



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UNA DIETA ALTA
EN GRASA EN MODELO DE RATA SOBRE LA
EXPRESIÓN EN ISLOTOS DE LANGERHANS DE
LOS GENES *Abca1*, *Rxra*, *Lxrβ* y *Pparγ*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

ANDREA JIMÉNEZ GARCÍA

Tutor: Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta

MÉXICO, D. F.

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.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1 Programación fetal.....	3
3.2 Dieta alta en grasa durante gestación y lactancia.....	5
3.3 Desarrollo del páncreas en roedores.....	8
3.4 Metabolismo del colesterol.....	12
3.5 <i>Abca1</i> y factores de transcripción regulatorios.....	14
3.6 El papel de ABCA1 en la diabetes.....	17
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	23
5.1 Objetivo General.....	23
5.2 Objetivos Específicos.....	23
6. METODOLOGÍA.....	24
6.1 Dietas experimentales.....	24
6.2 Animales de experimentación.....	24
6.2.1 Grupos experimentales.....	24
6.2.2 Manejo de las crías.....	25
6.2.3 Medidas somatométricas.....	26
6.3 Ensayos.....	26
6.3.1 Obtención de suero.....	26
6.3.2 Aislamiento de islotes de Langerhans.....	26
6.3.3 Extracción de RNA de Islotes de Langerhans.....	28
6.3.4 Síntesis de cDNA.....	28
6.3.5 Diseño de oligonucleótidos.....	29
6.3.6 Tiempo-real RT-PCR.....	29
6.3.7 Determinaciones bioquímicas.....	30
6.4 Análisis estadístico.....	32
7. RESULTADOS.....	33
7.1 Resultados maternos.....	33
Peso y consumo de alimento materno.....	33

Resultados bioquímicos.....	37
7.2 Resultados de las crías.....	38
Medidas somatométricas.....	38
Resultados bioquímicos.....	39
Resultados de expresión genética.....	41
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	43
9. CONCLUSIÓN.....	51
10. PERSPECTIVAS.....	53
11. BIBLIOGRAFÍA.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

Figuras

Figura 3.2.1 Resumen esquemático de los cambios en el hígado de los genes reguladores de la biosíntesis y oxidación de lípidos.....	7
Figura 3.3.1. Anatomía del páncreas.....	9
Figura 3.4.1 Transporte reverso del colesterol.....	13
Figura 3.5.1 Flujo inverso del colesterol mediado por el transportador ABCA1.....	14
Figura 6.2.1 Clasificación de 6 grupos experimentales según la dieta administrada.....	25
Figura 6.3.2.1 Gradiente de Ficoll para la separación de islotes de Lagerhans.....	27
Figura 6.3.2.2 Islotes de Langerhans.....	27
Figura 6.3.3.1 Electroforesis en gel de agarosa para RNA de Islotes de Langerhans.....	28

Tablas

Tabla 3.5.1 Regulación de la expresión de <i>ABCA1</i>	17
Tabla 6.1.1. Dietas experimentales.....	24
Tabla 6.3.5.1 Secuencia de oligonucleótidos para <i>Abca1</i> , <i>Rxra</i> , <i>Lxrβ</i> y <i>Pparγ</i> en <i>Rattus norvegicus</i>	29
Tabla 6.3.6.1 Secuencia de oligonucleótidos para <i>Hprt</i> en <i>Rattus norvegicus</i>	30
Tabla 7.1.1 Consumo total de alimento materno en los diferentes grupos experimentales durante los períodos de gestación y lactancia.....	36
Tabla 7.1.2 Resultados bioquímicos en el suero materno.....	37

Tabla 7.2.1 Medidas somatométricas de las crías al día 1 postnatal.....	38
Tabla 7.2.2 Medidas somatométricas de las crías al día 21 postnatal.....	39
Tabla 7.2.3 Resultados bioquímicos en suero de las crías al día 1 postnatal.....	39
Tabla 7.2.4 Resultados bioquímicos en suero de las crías al día 21 postnatal.....	40

Gráficas

Gráfica 7.1.1 Peso materno registrado durante la gestación y lactancia.....	33
Gráfica 7.1.2 Δ de peso materno durante la gestación.....	34
Gráfica 7.1.3 Δ de peso materno durante la lactancia.....	34
Gráfica 7.1.4 Consumo de alimento materno registrado durante la gestación y lactancia.....	35
Gráfica 7.1.5 Consumo materno de kilocalorías totales durante la gestación.....	36
Gráfica 7.1.6 Consumo materno de kilocalorías totales durante la lactancia.....	37
Gráfica 7.2.1 Expresión relativa de los genes <i>Abca1</i> , <i>Rxra</i> , <i>Lxrβ</i> y <i>Pparγ</i> al día 1 postnatal.....	41
Gráfica 7.2.2 Expresión relativa de los genes <i>Abca1</i> , <i>Rxra</i> , <i>Lxrβ</i> y <i>Pparγ</i> al día 21 postnatal.....	42

ABREVIATURAS

ABCA1	Casete transportador de unión a ATP A1
AACS	Acetoacetil coenzima A sintetasa
AAP	Aminoantipirina
ABC	Casete de unión a ATP
ACC1	Acetil coenzima A carboxilasa 1
Acil-CoA	Acil coenzima A
ACLY	ATP citrato liasa
Acot 3	Acil coenzima A tioesterasa 3
Acot1	Acil coenzima A tioesterasa 1
AdipoR1	Receptor de adiponectina 1
AdipoR2	Receptor de adiponectina 2
AG	Ácidos grasos
AMP	Adenosín monofosfato
AMPK	Proteincinasa activada por AMP
ANOVA	Análisis de varianza de una sola vía
ApoA1	Apolipoproteína A1
ApoB	Apolipoproteína B
ATP	Adenosín trifosfato
cDNA	DNA complementario
CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
cHDL	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
CHREB	Proteína de unión en respuesta a hidratos de carbono
CICUAL	Comité interno de cuidado y uso de animales de laboratorio
cLDL	Colesterol de lipoproteínas de baja densidad
CPT-1a	Carnitin palmitoiltransferasa 1a
CT	Ciclo umbral
cVLDL	Colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad
CYP4A	Citocromo P450
DAP	Dihidroxiacetona fosfato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
Elov6	Elongasa de ácidos grasos 6
ES	Error estándar
FADS1	Desaturasa de ácidos grasos 1
FASN	Ácido graso sintasa

FGF21	Factor de crecimiento de fibroblasto 21
G3P	Glicerol 3 fosfato
GK	Glucocinasa
GLUT-2	Transportador de glucosa 2
GOD	Glucosa oxidasa
GPO	Glicerol fosfato oxidasa
Grb2	Proteína de unión del receptor de factor de crecimiento 2
GTT	Prueba de tolerancia a la glucosa
H3	Histona 3
H4	Histona 4
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HFD	Dieta alta en grasa
HMW	Alto peso molecular
Hprt	Hipoxantina guaninafosforribosiltransferasa
IFN- γ	Interferón gama
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
IR- β	Receptor de insulina beta
IRS1	Receptor de insulina 1
K	Potasio
Kcal	Kilocaloría
LCAT	Lecitina colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDL-R	Receptor de lipoproteína de baja densidad
Lxr β	Receptor de hígado X beta
MAPK	Proteincinasa activada por mitógeno
ME1	Enzima málca 1
Mg	Miligramo
mRNA	Ácido ribonucléico mensajero
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NPY	Neuropéptido Y
pAKT	Cinasa AKT o proteín cinasa b
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PK	Piruvato cinasa
PKC	Protein cinasa C
PLD2	Fosfolipasa 2
POD	Peroxidasa

PP	Polipéptido pancreático
PPAR- α	Receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa
Ppar γ	Receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma
Pxmp4	Proteína de membrana peroxisomal 4
R230C	Arginina 230 Cisteína
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especie reactiva de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
Rxr α	Receptor X retinoides alfa
SNAP	Proteína soluble de unión a SNF
SNARE	Receptor soluble de unión a SNF
SNF	Factor sensible de N-etilmaleimida
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SR-BI	Receptor de unión a esteroides tipo 1
SREBP-1	Proteína de unión del elemento regulador por esteroides
TBHB	Ácido tribromobenzoico
TGF- β	Factor de crecimiento transformante
TMD	Dominio transmembranal
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TR- PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
VAMP	Proteína de membrana asociada a vesícula
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

1. RESUMEN

Antecedentes: La incidencia de obesidad y diabetes ha aumentado de manera significativa en nuestro país durante los últimos años. El desarrollo de estas patologías es multifactorial, y se sabe que el consumo alto en grasa y la genética están altamente implicados. El mecanismo molecular de la disfunción de las células β es incierto, sin embargo, recientemente se descubrió que el transportador para el flujo reverso del colesterol (ABCA1) es relevante en la función de la célula β . En ratones knockout para *Abca1*, el colesterol se acumula en las células β y disminuye significativamente la secreción de insulina. Este transportador es regulado por los factores de transcripción, *Rxra*, *Lxr β* y *Ppar γ* . No se sabe si esta cadena de genes puedan ser afectados mediante programación en períodos críticos del desarrollo como la gestación y lactancia debido a la alimentación materna y aumentar la susceptibilidad a la diabetes. Por esta razón, la evaluación de estos genes, su asociación con la diabetes y el consumo de una dieta alta en grasa, puede contribuir a la investigación del desarrollo de la enfermedad que actualmente es la primera causa de muerte en nuestro país.

Objetivo: Evaluar la expresión de los genes *Abca1*, *Rxra*, *Lxr β* y *Ppar γ* en Islotes de Langerhans de crías macho al día postnatal 1 y 21 cuyas madres fueron alimentadas con dieta alta en grasa durante la gestación y/o lactancia así como determinaciones de parámetros bioquímicos.

Hipótesis: El consumo de una dieta alta en grasa durante la gestación y/o lactancia generará un ambiente intrauterino subóptimo que alterará la expresión de *Abca1*, *Rxra*, *Lxr β* y *Ppar γ* en los islotes de Langerhans asociándose a un mayor riesgo al desarrollo de diabetes tipo 2.

Metodología: Se utilizaron ratas Sprague Dawley hembras y se administró una dieta alta en grasa (18% proteína, 28% grasa y 30% hidratos de carbono) y control (18% proteína, 6.2% grasa y 44.2% hidratos de carbono) durante los períodos de gestación y/o lactancia. Se evaluaron las crías macho al día 1 y 21 postnatal, obteniendo 6 grupos experimentales: "Control" y "Grasa" para el día 1 postnatal y CC, CG, GC y GG para el día 21 postnatal (la primera letra representa la dieta materna durante la gestación y la segunda letra la dieta durante la lactancia). La expresión de los genes *Abca1*, *Rxra*, *Lxr β* y *Ppar γ* se midió por PCR-Tiempo Real en islotes de Langerhans. Se evaluó por determinación enzimática los parámetros de glucosa, colesterol, triacilglicéridos y colesterol HDL en suero plasmático. Los valores de insulina se determinaron por un inmunoensayo ELISA.

Resultados: Las crías al día 1 de nacimiento no presentaron cambios significativos. Al día 21 postnatal el grupo CG obtuvo un aumento significativo en la glucosa plasmática. El grupo GG incrementó los valores de colesterol HDL e insulina a causa del consumo materno de dieta alta en grasa. El grupo GC presentó una disminución significativa en la expresión del gen *Abca1* en islotes pancreáticos.

Conclusiones: El consumo materno de dieta alta en grasa durante gestación y/o lactancia lleva a las crías a presentar altas concentraciones de HDL (grupo GG), glucosa (grupo CG) e insulina (grupo GG), reflejando las dos últimas un fenotipo asociado a diabetes tipo 2 en la adultez. La disminución de la expresión del gen *Abca1* en el grupo GC, refleja una posible programación fetal en los islotes de Langerhans desde etapas tempranas del desarrollo asociándose a mayor riesgo a diabetes en la vida adulta.

2. INTRODUCCIÓN

En México, el 70% de la población mexicana presenta sobrepeso u obesidad y estas condiciones pueden llevar a los individuos a desarrollar diabetes tipo 2 y enfermedades coronarias. El país actualmente está enfrentando un cambio de alimentación, donde la dieta occidental, así como las enfermedades del primer mundo como diabetes y obesidad, están tomando fuerza en los problemas de salud. El consumo de dietas ricas en grasas están programando a la población a desarrollar enfermedades del primer mundo, alterando también a las futuras generaciones. En modelos animales se observa como el consumo de una dieta alta en grasa durante el embarazo predispone a las crías a una alteración en el metabolismo de lípidos y hidratos de carbono (Zambrano et al, 2010). Por lo tanto, este

Un ambiente adverso intrauterino, como el consumo de dieta alta en grasa durante la gestación, lleva a un fenotipo similar a la diabetes en las ratas adultas. Esto se puede deber a una disfunción en los islotes del páncreas. El transportador ABCA1 (ATP-binding cassette transporter ABCA1) medía el flujo de colesterol inverso hacia lipoproteínas de alta densidad (HDL). El papel del transportador en la función del páncreas se descubrió cuando se observó que ratas knockout de *Abca1* presentaban intolerancia a la glucosa (Brunham, Kruit et al. 2007). Por lo tanto, este transportador está presente en el páncreas y juega un papel relevante en el metabolismo del colesterol. Se ha asociado una disminución de la expresión de *Abca1* a una acumulación de colesterol en los islotes de Langerhans y por lo tanto intolerancia a la glucosa y disminución en la secreción de insulina (Brunham et al, 2008). El gen está regulado por factores de transcripción involucrados en el metabolismo de lípidos como son el RXR α , LXR β y PPAR γ .

El proyecto realizado tiene como objetivo evaluar la alteración de la expresión en islotes pancreáticos del transportador *Abca1* y los factores de transcripción *Rxr*, *Lxr β* y *Ppar γ* en el modelo de rata macho cuyas madres fueron alimentadas con dieta alta en grasa durante la gestación y/o lactancia, así como evaluar parámetros bioquímicos del metabolismo de hidratos de carbono y lípidos. Las mediciones se harán al día postnatal 1 y 21 postnatal para evaluar el efecto en los islotes durante la programación fetal y postnatal de la madre a la exposición de dieta alta en grasa.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Programación fetal

En el año de 1997, David J.P. Barker creó la teoría de la programación fetal. Sugirió que durante la gestación, el feto debe adaptarse a un aporte de nutrimentos limitada lo cual causará un cambio permanente en la fisiología y metabolismo. Él propuso que esta programación puede ser el origen de varias enfermedades en la vida adulta (Barker 1990). Actualmente la hipótesis es aceptada y gracias a ella se busca encontrar algunos de los factores causantes de enfermedades. El consumo de una dieta hipercalórica durante la gestación en humanos predispone a los hijos a alterar el balance de energía así como a una alteración en el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos. Existen asociaciones de una ganancia de peso excesiva durante el embarazo con un índice de masa corporal alto en los hijos. La relación entre exposiciones nutricionales en etapas tempranas de la vida y enfermedades en edad adulta pueden ser reguladas por alteraciones al epigenoma (las cuales incluyen metilaciones del DNA y modificaciones en histonas) (Cooper, Khulan et al. 2012). Los mecanismos de este fenómeno, en el origen fetal o la programación de enfermedades, permanecen en estudio. Los mecanismos biológicos no son bien entendidos, sin embargo, se apoya la hipótesis de la regulación epigenética durante el desarrollo y su asociación a enfermedades en el humano (Martínez 2008).

Las modificaciones epigenéticas existen comúnmente de dos tipos: el primero es la metilación del DNA que involucra la modificación de citosinas. El segundo son las modificaciones de la cromatina las cuales ocurren por varias formas, donde principalmente incluyen modificaciones post-traduccionales de las histonas H3 y H4, incluyendo metilación, fosforilación y acetilación (Tamashiro and Moran 2010). Para la mayoría de las células del cuerpo, las marcas epigenéticas se corrigen una vez que las células se diferencian, sin embargo, en algunos estados de desarrollo o en situaciones específicas como algún estado patológico, las células experimentan una reprogramación que involucra la eliminación o modulación de marcas epigenéticas (Nafee, Farrell et al. 2008). Estas marcas pueden alterar significativamente la estructura

de la cromatina y su nivel de compactación, alterando el acceso de la maquinaria de transcripción del DNA.

Los modelos animales son necesarios para entender el desarrollo de la programación en las enfermedades adultas, especialmente en las enfermedades metabólicas que actualmente son la primera causa de muerte en nuestro país, como son la diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares. Permiten analizar cómo las condiciones intrauterinas programan al feto a alteraciones metabólicas en la edad adulta.

Por lo tanto, estas condiciones específicas que se dan en etapas críticas del desarrollo están programado a la población a padecer ciertas enfermedades en la vida adulta. En México , según la Encuesta Nacional de Nutrición 2006, aproximadamente el 70% de la población adulta presenta sobrepeso u obesidad. Esta condición ha ubicado a México en el segundo lugar de prevalencia mundial de obesidad. La prevalencia de obesidad es 46% más alta en mujeres que en hombres (35.5% y 24.3% respectivamente). El consumo de grasas y el cambio en el estilo de vida son algunos de los factores que están cambiando a la población. Actualmente el país presenta enfermedades tanto del tercer mundo, como son la desnutrición y enfermedades infecciosas, y enfermedades del primer mundo, como la diabetes y obesidad. Las principales causas de muerte de la población son la diabetes, enfermedades isquémicas del corazón y las enfermedades cerebro-vasculares. La diabetes es la primera causa de demanda de atención médica en consulta externa, una de las principales causas de hospitalización y la enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de las instituciones públicas (alrededor de 20%) (SSA, 2007).

Existen varios modelos con animales de experimentación que estudian la programación fetal, como son el consumo de dietas hipocalóricas/hipoprotéicas o dietas hipercalóricas/altas en grasa durante la gestación y lactancia. El consumo de una dieta alta en grasa durante el embarazo y la lactancia predispone a las crías a una alteración en el metabolismo de lípidos y hidratos de carbono (Zambrano, Martínez-Samayoa et al. 2010). Las crías expuestas a una dieta alta en grasa por parte de la madre presentan un mayor riesgo a padecer diabetes tipo 2 y obesidad. En México, debido a varios factores y al alto consumo de grasas saturadas, la prevalencia de dislipidemias es de 28.8% en mujeres y 26.5% en hombres (SSA, 2007).

3.2 Dieta alta en grasa durante gestación y lactancia

La dieta es uno de los factores más importantes en el ser humano que pueden prevenir o predisponer a enfermedades. Actualmente, la prevalencia de obesidad y diabetes tipo 2 ha incrementado en el país. El consumo de dietas altas en grasa y de alimentos con alta densidad energética, así como una vida sedentaria, conllevan a la obesidad. En roedores, el consumo de una dieta alta en grasa por largos períodos de tiempo, asemejan el modelo de obesidad y resistencia a la insulina del humano, presentando ganancia de peso, aumento de tejido adiposo y dislipidemias.

El ambiente actual en México está más caracterizado por un exceso nutricional característico de los países occidentales. Las mujeres durante el embarazo consumen una dieta rica en grasas y presentan sobrepeso. Estudios humanos demuestran que una exposición a un consumo excesivo de calorías antes del nacimiento se asocia a obesidad en la vida postnatal, así como el peso al nacer es asociado con el aumento de masa grasa en la vida adulta (Tamashiro y Moran, 2010). Por lo tanto, el consumo de dietas ricas en grasa en el ambiente perinatal y postnatal altera la susceptibilidad de la progenie a un futuro cambio metabólico, en este caso a la obesidad y diabetes.

La variación en la administración de nutrimentos durante las etapas tempranas del desarrollo son una fuerte señal que inician los procesos de adaptación. El medio por el cual los eventos en la vida temprana activan respuestas permanentes se describe como programación metabólica (Langley-Evans 2006). Los estímulos en ventanas críticas del desarrollo generan respuestas permanentes que producen cambios a largo plazo en la estructura o función de los tejidos.

Es necesario utilizar modelos animales para asemejar los desórdenes metabólicos que ocurren en el humano. Los científicos han creado dietas altas en grasa (HFD, high fat diet por sus siglas en inglés) para poder generar roedores obesos. Una dieta alta en grasa promueve la hiperglucemia y resistencia a la insulina. Por lo tanto, la dieta alta en grasa se usa para crear roedores con un fenotipo semejante al síndrome metabólico con resistencia a la insulina y disfunción en las células beta. Sin embargo, no se sabe si los efectos son el resultado de una obesidad materna *per se* o de la dieta consumida para inducir obesidad (Akyol, Langley-Evans et al. 2009). La evidencia científica varía desde los tiempos de exposición a la dieta o el tipo de dieta. La variedad de dietas utilizadas van desde una composición del 20% al 60% de grasa por kilocalorías totales y

utilizando diferentes fuentes como la manteca, aceite de coco o dieta de cafetería. En ratas Wistar y Sprague-Dawley una alimentación rica en grasa lleva eventualmente a hiperglucemia normalmente acompañada de resistencia a la insulina sistémica (Buettner, Scholmerich y Bollheimer 2007). También se ha reportado en la vida adulta, como efectos de la dieta alta en grasa, el aumento en el porcentaje de grasa total, mayor peso del hígado, aumento en glucosa, triacilglicéridos, insulina y leptina así como hiperplasia de adipocitos (Shankar, Harrell et al. 2008).

Los períodos postnatales, como la lactancia, también representan un momento crítico en el desarrollo de las crías. Durante la lactancia, el consumo de grasas por parte de la madre es relacionado linealmente con las concentraciones lipídicas de la leche materna. Los lípidos se transmiten de la leche materna al neonato (Kavanagh, Sajadian et al. 2010). Por lo tanto, durante este período, un cambio de dieta puede afectar considerablemente a las crías. Una vez que las madres recibieron dieta alta en grasa durante la gestación pero dieta control durante la lactancia, las crías experimentan un efecto “catch-up” o crecimiento compensatorio. El catch-up se da cuando se intenta revertir el efecto de la dieta que altera el metabolismo y regresar a la cría a una alimentación normal. En varios artículos se reporta que el catch-up puede ayudar a que niveles elevados de glucosa regresen a los valores normales, sin embargo a largo plazo estos grupos son los más afectados y están asociados a mayor riesgo de diabetes u obesidad (Hermann, Miller et al. 2009). En humanos, el crecimiento compensatorio en niños, está asociado a un aumento en la adipocidad y mayor incidencia de resistencia a la insulina cuando el menor llega a los 5 años de edad (Green, Rozance et al. 2010).

Los efectos metabólicos reportados en la literatura, indican la presencia de un metabolismo lipogénico. En las crías cuyas madres han consumido una dieta alta en grasa o representan un modelo de obesidad, generan un ambiente lipogénico donde se alteran varios genes responsables del metabolismo de los hidratos de carbono, biosíntesis de lípidos y catabolismo de ácidos grasos. Shankar (2010) diseñó un modelo de obesidad por consumo hipercalórico previo y durante la gestación. Las crías al día 21 postnatal presentan un aumento en niveles de insulina sérica así como mayor expresión hepática de genes y enzimas lipogénicos (río abajo de la respuesta dada por la proteína SREBP-1, proteína de unión al elemento regulador por esteroides tipo 1) y menor expresión de genes reguladores del catabolismo de lípidos (**Figura 3.2.1**) (Shankar, Kang et al. 2010).

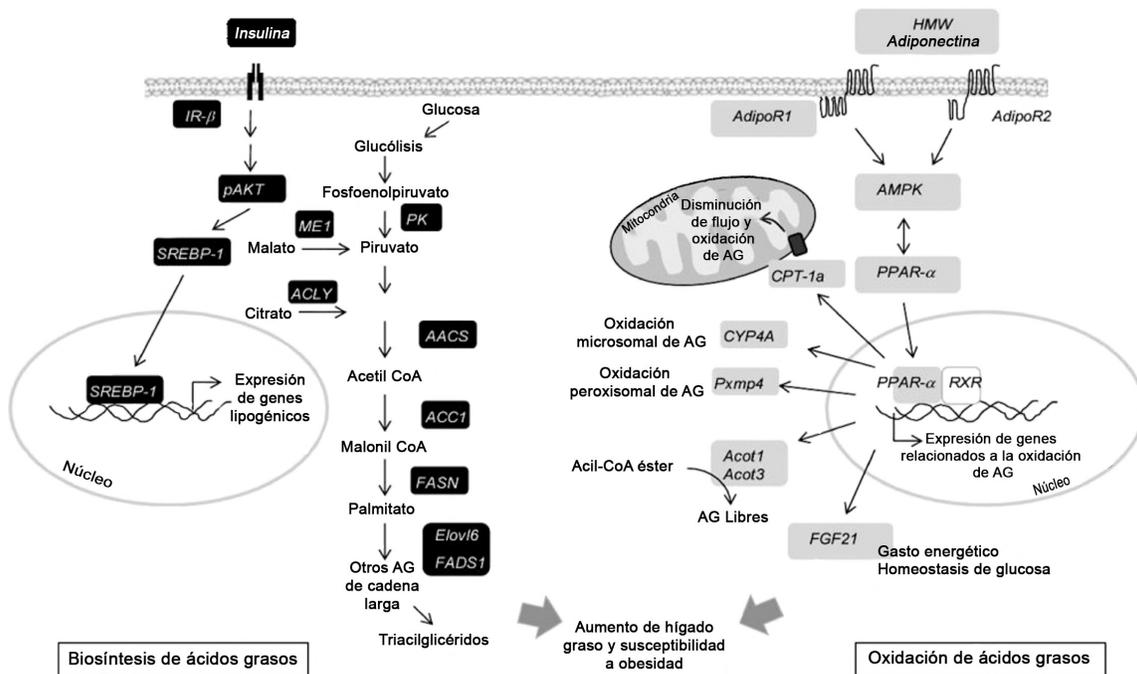


Figura 3.2.1. (Shankar, Kang et al. 2010). Resumen esquemático de los cambios en el hígado de los genes reguladores de la biosíntesis y oxidación de lípidos en crías al día 21 cuyas madres consumieron dieta hipercalórica previo y durante la gestación. Los genes en las casillas negras aumentaron significativamente su expresión mientras que los genes en las casillas grises disminuyeron su expresión. IR-β, receptor de insulina beta; pAKT, conocida como proteína cinasa b; ME1, enzima málica 1; PK, piruvato cinasa; SREBP-1, proteína de unión del elemento regulador por esteroides; ACLY, ATP citrato liasa; AACS, acetoacetil coenzima A sintetasa; ACC1, acetil coenzima A carboxilasa 1; FASN, ácido graso sintasa; Elov6, elongasa de ácidos grasos 6; FADS1, desaturasa de ácidos grasos 1; HMW, alto peso molecular; AdipoR1, receptor de adiponectina 1; AdipoR2, receptor de adiponectina 2; AMPK, proteincinasa activada por AMP; PPAR-α, receptor activado por proliferador de peroxisoma alfa; FA, ácido graso; CPT-1a, carnitina palmitoiltransferasa 1a; CYP4A, citocromo P450; Pmp4, proteína de membrana peroxisomal 4; RXR, receptor retinoides x; Acot 1 y 3, acil coenzima A tioesterasa 1 y 3; FGF21, factor de crecimiento de fibroblasto 21.

SREBP-1 es muy sensible a la insulina circulante y sirve como efector para las funciones lipogénicas de la insulina. La señalización de insulina es manejada por una serie de redes mediadas por dos vías de señalización principales: vía fosfatidil inositol 3 cinasa-Akt y vía Ras-MAPK activada por la proteína receptora del factor de crecimiento (Grb2/SOS). La insulina por lo tanto promueve la formación de ácidos grasos. Los ácidos grasos saturados de cadena larga (como el ácido palmítico), a largo plazo, pueden suprimir la secreción de insulina y causar pérdida y disfunción en las células beta del páncreas, fenómeno llamado lipotoxicidad. La lipotoxicidad también ocurre en varios tejidos, como el adiposo, músculo e hígado generando resistencia a la insulina. Se ha visto que en esteatosis hepática, la activación de SREBP-1 se mantiene muy

sensible así como la activación de lipogénesis por el factor de transcripción CHREB (proteína de unión en respuesta a hidratos de carbono). Los ácidos grasos promueven un aumento en el estrés de retículo endoplásmico en respuesta a la carga de lípidos, llevando esto a mayor lipogénesis. Una dieta alta en grasa, o patologías como la diabetes, debido a un estado crónico de acumulación de ácidos grasos, aumentan la oxidación en mitocondria y por lo tanto una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Éstas especies activan la cinasa Jun lo cual fosforila al sustrato receptor de insulina (IRS1) en los residuos de serina, llevando a esto en un fallo en la vía de señalización de insulina. La producción de acil-CoA y diacilglicerol en la oxidación de lípidos, activan isoformas atípicas de PKC que igualmente fosforilan a IRS1 en residuos de serina. Existen también citosinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 que suprimen la vía de señalización de insulina (Capeau 2008).

Las dietas altas en grasa durante la gestación, por lo tanto, promueven la acción de la insulina, logrando un estado lipogénico y glucolítico. Gracias a un estudio de Buettner (2006), podemos decir que las dietas altas en grasa generan cambios muy significativos en los genes relacionados a síntesis y metabolismo de lípidos. Debido a estas dietas, ellos observaron que en el hígado los grupos de genes que más se expresaban eran los genes lipogénicos (especialmente SREBP1c) y las enzimas claves glicolíticas (glucocinasa y piruvato cinasa), mientras que los genes para la oxidación de grasas (*Ppara*) no estaban notablemente expresados en las ratas con consumo de manteca de cerdo.

3.3 Desarrollo del páncreas en roedores

El páncreas está compuesto por células exócrinas acinares y células endócrinas llamadas islotes de Langerhans. Estos islotes están dispersos a través del páncreas y tienen un suministro de sangre altamente desarrollado. Los islotes de las ratas contienen unos pocos miles de células que constituyen aproximadamente del 1 al 2% de la masa pancreática. Las 4 células principales que forman el páncreas son: las células alfa, las cuales secretan glucagon y constituyen del 15-20% del páncreas endocrino; las células beta, las cuales secretan insulina y constituyen del 60-80% del páncreas endocrino; las células delta, que secretan somatostatina y forman del 5-10%

del páncreas endocrino y las células PP que secretan polipéptido pancreático y forman menos del 2% del páncreas endocrino (Edlund 2002; Brissova, Fowler et al. 2005).

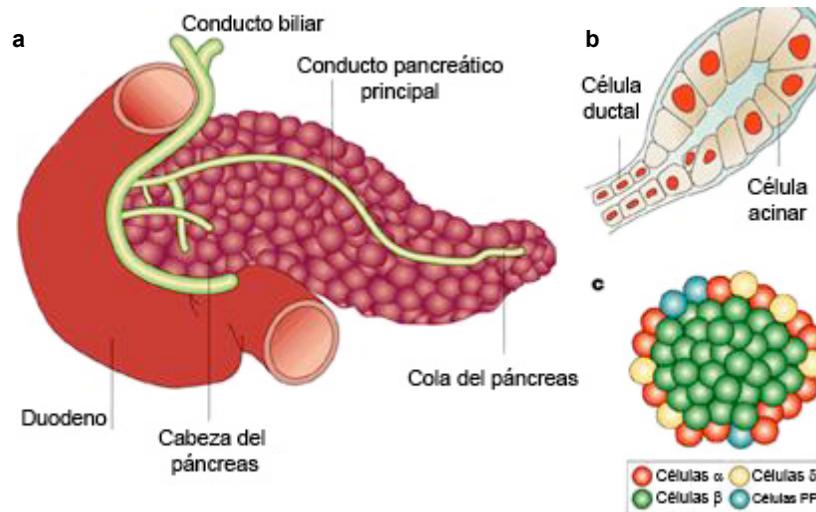


Figura 3.3.1. (Edlund 2002) Anatomía del páncreas. a) el páncreas maduro es adyacente al duodeno. b) el páncreas exócrino se compone de células acinares que suministran al intestino con enzimas digestivas a través de los ductos pancreáticos. c) el páncreas endocrino consiste de 4 tipos celulares: α (alpha), β (beta), δ (épsilon) y células PP.

Durante la etapa fetal, el páncreas endocrino se desarrolla desde una poza común de células precursoras que se convierten progresivamente en células endocrinas bajo el control de una red jerárquica de factores transcripcionales. El desarrollo del páncreas tiene diferentes etapas. Estas transiciones de desarrollo inician desde el endodermo y la primera transición. El páncreas se origina de las regiones dorsal y ventral del endodermo al día embrionario 11 (E11) en la rata. Estas células precursoras comienzan a expandirse hasta formar una protuberancia a la cual se le forman lóbulos y ramificaciones. Finalmente, estas células progenitoras se expanden y llegan a la segunda transición ó “estado diferenciado” donde ya es posible identificar productos secretores (entre los días E15 y 18 en ratas). En esta etapa ocurre la fusión de la región dorsal con la ventral. En los días E21.5 - 22 ocurre la proliferación de las células endocrinas y el páncreas continúa su desarrollo hasta el día 28 postnatal (Green, Rozance et al. 2010). En este período de organogénesis, las condiciones de desarrollo son críticas para el páncreas. Como se ha mencionado antes, algún insulto en esta etapa puede afectar al páncreas tanto en su desarrollo como en efectos futuros causados por programación fetal.

La homeostasis de la glucosa en el feto depende de la madre, mientras que al nacer, la cría debe controlar la glucosa por sí misma por lo cual es un cambio muy brusco y comienzan a secretar insulina. Los islotes de ratas adultas responden a los cambios de glucosa para la secreción de insulina. Al nacer, esta respuesta está subdesarrollada ya que las células β de neonatos son insensibles a la glucosa y por lo tanto sintetizan y secretan menos insulina que en la adultez (Navarro-Tableros, Fiordeliso et al. 2007). Los islotes en ratas neonatales son de menor tamaño, mientras que al día 20 postnatal ya presentan una forma y distribución normal a los de adultos, aunque con menor contenido de colágena (Cabrera-Vasquez, Navarro-Tableros et al. 2009). El tamaño y el número de islotes continúa aumentando mientras el animal se desarrolla. Se ha propuesto que la respuesta inmadura de los islotes se puede deber a una deficiencia en la enzima glucocinasa (GK) y a una reducción en el transportador de GLUT-2 (Tiedge and Lenzen 1993). Igualmente, en el estudio de Cabrera-Vásquez se toma como indicador de inmadurez al día 1 postnatal la falta de una capa protectora alrededor de los islotes (Cabrera-Vásquez, 2009). La inadecuada secreción de insulina por glucosa es una falla en la respuesta y no una disminución en la expresión del gen de insulina (Aguayo-Mazzucato, Sanchez-Soto et al. 2006). Sin embargo, sí existe una menor expresión del RNA mensajero de insulina en células β neonatales que en adultas (Navarro-Tableros, Fiordeliso et al. 2007). Otro ejemplo de inmadurez en los islotes de Langerhans, es reportado en el artículo de Foot (Foot, Richardson et al. 2010), ya que utilizan islotes neonatales para cultivarlos en inductores apoptóticos, pero se muestran resistentes a estos inductores al día 2 postnatal y no presentan marcadores apoptóticos, mientras que al día 21 ya existe una respuesta y se ve un aumento significativo en los niveles de indicadores apoptóticos de los islotes.

El período del destete representa un reto metabólico ya que las ratas cambian de una dieta alta en lípidos de la leche materna, a una dieta baja en grasa y alta en hidratos de carbonos. Aguayo e Hiriart (2006) reportan en ratas Wistar, una hiperinsulinemia e hiperglucemia sérica al día 20 postnatal, asociado al aumento de la masa de células beta y una falla en la respuesta a altas concentraciones de glucosa. Este estado hiperinsulinémico se correlaciona a una secreción basal elevada de insulina en células beta aisladas. Este estado se normaliza al día 28 cuando el páncreas termina de desarrollarse. Al día 21 de lactancia, el páncreas presenta un aumento de masa y proliferación que eleva los valores de insulina.

Las condiciones alterantes en las etapas tempranas del desarrollo como son la desnutrición, sobrenutrición, hiperglicemia o dietas altas en grasa desencadenan una respuesta adaptativa en la masa de las células β durante el período fetal. En los últimos días del desarrollo fetal así como los primeros días de la vida postnatal, la masa de células β está determinada por las tasas de replicación y apoptosis de las células β . Obviamente, cualquier alteración en este punto modificará el balance de estos factores, contribuyendo así a una respuesta adaptativa en el crecimiento de la célula β , la cual es metabólicamente adaptativa a corto plazo. Sin embargo, a largo plazo fomenta una falla en las células β y diabetes en la edad adulta (Portha, Chavey et al. 2011).

No existen muchos reportes sobre los efectos de una dieta alta en grasa materna en las células beta de las crías. Cerf, et al, demostró que el consumo de una dieta alta en grasa durante la gestación disminuye significativamente el volumen y número de las células β , resultando en hiperglucemia al día 1 de nacimiento sin cambios significativos en las concentraciones séricas de insulina (Cerf, Williams et al. 2005).

La ciencia ha comprobado que modelos de sobrenutrición durante períodos tempranos de la vida, reflejan un ambiente hiperinsulinémico y obeso. Se ha comprobado que los bebés de mujeres con diabetes gestacional tienen altos niveles de insulina en el período perinatal y que continúan hasta la edad adulta. Kohlhoff (1990) reporta fetos al día 21 gestacional con hiperinsulinemia ya que fueron expuestos a un ambiente hiperinsulinémico y obeso durante la gestación (Kohlhoff and Dorner 1990). Se observa que este efecto hiperinsulinémico se debe a que los islotes tienen una capacidad hipersecretora e hiperreactiva. Además, reportan un aumento en el mRNA de NPY (neuropéptido Y) que da la señal para mayor secreción de insulina. Por otro lado, se sabe también, que en una fase de resistencia a la insulina previa a la manifestación de la diabetes, el volumen de las células β aumenta para compensar la demanda de insulina en un organismo obeso. Existe una potenciación de la secreción de insulina estimulada por glucosa debido a las concentraciones elevadas de ácidos grasos circulantes (Gehrmann, Elsner et al. 2010).

En ratas, la hiperglicemia severa materna aumenta el porcentaje de tejido endocrino debido a hiperplasia e hipertrofia de islotes de Lagerhans, se aumenta la actividad y el número de células β . Al momento del nacimiento, una vez que se elimina el estímulo de un estado hiperglucémico, el páncreas llega a un período de hipoplasia en el momento

del destete. Durante la lactancia, se disminuye el porcentaje de islotes y las células β restauran su capacidad secretora debido a una normalización en la granulación de éstas. En la etapa adulta, las crías de madres severamente diabéticas, exceden la masa pancreática debido a un alto número de islotes pequeños, sin embargo existe un aumento en la secreción de insulina sugiriendo la existencia de resistencia a la insulina (Holemans, Aerts et al. 2003).

En la adultez, una afectación al páncreas llevará a una disminución en la masa de células beta y a una resistencia en la insulina. La resistencia a la insulina hará que el páncreas aumente sus capacidades secretoras de insulina para compensar la hiperglucemia circulante (Meier 2009). Esta cadena de eventos más varios factores sumados como la programación fetal y la dieta, llevarán a una disfunción del páncreas y diabetes.

3.4. Metabolismo del colesterol

El colesterol es esencial en la célula para la formación de membranas, la fluidez, el movimiento y la función. Aproximadamente de 1200 mg a 1700 mg de colesterol entran al día al lumen del intestino, de los cuales 300-500 mg provienen de la dieta y el resto de la bilis (Matsuo 2010). Cincuenta por ciento de este colesterol exógeno es absorbido en el intestino y transportado al hígado en quilomicrones. Una vez que llega al hígado, los hepatocitos forman las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para transportar el colesterol y los triacilglicéridos a los tejidos extrahepáticos. El transporte reverso de colesterol inicia con las lipoproteínas libres de lípidos apoA1 que son producidas en el intestino, en el hígado o como salientes de la superficie de lipoproteínas ricas en triacilglicéridos durante la lipólisis. Estas partículas inician el flujo de los fosfolípidos y colesterol desde las membranas celulares a través del transportador ABCA1. Mientras las apoA1 van acumulando lípidos, se convierten en lipoproteínas nacientes de alta densidad (HDL). El colesterol y los fosfolípidos son esterificados por la acción de LCAT (lecitina-colesterol acil transferasa) y después son empacados en el centro de las HDL discoidales. Mientras más ésteres de colesterol se acumulan en las partículas, su tamaño va a aumentando y se convierten en HDL-3 o HDL-2. El intercambio recíproco de ésteres de colesterol por triacilglicéridos, mediado por CETP (proteína de transferencia de ésteres de colesterol), mueve los ésteres de colesterol a lipoproteínas

apoB, las cuales son eventualmente eliminadas por el hígado a través de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Éstas entran al hígado por medio de los receptores LDL (LDL-R). Los ésteres de colesterol de tejidos periféricos también pueden ser depositados en el hígado a través de los receptores SR-B tipo 1. Finalmente el colesterol se excreta por medio de la bilis. Éste proceso se representa en la **Figura 3.4.1** (Feng and Li 2009).

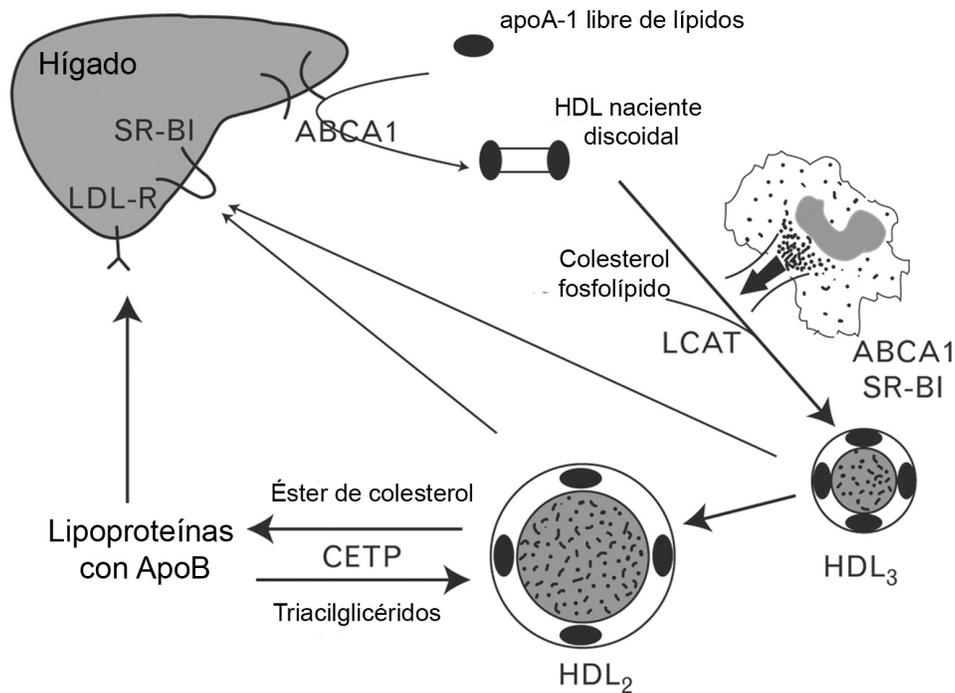


Figura 3.4.1. (Feng and Li 2009). Transporte reverso del colesterol. HDL, lipoproteína de alta densidad; LCAT, lecitina-colesterol acil transferasa; ABCA1, casete transportador A1 de unión a ATP; SR-BI, receptor de unión a esteroides tipo 1; CETP, proteína de transferencia de ésteres de colesterol; LDL-R, receptor de lipoproteínas de baja densidad.

El flujo reverso del colesterol debe de ser controlado por el cuerpo. Alteraciones de este flujo puede llevar a ciertas patologías o aumentar el riesgo de daños metabólicos. Hao et al (2007) muestra en ratones que el exceso de colesterol intracelular está directamente asociado a reducir la secreción de insulina en respuesta a glucosa y que la secreción normal se puede restaurar por la disminución de colesterol. El colesterol intracelular puede llegar a afectar la cascada de factores regulatorios de la secreción de insulina estimulada por la glucosa hasta llegar a una pérdida parcial o completa de la función secretora. Está comprobado que el exceso de colesterol dentro de los islotes, reduce la secreción de insulina estimulada por glucosa, viéndose esto en ratones knockout de *Abca1* en células β . Existe un efecto directo del colesterol y la disfunción de las células (Hao, Head et al. 2007; Brunham, Kruit et al. 2008).

3.5. *Abca1* y factores de transcripción regulatorios

El ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1, por sus siglas en inglés) es una proteína de membrana que media el transporte de colesterol inverso en las células. Se han identificado mutaciones en *ABCA1* que causan el síndrome de deficiencia de HDL, conocido como enfermedad de Tangier. Esta proteína transporta el colesterol de tejidos extrahepáticos hacia el hígado a través de lipoproteínas de alta densidad (HDL). ABCA1 acepta los fosfolípidos y el colesterol intracelular, los expone en la membrana y a través de aceptores apolipoproteínicos (apoA) genera las HDL (Brunham, Kruit et al. 2007) (**Figura 3.3.1**). Las HDL ya maduras son ricas en ésteres de colesterol. El principal sustrato del ABCA1 son los fosfolípidos, y el colesterol es transportado a través de difusión espontánea mediado por los fosfolípidos. La disfunción del transportador causa bajos niveles de HDL como consecuencia de un transporte inadecuado de fosfolípidos al espacio extracelular y crea un hipercatabolismo de apoA-I pobres de lípidos (Attie, Kastelein et al. 2001).

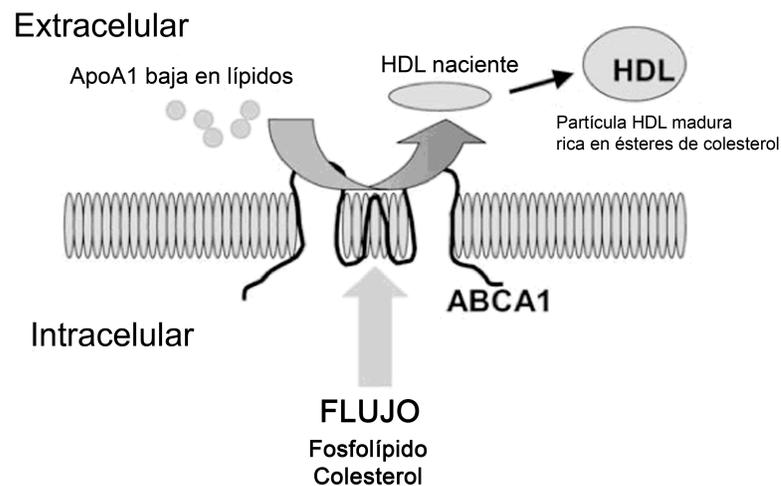


Figura 3.5.1. (Srivastava 2002). Flujo inverso del colesterol mediado por el transportador ABCA1. Las partículas pobres en colesterol HDL en la circulación, aceptan el colesterol y fosfolípidos de tejidos extrahepáticos gracias al transportador asociado a membrana ABCA1. Las partículas nacientes de HDL se convierten en partículas maduras ricas en ésteres de colesterol capaces de transportar el colesterol al hígado para su excreción.

El transportador ABCA1 se localiza principalmente en la membrana plasmática. Después de la traducción, sufre una modificación donde se une un ácido graso palmítico a la proteína y así aumenta su hidrofobicidad para que pueda interactuar fácilmente con la bicapa lipídica (Singaraja, Kang et al. 2009).

Los transportadores ABC son la familia más grande de transportadores de membrana. Utilizan ATP para generar energía y poder transportar metabolitos a través de la membrana. Estos transportadores consisten de dos dominios principales, el dominio transmembranal (TMD) y el dominio de unión a nucleótido localizado en el citoplasma. ABCA1 es una proteína de 2,261 aminoácidos con dos estructuras similares. De acuerdo a su homología con otros transportadores ABC, se sugiere que el transportador forma un canal en la membrana que promueve la translocación de lípidos desde el interior al exterior de la membrana. Una vez que el transportador interacciona con las apolipoproteínas, ABCA1 se fosforila para promover su activación como flipasa así como su protección con las proteínas que lo degradan (Nagao, Tomioka et al. 2011). Las apolipoproteínas lipidadas ya no son capaces de unirse al transportador. Se sugiere que la traslocación de fosfolípidos y colesterol vía ABCA1 crea un sitio en el exterior de la membrana donde llegan las apoA-I para unirse y solubilizar estos fosfolípidos y colesterol de la membrana y así formar las HDL.

ABCA1 promueve el aumento de HDL ya que se ha comprobado en ratones transgénicos con ausencia de ABCA1 en el intestino e hígado que existe una disminución significativa de colesterol HDL ocasionada por la ausencia de ABCA1, mostrando la estrecha relación (Brunham, Kruit et al. 2006). Sin embargo, la proteína ABCA1 del hígado y del intestino son responsables por aproximadamente el 90% del colesterol HDL en suero, (Ku, Rasmussen et al. 2011), por lo cual únicamente alteraciones en la expresión de ABCA1 hepático e intestinal puede tener un gran impacto en la biogénesis de las HDL. En ratones transgénicos donde se sobrexprende el gen *Abca1*, se ha visto que un aumento en la expresión promueve el flujo de colesterol en las células y por lo tanto se elevan las concentraciones de HDL (Singaraja, Bocher et al. 2001). En este mismo estudio, los ratones silvestres fueron alimentados tanto con dieta normal como con dieta aterogénica. El colesterol total y el colesterol HDL aumentaron significativamente en los ratones con dieta aterogénica, mientras que los triacilglicéridos no cambiaron, mostrando que el aumento en HDL se considera un efecto ateroprotector.

El transportador en la membrana está inactivo cuando el heterodímero de proteínas LXR β /RXR está unido. Para mantener la homeostasis del colesterol, LXR β unido a

ABCA1 inhibe la unión de ATP a la proteína. En estudios de macrófagos se ha visto que al agregar ligandos exógenos de LXR, los cuales mimetizan la acumulación de colesterol, hacen que LXR β se disocie de ABCA1 liberándolo y permitiendo el flujo de colesterol a las apoA-I (Hozoji-Inada, Munehira et al. 2011). Por lo tanto, estos factores de transcripción no solo tienen un efecto para la transcripción del gen de *ABCA1* si no también en su función.

El transportador tiene una vida media de aproximadamente 1 a 2 horas y debe ser degradado rápidamente para evitar la depleción de colesterol en las células. Se degrada por endosomas o por proteasas una vez que ya no se unen las apoA-1 (Nagao, Tomioka et al. 2011).

La expresión de *Abca1* está mediada principalmente por la sobrecarga de colesterol en las células. Esta inducción ocurre por la activación de los factores de transcripción LXR α /LXR β (receptor "x" del hígado) y RXR (receptor "X" retinoide). Estos dos receptores son receptores nucleares, que al ser activados, forman un heterodímero y se unen al primer intrón del gen *Abca1*. Los ligandos que activan son los oxisteroles y el ácido retinoico. El colesterol convertido a oxisterol es el que activa a *Abca1*. Los activadores de PPAR γ (receptor nuclear activador de proliferación de peroxisoma) también promueven la transcripción de *Abca1* y estimulan el flujo de colesterol en las células ya que activan la transcripción de *Lxra* (Oram and Heinecke 2005). En un estudio, la incubación de macrófagos con lipoproteínas, oxisteroles y LDL inducían la expresión de *Abca1* mRNA análogo al aumento en la expresión de *Lxra* (Srivastava 2002). A continuación, se muestra una tabla de los componentes reguladores de la expresión de *ABCA1*:

Tabla 3.5.1. Regulación de la expresión de *ABCA1* (Oram and Heinecke 2005).

EFECTOR	MEDIADOR	ABCA1	MECANISMO
Transcripción			
Esteroles	LXR α , LXR β	+	+ transcripción de <i>ABCA1</i>
Retinoides	RXR	+	+ transcripción de <i>ABCA1</i>
Ácidos grasos polinsaturados	LXR α , LXR β	-	Antagoniza esteroides
Tiazolinedionas	PPAR γ	+	+ transcripción de <i>LXR</i>
Hormona tiroidea	Receptor de hormonas	-	- Actividad de LXR/RXR
IFN- γ	?	+	+ transcripción de <i>ABCA1</i>
TGF- β	?	-	Antagoniza IFN- γ
Postranscripción			
Apolipoproteínas	?	+	- degradación de <i>ABCA1</i>
Ácidos grasos insaturados	PLD2	-	+ degradación de <i>ABCA1</i>
Colesterol libre	Proteosomas	-	+ degradación de <i>ABCA1</i>
Carbonilos reactivos	?	-	+ degradación de <i>ABCA1</i>
Ceramidas	?	+	Tráfico de <i>ABCA1</i>

LXR, receptor de hígado beta; RXR, receptor X retinoide; PPAR, receptor activado por proliferador de peroxisomas, IFN- γ , interferón gama; TGF- β , factor de crecimiento transformante; PLD2, fosfolipasa 2.

La regulación de los transportadores de colesterol es dependiente ciertos factores de transcripción. En un estudio en enterocitos de ratones con dieta alta en grasa, pero libre de colesterol, se observó una baja expresión en los transportadores de colesterol. Para comprobar si esta expresión fue regulada por el receptor LXR, se evaluó la expresión en ratones knockout *Lxr α ^{-/-}* y se observó el mismo comportamiento de disminución en la expresión. Demostrando que no depende específicamente de LXR α (de Vogel-van den Bosch, de Wit et al. 2008).

El consumo de dietas altas en grasa puede alterar la expresión los receptores nucleares involucrados en el metabolismo de lípidos. Se observó que una dieta “de cafetería” alta en grasa aumentó significativamente la expresión de *Ppar γ* después de 28 días en ratas jóvenes (Redonnet, Groubet et al. 2001).

3.6. El papel de *ABCA1* en la diabetes

Actualmente la diabetes afecta alrededor de 150 millones de personas en todo el mundo. Es un síndrome caracterizado por un desorden del metabolismo e hiperglucemia. En la diabetes tipo 2 ocurre una falla en la respuesta y/o secreción de la insulina, y una disfunción en las células β . Existen varios factores que contribuyen al desarrollo de la diabetes como apoptosis de las células β , reducción en la masa o la

habilidad para compensar la resistencia a la insulina. Algunos mecanismos son el estrés oxidativo, hiperglucemia, hiperlipidemias entre otras. Sin embargo, varios mecanismos no se conocen con detalle. La disfunción de células β existe en individuos que están en alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 a pesar de que presenten niveles de glucosa normales (Lin and Sun 2010).

El papel del ABCA1 en la diabetes tipo 2 se estudió al observar que los ratones knockout de *Abca1* presentaban intolerancia a la glucosa significativamente (Brunham, Kruit et al. 2008). Se observó que la ausencia del transportador en las células β reducen la secreción de la insulina tanto por la estimulación por glucosa o sin glucosa (Brunham, Kruit et al. 2007). En la diabetes existe una secreción de insulina insuficiente para cumplir con las demandas metabólicas por lo cual la disfunción de células β caracteriza esta patología. Actualmente no se saben con exactitud los mecanismos responsables de la muerte y disfunción de las células beta. El papel del colesterol está tomando fuerza como un factor causante de esta disfunción.

La ausencia de ABCA1 en humanos o en modelos animales resulta en una casi completa ausencia de colesterol HDL, acumulación de colesterol en tejidos periféricos y aterosclerosis acelerada (Singaraja, Brunham et al. 2003). *Abca1* se expresa muy poco en el páncreas pero está altamente expresado en los islotes de Langerhans (Brunham, Kruit et al. 2007). Los ratones knockout de *Abca1* en células β presentan intolerancia a la glucosa y falla en la secreción de la insulina debido a la acumulación de colesterol en los islotes. De acuerdo a los estudios de Hayden, se ha visto como el fenotipo de la ausencia de ABCA1 se asemeja a la diabetes tipo 2, acentuando la importancia de evaluar el efecto del colesterol en la disfunción de los islotes.

La enfermedad de Tangier es un desorden genético del transporte del colesterol, nombrado así por el descubrimiento de la enfermedad en la isla de Tangier (Virginia, EUA). Se identificó en un paciente de 5 años que presentaba amígdalas color naranja, muy bajos niveles de HDL y un aumento en el tamaño del hígado y bazo. Posteriormente se descubrió que la enfermedad se da por mutaciones del gen *ABCA1* en el cromosoma 9q31. En los pacientes con enfermedad de Tangier, las mutaciones que causan las alteraciones se deben a cambios estructurales del transportador principalmente en los dominios extracelulares (sitios putativos de unión a apoA-1) y

dominios de unión a nucleótidos (NBDs). Por ejemplo, se espera que las mutaciones en los loops extracelulares hagan que la proteína disminuya el flujo de lípidos ya que las apolipoproteínas A1 (apoA-1) no podrán interactuar directamente con el transportador. También se prevé que las mutaciones puedan alterar la estructura secundaria de ABCA1 inhibiendo así su función en la membrana. Cada mutación, por consiguiente, generará diferentes fenotipos de HDLc en los pacientes que las presenten (Singaraja, Brunham et al. 2003). Recientemente se reporta que se han encontrado hasta 70 mutaciones en el gen *ABCA1* (Nagao, Tomioka et al. 2011).

En México, la dislipidemia más común de la población es la baja concentración de HDL plasmática. Bajas concentraciones de HDL se encuentran comúnmente en pacientes diabéticos y estos niveles son asociados al riesgo de enfermedades cardiovasculares. Se encontró que la variante polimórfica *R230C* de *ABCA1* está notoriamente presente en individuos mexicanos con bajos niveles de colesterol HDL. Existe una asociación significativa de esta variante polimórfica con la obesidad y por lo tanto al síndrome metabólico y a la diabetes tipo 2. De un total de 429 mexicanos mestizos estudiados, el 20.1% presentaron este polimorfismo. Los portadores del genotipo *R230C/C230C* mostraron niveles significativos bajos de HDL y apoA-1, así como asociación a un Índice de Masa Corporal (IMC) mayor. No presentaron diferencias significativas entre los valores de glucosa e insulina (glucosa en ayuno: 105 ± 43.5 mg/dl, insulina: 11.6 ± 8.0 μ U/ml) contra los no portadores (Villarreal-Molina, Aguilar-Salinas et al. 2007). El alelo *C230* demostró tener un efecto funcional en células *in vitro* (Acuna-Alonzo, Flores-Dorantes et al. 2010). El flujo de colesterol de la línea celular que expresaba el gen *ABCA1* del alelo *C230* disminuyó en un 27%, siendo significativamente menor a las células silvestres. Respecto a la proteína, ABCA1 presentó niveles similares en las dos líneas celulares. Hasta el año 2003, se habían reportado 10 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) en regiones codificantes del gen y cientos de SNP's no codificantes para este gen. Dentro de los codificantes, los resultados son inconclusos, ya que algunos se asocian a cambios lipídicos mientras otros no, sugiriendo que los cambios en la actividad ABCA1 pueden ocurrir sin alteraciones en los niveles plasmáticos de lípidos (Singaraja, Brunham et al. 2003).

El gen *ABCA1* fue descubierto en los años noventa mientras que su asociación a la diabetes fue establecida posteriormente por el grupo canadiense del investigador Michael R. Hayden (Brunham, Kruit et al. 2007). No se sabe exactamente el papel del transportador *ABCA1* y su efecto disfuncional en la célula β . Brunham et al. ha propuesto varias hipótesis, en un artículo reciente, explica una de las hipótesis donde se basa en que el ambiente del islote rico en colesterol reduce la actividad citoplásmica de la glucocinasa (GK) ya que retiene a la GK en los gránulos de insulina. Existe evidencia de que la GK está localizada en varios compartimentos de las células β , sin embargo no se sabe exactamente la función y el mecanismo molecular de estas localizaciones (Rizzo, Magnuson et al. 2002). En ausencia de glucosa, la GK se encuentra asociada a los gránulos de insulina y con la presencia de glucosa, se trasloca al citoplasma. Sabemos que la GK es la enzima capaz de determinar y regular el flujo metabólico de la glucosa en respuesta a los cambios de la concentración plasmática. La enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) se encuentra también en las vesículas de insulina formando un heterodímero con la GK. Evidencia científica reporta que cuando la célula presenta una sobrecarga de colesterol, el heterodímero no se disocia y la GK no se trasloca al citoplasma (Hao, Head et al. 2007). El colesterol por lo tanto interfiere con la acción de sensar la glucosa y con la despolarización de membrana de las células β , inhibiendo así la secreción de insulina (Vergeer, Brunham et al. 2010).

Otra hipótesis refiere la alteración en la exocitosis de los gránulos de insulina debido a la fluctuación de colesterol en la membrana. El colesterol juega un papel muy importante en la conformación de las membranas para el anclaje de las proteínas. Forma microdominios de membrana que promueven las vías de señalización. En la célula β las propiedades de la membrana se ven afectadas al depletar o sobrecargar la célula con colesterol, llevando a esto a una alteración en la secreción de insulina. Se ha visto que la depleción de colesterol lleva a una redistribución de canales de K^+ y proteínas llamadas REceptores SNAp (SNARE: receptor soluble de unión a SNF) para promover la secreción de insulina estimulada por glucosa. Las SNARE forman un complejo constituido por una proteína de vesícula de membrana (synaptobrevina o VAMP) y dos proteínas de membrana plasmáticas (SNAP-25 y syntaxina o también llamada t-SNARE). Gracias a este complejo, ocurre la fusión y exocitosis de los gránulos de insulina (Easom 2000). El colesterol se une directamente a la syntaxina 1A y SNAP25 forma un heterodímero con syntaxina 1A, por lo tanto la depleción de colesterol

facilita la difusión de SNAP25 a lo largo de la membrana y promueve la redistribución de éstos receptores en los gránulos fusionados, aumentando así la secreción de insulina (Takahashi, Hatakeyama et al. 2004).

4. HIPÓTESIS

El consumo de una dieta alta en grasa durante la gestación y/o lactancia generará un ambiente intrauterino subóptimo que alterará la expresión de *Abca1*, *Rxra*, *Lxrβ* y *Pparγ* en los islotes de Langerhans promoviendo un mayor riesgo al desarrollo de diabetes tipo 2.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de una dieta materna alta en grasa durante ventanas críticas del desarrollo sobre la expresión del gen *Abca1*, *Rxra*, *Lxrβ* y *Pparγ* en islotes de Langerhans de un modelo murino.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar la expresión del gen *Abca1* de crías macho al día postnatal 1 y 21 cuyas madres fueron alimentadas con dieta alta en grasa durante la gestación y/o lactancia y su relación con la diabetes tipo 2.
- Evaluar la expresión de los factores de transcripción regulatorios *Rxra*, *Lxrβ* y *Pparγ* en las crías y su asociación con *Abca1*.
- Correlacionar la presencia de cambios en los parámetros bioquímicos de glucosa, colesterol, triacilglicéridos, cHDL, cVLDL, cLDL e insulina con la expresión de *Abca1*.

6. METODOLOGÍA

6.1. Dietas experimentales

- Dieta control: Teklad Global 18% Protein Rodent Diet, elaborada por Harlan Laboratories, Inc.
- Dieta hipercalórica alta en grasa: Formulada a base de la dieta control y agregando manteca de cerdo y caseína (CA. 160040 “Vitamin-Free” Test Casein, Harlan Laboratories, Inc.). Preparada en el laboratorio 202 del edificio F, Facultad de Química, UNAM.

Tabla 6.1.1. Dietas experimentales

Macronutrientos	Control		Grasa	
	% por peso	% Kcal	% por peso	% kcal
Proteína	18.6	24	18.6	16.5
Grasa	6.2	18	28.1	56.2
Hidratos de Carbono	44.2	58	30.9	27.4
Kcal/g		3.1		4.5

6.2 Animales de experimentación

Se obtuvieron 20 ratas macho y 70 ratas hembras de la cepa Sprague Dawley de 220 ± 10 g de peso del Centro UNAM-Harlan. Los animales estuvieron en condiciones de bioterio bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 por 12 horas en jaulas de 4 ratas con consumo de alimento y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Interno de Cuidado y Uso de animales de Laboratorio (CICUAL) de la UNAM.

6.2.1 Grupos experimentales

Las ratas hembras con un peso de 230 ± 10 g se pusieron a monta durante la noche con los macho, 2 hembras con 1 macho en cada jaula. Al día siguiente, se realizó un frotis vaginal para verificar la presencia de espermatozoides en el microscopio. Se

designó el día 0 de concepción por la presencia de espermatozoides en el tapón vaginal. Las ratas preñadas se transfirieron a cajas individuales y se alimentaron con dieta control (croqueta Harlan 2018s con 18% por peso de proteína cruda y un aporte de 6.2% grasa y 44.2% hidratos de carbono) o con dieta hipercalórica alta en grasa (aporte por peso de 18.6% de proteína, 28.1% de grasa y 30.9% de hidratos de carbono) durante el período de la gestación. Se obtuvo el peso diario de las ratas, así como el consumo de alimento. Un grupo de ratas se sacrificaron al día de parto, formando los grupos Control y Grasa. Otro grupo de ratas continuaron la administración de dieta, ya sea con la misma dieta o realizando el cambio de dieta, generando así 6 grupos experimentales (**Figura 6.2.1**)



Figura 6.2.1. Grupos experimentales según la dieta administrada

6.2.2. Manejo de las crías

Las crías macho al día 1 del grupo Control y Grasa se sacrificaron por decapitación después de un ayuno de 4 horas. Se obtuvo el peso, talla, circunferencia abdominal y ancho de cráneo al nacer. Las madres se sacrificaron con anestesia después de 8 horas de ayuno.

Los grupos CC, CG, GC y GG, al día postnatal 1 de nacimiento tuvieron un ajuste de camada de 10 crías por mamá y se hizo el cambio de dieta correspondiente del grupo experimental. Al día 21 postnatal, se sacrificaron las crías por anestesia (pentobarbital) después de 4 horas de ayuno. Se obtuvo el peso de las crías al día postnatal 1 y 21, así como la talla, circunferencia abdominal y ancho de cráneo.

6.2.3. Medidas somatométricas

El peso de las crías se tomó con una balanza digital. La talla y circunferencia abdominal se tomaron con una cinta métrica de fibra de vidrio. La talla se registró con la longitud desde la nariz a la base de la cola y la circunferencia abdominal se registró en la parte más prominente del abdomen. El ancho de cráneo se midió con un instrumento de medición tipo vernier y se tomó como lectura la distancia de oreja a oreja.

6.3. Ensayos

6.3.1. Obtención de suero

1) Crías al día postnatal 1: Las crías se separaron a las 7 am de la madre para un ayuno de 4 horas. La sangre se obtuvo por decapitación. Se centrifugó por 10 minutos a 3500 rpm, se separó el suero y se almacenó a -20°C para posterior evaluación.

Ratas adultas → Se pusieron en ayuno por 8 horas y se extrajo la sangre y el suero.

2) Crías al día postnatal 21: Las crías se pusieron en ayuno por 4 horas y una vez anestesiadas con pentobarbital se extrajo la sangre por punción cardíaca. La separación de suero de las crías y la madre se llevó a cabo de la misma manera que al día 1.

6.3.2. Aislamiento de Islotes de Langerhans

Los islotes de Langerhans se aislaron siguiendo el protocolo de Carter, et al. (2009). La metodología se menciona a continuación:

1) Digestión enzimática del tejido pancreático: Una vez sacrificada la rata, se disecó el páncreas y se colocó en solución HBSS (HBSS-Hank's Balanced Salt Solution, GIBCO®) con enzima colagenasa (Collagenase P, *Clostridium histolyticum*, Roche) a una concentración de 0.5 mg/ml. Para una muestra, se utilizaron aproximadamente entre 5 y 10 crías del mismo tratamiento. Los páncreas se cortaron en pedazos pequeños y se incubaron en un baño a 37°C para lograr la digestión (12 minutos para

las crías de día 1 y 20 minutos para las crías de día 21). Cada 5 minutos se agitaba el tubo vigorosamente.

2) Separación de los islotes del tejido acinar: Una vez lograda la digestión, el producto se sometió a 3 lavados con HBSS centrifugando 4 min/1200 rpm. Se removió el último sobrenadante cuidadosamente y al botón se le agregó un gradiente de Ficoll (Ficoll PM400, GE Healthcare) (**Figura 6.3.2.1**). El gradiente de Ficoll permite separar por densidades y se aplicó a concentraciones de 27%, 23%, 20% y 11%.

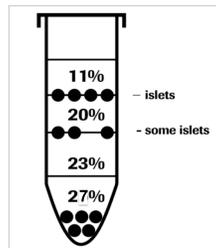


Figura 6.3.2.1. Gradiente de Ficoll para la separación de Islotes de Langerhans

Se centrifugó a 2000 rpm/10 min y se recuperaron los islotes de la interfase entre los gradientes de 11 y 20%. El Ficoll se remueve sometiendo los islotes a 3 lavados con buffer de lavado (HBSS 10% SFB). Los islotes se observaron al microscopio para hacer una segunda purificación y remover cualquier tejido exócrino o célula acinar remanente (**Figura. 6.3.2.2**). Una vez purificados, se lavaron con solución PBS (PBS- Phosphate-Buffered Saline, GIBCO®) para ser sometidos a la extracción de RNA.

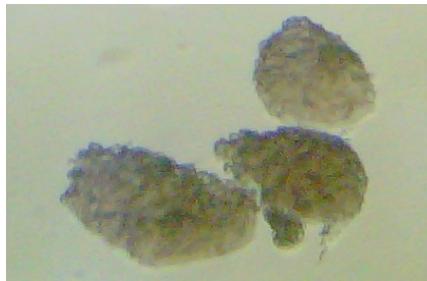


Figura. 6.3.2.2. Islotes de Langerhans

6.3.3. Extracción de RNA de Islotes de Langerhans

Los Islotes de Langerhans fueron sonicados para lisar la célula y liberar el material genético. La extracción de RNA se llevó a cabo con el kit RNeasy®Plus Mini de QIAGEN siguiendo la técnica de uso del fabricante. Este kit permite purificar hasta 100 µg de RNA de tejidos celulares utilizando columnas eliminadoras de DNA. Se cuantificó el RNA por medio del Thermo Scientific Nanodrop y se verificó la integridad por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, visualizando las bandas de RNA ribosomal 28s, 18s y 5s (**Figura 6.3.3.1**).

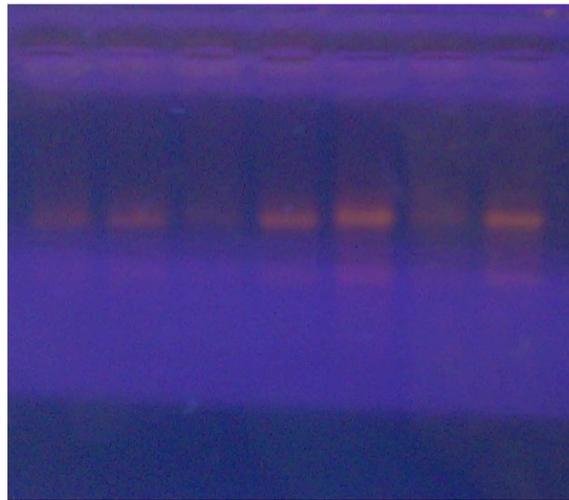


Figura 6.3.3.1. Electroforesis en gel de agarosa para RNA de Islotes de Langerhans. Carril 1-7: RNA de Islotes de rata.

6.3.4. Síntesis de cDNA

Antes de realizar tiempo-real RT-PCR se debe transcribir inversamente el RNA a cDNA en una reacción con la enzima transcriptasa inversa. Esta enzima se encarga de tomar la cadena de RNA y crear una cadena simple de DNA. Este paso se llevó a cabo utilizando el QuantiTect® Reverse Transcription Kit de QIAGEN siguiendo la técnica de uso del fabricante.

6.3.5. Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos se obtuvo de la página de Roche Applied Science (www.roche-applied-science.com). En esta página, se obtuvo la secuencia de los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia del gen (**Tabla 6.3.5.1**). Con la misma página web, se escogió la sonda a utilizar. Gracias al programa Basic Local Alignment Search Tool del Centro Nacional de Biotecnología e Información (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) se confirmó la especificidad de los oligonucleótidos creados.

Tabla 6.3.5.1. Secuencia de oligonucleótidos para *Abca1*, *Rxra*, *Lxr β* y *Ppar γ* en *Rattus norvegicus*.

Gen	Oligonucleótidos	
<i>Abca1</i>	Forward	5' agcctgcagtggacagaatc 3'
	Reverse	5' aactcccaggagtccaaagc 3'
<i>Lxrβ</i>	Forward	5' cactatgtcttccccacaag 3'
	Reverse	5' gtactgggctggggagaac 3'
<i>Rxra</i>	Forward	5' actgccgataccagaagtgc 3'
	Reverse	5' ttctcgttccggctccttg 3'
<i>Pparγ</i>	Forward	5' cccaatggttgctgattaca 3'
	Reverse	5' ggacgcaggctctactttga 3'

6.3.6. Tiempo-real RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es una herramienta utilizada en la biología molecular para cuantificar la expresión del mRNA y detectarlo en tiempo real. Se utilizó el equipo LightCycler 2.0 de Roche para identificar la expresión de los genes. Este equipo permite utilizar un sistema cerrado que amplifica y detecta en 30-49 minutos el cDNA. La reacción en la cadena de polimerasa utiliza la enzima TaqPolimerasa que al ir polimerizando, libera la fluorescencia de las sondas TaqMan por hidrólisis. Esta fluorescencia emitida es detectada por el lector del LightCycler 2.0 y se representa en curvas que dan la cuantificación del mRNA. Para normalizar la expresión de cDNA en cada reacción, se utilizó el gen constitutivo *Hprt* (**Tabla 6.3.6.1**). Finalmente, se obtuvo de cada muestra el valor CT (threshold cycle), que es el ciclo de

amplificado que se detecta arriba del rango por el termociclador. La expresión relativa se obtuvo por medio de la fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta CT}$, la cual refleja la cantidad del blanco, normalizado a la referencia endógena y relativo a un calibrador.

De cada muestra se midió la expresión en tiempo real de los 4 genes problema que son *Abca1*, *Rxra*, *Lxrβ* y *Pparγ*, normalizados con la expresión del gen constitutivo *Hprt*.

Tabla 6.3.6.1. Secuencia de oligonucleótidos para *Hprt* en *Rattus norvegicus*

Gen	Oligonucleótidos	
Hprt	Forward	ggtcattcctatgactgtagatfff
	Reverse	caatcaagacggtctttccagtt

6.3.7. Determinaciones bioquímicas

Los sueros de las crías y las mamás se descongelaron para llevar a cabo las mediciones siguientes:

a) Determinación de glucosa → Se determinó por el reactivo Glicemia enzimática AA 4x250 ml de Wiener Lab, método enzimático por las enzimas GOD-POD. En un primer paso la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la D- glucosa a ácido D-glucónico con formación de peróxido de hidrógeno. Éste es utilizado por la peroxidasa para oxidar a la 4- aminofenazona y al fenol, dando lugar a una quinonaimina coloreada. La intensidad de color será proporcional a la concentración de glucosa presente inicialmente. Se obtuvo la concentración de las muestras por un espectrofotómetro, leyendo a 505 nm.

b) Determinación de colesterol → Se determinó por el reactivo Colestat enzimático de Wiener Lab. La técnica se basa en reacciones enzimáticas donde la enzima colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol y ácidos grasos libres. El colesterol oxidasa entonces oxida al colesterol para formar 4-colestenona y peróxido de hidrógeno. La peroxidasa cataliza la oxidación con peróxido de hidrógeno de 4- aminofenazona con la subsecuente copulación de p-hidroxibenzensulfonato. El producto

final es un colorante quinoneimina. Se obtuvo la concentración de las muestras por un espectrofotómetro, leyendo a 505 nm.

c) Determinación de triacilglicéridos → Se determinó por el reactivo TG Color GPO/PAP AA 5x20 ml. La lipasa hidroliza triacilglicéridos a glicerol y ácidos grasos, el glicerol es fosforilado por ATP en presencia de kinasa glicerol para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato. El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido hidrogenado por oxido glicerofosfato (GPO). El peróxido hidrogenado reacciona entonces con 4-aminoantipirina (4-AAP) y 3-hidroxi-2, 4, 6-acido tribomobensoico (TBHB) en una reacción catalizada por peroxidasa para producir un tinte quinoneimino de color rojo. Se obtuvo la concentración de las muestras por un espectrofotómetro, leyendo a 505 nm.

d) Determinación de colesterol HDL → Se utilizó el método enzimático Stanbio HDL Colesterol. La fracción de HDL es solubilizada por un detergente que solubiliza únicamente la fracción HDL, de forma que el cHDL se libera reaccionando con la colesterol esterasa, la colesterol oxidasa y los cromógenos. La intensidad de color formado es proporcional a la concentración de cHDL presente en la muestra. Se registraron 2 absorbancias a 600 nm por medio de un espectrofotómetro y se obtuvieron las concentraciones con la siguiente fórmula:

$$\frac{(\Delta A)_{\text{Muestra}}}{(\Delta A)_{\text{Calibrador}}} \times \text{Conc. Calibrador} = \text{mg/dL de HDL colesterol en la muestra}$$

e) Determinación de colesterol VLDL y LDL → Se utilizó el método indirecto por la fórmula de Friedewald (Friedewald, Levy et al. 1972), donde:

$$cLDL = \text{Colesterol Total} - cHDL - cVLDL$$

$$cVLDL = \text{Triacilglicéridos}/5$$

Determinación de insulina por ELISA

La insulina se determinó utilizando el kit de Mercodia Ultrasensitive Rat Insulin ELISA formato 1x96 pozos. Es un inmunoensayo basado en la alta especificidad de anticuerpos monoclonales. Se detecta el antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que forman un inmunocomplejo. Se añade un sustrato enzimático

que reaccionará con el anticuerpo conjugado a una enzima y se dejará reaccionar. Se lee la densidad óptica del producto mediante espectrofotometría. La lectura se llevó a cabo por un espectrofotómetro de placas capaz de realizar lecturas seriadas de cada uno de los positos de la placa ELISA. La lectura proporcionó una absorbancia que por medio de una curva de calibración y su respectiva regresión lineal, se obtuvieron las concentraciones (ng/ml) de insulina en las muestras.

6.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 16.0. La “n” se refiere al número de camadas y los datos se analizaron con los promedios de las camadas. Los efectos de la dieta entre los grupos Control y Grasa al día 1 postnatal fueron analizados por la prueba paramétrica T-student. Las diferencias entre los 4 grupos al día 21 postnatal fueron analizados por el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y con la prueba *post hoc* Tukey. Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron con un valor de $p < 0.05$.

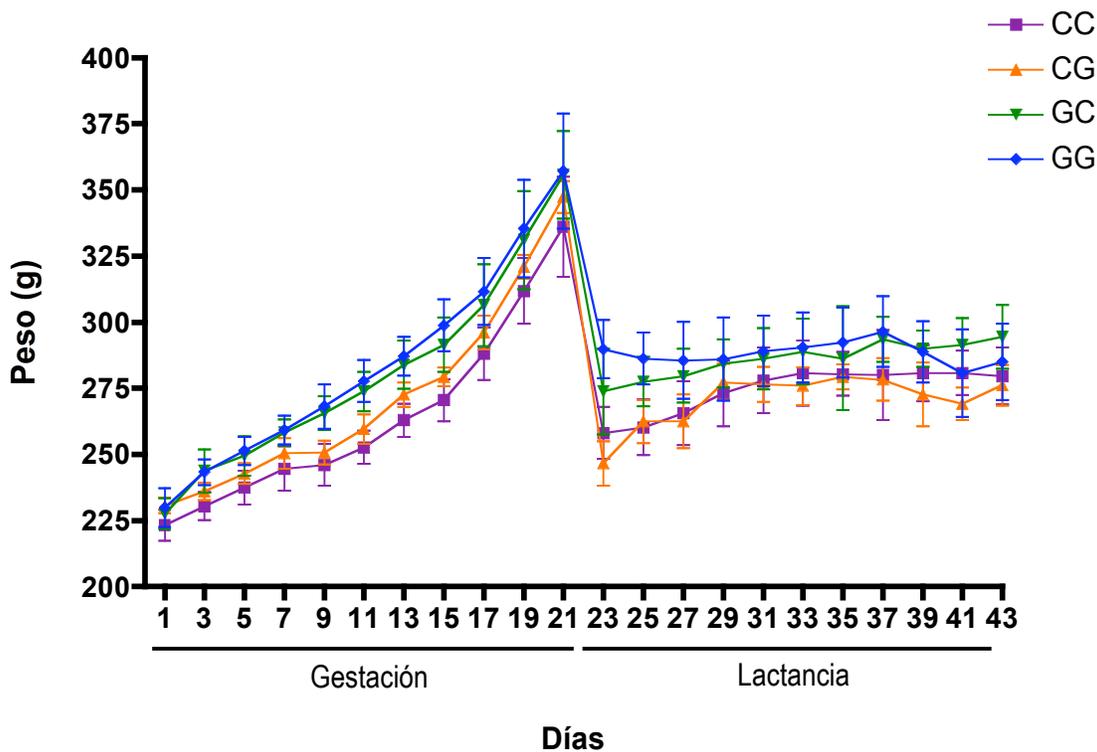
7. RESULTADOS

7.1. Resultados maternos

Peso y consumo de alimento materno

El peso y consumo de alimento materno fueron registrados a lo largo del experimento. La **Gráfica 7.1.1** muestra el peso en gramos durante los días del período de gestación y lactancia. Se observa un incremento de peso durante la gestación y al día 21 bajan de peso debido al nacimiento de las crías. Durante la lactancia se observan fluctuaciones en el aumento y la pérdida de peso.

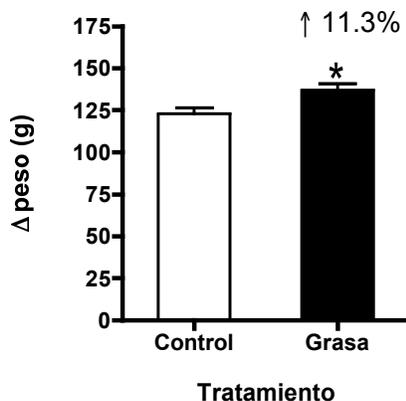
Gráfica 7.1.1. Peso materno registrado durante la gestación y lactancia



Media \pm desviación estándar. El grupo CC representa una n=5, CG y GC n=6 y GG n=7.

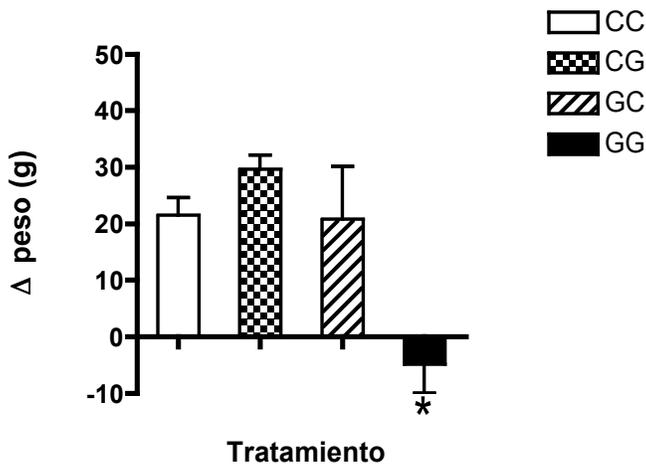
La **Gráfica 7.1.2** indica el aumento significativo del peso materno durante la gestación en el grupo Grasa, siendo éste de un 11.3% mayor con respecto al control. Durante la lactancia, los grupos CG y GC mantuvieron el mismo aumento de peso respecto al control, mientras que el grupo GG disminuyó significativamente de peso (**Gráfica 7.1.3**).

Gráfica 7.1.2. Δ de peso materno durante la gestación



Media \pm error estándar. Prueba T-student, *diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al Control. El grupo Control representa una $n=23$ y Grasa $n=25$.

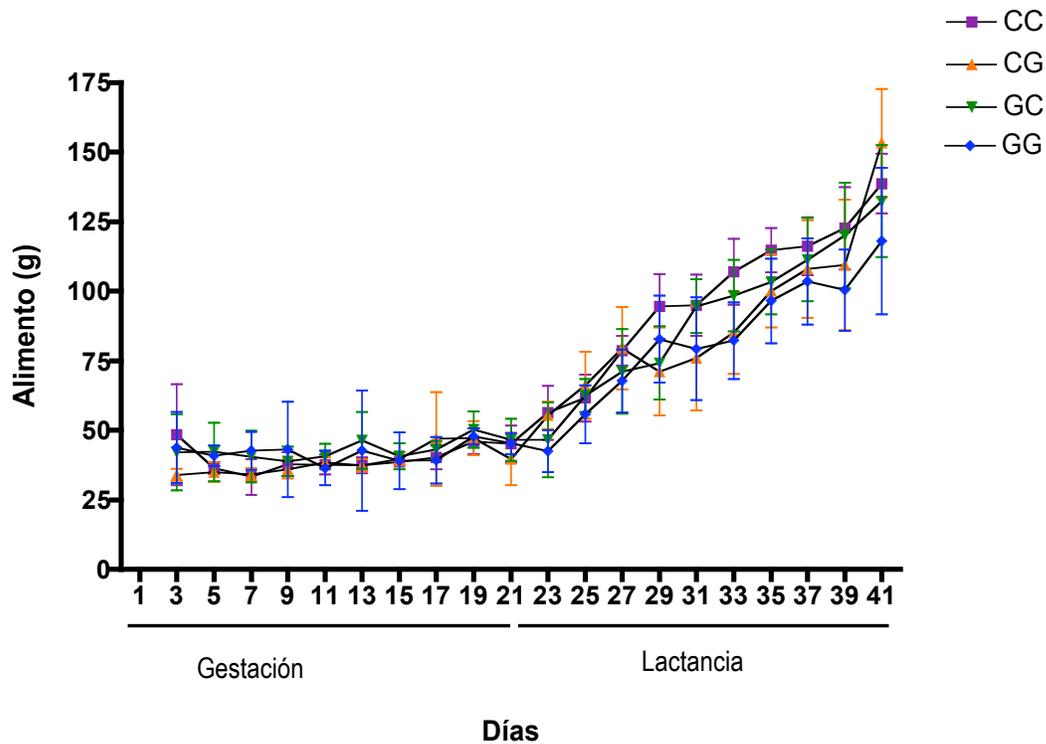
Gráfica. 7.1.3. Δ de peso materno durante la lactancia



Media \pm error estándar. Prueba ANOVA de una vía y prueba paramétrica Tukey, *diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto a CC. Grupo CC y GG representan una $n=7$, CG y GC $n=6$.

El consumo de alimento se registró de igual manera durante todo el experimento. Las ratas consumieron la dieta control y la dieta con manteca elaborada en el laboratorio. En la **Gráfica 7.1.4** se observa el consumo de alimento durante la gestación y el consumo durante la lactancia. Conforme crecen las crías, las madres consumen más alimento.

Gráfica 7.1.4. Consumo de alimento materno registrado durante la gestación y lactancia



Media

Media \pm desviación estándar. El grupo CC representa una $n=5$, CG y GC $n=6$ y GG $n=7$.

La **Tabla 7.1.1** reporta los gramos del consumo total materno de alimento a lo largo de la gestación y la lactancia. Durante la gestación, el consumo de alimento fue similar en los dos tratamientos. Durante la lactancia los grupos CC, CG y GC comieron aproximadamente la misma cantidad de alimento, sin embargo el grupo GG consumió menor cantidad de alimento durante la lactancia, siendo éste un total de 828.71 ± 35.31 gramos mientras que el control consumió 985.14 ± 29.57 gramos.

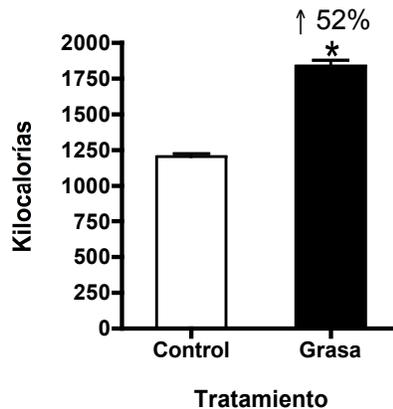
Tabla 7.1.1. Consumo total de alimento materno en los diferentes grupos experimentales durante los períodos de gestación y lactancia.

	Gestación		Lactancia			
	CONTROL	GRASA	CC	CG	GC	GG
	<i>Media ± ES</i>	<i>Media ± ES</i>	<i>Media ± ES</i>	<i>Media ± ES</i>	<i>Media ± ES</i>	<i>Media ± ES</i>
Consumo Total (g)	388.7 ± 5.5 n= 17	407.9 ± 8.8 n= 26	985.1 ± 29.5 n=7	904.1 ± 17.4 n=6	914.5 ± 37.44 n=6	828.7 ± 35.3 * n=7

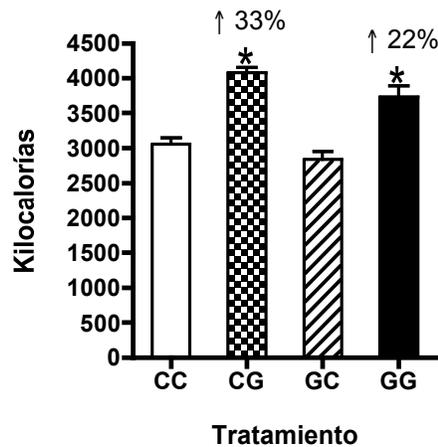
ES, error estándar. ANOVA de una vía y prueba paramétrica Tukey para los grupos CC, CG, GC y GG, *diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto a CC.

La **Gráfica 7.1.5** representa el consumo de alimentos en kilocalorías. Recordemos que la dieta alta en grasa es hipercalórica a comparación de la control, por lo que el consumo de calorías es significativamente más alto en las ratas del grupo Grasa. De igual manera, en la **Gráfica 7.1.6** se observa que los grupos CG y GG consumen significativamente más calorías debido a la dieta hipercalórica durante la lactancia. El grupo CG consume un 33% más y el grupo GG un 22% más de calorías en la lactancia comparados con el grupo control CC.

Gráfica 7.1.5. Consumo materno de kilocalorías totales durante la gestación



Media ± error estándar. Prueba T-student, *diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al Control. El grupo Control representa una $n = 17$ y Grasa $n = 26$.

Gráfica 7.1.6. Consumo materno de kilocalorías totales durante la lactancia

Media \pm error estándar. Prueba ANOVA de una vía y prueba paramétrica Tukey, *diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto a CC. El grupo CC y GG representan una $n=7$, CG y GC $n=6$.

Resultados bioquímicos

Los valores bioquímicos de glucosa, colesterol y triacilglicéridos se midieron en el suero materno (**Tabla 7.1.2**). Durante la gestación, no se observó diferencia significativa entre los dos grupos (Grasa vs Control). Durante la lactancia, tampoco se observó cambio en los parámetros a excepción de la glucosa en el grupo CG, la cual se observó elevada respecto al grupo CC.

Tabla 7.1.2 Resultados bioquímicos en suero materno.

	<i>Fin de gestación</i>		<i>Fin de lactancia</i>			
	CONTROL Media \pm ES	GRASA Media \pm ES	CC Media \pm ES	CG Media \pm ES	GC Media \pm ES	GG Media \pm ES
Glucosa	94.4 \pm 2.6	92.7 \pm 2.8	91.5 \pm 3.4	151 \pm 3.5*	114.6 \pm 9.6	102.8 \pm 5.9
Colesterol	104.1 \pm 4.0	94.9 \pm 5.5	110.1 \pm 8.0	120.7 \pm 11.1	102.8 \pm 3.6	122.8 \pm 4.8
Triacilglicéridos	54 \pm 3.8	54 \pm 3.8	60.2 \pm 7.81	45.3 \pm 5.6	44.4 \pm 4.5	49.2 \pm 5.17

ES, error estándar; ANOVA de una vía y prueba paramétrica Tukey. *Valor significativamente diferente ($P < 0.05$) a comparación del control CC. Los grupos al final de la gestación representan una $n=12$ mientras que al fin de la lactancia representan una $n=6 \pm 1$.

7.2 Resultados de las crías

Medidas somatométricas

El efecto de la dieta en las madres puede afectar las medidas somatométricas de las crías. En la tabla 7.2.1 se registran los valores de las medidas en las crías al día 1 postnatal. Se midió el peso, la talla, circunferencia abdominal y el ancho de cráneo para determinar su crecimiento. Al día 1 postnatal no se encontraron diferencias significativas en el grupo Grasa contra el Control.

Tabla 7.2.1. Medidas somatométricas de las crías al día 1 postnatal.

	<i>Día 1 postnatal</i>	
	<i>CONTROL</i> <i>Media ± ES</i>	<i>GRASA</i> <i>Media ± ES</i>
Peso (g)	6.49 ± 0.17	6.4 ± 0.08
Talla (cm)	5.13 ± 0.047	5.2 ± 0.04
Circunferencia Abdominal (cm)	4.42 ± 0.03	4.38 ± 0.05
Ancho de cráneo (mm)	0.96 ± 0.02	0.95 ± 0.00

ES, error estándar. Los grupos representan una n=10 camadas, el promedio de crías por camadas es de 4 ± 2.

Se tomaron medidas nuevamente al día 21 postnatal, lo cual representa el fin de la lactancia. A esta edad se registraron las medidas para identificar algún cambio en el crecimiento como consecuencia de la alimentación de la madre. La **Tabla 7.2.2.** muestra que no existe diferencia significativa en las medidas de las crías al día postnatal 21 respecto al grupo control CC.

Tabla 7.2.2. Medidas somatométricas de las crías al día 21 postnatal.

	<i>Día 21 postnatal</i>			
	CC <i>Media ± ES</i>	CG <i>Media ± ES</i>	GC <i>Media ± ES</i>	GG <i>Media ± ES</i>
Peso (g)	49.7 ± 1.9	49.7 ± 1.3	51.7 ± 1.3	48.5 ± 1.5
Talla (cm)	11.1 ± 0.1	11.1 ± 0.1	11.4 ± 0.3	11.0 ± 0.2
Circunferencia Abdominal (cm)	8.6 ± 0.1	8.7 ± 0.2	8.9 ± 0.08	8.1 ± 0.3
Ancho de cráneo (mm)	1.6 ± 0.03	1.7 ± 0.01	1.7 ± 0.06	1.6 ± 0.05

ES, error estándar. Los grupos representan una n= 6± 1 camadas, el promedio de crías por camadas es de 4 ± 2.

Resultados bioquímicos

La manera de detectar alguna alteración en el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos en las crías fue midiendo los parámetros bioquímicos de insulina, glucosa, triacilglicéridos, colesterol total, HDL, VLDL y LDL. Al día 1 postnatal (**Tabla 7.2.3**) no existe diferencia de estos valores entre los dos grupos.

Tabla 7.2.3. Resultados bioquímicos en suero de las crías al día 1 postnatal

	<i>Día 1 postnatal</i>	
	CONTROL <i>Media ± ES</i>	GRASA <i>Media ± ES</i>
Glucosa (mg/dl)	48.80 ± 4.33 (n=12)	51.47 ± 4.09 (n=12)
Triacilglicéridos (mg/dl)	159.13 ± 20.2 (n=12)	173.92 ± 28.26 (n=12)
Colesterol total (mg/dl)	78.85 ± 2.88 (n=12)	85.16 ± 6.14 (n=12)
Colesterol HDL (mg/dl)	6.85 ± 1.67 (n=11)	15.94 ± 5.42 (n=9)
VLDL (mg/dl)	29.50 ± 3.62 (n=11)	32.15 ± 3.42 (n=9)
LDL (mg/dl)	42.40 ± 4.89 (n=11)	37.9 ± 9.44 (n=9)
Insulina (ng/ml)	0.09 ± 0.008 (n=5)	0.166 ± 0.041 (n=4)

ES, error estándar; n= número de camadas, el promedio de crías por camadas es de 4 ± 2.

En la **Tabla 7.2.4** se observa que al día 21 postnatal las crías del grupo CG tuvieron un aumento significativo en las concentraciones de glucosa con respecto a CC. El colesterol HDL de igual manera presenta valores significativamente diferentes. Los valores de triacilglicéridos no presentan una diferencia estadística pero muestran una tendencia de incremento. La insulina está elevada respecto al control CC en las crías cuyas madres consumieron dieta alta en grasa durante la gestación y la lactancia (GG).

Tabla 7.2.4. Resultados bioquímicos en suero de las crías al día 21 postnatal

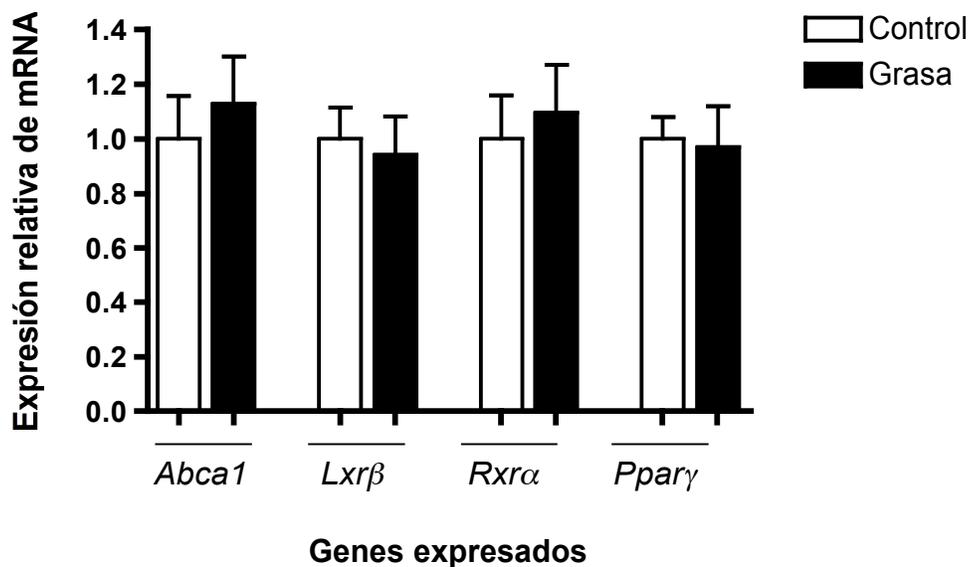
	<i>Día 21 postnatal</i>			
	CC <i>Media ± ES</i>	CG <i>Media ± ES</i>	GC <i>Media ± ES</i>	GG <i>Media ± ES</i>
Glucosa (mg/dl)	210.14 ± 11.73 (n=6)	308.36 ± 7.83*	200.69 ± 8.37 (n=6)	209.04 ± 10.48 (n=6)
Triacilglicéridos (mg/dl)	49.18 ± 8.22 (n=6)	70.39 ± 7.3 (n=6)	66.17 ± 12.31 (n=6)	102.89 ± 22.95 (n=6)
Colesterol total (mg/dl)	183.91 ± 13.59 (n=6)	179.86 ± 6.9 (n=6)	189 ± 14.21 (n=6)	217.94 ± 7.91 (n=6)
Colesterol HDL (mg/dl)	36.28 ± 1.17 (n=6)	41.94 ± 3.14 (n=7)	45.37 ± 5.19 (n=6)	53.33 ± 2.23*
VLDL (mg/dl)	9.56 ± 1.69 (n=6)	16.14 ± 7.9 (n=7)	13.41 ± 2.39 (n=6)	21.46 ± 4.93 (n=5)
LDL (mg/dl)	130.19 ± 14.08 (n=6)	124 ± 4.88 (n=7)	129.04 ± 11.84 (n=6)	140.76 ± 3.29 (n=5)
Insulina	0.39 ± 0.02 (n=5)	0.48 ± 0.01 (n=5)	0.49 ± 0.05 (n=4)	0.68 ± 0.05*

ES, error estándar; ANOVA de una vía y prueba paramétrica Tukey. *Valor significativamente diferente ($p < 0.05$) a comparación del control CC. n= número de camadas, el promedio de crías por camadas es de 4 ± 2 .

Resultados de expresión genética

Por medio de PCR-Tiempo Real se detectó la expresión relativa de RNA mensajero en islotes de Langerhans de los genes estudiados *Abca1*, *Rxra*, *Lxrβ* y *Pparγ*. La **Gráfica 7.2.1** muestra la expresión al día 1 postnatal. Se observa que al día 1 no existen diferencias significativas en la expresión de los genes. Esta cadena regulatoria del gen *Abca1*, así como el mismo gen, no se ven alterados en esta etapa debido a la dieta alta en grasa por parte de la madre. Se puede identificar una tendencia a aumentar en la expresión de *Abca1*.

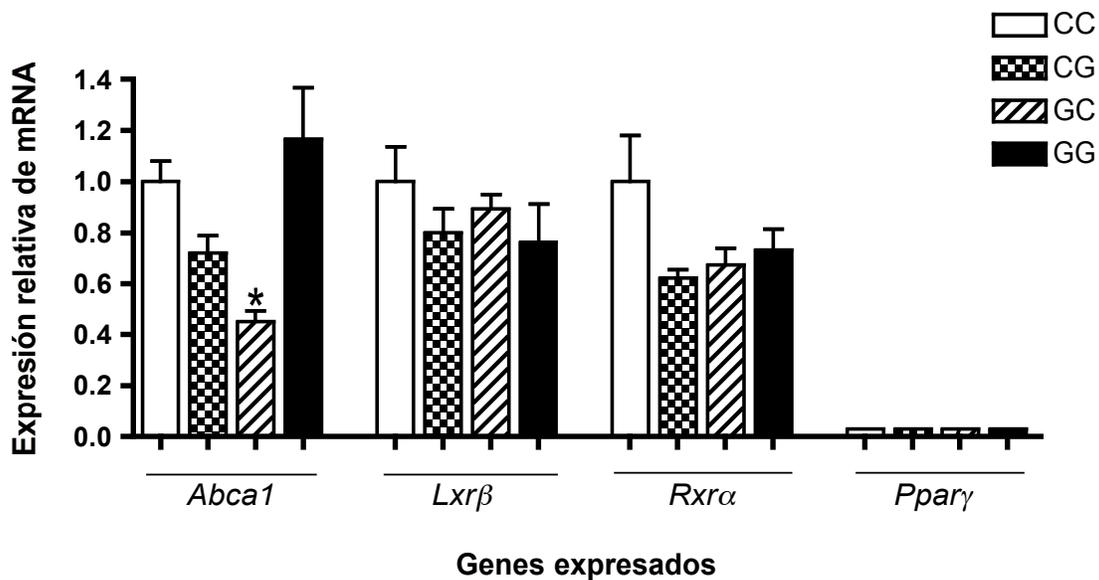
Gráfica 7.2.1. Expresión relativa de los genes *Abca1*, *Rxra*, *Lxrβ* y *Pparγ* al día 1 postnatal



Media \pm error estándar. Prueba T-student, *diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al Control. Los grupos representan una $n=7$. n = número de camadas, el promedio de crías por camadas es de 4 ± 2

Al día 21 postnatal (**Gráfica 7.2.2**) se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de *Abca1* en el grupo GC respecto al control CC. El gen del transportador disminuye su expresión a causa de la dieta alta en grasa consumida por la madre durante la gestación. Los genes de los factores de transcripción *Lxrβ* y *Rxrα* no mostraron diferencia significativa en su expresión al día 21 postnatal. Se observa que el gen *Pparγ* no se expresó significativamente al día 21 postnatal en ninguno de los 4 grupos experimentales.

Gráfica 7.2.2. Expresión relativa de los genes *Abca1*, *Rxrα*, *Lxrβ* y *Pparγ* al día 21 postnatal



Media \pm error estándar. ANOVA de una vía y prueba paramétrica Tukey. *Valor significativamente diferente ($p < 0.05$) a comparación del control CC. Los grupos CC y CG representa una $n = 5$ y GC y GG $n = 4$. $n =$ número de camadas, el promedio de crías por camadas es de 4 ± 2 .

8. Discusión de resultados

Las alteraciones alimenticias durante ventanas críticas del desarrollo, como los períodos fetal y postnatal, programan al organismo a cambios genéticos y metabólicos en la vida adulta. El consumo de una dieta materna alta en grasa altera la expresión de los genes en las crías promoviendo un aumento en el riesgo a padecer enfermedades como la diabetes. Genes reguladores del metabolismo, como el transportador *Abca1*, juegan un papel muy importante en la secreción de insulina por parte de las células β . Algún cambio en la expresión de este gen, causado por una programación, sumará un factor más para la susceptibilidad a la diabetes tipo 2.

El presente estudio, reporta una disminución de la expresión del gen *Abca1* en crías cuyas madres consumieron una dieta alta en grasa durante la gestación y dieta control durante la lactancia (GC). La expresión se analizó específicamente en los islotes de Langerhans debido a que las células β son las responsables de regular la secreción de insulina y esta secreción es influenciada por muchos factores, siendo uno de éstos el transportador ABCA1.

El gen *ABCA1* fue descubierto en los años noventas con la enfermedad de Tangier, mientras que su asociación a la diabetes fue establecida por el grupo canadiense del investigador Michael R. Hayden en el siglo XXI (Brunham, Kruit et al. 2007). En ratones genéticamente modificados ausentes del gen *Abca*, los investigadores reportan la existencia de intolerancia a la glucosa, falla en la secreción de insulina y alteraciones en el flujo de colesterol en los islotes de Langerhans, contribuyendo así a la disfunción de las células β . En el humano, se han identificado al menos 50 variantes genéticas en *ABCA1*, todas resultando en una disminución del flujo de lípidos (Singaraja, Brunham et al. 2003). Sin embargo, en la literatura no está reportada la caracterización del efecto de una programación fetal en la expresión de *Abca1*. No se sabe cómo se expresa en etapas tempranas del desarrollo y se desconoce si puede ser alterado o no por una programación fetal. Los estudios se centran en modelos animales y/o humanos donde el gen *ABCA1* es defectuoso o ausente y el fenotipo está caracterizado por acumulación intracelular de colesterol, ausencia casi total de HDL en plasma y un mayor riesgo a enfermedades cardiovasculares y diabetes.

Este estudio logra demostrar que existe una programación en el gen *Abca1* debido al ambiente materno alterado durante la gestación, causado por una dieta alta en grasas. En las etapas de programación, el ambiente intrauterino y la alimentación postnatal modifican la expresión de genes permanentemente por medio de la epigenética (Yajnik, Godbole et al. 2007). Los genes obtienen patrones de expresión a lo largo de la vida que manifiestan diferentes fenotipos. Es de suma importancia caracterizar la expresión de este gen en crías cuyas madres consumen dieta alta en grasa, ya que una alteración en este gen desde etapas tempranas, podría asociarse a un fenotipo diabético debido a la falla de secreción de insulina mencionada anteriormente.

El páncreas inicia su organogénesis desde la etapa fetal, siguiendo su desarrollo hasta el período postnatal temprano. Durante la gestación, la diferenciación de las células precursoras y la proliferación de las células β comienzan a caracterizar la maduración del páncreas. En los días de gestación E21.5 - 22, ocurre la mayor proliferación de las células endocrinas y el páncreas continúa su desarrollo hasta el día 28 postnatal (Green, Rozance et al. 2010). En este período de organogénesis, las condiciones de desarrollo son críticas para el páncreas. Como se ha mencionado antes, algún insulto en esta etapa puede afectar al páncreas tanto en su desarrollo como en su funcionamiento durante la vida adulta. La valoración al día 1 de nacimiento será, por lo tanto un momento crítico del desarrollo que reflejará la manera como se transitó la gestación. En este estudio, interesantemente los islotes de Langerhans de las crías al día 1 postnatal no presentaron cambios significativos en la expresión del gen *Abca1* en comparación del control (**Gráfica 7.2.2**). Las alteraciones existentes en las etapas de desarrollo, en este caso la gestación, tienen influencia sobre la expresión de genes durante la vida del organismo, no necesariamente al momento del nacimiento. Este fenómeno se explica con la epigenética. Por ejemplo, las modificaciones en las histonas durante el desarrollo inicial de un organismo, no necesariamente establecen la ausencia o presencia de la expresión de un gen, sino que establecen la subsecuente expresión y respuesta a varios controles transcripcionales que puedan surgir en etapas de vida posteriores (Skinner 2011).

Durante las primeras semanas postnatales, las crías cambian su alimentación y consumen leche materna hasta el fin del período de lactancia (destete). Los islotes de

Langerhans continúan madurando y sufriendo cambios a lo largo de este período (Aguayo-Mazzucato, Sanchez-Soto et al. 2006). El estudio demostró que la programación fetal genera cambios al día 21 postnatal. La **Gráfica 7.2.3** indica una disminución significativa de la expresión de *Abca1* en el grupo GC, reflejando que la dieta alta en grasa materna tiene efectos en la expresión postnatal del gen. Por otra parte, el grupo CG no mostró diferencia estadísticamente significativa, descartando una alteración del gen a causa de la dieta durante la etapa de lactancia y confirmando que la alteración se da en la vida intrauterina cuando sí se consume una dieta alta en grasa por parte de la madre. Como se ha mencionado previamente, el transportador ABCA1 regula el flujo reverso de colesterol según las necesidades de la célula. El aumento de colesterol es tóxico para las células, por lo cual el mecanismo de control debe estar bien regulado. Cualquier disminución en este transportador, específicamente en los islotes de Langerhans, reflejaría un mal control del colesterol intracelular y por lo tanto afectaría la secreción de insulina.

El grupo GG, que igualmente consumió dieta alta en grasa durante la gestación, no revela una disminución en la expresión de *Abca1*, ya que el mantenimiento del mismo tipo de dieta no permite ver el cambio que fue programado durante la gestación. En la programación fetal, el ambiente embrionario induce cambios a lo largo de la vida tanto morfológicos como metabólicos. Los grandes cambios morfológicos son poco frecuentes, sin embargo, ciertas alteraciones a nivel metabólico o en expresión genética como en este caso, llevan a daños en el desarrollo y aumentan el riesgo a enfermedades metabólicas (Lillycrop and Burdge 2011). Al no observar cambios en el grupo GG, se sugiere que existe un mecanismo adaptativo, donde la constancia de la dieta logra favorecer la regulación metabólica en la vida postnatal. Khan et al comprueba esto al evaluar crías cuyas madres consumieron la misma dieta pre y postnatal (dieta alta en grasa), adquieren protección contra la disfunción endotelial en comparación de las ratas que consumieron grasa durante el embarazo y cambiaron a dieta control en la lactancia (Khan, Dekou et al. 2004).

La dieta administrada no es consumida directamente por las crías, por lo que se evidencia que el cambio en la expresión no es una respuesta a la dieta, sino al ambiente alterado que vivió la cría durante la gestación. El efecto de los nutrimentos sobre el transportador se caracteriza debido a que el colesterol y los lípidos son los

ligandos que promueven la expresión de *Abca1*. La regulación del transportador sobre las necesidades de la célula es reportado por Hayden en ratones wild type adultos con administración de 15.8% de grasa dietética. En diferentes tejidos se observó que los oxisteroles aumentan la transcripción de *Abca1*, por ejemplo en fibroblastos se observó que el aumento de expresión de *Abca1* es críticamente dependiente de la carga de colesterol intracelular (Singaraja, James et al. 2005). En caso de que en este estudio la dieta fuera responsable de los efectos, se esperaría que al quitar el estímulo de grasa en el grupo GC, la expresión del gen regrese a los niveles normales de expresión del grupo control (CC), sin embargo, en este caso disminuyó aun más. En el grupo GG, se observa una tendencia de aumento en la transcripción de *Abca1*, sin embargo no existe diferencia significativa.

El gen *Abca1* es regulado por los factores de transcripción que promueven su expresión. Al observar la programación de este gen en el grupo GC del día 21 postnatal, se decidió evaluar la cadena de factores que regulan la transcripción del gen: *Rxra*, *Lxrβ* y *Pparγ*. Este estudio reveló que los factores de transcripción *Rxra* y *Lxrβ* no se encuentran alterados al día 1 y 21 postnatal con respecto al control CC (**Gráfica 7.2.1 y 7.2.2**). *Rxra* es utilizado para formar un heterodímero con *Lxrβ* por lo que su expresión deberá ser similar. Sin embargo, estos dos factores de transcripción son receptores nucleares que regulan conjuntamente muchos otros genes. Tienen un sistema de autorregulación donde el mismo factor de transcripción se une directamente al promotor de su propio gen, influenciando así la tasa de transcripción de él mismo (Calkhoven and Ab 1996). Gracias a esto mantienen la expresión debida y el fenotipo específico necesario para cada célula donde se expresan. El autor Buettner (Buettner, Parhofer et al. 2006) reporta resultados similares donde en su estudio de administración de varias dietas altas en grasa a ratas Wistar, no encontró diferencia en la expresión de *Lxr* en hígado a pesar de los diferentes tratamientos. RXRα forma un heterodímero con PPARγ para que éste último pueda funcionar, sin embargo, *Rxra* no depende de *Pparγ* para su expresión (Schmitz and Langmann 2005). Por lo tanto vemos que el hecho de que *Pparγ* no esté expresado al día 21, no quiere decir que *Rxra* tampoco deba estarlo. *Rxra* y *Lxrβ* funcionan independientemente para regular otros genes.

Pparγ no se observó alterado en los diferentes grupos experimentales. Mostró patrones de expresión característicos al día 1 y 21 postnatal sin verse alterado por los

tratamientos al igual que los factores *Rxra* y *Lxr β* . Está muy poco expresado al día 21 de nacimiento, casi indetectable por la técnica de PCR-Tiempo Real (**Gráfica 7.2.2**). Se sabe que en ratas, la expresión de *Ppar γ* presenta patrones de expresión muy estrictos, a comparación de otros receptores nucleares *Ppar*. El gama (γ) es casi restringido para tejido adiposo, aunque sí se ha encontrado en el islote adulto (Dubois, Pattou et al. 2000). Por ejemplo, en un estudio de embriones de ratas, la expresión de *Ppar γ* durante la embriogénesis se observó únicamente en los días 13 a 15 en el sistema nervioso central, mientras que al día 18.5 únicamente se encontró expresado en el tejido adiposo marrón (Braissant and Wahli 1998). Estos patrones variantes de la expresión de *Ppar γ* se reflejan en este estudio, ya que al día 1 postnatal sí está expresado, mientras que al día 21 es casi indetectable (**Gráfica 7.2.2 y Gráfica 7.2.3**). Es interesante notar como la expresión de *Abca1* no es dependiente de la expresión de *Ppar γ* , ya que aunque *Ppar γ* no esté expresado en ningún grupo experimental ni responda a una dieta alta en grasas, *Abca1* si se expresa en los islotes de las crías.

Con base en lo anterior, de los cuatro genes evaluados, la programación se observó claramente en el gen regulador del flujo reverso del colesterol *Abca1*. Este estudio es el primero en reflejar los efectos de programación que pueden existir en el gen *Abca1* en períodos tempranos del desarrollo de los islotes de Langerhans debido al ambiente materno alto en grasa. Como se ha mencionado, esta programación ocurre por cambios epigenéticos. La literatura muestra la evidencia sobre la susceptibilidad del gen *ABCA1* a ser modificado por la epigenética en el período gestacional. Un estudio realizado en el 2009 donde se analizaron las metilaciones de 15 genes en individuos cuyas madres fueron expuestas a hambruna durante la segunda guerra mundial, comprueba que *ABCA1* es uno de los 5 locus con mayor hipermetilación (Tobi, Lumey et al. 2009), asociándose esto a que un ambiente alterado lleve a consecuencias metabólicas en la vida adulta.

La programación de *Abca1* observada tendrá efectos en las crías, sobre todo si el patrón de expresión disminuido continúa a largo plazo. En este trabajo, la expresión de *Abca1* no presenta una disminución total porque no existe la delección del gen. Los estudios de Hayden y Singaraja indican que la acumulación de colesterol en islotes de ratones knockout de *Abca1*^{-/-} únicamente en islotes, lleva a presentar niveles de colesterol plasmático similar a los controles silvestres, sin embargo el colesterol

acumulado en los islotes es mucho mayor, esto a su vez lleva a estos ratones a presentar una mayor área bajo la curva de glucosa en una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT por sus siglas en inglés). Se sugiere que esta disminución disminuye la secreción de insulina debido a una falla en el flujo reverso del colesterol en las células β . Aunque en este estudio no se reporta un aumento de niveles de colesterol en plasma, no elimina la posibilidad de tener acumulación de colesterol en el islote que lleve a generar una falla en la secreción de insulina en etapas tempranas y futuras. La disminución en la expresión del transportador se asemeja al modelo humano con algún polimorfismo en el gen de esta proteína. Este estudio revela así un nuevo indicador a temprana edad que se asocia a enfermedades metabólicas. Desde etapas del inicio del desarrollo ya existen alteraciones en este transportador que darán la clave a varios estudios a futuro y evaluar la alteración a largo plazo.

El modelo murino realizado en este estudio es caracterizado en la literatura como un modelo que genera resistencia a la insulina debido a una dieta alta en grasa/hipercalórica (Cerf, Williams et al. 2005, Zambrano, Martínez-Samayoa et al. 2010, Benkalfat, Merzouk et al. 2011, Page, Malik et al. 2009). Los cambios metabólicos transitorios llevarán a un agotamiento de las funciones del páncreas en la vida adulta. Las variaciones fenotípicas de este modelo se deben principalmente al tipo de dieta utilizada, el tipo de grasa empleada y al tiempo de exposición a la dieta. Nuestro modelo refleja algunas alteraciones presentes en estos estudios como son los observados en las crías al día 21 de nacimiento. En la **Tabla 7.2.4** se muestra un aumento en la glucosa en el grupo CG y un aumento en las concentraciones de las HDLs y de insulina en el grupo GG respecto al grupo control (CC). Actualmente, los mecanismos de la programación fetal no se conocen (Shankar, Harrell et al. 2008), sin embargo en este estudio se identificaron alteraciones metabólicas y moleculares que sugieren la existencia de una programación fetal.

El modelo de dieta alta en grasa sumado al factor de los hallazgos de este estudio en la expresión del transportador, aumentan las susceptibilidad al organismo a la diabetes tipo 2. La proteína expresada también pierde su funcionalidad mientras se va desarrollando la enfermedad. En la edad adulta, la hiperglucemia y lipotoxicidad afectan la función de la proteína ABCA1, fomentando la progresión de la enfermedad. Un estudio de diabetes en riñones y macrófagos mostró que la expresión del mRNA no se

ve afectada, sin embargo las concentraciones de proteína disminuyeron significativamente a causa de la diabetes, llevando a estas células a presentar un menor flujo de colesterol y mayor acumulación de colesterol intracelular (Tang, Kanter et al. 2010). El grupo de investigadores propone que la proteína ABCA1 se ve disminuida debido a los productos altamente glicosilados (AGE) presentes en la diabetes. También observaron que los altos niveles de ácidos grasos desestabilizan a ABCA1 por medio de una vía de señalización que fosforila las serinas del transportador disminuyendo así su función. En otro estudio se registró que tanto en adipocitos controles, como en adipocitos sensibles a la insulina, la insulina es capaz de disminuir la expresión de *Abca1* (Sartipy and Loskutoff 2003). En humanos con diabetes tipo 2, se ha visto que presentan bajos niveles de mRNA de *ABCA1* en monocitos comparado con sujetos controles (Brunham, Kruit et al. 2008). No existen estudios de ABCA1 en islotes de Langerhans en humanos con diabetes tipo 2. Probablemente también exista una glicosilación por la hiperglucemia, así como disminución en la función por efectos de la grasa, llevando esto a una mayor progresión de la enfermedad. En los resultados de este trabajo, la disminución de la expresión del transportador en el grupo GC se identifica como un factor más que hace a las crías más susceptibles a presentar diabetes en la vida adulta. El organismo se verá afectado tanto por la programación de *Abca1* como por el daño en la proteína una vez que se presente el fenotipo diabético. La suma de los factores predispondrán al individuo a presentar falla en la secreción de insulina y flujo alterado del colesterol llevando a un desarrollo o progresión acelerada de la enfermedad.

Es importante recalcar la importancia de este estudio para México. En nativos mexicanos, existe una alta prevalencia del polimorfismo R230C del gen *ABCA1* (20.1% en mestizos mexicanos). Esta variante tiene un efecto funcional ya que disminuyen en un 27% el flujo del colesterol, así como una disminución en los valores de HDL, apoA-1 y mayor índice de masa corporal, asociándolos a un mayor riesgo de diabetes y obesidad (Acuna-Alonzo, Flores-Dorantes et al. 2010). Estos pacientes no presentan valores elevados de glucosa e insulina en suero. Los pacientes con este tipo de variante alélica tienen mayor riesgo a padecer diabetes, por lo que una alteración en la expresión del transportador es un factor aditivo al riesgo de desarrollar la enfermedad. De esta manera, la expresión reducida del transportador asemeja a las variantes

alélicas en los humanos, ya que aquí existe una disminución en la expresión, mientras que en el humano se reflejan alteraciones funcionales en la proteína.

El ambiente alto en grasa de este modelo murino se asemeja a la alimentación de la población mexicana actualmente. En México existen tanto enfermedades de países desarrollados como obesidad y diabetes, y enfermedades de países en vías de desarrollo como la desnutrición. Los efectos de desnutrición en la programación fetal están reportados ampliamente en la literatura. Recientemente, nuestro grupo de estudio publicó que la restricción proteica materna aumenta ciertos factores de transcripción que aceleran el desarrollo del páncreas en las crías a expensas de la maduración de la célula β (Rodríguez-Trejo, Ortiz-Lopez et al. 2012). Se propone que la dieta alta en grasa asemeje los efectos de la dieta baja en proteínas aumentando la susceptibilidad a la diabetes tipo 2.

Por lo tanto, se comprueba que el ambiente materno alterado por una dieta alta en grasa, programa a las crías a disminuir la expresión del transportador *Abca1* en islotes de Langerhans en la crías cuyas madres consumieron grasa en el embarazo y dieta control durante la lactancia. Este trabajo demostró que la expresión en los islotes no depende específicamente de los niveles de expresión de sus factores regulatorios que son *Rxra*, *Lxr β* y *Ppar γ* . El saber que *Abca1* se altera desde etapas tempranas del desarrollo, muestra un punto alarmante ya que indicaría un factor más que disminuirá la secreción de insulina. Las alteraciones bioquímicas por la exposición a la grasa durante la gestación como el incremento en la glucosa e insulina, reflejan el inicio del daño metabólico que aumenta el riesgo a enfermedades en la vida adulta. En la población mexicana, la diabetes tipo 2 es la primera causa de muerte, por lo que el poder identificar un factor más asociado a la falla de la secreción de insulina en los islotes de Langerhans es de suma importancia para entender la etiología. México tiene población con una genética específica que aumenta el riesgo a padecer diabetes, como el caso de la variante alélicas R230C del transportador *Abca1*. Es necesario poder unir tanto la genética como la nutrición y el medio ambiente para entender las enfermedades que existen en el país.

9. CONCLUSIÓN

La dieta materna alta en grasa administrada durante ventanas críticas del desarrollo programa a las crías a disminuir la expresión del transportador *Abca1* asociándose esto a una mayor susceptibilidad a la diabetes tipo 2. La programación fetal y postnatal es un mecanismo que podría contribuir al rápido aumento de obesidad y diabetes que existe en el país. Las características del consumo materno de dieta alta en grasa que lleva a un fenotipo similar a la diabetes, programa a las crías por medio de procesos epigenéticos y transmite estas alteraciones a las siguientes generaciones.

La alimentación es un factor muy importante durante los períodos críticos de desarrollo como son la gestación y la lactancia. En estos momentos, el páncreas se desarrolla a una gran velocidad y cualquier falla en este periodo altera los mecanismos de desarrollo y crecimiento. Las alteraciones en los parámetros bioquímicos generarán cambios metabólicos a corto y largo plazo que aumentan la susceptibilidad del organismo a desarrollar diabetes tipo 2. La programación en la expresión del transportador *Abca1* se presenta como uno de los candidatos fundamentales que puede aumentar el riesgo a padecer la enfermedad.

Este trabajo muestra un punto clave para analizar la importancia del transportador desde etapas tempranas. Actualmente no se sabe cómo funciona o se asocia a la programación y gracias a estos resultados se demuestra que la expresión está siendo alterada al día 21 postnatal a causa del consumo materno alto en grasa durante la gestación y un cambio de dieta durante la lactancia. Es predecible que la programación fetal se mantenga durante la vida del organismo y se asocie al desarrollo de enfermedades.

El transportador ABCA1 es sumamente relevante en la población mexicana debido a la alta frecuencia de la variante alélica R230C y su asociación con la diabetes, siendo ésta una enfermedad con alta prevalencia en el país y que ha aumentado drásticamente durante los últimos años. Actualmente el 70% de la población presenta sobrepeso u obesidad y somos el primer país con obesidad infantil, los cuales son factores de riesgo para la diabetes tipo 2. Proporcionar evidencias en cuanto a la expresión y el

comportamiento del gen *Abca1* en etapas tempranas de la vida de la rata promueve el conocimiento científico para caracterizar la etiología de las enfermedades que existen actualmente en la población mexicana.

La nutrición es un punto clave para estas enfermedades ya que las personas actualmente presentan malos hábitos alimenticios que los pueden programar a padecer enfermedades crónico degenerativas. Una buena alimentación y buenos hábitos son medidas que se deben seguir para prevenir el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas. Tanto en la vida adulta, como en ventanas críticas del desarrollo, la nutrición debe de ser vigilada para lograr un correcto crecimiento y funcionamiento del organismo.

10. PERSPECTIVAS

Este proyecto logró aumentar la evidencia sobre los efectos del consumo de la dieta alta en grasa en los períodos de gestación y lactancia, indicando las alteraciones metabólicas y genéticas. Se deberá evaluar en otros momentos postnatales el efecto de la programación en la expresión de *Abca1* para identificar las alteraciones permanentes a largo plazo y la suma de factores de riesgos que llevan a la diabetes.

Es recomendable realizar pruebas funcionales para identificar el estado fisiológico del islote de Langerhans y su asociación con la alteración del transportador, siendo estas pruebas un ensayo de secreción de insulina, flujo de colesterol en el islote, colesterol total contenido en el islote y prueba de tolerancia a la glucosa en las crías. Por otra parte, el estudio de los efectos de *Abca1* en otros órganos metabólicos como el hígado podría relacionarse con los efectos metabólicos observados en este estudio.

La base de la programación se basa en la epigenética, por lo que estudiar los marcadores epigenéticos que ocurren en estas crías sería de gran relevancia para entender los mecanismos moleculares que llevan a la susceptibilidad de enfermedades.

Otros estudios de programación fetal abarcan diferentes tipos de dieta que afectan el desarrollo de las crías. La comparación entre diferentes dietas como baja en proteínas, restricción calórica, exceso de hidratos de carbono o diferentes tipos de grasa, serían un punto importante tanto para identificar el comportamiento del transportador como para evaluar los riesgos a enfermedades crónico degenerativas originadas por una alimentación inadecuada.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Acuna-Alonzo, V., T. Flores-Dorantes, et al. (2010). "A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans." *Hum Mol Genet* **19**(14): 2877-2885.
- Aguayo-Mazzucato, C., C. Sanchez-Soto, et al. (2006). "Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window." *PLoS One* **1**: e35.
- Akyol, A., S. C. Langley-Evans, et al. (2009). "Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat." *Br J Nutr* **102**(11): 1601-1610.
- Attie, A. D., J. P. Kastelein, et al. (2001). "Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis." *J Lipid Res* **42**(11): 1717-1726.
- Barker, D. J. (1990). "The fetal and infant origins of adult disease." *BMJ* **301**(6761): 1111.
- Braissant, O. and W. Wahli (1998). "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development." *Endocrinology* **139**(6): 2748-2754.
- Brissova, M., M. J. Fowler, et al. (2005). "Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy." *J Histochem Cytochem* **53**(9): 1087-1097.
- Brunham, L. R., J. K. Kruit, et al. (2006). "Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels." *Circ Res* **99**(7): 672-674.
- Brunham, L. R., J. K. Kruit, et al. (2007). "Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment." *Nat Med* **13**(3): 340-347.
- Brunham, L. R., J. K. Kruit, et al. (2008). "Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes." *J Clin Invest* **118**(2): 403-408.
- Buettner, R., K. G. Parhofer, et al. (2006). "Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types." *J Mol Endocrinol* **36**(3): 485-501.
- Cabrera-Vasquez, S., V. Navarro-Tableros, et al. (2009). "Remodelling sympathetic innervation in rat pancreatic islets ontogeny." *BMC Dev Biol* **9**: 34.
- Calkhoven, C. F. and G. Ab (1996). "Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity." *Biochem J* **317** (Pt 2): 329-342.
- Capeau, J. (2008). "Insulin resistance and steatosis in humans." *Diabetes Metab* **34**(6 Pt 2): 649-657.
- Cerf, M. E., K. Williams, et al. (2005). "Islet cell response in the neonatal rat after exposure to a high-fat diet during pregnancy." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**(5): R1122-1128.
- Cooper, W. N., B. Khulan, et al. (2012). "DNA methylation profiling at imprinted loci after periconceptional micronutrient supplementation in humans: results of a pilot randomized controlled trial." *FASEB J*.

- de Vogel-van den Bosch, H. M., N. J. de Wit, et al. (2008). "A cholesterol-free, high-fat diet suppresses gene expression of cholesterol transporters in murine small intestine." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **294**(5): G1171-1180.
- Dubois, M., F. Pattou, et al. (2000). "Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells." Diabetologia **43**(9): 1165-1169.
- Easom, R. A. (2000). "Beta-granule transport and exocytosis." Semin Cell Dev Biol **11**(4): 253-266.
- Edlund, H. (2002). "Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy." Nat Rev Genet **3**(7): 524-532.
- Feng, H. and X. A. Li (2009). "Dysfunctional high-density lipoprotein." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **16**(2): 156-162.
- Foot, V. L., C. C. Richardson, et al. (2010). "Islets in early life are resistant to detrimental effects of a high-fat maternal diet: a study in rats." Horm Metab Res **42**(13): 923-929.
- Friedewald, W. T., R. I. Levy, et al. (1972). "Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge." Clin Chem **18**(6): 499-502.
- Gehrmann, W., M. Elsner, et al. (2010). "Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic beta-cells." Diabetes Obes Metab **12 Suppl 2**: 149-158.
- Green, A. S., P. J. Rozance, et al. (2010). "Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function." J Endocrinol **205**(3): 211-224.
- Hao, M., W. S. Head, et al. (2007). "Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction." Diabetes **56**(9): 2328-2338.
- Hermann, G. M., R. L. Miller, et al. (2009). "Neonatal catch up growth increases diabetes susceptibility but improves behavioral and cardiovascular outcomes of low birth weight male mice." Pediatr Res **66**(1): 53-58.
- Holemans, K., L. Aerts, et al. (2003). "Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development." J Physiol **547**(Pt 1): 11-20.
- Hozoji-Inada, M., Y. Munehira, et al. (2011). "Liver X receptor beta (LXRbeta) interacts directly with ATP-binding cassette A1 (ABCA1) to promote high density lipoprotein formation during acute cholesterol accumulation." J Biol Chem **286**(22): 20117-20124.
- Kavanagh, K., S. Sajadian, et al. (2010). "Neonatal and fetal exposure to trans-fatty acids retards early growth and adiposity while adversely affecting glucose in mice." Nutr Res **30**(6): 418-426.
- Khan, I., V. Dekou, et al. (2004). "Predictive adaptive responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring." Circulation **110**(9): 1097-1102.
- Kohlhoff, R. and G. Dorner (1990). "Perinatal hyperinsulinism and perinatal obesity as risk factors for hyperinsulinaemia in later life." Exp Clin Endocrinol **96**(1): 105-108.

- Ku, C. S., H. E. Rasmussen, et al. (2011). "Unsaturated fatty acids repress the expression of ATP-binding cassette transporter A1 in HepG2 and FHs 74 Int cells." Nutr Res **31**(4): 278-285.
- Langley-Evans, S. C. (2006). "Developmental programming of health and disease." Proc Nutr Soc **65**(1): 97-105.
- Lillicrop, K. A. and G. C. Burdge (2011). "Epigenetic changes in early life and future risk of obesity." Int J Obes (Lond) **35**(1): 72-83.
- Lin, Y. and Z. Sun (2010). "Current views on type 2 diabetes." J Endocrinol **204**(1): 1-11.
- Matsuo, M. (2010). "ATP-binding cassette proteins involved in glucose and lipid homeostasis." Biosci Biotechnol Biochem **74**(5): 899-907.
- Meier, J. J. (2009). "Linking the genetics of type 2 diabetes with low birth weight: a role for prenatal islet maldevelopment?" Diabetes **58**(6): 1255-1256.
- Nafee, T. M., W. E. Farrell, et al. (2008). "Epigenetic control of fetal gene expression." BJOG **115**(2): 158-168.
- Nagao, K., M. Tomioka, et al. (2011). "Function and regulation of ABCA1--membrane meso-domain organization and reorganization." FEBS J **278**(18): 3190-3203.
- Navarro-Tableros, V., T. Fiordelisio, et al. (2007). "Physiological development of insulin secretion, calcium channels, and GLUT2 expression of pancreatic rat beta-cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(4): E1018-1029.
- Oram, J. F. and J. W. Heinecke (2005). "ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease." Physiol Rev **85**(4): 1343-1372.
- Portha, B., A. Chavey, et al. (2011). "Early-life origins of type 2 diabetes: fetal programming of the beta-cell mass." Exp Diabetes Res **2011**: 105076.
- Redonnet, A., R. Groubet, et al. (2001). "Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator, retinoic acid, and triiodothyronine nuclear receptors in the rat." Metabolism **50**(10): 1161-1167.
- Rizzo, M. A., M. A. Magnuson, et al. (2002). "A functional link between glucokinase binding to insulin granules and conformational alterations in response to glucose and insulin." J Biol Chem **277**(37): 34168-34175.
- Rodriguez-Trejo, A., M. G. Ortiz-Lopez, et al. (2012). "Developmental programming of neonatal pancreatic beta-cells by a maternal low protein diet in rats involves a switch from proliferation to differentiation." Am J Physiol Endocrinol Metab.
- Samuelsson, A. M., P. A. Matthews, et al. (2008). "Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming." Hypertension **51**(2): 383-392.
- Sartipy, P. and D. J. Loskutoff (2003). "Expression profiling identifies genes that continue to respond to insulin in adipocytes made insulin-resistant by treatment with tumor necrosis factor-alpha." J Biol Chem **278**(52): 52298-52306.

- Schmitz, G. and T. Langmann (2005). "Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression." Biochim Biophys Acta **1735**(1): 1-19.
- Shankar, K., A. Harrell, et al. (2008). "Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **294**(2): R528-538.
- Shankar, K., P. Kang, et al. (2010). "Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring." Endocrinology **151**(6): 2577-2589.
- Singaraja, R. R., V. Bocher, et al. (2001). "Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoAI-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1." J Biol Chem **276**(36): 33969-33979.
- Singaraja, R. R., L. R. Brunham, et al. (2003). "Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(8): 1322-1332.
- Singaraja, R. R., E. R. James, et al. (2005). "Alternate transcripts expressed in response to diet reflect tissue-specific regulation of ABCA1." J Lipid Res **46**(10): 2061-2071.
- Singaraja, R. R., M. H. Kang, et al. (2009). "Palmitoylation of ATP-binding cassette transporter A1 is essential for its trafficking and function." Circ Res **105**(2): 138-147.
- Skinner, M. K. (2011). "Role of epigenetics in developmental biology and transgenerational inheritance." Birth Defects Res C Embryo Today **93**(1): 51-55.
- Srivastava, N. (2002). "ATP binding cassette transporter A1--key roles in cellular lipid transport and atherosclerosis." Mol Cell Biochem **237**(1-2): 155-164.
- Takahashi, N., H. Hatakeyama, et al. (2004). "Sequential exocytosis of insulin granules is associated with redistribution of SNAP25." J Cell Biol **165**(2): 255-262.
- Tamashiro, K. L. and T. H. Moran (2010). "Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring." Physiol Behav **100**(5): 560-566.
- Tang, C., J. E. Kanter, et al. (2010). "Diabetes reduces the cholesterol exporter ABCA1 in mouse macrophages and kidneys." J Lipid Res **51**(7): 1719-1728.
- Tiedge, M. and S. Lenzen (1993). "Differential regulation of glucokinase and GLUT-2 glucose transporter gene expression in pancreas and liver from neonatal and 16 day old rats." Biochem Mol Biol Int **29**(1): 161-166.
- Tobi, E. W., L. H. Lumey, et al. (2009). "DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific." Hum Mol Genet **18**(21): 4046-4053.
- Vergeer, M., L. R. Brunham, et al. (2010). "Carriers of loss-of-function mutations in ABCA1 display pancreatic beta-cell dysfunction." Diabetes Care **33**(4): 869-874.
- Villarreal-Molina, M. T., C. A. Aguilar-Salinas, et al. (2007). "The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities." Diabetes **56**(7): 1881-1887.

Yajnik, C. S., K. Godbole, et al. (2007). "Fetal programming of type 2 diabetes: is sex important?" Diabetes Care **30**(10): 2754-2755.

•