



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Expresión de los genes UCP2, FTO y Mgat4a en islotes
pancreáticos de crías de rata en un modelo con ejercicio y
dieta alta en lípidos.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ANA LAURA ORTEGA MÁRQUEZ



MÉXICO, D.F.

2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Elena Zambrano González
VOCAL: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
SECRETARIO: Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez
1er. SUPLENTE: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
2° SUPLENTE: Dra. Iliana Elvira González Hernández

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO: INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”

ASESOR DEL TEMA: DRA. LIDYA SUMIKO MORIMOTO MARTÍNEZ

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. TONANTZIN CITLALI SOSA LARIOS

(nombre y firma)

SUSTENTANTE: ANA LAURA ORTEGA MÁRQUEZ

(nombre y firma)

ÍNDICE

Índice	3
1. Resumen	5
2. Introducción	7
2.1 Obesidad.....	7
2.1.1 Obesidad materna.....	8
2.2 Programación fetal y obesidad materna.....	9
2.3 Páncreas.....	10
2.3.1 Insulina.....	12
2.3.2 Falla en las células beta y su relación con la obesidad.....	14
2.4 Regulación de la transcripción de genes.....	15
2.5 Dieta y expresión génica.....	17
2.6 Genes estudiados y su papel en la obesidad.....	19
2.6.1 Mgat4a.....	19
2.6.2 UCP2.....	21
2.6.3 FTO.....	22
2.7 Ejercicio Físico.....	23
3. Objetivo general	25
3.1 Objetivos particulares.....	25
4. Planteamiento del problema	25
5. Hipótesis	26

6. Material y Métodos	26
6.1 Grupos experimentales.....	26
6.2 Dietas.....	29
6.3 Aislamiento de islotes pancreáticos.....	30
6.4 Extracción de ARN.....	31
6.5 RT-PCR en tiempo real.....	32
6.6 Análisis estadístico.....	33
7. Resultados y análisis	33
7.1 Expresión relativa del gen Mgat4a.....	33
7.2 Expresión relativa del gen UCP2.....	37
7.3 Expresión relativa del gen FTO.....	38
8. Discusión de resultados	41
9. Conclusiones	44
10. Referencias	45

1. RESUMEN

La obesidad se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, en décadas recientes, su prevalencia ha incrementado. De acuerdo con la organización mundial de la salud, en el 2008, 1400 millones de adultos tenían sobrepeso, de los cuales, más de 200 millones de hombres y cerca de 300 millones de mujeres eran obesos. A consecuencia del sobrepeso y la obesidad, cada año fallecen por lo menos 2.8 millones de personas adultas en el mundo. Las causas que contribuyen con la aparición de estos problemas, comprenden factores ambientales, predisposición genética y estilo de vida, y se estima que el componente genético tiene una contribución de más del 40%. Dentro de los factores ambientales se incluye a la dieta y la reducción de actividad física. La obesidad materna induce efectos deletéreos en la salud de las crías, incluyendo la predisposición a la obesidad, enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2, cuyas principales características son la resistencia a la insulina y una deficiente secreción de la insulina debido al inadecuado funcionamiento de las células beta pancreáticas.

El páncreas es una glándula vital debido a que tiene un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa y es de gran interés por las enfermedades que le afectan, como la diabetes. Su función es tanto endocrina, como exocrina. Los componentes del páncreas endocrino son los islotes de Langerhans, conformados por distintos tipos celulares, entre éstos, las células beta que se encargan de la secreción de insulina.

Sabiendo que las dietas altas en lípidos incrementan la resistencia a la insulina y pueden llevar a la disfunción de las células beta y por otro lado, que el ejercicio mejora la sensibilidad a la insulina, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de una dieta materna alta en lípidos, una dieta intervenida (cambio de dieta materna hiperlipídica a dieta balanceada a partir del día 90 de edad) y el efecto del ejercicio materno y del ejercicio en la cría en el páncreas de la progenie evaluando la expresión de 3 genes (UCP2, FTO y Mgat4a), que están asociados con el balance energético y la secreción de insulina en respuesta a la glucosa.

Para ello se formaron los siguientes grupos de trabajo: crías provenientes de madres alimentadas con dieta control (C), crías provenientes de madres alimentadas con dieta control y que realizaron ejercicio durante la gestación (MejC), crías que realizaron ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta control (CE), crías provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica (OM), crías provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica y que realizaron ejercicio durante la gestación (Mej OM); crías que realizaron ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica (OM E); crías provenientes de madres alimentadas con dieta intervenida (Dint); crías provenientes de madres alimentadas con dieta intervenida y que realizaron ejercicio durante la gestación (MejDint); crías que realizaron ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta intervenida (DintE). Las crías macho fueron sacrificadas a la edad de 110 días y se obtuvieron islotes pancreáticos de los cuales se realizó la extracción de ARN. La expresión de los genes de interés se estudió por PCR en tiempo real. Se encontró que en el gen *Mgat4a* aumenta por efecto del ejercicio en las crías provenientes de madres obesas (OME) ó de madres alimentadas con dieta intervenida (DintE) con respecto a las crías con ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta control (CE), sugiriendo un posible papel benéfico del ejercicio sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa ya que la proteína codificada por este gen está involucrada con el anclaje del transportador de glucosa *Glut2*. Por otro lado, se encontró que la expresión del gen *FTO* aumenta debido al ejercicio en la madre alimentada con dieta control, y sabiendo que el *FTO* tiene función de desmetilasa, se puede especular que dicho gen podría estar regulando otros genes relacionados con la primera fase de la secreción de insulina. El gen *UCP2* no mostró modificación debido a la dieta materna, al ejercicio en la madre ó en la cría.

Ya que el ejercicio en la cría produjo un incremento en la expresión del gen *Mgat4a* cuando proviene de madres alimentadas con dieta alta en lípidos, se sugiere que el ejercicio materno (*FTO*) y el ejercicio en la cría (*Mgat4a*) tiene un efecto benéfico en la regulación de los mismos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Obesidad

Según la Organización mundial de la salud (OMS), la obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud, es una enfermedad compleja que involucra interacciones ambientales y factores genéticos (Zhao J y Grant S, 2011). Una forma para evaluar si una persona padece de esta enfermedad es determinando su índice de masa corporal (IMC), el cual se obtiene dividiendo el peso de un individuo (kg) entre la estatura elevada al cuadrado (m^2). Un IMC en una persona con peso normal va de 18.5-24.9, mientras que un valor mayor a 30 es indicador de obesidad.

Este padecimiento afecta a todas las poblaciones y grupos de edad (Söhle J et al, 2012). La incidencia creciente de la obesidad se ha convertido en una carga global y económica sin estar restringida a países industrializados (Prentice AM, 2006).

Entre 1980 y 2008, la prevalencia de la obesidad a nivel mundial se incrementó del 4.8% al 9.8% en hombres, y de 7.9% a 13.8% en mujeres (Finucane M, 2011). En el 2008, se estimó que aproximadamente 500 millones de adultos eran obesos, una prevalencia mayor al 30% se observó en mujeres de norte América, Latinoamérica, el norte de África y el medio oriente. En Estados Unidos, entre 2009-2010, 35.5% de los hombres y 35.8% de las mujeres eran obesos (Flegal KM et al, 2012). Análisis recientes de la organización para la cooperación y desarrollo económico (OCDE), indican que la obesidad es una epidemia que está escalando rápidamente en países como China, México y Brasil (Cecchini M et al, 2010).

De acuerdo con la encuesta nacional de salud y nutrición 2012 (Gutiérrez JP et al, 2012), en México la prevalencia de sobrepeso y obesidad es de 71.28% (46 millones de personas), 32.4% de estas personas presentaban obesidad y 38.8% tenían sobrepeso. La obesidad fue más alta en mujeres (37.5%) que en hombres

(35.9%).

La organización mundial de la salud la ha clasificado como pandemia y se estima que si las tendencias actuales continúan, para el 2030 habrá 1.12 billones de individuos obesos alrededor del mundo (Söhle J et al, 2012). La obesidad es un problema para la salud debido a que las personas que la presentan tienen un mayor riesgo de padecer diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina, además de que se le asocia con algunos tipos de cáncer (Despres JP y Lemieux I, 2006).

Como ya se mencionó, las causas de la obesidad comprenden factores ambientales, predisposición genética, y estilo de vida. A pesar de que los factores ambientales tienen una mayor contribución, la genética juega un papel vital en su desarrollo, se estima que tiene un aporte de más del 40% (Stunkard AJ et al, 1986; Hjelmberg J et al, 2008) e influye de tal forma que individuos con predisposición genética tendrían mayor riesgo de desarrollar obesidad en un ambiente obesogénico que las personas sin tal predisposición (Walley AJ et al, 2009). Un ambiente obesogénico se caracteriza por un fácil acceso a alimentos con alta densidad calórica y un gasto energético reducido debido a la disminución de actividad física en la vida diaria (Walley AJ et al, 2009).

2.1.1 La obesidad materna

El sobrepeso y obesidad antes y/o durante el embarazo son factores de riesgo para la aparición de diabetes mellitus, hipertensión y preclampsia (Torloni MR et al, 2009; Hoff GL et al, 2009; Doherty DA et al, 2006) además de incrementar el riesgo de cesárea, hemorragia, infección y muerte de la mujer durante la labor de parto (Heslehurst N et al, 2008; Chu SY et al, 2007; Liu X et al, 2011; Samuels-Kalow ME et al, 2007). También se aumenta el riesgo de resultados adversos neonatales, como parto prematuro, anomalías congénitas, hipoglicemia, problemas cognitivos, hipertensión, diabetes mellitus, resistencia a la insulina, enfermedad coronaria y/o muerte neonatal (Manzanares S et al, 2012; Kalk P et al, 2009; Van Lieshout RJ et al, 2011; Patel SP et al, 2012; Monasta L et al, 2010;

Ruager-Martin R et al, 2010). Los hijos de madres obesas son más susceptibles a desarrollar obesidad, diabetes mellitus, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares en la edad adulta (Heerwagen MJ et al, 2010).

2.2 Programación fetal y obesidad materna

La gestación es un periodo crucial del crecimiento, ya que se producen cambios fisiológicos tanto en la mujer como en el feto; en la vida nutricional de la mujer representa una mayor vulnerabilidad, ya que se requiere de un mayor aporte de nutrimentos para el crecimiento y metabolismo de la madre y el feto, esto se debe al incremento en la actividad anabólica, parte de estas demandas se cubren con el incremento en la ingesta de alimentos por parte de la madre (Allen L, 2006).

Los eventos que suceden en etapas críticas del desarrollo de un individuo se relacionan con el riesgo que tiene de desarrollar obesidad; un insulto ó condición adversa que ocurre durante el periodo de crecimiento máximo y desarrollo de un órgano, altera procesos fisiológicos normales, si el feto se enfrenta a un ambiente intrauterino desfavorable, existen respuestas adaptativas con el objetivo de sobrevivir, y a pesar de que pueden beneficiarlo a corto plazo *in utero*, se conduce a la adaptación/reprogramación del órgano en cuestión, repercutiendo en sus funciones fisiológicas (Barker DJ, 1997), a este fenómeno se le conoce como programación fetal. Las primeras evidencias de dicho fenómeno fueron observadas en individuos expuestos *in utero* a la hambruna holandesa en 1944, revelándose que una pobre nutrición materna, especialmente durante el último trimestre del embarazo, conlleva a una restricción en el crecimiento del feto y está asociada con una baja tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Ravelli AC et al, 1998), además de encontrar una relación entre un bajo peso al nacer y un incremento en el riesgo de hipertensión, obesidad y dislipidemias en la edad adulta (Barker DJ et al, 1989; Osmond C et al, 1990).

Dabelea y colaboradores realizaron un estudio con adultos jóvenes que tuvieron un peso normal al nacer y que provenían de madres obesas, de los cuales 88% tenían sobrepeso, obesidad u obesidad mórbida, comparados con 13% de sujetos

nacidos de madres con peso normal (Dabelea D et al, 2000), lo que nos dice que la obesidad en mujeres, antes y durante el embarazo, es un factor cuyos efectos se extienden a sus hijos.

En particular, una nutrición materna alterada (desnutrición y sobrenutrición) puede llevar a desórdenes metabólicos en la progeñie, como obesidad y resistencia a la leptina (Ravelli AC et al, 1999; Godfrey KM y Barker DJ, 2000; Breier BH et al, 2001). Los efectos deletéreos de la sobrenutrición durante la vida fetal y postnatal temprana se han investigado en modelos animales, por ejemplo, en ratones se demostró que una dieta obesogénica antes del apareamiento y durante el periodo de gestación y lactancia tiene como resultado crías con hiperfagia, incremento en adiposidad, hipertensión, resistencia a la insulina, y mayor peso en la vida postnatal (Samuelsson AM et al 2008).

En varios modelos de experimentación con roedores, las dietas altas en lípidos conllevan a la obesidad, resistencia periférica a la insulina, disminución en la secreción de insulina inducida por glucosa (Lupi R et al, 2002), disfunción e incluso muerte de las células beta pancreáticas, todo esto debido a una alta disponibilidad de los ácidos grasos, contribuyendo a la patogéñesis de la diabetes tipo 2 (Chadt A et al, 2012).

2.3 Páncreas

El páncreas es una glándula vital debido a que tiene un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa y en la digestión, además, es de gran interés por las enfermedades que le afectan, entre las que se encuentran la diabetes y el cáncer pancreático (Johansson KA y Grapin-Botton A, 2002). En humanos consiste en un órgano de 70-150 g y de 15-25 cm. de largo; está conectado al duodeno por la ámpula de Vater, donde el principal conducto pancreático se une con el colédoco y se utilizan los términos cabeza, cuerpo y cola para designar las regiones del órgano, de proximal a distal (Figura 1), mientras que en roedores, el páncreas muestra una forma irregular y menos definida (Slack JM, 1995).

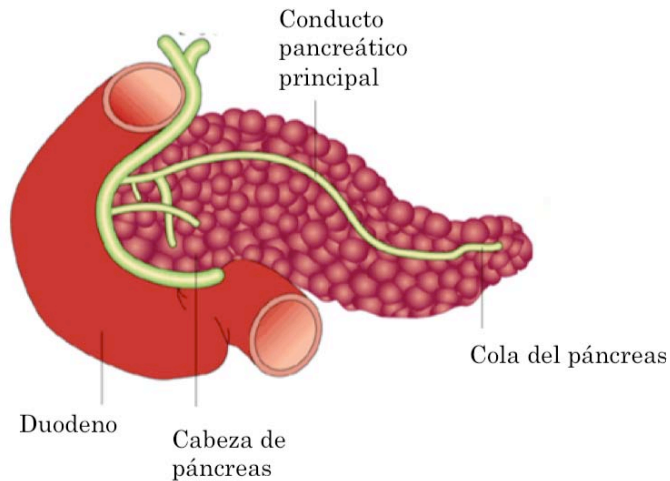


Figura 1. Representación de la anatomía del páncreas en el humano. Figura tomada y modificada de Edlund H, 2002.

Su función es tanto endocrina, como exocrina. Los componentes del páncreas endocrino son los islotes de Langerhans, conformados por células epiteliales endocrinas separadas de la porción exocrina por una capa de fibras de colágena, miden alrededor de 75 a 225 μm de diámetro y se distribuyen en mayor proporción en la cola del páncreas. Están compuestos por 4 tipos de células secretoras de hormonas. Las células que se encuentran en mayor proporción son las células beta, alrededor del 70%, las cuales secretan insulina. Las células alfa, delta y Pp secretan glucagón, somatostatina y péptido pancreático, respectivamente (Johansson y Grapin-Botton, 2002). Ver Figura 2.

En roedores las células beta se localizan en el centro del islote pancreático y los otros tipos celulares en la periferia, mientras que en el humano están distribuidas por todo el islote junto con las otras células. La proporción de células endocrinas es aproximadamente del 4% del total en una rata adulta (Githens S, 1988).

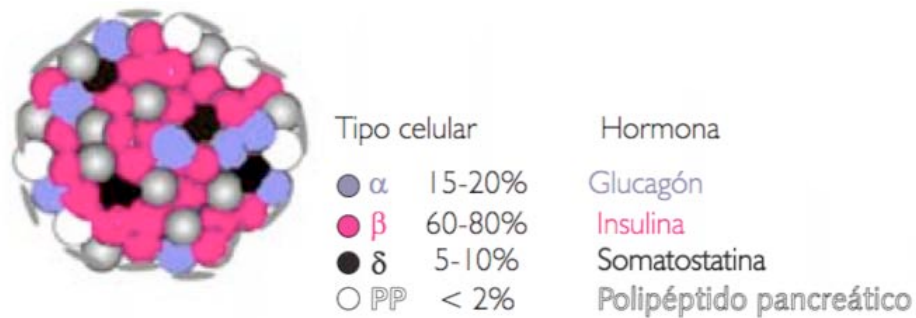


Figura 2. Representación de islote de Langerhans de humano. Figura tomada y modificada de Vinik, 2004

2.3.1 Insulina

La insulina es una hormona secretada por las células beta de los islotes pancreáticos, su secreción está regulada para mantener los niveles de glucosa en sangre dentro del rango fisiológico. La secreción insuficiente de esta hormona contribuye a la hiperglicemia crónica, la cual es característica de la diabetes. La regulación a corto plazo de la secreción de insulina, así como en respuesta a los alimentos, ocurre principalmente por exocitosis. Sin embargo, el mantenimiento de unas reservas adecuadas de insulina a largo plazo, depende de la regulación de la transcripción, la traducción y la biosíntesis de ésta. En mamíferos, la glucosa y ácidos grasos afectan profundamente la expresión del gen de la preproinsulina bajo circunstancias fisiológicas y patológicas (Poitout V, 2006).

En mamíferos adultos, la expresión del gen de insulina está esencialmente restringida a las células beta. El promotor de la insulina le confiere la expresión tejido específica y la regulación metabólica a dicho gen. Diversos factores de transcripción actúan sobre esta región, formando así una sofisticada red transcripcional que asegura una regulación precisa (Poitout V et al, 2004). El gen que da lugar al inicio de la señal para la síntesis de la insulina en el humano se encuentra en el brazo corto del cromosoma 11 (Harper ME, 1981).

La insulina es un péptido conformado por dos cadenas unidas por dos puentes disulfuro. La cadena A tiene 21 aminoácidos. La cadena B tiene 30 aminoácidos

(Fu Z et al, 2013). La secreción de insulina muestra un patrón bifásico, la primera fase o fase temprana, se refiere a la liberación de insulina de manera rápida debido a que la concentración de glucosa en el organismo tiene un aumento repentino, mientras que la segunda fase o fase tardía nos habla de si la concentración de glucosa a este nivel se prolonga, la liberación de insulina disminuye gradualmente y después empieza a incrementar a una velocidad menor o se estabiliza la secreción (Henquin JC et al, 2002; Gupta D et al, 2012).

La glucosa es el estímulo más potente para la liberación de insulina por parte de la célula beta, una vez que es introducida a la célula, es metabolizada vía glucólisis y fosforilación oxidativa, incrementando la relación ATP:ADP, que tiene como consecuencia el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP provocando la despolarización de la membrana plasmática y la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, permitiendo la entrada de iones calcio a la célula, lo cual finalmente desencadena la secreción de la insulina vía exocitosis (Gupta D et al, 2012). Ver Figura 3.

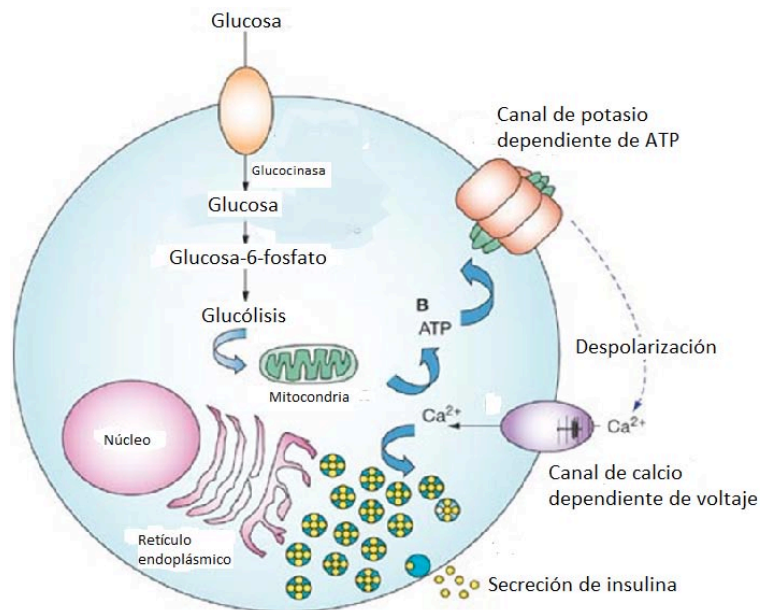


Figura 3. Esquema representativo de la secreción de insulina inducida por glucosa en la célula beta. Tomada de De León, 2007.

La insulina participa en el proceso de regulación hormonal del metabolismo de los hidratos de carbono (Gil, 2010). En el tejido adiposo y el músculo, la insulina incrementa la tasa de transporte de la glucosa a través de la membrana plasmática, la de la glucólisis y la síntesis de glucógeno en los tejidos ya mencionados además del hígado. También aumenta la tasa de oxidación de glucosa por la vía de las pentosas-fostafo en el hígado y tejido adiposo; por otro lado, disminuye la tasa de glucogenólisis en el músculo e hígado e inhibe el índice gluconeogénesis en este último (Ashcroft FM y Ashcroft SJ, 1992).

En el metabolismo de los lípidos, la insulina inhibe la lipólisis en tejido adiposo, aumenta a formación de lipoproteínas de muy baja densidad en el hígado, la actividad de la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo y esto a su vez, incrementa la captación de triacilglicerolos del torrente sanguíneo al tejido adiposo, la colesterogénesis en el hígado y puede disminuir la oxidación de ácidos grasos en el hígado (Ashcroft FM y Ashcroft SJ, 1992).

2.3.2 Falla en las células beta y su relación con la obesidad

Cuando las células beta se exponen a niveles elevados de glucosa por periodos prolongados de tiempo, la glucosa se vuelve tóxica para la secreción de insulina, expresión génica y supervivencia de estas células. A este fenómeno se le conoce como glucotoxicidad (Robertson RP et al, 1992).

De una manera similar, los niveles crónicamente elevados de ácidos grasos afectan la función de las células beta a través de un proceso llamado lipotoxicidad (Unger RH, 1995). La lipotoxicidad se asocia con la inhibición de la secreción de insulina inducida por glucosa, disfunción en la expresión del gen de insulina y muerte celular por apoptosis; la lipotoxicidad sólo ocurre en presencia de niveles altos de glucosa (Poitout V, 2010).

La glucosa o los ácidos grasos libres por sí solos no causan una toxicidad de importancia clínica en la célula beta, ya que se ha observado que las alteraciones provocadas por la lipotoxicidad son dependientes de niveles elevados de glucosa,

así, la hiperglicemia es un pre-requisito para que la lipotoxicidad se lleve a cabo, por lo que el término de glucolipotoxicidad, es más adecuado de utilizar para describir los efectos deletéreos sobre la función de la célula beta causados por los lípidos (Prentki M et al, 2002).

La glucolipotoxicidad resulta en una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno, disfunción y muerte celular. Debido a que los islotes pancreáticos tienen un nivel bajo de antioxidantes intrínsecos son muy vulnerables al daño por estrés oxidativo (Robertson R et al, 2007).

La obesidad está asociada con la resistencia a la insulina y disfunción de la célula beta. La resistencia a la insulina conlleva a la disminución de la captación de la glucosa por los tejidos periféricos y a una hiperglicemia transitoria durante el periodo postprandial. Una exposición prolongada de las células beta a estos episodios hiperglicémicos está asociada con hiperinsulinemia a través de la proliferación de dichas células, esta compensación es para aumentar la secreción de insulina ante niveles elevados de glucosa en sangre, y así, que ésta sea introducida a las células y lograr la euglicemia; este ciclo se repite hasta que la masa de las células beta no se puede incrementar más, provocando la disminución de los niveles de insulina y un estado de hiperglicemia (Gupta et al, 2012).

2.4 Regulación de la transcripción de genes

El proceso mediante el cual la información se transfiere del ADN al ARN se le llama transcripción y ocurre en el núcleo. El nivel de expresión de la mayoría de los genes es regulada por factores transcripcionales que se unen a secuencias regulatorias en el ADN situadas río arriba con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Los factores de transcripción se unen a elementos reguladores en la región promotora del gen y a través de otras interacciones con la maquinaria transcripcional, promueven el acceso al ADN y facilitan el reclutamiento de la ARN polimerasa. La transcripción de genes que codifican para proteínas es catalizada por la ARN polimerasa II. Una vez que la transcripción inicia, el ARN que va

siendo sintetizado es modificado por la adición de un “cap” en el extremo 5’, el cap sirve inicialmente para proteger al transcrito del ataque de nucleasas, después sirve como señal para proteínas involucradas en la exportación del ARN maduro al citoplasma. El proceso de la adición del cap coordina los eventos tempranos de la transcripción mediante la regulación de la transición de la etapa de inicio de la transcripción, donde la polimerasa empieza con la síntesis del ARN, a la etapa de la elongación de la transcripción, en donde la polimerasa se mueve en dirección $5' \rightarrow 3'$ a lo largo de la secuencia del ADN y extiende el transcrito. La elongación es regulada por una familia de factores de elongación. Las secuencias codificantes (exones) del gen comúnmente son interrumpidas por secuencias no codificantes (intrones), las cuales son removidas en el proceso de “splicing”. Cuando la polimerasa casi llega al final del gen, la ARN polimerasa detiene la transcripción (terminación), el ARN sintetizado es cortado y se le adiciona una cola de poliadenosinas en el extremo 3’. Finalmente, el ARN mensajero maduro es exportado del núcleo al citoplasma (Orphanides G y Reinberg D, 2002).

Una característica de la transcripción eucariótica es que su regulación se debe a la afinidad específica de los factores de transcripción (FT) por los promotores. A cada promotor se puede unir un número variable de factores de transcripción, que actúan favoreciendo o dificultando la unión y la actividad de la ARN polimerasa o de otros factores de transcripción y, en consecuencia, determinando la posición y la eficacia del inicio de la transcripción. Por tanto, los FT tienen más responsabilidad que la propia ARN polimerasa en el reconocimiento de la secuencia del promotor y se encargan de la regulación de la transcripción. Estos factores también se denominan “factores trans”, pues sus genes están en posición alejada y no relacionada con aquella región génica cuya expresión regulan (Luque J, 2001). Están incluidos los factores basales, activadores y coactivadores. Los factores basales interactúan con la ARN polimerasa en el sitio de inicio de la transcripción en el promotor. Los activadores se unen a secuencias cortas de ADN específicas localizadas cerca de los promotores. Los activadores funcionan por medio de interacciones proteína-proteína con los aparatos basales, otros requieren coactivadores para mediar esa interacción (Lewin B, 2011).

Los promotores se pueden dividir en tres tipos, de acuerdo con su acción y su ubicación. El promotor basal comprende las secuencias que definen el punto de inicio de la transcripción y son imprescindibles para que ésta comience. El promotor proximal determina la frecuencia con la que se produce el inicio de la transcripción (Luque J, 2001). Los elementos distales (potenciadores, los silenciadores y aisladores) participan en la regulación otorgando una expresión en el tiempo y tejido específicos (Recillas F y Escamilla M, 2004).

Aunque no es motivo de este trabajo, es importante mencionar que otro tipo de regulación de la expresión génica depende del componente epigenético. La regulación epigenética gira en torno a la estructuración del genoma en la cromatina y su efecto regulador sobre la expresión de los genes. Se consideran procesos de regulación epigenéticos, todos aquellos que influyen tanto de manera normal como anormal en la expresión heredable de los genes sin que ocurran cambios en la secuencia del ADN. Los más comunes son las modificaciones post-traduccionales de las histonas y la metilación del ADN (Recillas F y Escamilla M, 2004).

2.5 Dieta y expresión génica

El término dieta se refiere al conjunto de platillos y alimentos que un individuo consume en un día. La dieta debe ser adecuada a las condiciones fisiológicas y fisiopatológicas del organismo que ha de recibirla, de no ser así, resultará nociva a corto o a largo plazo, por eso, el ser humano ha de procurar consumir una dieta recomendable que cumpla con el objetivo de proporcionar la cantidad de energía y nutrimentos necesarios para lograr mantener un buen estado de nutrición. Una dieta recomendable debe ser:

- a) Completa: Que contenga todos los nutrimentos necesarios para mantener la vida y la salud. Se recomienda incluir en cada tiempo de comida alimentos de los tres grupos (hidratos de carbono, lípidos y proteínas).

- b) Equilibrada: Los nutrimentos deben guardar las proporciones adecuadas para mantener una nutrición óptima.
- c) Suficiente: Que aporte la cantidad adecuada de alimentos que proporcionen energía, nutrimentos inorgánicos, vitaminas, fibra y agua necesarios de acuerdo con las características físicas, fisiológicas y/o fisiopatológicas individuales para mantener el buen funcionamiento de los órganos, aparatos y sistemas.
- d) Variada: Debe incluir diferentes alimentos de cada grupo.
- e) Inocua: Que se encuentre exenta de microorganismos.

La cantidad mínima que es necesaria ingerir de cada nutrimento para alcanzar un estado de nutrición óptimo se denomina requerimiento nutrimental. El estado de nutrición expresa el grado de necesidad fisiológica de nutrimentos. Es de gran importancia ya que la mayoría de las veces es un factor determinante en la etiología y manejo de las diferentes enfermedades como la diabetes y la obesidad, enfermedades en que la nutrición está significativamente involucrada (Milke P, 2000).

La dieta es el factor ambiental de mayor influencia durante el desarrollo fetal, y sus efectos en la salud no se limitan al individuo, sino que pueden pasar a la siguiente generación. Los factores ambientales interactúan con el genoma para determinar la expresión de genes y consecuentemente, la función de los tejidos y el riesgo a padecer ciertas enfermedades (Sandovici I, 2011).

Los nutrimentos modulan mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN y la modificación de las histonas, la regulación epigenética de la expresión génica se ha visto implicada en la mediación de los efectos de la programación causados por la dieta en etapas tempranas de la vida (Sandovici I, 2011).

En estudios recientes se ha demostrado que una dieta materna con restricción proteínica y una dieta paterna hiperlipídica puede llevar a la reprogramación de la expresión de genes en los islotes pancreáticos de la progenie, lo cual implica un papel importante de los mecanismos epigenéticos en la función del islote (Chadt A et al, 2012).

La disfunción de las células beta tiene un papel fundamental en el comienzo y desarrollo de la diabetes tipo 2. Esta disfunción puede empezar con una disminución en la tolerancia a la glucosa, la cual se asocia con un número menor de células beta funcionales. Los hidratos de carbono, proteínas y lípidos influyen en la expresión génica en los islotes de Langerhans (Chadt A et al, 2012). Por ejemplo, la exposición a ácidos grasos de cadena larga inhibe la expresión de la preproinsulina inducida por glucosa, así como la síntesis y función de factores de transcripción esenciales para la función de la célula beta como Pdx-1 y MafA (Ritz-Laser B et al, 1999; Hagman DK et al, 2005).

Por otro lado, McCurdy y colaboradores reportaron en un estudio con primates, que la progenie de madres alimentadas con una dieta alta en lípidos mostró un incremento en los triglicéridos, una expresión elevada de enzimas gluconeogénicas y un incremento de diversos marcadores de estrés oxidativo en el hígado, incrementando el riesgo de tener esteatosis hepática no alcohólica (McCurdy CE et al, 2009).

2.6 Genes estudiados y su papel en la obesidad

En esta sección se describe la importancia de cada uno de los genes estudiados en el presente trabajo, en general, estos genes se relacionan con el balance energético (FTO) y con la secreción de insulina inducida por glucosa (Mgat4a, UCP2 y FTO).

2.6.1 Mgat4a

El transporte de glucosa en las células beta pancreáticas se lleva a cabo mediante el Glut 2 (en roedores, Glut2 es el principal transportador, en humanos también se expresa el Glut1 y Glut 3), y su expresión se reduce debido a la glucolipototoxicidad (Gremlich S et al, 1997; Reimer MK y Ahren B, 2002).

El anclaje del Glut2 en la membrana de la célula beta depende de su interacción

con una lectina de superficie celular, la galectina 9, que se une a una estructura de glicano (Ohtsubo K et al, 2005, 2011); y para que se forme dicha estructura, es necesaria una glicosiltransferasa llamada GnT-4a, codificada por el gen Mgat4a.

Bajo condiciones de glucolipototoxicidad, la Gnt-4a es regulada a la baja, teniendo como consecuencia la internalización del transportador de glucosa e impidiendo que la glucosa entre a la célula, afectando la secreción de insulina estimulada por glucosa.

Los transportadores de glucosa son una familia de glicoproteínas integrales de la membrana plasmática, que transportan glúcidos a través de ella por difusión facilitada para el suministro de energía (Olson AL y Pessin JE, 1996). La pérdida de la expresión del Glut2 en células beta pancreáticas de humano y roedores está asociada con hiperglicemia y una disminución en la secreción de insulina estimulada por glucosa, los cuales son marcadores tempranos de la diabetes tipo 2 y precede al desarrollo de resistencia a la insulina (Johnson JH et al, 1990; Unger RH 1991; Guerra SD et al, 2005). El transportador de glucosa Glut 2 es esencial para la respuesta primaria de la secreción de insulina estimulada por glucosa en células beta de ratón.

A pesar de que se ha demostrado el rol negativo de los lípidos en la función y sobrevivencia de la célula beta (Poitout V y Robertson RP 2008, Sako Y y Grill VE 1990), los detalles de los mecanismos moleculares son escasos.

Ohtsubo y colaboradores (2011) proveen una explicación molecular para la disminución de la secreción de insulina estimulada por glucosa a causa de una dieta alta en lípidos o la exposición de islotes pancreáticos (tanto de humano como ratón) al ácido palmítico (Ohtsubo K et al, 2005, 2011). Este mecanismo involucra la exclusión nuclear de dos factores de transcripción, Foxa2 y Hnf1a y una consecuente reducción en la expresión de la glicosiltransferasa Gnt-4a. Como resultado, disminuye la expresión de Glut 2 y la glicosilación por Gnt-4a, se suprime la captación de glucosa y la secreción de insulina estimulada por glucosa (Ohtsubo K et al, 2011). Ver Figura 4.

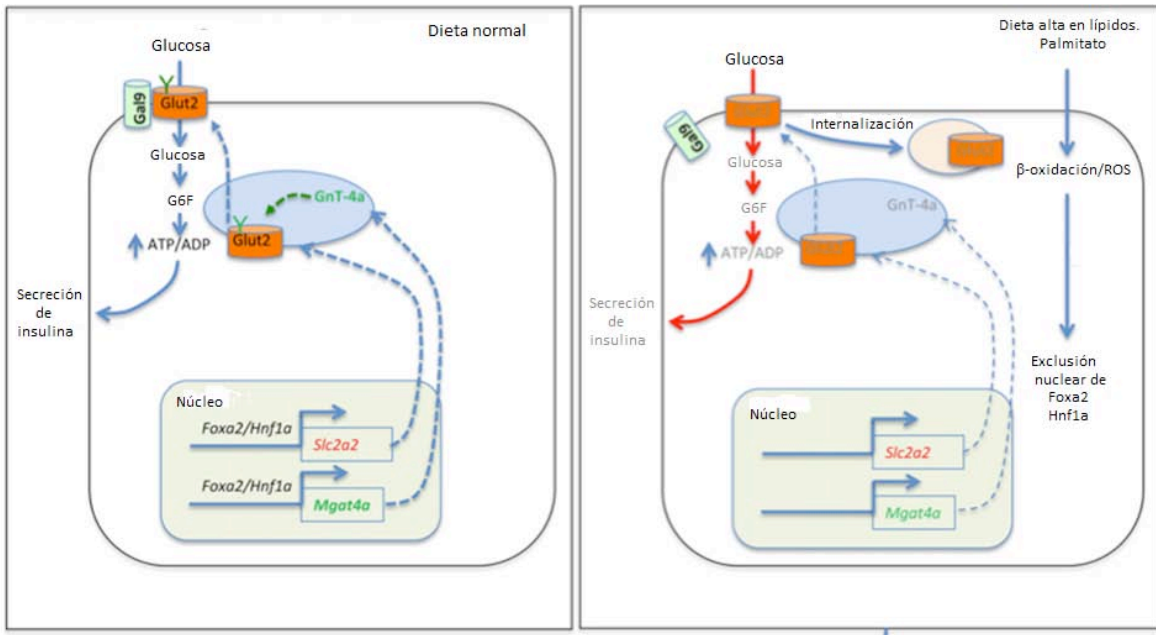


Figura 4. Mecanismo por el cual una dieta alta en lípidos disminuye la secreción de insulina estimulada por glucosa. (Figura tomada de Ohtsubo K et al, 2011)

2.6.2 UCP2

En la secreción de insulina estimulada por glucosa, la mitocondria tiene un papel esencial en el acoplamiento de la oxidación de la glucosa con la producción de *ATP*, señal que desencadena una serie de eventos que conllevan a la liberación de la insulina. Las células beta expresan una proteína desacoplante mitocondrial, UCP2 (proteína desacoplante 2, por sus siglas en inglés), a la que se le ha asociado con un daño en la secreción de insulina estimulada por glucosa y contribución con el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Affourtit C y Brand MD, 2008).

La UCP2, pertenece a una familia de proteínas que modulan el metabolismo mitocondrial y se les ha implicado en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Dichas proteínas, pueden intervenir en el desacoplamiento metabólico, que se refiere a la pérdida de energía (de la oxidación de los nutrimentos) en forma de calor no ligada a la síntesis de *ATP* (Chan CB y Harper ME, 2006).

El ARN mensajero de la UCP2 se expresa en varios tejidos, como el tejido adiposo, corazón, pulmón, músculo esquelético y riñón, sin embargo la expresión

de su proteína está restringida a pocos, tales como el páncreas endocrino, bazo, estómago, cerebro y pulmones. Su rol en la fisiopatología de la diabetes ha sido asociado con el daño en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Chan CB y Harper ME, 2006).

Tanto el ARN mensajero como la proteína de UCP2 han sido localizados en líneas celulares de células beta de roedores y humanos. En la mayoría de los reportes, la expresión de la UCP2 es mayor en los islotes de roedores obesos o diabéticos (revisión por Chan y Harper, 2006).

La elevación de los ácidos grasos induce la transcripción de UCP2. Estudios *in vitro* indican que la expresión de UCP2 aumenta en células de INS-1 e islotes pancreáticos de rata después de la exposición a ácido palmítico o ácido oleico (Lameloise, 2001; Chan CB et al, 2001; Patane G, 2002), por otro lado, estudios *in vivo* muestran resultados similares en roedores alimentados con dietas altas en lípidos (Joseph JW et al, 2004).

La expresión del gen UCP2 es regulado a la alta por niveles altos de glucosa y ácidos grasos y es relativamente alta en modelos de ratón con diabetes tipo 2 y lipotoxicidad (Patane G, 2002), aunque los niveles de ARNm y proteína no necesariamente son proporcionales en la célula beta, sugiriendo una regulación a nivel traduccional o una tasa variable de degradación de la proteína (Pecqueur C et al, 2001).

2.6.3 FTO

Otro gen relacionado con riesgo de padecer diabetes tipo 2 y obesidad es el FTO, al cual se le ha asociado con el índice de masa corporal (Dina C et al, 2007; Frayling TM et al, 2007). Aunque hay diversos fenotipos relacionados con el FTO, se sabe poco de los mecanismos o rutas fisiológicas a nivel molecular.

El gen asociado con la obesidad y grasa corporal (Fat mass and obesity associated gene, FTO por sus siglas en inglés) se le ha involucrado en la

regulación del apetito, ya que su ARN mensajero tiene una elevada expresión en áreas del cerebro asociadas con el balance energético (Gerken T et al, 2007). También se ha observado que se expresa en el páncreas endocrino, específicamente en islotes pancreáticos (células beta y células alfa); sin embargo su función en dicho órgano aún se desconoce.

Existe evidencia que indica que algunos de los polimorfismos de este gen están relacionados con resistencia a la insulina y diabetes. Adicionalmente la expresión inducida del FTO conlleva al incremento de la primera fase de la secreción de insulina inducida por glucosa en líneas celulares de insulinoma. Sin embargo, los mecanismos moleculares que controlan la expresión de dicho gen aún no son completamente entendidos (Guo J et al, 2012).

Recientemente, se ha encontrado que el FTO tiene función de desmetilasa en cadena sencilla de ADN y ARN. Se piensa que sus principales blancos son la 6-metiladenosina (m6A), 3 metil-uracilo (m3U) y 3 metil-timidina (m3T). La modificación en m6A, es el principal sustrato de la metilación del ARN y sugiere una afectación en el procesamiento del ARN, el transporte y la eficiencia de su traducción. Estas modificaciones son reversibles, y tiene influencia sobre su estabilidad y vida media. Dos estudios han identificado ARNm que contienen m6A en cerebro e hígado de ratón, donde se reportó zonas ricas de m6A alrededor del codón de paro, lo cual sugiere un papel en el control traduccional y que la metilación en m6A del ARN mensajero desempeña un papel importante en la regulación de la expresión génica (Merkestein et al. 2014).

2.7 Ejercicio físico

Existe evidencia de que realizar actividad física con regularidad, tiene múltiples beneficios para la salud, entre los que se encuentran una disminución en el peso corporal y un menor riesgo a desarrollar resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2 (Snowling NJ y Hopkins WG, 2006).

Recientemente se demostró que ratones jóvenes que realizaron ejercicio

voluntario en una rueda, mejoraron su composición corporal, tuvieron una disminución en el peso y un aumento en la masa muscular (Goh J y Ladiges WC, 2013).

Se sabe que la actividad física mejora la sensibilidad periférica a la insulina (Holloszy JO, 2005), mejora la tolerancia a la glucosa y ayuda la preservación de la función de las células beta pancreáticas (Kitabchi AE et al, 2005). Se ha sugerido que el ejercicio con una intensidad moderada durante la gestación y en el periodo perinatal, tiene beneficios tanto para la madre como para su descendencia y es necesario para prevenir el desarrollo de desórdenes metabólicos en la progenie (Vickers MH y Sloboda DM, 2012). Se ha observado en estudios en rata, un aumento en la neurogénesis y en la memoria de las crías provenientes de madres que realizaron ejercicio; mientras que en ratones que realizaron actividad física, se observó un aumento en la sensibilidad de insulina (Carter LG et al, 2013). Por otro lado, se ha reportado que ratas preñadas sujetas a ejercicio con intensidad baja a moderada, antes y durante la gestación puede disminuir los efectos metabólicos programados inducidos por una dieta baja en proteínas en las crías (Fidalgo M et al, 2013).

La progenie de madres desnutridas o con sobrealimentación, manifiestan desórdenes metabólicos como la obesidad y la resistencia a la insulina. En ratones se ha visto que una dieta materna obesogénica lleva a la reducción de actividad física en la progenie, es posible que esta inactividad programada contribuya a la adiposidad (Samuelsson AM et al. 2008).

Por otra parte, el ejercicio provoca cambios en la expresión génica en diferentes órganos, por ejemplo en el músculo esquelético, desencadenando adaptaciones metabólicas y estructurales (Coffey VG y Hawley JA, 2007). Estudios de Rönn y colaboradores en el 2013, concluyen que el ejercicio induce cambios en la metilación del ADN en el tejido adiposo en humano, que potencialmente afecta el metabolismo del adiposito, sin embargo aunque se ha visto que el ejercicio modula adaptaciones que ocurren por mecanismos epigenéticos, la ruta por la cual sucede este efecto de “desprogramación” se desconoce (Rönn T et al, 2013).

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de una dieta materna alta en lípidos, una dieta intervenida, ejercicio materno y ejercicio realizado por las crías en la expresión de los genes FTO, UCP2 y Mgat4a en el páncreas de la progenie.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Observar si el tipo de dieta consumida por la madre modifica la expresión de los genes de interés en el páncreas de la progenie
- Observar si un cambio de dieta, de obesogénica a balanceada, modifica la expresión de los genes de interés.
- Observar si el ejercicio en la madre modifica la expresión de los genes de interés.
- Observar si el ejercicio en la cría modifica la expresión de los genes de interés.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad es un problema a nivel mundial que está provocando daños a la salud, como enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo 2. Actualmente, la obesidad en mujeres embarazadas ha incrementado, y se han visto efectos deletéreos en su progenie, por tal motivo, es importante contar con un modelo animal de obesidad materna para tener un acercamiento a las consecuencias de esta enfermedad en la progenie. Ya que la genética está involucrada en el desarrollo de la obesidad, es importante saber si factores ambientales como la dieta y el ejercicio modifican la expresión de algunos genes relacionados con la secreción de insulina inducida por glucosa y el balance energético.

5. HIPÓTESIS

Una dieta materna alta en lípidos provocará una disminución en la expresión génica de FTO y Mgat4a y un aumento en el gen UCP2 en el páncreas de la progenie. Por otro lado, una dieta intervenida y el ejercicio físico realizado por la madre y la cría, producirán un efecto benéfico sobre la expresión de los genes de interés, aumentándola en el gen FTO y Mgat4a y disminuyéndola en el caso de UCP2.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Grupos experimentales

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo bajo las normas de uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM- 062- ZOO-1999).

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar que a partir de los 21 días de edad, se dividieron en dos grupos, control (C), las cuales fueron alimentadas con dieta control, y grupo de obesidad materna (OM), las cuales fueron alimentadas con dieta alta en lípidos. A partir del grupo de obesidad materna (OM) se formó un tercer grupo denominado dieta intervenida (Dint) en el cual, se cambió de la dieta alta en lípidos por una dieta control a los 90 días de edad. A partir de este día, se separaron las ratas de los grupos correspondientes, para que realizaran ejercicio.

Al cumplir 120 días de edad, las hembras se aparearon con ratas macho de fertilidad comprobada de la misma cepa. El criterio para determinar si estaban preñadas fue realizarles un frotis vaginal y la presencia de espermatozoides indicaba que las ratas estaban preñadas, una vez confirmado el estado gestante, se separaba a la rata hembra del macho para colocarla en una caja nueva y asignarle la dieta correspondiente (control o alta en lípidos), con la cual siguió hasta el final de la lactancia. Los grupos con ejercicio lo realizaron desde el día 90 hasta el final de la gestación.

Se trabajó con crías macho, una vez que cumplieron 21 días de edad, se les empezó a alimentar con dieta control y se les separó de sus madres. A partir del día 50, algunas de las crías hicieron ejercicio hasta los 110 días. Finalmente, los grupos de las crías quedaron asignados de la siguiente manera (ver Figura 5):

- C: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta control.
- C E: Crías que realizaron ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta control
- Mej C: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta control y que realizaron ejercicio durante la gestación.
- OM: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica
- OM E: Crías que realizaron ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica.
- Mej OM: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica y que realizaron ejercicio durante la gestación.
- Dint: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta intervenida.
- DintE: Crías que realizaron ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta intervenida.
- MejDint: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta control y que realizaron ejercicio durante la gestación.

El ejercicio realizado por las ratas fue en el interior de una rueda para roedor en una sesión de 2 lapsos de 15 min de actividad, con un lapso de 15 min de descanso entre ellos, 5 sesiones por semana a ritmo voluntario. Las madres durante 4 semanas y las crías durante 8.

Grupos experimentales

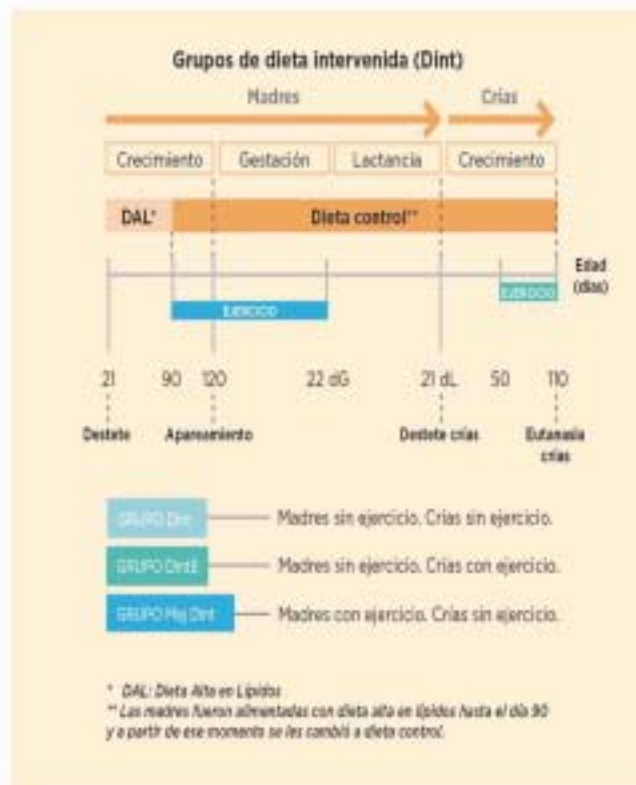
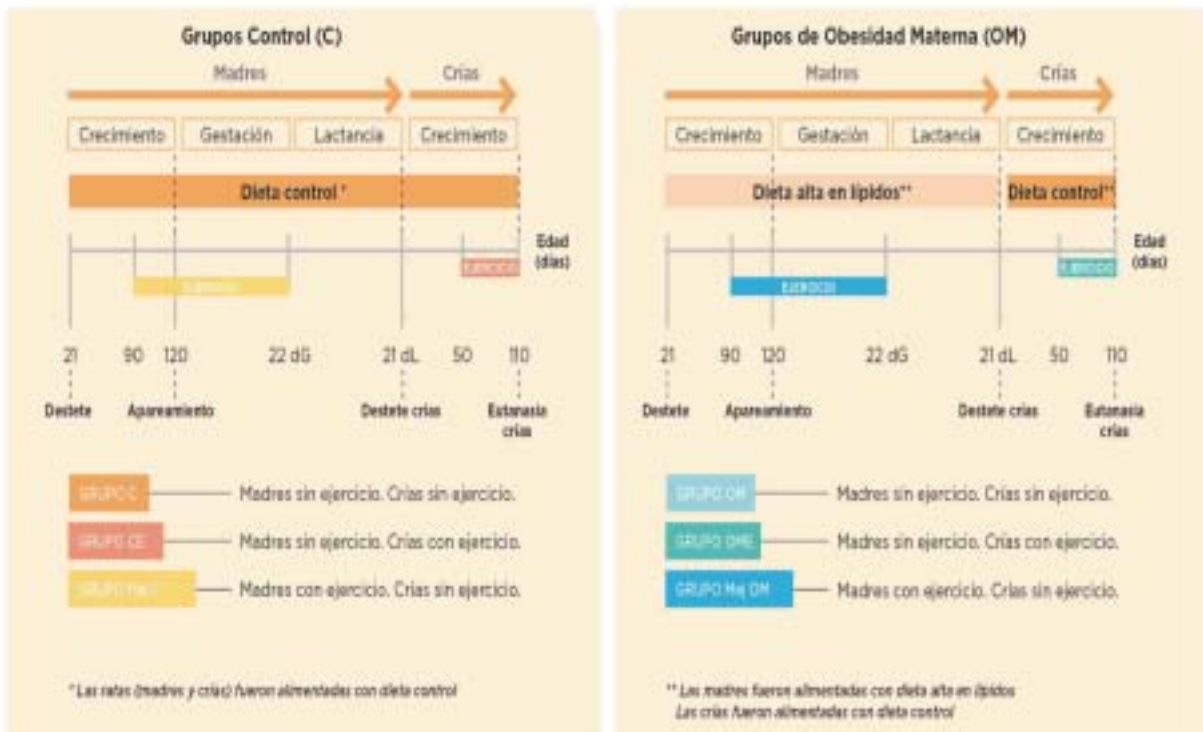


Figura 5. Esquema de alimentación y ejercicio de las ratas.

6.2 Dietas

La dieta control consistió en: Alimento comercial para roedor Rodent RQ 22-5 de Zeigler, formulada para mantenimiento, crecimiento, reproducción y lactancia de ratas y ratones convencionales conteniendo 5% (p/p) de grasa y un contenido energético de 4 kcal/g. Mientras que la dieta alta en grasa fue elaborada en la planta piloto del Departamento de Ciencia y tecnología de los alimentos (DCyTA) del INCMNSZ, cuyo contenido de lípidos fue del 25% (p/p) y el contenido energético de 5kcal/g, con una formulación diseñada en base a la recomendación AIN-93 del American Institute of Nutrition así como las modificaciones hechas por Zambrano y colaboradores (Zambrano E et al, 2010).

Tabla 1. Composición nutricional de las dietas

Nutrimento	% (p/p)	
	Dieta control	Dieta alta en lípidos
Proteína	22.0	23.4
Lípidos	5.0	25.0
Polisacáridos	31.0	20.59
Azúcares simples	31.0	20.59
Fibra dietética	4.0	5.0
Minerales	6.0	5.0
Vitaminas	1.0	1.0
Contenido energético	4 kcal/g	5 kcal/g

6.3 Aislamiento de islotes pancreáticos

Se decapitó a la rata con una guillotina para después colocarla boca arriba y limpiarla con alcohol. Se cortó la piel en el centro del vientre y el músculo por el centro, realizando un corte diagonal de ambos lados hasta las costillas. Se llevó el músculo hacia atrás para poder cortar el esternón. Con pinzas de hemostasis se bloqueó el conducto de Wirsung para poder realizar un corte en la ámpula de váter. Se procedió a canular. El páncreas se insufló con 10 mL de solución de Hank's, después se retiró cortando con microtijeras, colocándolo en un vaso de precipitados de 50 mL con solución de Hank's. Se cortó el páncreas en otro vaso de precipitados junto con 3 mg de colagenasa, completando a 5 mL con solución de Hank's. Se vació en un matraz de plástico y colocó en el baño de agitación a 37° C y una velocidad de 170 golpes por minuto durante 5 min. El matraz se sacó del baño y sacudió con la mano fuertemente 10 veces, terminado esto, se regresó al baño de agitación por 4 minutos. Se vació el contenido a un tubo de plástico de 50 mL y se llevó a 25-30 mL según el número de páncreas. Se centrifugó a 1000 rpm 3 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante dejando de 2 a 3 mL con la pastilla. Se completó el volumen a 25-30 mL con solución de Hank's y luego se centrifugó a 1000 rpm por 3 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante dejando de 2 a 3 mL con la pastilla y lo que quedó se resuspendió para después hacerlo pasar a través de un colador; el volumen obtenido se pasó a un tubo falcon de 50 mL y se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se procedió a hacer el gradiente de ficol. A la pastilla se le agregó 6 mL de ficol al 27% y se homogenizó en vortex, posteriormente se adicionaron 3 mL de ficol a 23%, 20% y 11% por las paredes del tubo. Se centrifugó 2100 rpm por 15 minutos. Se colectaron los islotes de la interfase de la última capa (11%) con una pipeta Pasteur y se prosiguió con dos lavados, éstos se llevaron a cabo pasando los islotes a un tubo de plástico, el cual contenía 15 mL de solución de Hank's, posteriormente se centrifugó a 800 rpm por 5 minutos. Después del segundo lavado, se decantó el sobrenadante y los islotes se vaciaron en una caja petri negra para recolectarlos con una micropipeta de 10 µL, bajo un microscopio estereoscópico. Los islotes se colectaron en un tubo eppendorf, y por cada 250-

300 islotes, se adicionó 1 mL de QIAzol Lysis reagent para después almacenarlos a -70°C . En la Figura 6 se muestra un resumen del procedimiento.

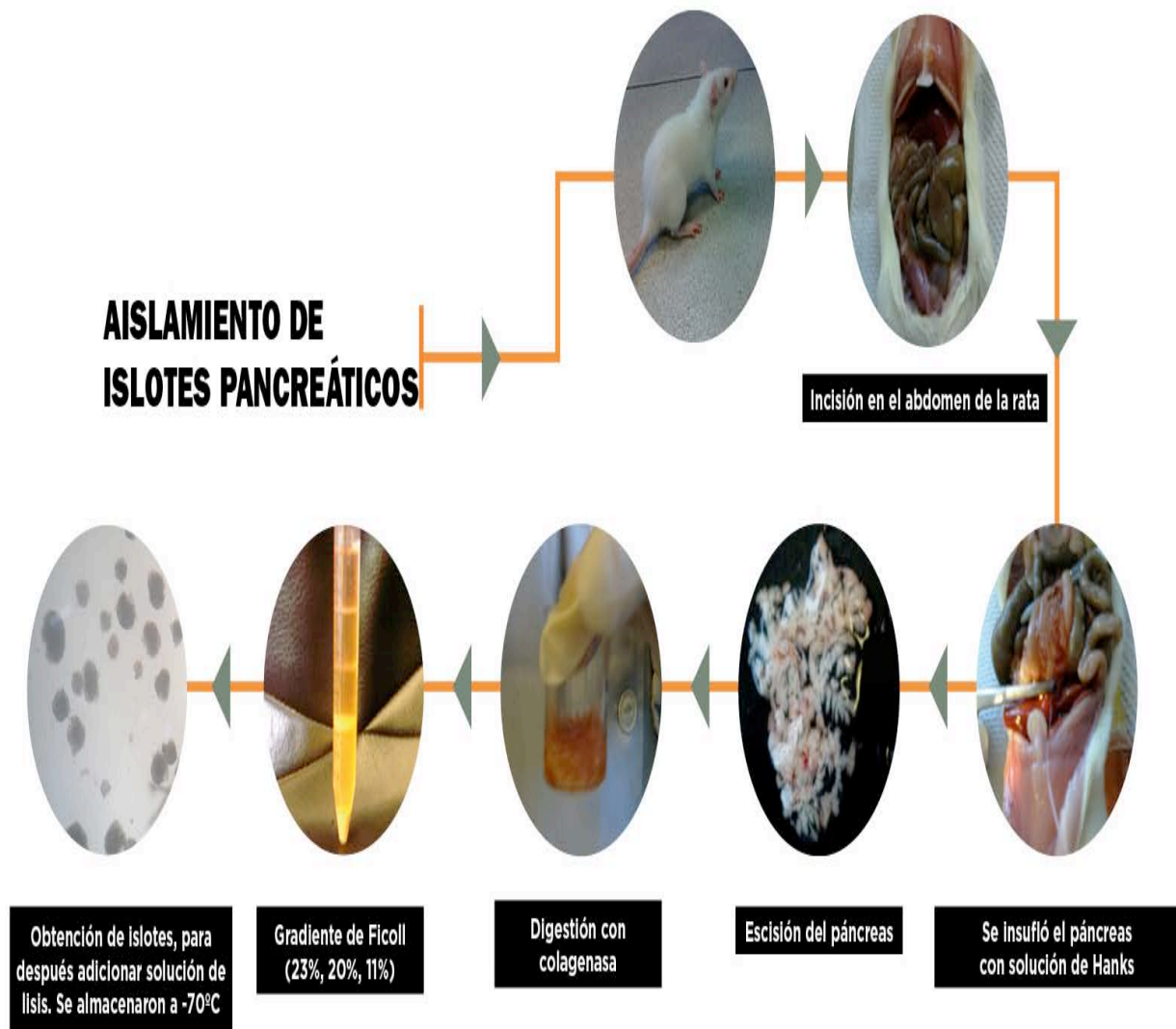


Figura 6. Esquema del procedimiento del aislamiento de islotes pancreáticos de rata.

6.4 Extracción de ARN

Se utilizó el mini kit RNeasy lipid tissue de Qiagen. Para lisar los islotes, se descongelaron y agitaron en vortex de 15-30 segundos. Después se volvieron a congelar a -70°C de 15-20 minutos, para descongelarlos después y agitar en vortex de 15-30 segundos. Este proceso se repitió una vez más. Se incubó la

muestra a temperatura ambiente por 5 minutos para después adicionar 200 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos. Se incubó a temperatura ambiente de 2-3 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4°C. Luego se transfirió la parte acuosa a un tubo nuevo y se adicionó 1 volumen de etanol al 70% y se agitó con vortex. Se transfirió la muestra a un tubo de 2 mL con columna para su purificación y centrifugó por 15 segundos a 10000 rpm, desechando los residuos.

Se adicionaron 700 µL de buffer RW1 (RNeasy lipid tissue kit, Qiagen) a la columna y centrifugó a 10000 rpm por 15 segundos. Al terminar, se descartaron los residuos. Se adicionaron 500 µL de buffer RPE (RNeasy lipid tissue kit, Qiagen) y centrifugó 15 segundos a 10000 rpm para luego descartar los residuos, nuevamente se adicionó la misma cantidad de ese buffer, centrifugándose a 10000 rpm por 2 minutos. Se colocó la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL, y se adicionaron de 30-50 µL de agua libre de RNAsas, se pasó a la centrífuga por un minuto a 10000 rpm.

Ya obtenido el ARN de los islotes, se cuantificó su concentración en un Luminometro Biotek Synergy HT a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

6.5 RT-PCR en tiempo real

La síntesis del ADN complementario se llevó a cabo mediante la reacción de transcriptasa reversa utilizando el kit de Roche "Transcriptor first strand cDNA synthesis kit" siguiendo las especificaciones del fabricante. El estudio de la expresión génica se llevó a cabo mediante la técnica de PCR en tiempo real utilizando el equipo Light Cycler 2.0 de Roche. Las condiciones de activación de la ARN Taq polimerasa y desnaturalización del ADN fueron a 95°C durante 10 minutos, 45 ciclos de amplificación (95°C, 10 s; 60°C 30 s; y 72°C 1 s). En el caso del gen UCP2 fueron 55 ciclos.

Los oligonucleótidos y las sondas específicas para cada uno de los genes de interés se diseñaron utilizando el programa “Universal Probe Library Assay Design Center” de Roche (<http://qpcr.probefinder.com/roche3.html>).

La secuencia de los oligonucleótidos para cada gen se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos sentido y antisentido de los genes UCP2, Mgat4a, FTO y β -actina.

Gen	Oligonucleótido sentido (5'-3')	Oligonucleótido antisentido (3'-5')
UCP2	gcgtgagacctcaaagcac	gggacctcaatcgtcaaga
Mgat4a	gagaaattagttccggcttgc	aggtttgcttcggtctcca
FTO	tcacagcctcggttagctc	aatccaagggtgcctgttgag
β -actina	aaggccaaccgtgaaaagat	accagaggcatacagggaca

6.6 Análisis estadístico

Se utilizó el programa Sigma Plot versión 11.0. Se utilizó la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA, por sus siglas en inglés) y la diferencia entre las medias se determinó con la prueba Holm-Sidak. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS

7.1 Resultados de la expresión relativa del gen Mgat4a

En la Figura 7 se muestra la expresión del gen Mgat4a de los grupos con dieta control (C), dieta alta en lípidos (OM) y dieta intervenida (Dint), en donde se observa una tendencia al incremento en el grupo OM con respecto al control.

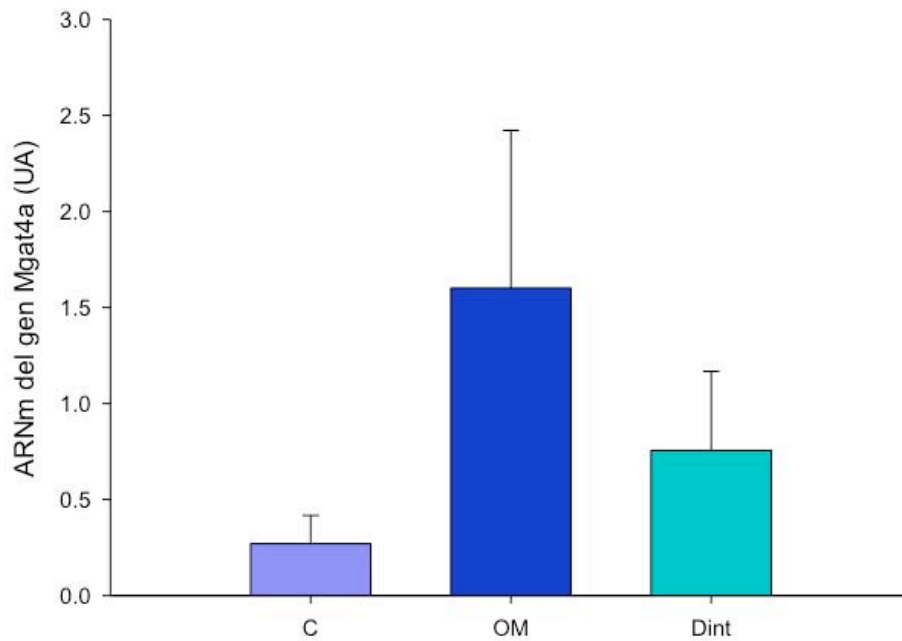


Figura 7. Expresión relativa en unidades arbitrarias (UA) del gen Mgat4a con respecto al gen β -actina en islotes pancreáticos de ratas macho. C: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta control. OM: crías provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica. Dint: crías provenientes de madres alimentadas con dieta intervenida. Los resultados representan la media \pm EE, n=3-5 experimentos independientes.

En la Figura 8 se muestra la expresión del gen Mgat4a de los grupos en donde la cría realizó ejercicio comparados con su grupo control. Se observa la tendencia al incremento de la expresión de este gen en los grupos en donde la cría realizó ejercicio, sin importar la dieta consumida por la madre, con respecto a su control (crías alimentadas con la misma dieta pero que no realizaron ejercicio).

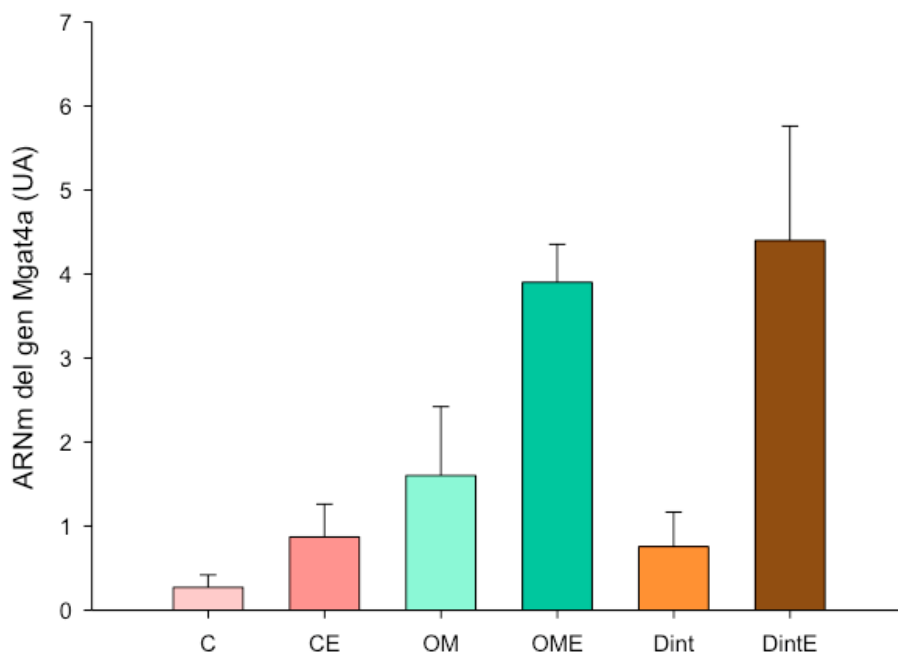


Figura 8. Expresión relativa en unidades arbitrarias (UA) del gen Mgat4a con respecto al gen β -actina en islotes pancreáticos de ratas macho. C: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta control. CE: crías que realizaron ejercicio, provenientes de madres alimentadas con dieta control. OM: crías provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica. OME: crías que realizaron ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica. Dint: crías provenientes de madres alimentadas con dieta intervenida. DintE: crías que realizaron ejercicio, provenientes de madres alimentadas con dieta intervenida. Los resultados representan la media \pm EE, n=3-5 experimentos independientes.

Cuando se analiza por separado el efecto del ejercicio en las crías y la dieta materna, se observa un incremento significativo en la expresión génica de Mgat4a en las crías provenientes de madres alimentadas con una dieta obesogénica y una dieta intervenida, comparados con el grupo proveniente de madres alimentadas con una dieta control. Ver Figura 9.

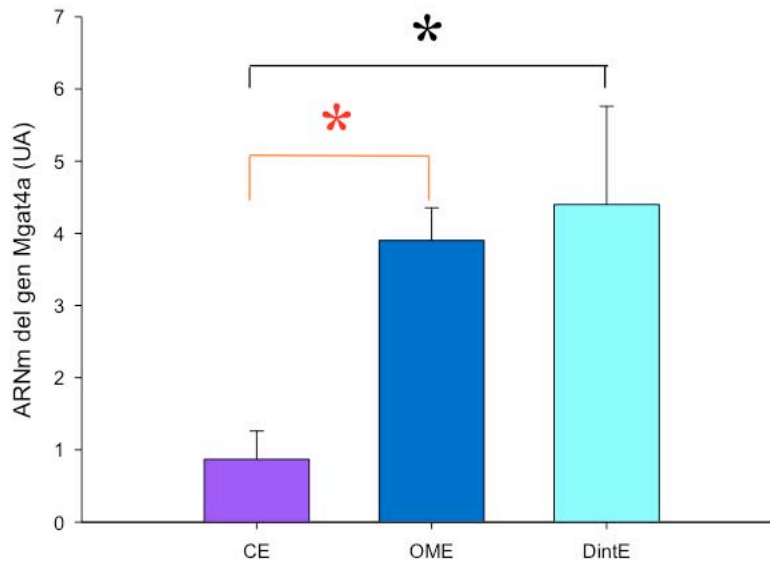


Figura 9. Expresión relativa en unidades arbitrarias (UA) del gen Mgat4a con respecto al gen β -actina en islotes pancreáticos de ratas macho. CE:Crías que realizaron ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta control. OME: Crías que realizaron ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica. DintE: Crías que realizaron ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta intervenida. Los resultados representan la media \pm EE, n=3-5 experimentos independientes. *p<0.05

En las crías provenientes de madres alimentadas con una dieta obesogénica y que durante el embarazo se cambió a dieta balanceada, se encontró un incremento significativo en la expresión del gen en cuestión, por efecto del ejercicio realizado por las crías. Ver Figura 10.

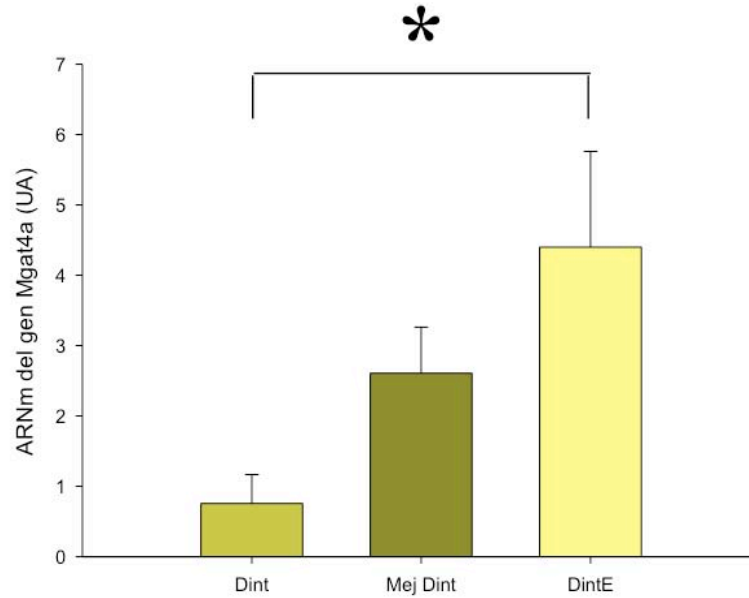


Figura 10. Expresión relativa en unidades arbitrarias (UA) del gen Mgat4a con respecto al gen β -actina en islotes pancreáticos de ratas macho. Dint: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta intervenida. MejDint: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta control y que realizaron ejercicio durante la gestación. DintE: Crías que realizaron ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta intervenida.. Los resultados representan la media \pm EE. n=3-5 experimentos independientes. * $p < 0.05$

7.2 Resultados de la expresión relativa del gen UCP2

A continuación se muestra la expresión del gen UCP2 en el páncreas de las crías de los grupos en donde la madre fue alimentada con dieta alta en lípidos. Aparentemente sólo es modificada por efecto del ejercicio en las crías (OME) con respecto a las que no lo realizaron (OM). Estos resultados se muestran en la Figura 11.

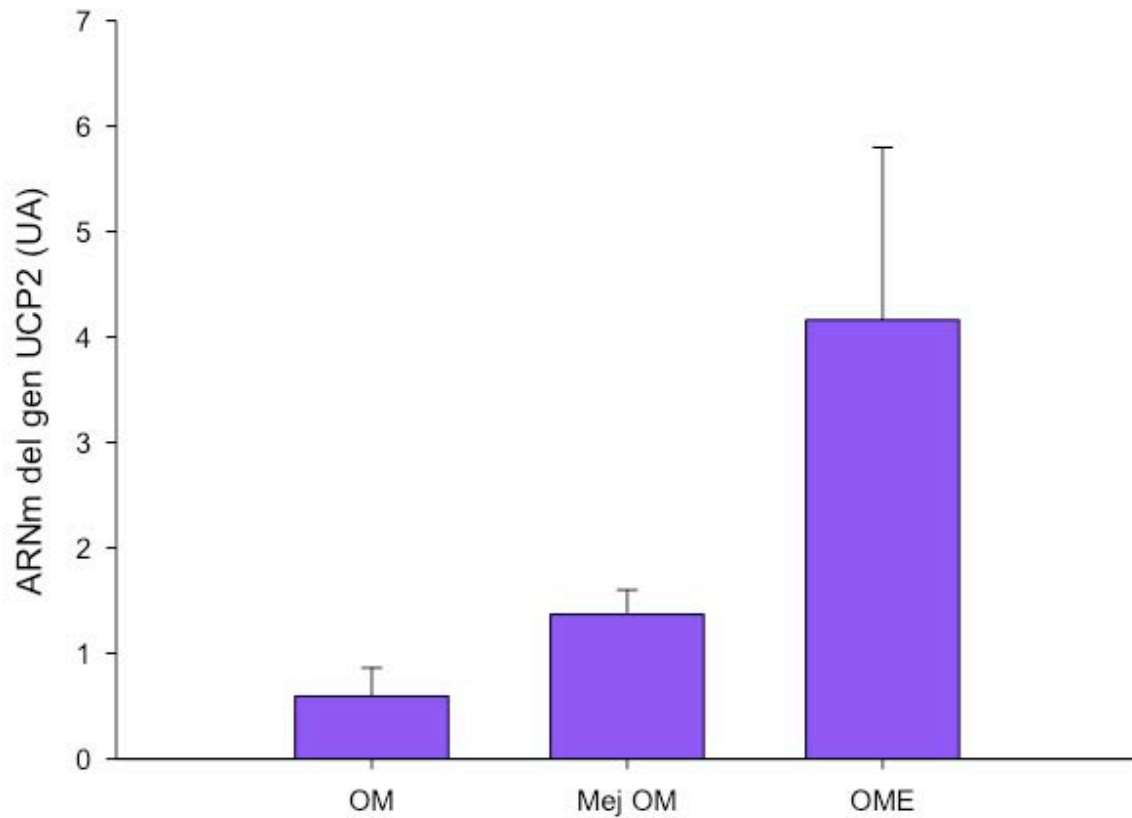


Figura 11. Expresión relativa en unidades arbitrarias (UA) del gen UCP2 con respecto al gen β -actina en islotes pancreáticos de ratas macho. OM: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica. OME: Crías que realizaron ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica. Mej OM: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica y que realizaron ejercicio durante la gestación. Los resultados representan la media \pm EE. n=3-5 experimentos independientes.

7.3 Resultados de la expresión relativa del gen FTO

A continuación se presenta la expresión del gen FTO, en el páncreas de las crías de los grupos en donde la madre fue alimentada con dieta control. Se observó un incremento en la expresión del gen cuando se realiza ejercicio, ya sea por la madre o por la cría en los grupos provenientes de madres alimentadas con una dieta materna control, sin embargo, el incremento es más notorio cuando la madre es la que realiza el ejercicio.

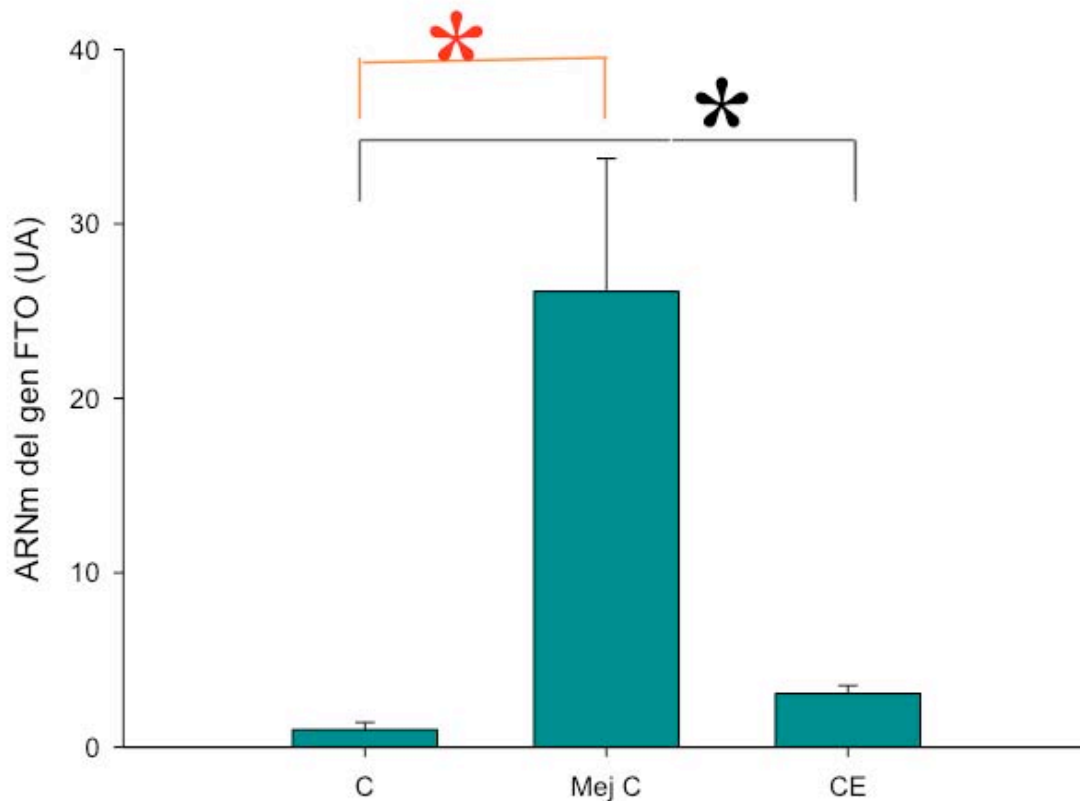


Figura 12. Expresión relativa en unidades arbitrarias (UA) del gen FTO con respecto al gen β -actina en islotes pancreáticos de ratas macho. C: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta control. Mej C: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta control y que realizaron ejercicio durante la gestación. CE: Crías que realizaron ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta control. Los resultados representan la media \pm EE. $n=3-5$ experimentos independientes. * $p<0.05$

Cuando se analizó el efecto del ejercicio de acuerdo con el tipo de dieta consumido, por la madre, se encontró que el ejercicio realizado por la madre produjo un incremento en la expresión del gen FTO solamente cuando esta consumió una dieta control (balanceada), comparado con los otros dos tipos de dieta, obesogénica (OM) y dieta intervenida (Mej Dint).

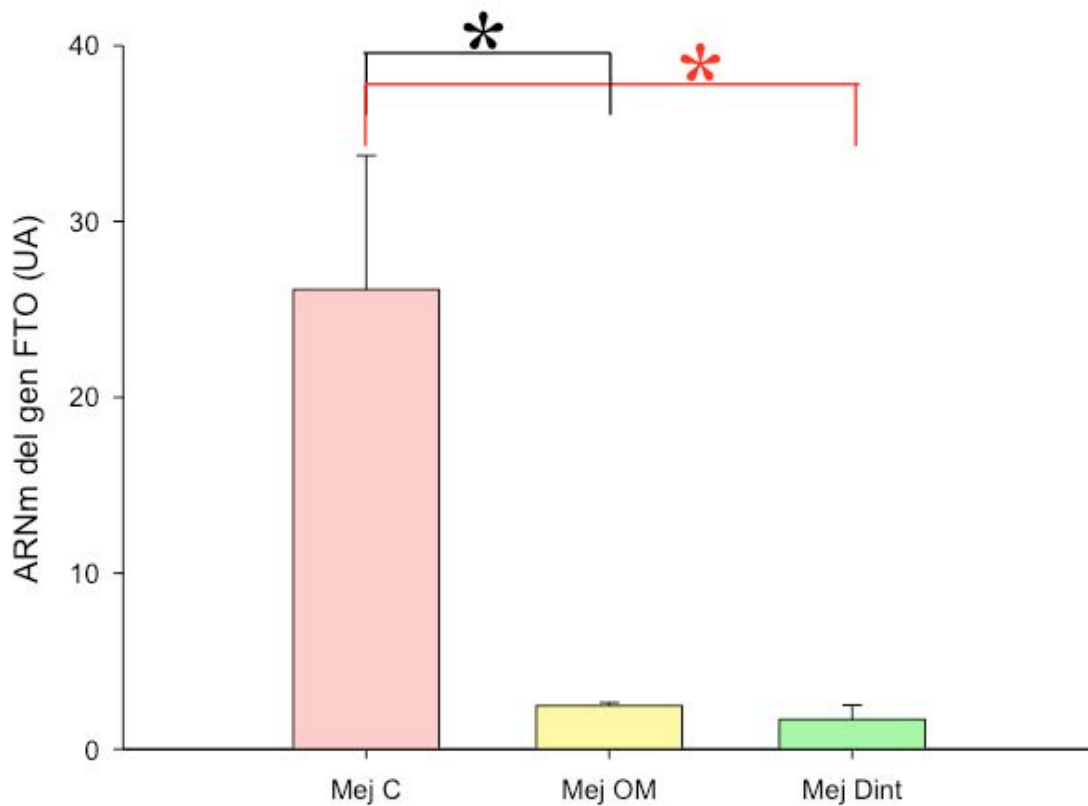


Figura 13. Expresión relativa en unidades arbitrarias (UA) del gen FTO con respecto al gen β -actina en islotes pancreáticos de ratas macho. Mej C: crías provenientes de madres alimentadas con dieta control y que realizaron ejercicio durante la gestación. Mej OM: crías provenientes de madres alimentadas con dieta hiperlipídica y que realizaron ejercicio durante la gestación. Mej Dint: crías provenientes de madres alimentadas con dieta control y que realizaron ejercicio durante la gestación. Los resultados representan la media \pm EE. $n=3$ experimentos independientes. $*p<0.05$

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La enzima N-acetilglucosaminil transferasa tiene un papel fundamental en la migración del transportador de glucosa (Glut2) hacia la membrana de la célula beta, ya que la adición de un glicano favorece el anclaje del transportador a la membrana; dicha enzima es codificada por el gen Mgat4a (Ohtsubo K et al, 2011). La disminución en la expresión de este gen podría comprometer de manera indirecta esta migración y por lo tanto afectar la captación de glucosa por la célula beta.

Los estudios realizados por Ohtsubo y colaboradores (Ohtsubo K et al, 2011), demuestran que una dieta alta en lípidos disminuye la expresión del gen Mgat4a en células beta pancreáticas de ratón. En el presente trabajo, se estudió el efecto de una dieta alta en grasa, un cambio en la dieta (de obesogénica a balanceada), del ejercicio materno y del ejercicio en la cría, en la expresión del gen Mgat4a en el páncreas de la progenie, y se encontró un incremento significativo en la expresión del gen Mgat4a por efecto del ejercicio realizado en las crías provenientes de madres alimentadas con una dieta obesogénica y una dieta intervenida (Figuras 9 y 10) comparadas con el grupo control con ejercicio en la cría, sugiriendo que el ejercicio en la progenie, modifica la expresión del gen Mgat4a a pesar de provenir de una madre sedentaria y aunque esta hubiera consumido una dieta obesogénica en alguna periodo de su vida antes o durante la gestación. El aumento en la expresión de este gen podría corresponder a un aumento en la síntesis de la glicosiltransferasa Gnt-4a y así se favorecería la migración del Glut2 a la membrana de la célula beta, beneficiando la secreción de insulina inducida por glucosa.

Con estos resultados se puede decir que el factor que está actuando en la modificación de la expresión de este gen podría no ser la dieta materna, sino el ejercicio realizado por la cría. Aunque se desconoce el mecanismo por el que el ejercicio regula la expresión de Mgat4a en este estudio, se ha reportado que en el humano, el ejercicio favorece modificaciones epigenéticas que regulan positivamente la expresión de genes que participan en rutas metabólicas en músculo y tejido adiposo (Rönn T et al, 2013).

Se sabe que la obesidad materna programa a su progenie para distintas enfermedades, como obesidad, enfermedades cardiovasculares y/o diabetes (Heerwagen MJ, 2010). En los resultados obtenidos en el presente estudio, se observó que la programación a la que pudieron estar sometidas las crías debido a la dieta materna, no afectó la expresión del gen *Mgat4a* en el páncreas, y aunque se hubiera esperado que la expresión de este gen fuera mayor en el grupo control con ejercicio en la cría con respecto a los grupos OME y DintE sugiere que el nivel de expresión génica en el control, es el necesario para la función de este gen en condiciones normales. Si bien el estudio de la expresión de un gen no determina que la proteína se comporte de igual manera, podemos suponer que el ejercicio tiene un efecto benéfico sobre la expresión del gen *Mgat4a* en el páncreas de las crías.

De acuerdo con estudios realizados por el grupo de Zambrano y colaboradores (Ibañez C, 2014), en crías machos de 110 días de edad provenientes de madres alimentadas con una dieta obesogénica (OM), la concentración sérica de insulina fue mayor tanto en las crías que realizaron ejercicio como en las que no lo hicieron comparadas con las crías con y sin ejercicio, provenientes de madres con dieta control, también se encontró un incremento en el índice de resistencia a la insulina (IRI) en los grupos OM y OME respecto a sus controles (crías sin ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta control, C y crías con ejercicio provenientes de madres alimentadas con dieta control, CE, respectivamente), en donde, a pesar del ejercicio, el IRI no mejoró (Ibañez C, 2014). En cuanto a los grupos con dieta intervenida (Dint) y con ejercicio en la cría (DintE), la concentración sérica de insulina no fue diferente de los grupos control, pero sí de los grupos de obesidad materna (OM). Si estos datos los relacionamos con los resultados de la expresión del *Mgat4a* encontrados en el presente estudio, se podría pensar que a pesar de que el ejercicio en la cría podría beneficiar la expresión de este gen, no significa que tenga el mismo efecto con la proteína; además de que el incremento en los niveles de insulina sugiere una resistencia a la insulina en los tejidos diana de los grupos OME y OM.

Respecto a la expresión del gen *UCP2*, se vio notoriamente una tendencia al

incremento (Figura 11) en el grupo de crías que realizaron ejercicio, provenientes de madres alimentadas con dieta alta en lípidos (OME), comparado con el grupo de crías que no lo realizaron y que provenían de madres que consumieron una dieta alta en lípidos (OM). De acuerdo con la literatura, la expresión de este gen aumenta en presencia de ácidos grasos libres, aunque es importante mencionar que los niveles de ARN mensajero y de proteína de UCP2 no son necesariamente proporcionales en las células beta pancreáticas, lo que sugiere una regulación post-traduccional y que el comportamiento de la proteína puede ser diferente a los niveles de expresión observados en el presente trabajo (Pecqueur C et al, 2001).

Existe evidencia de las funciones del gen FTO, se sabe que está implicado en la regulación de la ingesta alimentaria y el gasto energético (Guo J et al, 2012), además de regular aspectos relacionados con la secreción de insulina, aunque aún no es claro cómo influye en la primera fase de secreción inducida por glucosa, esto ha sido reportado en células de insulinoma de rata (INS-1). La inducción de su expresión no incrementa el contenido de insulina en estas células, lo que sugiere que podría controlar pasos en la exocitosis más que en la biosíntesis de esta hormona (Russell MA y Morgan NG, 2011). También se ha reportado que la proteína que codifica el gen FTO tiene una función de desmetilasa en cadena sencilla de ADN y ARN, y se sugiere que afecta el procesamiento del ARN, su transporte y la eficiencia de su traducción. Estas modificaciones son reversibles y tiene influencia sobre su estabilidad y vida media. Si se incrementa la metilación del ARNm, puede ocurrir como consecuencia, una disminución en la traducción, sugiriendo que esta desmetilasa desempeña un papel importante en la regulación de la expresión génica (Merkestein et al, 2014). Con esta información, se puede especular que el gen FTO podría estar regulando otros genes relacionados con la secreción de insulina.

Respecto a la expresión de FTO, en el presente estudio, se encontró un efecto benéfico del ejercicio realizado tanto en las madres como en las crías cuando provenían de madres alimentadas con una dieta balanceada (control). Dicho efecto fue mayor en las crías provenientes de madres que realizaron ejercicio durante la gestación, comparado con el grupo en donde solamente las crías

realizaron ejercicio (Figura 12). Una dieta materna balanceada influye positivamente en la expresión de FTO y una dieta alta en lípidos repercute negativamente sobre ella. En el grupo Dint se esperaba que debido al cambio de una dieta alta en lípidos a una dieta balanceada, la expresión de este gen fuera similar a la del grupo control, sin embargo, esto no fue así, por lo tanto, es importante que la madre se alimente desde el inicio de su vida con una dieta balanceada, al menos para el caso de la expresión de este gen.

9. CONCLUSIONES

Una dieta materna alta en lípidos no afectó la expresión de los genes estudiados, sin embargo, el ejercicio materno aumentó la expresión del gen FTO en el páncreas de las crías, solamente cuando la dieta materna fue control (balanceada). Por otro lado, el ejercicio en la cría produjo un incremento en la expresión del gen Mgat4a cuando proviene de madres alimentadas con dieta alta en lípidos, sugiriendo que el ejercicio materno (FTO) y el ejercicio en la cría (Mgat4a) tienen un efecto benéfico en la regulación de estos genes.

10. REFERENCIAS

- Affourtit C, Brand MD (2008). "On the role of uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells" *Biochim Biophys Acta* 1777: 973-979.
- Allen L (2006). "Pregnancy and lactation" In: *Present knowledge in nutrition*, Ed Bowman BA, Russell RM, 9ª Edition. International Life Sciences Institute. 2: 403–425.
- Ashcroft FM y Ashcroft SJ (1992). "Insulin: Molecular biology to pathology". Oxford: IRL Press at Oxford University Press. Pag 155.
- Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D y Wadsworth ME (1989). "Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease". *BMJ* 298: 564–567.
- Barker DJ (1997). "The long-term outcome of retarded fetal growth," *Clin Obstet Gynecol* 40 (4): 853–863.
- Breier BH, Vickers MH, Ikenasio BA, Chan KY, Wong WP (2001). "Fetal programming of appetite and obesity". *Mol Cell Endocrinol* 185: 73–79.
- Carter LG, Qi NR, de Cabo R y Pearson KJ (2013). Maternal exercise improves insulin sensitivity in mature rat offspring. *Med Sci Sports Exerc* 45(5): 832–840.
- Cecchini M, Sassi F, Lauer JA, Lee Y, Guajardo-Barron V, Chisholm D (2010). "Tackling of unhealthy diets, physical inactivity, and obesity: health effects and cost-effectiveness". *Lancet* 376(9754):1775-1784.
- Chadt A , Yeo GS, Al-Hasani H (2012). "Nutrition-/diet-induced changes in gene expression in pancreatic β -cells". *Diab Obes Metab* 14(3): 57-67
- Chan CB, De Leo D, Joseph JW, McQuaid TS, Ha XF, Xu F, Tsushima RG, Pennefather PS, Salapatek AM, Wheeler MB (2001). "Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion — mechanism of action". *Diabetes* 50: 1302–1310.
- Chan CB, Harper ME (2006). "Uncoupling Proteins: Role in Insulin Resistance and Insulin Insufficiency". *Curr Diab Rev* 2(3): 271–283.
- Chu SY, Kim SY, Schmid CH, Dietz PM, Callaghan WM et al (2007). "Maternal obesity and risk of cesarean delivery: a meta-analysis". *Obes Rev* 8: 385–394.
- Coffey VG y Hawley JA (2007). "The molecular bases of training adaptation". *Sports Med* 37(9):737–763.
- Dabelea D, Hanson RL, Lindsay RS, Pettitt DJ, Imperatore G, Gabir MM, et al (2000). "Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships". *Diabetes* 49(12):2208–2211.
- De León DD y Stanley CA (2007). "Mechanisms of Disease: advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in neonates". *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*

3:57-68

Despres JP y Lemieux I (2006). "Abdominal obesity and metabolic síndrome." *Nature* 444(7121):881–887.

Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Korner A, Jacobson P, Carlsson LM, Kiess, W, Vatin V, Lecoeur C et al (2007). "Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity". *Nat Genet* 39: 724–726

Doherty DA, Magann EF, Francis J, Morrison JC, Newnham JP (2006) "Pre-pregnancy body mass index and pregnancy outcomes". *Int J Gynaecol Obstet* 95: 242–247.

Edlund H (2002). "Pancreatic organogenesis — developmental mechanisms and implications for therapy". *Nat Rev Genet* 3: 524-532.

Fidalgo M, Falcão-Tebas F, Bento-Santos A, de Oliveira E, Nogueira-Neto JF, de Moura EG, Lisboa PC, de Castro RM, Leandro CG (2013). "Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training". *Br J Nutr* 109(3):449-456.

Finucane M (2011). "National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants" *Lancet* 377:557–567.

Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL (2012). "Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999–2010". *JAMA* 307: 491–497.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott, KS, Lango H, Rayner NW et al (2007). "A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity". *Science* 316: 889–894.

Fu Z, Gilbert ER, Liu D (2013). "Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes". *Curr Diab Rev* 9(1): 25-53.

Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, Yeo GS, McDonough MA, Cunliffe S, McNeill LA (2007) "The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate- dependent nucleic acid demethylase." *Science* 318:1469–1472.

Gil, A (2010). "Tratado de nutrición, tomo 1. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición" (2ªed). Madrid: Editorial médica panamericana.

Githens, S (1988). "The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation and culture". *J Pediat Gastroenterol Nutr* 7: 486-506.

Godfrey KM y Barker DJ (2000). "Fetal nutrition and adult disease". *Am J Clin Nutr*

71:1344S–1352S.

Goh J y Ladiges WC (2013). “A novel long term short interval physical activity regime improves body composition in mice”. *BMC Res Notes* 6:66.

Gremlich S, Roduit R, Thorens B (1997). “Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic b cells”. *J Biol Chem* 272:3216–3222.

Guo J, Ren W, Ding Y, Li A, Jia L, Su D, Liu X, Xu K, Yang T (2012). “Fat mass and obesity associated gene (FTO) expression is regulated negatively by the transcription factor Foxa2”. *PLoS One* 7(12):e51082.

Gupta D, Krueger C, Lastra G (2012). “Over-nutrition, obesity and insulin resistance in the development of beta cell dysfunction”. *Curr Diab Rev* 8: 76-83

Guerra SD, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani, M., Sbrana, S, Torri, S, Pollera M, Boggi U, Mosca F, et al (2005). “Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes”. *Diabetes* 54: 727–735.

Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. “Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales”. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.

Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, Poitout V (2005). “Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans”. *J Biol Chem* 280: 32413 – 32418.

Harper ME, Ullrich A, Saunders GF(1981) “Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11”. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4458-4460.

Heerwagen MJ, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE (2010). “Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil.” *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299 (3): 711-722.

Henquin JC, Ishiyama N, Nenquin M, Ravier MA, Jonas JC (2002). “Signals and pools underlying biphasic insulin secretion”. *Diabetes* 51: S60-S67.

Heslehurst N, Simpson H, Ells LJ, Rankin J, Wilkinson J, et al. (2008). “The impact of maternal BMI status on pregnancy outcomes with immediate short- term obstetric resource implications: a meta-analysis”. *Obes Rev* 9: 635–683.

Hjelmborg JVB, Fagnani C, Silventoinen K et al. (2008) “Genetic influences on growth traits of BMI: a longitudinal study of adult twins,” *Obesity* 16(4): 847–852.

Hoff GL, Cai J, Okah FA, Dew PC (2009). “Pre-pregnancy overweight status between successive pregnancies and pregnancy outcomes”. *J Womens Health (Larchmt)* 18: 1413–1417.

- Holloszy JO (2005) "Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity" *J Appl Physiol* 99:338-343.
- Ibañez C (2014) "Beneficio del ejercicio en las crías descendientes de ratas con obesidad experimental". Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Johansson KA y Grapin-Botton A (2002) "Development and diseases of the pancreas". *Clin Genet* 62: 14–23.
- Johnson JH, Ogawa A, Chen L, Orci L, Newgard CB, Alam T, Unger, RH (1990). "Underexpression of beta cell high Km glucose transporters in noninsulin-dependent diabetes". *Science* 250: 546–549.
- Joseph JW, Koshkin V, Saleh MC, et al (2004). "Free fatty acid-induced β -cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression". *J Biol Chem* 279:51049–51056.
- Kalk P, Guthmann F, Krause K, Relle K, Godes M et al (2009) "Impact of maternal body mass index on neonatal outcome". *Eur J Med Res* 14: 216–222.
- Kitabchi AE, Temprosa M, Knowler WC, Kahn SE, Fowler SE, Haffner SM, Andres R, Saudek C, Edelstein SL, Arakaki R, Murphy MB, Shamon H (2005). "Role of insulin secretion and sensitivity in the evolution of type 2 diabetes in the diabetes prevention program: effects of lifestyle intervention and metformin" *Diabetes* 54:2404-2414.
- Lameloise N, Muzzin P, Prentki M, Assimacopoulos-Jeannet F (2001). "Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion?" *Diabetes* 50: 803–809.
- Lewin B, Krebs JE, Goldstein, ES, Kilpatrick ST (2011). "Genes X" (10th ed). United States of America: Jones and Bartlett Learning.
- Liu X, Du J, Wang G, Chen Z, Wang W, et al (2011). "Effect of pre-pregnancy body mass index on adverse pregnancy outcome in north of China". *Arch Gynecol Obstet* 283: 65–70.
- Lupi R, Dotta F, Marselli L et al. (2002). "Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated". *Diabetes* 51: 1437 – 1442.
- Luque J, Herraes A (2001) "Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud". Madrid :Harcourt.
- Manzanares S, Santalla A, Vico I, Lopez MS, Pineda A, et al (2012). "Abnormal maternal body mass index and obstetric and neonatal outcome". *J Matern Fetal Neonatal Med* 25: 308–312.

McCurdy CE, Bishop JM, Williams SM, Grayson BE, Smith MS, Friedman JE, et al (2009). "Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates". *J Clin Invest* 119:323–335.

Merkestein M, McTaggart JS, Lee S, Kramer HB, McMurray F, et al (2014). "Changes in Gene Expression Associated with FTO Overexpression in Mice". *PLoS ONE* 9(5): e97162.

Milke P (2000). "Nutrición del individuo sano". México: Piensa.

Monasta L, Batty GD, Cattaneo A, Lutje V, Ronfani L, et al. (2010). "Early-life determinants of overweight and obesity: a review of systematic reviews". *Obes Rev* 11: 695–708.

Ohtsubo K, Takamatsu S, Minowa MT, Yoshida A, Takeuchi M, Marth JD (2005). "Dietary and Genetic Control of Glucose Transporter 2 Glycosylation Promotes Insulin Secretion in Suppressing Diabetes" *Cell* 123: 1307–1321.

Ohtsubo K, Chen MZ, Olefsky JM, Marth JD. (2011). "Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport". *Nat Med* 17(9): 1067-1075.

Olson AL y Pessin, JE (1996). "Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family". *Annu Rev Nutr* 16: 235–256.

Orphanides G y Reinberg D (2002). "A Unified Theory of Gene Expression" *Cell* 108:439–451

Osmond C, Barker DJ, Slattery JM (1990). "Risk of death from cardiovascular disease and chronic bronchitis determined by place of birth in England and Wales". *J Epidemiol Community Health* 44: 139–141.

Patane G, Anello M, Piro S, et al (2002). "Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibition". *Diabetes* 51:2749–2756.

Patel SP, Rodriguez A, Little MP, Elliott P, Pekkanen J, et al (2012). "Associations between pre-pregnancy obesity and asthma symptoms in adolescents". *J Epidemiol Community Health* 66: 809–814.

Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud D, Miroux B (2001). "Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation". *J Biol Chem* 276: 8705–8712.

Poitout V y Robertson RP (2008). "Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction". *Endocr Rev* 29: 351–366.

Poitout V, Stein R, Rhodes CJ (2004). "Insulin gene expression and biosynthesis.

- In: International textbook of diabetes mellitus". 3^a ed. DeFronzo RA, Ferrannini, E, Keen H, Zimmet P, eds. Chichester: John Wiley & Sons, pp 98–123.
- Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS (2006). "Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids". *J Nutr* 136(4):873–876.
- Poitout V (2010). "Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell". *Bioch Biophys Acta* 1801:289–298
- Prentice AM (2006). "The emerging epidemic of obesity in developing countries." *Int J Epidemiol* 35: 93–99.
- Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R (2002). "Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes." *Diabetes* 51(3):S405–S413
- Ravelli ACJ, van der Meulen JH, Michels RPJ et al (1998). "Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine". *Lancet* 351: 173–177.
- Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ y Bleker OP (1999). "Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally". *Am J Clin Nutr* 70: 811–816.
- Recillas F y Escamilla M (2004). "Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica" *Mensaje bioquímico* 28:173-201
- Reimer MK y Ahren B (2002). "Altered b-cell distribution of pdx-1 and GLUT2 after a short-term challenge with a high-fat diet in C57BL/6J mice". *Diabetes* 51 (1), S138–S143.
- Ritz-Laser B, Meda P, Constant I et al (1999). "Glucose-induced preproinsulin gene expression is inhibited by the free fatty acid palmitate". *Endocrinology* 140: 4005 – 4014.
- Robertson RP, Zhang HJ, Pyzdrowski KL, Walseth TF (1992). "Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations". *J Clin Invest* 90:320–325.
- Robertson R, Zhou H, Harmon JS (2007). "Chronic oxidative stress as a mechanism for glucose toxicity of the beta cell in type 2 diabetes". *Cell Biochem Biophys* 48: 139-146.
- Rönn T et al (2013). "A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue". *PLoS Genet* 9(6):e1003572.
- Ruager-Martin R, Hyde MJ, Modi N (2010). "Maternal obesity and infant outcomes". *Early Hum Dev* 86: 715–722.
- Russell MA y Morgan NG (2011). "Conditional expression of the FTO gene product in rat INS-1 cells reveals its rapid turnover and a role in the profile of glucose-induced insulin secretion". *Clin Sci* 120: 403–413

Sako Y y Grill VE (1990). "A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation". *Endocrinology* 127:1580–1589.

Sandovici I, Smith NH, Nitert MD, Ackers-Johnson M, Uribe-Lewis S, Ito Y, Jones RH, Marquez VE, Cairns W, Tadayyon M, O'Neill LP, Murrell A, Ling C, Constância M, Ozanne SE (2011). "Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter–enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets". *PNAS* 108 (13): 5449–5454.

Samuels-Kalow ME, Funai EF, Buhimschi C, Norwitz E, Perrin M, et al (2007). "Prepregnancy body mass index, hypertensive disorders of pregnancy, and long-term maternal mortality". *Am J Obstet Gynecol* 197: 490 e491–496.

Samuelsson AM, Matthew PA, Argenton M, 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: 383–392.

Slack JM (1995). "Developmental biology of the pancreas". *Development* 121: 1569–1580.

Snowling NJ y Hopkins WG (2006). "Effects of different modes of exercise training on glucose control and risk factors for complications in type 2 diabetic patients: a meta-analysis". *Diab Care* 29(11):2518-2527.

Söhle J, Machuy N, Smailbegovic E, Holtzmann U, Grönniger E, Wenck H, Stäb F y Winnefeld M (2012). "Identification of new genes involved in human adipogenesis and fat storage". *PLoS One* 7(2): e31193.

Stunkard AJ, Foch TT, Hrubec Z (1986) "A twin study of human obesity". *JAMA* 256 (1): 51–54.

Torloni MR, Betran AP, Horta BL, Nakamura MU, Atallah AN, et al (2009). "Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis." *Obes Rev* 10: 194–203.

Unger RH (1991). "Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells". *Science* 251: 1200–1205.

Unger RH (1995). "Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications". *Diabetes* 44:863–870.

Van Lieshout RJ, Taylor VH, Boyle MH (2011). "Pre-pregnancy and pregnancy obesity and neurodevelopmental outcomes in offspring: a systematic review". *Obes Rev* 12: e548–559.

Vickers MH y Sloboda DM (2012). "Strategies for reversing the effects of metabolic disorders induced as a consequence of developmental programming". *Front Physiol* 3:242

Vinik A, Rosenberg L, Pittenger G, Taylor-Fishwick D (2004). "Stimulation of pancreatic islet neogenesis: a possible treatment for type 1 and type 2 diabetes". *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 11: 125-140.

Walley AJ, Asher JE, Froguel P (2009). "The genetic contribution to non-syndromic human obesity". *Nat Rev Genet* 10: 431-442.

Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Rodriguez-Gonzalez GL y Nathanielsz PW (2010). "Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol* 588:1791-1799.

Zhao J y Grant SFA. (2011). "Genetics of Childhood Obesity" *J Obes* 2011: 845148.