



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE
PROTEÍNA EN LA DIETA EN EL METABOLISMO
DE LA MADRE EN HÍGADO, TEJIDO ADIPOSO Y
GLÁNDULA MAMARIA DE RATA DURANTE LA
GESTACIÓN Y LA LACTANCIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Laura Alejandra Velázquez Villegas

Tutor: Dr. ARMANDO R. TOVAR PALACIO

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN LA DIETA EN EL METABOLISMO DE LA MADRE EN HÍGADO, TEJIDO ADIPOSO Y GLÁNDULA MAMARIA DE RATA DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Armando R. Tovar Palacio en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Armando Tovar Palacio	Departamento de Fisiología de la Nutrición, INCMNSZ
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Departamento de Bioquímica, INCMNSZ
Dr. Roberto Hernández Fernández	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El jurado de examen estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Departamento de Bioquímica, INCMNSZ
Vocal	Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. Marta Menjívar Iraheta	Facultad de Química, UNAM

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al de Dr. Armando Tovar y a la Dra. Nimbre Torres del departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por permitirme trabajar en este proyecto de investigación y por su apoyo, tutoría y facilidades otorgadas durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco al Dr. Alejandro Zentella Dehesa y al Dr. Roberto Hernández Fernández, miembros de mi comité tutorial, por sus valiosas contribuciones en el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a los integrantes del jurado por la revisión crítica de esta tesis y sus aportaciones para la escritura de la misma.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos del departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por sus consejos, sus enseñanzas, su apoyo y por todas las horas de trabajo que compartimos durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a toda mi familia, especialmente a mis padres por el amor, la confianza y el apoyo que siempre me han brindado. A mis hermanas por todos estos años que hemos compartido juntas. Y a Oscar por entenderme y acompañarme en este camino profesional y personal, y por todo su cariño y apoyo.

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 Cambios metabólicos durante la gestación	2
2.2 Cambios metabólicos durante la lactancia	5
3. ANTECEDENTES	
3.1 La glándula mamaria: órgano clave	7
3.1.1 <i>Cambios en su morfología durante la gestación y la lactancia</i>	7
3.1.2 <i>Transporte de solutos en la glándula mamaria</i>	8
3.1.3 <i>Ajustes metabólicos en la glándula mamaria en el periodo de lactancia</i>	10
3.2 Sistema A de transporte de aminoácidos	13
3.2.1 <i>Expresión de RNAm y concentración de la proteína de SNAT2 en la glándula mamaria durante la gestación y la lactancia.</i>	14
3.3 Efecto de la restricción energética o proteica en la dieta en el balance energético y metabólico durante la gestación y la lactancia	16
4. JUSTIFICACIÓN	18
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	
6.1 Objetivo General	19
6.2 Objetivos Específicos	19
7. METODOLOGÍA	
7.1 Diagrama de flujo	21

7.2 Procedimientos y métodos de recolección de datos	24
8. RESULTADOS	
8.1 Consumo de alimento	27
8.2 Ganancia de peso	29
8.3 Parámetros bioquímicos	31
8.4 Hígado	34
8.5 Tejido adiposo	45
8.6 Glándula mamaria	52
9. DISCUSIÓN	60
10. CONCLUSIONES	64
11. REFERENCIAS	66
12. ANEXOS	71

ABREVIATURAS

	Inglés	Español
ABCG5	ATP-binding cassette transporter subfamily G member 5	Miembro 5 de la subfamilia de transportadores de unión a ATP
ABCG8	ATP-binding cassette transporter subfamily G member 8	Miembro 8 de la subfamilia de transportadores de unión a ATP
ACC	Acyl-CoA carboxylase	Acetil CoA carboxilasa
ACOT1	Acyl-CoA thioesterase 1	Acyl-CoA thioesterasa 1
ACSL	Long-chain acyl CoA synthetase	Acyl-CoA sintetasa
AGPAT	1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase	Acyl glycerol 3 fosfatasa aciltransferasa
AIB	Amino isobutyrate	Aminoisobutirato
Akt/PKB	Protein kinase B	Proteína cinasa B
AMPC	Cyclic adenosine monophosphate	Adenosin monofosfato cíclico
BHBA	Beta- hydroxy butyric acid	Ácido beta-hidroxibutírico
ChREBP	Carbohydrate responsive element binding protein	Elemento de respuesta a hidratos de carbono
CPT-1	Carnitine palmitoyltransferase 1	Carnitin palmitoil transferasa
CRE	cAMP response element	Elemento de respuesta a AMPC
ELOVL	Elongation of very long chain fatty acids	Elongasa de ácidos grasos de cadena larga
FABP3	Fatty acid binding protein 3	Proteína de union a ácidos grasos 3
FADS	Fatty acid desaturases	Desaturasas de ácidos grasos
FAS	Fatty acid synthase	Sintasa de ácidos grasos
GDH	Glutamate dehydrogenase	Glutamato deshidrogenasa

GLUT1	Glucose transporter 1	Transportador de glucosa 1
GLUT4	Glucose transporter 4	Transportador de glucosa 4
HSL	Hormone sensitive lipase	Lipasa sensible a hormona
IGF-I	Insulin growth factor I	Factor de crecimiento semejante a la insulina
IGFBP	Insulin growth factor binding proteins	Proteínas de union al factor de crecimiento semejante a la insulina
Insig1	Insulin-induced gene 1	Gen inducido por insulina 1
IRS	Insulin receptor substrate	Sustrato del receptor de insulina
LDL	Low density lipoprotein	Lipoproteína de baja densidad
LPL	Lipoprotein lipase	Lipoproteína lipasa
LXR	Liver X receptor	Receptor X del hígado
MeAIB	Methyl amino isobutyrate	Metilaminoisobutirato
mTOR1	Mammalian target of rapamycin 1	Proteína inhibida por rapamicina
NEFA	Non- esterified fatty acids	Ácidos grasos no esterificados
PCR	Polymerase chain reaction	Reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	Phosphoenol pyruvate carboxykinase	Fosfoenol piruvato carboxicinas
PK	Pyruvate kinase	Piruvato cinasa
PKA	Protein kinase A	Proteína cinasa A
PKC	Protein kinase C	Proteína cinasa C
PPAR α	Peroxisome proliferators-activated receptor α	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas α
PPAR γ	Peroxisome proliferators-activated receptor γ	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ
SCD2	Stearoyl-CoA desaturase 2	Desaturasa de ácidos grasos 2

SCAP	SREBP cleavage-activating protein	Proteína activadora de SREBP
SDH	Serine dehydratase	Serina deshidratasa
SGLT	Sodium-dependent glucose cotransporter	Transportador de glucosa dependiente de sodio
SNAT2	Sodium-dependent neutral amino acid transporter 2	Transportador de aminoácidos neutros cortos dependiente de sodio
SREBP1	Sterol regulatory element binding protein	Proteína de unión a los elementos de respuesta a esteroides
VLDL	Very low density lipoprotein	Lipoproteína de muy baja densidad

1. RESUMEN

Durante los periodos de gestación y de lactancia existen diversas adaptaciones metabólicas en el hígado, el tejido adiposo y la glándula mamaria de la madre para utilizar las diferentes fuentes de energía. El objetivo de este estudio fue analizar las adaptaciones en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos, hidratos de carbono y aminoácidos en el hígado, el tejido adiposo y en la glándula mamaria de ratas gestantes y lactantes alimentadas con diferentes concentraciones de proteína dietaria (10, 20 y 30%). La expresión de dichos genes se midió por PCR en tiempo real y la concentración de las proteínas FAS y SNAT2 se midió por western blot. Durante la gestación y la lactancia la expresión de genes lipogénicos (SREBP-1, ACC y FAS), y glicolíticos (PK) en el hígado, se incrementó conforme disminuía la concentración de proteína en la dieta; sin embargo, la lipogénesis hepática fue mayor en el periodo de lactancia. En contraparte, la expresión de la enzima degradadora de aminoácidos (SDH) presentó un patrón de expresión opuesto, y consecuentemente el gen gluconeogénico (PEPCK) siguió el mismo patrón de expresión durante la gestación. Sin embargo, durante el periodo de lactancia la expresión de SDH no se incrementó al aumentar la concentración de proteína proveniente de la dieta. En el tejido adiposo, se observó un incremento en la expresión del transportador de glucosa GLUT4 y de genes lipogénicos (SREBP-1, ACC y FAS) durante la gestación (día 14) en las ratas alimentadas con una restricción proteica (10%), no se observaron cambios en los otros grupos experimentales. En contraste con los otros dos tejidos, en la glándula mamaria la expresión de genes lipogénicos (SREBP-1, ACC y FAS), de transporte de aminoácidos (SNAT2) y de mTOR, se incrementó conforme transcurrían los periodos de gestación y lactancia independientemente de la concentración de proteína en la dieta; de manera opuesta, se redujo la expresión de genes lipolíticos (HSL) y de beta-oxidación (CPT-1) sobre todo en el periodo de lactancia. Estos resultados indican que el exceso de aminoácidos provenientes de la dieta sirven como fuente de energía al hígado, mientras que una carencia de aminoácidos genera adaptaciones metabólicas en el hígado y tejido adiposo de estos animales para proveer a la glándula mamaria los sustratos necesarios para la síntesis de proteínas y lípidos y cubrir la demanda energética de las crías en el periodo de lactancia, en el cual éste órgano lleva a cabo un proceso anabólico intenso independientemente de la concentración de proteína en la dieta.

2. INTRODUCCIÓN

Los periodos de gestación y lactancia son estados fisiológicos en los cuales se presentan una gran cantidad de cambios hormonales y metabólicos que tienen como fin capacitar a la madre para cubrir las necesidades de crecimiento y desarrollo del feto y de la cría después del nacimiento. En estos periodos se incrementan los requerimientos nutricios.¹ Algunos estudios en ratas han demostrado esta condición al encontrar un aumento en el consumo de alimentos durante estos periodos, pero especialmente durante la lactancia lo que está asociado con la ganancia de peso de las crías.² Durante la lactancia la rata madre incrementa la ingestión de alimento en un 300%.

2.1 Cambios metabólicos durante la gestación

El feto puede considerarse como otro tejido que requiere nutrimentos y emplea fundamentalmente glucosa para la obtención de energía; sin embargo, también utiliza aminoácidos, lactato, ácidos grasos y cuerpos cetónicos. El lactato producido en la placenta mediante glucólisis tiene dos destinos: parte se dirige al feto donde se utiliza como combustible, mientras que el resto retorna a la circulación materna para establecer un ciclo de Cori en el hígado. El colesterol materno de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es un importante precursor de las hormonas esteroideas de la placenta (estradiol y progesterona). Durante el embarazo, el ciclo de ayuno-alimentación queda perturbado.

La placenta secreta una hormona polipeptídica, el lactógeno placentario, y dos hormonas esteroideas, estradiol y progesterona. El lactógeno placentario estimula la lipólisis en el tejido adiposo, y en conjunto con las hormonas esteroideas induce un estado de resistencia a la insulina en diversos órganos de la madre como son el tejido adiposo, el hígado y el músculo. Además hay un incremento progresivo en la secreción de insulina en este periodo. La respuesta normal de las células beta del páncreas a la resistencia a la insulina es incrementar la secreción de insulina por lo que al disminuir las concentraciones de glucosa circulante disminuye la secreción de insulina en el páncreas. La secreción de insulina en páncreas se ve favorecida por una combinación de hipertrofia e hiperplasia de las células beta del páncreas ocasionado por hormonas presentes en altas concentraciones en la circulación sanguíneas de la madre.

En el estado post-prandial la madre entra en estado de inanición más rápidamente, debido al consumo incrementado de glucosa y aminoácidos por parte del feto. Las concentraciones plasmáticas de glucosa, aminoácidos e insulina caen rápidamente, mientras que las concentraciones de glucagon y lactógeno placentario aumentan y estimulan la lipólisis y la cetogénesis. El consumo de glucosa y aminoácidos por parte del feto puede ser tan grande que induzca en la madre una hipoglucemia.³

Al igual que la insulina, la leptina está involucrada en la modulación del balance energético inhibiendo el consumo de alimento e incrementando la generación de energía mediante la activación del sistema nervioso simpático.⁴ El periodo de gestación se caracteriza por ser un estado en donde se presenta resistencia a la leptina debido a que el consumo de alimento se mantiene estable o incrementa sin importar que exista un aumento en las concentraciones séricas de esta hormona.⁵ Particularmente durante la gestación la resistencia a la leptina se debe principalmente a que las proteínas de unión a leptina en el plasma secuestran a la hormona restringiendo su actividad en los tejidos. Además, el incremento en la concentración de estrógenos en este periodo fisiológico inhibe la expresión hipotalámica del receptor de leptina.⁶

Los cambios metabólicos se observan en diferentes órganos de la madre; sin embargo, para fines de este trabajo se enfatiza en los cambios observados en tres órganos fundamentales en estos estados fisiológicos: el hígado, el tejido adiposo y la glándula mamaria.

El hígado es un órgano crítico involucrado en el metabolismo y en una gran variedad de efectos fisiológicos como la captación, almacenamiento y distribución de nutrientes. Se encarga de mantener la concentración de glucosa y lípidos circulantes⁷, sintetizar proteínas y metabolizar nutrientes, toxinas y fármacos. Durante la gestación el hígado incrementa su capacidad funcional y lleva a cabo diversos ajustes metabólicos. Estos cambios están relacionados con la actividad de enzimas metabólicas⁸, la expresión de receptores y la señalización desencadenada por hormonas gonadales e hipofisiarias. Se ha observado que el peso del hígado incrementa durante la gestación en el ratón y la rata.⁹

Dentro de los ajustes metabólicos llevados a cabo por el hígado en estos periodos fisiológicos destacan el metabolismo de glucosa y lípidos que han sido los mayormente estudiados. El metabolismo de la glucosa, basal y postprandial cambia gradualmente con el curso de la gestación para cubrir las necesidades de la madre y el feto. Se ha visto en ensayos de tolerancia a la glucosa que hay una disminución en la tolerancia a la glucosa en el primer trimestre del embarazo. En estado no gestante, el hígado es el encargado de producir la glucosa endógena y la tasa de producción y utilización es similar. Durante la gestación, la glucosa en ayuno disminuye progresivamente conforme avanza el embarazo debido a diversos factores como un incremento en el volumen sanguíneo (por dilución), una mayor utilización de glucosa por parte de la placenta-feto, o la madre. A pesar de esto, la producción de glucosa hepática durante el embarazo se incrementa, sobre todo en etapas tardías de la gestación y no se suprime por efecto de la insulina como normalmente ocurre en estado no gestante. Esto demuestra que existe una resistencia a la insulina en el hígado de la madre durante este periodo. La disminución de la glucosa en sangre en el ayuno, se exagera si el ayuno es prolongado por lo que hay una compensación incompleta en la producción endógena de glucosa por parte del hígado. La producción hepática de glucosa incluye los procesos de gluconeogénesis y glucogenólisis. La disponibilidad de sustratos para la gluconeogénesis como es la alanina juega un papel importante en este proceso.¹⁰ La

concentración de ácidos grasos libres y la producción hepática de glucosa también están correlacionadas. Adicionalmente se ha observado un incremento de 2 a 4 veces en la concentración de triglicéridos y de 25 a 50% en la concentración de colesterol circulante durante el embarazo, asociados a lipoproteínas provenientes del hígado.

El tejido adiposo es otro órgano afectado por la de gestación y la lactancia. Hay un incremento en el depósito de lípidos en el tejido adiposo (efecto anabólico) en la primera etapa el embarazo; mientras que predomina la movilización de lípidos en la última etapa de la gestación y sobre todo a lo largo de la lactancia (efecto catabólico).¹¹ La concentración de insulina y su sensibilidad se ve favorecida a inicios de la gestación, mientras que la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina prevalecen en las siguientes etapas de este periodo. La lipoproteína lipasa regulada por la insulina cataliza la hidrólisis y captación de los triglicéridos circulantes y su actividad es especialmente mayor en el tejido adiposo en comparación con otros tejidos regulando el almacenamiento de lípidos en los adipocitos.¹²

Durante la gestación hay un incremento tanto del tejido adiposo subcutáneo como el visceral y ambos cubren funciones particulares. El tejido adiposo subcutáneo juega un papel importante como fuente de energía para la madre y el feto, especialmente en la etapa tardía de la gestación y durante la lactancia. El incremento en el tejido adiposo visceral puede estar relacionado con la disminución de la sensibilidad a la insulina sobre todo en la etapa final del embarazo.¹³

Una característica fundamental y particular de los mamíferos es la facultad que poseen para sintetizar alimento para sus crías. La glándula mamaria es la encargada de la producción de leche materna y es por ello que cobra especial importancia en estos periodos fisiológicos.

A lo largo de la gestación el propósito final de la glándula mamaria es su proliferación y desarrollo alveolar como preparación para cubrir las demandas de síntesis de componentes de leche en el periodo de lactancia. Al final del embarazo, las hormonas placentarias inducen a la lipoproteína lipasa en la glándula mamaria y promueven el desarrollo de las células y conductos secretores de leche.

Dentro de los cambios metabólicos presentados en el tejido mamario durante la gestación se encuentra la activación del factor de transcripción PPAR α (peroxisome proliferators-activated receptor α), el cual activa la expresión de enzimas de la β -oxidación así como la enzima ACOT1 (Acyl-CoA thioesterasa 1) en las células epiteliales del tejido mamario. ACOT1, provee el aporte de ácidos grasos libres (AGL) en el citoplasma incrementando la activación de PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) y favoreciendo la proliferación celular. La proteína FABP3 (fatty acid binding protein 3) también se incrementa en este periodo permitiendo el aporte de AGL a las células mamarias.

2.2 Cambios metabólicos durante la lactancia

La lactancia requiere la movilización de nutrimentos de diversos órganos como son del hígado y del tejido adiposo hacia la glándula mamaria para la síntesis de leche. Este proceso requiere de cambios sustanciales en el metabolismo de lípidos, glucosa y aminoácidos en estos órganos durante este proceso fisiológico.

El hígado incrementa de manera considerable la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) para abastecer a la glándula mamaria de triglicéridos y colesterol. También favorece el flujo de aminoácidos hacia la circulación sanguínea. En el tejido adiposo las reservas acumuladas durante la gestación son movilizadas durante el periodo de lactancia. Hamosh y colaboradores¹⁴ midieron los cambios en la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) como un indicador de acumulación de grasa en la rata. La reserva de grasa incrementó en el embarazo; sin embargo durante lactancia el acumulo de lípidos en el tejido adiposo cesó y se activó la liberación de ácidos grasos hacia la glándula mamaria para la síntesis de lípidos de la leche. A los 20 días postparto Steingrimsdottir y colaboradores¹⁵ encontraron que los animales lactantes tenían adipocitos más pequeños y una menor actividad de la LPL que los controles no lactantes.

Además del efecto de resistencia a la insulina, las catecolaminas juegan un papel importante en el control endocrino y la movilización de lípidos en el tejido adiposo blanco. Las catecolaminas activan los receptores adrenérgicos β favoreciendo la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) por la adenilato ciclasa y activando a la proteína cinasa A (PKA). PKA activa a su vez a la lipasa sensible a hormona (HSL) desencadenando el proceso de lipólisis. En roedores, el receptor adrenérgico β -3 es el más abundante en el tejido adiposo blanco. Las catecolaminas también pueden impedir la movilización de lípidos en el tejido adiposo activando a los receptores adrenérgicos α e inhibiendo la producción de AMPC. Ambos receptores coexisten en el tejido adiposo por lo tanto la activación de una clase α o β determina si los lípidos son almacenados o liberados al torrente sanguíneo.¹⁶

La glándula mamaria es el órgano con mayor actividad en el periodo de lactancia. Utiliza glucosa para la síntesis de lactosa y triglicéridos, tanto como esqueletos de carbono así como principal fuente de energía. Se captan aminoácidos para la síntesis de proteínas y los quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se utilizan como fuente de ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos (Figura 1).²⁸ Si no se suministran los nutrimentos en la dieta, se activan procesos de proteólisis en el músculo, gluconeogénesis en el hígado y lipólisis en el tejido adiposo, lo que puede conducir a un estado de desnutrición en la madre.

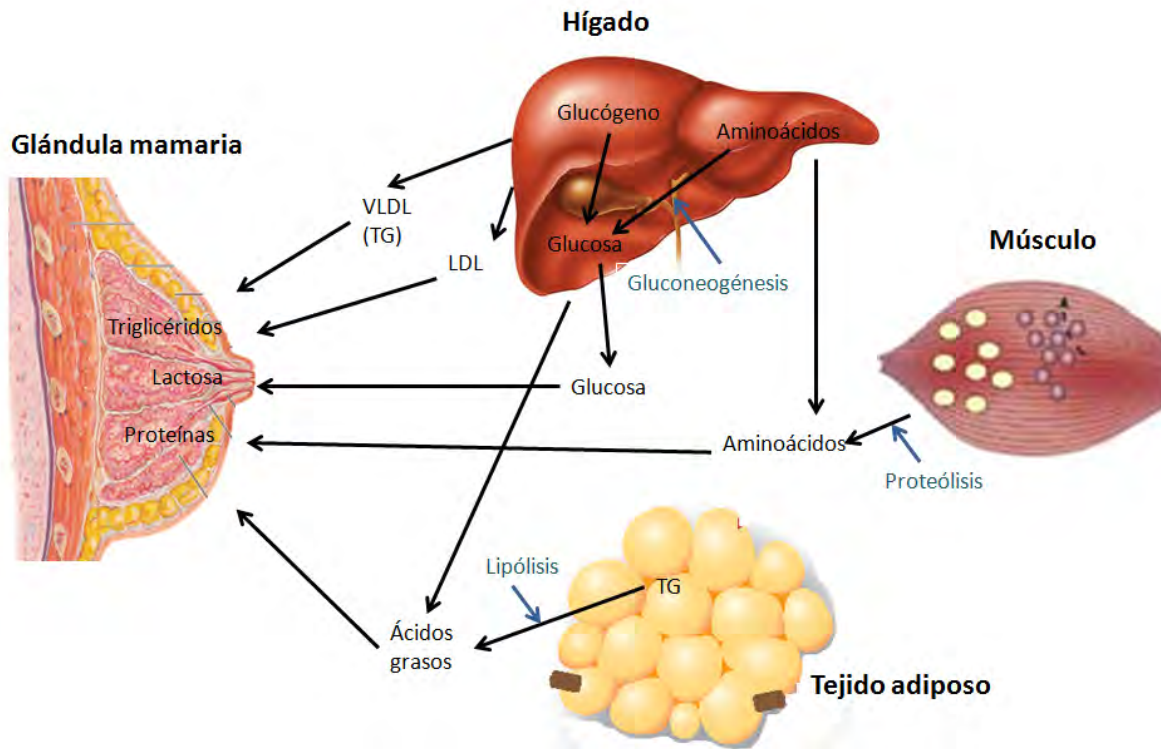


Figura 1. Cambios en el metabolismo de la madre durante la lactancia.

El inicio de la actividad secretora marca un cambio importante en la regulación de lípidos en la glándula mamaria¹⁷. Este órgano además de utilizar los triglicéridos y ácidos grasos de la circulación provenientes del hígado y el tejido adiposo, tiene la capacidad de llevar a cabo la síntesis de *novo* de lípidos, particularmente de ácidos grasos, por lo que deben de ocurrir una serie de adaptaciones funcionales en este órgano para cubrir las demandas de lípidos que conformarán la leche.

Lo anterior demuestra que el tejido mamario cobra especial importancia durante la gestación y sobre todo en el periodo de lactancia, por lo que se presentará a continuación un panorama más amplio de los cambios morfológicos, el transporte de solutos y los ajustes metabólicos que se llevan a cabo en este tejido retomando algunos resultados encontrados en diversas investigaciones.

Debido a que en este trabajo se determinará el efecto que tiene un cambio en la concentración de proteína de la dieta en los periodos de gestación y lactancia, también se presentarán posteriormente algunos estudios relacionados con el ajuste energético o proteico que ocurren en estos periodos fisiológicos y los efectos que ejercen en la madre o en las crías.

3. ANTECEDENTES

3.1 La glándula mamaria: órgano clave

3.1.1 Cambios en su morfología durante la gestación y la lactancia

El tejido mamario atraviesa por diferentes etapas de maduración en las cuales logra adquirir la conformación necesaria para cubrir las demandas energéticas de las crías. En la figura 2 se esquematiza el cambio en la morfología en el tejido mamario de rata en los periodos de gestación y lactancia.

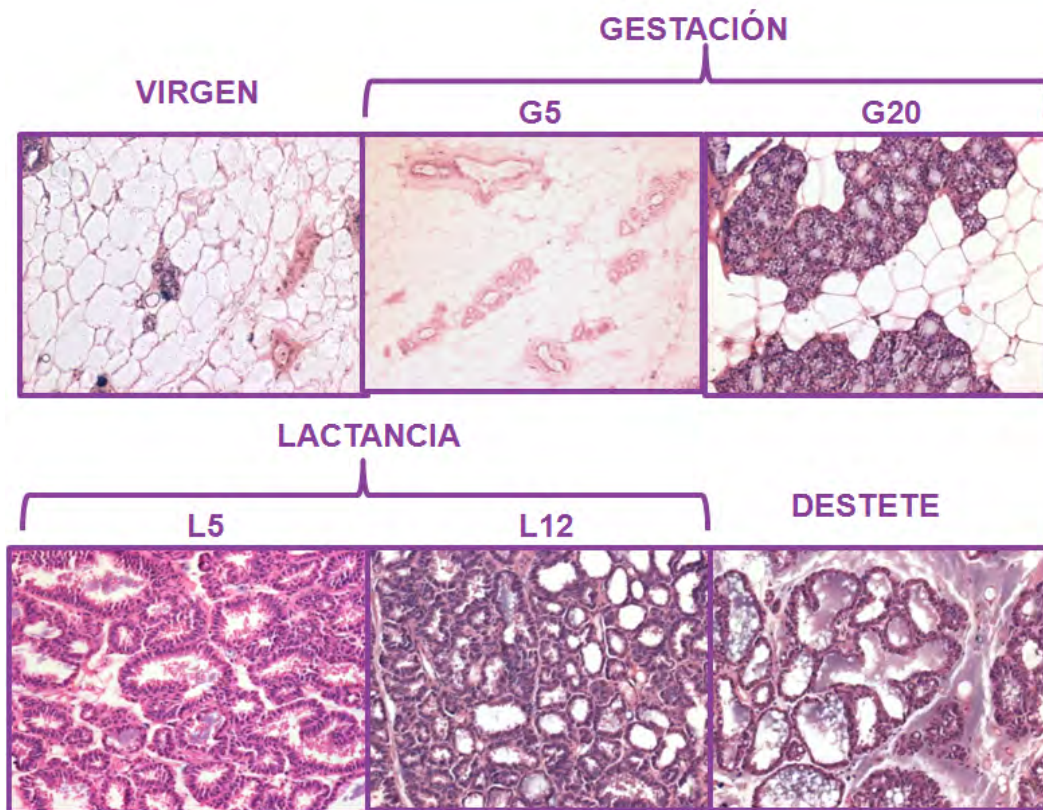


Figura 2. Cambio en la morfología del tejido mamario. Cortes histológicos de glándula mamaria de rata teñidos con hematoxilina/eosina 40X.

Durante la gestación tiene lugar un crecimiento de los acinos y es entonces cuando se define la estructura definitiva de la glándula. Esto se produce como respuesta a las concentraciones elevadas de estrógenos y progesterona.

El desarrollo de la mama desde el punto de vista funcional finaliza hacia la mitad del embarazo; sin embargo la lactancia está inhibida hasta que la concentración de estrógenos desciende, lo que ocurre después del nacimiento. El inicio del puerperio desencadena una caída súbita de estrógenos y progesterona, producidos por la placenta, lo que conlleva una descarga importante de prolactina que estimula el inicio de la secreción por parte de los alvéolos glandulares.¹⁸ Estos provocan la congestión sanguínea, posteriormente el calostro, la leche de transición y finalmente la leche madura. La oxitocina es otra hormona que interviene en el proceso de lactancia pues actúa sobre los elementos mioepiteliales que rodean a los acinos glandulares y a los conductos galactóforos para lograr la extracción de leche mediante una contracción muscular.

La conversión de células en el tejido mamario es un factor importante en la producción de leche; el número de células secretoras durante la lactancia, correlaciona con la producción láctea.¹⁹ Diversos factores de crecimiento inducen la proliferación celular en el tejido mamario entre los que se encuentran el factor de crecimiento semejante a la insulina IGF-I (insulin growth factor I) sistémico o local. El IGF-I es un factor mitótico que induce la proliferación celular y está relacionado con el número de células estromales y epiteliales en la glándula mamaria. Existe un incremento de IGF-I en la etapa tardía de la gestación sin embargo, a pesar de su incremento, su papel biológico está influenciado por su biodisponibilidad que está regulada por medio de sus proteínas enlazantes IGFBP (insulin growth factor binding proteins).²⁰

Cuando finaliza la lactancia la mama comienza un periodo de involución. Este periodo atraviesa por diferentes procesos como la apoptosis del epitelio mamario, la remodelación de la glándula, y la vuelta a su estado anterior al embarazo. En el periodo de destete un factor pro-apoptótico denominado Bax incrementa su expresión considerablemente. Este factor se transloca a la membrana interna de la mitocondria en donde forma oligómeros los cuales inducen la liberación de citocromo C y se da el inicio del fenómeno de apoptosis.²¹

En tejidos animales, como es el caso de la rata, se presentan de la misma manera cambios en la composición del tejido mamario en el periodo de gestación, lactancia²² y destete.²³

3.1.2 Transporte de solutos en la glándula mamaria

El estudio del transporte de solutos a través de las membranas de las células secretoras de la glándula mamaria, es de gran importancia debido a la relevancia fisiológica en este tejido. Los estudios conocidos sobre el transporte de solutos se han llevado a cabo en diversos cortes de tejidos, utilizando explantes.²⁴

Existen diferentes rutas celulares de secreción de biomoléculas y para el caso de las células secretoras de la glándula mamaria se conocen cinco rutas, cuatro de ellas son transcelulares y una es paracelular.²⁵

- Ruta de membrana. Las sustancias atraviesan la membrana apical de las células (y la basolateral si provienen de la sangre). Algunos ejemplos son el agua, urea, glucosa, Na⁺, K⁺ y Cl⁻.
- Ruta de Golgi. Los productos de secreción son transportados o secuestrados por el aparato de golgi y secretados (leche) por exocitosis. Algunos ejemplos de esta ruta son la caseína, otras proteínas, lactosa, citrato y calcio.
- Ruta de la grasa de la leche. Los glóbulos que conforman la grasa de la leche son expulsados de las células rodeados por una membrana y en algunas ocasiones con fragmentos de citoplasma. Por este mecanismo salen de las células la grasa de la leche, hormonas liposolubles, medicamentos, factores de crecimiento y leptina.
- Transcitosis. Este es un transporte vesicular que incluye varios organelos. De esta manera atraviesan las inmunoglobulinas durante la formación del calostro, la transferrina y la prolactina.
- Ruta paracelular. Esta ruta involucra el paso directo de fluido intersticial a la leche.

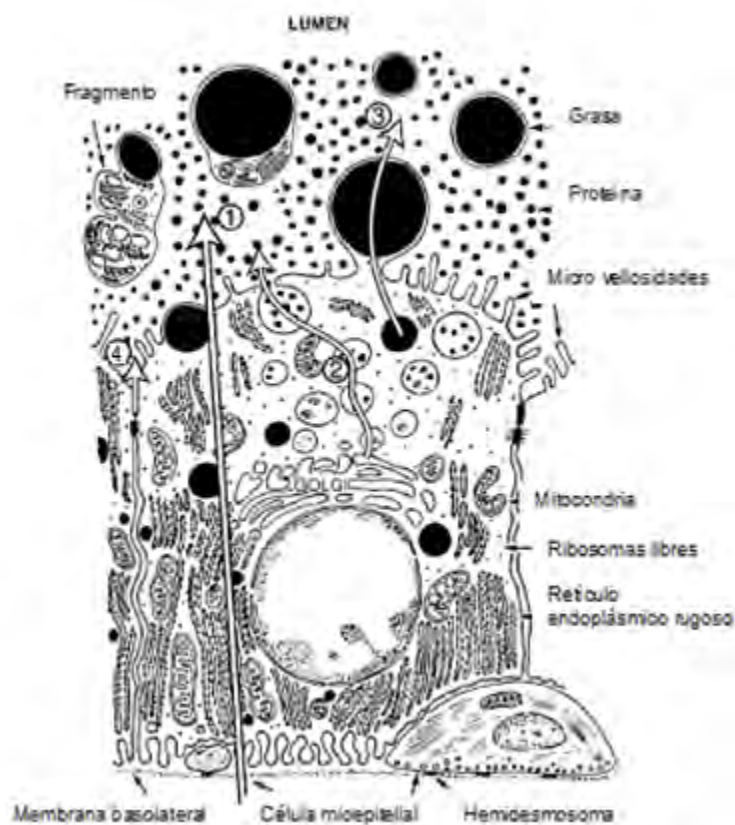


Figura 3. Rutas de secreción del epitelio mamario. 1. Ruta de membrana. 2. Ruta de golgi. 3. Ruta de la grasa de la leche. 4. Ruta paracelular. Adaptado de Linzell y Peaker 1971.

En la Figura 3 se esquematizan las diferentes rutas de transporte. El transporte transcelular comprende el paso de solutos a través de las membranas del epitelio, mientras que el transporte paracelular requiere del movimiento entre las células mediante uniones. En el tejido mamario la mayoría de los solutos se transportan vía transcelular, sin embargo el transporte paracelular puede ocurrir durante la gestación y en algunas especies, durante la lactancia.

Así como en la gestación diversas hormonas secretadas por la placenta y los ovarios favorecen la diferenciación y el cambio morfológico en la glándula mamaria, en el periodo de lactancia es la prolactina la hormona encargada de mantener y regular la síntesis de diversos componentes de la leche. Rudolph y colaboradores²⁶ llevaron a cabo un estudio de inhibición en la actividad de la prolactina en la glándula mamaria de ratones lactantes al utilizar el inhibidor bromocriptina. Los ratones con inhibición en la actividad de la prolactina disminuyen la expresión de los genes de β -caseína y α -lactoalbúmina, así como genes involucrados en la captación de glucosa, glucólisis, vía de las pentosas, síntesis de novo de ácidos grasos y biosíntesis de triglicéridos. Debido a estas alteraciones metabólicas, el crecimiento de las crías se detiene significativamente.

3.1.3 Ajustes metabólicos en la glándula mamaria en el periodo de lactancia

La glándula mamaria lactante debe mantener un constante aporte de ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos. Los triglicéridos de la leche, provienen de fuentes exógenas (dieta) y endógenas (ácidos grasos provenientes del tejido adiposo y síntesis de *novo* en la glándula mamaria). Durante la lactancia se activa la exportación de ácidos grasos del tejido adiposo y de lipoproteínas provenientes del hígado hacia la glándula mamaria; así como el proceso de síntesis de *novo* de ácidos grasos en este tejido. El proceso de síntesis de ácidos grasos requiere de la coordinación de diversos genes que permiten el flujo de nutrimentos necesarios para este proceso entre los que se encuentran enzimas, transportadores y proteínas de unión.

Existe un balance entre la captación de lípidos exógenos provenientes de la dieta y de la biosíntesis de lípidos endógena. Los AGL son hidrolizados de los triglicéridos presentes en los quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para atravesar la membrana basolateral de los lactocitos. Durante el ayuno, los AGL son liberados por el tejido adiposo, y transportados por albúmina para ser captados por las células alveolares. Una vez dentro de las células mamarias, estos ácidos grasos exógenos al igual que los sintetizados endógenamente son esterificados a acil-CoA por la acil CoA sintetasa (ACSL). Los AGL pueden ser desaturados o elongados en su proceso para formar parte de los triglicéridos.¹⁸

Los genes involucrados en la síntesis de triglicéridos ACSL (long-chain acyl CoA synthetase) y AGPAT (1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase), y en la elongación y

desaturación ELOVL (elongation of very long chain fatty acids), SCD2 (stearoyl-CoA desaturase 2) y FADS (fatty acid desaturases) incrementan su expresión al final de la gestación, mientras que los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos en la glándula mamaria, incrementan considerablemente su expresión al iniciar la actividad secretora en la lactancia ACC (acil CoA carboxylase), FAS (fatty acid synthase), y enzima málica. El incremento en la expresión de varias de estas enzimas se debe a la actividad del factor de transcripción SREBP1 (sterol regulatory element binding protein). En un estudio realizado en ratones knock out de *Srebp1c* y SCAP (SREBP cleavage-activating protein) proteína encargada de liberar a este factor del aparato de Golgi para su migración al núcleo, se observó que éstos animales presentaban grandes deficiencias en la producción de lípidos al disminuir la concentración de mRNA de FAS, Insig1 (insulin-induced gene 1), Slc25a1 (mitochondrial citrate transporter) y SCD2.²⁷ Por su parte, los genes involucrados en la β -oxidación disminuyen al iniciar la actividad secretora.

Por otra parte, se presentan de igual manera algunos ajustes en el metabolismo de hidratos de carbono. La concentración de lactosa en la leche de muchas especies es relativamente elevada debido a que es uno de los osmolitos más importantes.

La lactosa se sintetiza en el lumen del aparato de golgi por la lactosa sintasa y se transporta en vesículas por exocitosis. El volumen de leche secretada está relacionada con la síntesis de lactosa. La glándula mamaria requiere de la d-glucosa para la síntesis de lactosa y esta demanda es cubierta por su entrada a través de diferentes transportadores de glucosa en la glándula mamaria como GLUT1 (glucose transporter 1), GLUT4 (glucose transporter 4), sensible a insulina, y SGLT (sodium-dependent glucose cotransporter), dependiente de sodio. También se han identificado algunos factores que controlan el transporte de glucosa en el tejido mamario. Dentro de estos se encuentra el estadio de desarrollo de la glándula mamaria, la participación de hormonas como la prolactina y la hormona del crecimiento, así como el estado nutricional de la madre.

Así como existen adaptaciones en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, el metabolismo de aminoácidos también lleva a cabo ajustes y cobra especial importancia en estos periodos. Los aminoácidos son las unidades estructurales de las proteínas. Dependiendo del estado fisiológico por el cual atraviese un organismo, las necesidades de aminoácidos son diferentes. La glándula mamaria requiere de aminoácidos durante la gestación para cubrir las demandas de proliferación celular y desarrollo alveolar. Sin embargo, es durante el periodo de lactancia en donde se dan los principales cambios en la movilización de aminoácidos hacia la glándula mamaria principalmente para la síntesis de proteínas de la leche.

Es posible calcular la captación de aminoácidos por la glándula mamaria mediante el estudio de diferencias arteriovenosas de los aminoácidos. En un estudio realizado por Barber T. y colaboradores²⁸ se encontró que se incrementa la captación de aminoácidos en la glándula mamaria durante la lactancia, especialmente de alanina y glutamina. La captación de algunos de los aminoácidos por la glándula mamaria como arginina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, treonina, glutamina y alanina excede significativamente la salida de éstos en las proteínas de la leche por lo que se sugiere que existe un depósito de proteínas en la glándula mamaria o que éstos aminoácidos tienen funciones metabólicas adicionales.²⁹

La síntesis de las proteínas de la leche y de las enzimas involucradas en ésta las estimula la prolactina, la insulina y el cortisol. La prolactina se encarga de incrementar el proceso de transcripción de las proteínas de la leche, particularmente de la caseína y α -lactoalbúmina. La insulina estimula la síntesis de proteínas activando la vía de mTOR1 (mammalian target of rapamycin 1) mediante la activación previa de la proteína Akt/PKB (Protein kinase B) la cual se encarga de liberar al factor inhibitorio del complejo mTOR1 y de esta manera favorecer su activación.

Debido a que la síntesis de estas proteínas requiere de aminoácidos plasmáticos para su captación, el epitelio mamario generara gradientes de concentración de aminoácidos transepiteliales (plasma>leche), así como también mantiene gradientes de concentración de muchos aminoácidos a través de las membranas apicales y baso-laterales de las células mamarias (intracelular>extracelular).²⁴ Esto sugiere que se requiere una fuente de energía durante el proceso de transporte de algunos aminoácidos.

La captación de aminoácidos por la glándula mamaria, al igual que del resto de los tejidos la llevan a cabo los transportadores de aminoácidos. Diversos estudios confirman la existencia de una amplia variedad de sistemas de transporte de aminoácidos^{30,31} y se clasifican dependiendo de la carga neta de los sustratos que transportan en neutros, catiónicos y aniónicos. También pueden clasificarse de acuerdo a su dependencia o independencia para su co-transporte con el sodio. Se ha demostrado la presencia de varios sistemas de transporte de aminoácidos en el tejido mamario.^{32,33} En un estudio realizado en rumiantes se identificaron los sistemas de transporte A, ASC, L, N, Gli y EAAC en la glándula mamaria.³⁴ En tejido mamario de ratas se han encontrado los sistemas de transporte A, ASC, L, CAT, EAAC, GLAST, y β .^{35,36}

Como se mencionó anteriormente, estudios de diferencias arteriovenosas demostraron que los aminoácidos mayormente captados por la glándula mamaria son la alanina y la glutamina los cuales son transportados por el sistema A del cual se mostrarán algunos aspectos de este sistema de transporte de aminoácidos a continuación.

3.2 Sistema A de transporte de aminoácidos

El sistema A es una familia de transportadores de aminoácidos dependientes de sodio que se encargan de transportar aminoácidos neutros de cadena corta como son la alanina, glicina, serina, prolina, cisteína y glutamina. El SNAT2 (sodium-dependent neutral amino acid transporter 2) representa la isoforma del sistema A clásico. Fue el primer transportador de aminoácidos dependiente de sodio en ser estudiado siendo descrito en 1963 en células Ehrlich de ascitis de ratón.³⁷ Este transportador es capaz de mediar el transporte de aminoácidos-N-metilados no metabolizables como el metilaminoisobutirato (MeAIB) que es su sustrato modelo³⁸ además del aminoisobutirato (AIB). Existen datos de que este transportador interactúa con proteínas del citoesqueleto y participa activamente en procesos como la duplicación celular y la regulación del volumen celular.³⁹ En el hígado el SNAT2 transporta alanina que provee átomos de carbono para la gluconeogénesis y nitrógeno para la producción de urea, y se ha considerado que el transporte de alanina a través de este sistema es el paso limitante para su utilización como sustrato para la gluconeogénesis.⁴

El nivel de actividad de este transportador influencia de manera importante la concentración de la poza de aminoácidos intracelulares. La glutamina y la alanina representan una porción significativa de la poza total de aminoácidos tanto *in vivo* como *in vitro*; además la glutamina también puede interaccionar con otros sistemas intercambiadores como el ASC y L, estimulando la entrada de leucina, isoleucina y valina a las células. El SNAT2 es electrogénico y tiene la capacidad de responder al potencial de la membrana⁴⁰. Es un transportador de aminoácidos dependiente de sodio; la Asn-82 y la Thr-384 se han identificado como los aminoácidos involucrados en la unión del ión sodio al transportador.⁴¹ El SNAT2 también es regulado por acción hormonal. En el hígado, el glucagon estimula su actividad y expresión a través de la formación del AMPc, activando al factor de transcripción CRE que se une a la región promotora del gen de SNAT2.⁴² También la insulina promueve la migración de éste transportador de los compartimentos endosomales a la membrana celular en células de músculo esquelético;⁴³ así como la migración de este transportador del aparato de Golgi a la membrana plasmática en adipocitos.⁴⁴

La prolactina estimula la actividad del sistema de transporte A en la glándula mamaria. Esto se demostró en un estudio con administración de bromocriptina (inhibidor de la prolactina) en donde se encontró una disminución significativa de las concentraciones de aminoácidos dependientes de este sistema.⁶

La expresión del SNAT2 se activa por algunas vías de señalización. Ensayos realizados en explantes de glándula mamaria de rata demostraron que la forskolina y el 12- miristato -13- acetato de forbol (PMA), activadores de las vías de señalización de las proteínas cinasas A y C respectivamente, inducen la expresión de SNAT2, y dicho efecto se reprime parcialmente al pre-incubar los explantes con inhibidores de estas vías.³⁶

Por otro lado se ha demostrado que la ausencia extracelular de sustratos de SNAT2 incrementa la actividad de este sistema, fenómeno que se le conoce como regulación adaptativa.⁴⁵ La regulación adaptativa de la actividad del sistema A ocurre en conjunto con un incremento en la expresión del RNAm y la abundancia de dicho transportador en la membrana. La privación de aminoácidos también puede ser detectada por una reducción en el volumen celular, ocasionado por el efecto osmótico que provoca la disminución en la captación de aminoácidos. Del mismo modo la exposición de la célula a medios hipertónicos reduce la actividad del SNAT2 y su expresión génica, así como el añadir al medio el sustrato no metabolizable MeAIB o alguno (s) de los aminoácidos sustrato.

3.2.1 Expresión de RNAm y concentración de la proteína de SNAT2 en la glándula mamaria durante la gestación y la lactancia.

El análisis por Northern blot de diferentes estadios de la gestación y la lactancia muestra variaciones en la expresión del RNAm del SNAT2 en ratas vírgenes, gestantes, lactantes y en destete.³⁴ Se observa un incremento progresivo en la expresión del RNAm de SNAT 2 durante el periodo de gestación encontrándose un pico máximo en el día 18 seguido de un decremento en el día 20 de gestación, un día antes del nacimiento de las crías. En el periodo de lactancia se presenta un nuevo incremento en la expresión del RNAm de SNAT2 sobre todo en los días 12 y 16. Durante el destete disminuye la expresión del RNAm de SNAT2. Estas variaciones se presentan en la figura 4.

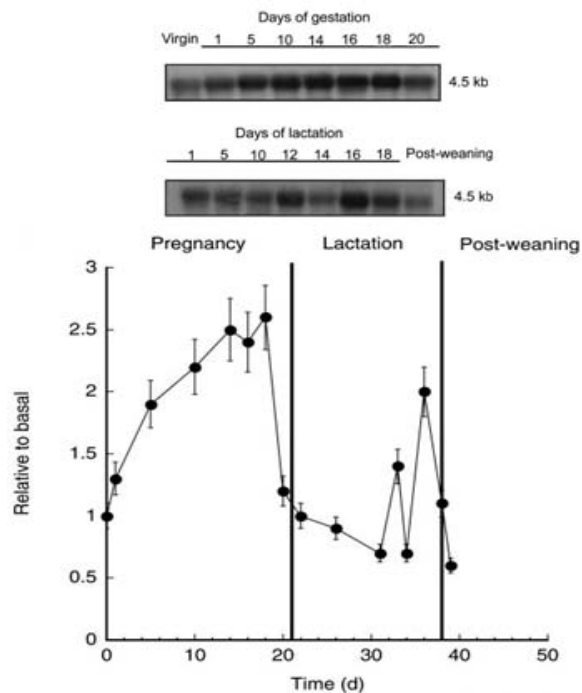


Figura 4. Expresión del RNAm de SNAT2 por Northern Blot en glándula mamaria en los periodos de gestación, lactancia y destete. López A et al Am J Physiol Endocrinol Metab 2006.

Por otra parte, el análisis por Western Blot de la concentración de proteína de SNAT2 en glándula mamaria de rata durante la gestación y la lactancia muestra variaciones interesantes. En la figura 5 se observa que en la glándula mamaria virgen se encuentra este transportador en grandes cantidades. Durante la gestación el patrón de expresión de esta proteína se mantiene elevado en el tejido mamario seguido de un descenso repentino en el día 20 de gestación, a tan solo un día del nacimiento de las crías. Posteriormente durante la lactancia vuelve a presentarse un incremento en la cantidad de proteína de SNAT2, aunque no tan intenso como en los periodos anteriores, mostrando fluctuaciones en los diferentes días de lactancia y presentando finalmente un ligero descenso en el primer día de destete. Estos resultados demuestran que las concentraciones máximas de este transportador de aminoácidos neutros cortos dependiente de sodio, se presentan en la glándula mamaria virgen y gestante.

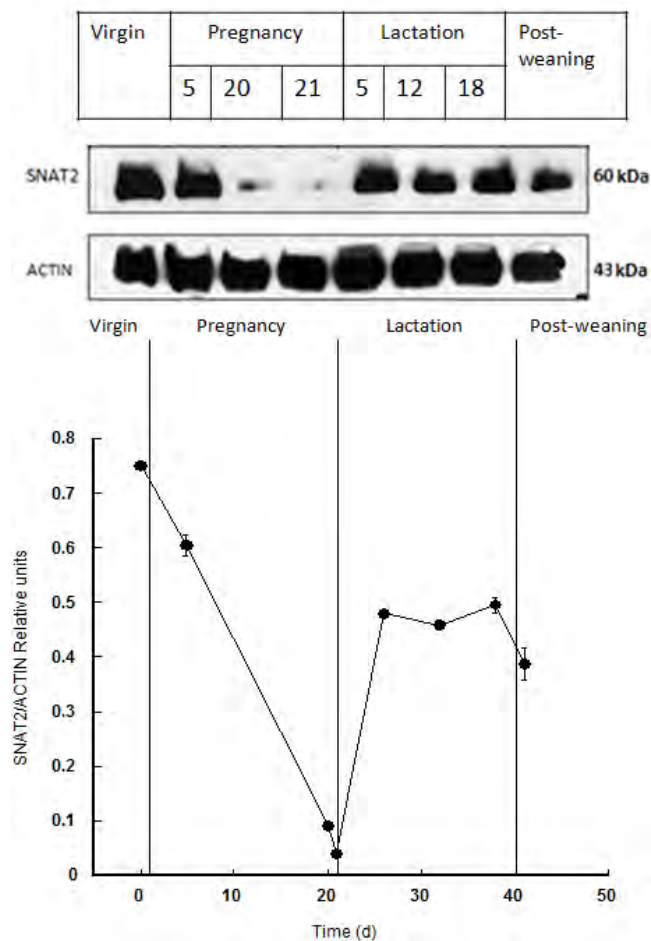


Figura 5. Concentración de proteína de SNAT2 en glándula mamaria de rata durante la gestación y la lactancia.

3.3 Efecto de la restricción energética o proteica en la dieta en el balance energético y metabólico durante la gestación y la lactancia

Existe una gran controversia sobre un incremento en el consumo de alimento de ratas alimentadas con dietas bajas en proteína. Los animales en periodos en crecimiento con dietas restringidas en proteína incrementan su consumo de alimento para tratar de reponer la deficiencia generada por la dieta y tienden a incrementar sus depósitos de grasa.⁴⁶ La hiperfagia debida a una disminución en el aporte normal de proteína se acompaña de un incremento en la pérdida de energía ya que ocurre un cambio metabólico que favorece la termogénesis incrementando el metabolismo basal. El incremento en la termogénesis está asociado a un aumento en la actividad del tejido adiposo pardo debido a la estimulación por sistema nervioso simpático. Un incremento en la actividad del sistema nervioso simpático conduce a una disminución de la secreción de insulina mediada por glucosa, la cual se compensa al aumentar la tolerancia a la glucosa y la acción de la insulina en dietas restringidas en proteína.

También se ha encontrado una serie de cambios en la distribución y metabolismo de nutrimentos en modelos de restricción energética o proteica durante los periodos de gestación y lactancia. En un estudio realizado en cabras, se observó que las concentraciones en plasma de ácidos grasos no esterificados (NEFA), ácido beta-hidroxibutírico (BHBA), y triglicéridos se incrementan en los animales con restricción energética (80% de su requerimiento).⁴⁷

Se ha hipotetizado que una deprivación de energía o proteína durante el embarazo puede afectar el desarrollo o proliferación de la glándula mamaria así como la producción láctea; sin embargo durante los periodos de gestación y sobre todo de lactancia, a pesar de una restricción energética o proteica, la glándula mamaria tiene prioridad sobre el mantenimiento de otros tejidos. Incluso se ha observado que el abasto de nutrimentos hacia la glándula mamaria para su desarrollo no se ve comprometido o alterado por el consumo de alimento.

En un estudio realizado en ovejas con restricción energética-proteica en la última etapa del embarazo se observa una disminución en la producción de calostro en comparación con los animales alimentados sin restricción por lo que se concluye que la producción de calostro si es dependiente del estado nutricional de la madre.⁴⁸ Sin embargo ni la expresión ni el contenido de α -lactoalbúmina o la producción láctea en etapas posteriores de lactancia se afecta por la restricción dietaria, por lo que se comprueba nuevamente que la movilización de nutrimentos de otros tejidos juega un papel muy importante para que la composición de la leche no se ve afectada por una restricción energética.

Se ha estudiado ampliamente en modelos de restricción proteica los efectos que se producen en las crías en su vida adulta, lo que se conoce como programación metabólica. Existen numerosos artículos en modelos animales de rata y ratón que señalan que los animales nacidos de madres con restricción proteica durante el embarazo o la lactancia presentan alteraciones metabólicas relacionadas con genes del metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos que los condicionan a desarrollar enfermedades crónicas como diabetes, dislipidemias, enfermedades cardiovasculares o síndrome metabólico en su etapa adulta.

En un modelo de ratón con restricción proteica prenatal, se encontró que el hígado de los descendientes de las madres que sufrieron restricción proteica durante el embarazo sufre adaptaciones epigenéticas entre las que se encuentran la hipermetilación del promotor del gen LXR (liver X receptor), un receptor nuclear involucrado en el metabolismo de colesterol y ácidos grasos. Esto conlleva a una disminución en los niveles de mRNA de los transportadores de colesterol ABCG5 (ATP-binding cassette transporter subfamily G member 5) y ABCG8 (ATP-binding cassette transporter subfamily G member 8), y una disminución de la excreción de colesterol endógeno en el hígado.⁴⁹

García-Souza y colaboradores⁵⁰ encontraron que los adipocitos de rata sometidos a restricción proteica e inducidos posteriormente con insulina presentan una reducción en la fosforilación de IRS (insulin receptor substrate 1)-1 y un incremento en la fosforilación de IRS-2 (insulin receptor substrate 2), Akt y mTOR, en comparación con los controles. La captación de glucosa basal es mayor en los adipocitos sometidos a restricción de aminoácidos debido a un incremento en la concentración del transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT4 en la membrana plasmática de éstos.

Por su parte, Guan y colaboradores⁵¹ encontraron que las ratas adultas cuyas madres son alimentadas con restricción proteica (8%) durante la gestación y la lactancia tienen un mayor contenido de tejido adiposo visceral en comparación con las ratas control, debido principalmente a un proceso de hiperplasia del tejido adiposo.

4. JUSTIFICACIÓN

Los periodos de gestación y de lactancia son estados fisiológicos en donde existen una serie de cambios en el metabolismo de glucosa, aminoácidos y lípidos, de acuerdo con las necesidades particulares que se presenten por parte de la madre y de las crías a lo largo de estos periodos. Particularmente el organismo de la madre enfoca su atención en el abastecimiento de nutrimentos hacia dos tejidos que cobran especial importancia: la placenta para el desarrollo del feto, y la glándula mamaria que será la encargada de llevar la carga metabólica después del parto.

Se sabe que a lo largo de la gestación el hígado incrementa su actividad para mantener la concentración de glucosa y lípidos circulantes. El tejido adiposo se encarga de almacenar reservas energéticas favoreciendo la lipogénesis en la primera mitad del embarazo, y la lipólisis aumenta en la segunda mitad de este periodo. La glándula mamaria lleva a cabo un proceso muy activo de proliferación celular y desarrollo alveolar como preparación para el periodo de lactancia. Adicionalmente se conoce que durante la lactancia ocurre un ajuste metabólico en donde la glándula mamaria tiene prioridad dándose la movilización de nutrimentos de otros tejidos hacia el tejido mamario e incrementándose la expresión de transportadores, y enzimas encargadas de la síntesis de hidratos de carbono, lípidos y proteínas que conformarán la leche materna.

Existen diversos estudios sobre el metabolismo de lípidos en tejido adiposo, hígado y glándula mamaria durante la gestación y la lactancia. También se han llevado a cabo estudios que reportan cambios metabólicos en las crías de madres alimentadas bajo una restricción proteica durante estos periodos fisiológicos. Sin embargo no se ha evaluado el metabolismo de la madre a lo largo de la gestación y la lactancia y el efecto que pueda causar diferentes concentraciones de proteína en la dieta en diversos indicadores del metabolismo de glucosa, aminoácidos y lípidos. Es por eso que el presente proyecto pretende realizar una integración del metabolismo de la madre en tres órganos que presentan gran actividad durante la gestación y la lactancia: el hígado, el tejido adiposo y de manera especial, la glándula mamaria cuando se consume una dieta deficiente de proteína, o una suficiente en proteína, o una con un exceso de proteína requerida.

5. HIPÓTESIS

La expresión de genes y proteínas involucrados en el metabolismo de glucosa, aminoácidos y de lípidos se modificará dependiendo de la concentración de proteína en la dieta durante los periodos de gestación y de lactancia en hígado, tejido adiposo y glándula mamaria. Por lo que una dieta baja en proteína activará la expresión de genes lipogénicos y glucolíticos, mientras que una dieta alta en proteína, la cual provee aminoácidos por arriba del requerimiento, activará a genes involucrados en el transporte de aminoácidos, así como de la gluconeogénesis hepática.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General:

- Determinar la expresión de genes y proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos, aminoácidos y glucosa en hígado, tejido adiposo y glándula mamaria de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante los periodos de gestación y lactancia.

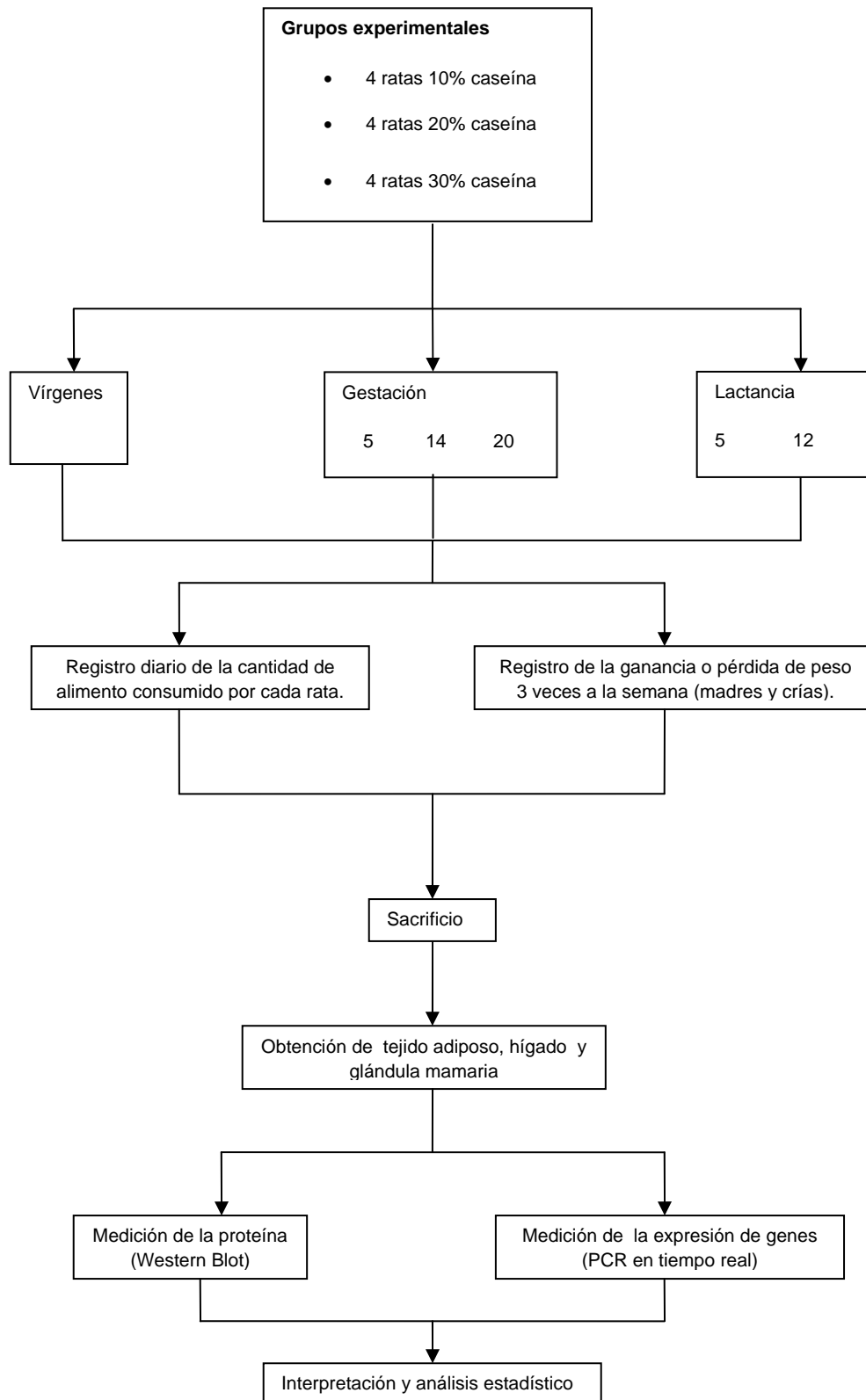
6.2 Objetivos Específicos:

- Determinar el efecto del consumo de dietas que contengan 10, 20 y 30% de proteína dietaria sobre la ganancia o pérdida de peso de la madre durante la gestación y la lactancia.
- Determinar el efecto del consumo de diferentes concentraciones de proteína (10, 20 y 30%) por parte de la madre, sobre el peso de las crías.
- Analizar los parámetros bioquímicos de glucosa, insulina y leptina de ratas alimentadas con 10, 20 y 30% de proteína, en estado virgen, durante la gestación los días 5, 14 y 20; y durante la lactancia los días 5 y 12.

- Cuantificar la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo, hígado y glándula mamaria de ratas alimentadas con 10, 20 y 30% de proteína, por análisis de PCR en tiempo real, en estado virgen; durante la gestación los días 5, 14 y 20; y durante la lactancia los días 5 y 12.
- Cuantificar la expresión de genes involucrados en el metabolismo de aminoácidos en el tejido adiposo, hígado y glándula mamaria de ratas alimentadas con 10, 20 y 30% de proteína, por análisis de PCR en tiempo real, en estado virgen, durante la gestación los días 5, 14 y 20; y durante la lactancia los días 5 y 12.
- Cuantificar la expresión de genes involucrados en el metabolismo de hidratos de carbono en el tejido adiposo, hígado y glándula mamaria de ratas alimentadas con 10, 20 y 30% de proteína, por análisis de PCR en tiempo real, en estado virgen, durante la gestación los días 5, 14 y 20; y durante la lactancia los días 5 y 12.
- Cuantificar la concentración de las proteínas SNAT2 y FAS por medio de la técnica de Western Blot, en hígado, tejido adiposo y glándula mamaria de ratas alimentadas con 10, 20 y 30% de proteína en estado virgen; durante la gestación los días 5, 14 y 20; y durante la lactancia los días 5 y 12.
- Analizar la morfología del hígado mediante la tinción del corte histológico con H/E de ratas alimentadas con 10, 20 y 30% de proteína durante la lactancia día 5.

7. METODOLOGÍA

7.1 Diagrama de flujo



Población de estudio

Se utilizaron 72 ratas hembras de la cepa Wistar de 200 g de peso provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), 60 fueron apareadas y se les realizó frotis vaginal para detectar presencia de espermatozoides; 12 fueron vírgenes (grupo control).

Tipo de estudio

Se trató de un estudio experimental con mediciones en los días 5, 14 y 20 de gestación y 5 y 12 de lactancia.

Tamaño de la muestra

Grupos experimentales

Cada grupo estuvo compuesto por:

- 4 ratas con una dieta del 10% caseína
- 4 ratas con una dieta del 20% caseína
- 4 ratas con una dieta del 30% caseína

Los grupos fueron los siguientes:

- Gestación: días 5, 14 y 20
- Lactancia: días 5 y 12

Variables

Variables Independientes

- Dieta con 10% de proteína (ratas gestantes y lactantes).
- Dieta con 20% de proteína (ratas gestantes y lactantes).
- Dieta con 30% de proteína (ratas gestantes y lactantes).

Variables dependientes

- Concentraciones séricas de glucosa, insulina y leptina.
- Expresión de los genes que codifican para las proteínas SREBP1c, FAS, ACC, HSL, CPT1, PEPCK, PIRUVATO CINASA, GLUT4, mTOR1, SNAT2, SDH y GHD.
- Concentración de las proteínas SNAT2 y FAS.

Composición de las dietas experimentales

Las dietas que se dieron a las ratas en el presente estudio se presentan en la Tabla 2. Estas dietas cumplen con los requerimientos de las ratas durante la gestación y la lactancia según las recomendaciones del AIN-93G (American Institute of Nutrition).⁵²

Tabla 2. Composición de las dietas experimentales

Ingredientes	g/kg dieta (20%)	g/kg dieta (10%)	g/kg dieta (30%)
Almidón	397,5	460,0	322,10
Caseína	200,00	100,00	300,00
Dextrina	132,00	152,5	107,3
Sacarosa	100,00	115,3	100,00
Aceite de soya	70,00	70,00	70,00
Mezcla de Minerales	35,00	35,00	35,00
Mezcla de Vitaminas	10,00	10,00	10,00
L-cistina	3,00	3,00	3,00
Colina	2,500	2,500	2,500
Celulosa	50,00	50,00	50,00
Total	1000	1000	1000

7.2 Procedimientos y métodos de recolección de datos

Las ratas se mantuvieron en jaulas individuales de acero inoxidable, con ciclos de luz/obscuridad de 12 h, con temperatura y humedad controladas. A todos los grupos se les inició al mismo tiempo el tipo de dieta determinada una vez que se detectó la presencia de espermatozoides en frotis vaginal. Todas las técnicas que se mencionarán a continuación se realizaron conforme a los procedimientos establecidos por el Departamento de Fisiología de la Nutrición del INCMNSZ.

Técnica para obtención de tejidos

Después de seguir la dieta correspondiente de acuerdo a su grupo, las ratas se anestesiaron en una cámara con CO₂ para su posterior decapitación. El suero de cada rata se recolectó en tubos de ensaye previamente etiquetados. El tejido adiposo, el hígado y la glándula mamaria se extrajeron y enjuagaron por separado en solución salina al 0.9%, enfriada previamente a 4°C, para su inmediata congelación en nitrógeno líquido. El tejido extraído se almacenó a -70°C hasta el momento de su utilización.

Métodos para medir la expresión de genes

Aislamiento de ARN total por el método de tiocianato de guanidina

El ARN total del tejido adiposo, el hígado, el músculo y la glándula mamaria se aisló por el método de tiocianato de guanidina y cloruro de cesio, un desnaturizante de proteína y una sal para la separación de los ácidos nucleicos (ver ANEXO I).

Cuantificación de ARN

El ARN se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm por espectrofotometría, se utilizó un nano-espectrofotómetro de Thermo Scientific que calcula los microgramos del RNA por microlitro de muestra (ver ANEXO II).

Electroforesis de ARN

Los resultados de la purificación del ARN se evaluaron por la separación electroforética de los productos purificados. La separación electroforética está basada en el peso molecular del ARN por lo que es necesario trabajar en condiciones desnaturizantes. Este método muestra la integridad del ARN obtenido antes de seguir con el proceso pues en el caso de estar degradado no se puede seguir utilizando (ver ANEXO III).

RT PCR

Una vez verificada la integridad del ARN se llevó a cabo la conversión de las moléculas de ARN a sus respectivas secuencias de ADN complementario (cDNA) utilizando RT PCR.

RT PCR es la tecnología por medio de la cual las moléculas son convertidas en sus secuencias de DNA complementario (cDNA) por alguna de las DNA polimerasas dependientes de RNA también conocidas como transcriptasas reversas, que son las enzimas requeridas para la síntesis de cDNA⁵³ (ver ANEXO IV).

Análisis de PCR- Tiempo Real

PCR, por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction, es la amplificación de secuencias de DNA genómico o complementario mediado por iniciadores.⁵⁴ El PCR se divide en ciclos que se repiten sucesivamente (45 veces) para obtener la amplificación exponencial de los genes blanco. Esta técnica se emplea para el análisis de ARN mensajero con el fin de estudiar la expresión de un gen específico. Se realizó un análisis de expresión relativa tomando como gen estructural a la actina (ver ANEXO V).

Métodos para medición de la proteínas

Extracción de proteína de tejido adiposo, hígado, músculo y glándula mamaria

Se agregaron 2 mL de Buffer RIPA directamente al tejido. Se homogenizó la muestra con el Politron cuidando que no quedara líquido. Se centrifugó a 1090 g en la centrífuga de modelo JA-20 durante 5 minutos a 2°C. El sobrenadante se guardó en el congelador (ver ANEXO VI).

Cuantificación de Proteína

La preparación de las muestras se hizo 1 a 20 para las muestras de hígado y 1 a 10 para las muestras de tejido adiposo y glándula mamaria utilizando como diluyente agua desionizada. De cada una de estas diluciones se toman 10 µL y se colocan en tubos eppendorf diferentes y rotulados. A cada uno de estos tubos se les agregó 50 µL de Reactivo A (BioRad Protein Assay), se mezclaron y posteriormente se les agregó 400 µL de Reactivo B (BioRad Protein Assay), se mezclaron y se colocaron 15 minutos en oscuridad para lograr que las muestras reaccionen. Una vez que las muestras reaccionaron se colocaron en celdas para lectura en espectrofotómetro. Todo se realizó por duplicado para evitar errores y confirmar que las cuantificaciones sean correctas. Se sacaron promedios de los duplicados para obtener la cuantificación de cada muestra.

Western Blot

El Western Blot es un método utilizado para la separación de proteínas de un tejido previamente homogeneizado,⁵⁵ está formado por tres pasos: preparación de geles, preparación de muestras, transferencia y revelado (ver ANEXO VII).

Fijación del hígado para histología

La fijación permite la preservación de los tejidos para su tratamiento subsecuente. Un fragmento del hígado extraído se colocó en cassettes y posteriormente se agregó a una solución de formalina la cual preserva las proteínas celulares.

Deshidratación, esclarecimiento e infiltración de la glándula mamaria

Los tejidos se sometieron a tres procesos para su posterior inclusión. Para la deshidratación se utilizaron alcoholes, el xileno se utilizó para la limpieza del tejido y la parafina para su infiltración (ver ANEXO VIII).

Inclusión

La inclusión es el proceso por el cual se rodea el tejido con parafina para poder realizar posteriormente los cortes del tejido. La parafina es una mezcla de hidrocarburos derivados del petróleo disponible con diferentes puntos de fusión en donde el recomendable para este proceso es de 56°C. Algunos polímeros plásticos son agregados a la parafina para incrementar la consistencia y dar elasticidad. El sulfóxido de dimetilo (DMSO) es un compuesto higroscópico que se agrega a la mezcla de parafina para promover la infiltración.⁵⁶ La mezcla anterior se agregó a los tejidos y se colocó en una superficie fría para favorecer su solidificación. Posteriormente los bloques de tejido en parafina se cortaron en un micrótopo en secciones de 3 µm de espesor, se agregaron en agua caliente y posteriormente se colocaron en portaobjetos para su utilización en microscopia. Cada portaobjetos con el corte de tejido se denomina laminilla.

Tinción de los cortes de hígado por el método Hematoxilina-Eosina (H-E)

Las laminillas se desparafinaron en un horno a 70°C por 10 minutos. Posteriormente los cortes de tejido se hidrataron pasándolos por un tren de soluciones que van de xilol a alcohol (xilol 100%, xilol 90% alcohol 10%, xilol 60% alcohol 40%, xilol 50% alcohol 50%, alcohol absoluto y alcohol 96%). Después de la hidratación, las laminillas se colocaron en un recipiente con hematoxilina por 7 minutos, se lavaron a chorro de agua y se sumergieron en una solución de alcohol ácido para quitar el excedente de hematoxilina. Posteriormente se lavaron nuevamente a chorro de agua y se pasaron a una solución de carbonato de litio para contrastar y permitir que el colorante vire a una tonalidad azul. Las laminillas se estabilizaron en agua para ser pasadas nuevamente por un tren de soluciones pero esta vez de alcohol a xileno para deshidratarlas. En este tren se incluyó la tinción de los cortes con eosina (alcohol 96%, eosina, alcohol absoluto, alcohol 50% xilol 50%, xilol 60% alcohol 40%, xilol 90% alcohol 10% y xilol 100%). Finalmente las laminillas se montaron quitando el excedente de xilol con una gasa (sin tocar el tejido). Se les agregó una gota de resina en un costado y se les colocó el cubreobjetos presionando ambos vidrios con el dedo para evitar la formación de burbujas.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las variables, se utilizó la prueba de ANOVA de una vía para determinar si existía una diferencia estadística entre los diferentes días de estudio durante la gestación y la lactancia. De cada punto de medición se calculó el promedio y la desviación estándar de un tamaño de muestra (n) de 4 por grupo experimental. Posteriormente, se utilizó la prueba de los cuadrados mínimos de Fischer para determinar entre qué grupos existía una diferencia significativa. Se consideró que una $p < 0.05$ o menor indica una diferencia significativa entre los grupos.

Aspectos éticos

El protocolo del presente estudio se aprobó por el Comité de Ética para uso de animales experimentales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

8. RESULTADOS

8.1 Consumo de alimento

Efecto de la concentración de proteína en la dieta en el consumo de alimento de la madre durante la gestación y la lactancia

El consumo de alimento de las ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína se mantuvo muy similar durante la gestación. En el periodo de lactancia, el consumo de alimento se incrementó de manera considerable en los tres grupos con diferentes concentraciones de proteína. El grupo del 10% de proteína tuvo un incremento mayor en el consumo de alimento durante la lactancia comparado con los grupos que consumieron 20 y 30% de proteína en la dieta (Figura 6).

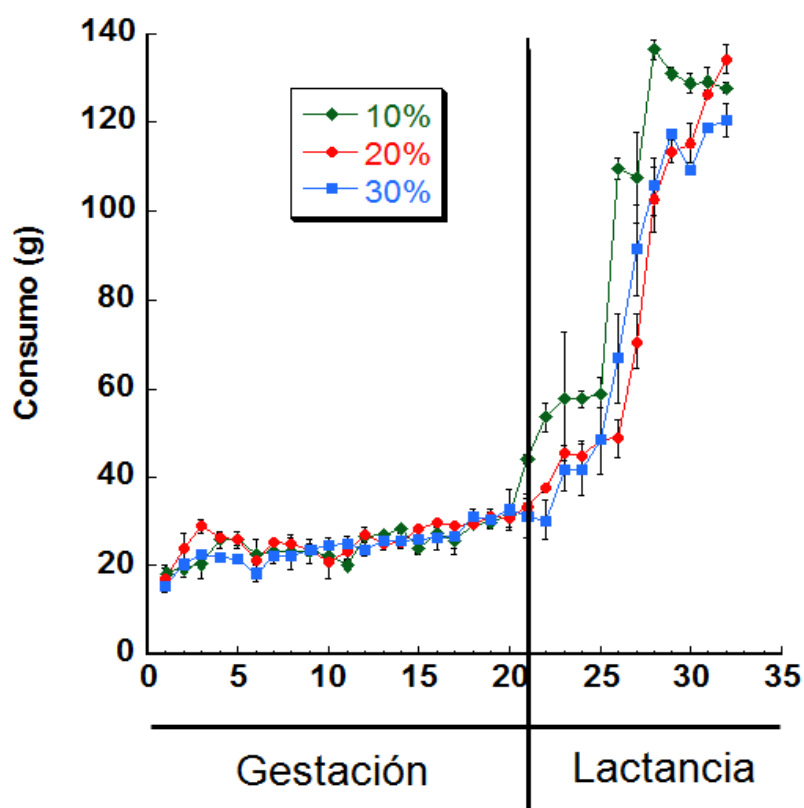


Figura 6. Efecto de la proteína de la dieta en el consumo de alimento de la madre durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$, $n=4$ animales por grupo experimental.

A pesar de este incremento en el consumo de alimento, las ratas que consumieron 10% de proteína en la dieta tuvieron el menor consumo de proteína; esto se observa en la Figura 7 en donde se presenta el consumo total de proteína en la dieta de cada uno de los grupos experimentales durante los periodos de gestación y de lactancia.

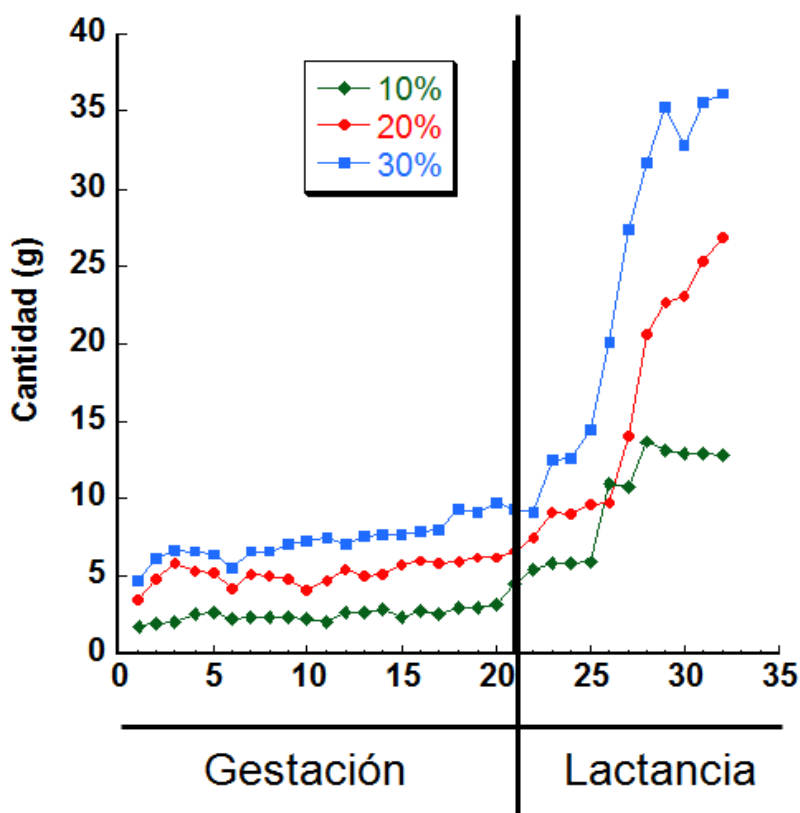


Figura 7. Consumo total de proteína en ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$, $n=4$ animales por grupo experimental.

8.2 Ganancia de peso

Efecto de la concentración de proteína de la dieta en el peso de la madre y las crías durante la gestación y la lactancia.

El peso de las ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta se incrementó de manera similar durante la gestación, presentándose una ligera diferencia en las ratas alimentadas con 10% de proteína, las cuales alcanzaron un peso menor al término

de este periodo. Al momento del parto se presentó una disminución significativa en el peso de la madre alimentadas con esta dieta debido en parte al bajo peso de sus crías. Durante la lactancia se observa una recuperación en el peso de la madre la cual es más pronta en las ratas alimentadas con 30% de proteína en la dieta en comparación con las ratas alimentadas con 10 y 20% de proteína en la dieta (Figura 8).

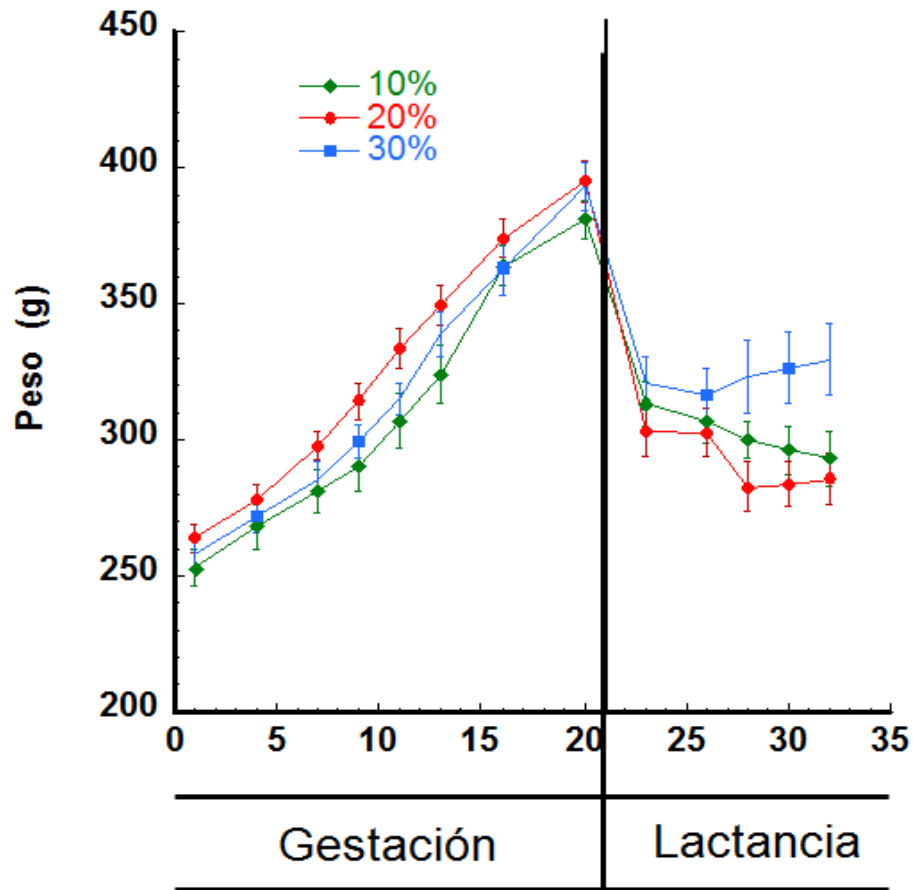


Figura 8. Efecto de la concentración de proteína de la dieta en el peso de la madre durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$, $n=4$ animales por grupo experimental.

En las crías también se encontró una diferencia notable en la ganancia de peso. Las crías de las madres que fueron alimentadas con 20 y 30% de proteína en la dieta presentaron un incremento de peso similar, mientras que las ratas de las madres alimentadas con 10% de proteína presentaron una menor ganancia de peso y un menor peso al nacer (Figura 9).

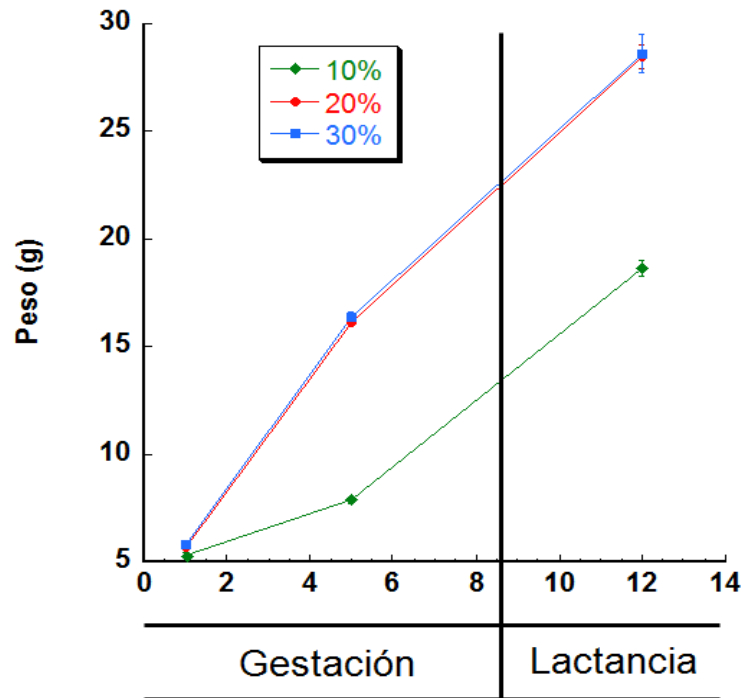


Figura 9. Efecto de la concentración de proteína de la dieta de la madre en el peso de las crías. Los resultados son $X \pm SD$, $n=4$ animales por grupo experimental.

8.3 Parámetros bioquímicos

Efecto de la concentración de proteína de la dieta en la concentración de glucosa, insulina y leptina de ratas vírgenes, gestantes y lactantes.

La concentración de glucosa en suero presentó algunos cambios. Durante el periodo de gestación disminuyó en los grupos alimentados con 10 y 20% de proteína, mientras que se observó un incremento en los grupos de ratas alimentadas con 30% de proteína en el día 5 de gestación ($p=0.006$). Durante la lactancia hubo un incremento en los tres grupos experimentales principalmente en el grupo alimentado con 30% de proteína en la dieta en el día 12 de lactancia ($p=0.03$). Esto se puede observar en la figura 10.

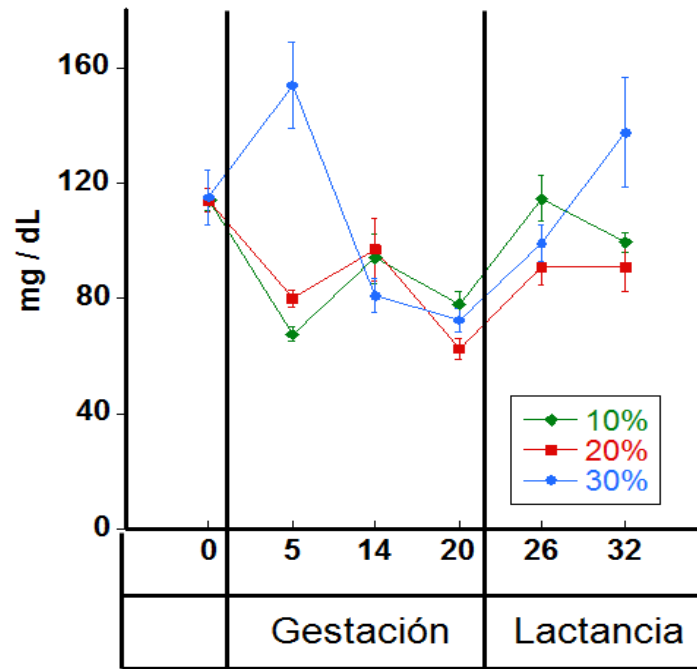


Figura 10. Efecto de la concentración de proteína de la dieta de la madre en la concentración de glucosa en suero. Los resultados son $X \pm SD$, $n=4$ animales por grupo experimental.

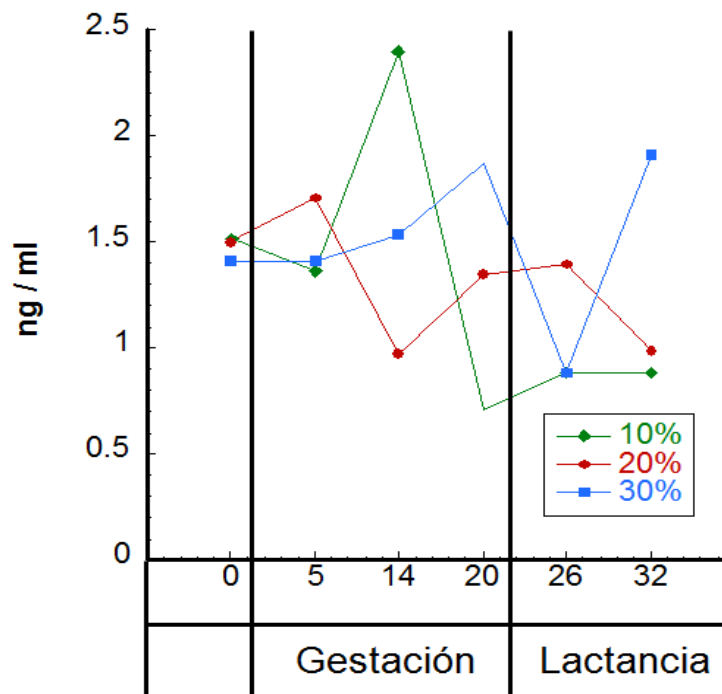


Figura 11. Efecto de la concentración de proteína de la dieta de la madre en la concentración de insulina en suero. Los resultados son $X \pm SD$, $n=4$ animales por grupo experimental.

En la Figura 11 se observa que la concentración de insulina en suero se incrementó durante la mitad del embarazo en ratas alimentadas con 10 y 20% de proteína, principalmente con 10% de proteína, y este incremento fue seguido de una disminución en la concentración de esta hormona hacia finales del embarazo para luego presentar un nuevo aumento en los primeros días de lactancia. En las ratas alimentadas con 30% de proteína en la dieta se observó un patrón diferente en donde se presentó un incremento en la concentración de insulina principalmente durante el periodo de lactancia.

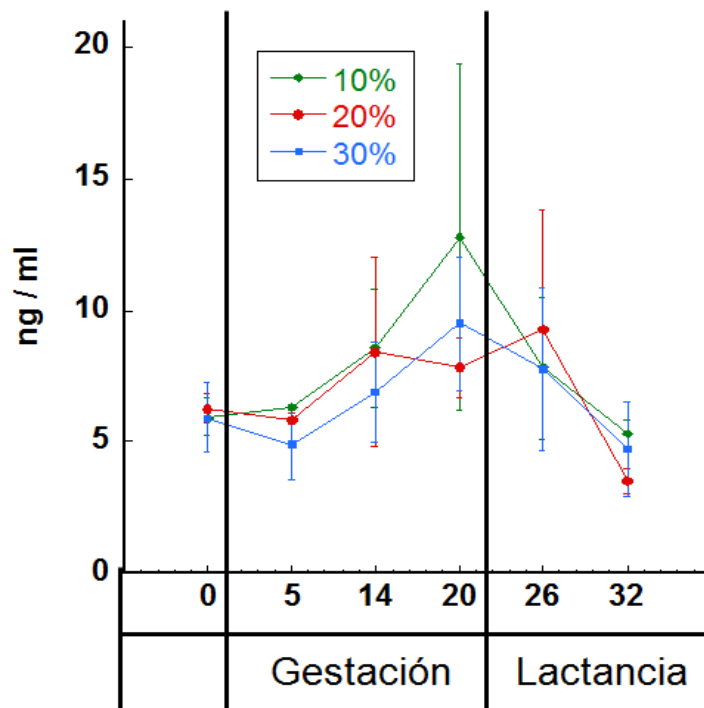


Figura 12. Efecto de la concentración de proteína de la dieta de la madre en la concentración de leptina en suero. Los resultados son $X \pm SD$, $n=4$ animales por grupo experimental.

Por su parte, la concentración de leptina se incrementó a lo largo del periodo de gestación en todos los grupos experimentales encontrándose el mayor aumento en las ratas alimentadas con 10% de proteína en el día 20 de gestación. En el periodo de lactancia la concentración de leptina en suero disminuyó considerablemente en los tres grupos experimentales encontrándose el mayor decremento en las ratas alimentadas con 20% de proteína en el día 12 de lactancia. Estos cambios no fueron significativos debido a la variabilidad biológica.

8.4 Hígado

Efecto de la concentración de proteína de la dieta en la expresión de genes del metabolismo de lípidos en el hígado

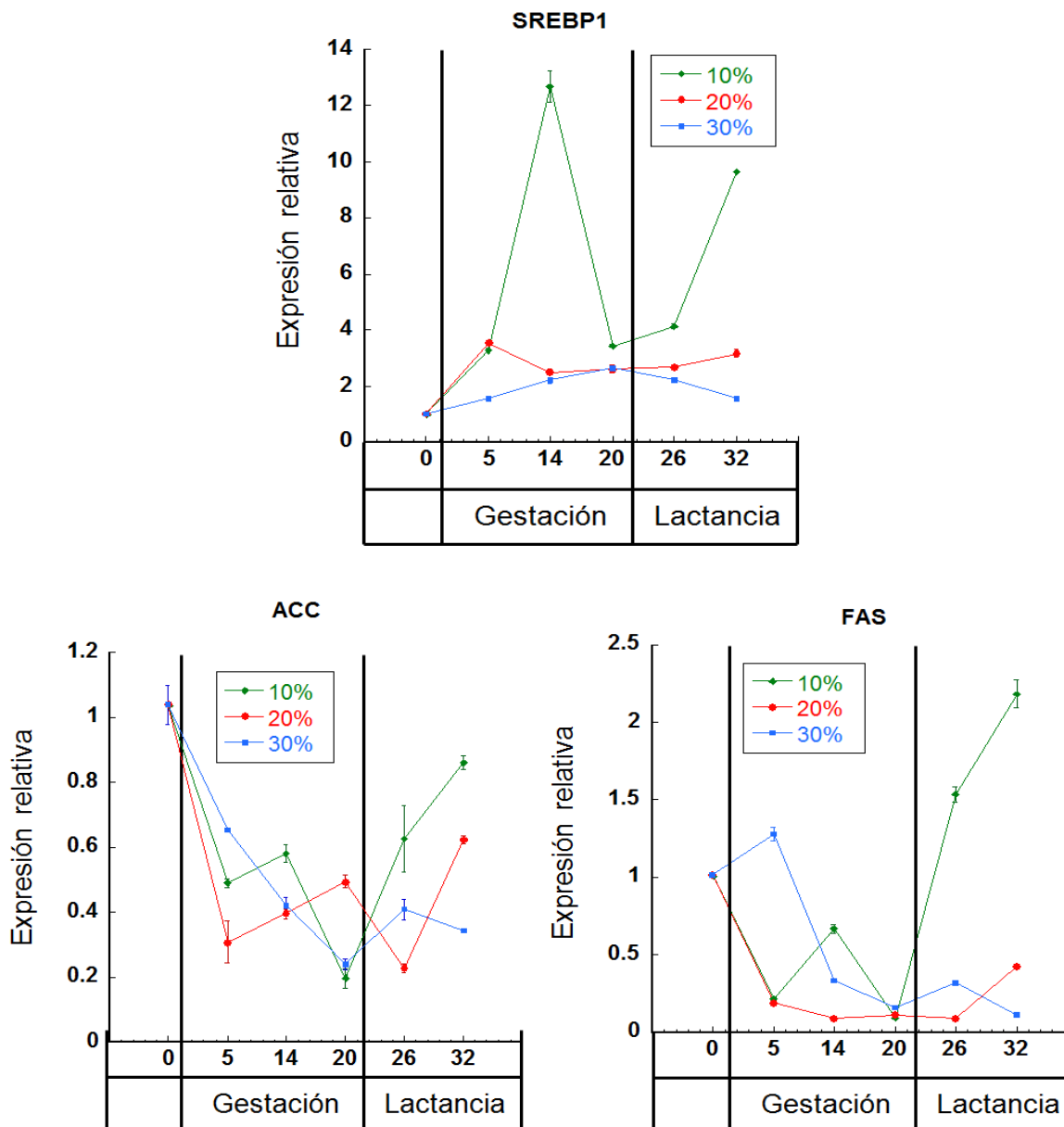


Figura 13. Expresión del RNAm de genes lipogénicos (SREBP1, ACC y FAS) en hígado de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

En el hígado de ratas alimentadas con 10% de proteínas la expresión del factor de transcripción SREBP1, que regula la expresión de enzimas lipogénicas como ACC y FAS, se mantuvo siempre elevado en comparación con los otros grupos experimentales observándose un nuevo incremento de hasta 10 veces más ($p < 0.001$) en la expresión de SREBP1 durante la lactancia especialmente en el pico de mayor producción láctea (día 12). La expresión de ACC (Acetil CoA Carboxilasa), enzima encargada de la transformación de Acetil CoA a malonil CoA para iniciar la lipogénesis, presentó patrones diversos, sobre todo en estado virgen dependiendo del porcentaje de proteína de la dieta ($p < 0.0001$), durante la lactancia. La expresión del gen de ACC se aumentó principalmente en los grupos de ratas alimentadas con 10 y 20% de proteína.

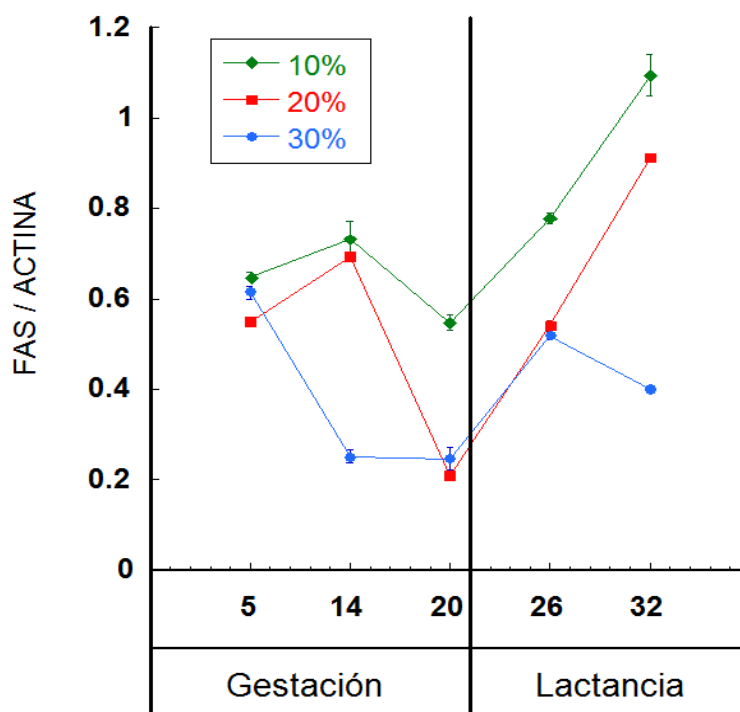
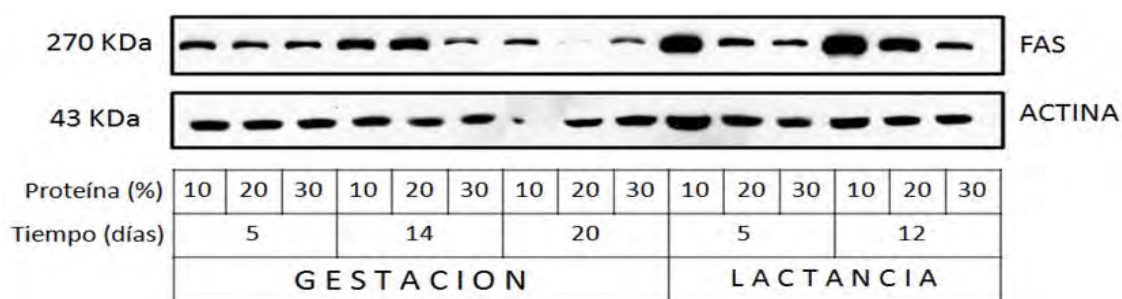


Figura 14. Concentración de la proteína FAS en hígado de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

La expresión de FAS (sintasa de ácidos grasos) en el hígado presentó una tendencia a la baja en el periodo de gestación y se mantuvo así hasta el día 12 de lactancia (día 32) en las ratas alimentadas con un porcentaje normal de proteína en la dieta (20%). En el grupo de 30% se incrementó su expresión en los primeros 5 días de gestación y posteriormente disminuyó conforme transcurrió el resto de la gestación y la lactancia. En contraparte, en ratas alimentadas con 10% de proteína, la expresión de FAS disminuyó en los primeros 5 días de gestación, presentó un incremento moderado en el día 14 de gestación y volvió a disminuir al término de este periodo. Durante la lactancia la expresión de esta enzima se incrementó significativamente (2.2 veces en el día 12 de lactancia) en el grupo de restricción proteica.

La concentración esta proteína (FAS) analizada por Western Blot, presentó una tendencia similar a su patrón de expresión determinado por PCR en tiempo real. Aumentó significativamente en el día 14 de gestación de las ratas alimentadas con 10 y 20% de proteína en comparación con el grupo de 30% de proteína dietaria y disminuyó en el día 20 de gestación sobre todo en las ratas del grupo de 20% de proteína. En el periodo de lactancia se observó un incremento significativo en las ratas alimentadas con 10% de proteína en la dieta tanto en el día 5 (día 26) como en el día 12 (día 32) de lactancia ($p < 0.0001$) (Figura 14).

Este incremento en la expresión de las enzimas lipogénicas encontrado en el periodo de lactancia de ratas alimentadas con 10% de proteína en la dieta se vio reflejado en un acumulo de vesículas de grasa como se muestra en la figura 15 en los cortes histológicos de hígados de ratas alimentadas con 10, 20 y 30% de proteína en la dieta, teñidos con hematoxilina y eosina, en el día 5 de lactancia o día 26 del estudio. En estas imágenes fue evidente el depósito de lípidos en las ratas con deficiencia proteica (10% de proteína). Por su parte, las ratas alimentadas con 20 y 30% de proteína presentaron algunas vesículas de grasa dispersas en el tejido; sin embargo la morfología del hígado hizo evidente un tejido sano.

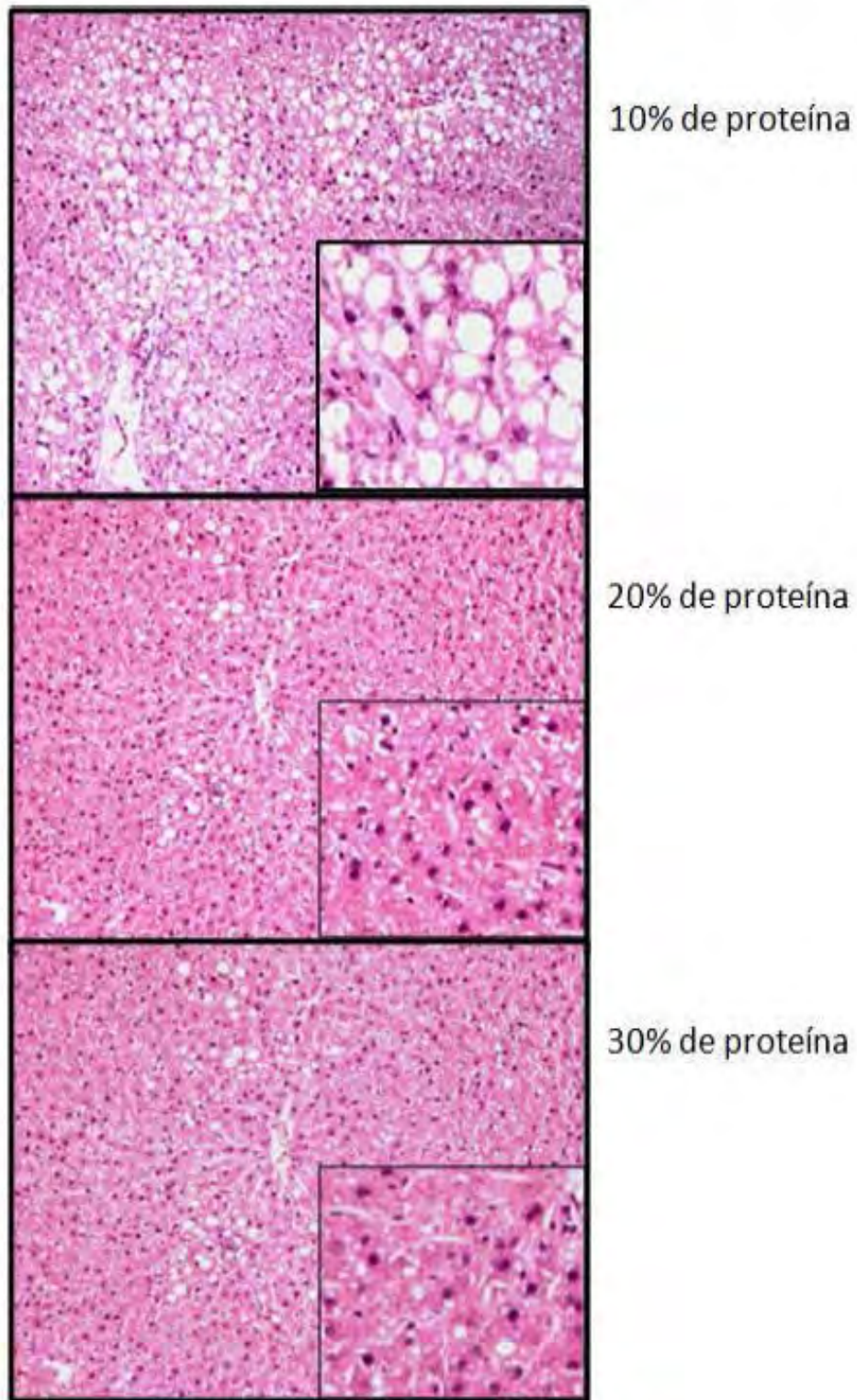


Figura 15. Morfología del hígado. Tinción de corte histológico H/E en hígado de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta en el día 5 de lactancia (día 26 del estudio).

Efecto de la concentración de proteína de la dieta en la expresión de genes del metabolismo de hidratos de carbono en hígado de ratas vírgenes, gestantes y lactantes.

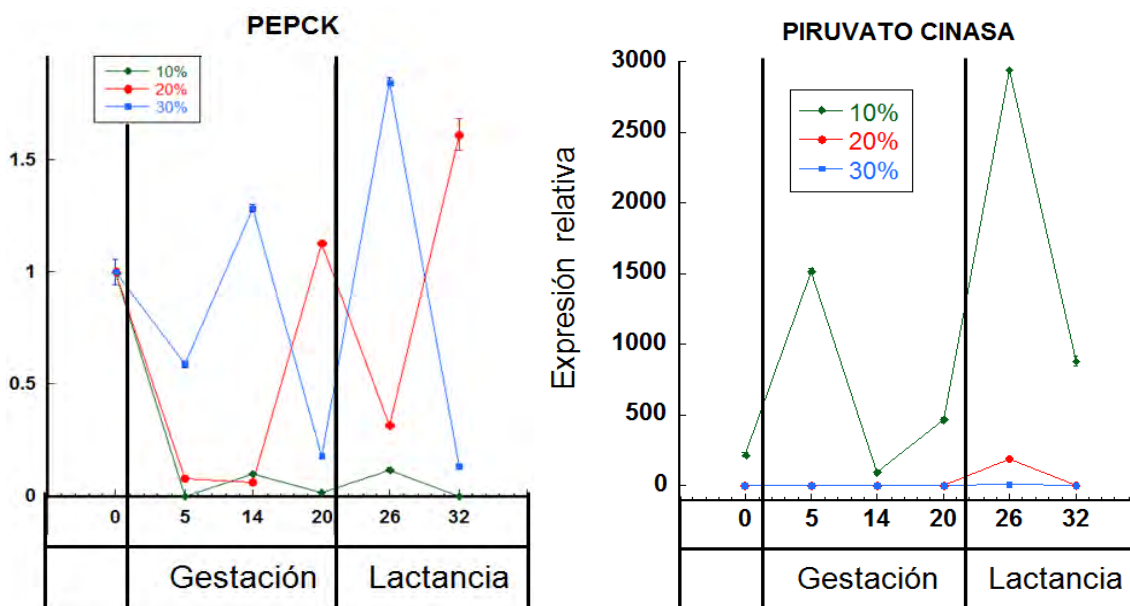


Figura 16. Expresión del RNAm de PEPCK y piruvato cinasa en hígado de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

Las enzimas reguladoras de la gluconeogénesis, PEPCK (Fosfoenolpiruvato carboxicinas), y de la glucólisis, la piruvato cinasa (PK), también presentan cambios en su expresión en el hígado de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta. La PEPCK tuvo patrones de expresión variables a lo largo de la gestación y la lactancia en las ratas alimentadas con 20 y 30%. En el grupo del 30% presentó dos incrementos en su expresión, uno a mediados de la gestación (día 14) y el otro en los primeros días de lactancia, mientras que en el grupo del 20% el incremento se dio a finales de la gestación (día 20) y en el día 12 de lactancia. Por otra parte, la expresión de esta enzima se inhibió en ratas alimentadas con 10% de proteína en la dieta ($p < 0.0001$) debido a la falta de aminoácidos provenientes de la dieta de estos animales, los cuales sirven como fuente de carbono para la vía de gluconeogénesis. La piruvato cinasa por el contrario presentó valores de expresión muy bajos en las ratas alimentadas con 20 y 30% de proteína y aumentó significativamente a principios de la gestación y durante la lactancia de las ratas alimentadas con 10% de proteína en la dieta (Figura 16) debido a un incremento en la concentración de glucosa proveniente de la dieta en este grupo experimental en donde la proporción de hidratos de carbono compensa la restricción proteica.

Por otra parte, el factor de transcripción activado por hidratos de carbono ChREBP (carbohydrate response element binding protein) también presentó modificaciones en su expresión en el hígado. Incremento su expresión en el día 20 de gestación en el grupo de 20% de proteína (4 veces); sin embargo en los grupos de 10 y 30% este incremento (3-3.5 veces) se observó en el día 12 de lactancia (Figura 17). Al parecer este factor de transcripción no sigue un patrón de expresión definido y la variación se da si no se consume la concentración adecuada de proteína (20%).

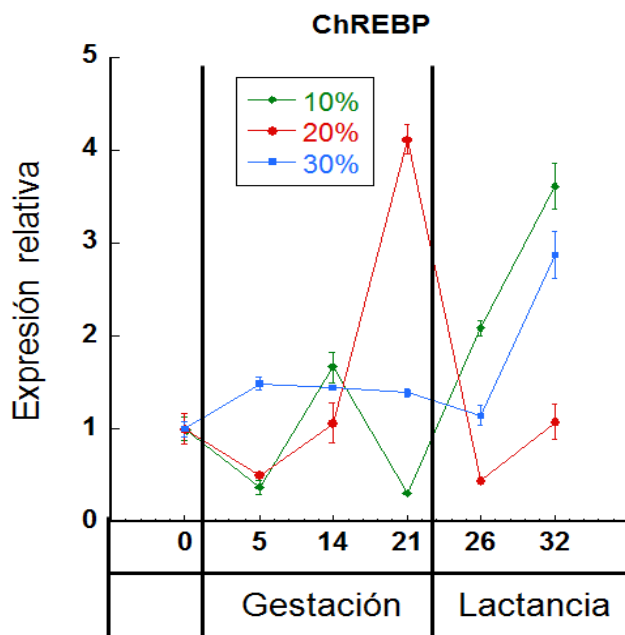


Figura 17. Expresión del RNAm de ChREBP en tejido adiposo, hígado y glándula mamaria de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

Efecto de la concentración de proteína de la dieta en la expresión de genes y proteínas del metabolismo de aminoácidos en hígado de ratas vírgenes, gestantes y lactantes.

El transportador de aminoácidos SNAT2 no presentó variaciones significativas en su expresión en el grupo de ratas alimentadas con una concentración adecuada de proteína dietaria (20%) a lo largo de los periodos de gestación y lactancia. En el grupo experimental alimentado con 10% de proteína, hubo un incremento en el día 14 de gestación y sobre todo en el día 5 de lactancia. Mientras que en el grupo de 30% de proteína se observó el mayor aumento en la etapa temprana del embarazo correspondiente al día 5 de gestación y de manera menos pronunciada, en los primeros días de lactancia (día 26 del estudio) (Figura 18).

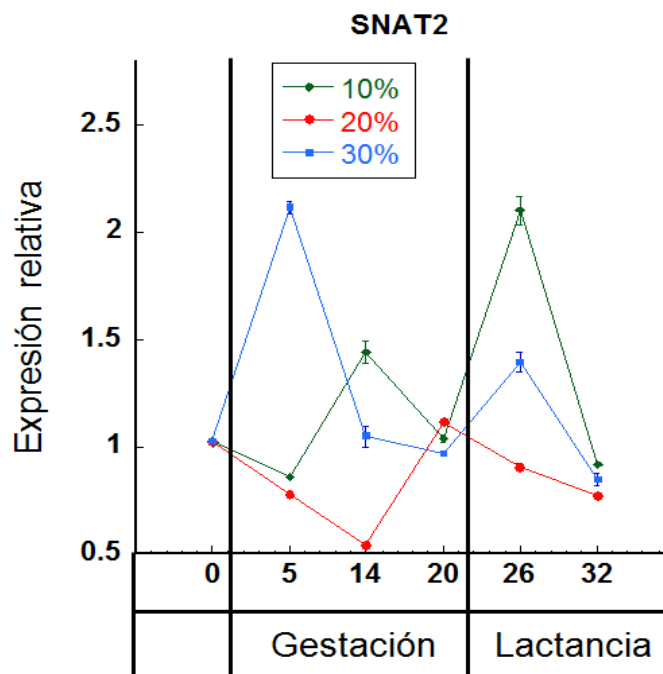


Figura 18. Expresión del RNAm de SNAT2 en hígado de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

Por su parte el análisis por Western Blot en este tejido demostró que la proteína SNAT2 disminuye a mediados de la gestación (día 14) en ratas alimentadas con 20 y 30% de proteína en la dieta. Posteriormente la concentración de esta proteína se incrementó conforme transcurren los días de estudio y este aumento es significativamente mayor en el grupo alimentado con exceso de proteína (30%) en los día 20 de gestación y 5 de lactancia (26 de estudio). Por otra parte, en el grupo con restricción proteica hubo un incremento en la concentración de este transportador en el día 14 de gestación, disminuyendo hacia finales de este periodo. Posteriormente se elevó nuevamente durante la lactancia aunque este incremento fue significativamente menor en el día 5 de lactancia o día 26 del estudio, al compararlo con los grupos alimentados con 20 y 30% de proteína dietaria (Figura 19).

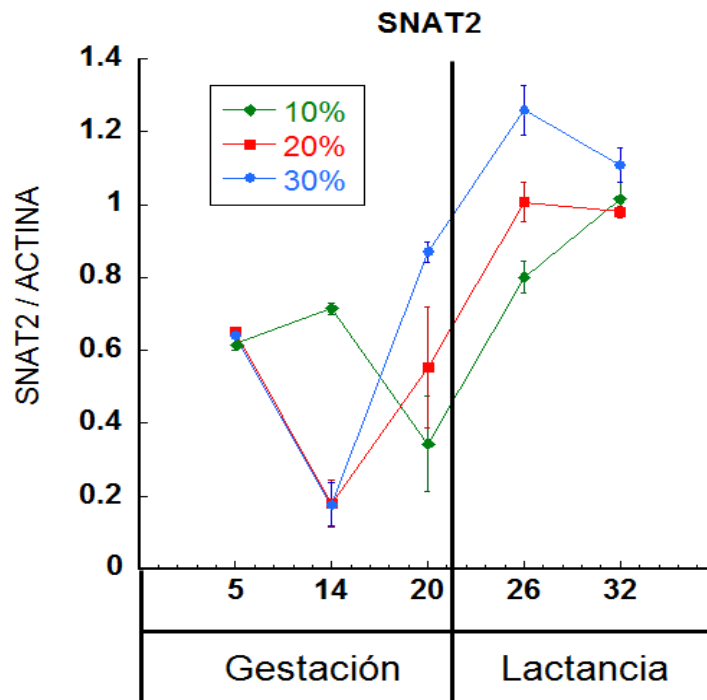


Figura 19. Concentración de la proteína SNAT2 en hígado de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

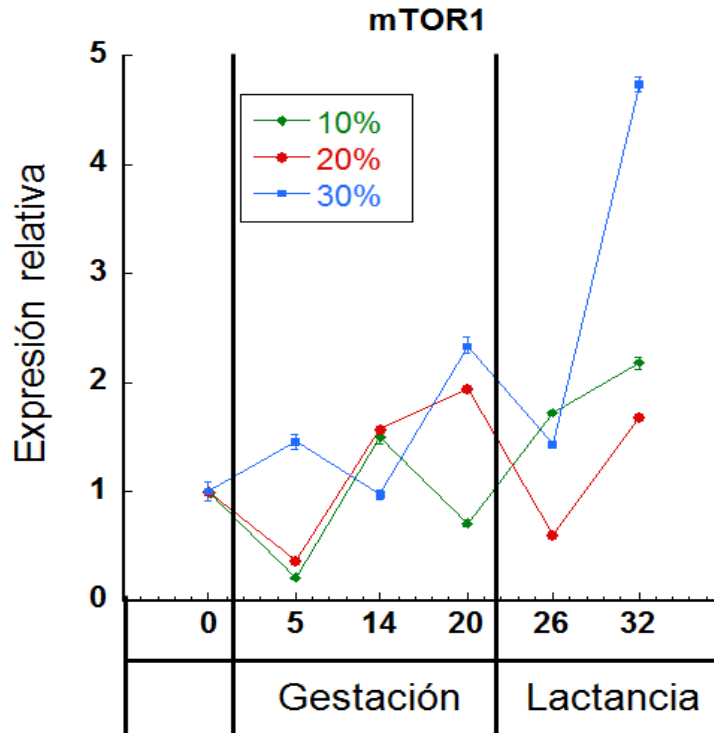


Figura 20. Expresión del RNAm de mTOR1 en hígado de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

La expresión de mTOR1 del grupo alimentado con porcentaje normal de proteína se incrementó en la segunda mitad de la gestación (días 14 y 20), disminuyendo en los primeros días de lactancia y volviendo a aumentar en el día 12 de lactancia. En el grupo de restricción proteica hubo un incremento en la expresión en el día 14 de gestación, disminuyendo a finales del embarazo y aumentando nuevamente durante la lactancia. Por su parte en el grupo alimentado con exceso de proteína la expresión de esta proteína se incrementó a finales de la gestación (día 20) y de manera más pronunciada (5 veces) en el día 12 de lactancia o día 32 del estudio en donde el incremento fue significativamente mayor comparado con los otros dos grupos experimentales ($p < 0.0001$) como se observa en la figura 20.

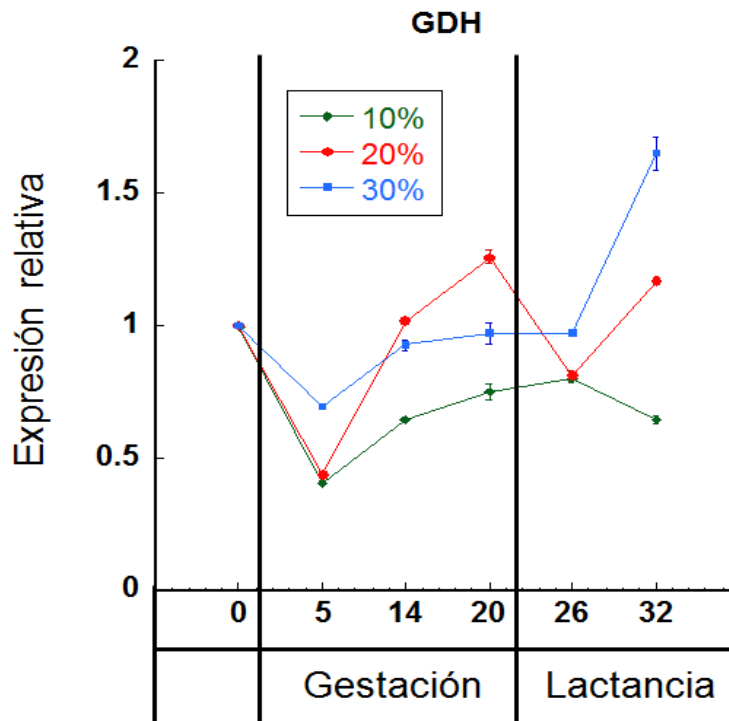


Figura 21. Expresión del RNAm de GDH en hígado de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

La expresión de la enzima GDH (Glutamato deshidrogenasa) encargada de la síntesis de urea debido a la degradación de aminoácidos (glutamato) se incrementó significativamente a finales de la gestación en el hígado de ratas alimentadas con 20% de proteína en la dieta en comparación con los otros grupos, y a mediados de la lactancia (día 32 de estudio). En las ratas alimentadas con dieta baja en proteína tuvieron una menor expresión de esta enzima en los días 14, 20 y 32 del estudio. Por su parte el grupo con exceso de proteína en la dieta mantuvo la expresión de esta enzima durante la gestación y presentó un aumento significativo (1.7 veces) en el día 12 de lactancia o día 32 del estudio en comparación con los otros dos grupos experimentales (Figura 21).

La enzima serina deshidratasa (SDH) encargada de la degradación de serina y utilizada como una enzima con un comportamiento típico de las demás enzimas involucradas en la degradación de aminoácidos en el hígado, se incrementó de manera significativa (20 veces) durante la gestación en ratas alimentadas con 30% de proteína en la dieta. Durante la lactancia disminuyó considerablemente la expresión de esta enzima en todos los grupos inclusive en el grupo alimentado con 30% de proteína en la dieta ($p < 0.0001$) (Figura 22).

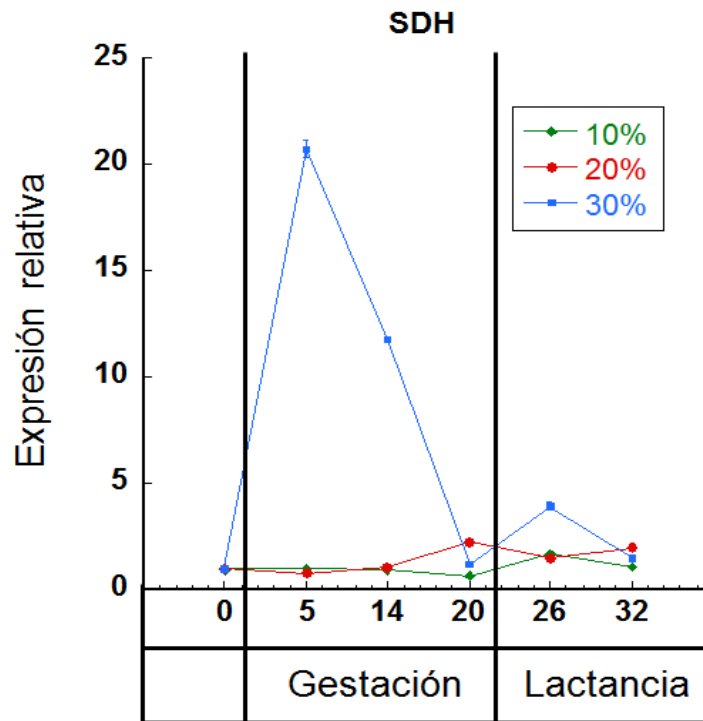


Figura 22. Expresión del RNAm de SDH en hígado de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

8.5 Tejido Adiposo

Efecto de la concentración de proteína de la dieta en la expresión de genes del metabolismo de lípidos en tejido adiposo de ratas vírgenes, gestantes y lactantes.

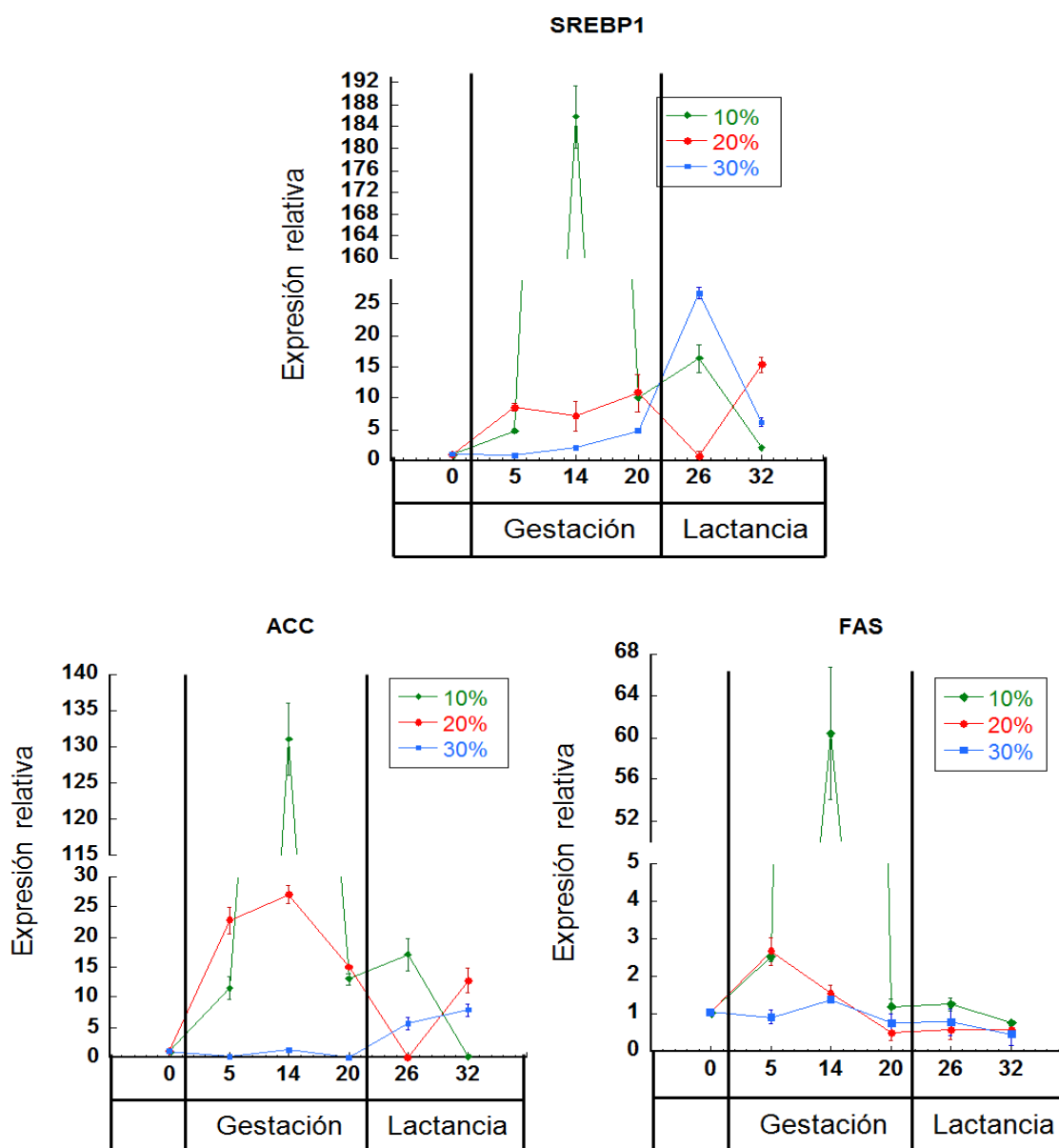


Figura 23. Expresión del RNAm de genes lipogénicos (SREBP1, ACC y FAS) en tejido adiposo de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

La expresión de los genes lipogénicos en el tejido adiposo se incrementó de manera significativa en el día 14 de gestación de las ratas alimentadas con 10% de proteína en la dieta. El factor de transcripción SREBP1, se incrementó 150 veces, mientras que las enzimas activadas transcripcionalmente por SREBP1: ACC y FAS se incrementaron 130 y 60 veces respectivamente ($p < 0.0001$) en este mismo grupo experimental (Figura 23).

En el grupo de ratas alimentadas con 20% de proteína dietaria la concentración de mRNA de ACC se incrementó de manera gradual pero significativa durante la gestación (hasta 27 veces), disminuyendo en el inicio de la lactancia y aumentando nuevamente en el día 12 de la lactancia (hasta 13 veces).

El análisis por Western Blot demostró que con el transcurso de la gestación disminuyó la expresión de la proteína FAS y en el periodo de lactancia se encontró en bajas concentraciones en los tres grupos experimentales (Figura 24).

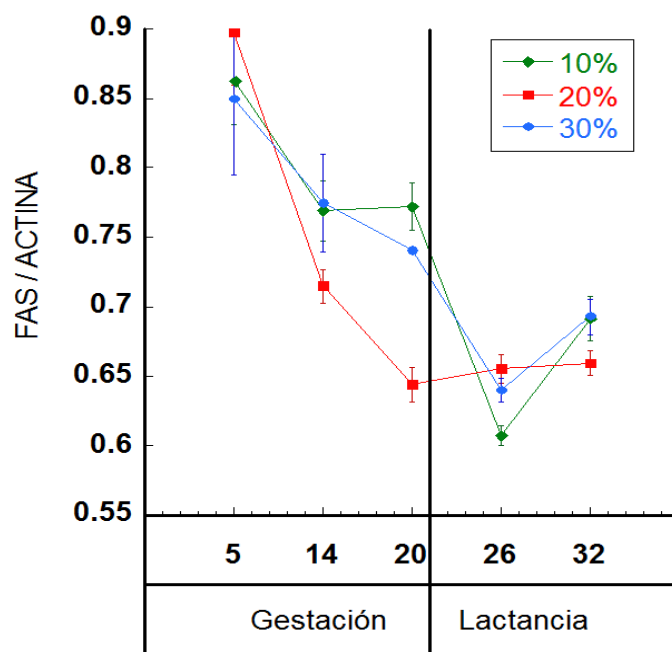


Figura 24. Concentración de la proteína FAS en tejido adiposo de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

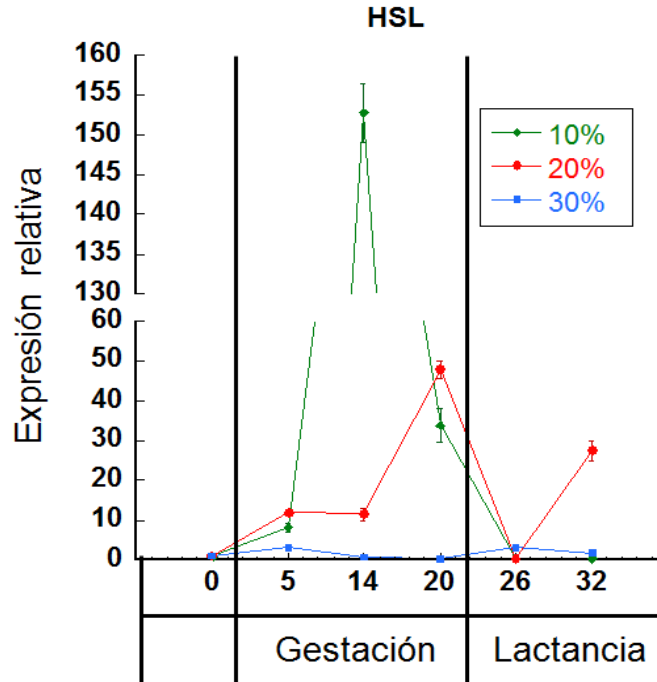


Figura 25. Expresión del RNAm de HSL en tejido adiposo de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

Otra enzima involucrada en el metabolismo de lípidos es la lipasa sensible a hormona (HSL). Esta enzima participa en el proceso de lipólisis para la liberación de ácidos grasos a la circulación. Su expresión en el tejido adiposo se muestra en la figura 25. En el grupo de ratas alimentadas con 20% de proteína se encontró un incremento significativo en su expresión en la etapa final del embarazo (40 veces) y durante la etapa de mayor producción láctea (25 veces), coincidiendo con los datos reportados en estudios previos.^{15,16} Sin embargo, en las ratas alimentadas con 10% de proteína se observó un aumento importante ($p < 0.0001$) en la expresión de esta enzima en el día 14 de gestación (150 veces) el cual disminuyó durante la lactancia. Las ratas alimentadas con 30% de proteína no presentaron cambios en la expresión de esta enzima en este tejido.

Efecto de la concentración de proteína de la dieta en la expresión de genes del metabolismo de hidratos de carbono en tejido adiposo, hígado y glándula mamaria de ratas vírgenes, gestantes y lactantes.

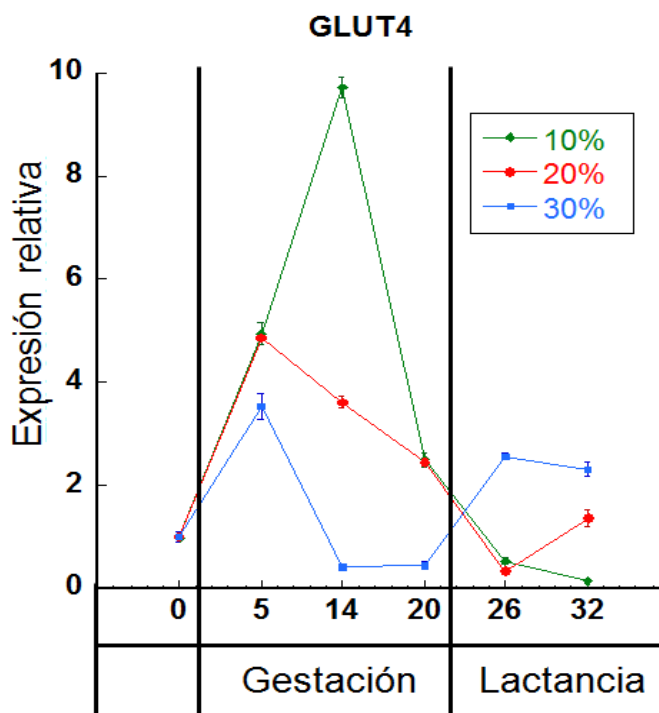


Figura 26. Expresión del RNAm de GLUT4 en tejido adiposo de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

La expresión del transportador de glucosa GLUT4 dependiente de insulina también presentó cambios en su expresión en los diferentes tejidos durante la gestación y la lactancia en ratas alimentadas con diferente concentración de proteína en la dieta. En el tejido adiposo de ratas alimentadas con 10 y 20% de proteína en la dieta se observó un incremento significativo en la expresión del transportador durante la gestación el cual fue mayor en el grupo de restricción proteica sobre todo el día 14 de gestación (9.8 veces). Durante la lactancia disminuyó significativamente la expresión de este transportador en estos dos grupos experimentales. En los animales alimentados con 30% de proteína se observó un aumento en los primeros días de la gestación (3.4 veces) aunque fue menor que en los otros grupos experimentales y disminuyó posteriormente en la segunda mitad del embarazo. Durante la lactancia la expresión de GLUT4 en este grupo experimental se incrementó significativamente en comparación con los grupos alimentados con 20 y 30% de proteína en la dieta ($p < 0.0001$) en los días 26 y 32 del estudio (Figura 26).

Por su parte, el factor de transcripción activado por hidratos de carbono ChREBP se aumentó principalmente durante la gestación en las ratas alimentadas con 10% de proteína en la dieta (hasta 23 veces en día 14 de gestación, $p < 0.0001$) en el tejido adiposo. Este comportamiento es similar al observado en la expresión de las enzimas lipogénicas en este mismo grupo experimental. En el grupo alimentado con 20% de proteína dietaria también hubo un incremento en la concentración de mRNA de ChREBP durante el embarazo, efecto que se reprimió en los primeros días de lactancia (Figura 27), mientras que en el grupo de 30% de proteína disminuyó la expresión de esta enzima en la segunda mitad de la gestación y se aumentó significativamente en los primeros días de lactancia (día 5 de lactancia) en comparación con los otros dos grupos experimentales.

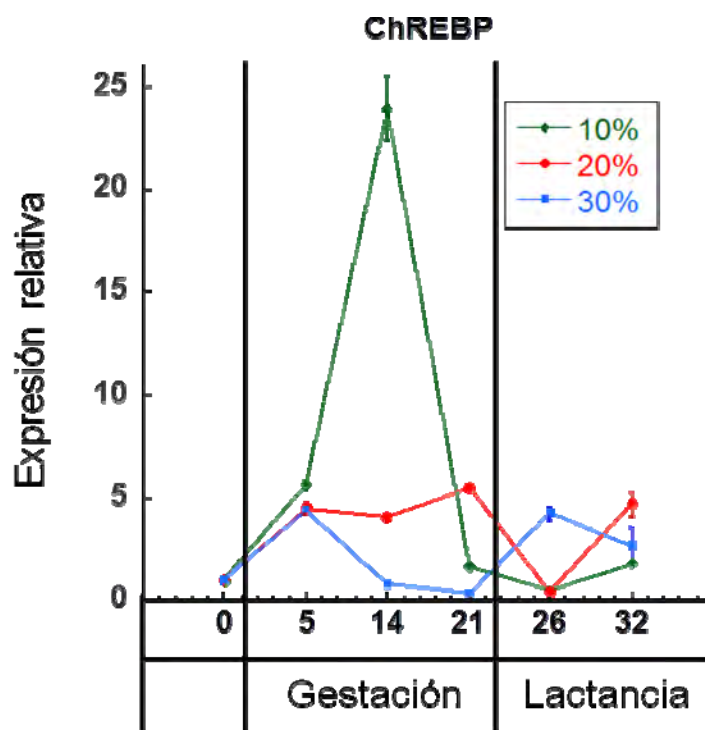


Figura 27. Expresión del RNAm de ChREBP en tejido adiposo de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

Efecto de la concentración de proteína de la dieta en la expresión de genes y proteínas del metabolismo de aminoácidos en tejido adiposo de ratas vírgenes, gestantes y lactantes.

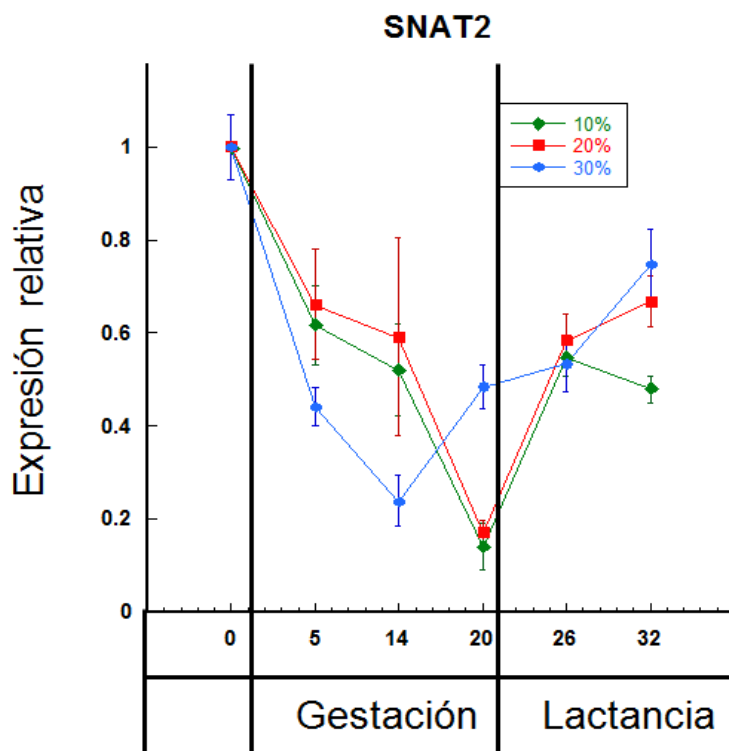


Figura 28. Expresión del RNAm de SNAT2 en tejido adiposo de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

El transportador de aminoácidos SNAT2 también presentó variaciones en su expresión en el tejido adiposo. Disminuyó de manera moderada pero significativa ($p < 0.0035$) durante el embarazo en los tres grupos experimentales. En el grupo de 30% la disminución fue significativamente mayor en los días 5 y 14 de gestación, mientras que en los grupos de 10 y 20% la disminución fue mayor en el día 20. Durante la lactancia se incrementó la expresión de este transportador en los tres grupos experimentales (Figura 28).

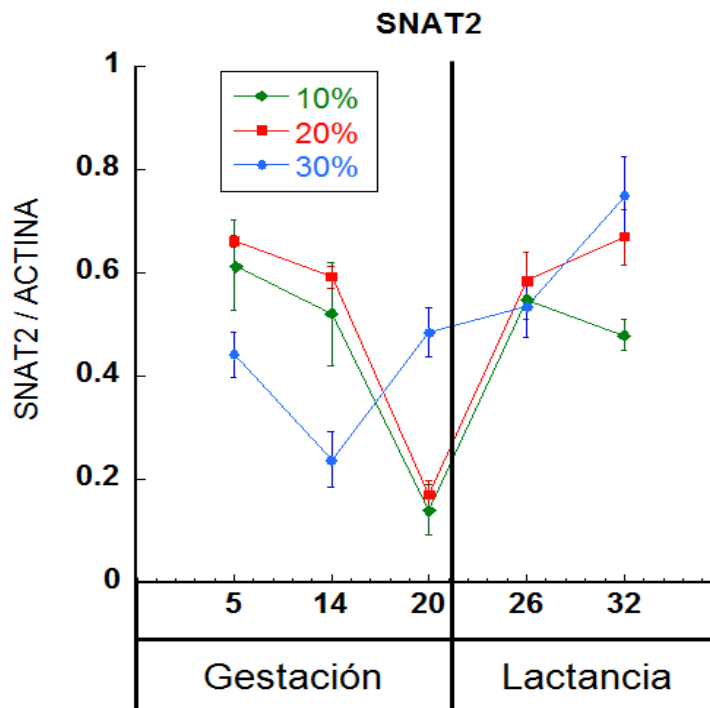
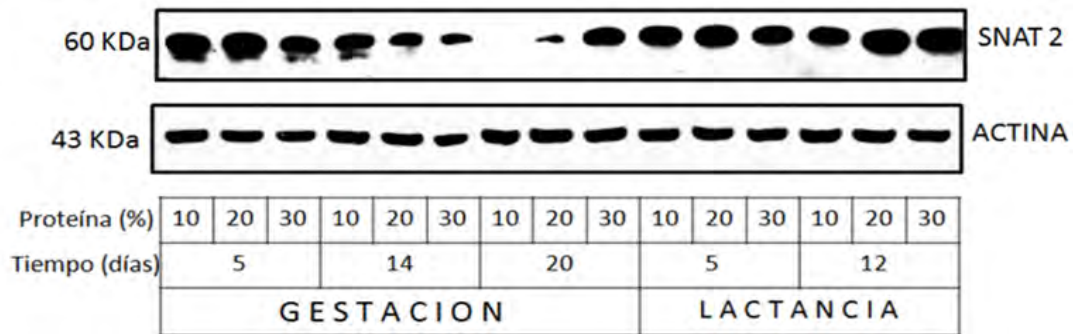


Figura 29. Concentración de la proteína SNAT2 en tejido adiposo de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

El análisis con western blot de este transportador reveló que durante la gestación disminuyó su expresión en este grupo mientras que se incrementó en los grupos de ratas alimentadas con 10 y 20% de proteína en a dieta. Al término del embarazo, en el día 20 de gestación, la concentración de esta proteína disminuyó de manera significativa en los grupos alimentados con 10 y 20% de proteína mientras que en el grupo de 30% hubo un aumento. Durante la lactancia la concentración de SNAT2 en el tejido adiposo se incrementó en los tres grupos de manera proporcional a la concentración de proteína en la dieta ($p < 0.001$) de manera similar a lo que se observó en la expresión génica de SNAT2 en este tejido (Figura 29).

8.6 Glándula mamaria

Efecto de la concentración de proteína de la dieta en la expresión de genes del metabolismo de lípidos en la glándula mamaria.

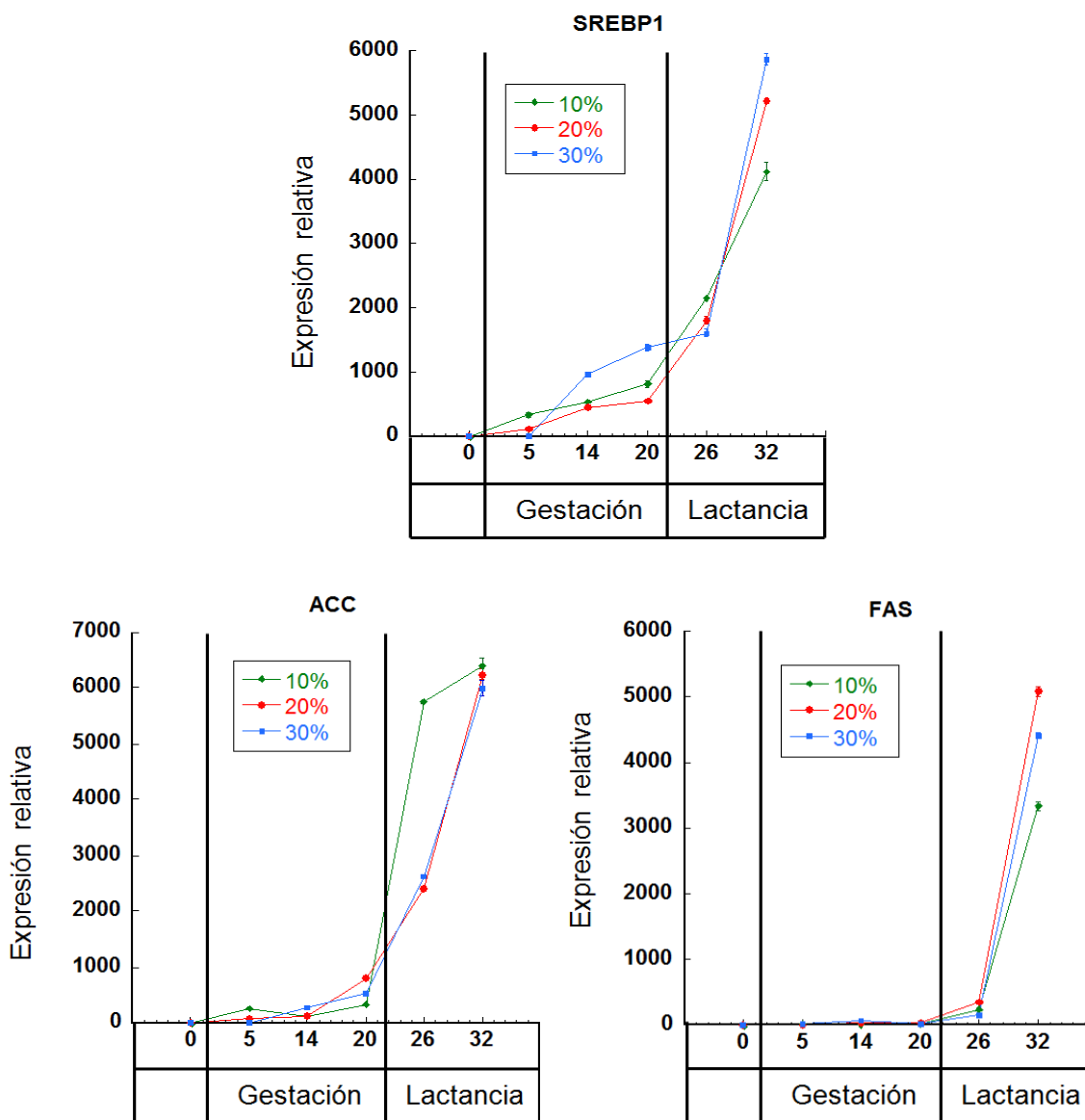


Figura 30. Expresión del RNAm de genes lipogénicos (SREBP1, ACC y FAS) en glándula mamaria de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

En la glándula mamaria se observó un incremento moderado, pero significativo, en la expresión del factor de transcripción SREBP1 conforme transcurre el embarazo. Sin embargo fue impactante el incremento en la expresión de los tres genes lipogénicos analizados en este estudio (SREBP1, ACC y FAS) durante el periodo de lactancia en donde se alcanzaron valores de expresión muy elevados de hasta 6000 veces ($p < 0.001$) para SREBP1 y ACC, 5000 veces en FAS (Figura 30). Estos cambios fueron similares en los tres grupos experimentales.

Estos resultados coincidieron con el análisis por Western Blot de la proteína FAS en el tejido mamario presentados en la figura 31. FAS aumentó ligeramente en la etapa final del embarazo en los tres grupos experimentales. En la lactancia, la concentración de FAS se elevó de manera significativa sin importar la concentración de proteína en la dieta destacando la prioridad que tiene el tejido mamario en el suministro de nutrientes en este periodo fisiológico.

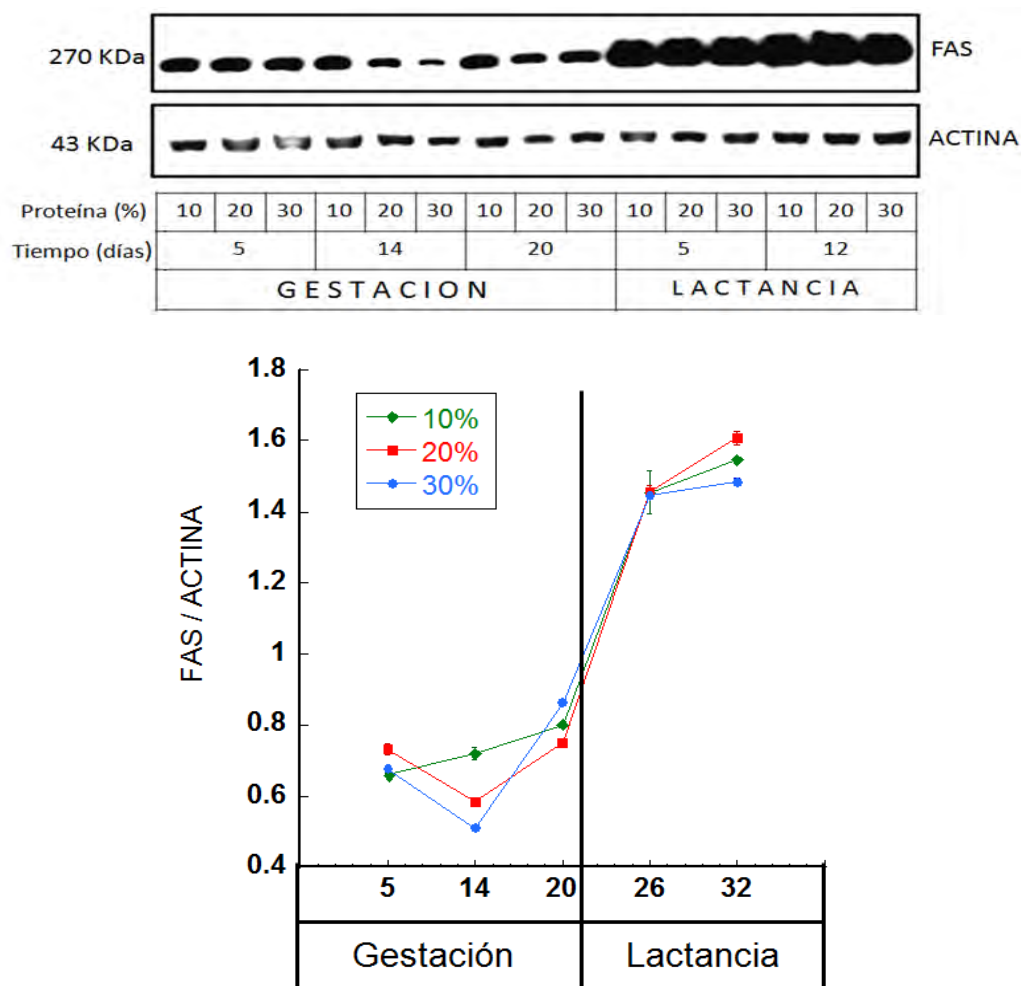


Figura 31. Concentración de la proteína FAS en glándula mamaria de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

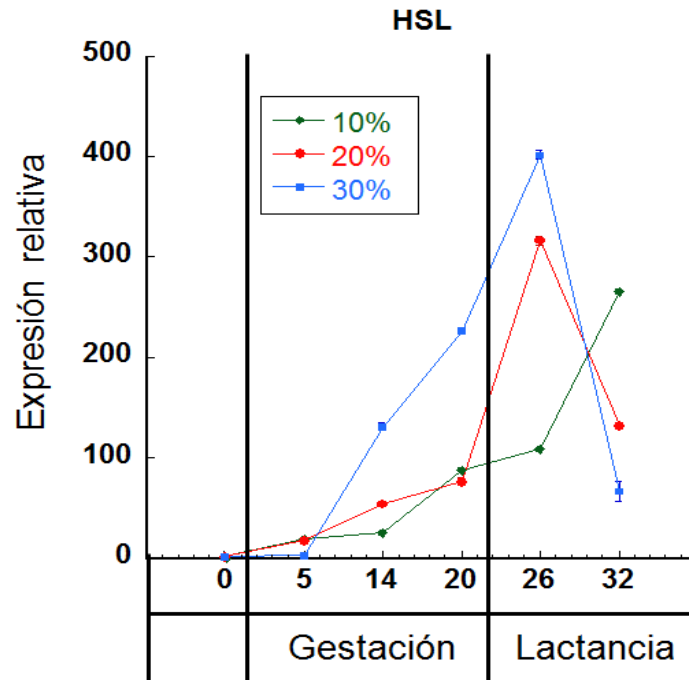


Figura 32. Expresión del RNAm de HSL en la glándula mamaria de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

En contraparte con los resultados anteriores, la expresión de genes involucrados con lipólisis (HSL) y oxidación de ácidos grasos (CPT-1) se comportaron de manera inversa en la glándula mamaria lo que nos habla que existe una adaptación en el metabolismo de lípidos entre los periodos de gestación y lactancia.

Se observó un incremento en la expresión de HSL durante los primeros días de gestación (hasta 350 veces), especialmente en las ratas alimentadas con 20 y 30% de proteína en la dieta y disminuyó en el día 12 de lactancia ($p < 0.001$); mientras que las ratas alimentadas con 10% de proteína tuvieron el mayor incremento en la expresión de esta enzima conforme se establecía el periodo de lactancia aumentándose hasta 250 veces en el día 12 de lactancia ($p < 0.0001$).

La expresión de la enzima CPT-1 (Carnitil palmitoil transferasa), encargada de introducir los ácidos grasos a la mitocondria para su oxidación, se incrementó de manera significativa en la glándula mamaria en la mitad y sobre todo en la etapa final de la gestación, principalmente en las ratas alimentadas con 30% de proteína en la dieta (26 veces). Durante la lactancia disminuyó la expresión de esta enzima. Estos resultados se presentan en las figuras 32 y 33.

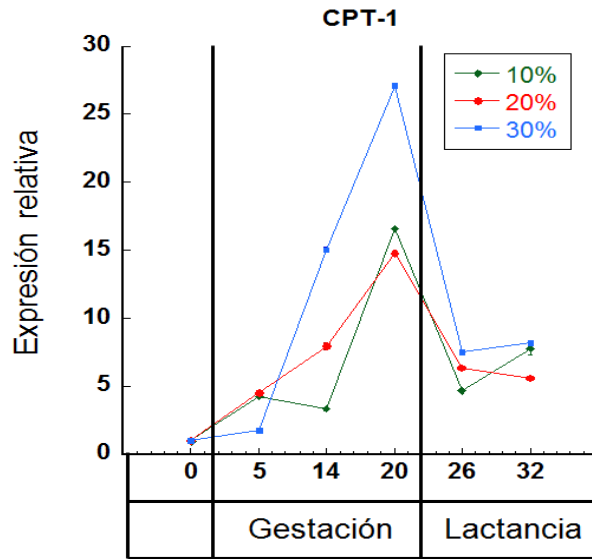


Figura 33. Expresión del RNAm de CPT1 en glándula mamaria de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

Efecto de la concentración de proteína de la dieta en la expresión de genes del metabolismo de hidratos de carbono en glándula mamaria de ratas vírgenes, gestantes y lactantes.

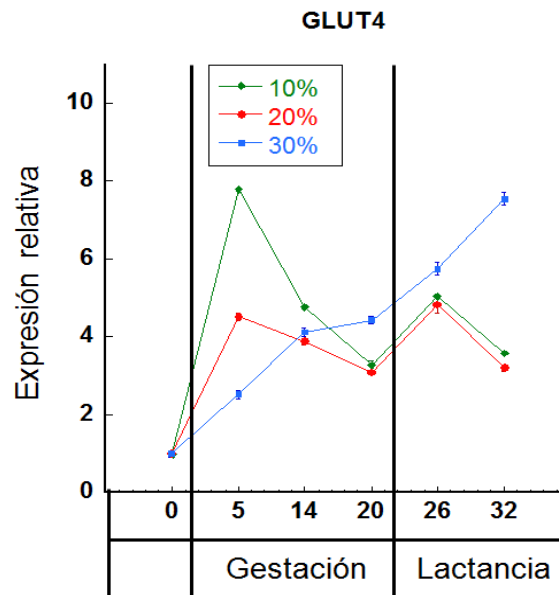


Figura 34. Expresión del RNAm de GLUT4 en glándula mamaria de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

El transportador de glucosa GLUT4 presentó un patrón variable de expresión en este estudio. Se incrementó principalmente en los inicios de la gestación (hasta 8 veces) en las ratas alimentadas con 10 y 20% de proteína, disminuyó al término de la gestación y se elevó nuevamente durante la lactancia (5 veces). En las ratas alimentadas con 30% de proteína se observó un aumento en la expresión de este gen a partir del día 14 de gestación el cual continuó en aumento hasta el periodo de lactancia. Todas estas variaciones fueron significativas (Figura 34).

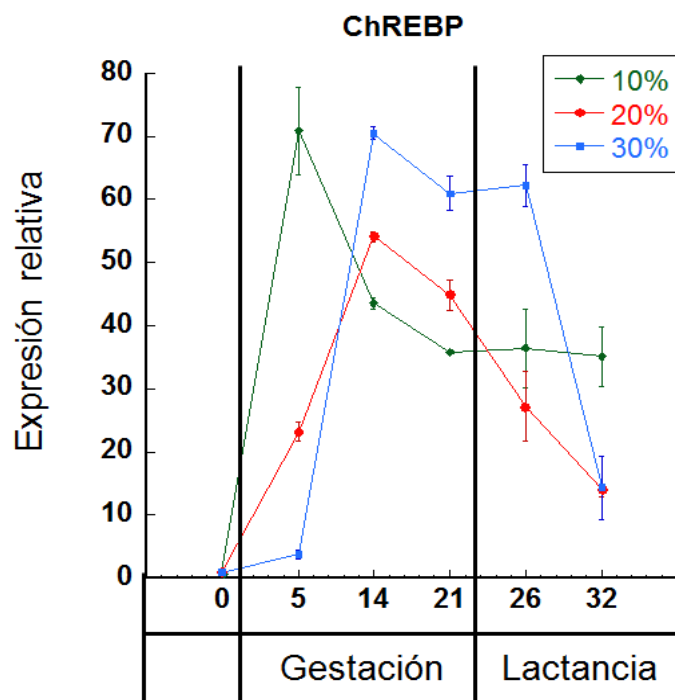


Figura 35. Expresión del RNAm de ChREBP en glándula mamaria de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

En la glándula mamaria ChREBP se incrementó en el periodo de gestación. Este aumento ocurrió de manera más rápida en las ratas alimentadas con 10% de proteína (hasta 70 veces en el día 5 de gestación) mientras que en las ratas alimentadas con 20 y 30% de proteína el incremento se observó hasta el día 14 de gestación (55-70 veces). Durante la lactancia disminuyó progresivamente la expresión de este gen en ratas alimentadas con 20 y 30% de proteína; sin embargo en el grupo del 10% la expresión de ChREBP se mantuvo en 35 veces en este periodo. Los cambios en este tejido tuvieron una $p < 0.0001$ (Figura 35).

Efecto de la concentración de proteína de la dieta en la expresión de genes y proteínas del metabolismo de aminoácidos en glándula mamaria de ratas vírgenes, gestantes y lactantes.

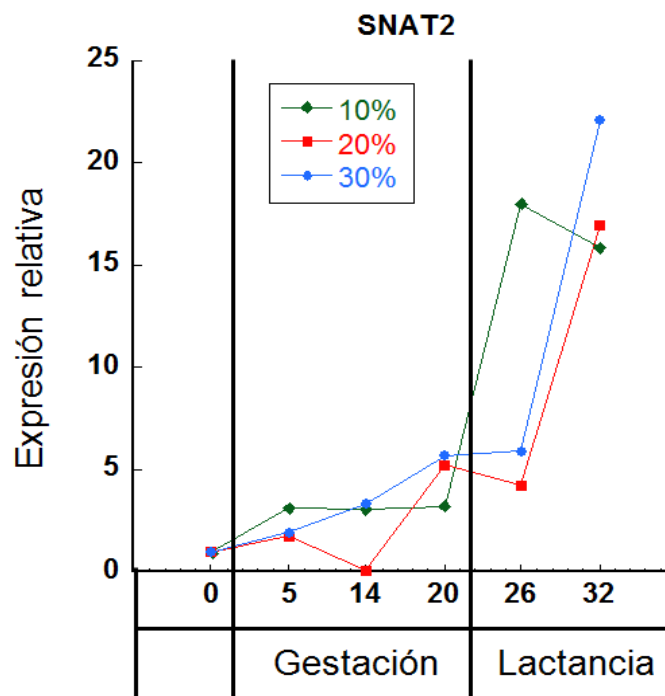


Figura 36. Expresión del RNAm de SNAT2 en glándula mamaria de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

La expresión del transportador de aminoácidos SNAT2 presentó un aumento significativo durante el periodo de lactancia sobre todo en el día 12 ($p < 0.0001$). En el grupo de ratas con 10% de proteína dietaria este incremento fue mayor en el día 5 de lactancia, mientras que en el día 12 es proporcional a la concentración de proteína en la dieta (Figura 36).

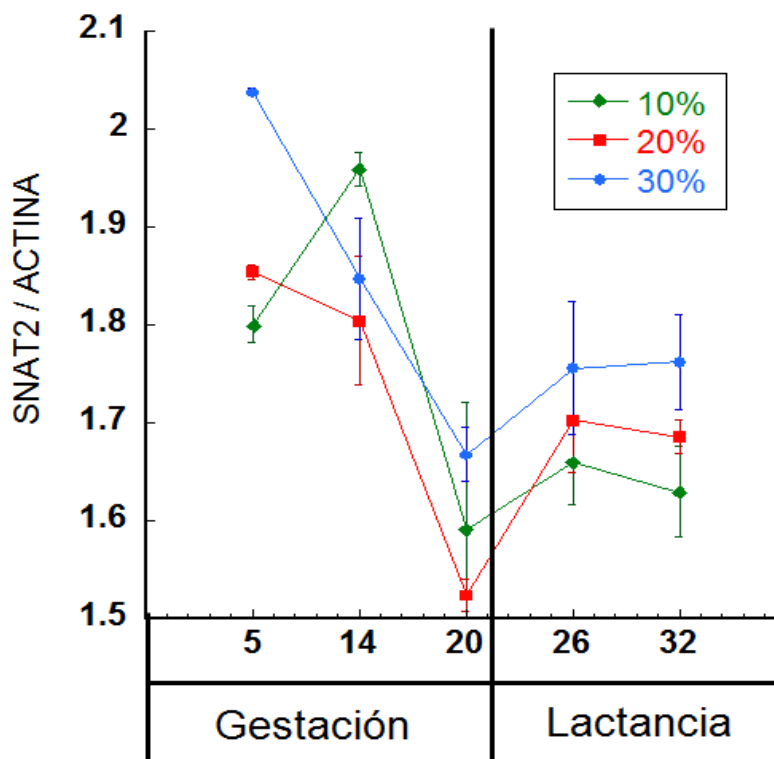
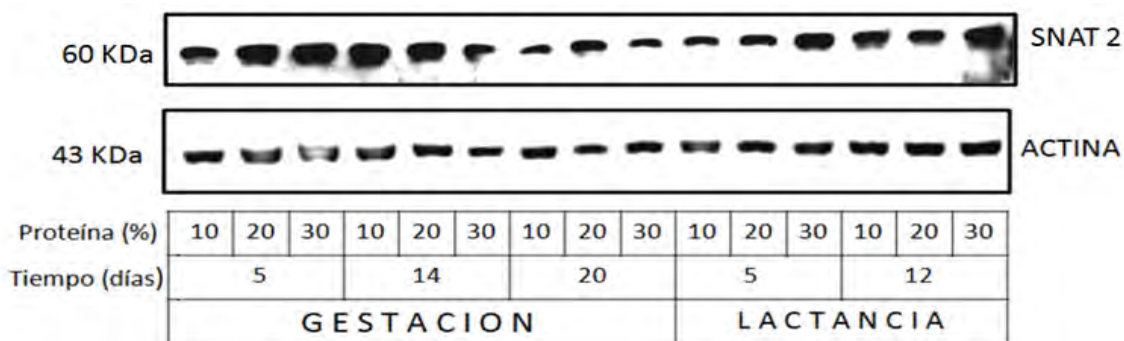


Figura 37. Concentración de la proteína SNAT2 en glándula mamaria de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

El análisis en la concentración de proteína presentó diferencias entre el patrón de expresión observado. La concentración de proteína SNAT2 disminuyó en el día 20 de gestación de los tres grupos experimentales de manera significativa. En el grupo de restricción proteica se presentó un incremento en el día 14 de gestación. En el periodo de lactancia se aumentó la concentración de esta proteína de manera moderada pero significativa, en los tres grupos. De manera general a lo largo de estos periodos en el grupo de ratas alimentadas con 30% de proteína en la dieta se encontró en concentraciones mayores a pesar de presentar un patrón de cambio similar.

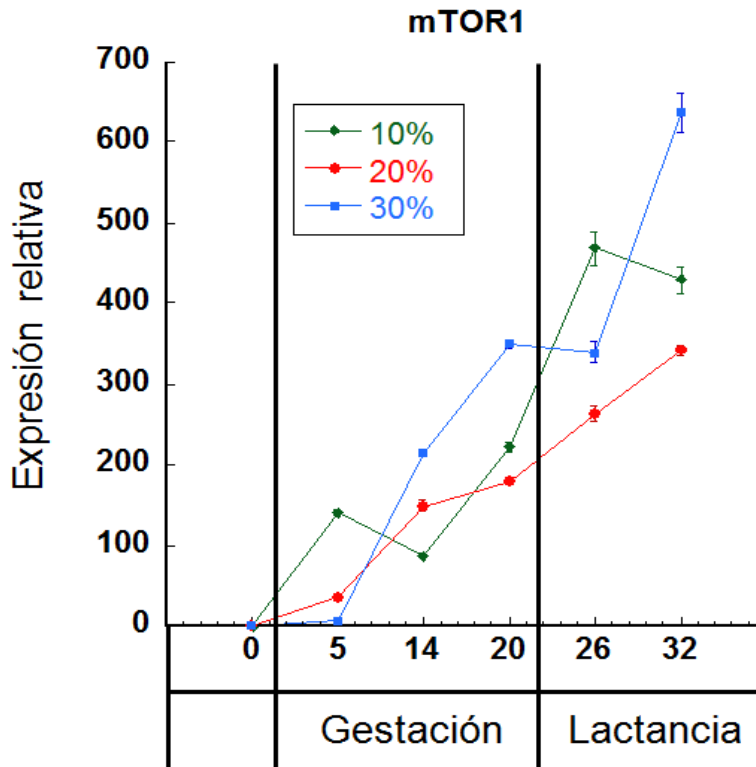


Figura 38. Expresión del RNAm de mTOR1 en glándula mamaria de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína en la dieta durante la gestación y la lactancia. Los resultados son $X \pm SD$.

En la glándula mamaria, se observó un incremento progresivo en la expresión del complejo mTOR1 que comienza en la etapa temprana de gestación de las ratas alimentadas con 10% de proteína y en la segunda mitad del embarazo en ratas alimentadas con 20 y 30% de proteína. Durante la lactancia se encontraron los niveles máximos de expresión de mTOR1 en el tejido mamario, en donde incrementó de 300 a 600 veces ($p < 0.0001$). El incremento fue mayor en el grupo de ratas alimentadas con 30% de proteína de la dieta (Figura 38).

9. DISCUSIÓN

La variación en la concentración de proteína en la dieta durante los periodos de gestación y de lactancia provoca diversos cambios metabólicos en la madre y el feto. Se sabe que las dietas bajas en proteína y el periodo fisiológico de gestación se caracterizan por ser estados en donde se presenta resistencia a la leptina debido a que el consumo de alimento se mantiene estable o incrementa sin importar que exista un aumento en las concentraciones séricas de esta hormona.

Estudios previos de restricción proteica encontraron un incremento en el consumo de alimento provocado por una alteración en la respuesta a la leptina en el hipotálamo.³⁴ En este proyecto, se encontró de igual manera un incremento en el consumo de alimento en las ratas alimentadas con 10% de proteína en la dieta; sin embargo ese incremento no fue suficiente para cubrir la alta demanda de aminoácidos en estos periodos fisiológicos lo que provocó una recuperación más lenta en el peso de la madre durante la lactancia y un incremento inadecuado en el peso de las crías cuyas madres se alimentaron con una dieta baja en proteína. Tal y como se esperaba, la concentración de leptina sérica se incrementó en el periodo de gestación, especialmente en las ratas alimentadas con baja concentración de proteína en la dieta (10%). Este incremento en la concentración de leptina no se relacionó con el peso de la madre, ya que fueron las ratas alimentadas con 10% de proteína las que alcanzaron un menor peso al término de la gestación. Sin embargo, posiblemente si se relacione con la cantidad de tejido adiposo ya que la mayoría de las enzimas lipogénicas se encuentran notablemente incrementadas en este grupo experimental en comparación con los grupos de ratas alimentadas con 20 y 30% de proteína en la dieta, aunque el peso del tejido adiposo no fue registrado en este estudio.

Las concentraciones séricas de glucosa presentaron algunos cambios disminuyendo a lo largo de la gestación e incrementando ligeramente durante la lactancia en las ratas alimentadas con 10 y 20% de proteína en la dieta. Las ratas alimentadas con 30% de proteína presentaron un patrón diferente al tener dos picos de hiperglucemia en los días 5 de gestación y 12 de lactancia. Esto posiblemente se debió a que este grupo al tener un mayor aporte de aminoácidos permitía que el hígado tuviera fuentes de carbono para llevar a cabo gluconeogénesis y mantener las concentraciones de glucosa en sangre un poco más elevadas, sobre todo en el periodo de gestación en donde se sabe que generalmente se encuentran disminuidas al haber una mayor utilización de glucosa gracias al feto.¹⁰

El metabolismo de lípidos, hidratos de carbono y aminoácidos está sujeto al control hormonal. La insulina es una hormona anabólica que estimula la lipogénesis al liberar la

forma activa del factor de transcripción SREBP1 de la membrana del retículo endoplásmico al núcleo para que active los genes de las enzimas lipogénicas ACC y FAS⁵⁷. También favorece la captación de glucosa, al estimular la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la superficie celular⁵⁸; y la síntesis de proteínas al favorecer la translocación del transportador de aminoácidos SNAT2 de compartimentos intracelulares hacia la membrana celular para favorecer la captación de aminoácidos por la célula⁴³ y la activación del complejo proteico mTOR1, encargado de estimular la síntesis de proteínas.⁵⁹

Los ácidos grasos son la mayor fuente de energía para la mayoría de los tejidos en periodos donde existe un balance de energía negativo como es el periodo de lactancia para la madre o durante la gestación en donde el feto tiene prioridad en la captación de glucosa para cubrir sus demandas de energía para su crecimiento y desarrollo.⁶⁰ Durante la gestación las hormonas liberadas por la placenta y los ovarios (lactógeno placentario, estrógenos y progesterona) provocan en la madre un estado de resistencia a la insulina para favorecer la captación de nutrientes por parte del feto³. Sin embargo, se ha reportado que dietas bajas en proteína incrementan la tolerancia a la glucosa y la acción de la insulina favoreciendo un incremento en la expresión de genes lipogénicos (SREBP1, ACC, FAS) y GLUT 4 en el tejido adiposo, tal y como se observó en este estudio en los animales alimentados con 10% de proteína. Además estos aumentos encontrados en el día de gestación 14 de las ratas alimentadas con 10% de proteína también coinciden con una elevación en la concentración de insulina sérica encontrada en este estadio.

En el hígado también se encontró un incremento en la expresión de SREBP1 en ratas alimentadas con 10% de proteína, indicándole a las células hepáticas una señal para hacer lipogénesis debido al incremento en la cantidad de hidratos de carbono (glucosa) que estaban consumiendo estas ratas como compensación a la restricción de aminoácidos. Este dato concuerda también con el incremento en la expresión de la enzima piruvato cinasa (paso limitante en la glucólisis) en el hígado de las ratas alimentadas con restricción proteica por lo que la expresión de esta enzima se modificó considerablemente por la concentración de proteína en la dieta ya que en las ratas alimentadas con un adecuado aporte de aminoácidos no presentaron cambios importantes en su expresión.

En contraparte, este mismo grupo (10% de proteína en la dieta) tuvo una expresión inhibida de PEPCCK, lo que indica una represión en la gluconeogénesis en el hígado de las ratas madres debido a la falta de esqueletos carbonados provenientes de los aminoácidos y a un incremento en la proporción de glucosa consumida.

Se puede determinar si existe un exceso en el consumo de proteína dietaria midiendo la expresión de enzimas degradadoras de aminoácidos, las cuales sensan la cantidad de nutrimento, en este caso de aminoácidos y activan o inhiben su expresión en el hígado. La enzima serina deshidratasa (SDH) es una enzima involucrada en la degradación de serina para la utilización de su esqueleto carbonado. Esta enzima responde a diferentes

concentraciones de proteína en la dieta incrementando su expresión al haber un exceso de aminoácidos.⁶¹ En este estudio, aumentó significativamente la expresión de SDH 20 veces en el hígado de las ratas que consumieron 30% de proteína en la dieta en el día 5 de gestación. Sorpresivamente en los días posteriores de gestación y durante el periodo de lactancia se normalizó la expresión de esta enzima lo que posiblemente se asocie a que el requerimiento de proteína en la madre incrementa de manera considerable en este periodo. Clowes y colaboradores⁶² reportaron que durante el periodo de lactancia hay un incremento en la demanda de aminoácidos por la glándula mamaria, lo que hace que el músculo establezca un estado de catabolismo proteico para movilizar aminoácidos a la circulación sanguínea con el propósito de compensar esa demanda. En este proceso se activa la expresión de proteasas y se inhibe la síntesis de proteínas en muchos tejidos, principalmente en el músculo esquelético de la madre, además se incrementan las concentraciones de aminoácidos libres sobre todo de glutamina. En este estudio se encontró que las ratas alimentadas con 30% de proteína fueron aquellas que recuperaron más rápido su peso en el periodo de lactancia infiriéndose que tuvieron una menor pérdida de masa muscular ya que la dieta les ayudó a cubrir la demanda de aminoácidos por parte de la glándula mamaria en este periodo. La enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) también respondió a la cantidad de proteína de la dieta expresándose en mayor proporción en el hígado y músculo de las ratas alimentadas con un exceso de proteína (30%), sobre todo durante la lactancia.

Durante el periodo de lactancia, el hígado, el tejido adiposo y la glándula mamaria son los principales órganos en donde se encuentra activo el metabolismo de lípidos. El tejido adiposo y el hígado favorecen el flujo de ácidos grasos y triglicéridos respectivamente. La glándula mamaria lleva a cabo la síntesis de *novo* de ácidos grasos y biogénesis de triglicéridos que conforman la leche materna y que ayudarán al recién nacido a obtener energía y mantener la temperatura corporal.¹⁸

Cabe mencionar que los tres tejidos pueden sintetizar ácidos grasos de *novo* y esterificarlos a triacilglicéridos pero durante la lactancia; la glándula mamaria es la principal productora de ácidos grasos coincidiendo con el incremento encontrado en la expresión del factor de transcripción SREBP1 y sus enzimas blanco (ACC y FAS), así como en la concentración de la proteína FAS en este periodo fisiológico, no importando la concentración de proteína en la dieta.

En el hígado, se encontró un incremento en la expresión de enzimas lipogénicas (ACC y FAS) durante la lactancia en el grupo alimentado con 10% de proteína en la dieta coincidiendo con la acumulación de vesículas de grasa en este tejido observadas en el corte histológico de estos animales en el día 5 de lactancia. Estos datos concuerdan con lo encontrado por Kwon y colaboradores⁶³ en un estudio realizado en ratas lactantes con restricción proteica (8%), en donde se encontró la presencia de hígado graso como

respuesta a una acumulación de triglicéridos ocasionada por una alteración en la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Al existir una deficiencia de aminoácidos, no se pueden formar de manera suficiente las proteínas que conforman a las lipoproteínas las cuales son partículas transportadoras de triglicéridos y colesterol que reparten estos nutrimentos a los diversos órganos. Por lo tanto los lípidos se acumulan en el hígado de manera patológica dando como resultado el hígado graso.

Adicionalmente hay que recordar que las dietas para los tres grupos eran isocalóricas y el contenido de grasa era el mismo en todos los grupos, la dieta con 10% de proteína contenía una mayor cantidad de hidratos de carbono (almidón y dextrosa) en comparación con la dieta de 20% y aún más con la de 30% de proteína. Por lo anterior, la concentración de glucosa ingerida en estos animales fue mayor. Un estudio realizado en hepatocitos demostró que concentraciones altas de glucosa inhiben a AMPK y mTOR1 y favorecen los procesos de glucólisis, y lipogénesis estimulados por la insulina para convertir el exceso de glucosa en depósitos de ácidos grasos,⁶⁴ lo que explica un incremento en la expresión de FAS y ACC en el hígado de ratas alimentadas con 10% de proteína durante la lactancia.

En contraparte, un exceso de aminoácidos provocado por un aumento en la concentración de proteína en la dieta inhibe de igual manera a AMPK pero activa a mTOR1 lo que favorece la activación de la síntesis de proteínas coincidiendo con lo encontrado durante la lactancia en el hígado al presentarse un incremento en la expresión del complejo proteico mTOR1 en las ratas alimentadas con 30% de proteína en la dieta.

La glándula mamaria es el tejido en donde se encontraron los mayores cambios en la expresión de genes relacionados no solo con el metabolismo de lípidos sino también de aminoácidos e hidratos de carbono durante el periodo de lactancia. Esto se debe al “switch” metabólico que existe en este periodo y al incremento en la demanda de todos los nutrimentos para la síntesis de proteínas, lactosa y triglicéridos que formarán parte de la leche. Esto explica el aumento notable en la expresión de mTOR1 y la recuperación en la concentración de SNAT2 en la lactancia después de haber disminuido de manera importante en los últimos días de gestación; el incremento en la expresión del transportador de glucosa GLUT4, y de los genes lipogénicos SREBP1, FAS, y ACC; así como la disminución de genes lipolíticos (HSL), y de beta-oxidación (CPT-1) en este periodo. Sin embargo a pesar de que los cambios metabólicos entre el estado virgen, gestante y lactante en el tejido mamario fueron muy grandes no hubo diferencia entre las concentraciones de proteína en la dieta. Con esto se comprueba que el tejido mamario tiene prioridad sobre el resto de los tejidos y son el hígado, el tejido adiposo y el músculo, los encargados de proveer nutrimentos a la glándula mamaria para solventar las demandas energéticas y mantener en lo posible una adecuada composición de la leche, lo cual dependerá de la concentración de proteína dietaria.

10. CONCLUSIONES

El estado nutricional de la madre durante los periodos de gestación y lactancia interviene de manera importante en el desarrollo y crecimiento de las crías así como en la recuperación y normalización del estado metabólico de ella. Un cambio en la concentración de proteína en la dieta generó cambios sobresalientes en la expresión de genes y proteínas del metabolismo de glucosa, aminoácidos y lípidos que repercutieron en el estado nutricional de la madre.

Cada tejido ejerce una función en estos periodos fisiológicos y la dieta modula estos cambios. En el tejido adiposo, una disminución en la concentración de proteína en la dieta activó el proceso de lipogénesis durante el día 14 de embarazo, evidenciado por un incremento en la expresión de los genes SREBP1, FAS, ACC (responsables en la síntesis de ácidos grasos) y de manera indirecta de GLUT4 y ChREBP, los cuales respondieron a un aumento en la concentración de hidratos de carbono en la dieta de estos animales y además también favorecieron el proceso anabólico de lipogénesis. Durante el periodo de lactancia disminuyó considerablemente la expresión de estos genes en el tejido adiposo sin importar el porcentaje de proteína en la dieta y se elevó la expresión y la concentración del transportador de aminoácidos SNAT2 de manera proporcional a la cantidad de proteína aportada por la dieta.

En el hígado, el grupo experimental que tuvo restricción proteica (10% de proteína dietaria) presentó un incremento en la expresión de genes involucrados en la lipogénesis (SREBP1, ACC y FAS) durante la gestación pero sobre todo en el periodo de lactancia. Este incremento también se observó al medir por Western Blot la concentración de la proteína FAS en hígado y se corroboró al encontrar una acumulación de vesículas de grasa en el corte histológico de este tejido en el día 5 de lactancia. Las ratas alimentadas con 20 y 30% de proteína dietaria no presentaron dicho incremento.

La expresión de la enzima glucolítica, piruvato cinasa (PK) aumentó en las ratas alimentadas con restricción proteica mientras que en las ratas alimentadas con un adecuado aporte de aminoácidos no presentó cambios en su expresión. Por el contrario, la expresión de la PEPCK se inhibió en las ratas alimentadas con 10% de proteína dietaria indicando una inhibición en la gluconeogénesis debido a la falta de esqueletos carbonados provenientes de los aminoácidos y a un incremento en la proporción de glucosa consumida.

La enzima serina deshidratasa (SDH) incrementó significativamente su expresión en el hígado de las ratas que consumieron 30% de proteína en la dieta en el día 5 de gestación. En los días posteriores de gestación y durante el periodo de lactancia disminuyó la expresión de esta enzima asociándose a un aumento en el requerimiento de proteína en la madre en este periodo.

En la glándula mamaria los cambios en la expresión de genes y concentración de proteínas fueron mayores. Durante la gestación se encontró un incremento moderado, pero significativo en la expresión de genes involucrados en la síntesis de proteínas (mTOR1); así como en el transporte de glucosa (GLUT4). Las enzimas HSL y CPT1 también presentaron un incremento en su expresión en este periodo, sobre todo en las ratas alimentadas con 30% de proteína en la dieta. La proteína SNAT2 se encuentra elevada en la glándula mamaria virgen de los tres grupos experimentales y disminuyó durante la gestación sobre todo un día antes del nacimiento de las crías. Durante el periodo de lactancia se observó un aumento muy pronunciado en la expresión de genes lipogénicos (SREBP1, ACC y FAS) y la proteína FAS; así como también incrementó la expresión génica del complejo proteico mTOR y la recuperación en la expresión y concentración de la proteína SNAT2. En contraparte se encontró una disminución en la expresión de la enzima lipolítica (HSL) y de la β -oxidación (CPT-1) y en el día 12 de lactancia.

En conjunto estos resultados indican que durante el periodo de lactancia aumenta el requerimiento de nutrientes en la glándula mamaria para la síntesis de leche; y son el hígado, el tejido adiposo y el músculo los órganos encargados de solventar el aporte de nutrientes hacia la glándula mamaria en este periodo, ya que se lleva a cabo un proceso anabólico muy intenso.

11. REFERENCIAS

-
- ¹ Worthington-Roberts B. Nutrition in pregnancy and lactation. Mexico City: Brown & Benchmark, 1997.
- ² Alemán G, López A, Ordaz G, Torres N, Tovar A: Changes in messenger RNA abundance of aminoacid transporters in rat mammary gland during pregnancy, lactation and weaning. *Metabol J* 2009; 14:1245-1256.
- ³ Harris R, Crabb D. Interrelaciones metabólicas. En Devlin T. *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4ta edición. Reverte, 2004; 891.
- ⁴ Macedo G, Ferreira C, Menegaz A. Correlation of serum leptin and insulin levels of pregnant protein-restricted rats with predictive obesity variables. *J Med and Biol Res* 2008; 41:519-525.
- ⁵ Bautista C, Boeck L, Larrea F, Nathanielsz P, Zambrano E. Effects of a Maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatric Res* 2008; 63:358-363.
- ⁶ Seeber R, Smith J, Waddel B. Plasma leptin-binding activity and hypothalamic leptin receptor expression during pregnancy and lactation in the rat. *Biol of Repro* 2002; 66: 1762-1767.
- ⁷ Smith JL, Lear SR, Forte TM. Effect of pregnancy and lactation on lipoprotein and cholesterol metabolism in the rat. *J Lipid Res* 1998; 39: 2237–2249.
- ⁸ Smith RW. The effects of pregnancy and lactation on the activities in rat liver of some enzymes associated with glucose metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1975; 411:22–29.
- ⁹ He XJ, Ejiri N, Nakayama H, Doi K. Effects of pregnancy on CYPs protein expression in rat liver. *Exp Mol Pathol* 2005; 78:64–70.
- ¹⁰ Lain KY, Catalano PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obst Gynec* 2007; 50:938-948.
- ¹¹ Lopez-Luna P, Maier I, Herrera E. Carcass and tissue fat content in the pregnant rat. *Biol Neonate* 199; 60:29-38.
- ¹² Hammerle G, Zechner R. Lipoprotein lipase: The regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13:471-81.
- ¹³ Pujol E, Proenza AM, Lladó I, Roca P. Pregnancy effects on rat adipose tissue lipolytic capacity are dependent on anatomical location. *Cell Physiol Biochem* 2005; 16:229-236.

-
- ¹⁴ Hamosh M, Clary TR, Chernick SS, Scow RO. Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochim Biophys Acta* 1970; 210:473–482.
- ¹⁵ Steingrimsdottir L, Brasel JA, Greenwood MR. Diet, pregnancy, and lactation: effects on adipose tissue, lipoprotein lipase, and fat cell size. *Metabolism* 1980; 29:837–841.
- ¹⁶ Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 1993; 34:1057-91.
- ¹⁷ Rudolph MC, Neville MC, Anderson SM. Lipid synthesis in lactation: Diet and the fatty acid switch. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2007; 12:269–281.
- ¹⁸ Akers M. Lactation and the mammary gland. Iowa: Iowa State University Press, 2002.
- ¹⁹ Knight CH. The importance of cell division in udder development and lactation. *Livest. Prod Sci* 2000; 66:169–176.
- ²⁰ Weber MS, Purup S, Vestergaard M, Akers RM, Sejrsen K. Regulation of local synthesis of insulin-like growth factor- I and binding proteins in mammary tissue. *J Dairy Sci* 2000; 83:30– 37.
- ²¹ Smaili SS, Hsu YT, Carvalho ACP, Rosenstock TR, Sharpe JC, Youle RJ. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36, 183–190.
- ²² De Santiago S, Hernandez-Montes H, Flores-Huerta S, Villalpando S. Changes in the composition of mammary tissue, liver and muscle of the rat dams during lactation and after weaning. *J Nutr* 1991; 121:37–43.
- ²³ Davis T, Fiorotto M, Reeds P. Amino acid compositions of body and milk protein change during the suckling period in rats. *J Nutr* 1993; 123:947–956.
- ²⁴ Shennan DB, Millas ID, Calvert DT. Mammary tissue amino acid transporter systems. *Proc Nutr Soc* 1997; 56:177-191.
- ²⁵ Linzell JL, Peaker M. Mechanism of milk secretion. *Physiol Rev* 1971; 51:564–597.
- ²⁶ Rudolph MC, Russell TD, Webb P, Neville MC, Anderson SM. Prolactin-mediated regulation of lipid biosynthesis genes in vivo in the lactating mammary epithelial cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 300:1059–1068.
- ²⁷ Rudolph MC, Monks J, Burns V, Phistry M, Marians R, Foote MR, Bauman DE, Anderson SM, Neville MC. Sterol regulatory element binding protein and dietary lipid regulation of fatty acid synthesis in the mammary epithelium. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299: 918–927.

-
- ²⁸ Barber T. et al. Arteriovenous differences of amino acid across the Mammary gland. *J Nutr* 1999; 129:928-933
- ²⁹ Barracos VE. Integration of amino acid metabolism during intense lactation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9:48-52.
- ³⁰ Hyde R, Taylor P, Hundal H. Amino acid transporters: Roles in amino acid sensing and signaling in animal cells. *Biochem J* 2003; 373: 1-18.
- ³¹ Kilberg M, Stevens B, Novak D. Recent advances in mammalian amino acid transport. *Annu Rev Nutr* 1993; 13: 137-165.
- ³² Trottier NL. Nutritional control of amino acid supply to the mammary gland during lactation in the pig. *Proc Nutr Soc* 1997; 56: 581–591.
- ³³ Shennan D. Mammary gland membrane transport systems. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998; 3: 247–258.
- ³⁴ Braumrucker CR. Nutrient uptake across the mammary gland. Amino acid transport systems in bovine mammary tissue. *J Dairy Sci* 1985; 68: 2436-2461.
- ³⁵ López A, Torres N, Ortiz V, Alemán G, Hernández-Prado R, Tovar AR. Characterization and regulation of the gene expression of amino acid transport system A (SNAT2) in rat mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291:1059-1066.
- ³⁶ Tovar AR, Becerril E, Hernandez-Pando R, Lopez G, Suryawan A, De Santiago S, Hutson SM, Torres N. Localization and expression of BCAT during pregnancy and lactation in the rat mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: 480–488.
- ³⁷ Oxender DL, Christensen HN. Distinct mediating system for the transport of neutral amino acids by Ehrlich cell. *J Biol Chem* 1963; 238: 3686-3699.
- ³⁸ Tovar A, Avila E, De Santiago S, Torres N. Characterization of methylaminoisobutyric acid transport by system A in rat mammary gland. *Metabolism* 2000; 49:873-879.
- ³⁹ Gazzola F, Visigalli R, Bussolatti O, Dll'Asta V, Franchi R. Adaptative increase of amino acid transport system A requires ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 28922-28928.
- ⁴⁰ Pali S, Chen H, Kilberg M. Transcriptional control of the human SNAT2 system A transporter gene by amino acid availability is mediated by an intronic element. *J Biol Chem* 2004; 279: 3463-3471
- ⁴¹ Zhang Z, Alberts T, Fiumera H, Gameiro A, Grewer C. A conserved Na⁺ binding site of the sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2). *J Biol Chem* 2009; 284: 25314-25323.

-
- ⁴² Ortiz V, Alemán G, Escamilla-Del-Arenal M, Recillas-Targa F, Torres N, Tovar AR. Promoter characterization and role of CRE in the basal transcription of the rat SNAT2 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 300:1092-1102.
- ⁴³ Hyde R, Peyrollier K, Hundal H. Insulin promotes the cell surface recruitment of the SNAT2/ATA2 system A amino acid transporter from an endosomal compartments in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 13628-13634.
- ⁴⁴ Hatanaka T, Hatanaka Y, Tsuchida J, Ganapathy V, Setou M. Amino acid transporter ATA2 is stored at the trans-Golgi network and released by insulin stimulus in adipocytes. *J Biol Chem* 2006; 281: 39273-39284.
- ⁴⁵ Franchi R, Sala R, Bussolatti O, Di'Asta V, Rotoli B, Gazzola G. The adaptative regulation of amino acid transport system A is associated to change in ATA₂ expression. *FEBS Letters* 2001; 490: 11-14.
- ⁴⁶ Higginbotham A, White D. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J Nutr* 2000; 130: 514-521.
- ⁴⁷ Celi P, Di Trana A, Claps S. Effects of perinatal nutrition on lactational performance, metabolic and hormonal profiles of dairy goats and respective kids. *Small Rum Res* 2008; 79:129–136.
- ⁴⁸ Norgaard JV, Nielsen MO, Theil P, Sorensen MT, Safayi S, Sejrsen K. Development of mammary glands of fat sheep submitted to restricted feeding during late pregnancy. *Small Rum Res* 2008; 16:155–165.
- ⁴⁹ Van Straten E, Bloks V, Huijkman N, Baller JF, Van Meer H, Lu'tjohann D, Kuipers F, Plo'sch T. The liver X-receptor gene promoter is hypermethylated in a mouse model of prenatal protein restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298:275–282.
- ⁵⁰ Garcia-Souza EP, Vargas S, Barreto G, Lages A, Sampaio M, Sanchez A, Barja-Fidalgo C. Maternal protein restriction during early lactation induces GLUT4 translocation and mTOR/Akt activation in adipocytes of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295: 626–636.
- ⁵¹ Guan H, Arany E, Van Beek J, Chamson-Reig A, Thyssen S, Hill D, Yang K. Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: 663–673.
- ⁵² Reeves P, Nielsen F, Fahey G. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. American Institute of Nutrition 1993:1939-1951.

-
- ⁵³ Muller P, Janovjak H, Miserez A, Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* 2002; 32: 1372-1379.
- ⁵⁴ Vinueza-Burgos C. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular (Real Time PCR: the new age of cellular genetic information). *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria* 2009; 10: 1695-1704.
- ⁵⁵ Burnette W. Western Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochem* 1981; 112: 195-203.
- ⁵⁶ Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L. Laboratory methods in Histotechnology. *American Registry of Pathology* 2000: 39-41.
- ⁵⁷ Ferré O. Regulation of gene expression by glucose. *Proc Nutr Soc.* 1999; 58:621-630.
- ⁵⁸ Bogan JS, Kandror KV. Biogenesis and regulation of insulin-responsive vesicles containing GLUT4. *Curr Opin Cell Biol.* 2010; 22:506-512.
- ⁵⁹ Smith GC, Ong WK, Rewcastle GW, Kendall JD, Han W, Shepherd PR. Effects of Acutely Inhibiting PI 3-kinase Isoforms and mTOR on Regulation of Glucose Metabolism in vivo. *Biochem J* 2011: 3456-3567.
- ⁶⁰ Vernon R. Lipid Metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J Dairy Res* 2005; 72: 460-469.
- ⁶¹ Zhong B, Sakai S, Saeki T, Kanamoto R. Excess leucine intake induces serine dehydratase in rat liver. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000; 71:2614-2617
- ⁶² Clowes E, Aherne F, Baracos V. Skeletal muscle protein mobilization during the progression of lactation. *Am J Endocrinol Metab* 2005; 288: 564-572.
- ⁶³ Kwon DH, Kang W, Nam YS, Lee MS, Lee IY, Kim HJ, Rajasekar P, Lee JH, Baik M. Dietary protein restriction induces steatohepatitis and alters leptin/signal transducers and activators of transcription 3 signaling in lactating rats. *J Nutr Biochem* 2011:4567-4654.
- ⁶⁴ Chotechuang N. mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297:1313-1323.

12. ANEXOS

ANEXO I – Extracción de RNA con Tiocianato de Guanidina y Cloruro de Cesio

DIA 1

1. Se limpió el área de trabajo con etanol y DEPC
2. Se encendieron y ajustaron las centrifugas
 - Centrifuga: 15 min, 18°C, 23700 g (Rotor JA-20 14000 rpm)
 - Ultracentrífuga: 18 h, 18°C, 29000 rpm
3. Se colocaron las 6 camisas delgadas en el rotor de la centrífuga.
4. Se colocaron 40 tubos falcon en una gradilla y se agregó agua DEPC a cada uno.
5. Se colocaron tubos Corex de 30 ml en una gradilla y agregaron 8ml de Tiocianato de guanidina con una pipeta estéril desechable.
6. Se agregaron 56 µl de β mercaptoetanol a cada tubo (en la campana).
7. Se taparon los tubos con papel aluminio y se dejaron en la campana.
8. Se sacaron tejidos del ultracongelador y se colocaron en nitrógeno líquido.
9. Se agregó 500 mg de tejido en cada tubo y se homogenizó con Politron (nivel 3 y previamente lavado x6). Se lavó 6 veces con agua DEPC después de cada muestra.
10. Se agregaron 400 µl de sarcosil 10% por la pared del tubo.
11. Se mezcló cada tubo con el homogenizado por inversión 1 vez.
12. Se centrifugó por 15min, 18°C, a 23700 g (Rotor JA-20 14000 rpm).
13. En tubos de polialómero, se agregaron 4 ml de cloruro de cesio.
14. Se sacaron los tubos de la centrífuga y se tomaron 8 ml de sobrenadante y se vertieron suavemente por las paredes del tubo de polialómero para no romper el gradiente.

15. Se colocaron las muestras en las camisas de la ultracentrífuga y se atornilló la tapa.
16. Se engancharon las camisas al rotor y revisaron que estuvieran bien fijadas.
17. Se encendió el vacío y se centrifugó 18 h, 18°C a 29000 rpm.

DIA 2

1. Se apagó el vacío y se retiraron las muestras de la ultracentrífuga.
2. Se destaparon las camisas y extrajeron los tubos con una aguja.
3. Se vertió el sobrenadante en un vaso y se dejaron invertidos en una gradilla.
4. Se cortaron los tubos de polialómero a 2 cm de la base con un cutter.
5. Se disolvió la pastilla con 200 µl de agua DEPC pipeteando suavemente.
6. Se pasó el sobrenadante a un tubo eppendorf y se agregaron otros 200 µl de agua DEPC.
7. Se dio vortex hasta disolver la pastilla por completo.
8. Se agregaron 30 µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 750 µl de etanol 100% frío.
9. Se dio vortex y se almacenó a -70°C por 24hrs.

DIA 3

1. Se encendió la microcentrifuga y se ajustó 30 min, 4°C, 12500 g (14000 rpm).
2. Se sacaron las muestras del ultracongelador y se descongelaron en hielo.
3. Se centrifugaron las muestras 30 min, 4°C, 12500 g (14000 rpm).
4. Se desechó etanol cuidando de no desprender la pastilla y se dejaron escurrir por inversión.

5. Se añadió 1 ml de etanol al 70% frío y se dió vortex hasta desprender la pastilla.
6. Se centrifugaron las muestras 30 min, 4°C, 12500 g (14000 rpm).
7. Se tiró el etanol y se secó el borde del tubo.
8. Se resuspendieron con 500 µl de agua DEPC y se dio vortex hasta disolver completamente.
9. Se almacenó a -70°C.

ANEXO I.1 – Reactivos para extracción de RNA con Tiocianato de Guanidina

- Tiocianato de Guanidina

Tiocianato de Guanidina	236.32 g
Citrato de sodio 1M, pH 7	12.5 ml
Agua DEPC	Aforar a 500 ml

Se calentó a baño maría por 30 min a 40°C y se enfrió en hielo. Se esterilizó por filtración con membrana de nylon 0.22 µm y se guardó a 4°C.

- Cloruro de Cesio

Cloruro de cesio	230 g
Acetato de sodio 3M, pH 5.2	2 ml
Agua DEPC	Aforar a 250 ml

Se esterilizó por filtración con membrana de nylon 0.22 µm y se guardó a temperatura ambiente.

- Acetato de sodio 3M

Acetato de sodio	20.415g
Agua DEPC	Aforar a 50ml

Se esterilizó por filtración con membrana de nylon 0.22 µm y se guardó a temperatura ambiente

- Lauril Sarcosina 10%

N-Lauroilsarcosina sal de sodio	10 g
Agua DEPC	Aforar a 100 ml

Se mezcló por 1 hora hasta disolver y se dejó reposar 15 min. Se esterilizó por filtración con membrana de nylon 0.22 μm y se guardó a temperatura ambiente

ANEXO II – Cuantificación de RNA

- Se midió la absorbancia a 260 nm por espectrofotometría.
 1. Se incubaron las muestras de RNA a 65°C por 5 min.
 2. Se colocaron 2 μl de la muestra de agua DEPC y se hizo la lectura del blanco.
Se limpió la superficie de lectura con paño Kimwipe.
 3. Se colocaron 2 μl de la cada muestra de RNA y se llevó a cabo la lectura.
 4. Las lecturas se realizaron en el nano-drop de Thermo Scientific.
- Para corroborar la pureza del RNA, se obtuvo la relación 260/280nm que debe ser entre 1.9 y 2.2.
- Se obtuvo la cuantificación del RNA en $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ de muestra.
- Se ajustó a la concentración deseada para correr la electroforesis

ANEXO III – Electroforesis de RNA

a) PREPARACION DEL GEL DE AGAROSA 1.5%

1. Se lavó la cámara de electroforesis, el peine y la caja con agua DEPC. Se colocó la cámara en la campana para equilibrar.
2. Se pasaron 1.5 g de agarosa grado biología molecular en papel aluminio y se agregó a un matraz.
3. Se midieron 72 ml de agua y se agregaron al matraz con la agarosa.
4. Se disolvió calentando en microondas y agitando lentamente.
5. Se dejó enfriar a 50°C y se agregaron 10 ml de MOPS 10X y 18 ml de formaldehído.
6. Se vació en la cámara de electroforesis y se dejó solidificar 1 hora.
7. La cámara se cubrió con plástico hasta que las muestras estuvieran listas.

b) PREPARACION DE MUESTRAS Y ELECTROFORESIS

1. Se incubó el RNA a 65°C por 5 min.
2. Se hizo una dilución del RNA en agua estéril a una concentración de 7.5 µg/µl de cada muestra y se colocaron en hielo.
3. En tubos eppendorf nuevos se agregó:

MOPS 10X	2 µl
Formaldehído	4 µl
Formamida	10 µl
Bromuro de etidio	1 µl
RNA total (7.5µg/µl)	2 µl
4. Se dejó incubando la reacción 10 min a 75°C

c) CARGADO Y CORRIMIENTO DEL GEL

1. Se llenó la cámara de electroforesis con MOPS 1x frío hasta 1mm por arriba del gel.

2. Se pre corrió el gel 5 min a 95 volts.
3. Se sacaron las muestras y se enfriaron en hielo por 10 min. Se les dio un spin.
4. Se añadió 2 µl de Loading Buffer a cada tubo y se mezcló por pipeteo.
5. Se cargaron las muestras en el gel de agarosa y se corrieron 2.5 h a 95 volts.

d) FOTOGRAFÍA DEL GEL

Se visualizó el gel en el transluminador sobre plástico adherible y se tomó una foto (Kodak, Digital Imaging). Se observó la banda 28 S dos veces más brillante que la 18 S en RNA no degradado.

ANEXO IV – RT por MMuLV

Se colocaron en hielo los reactivos y soluciones:

- Buffer RT 5x
- dNTPs 2 mM
- Oligo dT (1:5)
- DTT 0.1 M
- Agua estéril
- RNA total

1. Se colocaron los tubos eppendorf en una gradilla y se rotularon.
2. Se encendió el termociclador.
3. Se agregó el agua estéril y la muestra de RNA a cada tubo:
5 µg de RNA en un volumen de 3.75 µl
4. Se preparó el Mix con los demás reactivos en un tubo eppendorf de 1.5 ml con el volumen para el número de reacciones más 1.
5. Se agregó el Mix a cada tubo con la muestra de RNA.
6. Se corrió en el programa del termociclador (42°C 1 h, 95°C 5 min, 4°C 10 min)

PREPARACIÓN DEL MIX

1. Se descongelaron los reactivos.
2. Se añadió cada reactivo mezclando por pipeteo:

Reactivo	Por reacción (µl)
Buffer de RT 5x	4
Mezcla de dNTPs	4
Oligo dT	2
DTT	2

3. Se sacaron las enzimas del refrigerador sin agitar. Se agregaron las enzimas al Mix pipeteando suavemente:

Inhibidor de RNasas	1
RT (M-MuLV)	0.5

ANEXO V – PCR tiempo real por Taq DNA polimerasa (Invitrogen)

Se colocaron en hielo los reactivos y soluciones:

- Buffer PCR (10x)
- MgCl₂ 25 mM
- dNTPs 10 mM
- Upper y lower primers 20 µM
- Agua DEPC
- Producto de RT → cDNA

1. Se encendió el termociclador.

- Se preparó un mix con el número de reacciones más 1 en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Cada reactivo se descongeló, se mezcló por vórtex y se depositó en el fondo del tubo, pipeteando para mezclar.

Reactivo	Por reacción (µl)
Buffer PCR (10x)	2.5
MgCl ₂ 25 mM	1.5
dNTPs 10 mM	1
Upper primer	1
Lower primer	1
Agua DEPC	15.5

- Se sacó la enzima del refrigerador SIN AGITAR y se depositó en el fondo del tubo, pipeteando para mezclar.

Reactivo	Por reacción (µl)
Taq DNA polimerasa	0.5

- Se agregó la muestra de DNA complementario (cDNA) mezclando por pipeteo.

Reactivo	Por reacción (µl)
Producto de RT → cDNA	2

VOLUMEN FINAL: 25 µl

6. Se programó el equipo y se corrieron los programas de la siguiente manera:

Programa	#ciclos	descripción
6	1	95°C 5 min; TA 1 min: 72°C 1 min 30 seg
7	33	95°C 1 min; TA 1 min: 72°C 1 min 30 seg
8	1	95°C 1 min; TA 1 min: 72°C 7 min 30 seg
9	-	4°C

ANEXO VI- Preparación de la solución buffer para extracción de proteína del tejido mamario, hígado y tejido adiposo.

Tabla 4. Buffer de lisis RIPA

RIPA	ml							
		10	50	100	150	200	250	500
PSB 1X	ml	9.9	49.5	99	149	198	248	495
NP-40 al 1%	ml	0.1	0.5	1	1.5	2	2.5	5
Deoxicolato de sodio al 0.5%	g	0.05	0.25	0.5	0.75	1	1.25	2.5
SDS 0.1%	g	0.01	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.5
Azida de sodio al 0.006%	g	0	0	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03

Se pesaron todos los ingredientes y se mezclaron con agitador. Se filtró la solución y se guardó a 4°C y protegido de la luz.

Al momento de usarse para la extracción de proteína se agregaron las pastillas de inhibidores de proteasas (se agregó 1 por cada 10 ml).

ANEXO VII- Técnica Western Blot para separación de proteínas

1) Preparación de geles

Se lavaron las cámaras con agua destilada y posteriormente se limpiaron con alcohol etílico (ETOH). Se montaron las cámaras asegurándose de que los soportes detuvieran correctamente los vidrios. Se dibujó una línea de 5 centímetros sobre el vidrio chico con el peine. Se preparó el gel de acuerdo al porcentaje en tubo falcón (los porcentajes se muestran en la tabla 5). Se vació el gel de separación y se adicionó lentamente isopropanol. El gel tardó 20 minutos en polimerizar, después de este tiempo se retiró el isopropanol y se secó con cuidado con un papel filtro. Posteriormente se vació el gel de concentración, se introdujo el peine y se esperó otros 20 minutos a que polimerizara. Se retiró el peine y se lavó con agua desionizada. Al final los geles se colocaron en la cámara y se agregó el buffer de corrida.

Tabla 5. Reactivos para preparación de los geles de Western Blot

Reactivos	Gel de separación		Gel de concentración	
	8%		4%	
	2 geles	4 geles	2 geles	4 geles
H ₂ O destilada (ml)	7.44	14.88	3.6	7.2
Acrilamida (ml)	4.32	8.64	0.8	1.6
Tris 1.5M pH 8.8 (ml)	4	8		
Tris 1M pH 6.8 (ml)			1.5	3
SDS 10% (μL)	160	320	60	120
APS (persulfato de amonio) 10% (μL)	80	160	30	60
TEMED (μL)	16	32	12	24

El porcentaje que se usó dependió del tamaño de la proteína. * Se agregó todo en tubos falcon, excepto el APS 10% y el temed. Una vez polimerizado el gel de separación, se agregó el APS 10% y el temed al gel de concentración.

2) Preparación de muestras

Las muestras se ajustaron a 12.5 μL con buffer RIPA en tubos eppendorf de tal manera que de todas las muestras se cargara la misma cantidad de proteína (50 μg). Se agregaron 12.5 μL de buffer de carga. Todas las muestras se calentaron 5 minutos a una temperatura de 80°C y posteriormente se colocaron unos segundos en la microcentrífuga. Se cargaron 25 μL de cada muestra en el gel al igual que 15 μL de marcador en el primer pozo el cual sirve para identificar el peso molecular según el color del arcoíris. Se corrió en una fuente de poder a 75 volts por 30 minutos para concentrar y posteriormente a 100 volts por 120 minutos para separar las proteínas.

3) Transferencia

Se cortaron las membranas PVDF de un tamaño de 6 x 8 centímetros. Se sumergieron en metanol por 15 segundos y posteriormente en agua destilada por 5 minutos. Las membranas, el gel y los filtros se sumergieron en buffer de transferencia por 20 minutos y se colocaron en el transblot de la siguiente manera: filtro \rightarrow membrana \rightarrow gel \rightarrow filtro. Se corrieron a 15 volts en la fuente de poder por 30 minutos. Después se tiñeron y destiñeron los geles con solución de tinte para asegurar que la transferencia fue completa. Las membranas se lavaron con TBS tween.

4) Bloqueo e incubación con anticuerpos

Se agregaron 5 ml de solución de bloqueo (leche al 5%) a cada membrana y se agitó suavemente a 120 rpm por 1 h a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces cada membrana con 5 ml de TBS tween a 150 rpm por 5 min. Se agregó la solución de anticuerpo primario (anticuerpo de interés a la dilución adecuada en solución blotto). SNAT2 1:800, FAS 1:3000, Actina 1:1000. Se agitó suavemente a 120 rpm overnight a 4°C y posteriormente se dejó 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas por 10 min con TBS tween 3 veces a 150 rpm. Se agregó la solución del anticuerpo secundario haciendo una dilución 1:3000. Se incubó por 160 minutos a 120 rpm a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas por 10 min con TBS tween 3 veces a 150 rpm.

4) Revelado

Las membranas se colocaron en un recipiente con parafilm. Se agregó el revelador mezclando los reactivos A y B (ECL Immobilon Western (millipore) 1:1) y se dejó reposar

por 5 minutos. Las membranas fueron secadas nuevamente y colocadas en un cassette para revelar en placas en un cuarto oscuro.

ANEXO III- Deshidratación, Limpieza e Infiltración del tejido.

Las muestras de tejido en los cassettes colocados en formalina, se pasaron a un recipiente con agua, posteriormente se les dio el siguiente tratamiento.

1. Se colocaron una hora en alcohol al 96 %.
2. Se cambiaron a alcohol absoluto y se dejaron una hora.
3. Se pasaron una hora en una solución de alcohol 75% y xilol 25%.
4. Se transfirieron a una solución de alcohol 50% y xilol 50% y se dejaron una hora.
5. Se cambiaron a una solución de xilol 75% y alcohol 25% por una hora.
6. Se pasaron a la parafina 1 por una hora.
7. Se cambiaron a la parafina 2 por otra hora
8. Se transfirieron a la parafina 3 esperando una hora.