante gestación–lactancia disminuye la expresión pancreática de ABC_{A1} en los críos a lo largo de la lactancia con recuperación ante la suspensión de este esquema nutricional.
- El establecimiento metabólico autónomo en la progenie se establece al final de la lactancia en donde la alimentación materna en base graso condiciona a un incremento de las variables bioquímicas en estudio.
- Existe una correlación entre el incremento en la expresión del gen ABC_{A1} y un aumento en los valores circulantes cuantificados para insulina, sin embargo esta no es robusta probablemente debido a las limitantes del modelo o al reducido número de datos.

INTRODUCCIÓN

PROGRAMACIÓN DEL DESARROLLO Y MEDIOAMBIENTE INTRAUTERINO

Las enfermedades en la edad adulta están asociadas con patrones de crecimiento en etapas tempranas de la vida, implicando la alimentación en este estadio como un patrón relevante (1) en donde el ambiente intrauterino de la madre actúa como una poderosa condicionante del desarrollo fetal (2).

El crecimiento normal del feto es un proceso ordenado y secuencial de divisiones y movimientos de las células, producto de una interacción continua y variable de reguladores genéticos que son constantemente modificados por los factores del entorno (2) por lo que procesos que son un estímulo *in útero* establecen una respuesta permanente en el feto, lo cual conduce a una ulterior potenciación y sensibilidad a las enfermedades (3).

Cada cría está preestablecida a maximizar su propio bienestar, lo cual, durante etapas tempranas de la vida está concomitantemente relacionado con el medio ambiente intrauterino, por lo que se considera el embarazo y la lactancia como nidos metabólicos dependientes de la función placentaria, así como del control metabólico de la madre (1).

En el proceso de adaptación, el término “*Nido*” refiere al lugar físico en el ambiente, condiciones características del hábitat (1), así como factores nutricionales y hormonales que son determinantes del crecimiento y desarrollo fetal dependientes de los nutrientes y oxígeno aportados por la madre (4), es por ello que la alimentación materna, la ingesta de calorías y cada función metabólica tienen un papel importante que desempeñar en la programación metabólica y bioquímica fetal (5–7).

El proceso de adaptación se halla supeditado a una serie de variantes entre las que se remarcan las de orden genético y ambiental, así la adaptación génica de los organismos vivos se da en función al medio ambiente generando una modificación de su fenotipo. A este concepto se lo conoce como “*Plasticidad del Desarrollo*” (1).

Por otra parte, la capacidad de los padres para inducir efectos medio ambientales en sus crías es de notable relevancia. Lacey (1998) distinguió tres clases de efectos medioambientales promovidos por los padres (1):

1. El fenotipo de los progenitores no puede afectar al fenotipo de las crías.
2. El fenotipo del progenitor puede transmitirse directamente a la descendencia.
3. El fenotipo del progenitor puede transmitirse indirectamente a la descendencia.

Estudios experimentales en animales de laboratorio con dietas ricas en grasas pero con una concentración normal de carbohidratos, revelan que estos mantienen una ingesta similar comparada con sus controles pero derivan en una mayor ingesta calórica proporcionada por la grasa (8, 9) , por lo cual protocolos nutricionales bajo este esquema nutricional durante la gestación y la lactancia de roedores resultan en un fenotipo muy similar al síndrome metabólico en el humano en la progenie animal con una marcada disminución hipotalámica a la sensibilidad de la leptina (10, 11).

De manera similar, ratas alimentadas bajo estas condiciones desde y durante el periodo posnatal desarrollan índices similares al síndrome metabólico en edad adulta como es aumento en su peso corporal, valores plasmáticos de glucosa, lípidos e insulina, así como una marcada resistencia a la misma y alteraciones en el metabolismo lipídico y un considerable incremento en la presión sanguínea sistólica (12–14).

Estudios nutricionales en ratas de la cepa Hsd: *Sprague Dawley*[®] *SD*[®] relacionan el consumo de una dieta rica en lípidos durante la gestación y la lactancia con una disminución de la capacidad reproductiva así como una disminución en la expresión pancreática de genes como el homeobox pancreático duodenal 1 [Pdx-1], transportador de glucosa 2 [Glut2] y el de la glucocinasa [GK] con efecto sobre el peso corporal, glucosa circulante y concentración de insulina en las crías al destete (14–16).

SÍNDROME METABÓLICO

Es una entidad clínica controvertida que aparece con amplias variaciones fenotípicas en personas con una predisposición endógena la cual es determinada genéticamente y condicionada por factores ambientales (17).

El síndrome metabólico está caracterizado por insulinorresistencia e hiperinsulinemia compensadora, asociado a trastornos en el metabolismo de carbohidratos, hipertensión, dislipidemias (hipertrigliceridemia, descenso del HDL-C, aumento del LDL-C, aumento de ácidos grasos libres y lipemia postprandial) y obesidad (17).

DIABETES MELLITUS TIPO 2

Se la puede definir como la inhabilidad endocrina del páncreas para secretar insulina suficiente para abastecer el aumento en la demanda metabólica resultante de la resistencia a la insulina que está asociada con obesidad y envejecimiento (17, 18).

Clínicamente la “*Resistencia a la Insulina*” se define como la incompetencia de una determinada concentración de insulina para conseguir el control de la glucosa sanguínea. Es una anormalidad celular compleja que implica fundamentalmente al tejido adiposo, al hígado y al músculo esquelético (17).

Además de la susceptibilidad genética, se precisa de los siguientes factores de riesgo (17):

1. Obesidad central o abdominal.
2. Sedentarismo.
3. Dieta hipercalórica rica en grasas y carbohidratos.
4. Tabaquismo.
5. Otros.

OBESIDAD

El vertiginoso aumento en la obesidad en los últimos años es consecuencia de cambios medio ambientales que han generado una abundancia de alimentos y un estilo de vida sedentario lo cual favorece una acelerada ganancia de peso así como la alteración en procesos fisiológicos y metabólicos innatos en donde la regulación en el balance de energía radica (19). Comúnmente, la obesidad aparece en individuos quienes presentan un grupo de genes en donde, cada uno de los cuales crea solamente una menor tendencia a la generación de energía pero estos efectos combinados, pueden conducir a una ganancia de peso en condiciones medioambientales adecuadas (19).

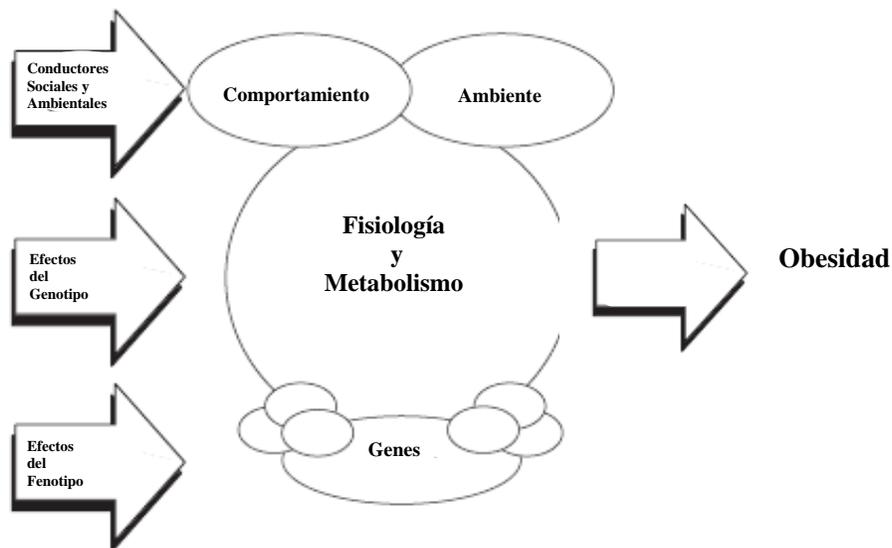


Fig. 1.0. Interacción multifactorial en el desarrollo de obesidad (19).

Existen una serie de factores relacionados con la obesidad (Figura. 1.0.) entre los cuales destacan (19):

1. **Factores genéticos:** muchos de ellos discretos enmarcando la obesidad como síntoma cardinal de una etiología clara con herencia Mendeliana, vinculados a desórdenes alimenticios de asociación familiar que infiere mutaciones en genes que forman parte del mapa genético de la obesidad estudiados en ratón y humano (19).

2. **Factores metabólicos:** asociados a un fondo genético característico, así como a un período de exposición nutricional y a la actividad física, lo cual genera un metabolismo que podría ser más o menos susceptible a la influencia obesogénica del estilo de vida moderno, aunado a factores intrínsecos propios del individuo como metabolismo lento, alteraciones en la selección de energía, alteraciones en el control del apetito e hiperplasticidad del tejido adiposo (19).
3. **Factores comportamentales y medioambientales:** existe evidencia aplastante que la obesidad moderna es una epidemia causada por cambios en el estilo de vida, es por ello, que efectos en la programación del desarrollo que operen bajo estas nuevas condiciones, pueden presentar interacciones complejas entre el fenotipo/medioambiente. Por otra parte la actividad física es un modulador poderoso del síndrome metabólico (19).
4. **Exceso de tejido adiposo:** existe una asociación entre el exceso de tejido adiposo y el síndrome metabólico esencialmente en la sensibilidad a la insulina a través del Ciclo de Randall, en el cual la resistencia a la insulina es causada por la competencia por la utilización de la glucosa mediada por la liberación de altas concentraciones de ácidos grasos del tejido adiposo (19).

TRANSPORTADORES DE MEMBRANA

Son proteínas que disminuyen la energía de activación para el transporte de iones y moléculas pequeñas a través de una membrana con gran especificidad en un proceso que recibe el nombre de difusión facilitada o transporte activo según si el mecanismo depende o no del consumo de energía para su inicio (Figura. 1.1.). Estas proteínas de membrana, aceleran el movimiento de un soluto a través de la misma con una cinética de transporte del soluto similar a la cinética enzimática pero sin que este sufra alguna transformación durante dicho proceso (20). Los transportadores de membrana se clasifican (Tabla. 1.0.) en superfamilias de acuerdo a su estructura (20).

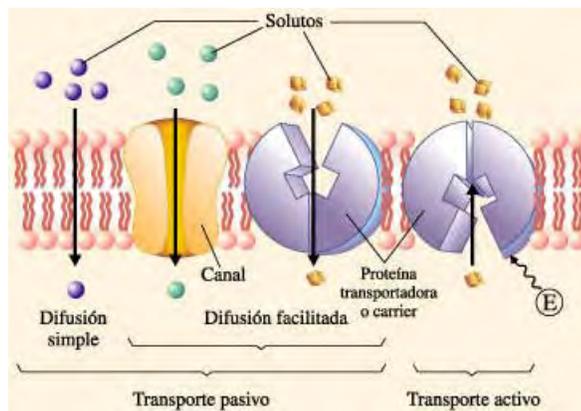


Fig. 1.1. Mecanismos de transporte membranar (21).

TRANSPORTADORES ABC

Constituyen una gran familia de transportadores dependientes de ATP que bombean

Tabla. 1.0. Clasificación de los sistemas transportadores (CT) (20).

1.A. Canales tipo hélice α	
1.A.1.	Superfamilia VIC de canales iónicos dependientes del voltaje Canales de K^+ dependientes del voltaje
1.A.3.	Canal de rianodina/ IP_3 receptor de Ca^{2+}
1.A.8.	Familia mayor de proteínas intrínsecas Acuaporinas
1.A.9.	Canales iónicos ligando dependientes de receptores a neurotransmisores (LIC) Canal/receptor de acetilcolina
1.B. Porinas tipo barril β	
1.B.1.	Familia general de las porinas bacterianas (GBP)
1.C. Toxinas Formadoras de Poro	
1.C.7.	Familia de las toxinas diftéricas
1.C.18.	Familia de las mellitinas
2.A. Portadores: uniportadores, simportadores y antiportadores	
2.A.1.	Familia mayor de facilitadores (MFS) Transportadores de lactosa/permeasa de <i>E. Coli</i>
2.A.1.1.	Familia de portadores de glucosa GLUT1: transportador de glucosa en eritrocito
2.A.1.9.	P_i - H^+ simporter
2.A.12.	Familia ATP-ADP antiporter (AAA)
2.A.13.	Familia de captura de C_4 -dicarboxilato (Dcu)
2.A.21.	Familia de simporter soluto- Na^+ (SSS) Na^+ -glucosa simporter en células epiteliales
2.A.73.	Transportadores de HCO_3^- Antiporter HCO_3^- - Cl^-
2.B. Portadores de síntesis no-ribosomal	
2.B.1.	Familia de acarreadores de valinomicina Valinomicina
3.A. Transportadores conducidos por la hidrólisis de una unión difosfato (usa PP_i no ATP)	
3.A.1.	Superfamilia de casete de unión al ATP
3.A.2.	Superfamilia ATPasa H^+ - o Na^+ -Translocasa Tipo-F, Tipo-V, Tipo-A F_0F_1 ATPasa Bomba de Protones; V_0V_1 ATPasa; A_0A_1 ATPasa
3.A.3.	Superfamilia ATPasa Tipo-P Antiporter ATPasa Na^+K^+ ; bomba SERCA Ca^{2+}

aminoácidos, péptidos, proteínas, iones metálicos, lípidos varios, sales biliares y muchos compuestos hidrofóbicos incluyendo drogas a través de las membranas celulares, el más conocido de ellos es el transportador multidrogas (**MDR1**) que es responsable del transporte efectivo de drogas antitumorales (**20**). La mayoría de ellos actúan como bombas dependientes de ATP, cuya hidrólisis, los cierra teniendo a la vez una alta especificidad por su sustrato (**20, 22**).

El genoma humano contiene por lo menos 49 genes que codifican para transportadores ABC muchos de los cuales están involucrados en el mantenimiento de la bicapa lipídica y en el transporte de esteroides, derivados del colesterol y ácidos grasos por todo el cuerpo (**20**). Los transportadores de esta familia tienen una actividad flipasa, es decir, mueven a sus sustratos a través de la bicapa de la membrana lipídica de un lado a otro, integrando de esta manera parte de la maquinaria celular de intercambio de colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos (**24**). Todos los transportadores ABC, constituidos por dos dominios de unión a nucleótidos (**NBDs**) y dos dominios

transmembranales (**Figura. 1.2.**), se localizan generalmente en la membrana celular aun cuando se los ha encontrado en la membrana de retículo endoplásmico, mitocondria y lisosomas (**20, 22**).

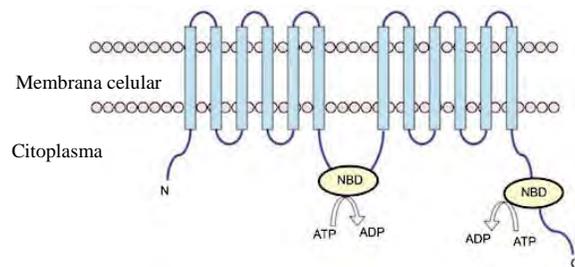


Fig. 1.2. Estructura transportadores de la familia ABC (23).

TRANSPORTADOR ABC_{A1}

El transportador casete de unión al ATP o ABC_{A1} por sus siglas en inglés, es un transportador de membrana que regula el eflujo del colesterol intracelular asistiendo en su unión a las apolipoproteínas A₁ durante la maduración del HDL-C (**24, 25**).

BASES MOLECULARES DE ABC_{A1}

Para ABC_{A1} en *Rattus norvegicus* se dispone de la siguiente información (**26–28**):

Nombre: ATP-binding cassette, subfamily A (ABC_{A1}), member 1.

Tipo de Gen: Codifica para proteína transportadora de membrana (**29**).

Localización: 5q.24 (**30**).

Estructura: Conformado por 50 exones con un tamaño de 149 Kpb.

mRNA: Transcrito de 6,783 b.

Proteína: Estructurada por 2,261 residuos (**31**).

Expresión: En la mayoría de tejido y de manera primaria en páncreas, músculo, tejido adiposo, hígado, intestino y macrófagos.

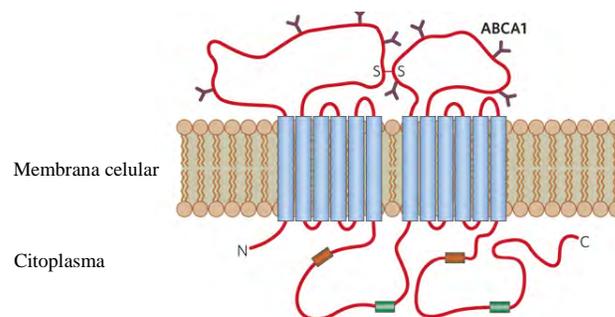


Fig. 1.3. Estructura del transportador ABC_{A1} (32).

El transportador ABC_{AI} tiene dos estructuras integrales cada una con un dominio transmembranal constituido por seis hélices y un NBD en los cuales se observa dos motivos peptídicos conservados conocidos como Walker A y B presentes en muchas proteínas dependientes de ATP, en donde Walker C representa la firma particular de los miembros de esta familia de transportadores (**Figura. 1.3.**). Además, ABC_{AI} tiene su grupo amino terminal orientado al citosol y dos giros extracelulares altamente glicosilados unidos por una o más cisteínas (**24, 29, 32**).

La familia ABC está constituida por 13 subclases (ABC_A – ABC_G), mutaciones en algunos miembros de esta familia se han asociado con una gran variedad de enfermedades mayoritariamente vinculadas con el metabolismo de lípidos y lipoproteínas por lo que en numerosas investigaciones en cultivos celulares y animales de experimentación se ha caracterizado ampliamente al representante AI de esta familia y se demuestra como el mayor determinante de los valores plasmáticos de HDL-C y un potente factor ateroprotector a ser considerado como blanco terapéutico en el diseño de drogas para el aclaramiento de colesterol en macrófagos arteriales y en la prevención de eventos cerebrovasculares (**24**).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ABC_{AI}

El transportador ABC_{AI} media el transferencia de diversos tipos de moléculas tales como colesterol, fosfolípidos y otras moléculas lipofílicas tales como α -tocoferol, apoE e interleucina- 1β a través de la membrana celular en un proceso dependiente de ATP; en donde remueve el colesterol citosólico que de otra manera se acumula en forma de gotas de colesterol esterificado (**24**).

Se han propuesto dos modelos funcionales para este transportador (**Figura. 1.4.**) en el cual la exocitosis implica que el exceso de colesterol se empaqueta en vesículas transportadoras probablemente en el aparato de Golgi, las cuales, son translocadas a dominios membranales que contienen al

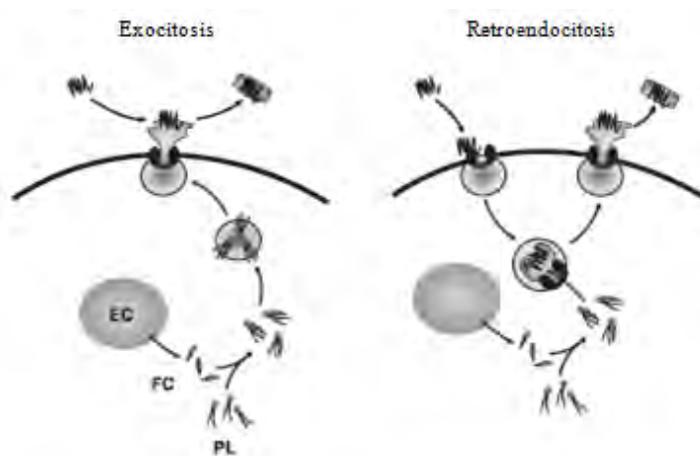


Fig. 1.4. Modelos de transporte mediado por ABC_{AI} (24).

transportador ABC_{AI} , sustentándose este modelo con estudios que muestran la inducción de ABC_{AI} en ausencia de apolipoproteínas que llevan a un incremento en la aparición de colesterol en la superficie celular. El segundo modelo, retroendocitosis, sugiere que vesículas que contiene ABC_{AI} –apolipoproteínas son acarreadas a depósitos lipídicos intracelulares en donde ABC_{AI} bombea lípidos al lumen vesicular cuya

liberación citoplasmática esta mediada por endocitosis. Estudios que apoyan este mecanismo muestran que el transportador recicla rápidamente entre la membrana plasmática y compartimentos endosómico/lisosomal tardío, en los cuales, se acumula colesterol en aquellas células ABC_{AI} -disfuncionales, en donde el contenido vesicular esta conformado también por fosfolípidos cuyos niveles disminuyen. Aún no se conocen completamente las bases mecánicas de este proceso, sin embargo, tal modelo representa una vía dominante del eflujo lipídico ABC_{AI} -dependiente (24, 29).

Las apolipoproteínas A_I (presentes en un 70% en la fracción HDL-C) interactúan de manera selectiva con la parte externa de ABC_{AI} la cual reconoce repeticiones de 11–22 residuos que por sus características hidrofóbicas se arreglan estructuralmente de manera lineal en una hélice α anfipática a lo largo de una de sus caras, dando la pauta para que ABC_{AI} lo registre, coordine y regule el eflujo de colesterol intracelular fijándolo de esta manera a moléculas de apolipoproteína A_I contenidas en la macromolécula de HDL-C, siendo entonces el paso regulatorio en el proceso de maduración de dicha macromolécula regulando de esta manera el tráfico de sustratos con saturabilidad dependiente del sustrato y una gran afinidad ($K_d < 10^{-7}$ M) por el mismo (24).

Por otra parte, este transportador se encarga del transporte reverso de colesterol, considerando que la principal función de las HDL es transportar el colesterol desde las células de tejidos periféricos al hígado para su eliminación en la bilis, reafirmando el efecto cardio-protector de este exportador celular de colesterol (33).

Se han propuesto diferentes teorías acerca de la translocación lipídica mediada por ABC_{AI} , en donde la más aceptada (Figura. 1.5.) refiere a que un exceso de colesterol celular y fosfolípidos se acumula en vesículas citosólicas inaccesibles a las apolipoproteínas plasmáticas, por lo cual el colesterol para ser acarreado debe translocarse a la superficie y removido

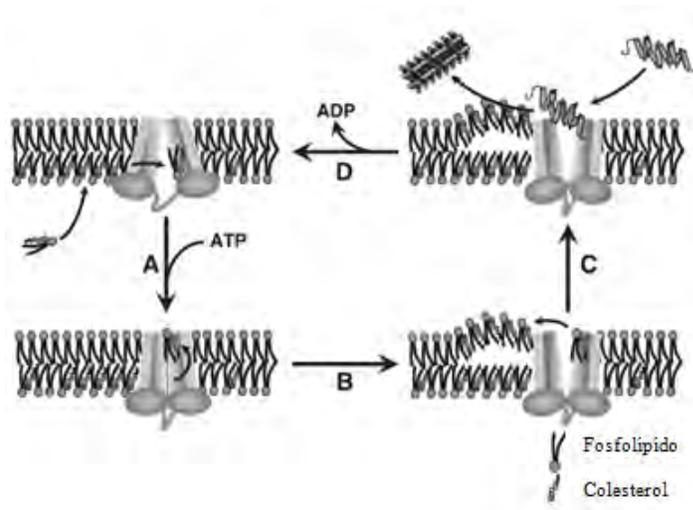


Fig. 1.5. Modelo de actividad translocasa de ABC_{AI} (24).

de la vesícula. Los dominios lipídicos pueden ser ensamblados en la vecindad a las moléculas de ABC_{AI} o estas pueden migrar a dichos dominios. Como se observa en la Figura. 1.5. estos lípidos internos son transportados longitudinalmente a una cámara por un proceso facilitado por la alta afinidad que presentan los sitios de unión de fosfolípidos los cuales inducen a la unión del ATP a los NBDs lo que promueve su dimerización y entonces cierran la cámara atrapando los lípidos girando al hidrolizar el

ATP [A]; la unión ADP–NBDs ocasionará un cambio configuracional en la estructura del transportador abriendo la cámara [B], es entonces cuando los lípidos son extruidos a dominios en la superficie celular ricos en colesterol donde serán removidos por apolipoproteínas integradas en la partícula de HDL naciente [C] para finalmente revertir la cámara incrustada en ABC_{AI} ocasionando un re–arreglo conformacional [D] luego de la disociación ADP–NBDs y la extracción de lípidos (24, 29).

El transportador ABC_{AI} está regulado por dos mecanismos básicos (Tabla. 1.1.) los cuales modulan su actividad en estadios previos a la iniciación de la actividad mediada por esta proteína o luego de la misma, pudiendo estar concatenado a una serie de eventos dependientes o a vías metabólicas y/o de señalización relacionadas a su acción (24, 29).

Tabla 1.1. Mecanismos de regulación de la expresión y la actividad del transportador ABC_{AI} (24).

	EfeCTOR	Mediador	ABC_{AI}	Mecanismo
A. Expresión				
Transcripción				
	Esteroles	LXR α , LXR β	+	+ Transcripción de ABC_{AI}
	Retinoides	RXR	+	+ Transcripción de ABC_{AI}
	Ácidos Grasos Poliinsaturados	LXR α , LXR β	–	Antagonista de esteroles
	Geranyl-geranyl pirofosfato	ggPP, Rho	–	– Actividad de LXR
	Tiazolinedionas	PPAR γ	+	+ Transcripción LXR
	Hormonas Tiroideas	Receptor Hormonal	–	– Actividad de LXR/RXR
	?	cAMP	–	– Transcripción de ABC_{AI}
	Verapamilo	Calcio?	–	– Transcripción de ABC_{AI}
	?	ZNF202	–	– Transcripción de ABC_{AI}
	?	Sp1	+	+ Transcripción de ABC_{AI}
	?	Sp3	–	Antagonistas de Sp1
	?	USF1/USF2/Fra2	–	– Transcripción de ABC_{AI}
	INF- γ	?	+	+ Transcripción de ABC_{AI}
	TGF- β	?	–	Antagonistas de INF- γ
	Oncostatina M	?	–	– Transcripción de ABC_{AI}
	Agotamiento de EC esterol	SREBP 2	–	– Transcripción de ABC_{AI}
Posttranscripción				
	Apolipoproteínas	?	+	– Degradación de ABC_{AI}
	Ácidos grasos insaturados	PLD2	–	+ Degradación de ABC_{AI}
	Colesterol libre	Proteosomas	–	+ Degradación de ABC_{AI}
	Carbonilos reactivos	?	–	+ Degradación de ABC_{AI}
	?	α_1 -Sintrofina	+	Trafico de ABC_{AI} ?
	?	Sintaxina 13	+	Trafico de ABC_{AI} ?
	Ceramida	?	+	Trafico de ABC_{AI}
	Ciclosporina	?	–	Trafico de ABC_{AI}
B. Actividad				
Señalización				
	Apolipoproteínas?	Protein cinasa A	+ Transporte de lípidos	Fosforilación de ABC_{AI}
	Citoquinas?	Protein cinasa CK2	– Transporte de lípidos	Fosforilación de ABC_{AI}
	?	?	– Unión de Apo	?
	Apolipoproteínas	Janis cinasa 2	+ Unión de Apo	?
	Apolipoproteínas	Protein cinasa C	+ Transporte de lípidos	Fosforilación de ABC_{AI} ?
Proteínas Asociadas				
	?	Cdc42	+ Transporte de lípidos	Unión de ABC_{AI}
	?	FADD	+ Transporte de lípidos	Unión de ABC_{AI}
	?	?	– Unión de Apo	Unión de ABC_{AI} -VFNFA
Trafico de Sustrato				
	Colesterol?	ARL7	+ Transporte de colesterol	Trafico de Colesterol
	Apolipoproteínas	Protein Cinasa C	+ Transporte de colesterol	Trafico de Colesterol
	?	NPC1	+ Transporte de colesterol	Trafico de Colesterol

INF, interferón; TGF, factor transformante del crecimiento; LXR, receptor hepático X; RXR, receptor de ácido retinoico; PPAR, activante del receptor nuclear de proliferación de peroxisomas.

In vivo, el transportador ABC_{AI} se expresa extensamente a lo largo de todos los tejidos animales con diversas funciones, destacando entre ellas, la formación de HDL–C y el transporte reverso de colesterol (Figura. 1.6.). En esta última, como se aprecia en la

Figura. 1.6., se pone en evidencia la mayor función de las moléculas de HDL transportando el colesterol desde las células de tejidos periféricos al hígado para su eliminación en la bilis en donde ABC_{AI} media dicho fenómeno en el cual Apo_{AI} hepática, libre de lípidos, adquiere colesterol libre [C] y fosfolípidos [PL] desde el hígado y células de tejidos periféricos para formar partículas nacientes de HDL [discos]. Las moléculas Apo_{AI} que no acarrean lípidos son purificadas por el riñón. Las moléculas maduras de HDL-C a través de la acción de la enzima esterificante del colesterol lisolecitincolesterol aciltransferasa [LCAT] transfiere los esteres de colesterol [CE] por SR-B1 y otras lipoproteínas como la proteína de transferencia de CE [CETP] (24).

Los esteres de colesterol, provenientes del LDL-C, son entregados al hepatocito por endocitosis mediado por el receptor hepático para las LDL [LDLR]. Apo_{AI} es reciclada para volver a circulación ávida por ABC_{AI} en células de tejido periférico (24).

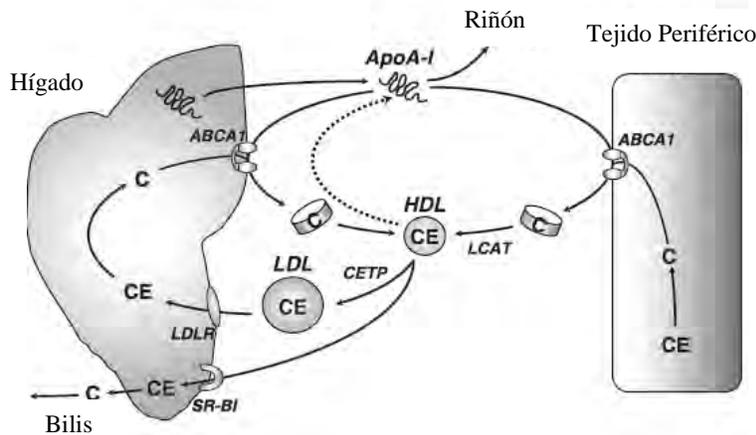


Fig. 1.6. Modelo de transporte reverso de colesterol mediado por ABC_{AI} (24).

METABOLISMO DE COLESTEROL, ABC_{AI} Y DISFUNCIÓN EN ISLOTES PANCREÁTICOS

El transportador ABC_{AI} tiene función tejido específico-dependiente susceptible a distintas patologías relacionadas con el metabolismo de lípidos. Esta propiedad ha sido estudiada en distintos modelos experimentales en busca de variantes en su modulación, en donde, la exposición a dietas altas en grasa como la dieta de occidente, ocasionan cambios en la expresión selectiva de dicho gen frente a una dieta control (33, 34).

Existe evidencia robusta sobre el papel del transportador ABC_{AI} en el metabolismo de colesterol y la función de la célula β pancreática, sobre el cual, ciertas mutaciones conducen a una inhabilidad de eliminar el exceso de colesterol intracelular con una disminución en los niveles plasmáticos de las HDL-C. Este exceso de colesterol

intracelular puede indirectamente disminuir la función de la célula β pancreática en la liberación de insulina ante un estímulo de glucosa (35).

Animales de experimentación alimentados con dietas altas en grasa manifiestan un deterioro progresivo de la función secretora de la célula β pancreática acompañada con una marcada insulinoresistencia. En ratones, a los que se les administró una dieta rica en lípidos, la rosiglitazona, un medicamento que estimula síntesis de insulina vía PPAR- γ , mejora la tolerancia a la glucosa, sin embargo, ratones carentes de ABC_{AI} a nivel pancreático, no responden a este tratamiento lo que sugiere que la activación de ABC_{AI} juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa en los acinos pancreáticos (35).

Existen muchos genes (Tabla. 1.2.) involucrados en el metabolismo del colesterol los cuales presentan un impacto relevante en la etiología y severidad de la diabetes mellitus tipo 2 [DMT2] (35).

Tabla. 1.2. Genes involucrados en el metabolismo del colesterol que tienen impacto sobre DMT2 (35).

Gen	Efecto
ABC_{AI}	Variantes han sido asociadas con DMT2 a lo largo de muchos grupos étnicos.
LXR	Activador transcripcional de ABC_{AI} , delección genética de LXR β resulta en una disminución en la tolerancia la glucosa y al acumulo de lípidos en los islotes.
LDLR	Identificado a lo largo del genoma presentando asociación con diabetes.
LRP $_5$	Ratones con falta de LRP $_5$ tiene valores plasmáticos elevados de LDL-C y disminución en la secreción de insulina por parte de los islotes.
LRP $_6$	Portadores de mutaciones en LRP $_6$ presentan valores elevados de LDL-Colesterol y un riesgo incrementado en el desarrollo de DMT2.
SCD $_1$	Ratones que carecen SCD $_1$ tienen una subpoblación de islotes con una concentración elevada de colesterol y una secreción de insulina atenuada.

Alteraciones en la concentración plasmática de colesterol y en el interior de la célula β pancreática pueden contribuir en la patogénesis de DMT2 ya que el transportador ABC_{AI} regula el eflujo de colesterol celular siendo esencial para un óptimo funcionamiento de la célula β pancreática, por lo que el dilucidar el mecanismo exacto mediante el cual esta regulación se produce y el impacto del colesterol sobre la secreción y liberación de insulina es de gran importancia (35).

JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes muestran que la ausencia del gen ABC_{AI} en la célula β pancreática se asocia a un incremento en la concentración de colesterol intracelular así como una marcada disminución en la liberación de insulina que incurre en una alteración progresiva en la tolerancia a la glucosa (18, 33–36).

El transportador ABC_{AI} , además de estar relacionado funcionalmente con su actividad acarreadora de colesterol, se asocia a enfermedades endémicas propias de la globalización y de la urbanización tales como la obesidad, DMT2 y en consecuencia al síndrome metabólico (35, 36).

Existen pocos datos que expliquen el mecanismo mediante el cual el transportador de membrana ABC_{AI} está directamente involucrado con la liberación de insulina y la homeostasis de la glucosa, de tal manera que una dieta hipercalórica alta en lípidos como programador fetal del desarrollo durante gestación y lactancia en animales de experimentación, ofrece una perspectiva mucho más amplia del papel de ABC_{AI} en la liberación de insulina por parte de la célula β pancreática.

HIPÓTESIS

- Una dieta hipercalórica con un alto contenido en lípidos, como factor programador del desarrollo durante gestación y lactancia, inducirá una alteración en la expresión pancreática del gen ABC_{A1} con cambios significativos en la concentración plasmática de insulina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión génica de ABC_{A1} en tejido pancreático durante la lactancia en el modelo de rata obesa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la expresión de ABC_{A1} a día 10 y 20 durante lactancia.
- Asociar patrones de expresión de ABC_{A1} con la concentración de insulina circulante.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se trabajó con ratas de la cepa Hsd: *Sprague Dawley*^{®TM} SD^{®TM}, cuya tabla de crecimiento peso/tiempo [gramos/semanas] muestra un mayor incremento a comparación de otras cepas con genética silvestre. Asimismo, estos animales presentan una fisiología y bioquímica estable y homogénea así como un patrón reproductivo adecuado para los requerimientos de este proyecto (37).

El proveedor garantiza la idoneidad, salud y calidad del animal por lo que se solicitaron hembras adultas entre 90–110 días de edad [peso=200–250 g] al momento de la monta y machos adultos de edad semejante [peso=250–300 g] a fin que al momento del apareo ajustar un radio de monta macho/hembra 1:2 (8, 9, 37). A fin de asegurar el resultado y la homogeneidad experimental, se pidió un total de 40 hembras y 20 machos vírgenes para este estudio.

Los animales fueron alojados en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán [INNSZ] bajo condiciones controladas de humedad y temperatura ($hR=60\% \pm 5$ y $T=20^{\circ}\text{C} \pm 1$) con ciclos luz/oscuridad de 12 horas teniendo acceso a agua y alimento *ad libitum* con un protocolo de trabajo preestablecido (Figura. 2.0.) (8–10). La distribución de animales dentro de cada uno de los grupos experimentales fue planeada de tal manera que el valor promedio del peso para cada uno de ellos no marcara una brecha al inicio del experimento, asimismo, su alojamiento fue en caja individual a partir del día 0 de gestación el cual se estableció por el hallazgo de espermatozoides en un frotis vaginal teñido con lugol a las primeras horas de la mañana (8, 10).

El acceso a agua y alimento fue *ad libitum* empleándose dietas control [Harlan[®]-2018S] y una alta en grasa [Harlan TD.97070[®]-HFD] con un aporte energético de 3,4 Kcal/g y 5,1 Kcal/g respectivamente (38–41). Ambas dietas son producidas por Harlan–Teklan, en donde la dieta HFD, es una dieta usada para inducir la obesidad [DIO] cuya concentración lipídica es del 33,4% en peso, con una composición en grasas de: 45% insaturadas, 24% transinsaturadas, 24% monoinsaturadas (cis) y 7% poliinsaturadas, provenientes de grasas vegetales y de aceite de coco (40, 41).

El estudio está orientado a los críos machos en lo que respecta a su caracterización molecular y metabólica; en lo que refiere a las madres, se valoró sus parámetros metabólicos teniéndose en consideración el desarrollo fenotípico clásico del modelo de manera homogénea tanto en críos como en madres, registrándose los pesos y medidas cada tercer día así como al momento del inicio del estudio (9, 11). Al nacimiento y al día de sacrificio se registró talla, peso, perímetro cefálico y abdominal así como la

distancia ano-genital registrándose también, al nacimiento, el número de críos, sexo y ajustando camadas a 12 tratando en lo posible de mantener una relación 1:1 macho/hembra entre ellas trabajándose solamente con aquellos animales que presentaron un comportamiento homogéneo y con un número de críos mayor a 10 (9, 11, 41); observándose el comportamiento de las madres en busca de fenómenos tales como canibalismo y alteraciones conductuales reportados como consecuencia de la transición nutricional que actúa como un estresor. (8-11)

Como se esquematiza en la **Figura. 2.0.**, el protocolo muestra el trabajo con el animal hasta la fecha de sacrificio, en donde, la obtención de tejidos, sangre y demás muestras se hizo previa decapitación con un ayuno tanto para críos como madres de 4 horas. (8, 9, 11)

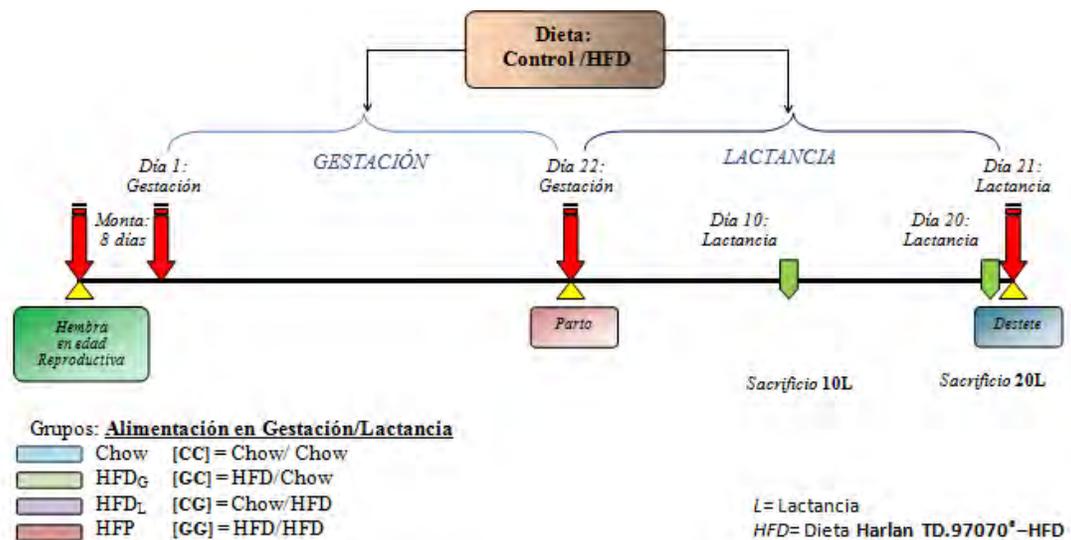


Fig. 2.0. Protocolo de manejo, alimentación y grupos de trabajo.

Posterior al sacrificio se separó por centrifugación el suero del paquete globular el cual se almacenó a -20°C hasta su análisis posterior (8, 10) (Figura. 2.1).

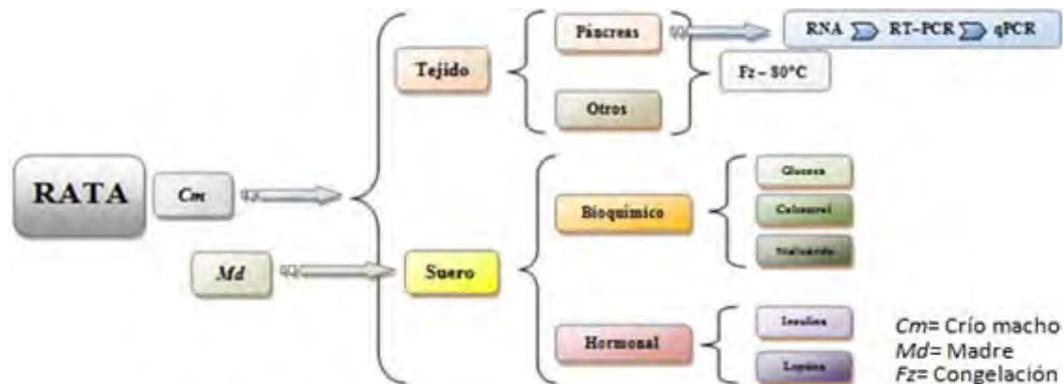


Fig. 2.1. Esquema de flujo y procesamiento de muestras/tejidos empleados.

El tejido pancreático, exento de grasa, se recolectó rápidamente luego de haber sido sacrificado el animal, fragmentándolo y sumergiéndolo en una solución que estabiliza la molécula de RNA y la protege de la acción de RNAsas conservándola de manera idónea hasta 72 horas a 4°C para su ulterior extracción (42, 43). Muestras adicionales se conservan a -80°C.

PERFIL BIOQUÍMICO

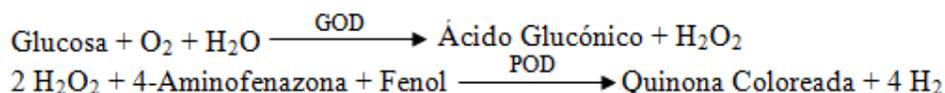
El perfil bioquímico seleccionado constó de las siguientes pruebas:

GLUCOSA

La patología más común relacionada con el metabolismo de hidratos de carbono es la diabetes mellitus. El diagnóstico precoz y control de los pacientes diabéticos tiene por objeto evitar las complicaciones de los síntomas resultantes de la hiperglucemia (44).

FUNDAMENTO

El esquema de la reacción es el siguiente (44):

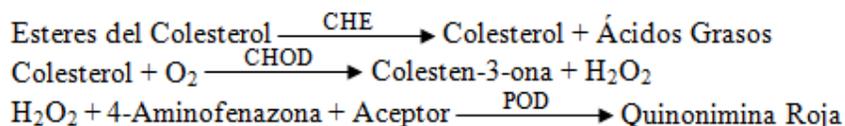


COLESTEROL

La determinación de colesterol en forma aislada tiene utilidad diagnóstica limitada y su concentración varía en un gran número de condiciones clínicas. El colesterol es uno de los factores contribuyentes al desarrollo de aterosclerosis (45).

FUNDAMENTO

El esquema de la reacción es el siguiente (45):

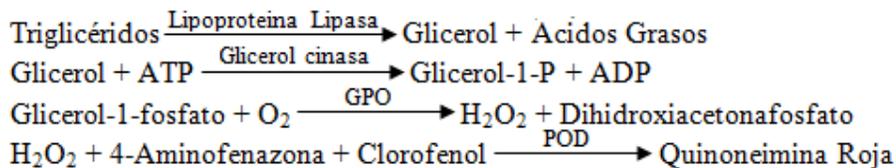


TRIGLICÉRIDOS

Su medición es importante en el diagnóstico y manejo de las hiperlipidemias, que pueden ser de origen genético o secundarias a algunos tipos de patologías como diabetes mellitus (46).

FUNDAMENTO

El esquema de la reacción es el siguiente (46):



El proveedor de la cepa Hsd: *Sprague Dawley*^{®TM} SD^{®TM}, propone los siguientes valores de referencia (Tabla. 2.0.) a ser considerados en este estudio (37):

Tabla. 2.0. Parámetros de referencia cepa HSD: *Sprague Dawley*^{®TM} SD^{®TM} – Harlan Holanda (37).

Parámetro	Unidad	Machos n_{mm}		Hembras n_{mm}	
		6 Wso	12 Wso	6 Wso	12 Wso
Peso corporal	g	153,8 – 173,8	348,3 – 371,3	142,1 – 162,5	206,6 – 242,2
Glucosa	mmol/l	6,3 – 7,1	5,7 – 7,1	5,2 – 10,2	5,1 – 11,9
Colesterol	mmol/l	2,9 – 3,3	2,3 – 2,9	2,9 – 3,5	2,3 – 2,7
Triglicéridos	mmol/l	0,57 – 0,91	1,06 – 1,38	0,39 – 0,72	0,39 – 1,31

n_{mm} = rango de referencia (máximo–mínimo)

Wso = semanas de edad

Las técnicas bioquímicas aplicadas se fundamentan en la ley de Lambert y Beer en donde incrementos sucesivos del analito a determinar aumentan la absorbancia a una longitud de onda determinada a un solo punto, detectable y cuantificable por equipos espectrofotométricos–colorimétricos (47). El control de calidad de la marca Wiener[®] aplica 2 niveles de aseguramiento con coeficientes de variación [CV] inter e intraensayo permitidos menores a 5% para técnicas manuales a emplearse en todos sus reactivos (48).

PERFIL HORMONAL

En esta investigación se cuantificó:

INSULINA

La insulina es una hormona pancreática de naturaleza polipeptídica que de forma madura está constituida por 51 residuos con un peso molecular de 5,8 kilo–Daltones [kDa] encargada de la regulación del metabolismo de carbohidratos. Su localización génica en *Rattus norvegicus* es 12q12. Su cuantificación beneficia al diagnóstico, seguimiento, tratamiento y pronóstico de diabetes mellitus (49).

FUNDAMENTO

El radioinmunoanálisis [RIA] es el estándar de oro para la cuantificación de esta hormona. Para este efecto, se empleó el kit de insulina para rata de la marca Linco[®] cuya metodología usa insulina marcada con ¹²⁵I y un antisuero para insulina de rata

para determinar el nivel de insulina en suero, plasma o medios de cultivo de tejido por la técnica de doble anticuerpo/polietilenglicol de manera competitiva **(50)**.

Esta metodología presenta una sensibilidad de 3,4 pmol/l con alta precisión y especificidad empleando dos controles internos con un CV intra e interensayo permitido de ~5% y ~10% respectivamente siendo la reacción lineal hasta 172,18 pmol/l. El rango de referencia propuesto por el fabricante es de 86,1 – 344,4 pmol/l **(50)**.

LEPTINA

Es producida en su gran mayoría por el adipocito, aunque también se expresa en el hipotálamo, ovario y placenta. Fue descubierta en 1994 en el ratón, el gen Ob en rata se cartografió en 7q31,3 codificando para una proteína de 16 kDa integrada por 167 residuos. Se cree que la leptina actúa como un lipostato, lo que constituye una señal (retroalimentación negativa) que informa al hipotálamo que el cuerpo ya ha ingerido suficiente alimento y debe inhibir el apetito **(51, 52)**.

FUNDAMENTO

Se empleó un kit de leptina para rata de la casa Linco[®] que se fundamenta en un RIA competitivo de doble anticuerpo con una sensibilidad de 12,5 pmol/l, preciso y altamente específico **(51, 53)**.

Emplea dos controles internos con un CV intra e interensayo permitido de ~10% y ~15% respectivamente siendo la reacción lineal hasta 1250 pmol/l. El rango de referencia propuesto por el fabricante es de 187,5 – 437,5 pmol/l **(53)**.

PRUEBAS MOLECULARES

La secuencia metodológica se construyó de la siguiente manera:

EXTRACCIÓN DE RNA

Se ocupó el Kit de extracción de RNA RNeasy[®] Plus Mini de QIAGEN con columnas para la eliminación de DNA genómico [gDNA] trabajándose de acuerdo al protocolo de purificación de RNA_{total} a partir de tejido animal propuesto por el fabricante, diseñado para su aislamiento rápido de 1–6 µg empleando de 15 a 20 mg de tejido estabilizado **(54)**.

Su fundamento **(Figura. 2.2.)** radica en la propiedad selectiva de unión que tiene la columna al DNA de doble cadena para asegurar una purificación eficiente de RNA de alta calidad sin la necesidad de la digestión adicional por DNasas **(54)**. Las muestras

biológicas primero son lisadas y homogenizadas con un buffer altamente desnaturante de isotiocianato de guanidina, el cual inmediatamente inactiva las RNAsas para asegurar el aislamiento integro de RNA para luego remover el gDNA por centrifugación sobre su columna, la cual, en combinación de una buffer rico en sales permite la separación de manera eficiente (54). Para el proceso de purificación, el etanol adicionado ofrece las condiciones adecuadas de unión RNA–columna, lo cual, a través de lavados consecutivos permite la remoción eficaz de contaminantes obteniendo al final un RNA sumamente puro el cual es eluido en 30–50 μ L de agua libre de RNAsas para su uso (54).

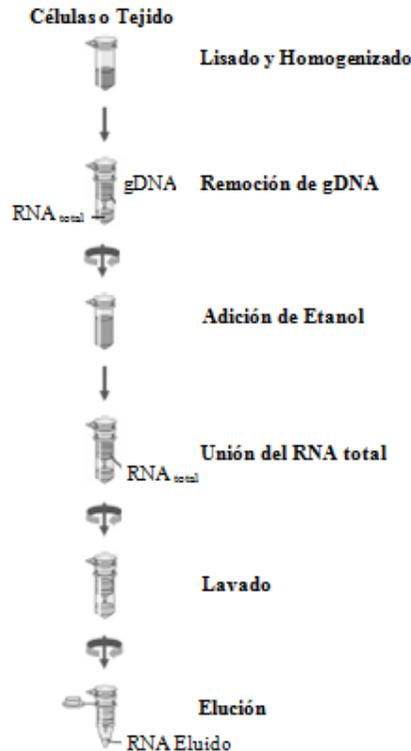


Fig. 2.2. Protocolo de extracción de RNA kit RNaeasy[®] Plus Mini QIAGEN (54).

TRANSCRIPCIÓN REVERSA

La enzima QuantiTect[®] de QIAGEN para la síntesis de DNA copia [cDNA] y la remoción de gDNA es usada para tiempo real a partir de 1 μ g de RNA total (55).

Seguido a la extracción y purificación de RNA, se determinó la concentración de nucleótidos por espectrofotometría–UV a 260 nm mediante la valoración de la absorbancia por duplicado [A260] a fin de calcular la correspondencia volumen–concentración para la síntesis de cDNA, considerando un volumen final de reacción de 20 μ L (55). El fabricante recomienda testigo positivo y negativo para cada reacción de síntesis así como comprobar la integridad del RNA de manera previa por corrimiento electroforético sobre un gel de agarosa al 1% en TBE–1X teñido con bromuro de etidio

corroborando la presencia de fracciones ribosomales 28S, 18S y 5S para cada una de las muestras (55, 56).

Esta metodología emplea la enzima MMLV (Maloney Murine Leukemia Virus) siendo una enzima multifuncional con actividad: DNA polimerasa RNA dependiente, exonucleasa (RNasa H) y DNA polimerasa DNA dependiente, a fin de garantizar una transcripción reversa adecuada (55). Asegurando la eliminación de gDNA que aun pueda estar presente luego de la extracción, la técnica (Figura. 2.3.), recomienda el uso previo de la enzima gDNA Wipeout incluida en el kit (55, 56). Para la reacción de síntesis, la enzima tiene una gran afinidad por el RNA optimizando el proceso requiriendo en su protocolo de 10 pg a 1 µg de RNA total en donde la mezcla de oligonucleótidos aleatorios asegura una alta eficiencia de reconocimiento para todas las regiones a ser transcritas (56).

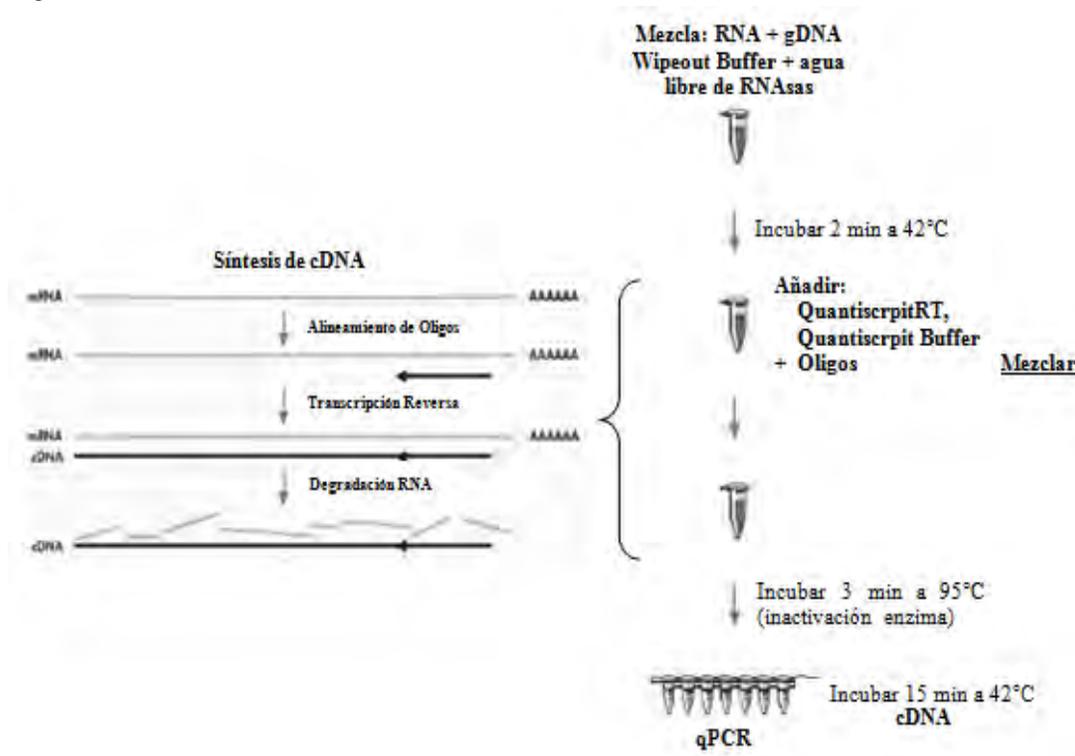


Fig. 2.3. Protocolo y secuencia de síntesis de cDNA del kit QuantiTect® de QIAGEN (55, 56).

PCR TIEMPO REAL

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real [qPCR] es una prueba cuantitativa para cualquier secuencia amplificable de DNA mediante la cual se monitorean múltiples reacciones simultaneas durante un ciclo de termociclado, en donde se registra la acumulación de DNA de doble hebra sintetizado mediante la cuantificación de la fluorescencia resultante de la unión de la doble hebra teniendo en consideración que la cinética de la fluorescencia acumulada durante el proceso es directamente proporcional y trazable al número inicial de copias (57).

El instrumento que se empleó fue el LightCycler 2.0[®] de Roche Diagnostics/Applied –Science, el cual usa sondas de hidrólisis (Figura. 2.4.) para trazar la reacción, las cuales, están estructuradas de 8–9 nucleótidos marcadas generalmente con fluoresceína [FAM] en el extremo 5' a un cuando se puede usar otros fluoroforos como marca para reacciones múltiples [multiplex] (58). Roche emplea la tecnología de ácidos nucleídos cerrados [LNA] en sus sondas, que siendo análogos a los nucleótidos de origen biológico, poseen un puente metilo 2'–O y 4'–O en la ribosa lo que aumenta la estabilidad térmica y el poder discriminativo, lo cual permite tener un 99% de cobertura en la especie motivo de este estudio (58).

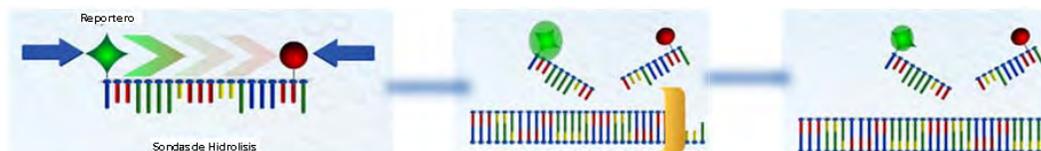


Fig. 2.4. Principio de fluorescencia de las sondas de hidrólisis Roche[®] (58).

El diseño de sondas se realiza en el sitio www.universalprobelibrary.com que es una biblioteca que usa un software que permite la búsqueda y/o diseño de oligonucleótidos *in-silico* a fin de minimizar falsos positivos con gDNA, reacción homologa o con pseudogenes y la interacción con intrones mediante un proceso sencillo (Figura. 2.5.) de salto intrónico proporcionando al final el par de oligonucleótidos, y el número de sonda UPL (Universal Probe Library) correspondiente (Tabla. 2.1.) a más de información adicional como tamaño de amplicón, espacio intrónico y secuencia de estudio (57–59).



Fig. 2.5. Principio de salto intrónico UPL (58).

Tabla 2.1. Resultados de la biblioteca de sondas para ABC_{A1} y HPRT en *Rattus norvegicus* (59).

ABC _{A1}				
	Secuencia	Tm	% GC	Posición
Oligo 5' Fw	gaaaaccaggcgatgg	60	50	5288 – 5305
Oligo 3' Rv	caagagagtgagagacgaagc	60	55	5336 – 5357
Amplicon: 70 nt				
Sonda #: 80				
HPRT				
	Secuencia	Tm	% GC	Posición
Oligo 5' Fw	gaccggtctgtcatgtcg	60	58	54 – 72
Oligo 3' Rv	acctggtcatcatcactaatcac	59	42	91 – 114
Amplicon: 61 nt				
Sonda #: 95				

Se normalizó la expresión relativa de ABC_{AI} con el gen constitutivo HPRT (Hipoxantina guanina fosforibosil Transferasa) de alta expresión, el cual, acorde a la bibliografía es adecuado para el estudio de nuestro gen problema bajo las condiciones generales y nutricionales del modelo experimental (60).

Dentro de esta metodología, fabricante y proveedor recomiendan trabajar de manera uniforme a fin de evitar artificios que puedan incurrir en diferencias significativas interensayo, es por ello que se empleó el mismo calibrador para normalizar a lo largo de todo el experimento, el cual es una poza de animales Chow *Cm* a día 10 y se estandarizó la eficiencia y la especificidad mediante interpolación de un punto externo exportable de calibración que además de garantizar la reproducibilidad inter e intraensayo sirve de control interno de calidad (57–60).

Finalmente, a todas las reacciones para el constitutivo HPRT, se adicionó la enzima Uracil–DNA–Glicosilasa recombinante que hidroliza uniones uracil– glicosídicas en los sitios U–DNA a fin de eliminar el producto de la reacción que pudiera contaminar la reacción (61).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se emplearon los programas SPSS 15.0 en español (62, 63) y GraphPad Prism 4.0 (64) para Windows considerándose una significancia mínima preestablecida de $p < 0,05$.

En esta investigación se emplea una prueba *t* para muestras independientes para el análisis intragrupal a cohortes entre día 10 y día 20 considerándose una distribución muestral uniforme. Cuando sus varianzas no son iguales la prueba U de Mann–Whitney es la de elección.

El estudio estadístico intergrupo se efectuó con un análisis normal de varianza de un solo factor [ANOVA] a los intervalos dados empleando como prueba poshoc Bonferroni asumiéndose varianzas iguales a ser corroboradas con la prueba Z de Kolmogorov–Smirnov o en su defecto la prueba no paramétrica Kruskal Wallis al tratarse de varianzas no semejantes.

En busca de asociaciones y/o tendencias se empleó la prueba de Pearson de correlación bivariada.

RESULTADOS

En la presente investigación el establecimiento de un modelo experimental idóneo a ser aplicado incide en gran importancia. El proceso de estandarización y validación del modelo biológico de obesidad en rata a fin de garantizar una muestra representativa sobre la cual trabajaremos nuestros ensayos, es fruto de arduo trabajo y observación sobre las variables intrínsecas en el animal y las variables en estudio (Tabla. 3.0.).

Tabla 3.0. Resumen de experimentos ejecutados a fin de establecer el modelo final de estudio.

Experimento	Cepa	n	Dieta Control	Dieta Grasa	Alojamiento	Observaciones
I	HsdHan TM : WIST	16	Harlan [®] -2018S	Harlan [®] -2018S up10%	INNSZ	<ul style="list-style-type: none"> Modelo: obesidad materna/inicio destete Dieta Grasa: palatabilidad baja Camadas: escasa representatividad
II	HsdHan TM : WIST	10	Harlan [®] -2018S	Harlan [®] -2018S up10%	INNSZ	<ul style="list-style-type: none"> Modelo: Obesidad materna/previa gestación Dieta Grasa: palatabilidad baja Camadas: escasa representatividad
III						
a.	Hsd: ^{®TM} SD ^{®TM} <i>Sprague Dawley</i>	20	Harlan [®] -2018S	Harlan TD.97070 [®] -HFD	F.Q.	<ul style="list-style-type: none"> Modelo: Obesidad materna/previa gestación Dieta Grasa: palatabilidad alta Camadas: escasa representatividad
b.	Hsd: ^{®TM} SD ^{®TM} <i>Sprague Dawley</i>	20	Harlan [®] -2018S	Harlan TD.97070 [®] -HFD	INNSZ	<ul style="list-style-type: none"> Modelo: Obesidad materna/previa gestación Dieta Grasa: palatabilidad alta Camadas: alta representatividad
IV	Hsd: ^{®TM} SD ^{®TM} <i>Sprague Dawley</i>	40	Harlan [®] -2018S	Harlan TD.97070 [®] -HFD	INNSZ	<ul style="list-style-type: none"> Modelo: Obesidad materna/previa gestación Dieta Grasa: palatabilidad alta Camadas: alta representatividad

Harlan[®]-2018S: Dieta control de 3,8 Kcal/g de contenido energético.

Harlan[®]-2018S up10%: Dieta base Harlan[®]-2018S control adicionada 10% de manteca animal con ~4,7 Kcal/g de contenido energético.

Harlan TD.97070[®]-HFD: Dieta base grasa vegetal insaturada y aceite de coco de 5,1 Kcal/g de contenido energético.

INNSZ: Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán.

F.Q.: Bioterio Conjunto E Facultad de Quimica, Universidad Nacional Autónoma de México.

n: hembras que se pusieron en monta.

En el modelo final [IIIb./IV] se efectúan todas las mediciones de esta investigación. La cuantificación de la expresión relativa de ABC_{A1} frente al constitutivo HPRT se realizó por duplicado empleando un estándar interno extrapolable asegurando la reproducibilidad del ensayo, normalizando el proceso con un calibrador, mezcla de animales control a d10, a lo largo de todo el experimento.

La expresión génica de ABC_{A1} (Tabla. 3.1.) muestra un patrón constante a los intervalos señalados en lactancia en los grupos sin transición nutricional gestación-lactancia HFP y Chow. Sin embargo, el grupo HFD_G que viene de un esquema nutricional graso en gestación y control durante lactancia presenta un incremento significativo en la expresión del transportador a d20 ($p=0,005$) al compararlo con el promedio de sus animales a d10. En el grupo HFD_L la expresión disminuye de manera

significativa a d20 ($p=0,039$) al compararlo con el primer cohorte a d10, contrario a lo observado para el grupo HFD_G, lo que sugiere que un cambio a régimen nutricional graso durante estos intervalos en la lactancia disminuye la expresión pancreática de ABCA₁.

Tabla 3.1. Expresión relativa ABCA₁/HPRT en tejido pancreático a d10 y d20–lactancia en críos machos grupos Chow, HFD_G, HFD_L y HFP.

Grupo	n	[C] Cociente ± DE ABCA ₁ /HPRT		
Día 10 Gestación				
Grupo Chow [CC]	a 10	0,83 ± 0,83		
Grupo HFD _G [GC]	b 26	0,47 ± 0,21	* b,d	* b,b'
Grupo HFD _L [CG]	c 18	0,86 ± 0,49		* c,c'
Grupo HFP [GG]	d 18	1,47 ± 1,45		
Día 20 Gestación				
Grupo Chow [CC]	a' 10	0,88 ± 0,41		
Grupo HFD _G [GC]	b' 19	0,87 ± 0,53		* b,d p=0,002
Grupo HFD _L [CG]	c' 12	0,50 ± 0,34	* c',d'	* c',d' p=0,015
Grupo HFP [GG]	d' 10	1,27 ± 0,69		* b,b' p=0,005
				* c,c' p=0,039

El transportador ABCA₁ en el grupo HFD_G presentó el valor de expresión más bajo $0,47 \pm 0,21$ con significancia estadística ($p=0,002$) al compararlo con el grupo HFP al d10. A d20, HFD_L presentó un valor intergrupar más bajo con $0,50 \pm 0,34$ marcando una diferencia ($p=0,015$) al compararlo con el grupo HFP, el cual en ambos cohortes es el de mayor expresión, es por ello que bajo este sustento (Figura. 3.0.) el cambio a dieta HFP durante lactancia induce un decremento en la expresión de ABCA₁ en el d20. Además la exposición prolongada a lo largo de la gestación y la lactancia a una dieta hipercalórica

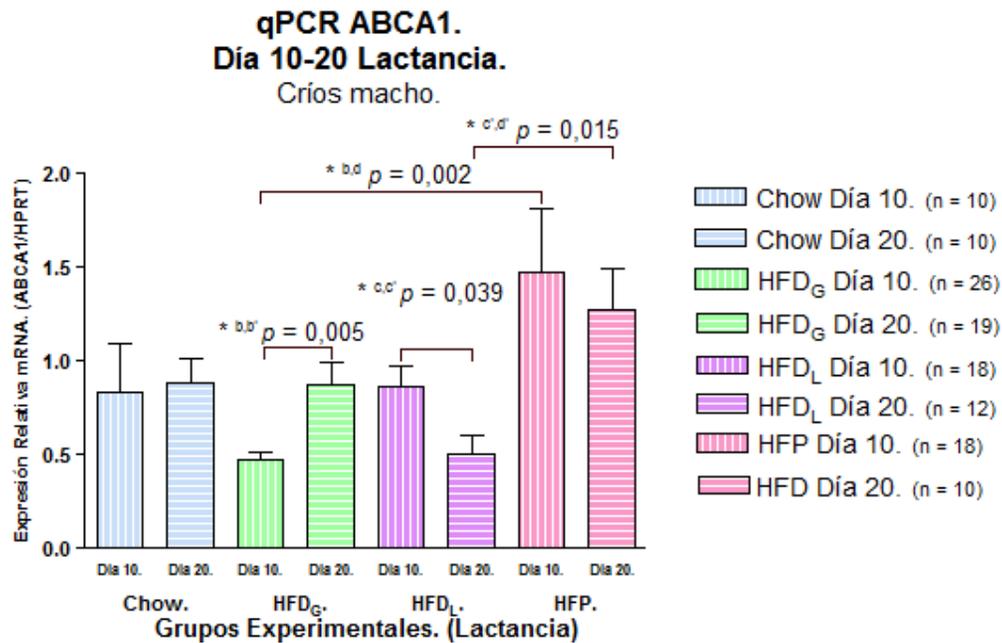


Fig. 3.0. Gráficas de barra qPCR para críos macho a cohortes d10-d20 grupos Chow, HFD_G, HFD_L y HFP lactancia.

rica en lípidos induce un aumento en la expresión pancreática de ABC_{A1} sin manifestar diferencia estadísticamente representable con el resto de grupos estudiados.

En la **Figura. 3.0.** se presentan gráficas de barra del valor promedio \pm error medio de la desviación estándar [SEM] para cada grupo en donde de manera clara se observan diferencias y patrones anteriormente descritos en los resultados obtenidos a d10 y a d20.

La concentración sérica de insulina presentó un incremento normal en su valor d20 en los cuatro grupos de estudio comparado frente a su valor a d10 (**Figura. 3.1.**). A d10, la distribución homogénea y semejante entre los grupos de estudio, sin embargo, es a d20 donde se aprecia discrepancia ($p=0,018$) entre los grupos sin transición alimentaria HFP y Chow respectivamente con un valor promedio a este cohorte de $82,36 \pm 50,68$ pmol/l y $27,62 \pm 19,77$ pmol/l.

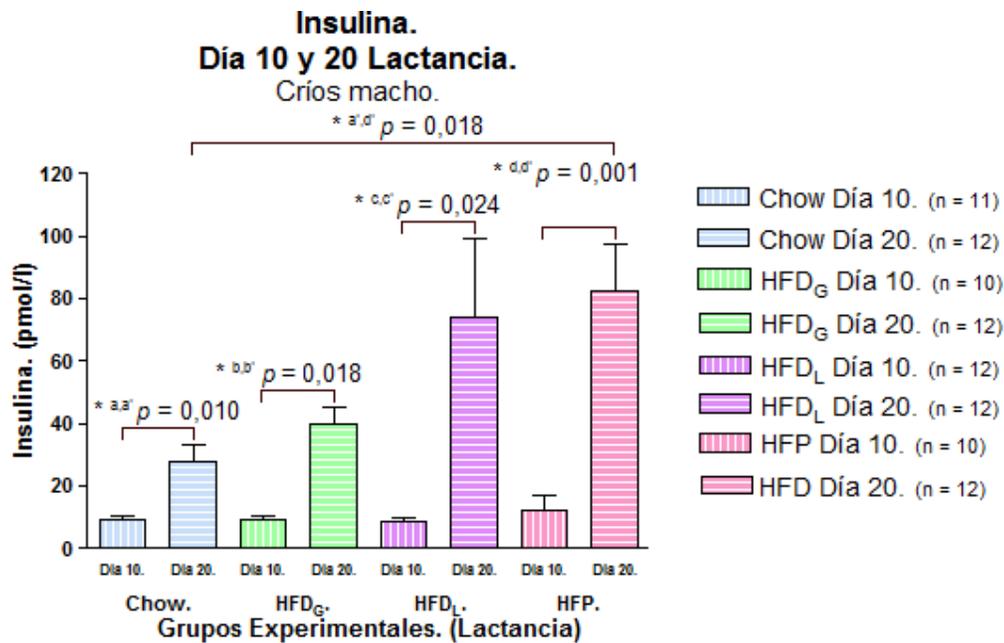


Fig. 3.1. Gráficas de barra insulina para críos macho a cohortes d10-d20 grupos Chow, HFD_G, HFD_L y HFP lactancia.

Al estimar el grado de correlación entre los patrones de expresión del transportador ABC_{A1} con los valores de insulina circulante en los distintos grupos experimentales a los intervalos descritos durante la lactancia se aprecia (**Tabla. 3.2.**) a d10 una relación inversa entre la expresión del transportador y los valores de insulina en los grupos con alimento graso a este cohorte. A d20 la correlación estudiada es inversa en aquellos grupos con transición nutricional.

En el perfil bioquímico seleccionado se observa (**Figura. 3.2.**) un patrón significativo de incremento intrínseco al desarrollo animal durante la lactancia a lo largo de todos los grupos experimentales en los parámetros glucosa [A] y triglicéridos [C] estudiados a intervalo d10 y d20 se muestran significativamente más altos en este último. Para el

Tabla 3.2. Expresión relativa ABCA1/HPRT en tejido pancreático y asociación con valores de insulina sérica a d10 y d20-lactancia en críos machos grupos Chow, HFD_G, HFD_L y HFP.

Grupo	[C] Cociente ± DE ABCA1/HPRT	Insulina ± DE pmol/l	r	p	n
Día 10 Gestación					
Grupo Chow	[CC] a 0,83 ± 0,83	9,13 ± 3,70	0,390	0,387	5
Grupo HFD _G	[GC] b 0,47 ± 0,21	9,10 ± 3,73	0,265	0,526	8
Grupo HFD _L	[CG] c 0,86 ± 0,49	8,44 ± 4,86	-0,366	0,333	9
Grupo HFP	[GG] d 1,47 ± 1,45	12,51 ± 14,23	-0,159	0,763	6
Día 20 Gestación					
Grupo Chow	[CC] a' 0,88 ± 0,41	27,61 ± 20,64	0,551	0,335	5
Grupo HFD _G	[GC] b' 0,87 ± 0,53	39,81 ± 18,37	-0,419	0,482	7
Grupo HFD _L	[CG] c' 0,50 ± 0,34	74,32 ± 87,02	-0,149	0,749	5
Grupo HFP	[GG] d' 1,27 ± 0,69	82,35 ± 52,92	0,275	0,598	5

colesterol [B] esta tendencia al incremento se repite a excepción del grupo HFD_L en donde los valores de colesterol sérico no manifiestan diferencia alguna en los dos intervalos estudiados.

En la Figura 3.2. y Tabla. 3.3. se intenta poner en evidencia la variación bioquímica en el modelo asociado a los distintos grupos experimentales durante los cohortes en lactancia.

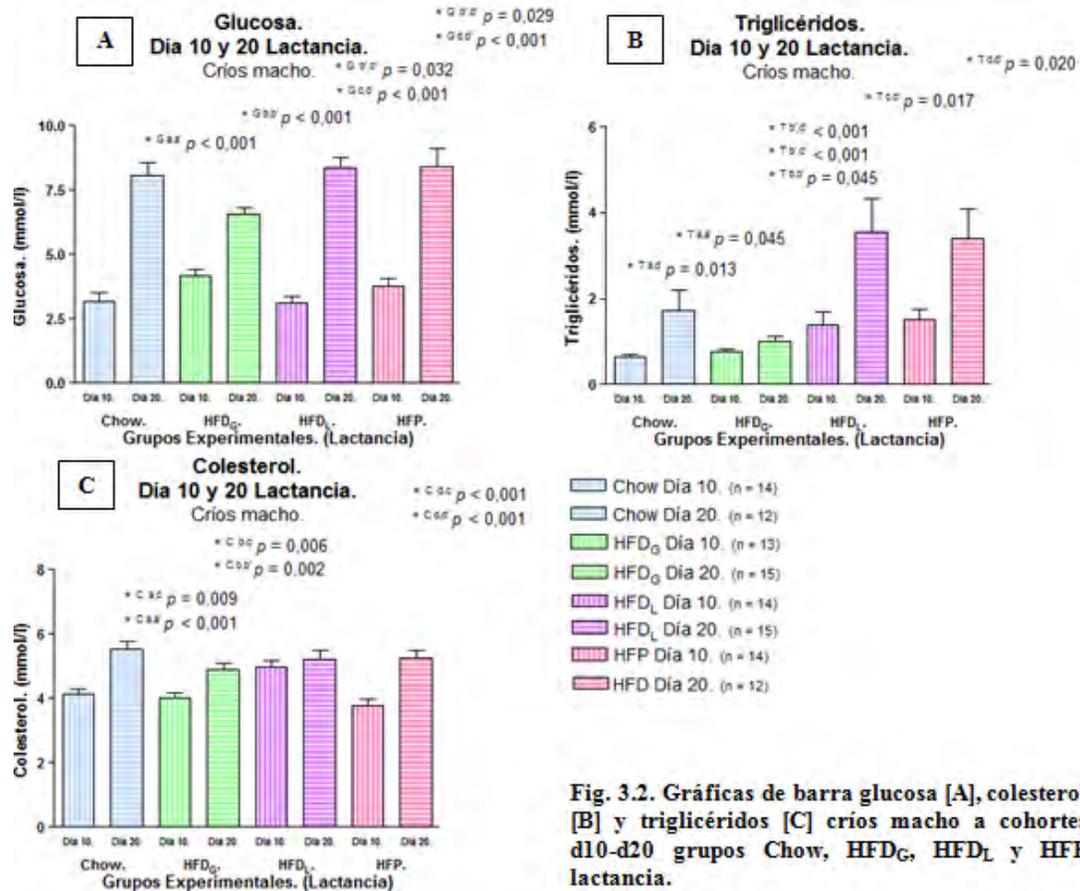


Fig. 3.2. Gráficas de barra glucosa [A], colesterol [B] y triglicéridos [C] críos macho a cohortes d10-d20 grupos Chow, HFD_G, HFD_L y HFP lactancia.

La glicemia a d10 no reportó diferencia estadística, no obstante el valor más alto a este punto corresponde a los animales del grupo HFD_G. A d20, el valor más bajo corresponde al grupo HFD_G ($6,57 \pm 0,92$ mmol/l) diferencia que es significativa ($p=0,032$) respecto al grupo HFD_L ($8,36 \pm 1,57$ mmol/l) y HFP ($p=0,029$) a este corte, ($8,44 \pm 2,31$ mmol/l) siendo incluso menor al promedio del grupo control (Tabla. 3.3.).

Tabla 3.3. Valores séricos de perfil bioquímico a d10 y d20-lactancia en críos machos grupos Chow, HFD_G, HFD_L y HFP.

Grupo	n	Glucosa \pm DE (mmol/l)	Colesterol \pm DE (mmol/l)	Triglicéridos \pm DE (mmol/l)
Día 10 Gestación				
Grupo Chow [CC]	a	14 3,20 \pm 1,25	* Gaa 4,15 \pm 0,52	* Cas * Caa 0,64 \pm 0,21
Grupo HFD _G [GC]	b	13 4,19 \pm 0,90	* Gbb' 4,01 \pm 0,56	* Cbc * Cbb' 0,75 \pm 0,22
Grupo HFD _L [CG]	c	14 3,10 \pm 1,05	* Gcc' 4,97 \pm 0,82	* Tcc' 1,38 \pm 1,21
Grupo HFP [GG]	d	14 3,79 \pm 1,15	* Gdd' 3,79 \pm 0,68	* Tdd' 1,53 \pm 0,82
Día 20 Gestación				
Grupo Chow [CC]	a'	12 8,07 \pm 1,74	* Ga'b' 5,53 \pm 0,93	1,72 \pm 1,65
Grupo HFD _G [GC]	b'	15 6,57 \pm 0,92	* Gb'c' * Gb'd' 4,91 \pm 0,66	* Tb'c' * Tb'd' 1,00 \pm 0,47
Grupo HFD _L [CG]	c'	15 8,36 \pm 1,57	5,21 \pm 1,19	3,56 \pm 2,96
Grupo HFP [GG]	d'	12 8,44 \pm 2,31	5,25 \pm 0,86	3,42 \pm 2,36
		* Gb'c' p=0,032	* Cas p=0,009	* Tad p=0,013
		* Gb'd' p=0,029	* Cbc p=0,006	* Tb'c' p<0,001
		* Gaa' p<0,001	* Cdc p<0,001	* Tb'd' p<0,001
		* Gbb' p<0,001	* Caa p<0,001	* Taa' p=0,045
		* Gcc' p<0,001	* Cbb' p=0,002	* Tbb' p=0,045
		* Gdd' p<0,001	* Cdd' p<0,001	* Tcc' p=0,017
		* Ga'b' p=0,106		* Tdd' p=0,020
				* Tac p=0,103
				* Tbd p=0,058

El colesterol presentó un intervalo de distribución homogéneo a d20 sin diferencia entre sus varianzas. A d10, HFD_L es el grupo con el valor promedio más alto con $4,97 \pm 0,82$ mmol/l marcando diferencias significativas ($p=0,009$) ($p=0,006$) ($p<0,001$) con todos los grupos: Chow de promedio $4,15 \pm 0,52$ mmol/l, HFD_G con $4,01 \pm 0,56$ mmol/l y HFP con $3,79 \pm 0,68$ mmol/l.

Los triglicéridos en la muestra a d10 presentan una clara diferencia entre los animales que reciben dieta control y dieta grasa durante la lactancia. Es en estos últimos en los que se encuentra un incremento con una marcada diferencia ($p=0,013$) entre HFP alcanzando un valor de $1,53 \pm 0,82$ mmol/l y el grupo Chow con $0,64 \pm 0,21$ mmol/l. Al segundo intervalo estudiado HFD_G con un promedio de $1,00 \pm 0,47$ mmol/l revela discrepancia ($p<0,001$) ($p<0,001$), con los grupos grasa durante lactancia HFD_L y HFP con $3,56 \pm 2,96$ mmol/l y $3,42 \pm 2,36$ mmol/l, respectivamente.

Se observa que a d20 los animales del grupo HFD_G presentan los valores más bajos en el perfil bioquímico estudiado, lo que sugiere asociación con el fenómeno de incremento en la expresión génica del transportador de membrana ABC_{A1}. Los animales bajo un régimen nutricional grasa durante la lactancia presentan los valores más elevados a este segundo punto.

Adicionalmente el efecto programador sobre los críos macho se monitorea con curvas de crecimiento y peso final a sacrificio en d10 y d20 (Figura. 3.3.). En donde en la Figura. 3.3. [A] y [B] se evalúa el intervalo d1–d10. **B** denota a d1 que el grupo con el peso más bajo es el grupo HFP con $5,92 \pm 0,43$ g con significancia ($p < 0,001$) ($p < 0,001$) al compararlo con HFD_L , que presenta el peso promedio más elevado, $6,95 \pm 0,47$ g y HFD_G con un promedio de $6,49 \pm 0,35$ g. En d10 HFD_L presentó el peso promedio más elevado con $15,93 \pm 3,32$ g discrepando de manera significativa con HFD_G ($p = 0,013$) con $12,76 \pm 2,06$ g siendo el más bajo de entre los grupos a este cohorte mostrando incluso diferencia significativa ($p = 0,012$) con el grupo control de promedio $15,79 \pm 2,12$ g sugiriendo un probable retraso en el desarrollo.

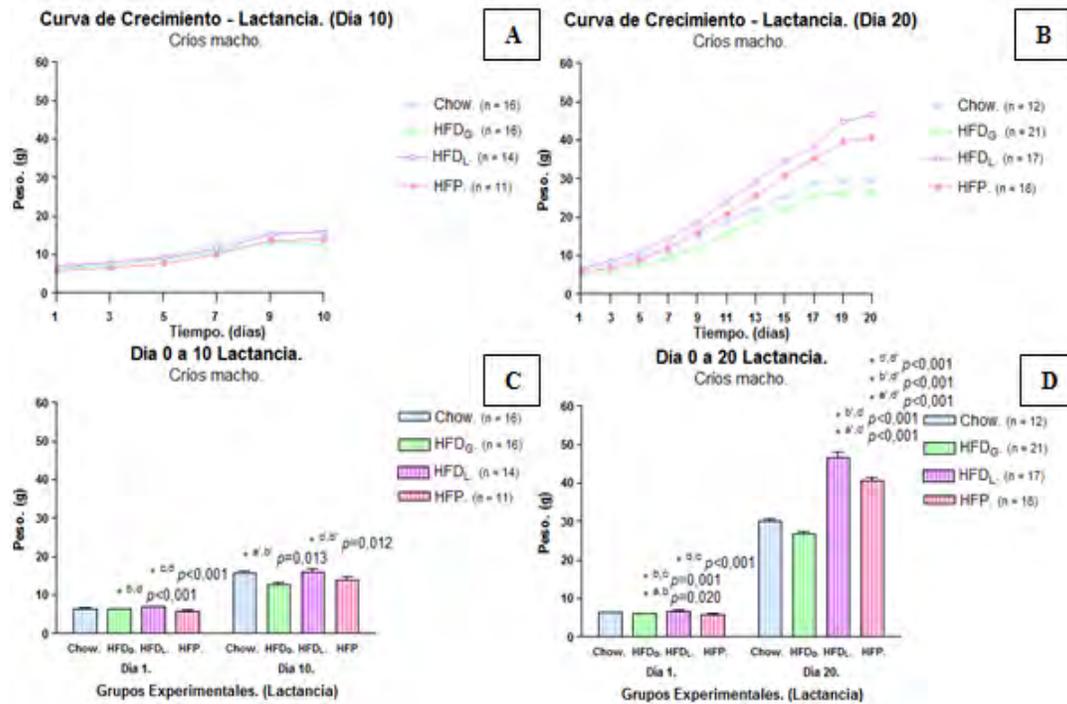


Fig. 3.3. Curvas de crecimiento críos macho d10 [A]–d20 [C] y graficas de barra a cohorte d10 [B]–d20 [D] grupos Chow, HFD_G , HFD_L y HFP lactancia.

En la Figura 3.3., para el intervalo d1–d20 en [C] y [D], [C] a d20 muestra una clara separación entre los distintos grupos hasta el final del experimento. En la estadística puntual a d1/d20, a d1 HFP y HFD_G mostraron los valores más bajos en peso con $5,96 \pm 0,23$ g y $6,01 \pm 0,55$ g respectivamente frente a $6,30 \pm 0,52$ g y $6,81 \pm 0,54$ g del grupo Chow y HFD_L . Las diferencias estadísticas a este intervalo develan que el control ($p = 0,02$) y HFD_L ($p = 0,001$) son significativas ante el grupo HFD_G al igual que HFD_L discrepa en gran manera con HFP ($p < 0,001$) a este intervalo. En d20 HFD_L de promedio $46,73 \pm 6,25$ g marca diferencia significativa con todos los grupos restantes: Chow ($p < 0,001$) de promedio de $30,05 \pm 2,24$ g, HFD_G ($p < 0,001$) con el menor promedio a este cohorte con $26,85 \pm 2,36$ g y HFP ($p < 0,001$) con $40,78 \pm 3,52$ g. El grupo experimental HFP presenta divergencia con el grupo testigo ($p < 0,001$) y HFD_G ($p < 0,001$).

Con la finalidad de disponer de una panorámica metabólica completa se cuantificó sobre una muestra representativa la hormona reguladora del apetito leptina, la cual (Figura. 3.4.) no manifestó diferencias apreciables a d10 de lactancia. No obstante, al segundo intervalo propuesto muestra incremento significativo de la concentración plasmática en aquellos animales que reciben dieta alta en grasa durante esta ventana. Es así que HFP con un valor promedio de $366,34 \pm 122,04$ pmol/l, marca una gran diferencia estadística ($p=0,028$) ($p=0,030$) apreciable con el grupo Chow de promedio $94,66 \pm 60,14$ pmol/l y con animales del grupo HFD_G con $97,19 \pm 46,20$ pmol/l a d20. Un patrón similar reporta el grupo HFD_L a este segundo cohorte con un promedio $361,74 \pm 218,82$ mmol/l significativamente mayor en comparación al testigo ($p=0,032$) y HFD_G ($p=0,032$). Como se observa en la Figura. 3.4., existe una marcada diferencia intragrupal d10–d20, sin embargo el análisis de varianza encontró apenas diferencia significativa ($p=0,023$) entre el grupo HFP d20–d10 con un promedio de $366,34 \pm 122,04$ pmol/l y $56 \pm 73,77$ pmol/l en este experimento.

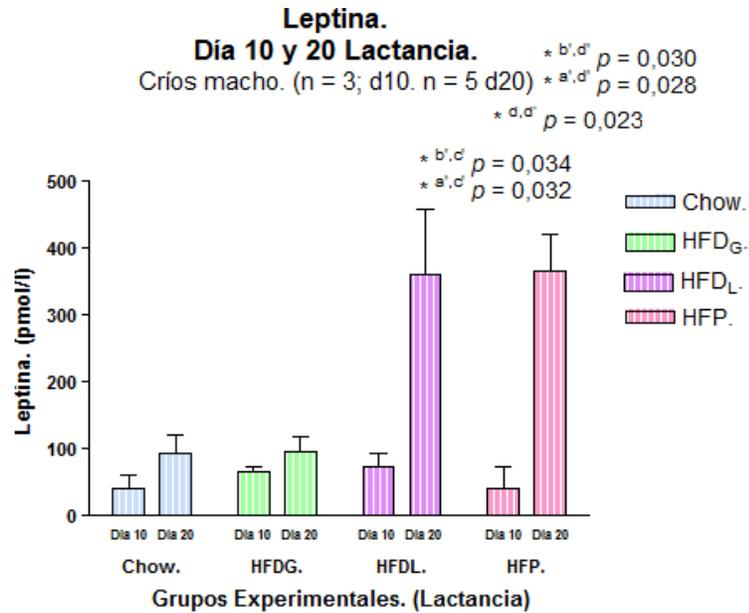


Fig. 3.4. Gráfica de barras leptina críos macho a cohortes d10-d20 grupos Chow, HFD_G, HFD_L y HFP lactancia.

Todos los valores de leptina se encuentran dentro de márgenes de referencia a los intervalos dados. Se observa claramente el valor promedio \pm SEM para cada grupo de estudio a intervalos d10 y d20 para esta hormona en la Figura 3.4., en donde los críos que presentan un incremento en los valores séricos de leptina son aquellos con un esquema nutricional graso durante la lactancia por lo que su estado metabólico condiciona un patrón de ingesta mayor justificando su acelerada ganancia de peso que infiere en un mayor valor de lípidos circulantes.

DISCUSIÓN

La evaluación génica de ABC_{A1} en páncreas total revela dos patrones de expresión a los intervalos citados durante lactancia:

1. Un patrón constante en los grupos sin transición nutricional Chow y HFP teniendo que:
 - a. Chow d10/d20 con un valor promedio de $0,83 \pm 0,83$ a d10 y $0,88 \pm 0,41$ a d20 en sus animales.
 - b. HFP d10/d20 de promedio $1,47 \pm 1,45$ a d10 y $1,27 \pm 0,69$ a d20.

Mecanismos de regulación y vías de señalización relacionados con el metabolismo de lípidos y colesterol, que modulan río arriba en la región promotora de ABC_{A1} (24), incurren en un mayor patrón de expresión sobre los animales con régimen graso durante lactancia sin que exista diferencia significativa frente al grupo control.

2. Un patrón variable en los grupos de transición nutricional HFD_G y HFD_L , observándose que:
 - a. HFD_G d10/d20 presenta un incremento significativo ($p=0,005$) en la expresión de este transportador a d20 con un promedio de $0,87 \pm 0,53$ en sus animales al compararlo a d10 con un promedio $0,47 \pm 0,21$.
 - b. HFD_L d10/d20 presenta un efecto deletéreo en magnitud ($p=0,039$) en la expresión de ABC_{A1} partiendo de un valor a d10 de $0,86 \pm 0,49$ a un valor de $0,50 \pm 0,34$ al d20.

El proceso de adaptación del organismo en formación durante la gestación–lactancia y la transición alimentaria desde y hacia una dieta alta en grasa aparentemente desencadena un efecto represor en la expresión del transportador ABC_{A1} apreciable a d10 y d20 sugiriendo el fenómeno de re–modelación celular durante lactancia como un supuesto causal en esta neo–adaptación a nivel de tejido pancreático (65).

Bajo esta hipótesis, a d10 el valor de expresión promedio intergrupo para ABC_{A1} más bajo corresponde a HFD_G y a d20 dicho valor está representado por HFD_L sugiriendo que una dieta alta en grasa como programador fetal del desarrollo en gestación y lactancia, disminuye la expresión génica de ABC_{A1} en transición con dieta estándar debido a una disrupción en el acondicionamiento metabólico frente al reto nutricional que representa una dieta rica en lípidos (65).

Para asegurar mayor representatividad y un mayor poder estadístico sobre este proyecto se desea incrementar la muestra para la cuantificación relativa de ABC_{AI} por tiempo real y completar el estudio de expresión con la dosificación proteica del transportador por inmunoblot en tejido pancreático.

Como se comentó con antelación, la insulina denota un incremento de d10 a d20 a razón de que el nuevo organismo crece, sus necesidades metabólicas incrementan y se independiza (**11, 15**). Sin embargo a día 20, como consecuencia de un incremento exacerbado en el peso, concentración de lípidos circulantes y aunado a la modulación en la expresión génica de ABC_{AI} los animales alimentados con dieta grasa durante lactancia revelan un incremento significativo en los valores séricos de esta hormona al compararlos con los animales control durante este estadio.

El estudio de correlación entre la expresión del gen ABC_{AI} y los valores séricos cuantificados para insulina en un mismo animal muestran un ligero patrón de asociación a los intervalos seleccionados. A día 10, la expresión relativa de ABC_{AI} y la concentración de insulina son inversamente proporcionales en aquellos animales alimentados con dieta grasa durante la lactancia mientras que a día 20 esta asociación inversa se presenta en aquellos grupos con transición en el nutricional. La correlación no fue significativa por lo que sugiere replicar el estudio debiéndose ajustar y ampliar la muestra a fin de aumentar la resolución estadística del ensayo coadyuvado a un estudio de co-localización intracelular de insulina sobre célula β en tejido pancreático a fin de tener una mejor perspectiva de la función secretora mediada por este transportador en nuestro modelo.

Cambios permanentes que podrían potenciar la ulterior aparición de la diabetes con una disminución en la secreción de insulina.

El perfil bioquímico seleccionado presenta un patrón al incremento en d20 de manera significativa en su valor sérico sobre todos los grupos experimentales debido al establecimiento paulatino de un metabolismo autónomo hacia el final de la lactancia (**15**). La glucemia remarca las siguientes consideraciones:

1. Pese a que la diferencia entre los grupos no alcanzó significancia a d10 los valores de glucosa circulante en los animales alimentados con dieta grasa durante la gestación se vieron elevados.
2. A d20 el incremento se hace significativo ($p=0,029$) ($p=0,032$) en el grupo HFD_L y HFP frente al grupo HFD_G cuyo valor promedio por debajo al grupo de referencia.

Como está descrito en la literatura, la exposición materna a un alimento rico en lípidos durante gestación y lactancia (**14, 15**) incrementa la glucemia en la progeñe apreciándose este fenómeno de manera contundente hacia el término de la lactancia. No se pudo realizar la prueba de correlación entre expresión relativa del gen ABC_{AI} y la

bioquímica seleccionada. Sin embargo, una disminución en la expresión de este transportador de membrana en célula β pancreática se asocia a un decremento en la liberación de insulina (**18, 33, 35, 36**), lo cual a estos intervalos podría generar una secreción compensadora de insulina ante el reto metabólico que incurrirá en una alteración progresiva en la tolerancia a la glucosa con el consecutivo agotamiento pancreático.

No existe asociación reportada entre los valores séricos de colesterol y triglicéridos con la ausencia de ABC_{A1} en la célula β pancreática (**18, 33**). Los valores de colesterol sérico encontrados a d20 no presentan diferencia intergrupo. A d10 HFD_L, cuyos animales vienen de un esquema nutricional no graso en gestación, frente a un reto nutricional mediado por una sobrecarga exógena de lípidos aumentan sus valores de colesterol en circulación con disminución en la secreción de insulina lo que podría incidir en un decremento en la expresión de ABC_{A1} , acumulo intracelular de lípidos al reducirse la tasa de extracción de colesterol mediado por este transportador y un decremento en la función secretora de la célula β pancreática en etapas posteriores de la vida (**18, 24, 33**).

Los triglicéridos en circulación son un fiel reflejo del aumento dietario en la ingesta mediata de ácidos grasos y lípidos, los que incurren en un aumento en sus valores en circulación en los grupos con alimento graso durante lactancia sin correlación conocida a diversos patrones de expresión pancreática de ABC_{A1} .

Se ha descrito ampliamente el efecto inductor de obesidad mediado por la dieta Harlan TD.97070®-HFD sobre críos durante gestación y lactancia siendo extrapolable a otras dietas en base grasa e hipercalóricas. Sin embargo, sobre los críos, el efecto programador fetal del desarrollo y el patrón de caracterización bioquímico y hormonal no es claro y difiere entre los distintos modelos y grupos de estudio teniendo todos ellos como denominador en común el desarrollo de índices similares al síndrome metabólico como adultos (**12–14**) y la asociación a un patrón menor de expresión de ciertos genes pancreáticos encargados de la producción y liberación de insulina (**14–16**).

Durante la lactancia en roedores ocurre un fenómeno de apoptosis y remodelación en célula β dando lugar a proliferación, neo-formación y diferenciación celular en los acinos pancreáticos, permeabilizando dicha célula al efecto programador mediado por la dieta grasa de manera permanente (**65**). Distintas evidencias sugieren que una disminución en la expresión del transportador de membrana ABC_{A1} en célula β pancreática conducirá a un almacenamiento celular excesivo de colesterol y ácidos grasos al restringir su tránsito membranal (**18, 33, 35, 36**) que podría originar un aumento citoplasmático de especies reactivas de oxígeno, aunado a un detrimento en la función mitocondrial (**65**) que induciría una alteración progresiva de la célula β pancreática, adicional a un perfil insulinoresistente que desencadenará en el animal diabetes mellitus tipo 2, con una pérdida en la tolerancia a la glucosa a edad adulta.

Este modelo experimental de programación fetal ofrece grandes expectativas y perspectivas a ser estudiadas sobre la progenie en busca de patrones génicos del desarrollo en el modelamiento bioquímico y metabólico de obesidad y diabetes. Se sugiere como prerrogativa a ser estudiada la evaluación genético-molecular y su asociación anatómica/bioquímica durante la gestación en busca del efecto programador durante y al final, esta ventana así como el seguimiento del mismo pos-lactancia a edad adulta en busca de una respuesta permanente que incremente el riesgo y la mayor susceptibilidad al desarrollo de diabetes. Adicionalmente, como ya se comentó, el análisis químico de la leche como el programador directo y el concentrado graso en el animal como efecto primario de ello adquieren gran importancia para futuras asociaciones entre la liberación y acción periférica de la insulina en estos animales.

CONCLUSIONES

- La expresión pancreática del gen para el transportador ABC_{A1} en los críos a lo largo de la lactancia aumenta bajo un régimen nutricional constante con base grasa durante gestación–lactancia.
- La transición desde o hacia el alimento graso durante gestación–lactancia disminuye la expresión pancreática de ABC_{A1} en los críos a lo largo de la lactancia con recuperación ante la suspensión de este esquema nutricional.
- El establecimiento metabólico autónomo en la progenie se establece al final de la lactancia en donde la alimentación materna en base grasa condiciona a un incremento de las variables bioquímicas en estudio.
- Existe una correlación entre el incremento en la expresión del gen ABC_{A1} y un aumento en los valores circulantes cuantificados para insulina, sin embargo esta no es robusta probablemente debido a las limitantes del modelo o al reducido número de datos.
- Los valores de leptina hacia el término de la lactancia se encuentran elevados en aquellos animales cuyas madres guardan un esquema nutricional graso durante la lactancia.

PERSPECTIVAS

El modelo de obesidad y el protocolo de estudio brindan la oportunidad de obtener una perspectiva completa en busca del efecto programador permanente sobre la progenie así como su origen. Se trabaja en busca de patrones de programación durante gestación y al momento del nacimiento así como un seguimiento de los animales a término de lactancia y en edad adulta, más aun, se ahondan esfuerzos al buscar el efecto directo de programación sobre la composición total grasa y tisular del ejemplar así como su vínculo directo sobre la leche materna, el programador primario.

Existen una serie de genes de la familia ABC con función análoga a ABC_{A1} como ABC_{G8} involucrados en un mecanismo compensatorio al existir una depleción de ABC_{A1} funcional. Otros genes como: $LXR\alpha/\beta$, RXR y $PPR\gamma$ que actúan como moduladores positivos de la transcripción en ABC_{A1} al poseer sitios de reconocimiento en su región promotora y $SREBP 2$ que reprimen su transcripción de manera activa, incurren en vital importancia para tener una perspectiva clara de la regulación pre y postranscripcional de ABC_{A1} , sobre su actividad en el tráfico de sustrato y su relación con otras vías metabólicas a fin de poder caracterizar la expresión génica de los principales elementos reguladores del metabolismo lipídico y su asociación con patrones de producción y liberación de insulina en célula β pancreática y su concentración circulante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wells JC. 2007. The thrifty phenotype as an adaptative maternal effect. *Biological Reviews*. 82:143–172.
2. Nathanielsz PW. 1999. Life in the womb: The origin of health and disease. USA. Prometheus. Pág. 1–10; 20–21; 30–31.
3. Simmons R. 2005. Developmental origins of adult metabolic disease: concepts and controversies. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 16(8):390–394.
4. Holness MJ, Langdown ML, Sugden MC. 2000. Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of Type 2 diabetes mellitus. *The Biochemistry Journal*. 349 Pt 3:657–665.
5. Jansson T, Powell TL. 2007. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanism and potential interventional approaches. *Clinical Science*. 113:1–13.
6. Holemans K, Aerts L, Van Asche FA. 2003. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *The Journal of Physiology*. 547(Pt 1):11–20.
7. Picciano MF. 2003. Pregnancy and Lactation: physiological adjustments, nutritional requirements and the role of dietary supplements. *Journal of Nutrition*. 133(6): 1997S–2002S.
8. Zambrano E, Martínez-Samayoá PM, Bautista CJ, Deás M, Guillén L, Rodríguez-González GL, Guzmán C, Larrea F, Nathanielsz PW. 2005. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F₂) of female offspring (F₁) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *The Journal of Physiology*. 566(Pt 1):225–236.
9. Zambrano E, Rodríguez-González GL, Guzmán C, García-Becerra R, Boeck L, Díaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW. 2005. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *The Journal of Physiology*. 563(Pt 1):275–284.
10. Férézou-Viala J, Anne-Reacne R, Sérougne C, Gripous D, Parquet M, Bailleux V, Gertler A, Delplanque B, Dijane J, Riottot M, Taouis M. 2007. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *The American Journal of Physiology*. 293(3):R1056–1062.
11. Armitage JA, Taylor PD, Poston L. 2005 Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *The Journal of Physiology*. 565(Pt 1):3–8.
12. Grove KL, Grayson BE, Glavas MM, Xiao XQ, Smith MS. 2005. Development of metabolic systems. *Physiology & Behavior*. 86(5): 646–660.
13. Shillabeer G, Lau DC. 1994. Regulation of new fat cell formation in rats: the role of dietary fats. *The Journal of Lipid Research*. 35(4):592–600.
14. Shaw MA, Rasmussen KM, Myers TR. 1997. Consumption of a high fat diet impairs reproductive performance en Sprague-Dawley rats. *The Journal of Nutrition*. 127(1):64–69.
15. Guo F, Jen KL. 1995. High-Fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiology & Behavior*. 57(4):681–686.
16. Cerf M, Muller C, Du Toit D, Louw, J, Wolfe-Coote S. 2006 Hyperglycaemia and reduced glucokinase expression in weanling offspring from dams maintained on a high-fat diet. *The British Journal of Nutrition*. 95(2):391–396.

17. [<http://www.fisterra.com/guias2/Smetabolico.asp>] [Consulta: 14/Noviembre/2007]
18. Brunham L, Kruit JK, Pape TD, Timminis JM, Reuwer AQ, VasANJI Z, Marsh BJ, Rodrigues B, Johnson JD, Parks SJ, Verchere B, Hayden MR. 2007. Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nature Medicine*. 13(3):340–347.
19. Prentice AM. 2001. Obesity and its potential mechanistic basis. *British Medical Bulletin*. 60:51–67.
20. Nelson DL, Cox MM. 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*. USA. W. H. Freeman. Pág. 389–402.
21. [<http://iescarin.educa.aragon.es/depart/biogeo/varios/BiologiaCurtis/Seccion%201/6-11.jpg>] [Consulta: 8/Abril/2008]
22. Voet D, Voet DJ. 2001. *Biochemistry*. USA. John Wiley and Sons. Capítulo 11.
23. Lin T, Islam O, Heese K. 2006. ABC transporters, neural stem cells and neurogenesis-a different perspective. *Cell Research*. 16(11):857–871.
24. Oram JF, Heinecke JW. 2005. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiological Reviews*. 85(4):1343–1372.
25. See RH, Caday-Malcom RA, Singaraja RR, Zhou S, Silverstone A, Hubert MT, Moran J, James ER, Janoo R, Savill JM, Rigot V, Zhang LH, Wang M, Chimini G, Wellington CL, Tafuri SR, Hayden MR. 2002. Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(44):41835–41843.
26. Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G. 1999. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochemistry and Biophysical Research Communications*. 257(1):29–33.
27. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes & Development*. 14(22):2819–2830.
28. Santamariana-Fojo S, Peterson K, Knapper C, Qiu Y, Freeman L, Cheng JF, Osorio J, Remaley A, Yang XP, Haudenschild C, Prades C, Chimini G, Blackmon E, Francois T, Duverger N, Rubin EM, Rosier M, Denèfle P, Fredrickson DS, Brewer HB Jr. 2000. Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. 97(14):7987–7992.
29. Dean M. 2005. The Genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods in Enzymology*. 400: 409–429.
30. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=313210&ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum] [Consulta: 7/Junio /2008]
31. www.expasy.ch [Consulta: 12/Septiembre/2007]
32. [http://www.alantall.org/images/ApoA-I_sm.gif] [Consulta: 27/Septiembre/2007]
33. Brunham LR, Singaraja RR, Duong M, Timmins JM, Fievet C, Bissada N, Kang MH, Samra A, Fruchart JC, McManus B, Staels B, Parks JS, Hayden MR. 2009.

- Tissue-specific roles of ABCA1 influence susceptibility to atherosclerosis. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 29(4):548–554.
34. Merat S, Casanada F, Sutphin M, Palinski W, Reaven PD. 1999. Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by fructose-rich diet. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 19(5):1223–1230.
 35. Brunham LR, Kruit JK, Verchere BC, Hayden MR. 2008. Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*. 118(2) 403–408.
 36. Villareal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparan M, Coral-Vasquez R, Menjivar M, Yescas-Gomez P, Königsoerg-Fainstein M, Romero-Hidalgo S, Tusie-Luna MT, Canizales-Quinteros S, Metabolic Study Group. 2007. The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population. *Diabetes*. 56(7):1881–1887.
 37. Harlan SD Rats-Harlan Europe. 2007.
 38. 2018S Teklan Global 18% Protein Rodent Diet. Harlan-Teklan.
 39. Rodent RQ 22-5. Zeigler Product Description.
 40. Diets Induced Obesity Models. Harlan-Teklan.
 41. Ozanne SE, Hales CN. 2004. Lifespan: catch up growth and obesity in male mice. *Nature*. 427(6973):411–412.
 42. RNAlater[®] Handbook. QIAGEN[®]. 2006.
 43. RNase OUT[®] Handbook. INVITROGEN[®] Doc. Rev:121701.
 44. Glicemia Enzimática Liquicolor–STANBIO[®] Lab. 2005.
 45. Colesterol Enzimático AA–Wiener[®] Lab. 2000.
 46. TG Liquicolor GPO/PAP–STANBIO[®] Lab. 2005.
 47. Gaw A, Cowan RA, O'Reilly D, Shepherd J, Stewart MJ. 2006 *Bioquímica Clínica*. México. ElSevier. Capítulo II.
 48. Standatrol S-E. 2 niveles. Wiener[®] Diagnostics. 2000.
 49. Coat-A-Count Insulin. DPC[®] Diagnostics. 2005.
 50. Morgan C, Lazarow A. 1962. Immunoassay of insulin using two-antibody system. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 110:29–32.
 51. Druker R. 2005. Regulación del apetito y control hormonal del peso corporal en fisiología médica. *El Manual Moderno*. México.
 52. Ahrén B, Månsson S, Gingerich RL, Havel PJ. 1997. Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet and fasting. *The American Journal of Physiology*. 273(1 Pt 2):R113–120.
 53. Coat-A-Count Leptin. DPC[®] Diagnostics. 2005.
 54. RNeasy[®] Plus Mini Handbook. QIAGEN[®]. 2005.
 55. QuantiTect[®] Reverse Transcription Handbook QIAGEN[®]. 2005.
 56. QuantiTect[®] Reverse Transcription Guide Lines Protocol 10. QIAGEN[®].
 57. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*. 11(9):1026–1030.
 58. [www.universalprobelibrary.com] [Consulta: 27/Abril/2008]
 59. Roche Applied Science-Universal Probe Library. Probes: 1-165.

60. Radoníc A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313(4):856–862.
61. Uracil–DNA-Glycosylase. Roche Diagnostics®. 2005.
62. SPSS 15.0 for Windows. Spanish Standard Version. Copyright© SPSS Inc., 1989-2005.
63. Ferrán M. Curso de SPSS para Windows. 2002. McGraw-Hill Profesional. España.
64. GraphPad Prism Version 4.0 Copyright©. GraphPad Software Incorporated, 1994-2005.
65. Jones RH, Ozanne SE. 2009. Fetal programming of glucose-insulin metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 297(1–2):4–9.