



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EXPRESIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN EL PROCESAMIENTO DE LA  
INSULINA: *PCSK1* Y *CPE*, EN ISLOTES PANCREÁTICOS DE CRÍAS DE RATA EN UN  
MODELO CON DIETA BAJA EN PROTEÍNAS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**FERNANDO MARTÍNEZ TEJEDA**



**MÉXICO, CDMX**

**2017**



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:**           **Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra**

**VOCAL:**                   **Profesor: Lidya Sumiko Morimoto Martínez**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Claudia Teresa Tovar Palacio**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: Sara Margarita Garza Aguilar**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Alberto Ortega Vázquez**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**DRA. LIDYA SUMIKO MORIMOTO MARTÍNEZ**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**Q.A ANA LAURA ORTEGA MÁRQUEZ**

**SUSTENTANTE:**

---

**FERNANDO MARTÍNEZ TEJEDA**



# Índice

1. Resumen .....	6
2. Introducción .....	7
2.1. Desnutrición .....	7
2.1.1 La desnutrición materna.....	8
2.2 Programación fetal y desnutrición materna.....	10
2.3 Páncreas .....	12
2.3.1 Insulina .....	14
2.4 Falla de las células beta y su relación con la diabetes mellitus y la obesidad .....	17
2.5 Regulación de la transcripción de genes .....	18
2.6 Dieta y expresión génica .....	20
2.7 Genes estudiados y su relación con la obesidad y la diabetes .....	22
2.7.1 PCSK1 .....	22
2.7.2 CPE .....	25
3. Objetivo .....	29
4. Hipótesis .....	29
5. Material y Métodos.....	29
5.1 Dietas .....	29
5.2 Grupos experimentales .....	30
5.3 Aislamiento de islotes pancreáticos.....	31
5.4 Extracción de RNA .....	32
5.5 RT-PCR en tiempo real .....	33
5.6 Determinación de insulina .....	34
5.7 Determinación de péptido C .....	35
5.8 Determinación de glucosa en suero .....	36
5.9 Análisis estadístico .....	37
6. Resultados y Análisis .....	37
7. Discusión .....	43
8. Conclusiones .....	48
9. Referencias.....	49
10. Apéndices .....	56



## Índice de Figuras

Figura 1. Partes del páncreas exocrino y endocrino y tipos celulares que componen al islote de Langerhans.....	13
Figura 2. Representación esquemática de la biosíntesis de insulina.....	15
Figura 3. Microscopía electrónica de una célula $\beta$ pancreática y representación esquemática de un gránulo de insulina.....	16
Figura 4. Interacción entre los nutrientes de la dieta y la expresión génica.....	21
Figura 5. La familia de las proprotein convertasas.....	22
Figura 6. Estructura tridimensional de la enzima <i>PCSK1</i> .....	23
Figura 7. Esquema representativo de la vía de señalización JAK/STAT.....	24
Figura 8. Representación esquemática de la enzima carboxipeptidasa E.....	26
Figura 9. Esquema de la reacción quimioluminiscente de la molécula de AMPPD .....	36
Figura 10. Reacciones químicas que suceden en el método de cuantificación de la glucosa sérica. ....	36
Figura 11. Frotis vaginal positivo de cuatro ratas diferentes, visto con microscopio óptico. Tinción con lugol 10X.....	37
Figura 12. Peso corporal a los 36 días de edad de las crías de rata macho.....	39
Figura 13. Expresión relativa del gen <i>PCSK1</i> con respecto al gen $\beta$ -actina en islotes pancreáticos de ratas macho.....	40
Figura 14. Expresión relativa del gen <i>CPE</i> con respecto al gen $\beta$ -actina en islotes pancreáticos de ratas macho de 36 días.....	41
Figura 15. Concentración de glucosa en suero de crías de rata macho de 36 días de edad.....	42
Figura 16. Concentración de insulina en suero de crías de rata macho de 36 días de edad.....	42



## Índice de tablas

Tabla 1. Composición nutricional de las dietas control y restringida en proteína.....	30
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos sentido y antisentido de los genes PCSK1, CPE y $\beta$ -actina.....	34
Tabla 3. Grupos experimentales. ....	38
Tabla 4. Concentraciones de RNA obtenido a partir de las muestra de islotes de crías de ratas alimentadas con dieta control (C) y dieta restringida (R) en proteínas.....	38



## 1. Resumen

La desnutrición infantil y materna sigue siendo un mal persistente y generalizado en países con ingresos bajos como México. Un deficiente suministro de proteínas en las primeras etapas del desarrollo produce cambios en la estructura y función de diversos órganos. El páncreas es uno de los órganos que se ve afectado negativamente durante el desarrollo fetal debido al efecto de la desnutrición materna, dando lugar a trastornos metabólicos en la vida adulta de la descendencia.

En el presente trabajo se estudió el efecto de una restricción proteínica del 50% en la dieta materna, durante la gestación, en crías de rata; con el objetivo de analizar específicamente las enzimas involucradas en el procesamiento de la insulina en los islotes pancreáticos: Proproteín convertasa subtilisin/kexin tipo 1 (*PCSK1*) y Carboxipeptidasa *E* (*CPE*). Para ello se dividieron a las ratas gestantes en dos grupos; que fueron alimentados con dieta control y dieta restringida en proteínas. Las crías macho fueron sacrificadas a los 36 días de edad y se obtuvieron las muestras de suero y los islotes pancreáticos de los cuales se realizó la extracción de RNA total. La expresión de los genes de interés se estudió por PCR en tiempo real.

Los hallazgos encontrados indican que *PCSK1* no cambió su expresión por efecto de la dieta. Por otro lado *CPE* disminuyó significativamente su expresión en las crías de rata provenientes de madres alimentadas con la dieta restringida con respecto a las crías de madres alimentadas con la dieta control. Posteriormente se determinó el efecto de esta disminución en la concentración de insulina, péptido C y glucosa. No se apreciaron cambios en ninguno de los tres parámetros estudiados por lo cual se piensa que existe un mecanismo compensatorio para la disminución del gen *CPE* ya sea que alguna otra carboxipeptidasa de la misma familia supla la función de esta enzima o que el mismo páncreas sufra fenómenos de hipertrofia, aumentando el tamaño de los islotes y aumentando la cantidad de insulina que secretan, lo cual podría causar la subsecuente falla de las células  $\beta$  y a largo plazo el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2.



## **2. Introducción**

### **2.1. Desnutrición**

La desnutrición se define como una provisión insuficiente de energía y nutrientes como proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales; acompañada de una incapacidad para cumplir con los requisitos del organismo para asegurar el crecimiento, mantenimiento y realización de sus funciones específicas (Martins J.B. et al. 2011). Actualmente la prevalencia de la desnutrición supera los 900 millones de personas en todo el mundo.

Específicamente la desnutrición infantil y materna sigue siendo un mal persistente y generalizado en países con ingresos bajos. Es la causante de aproximadamente 3.5 millones de muertes en niños menores de 5 años y responsable de 35% de las enfermedades en este grupo de edad (Black R.E. et al., 2008). La desnutrición que ocurre principalmente durante la gestación y los primeros años de vida tiene peculiar importancia debido a los efectos adversos que provoca tanto en la salud como en el desarrollo de las capacidades de los individuos (Martorell R. et al., 2010).

La UNICEF reconoce la existencia de causas básicas y subyacentes de la desnutrición, incluyendo los factores ambientales, económicos y sociopolíticos. (Black R.E. et al., 2008). Sin embargo, existen causas inmediatas de la desnutrición entre las que se encuentran: la alimentación inadecuada en cantidad o calidad, la incidencia de enfermedades infecciosas y el cuidado inadecuado del niño, que depende para su adecuada alimentación y salud del cuidado de su madre. Aunque la desnutrición tiene varios factores determinantes, el principal de estos es la pobreza, la cual conduce no sólo a la inseguridad alimentaria sino también a un cuidado deficiente de los niños, desnutrición materna, ambientes insalubres y una mala atención en los servicios de salud (Fishman S.M. et al., 2004).

Por otro lado, actualmente en la sociedad existe un alto consumo de alimentos ricos en energía pero con una mala calidad de nutrientes. El fácil acceso a la





comida chatarra aunado a su bajo costo conllevan a un aumento del consumo de este tipo de alimentos que en hoy en día es un problema que afecta a los países en desarrollo y a las poblaciones más pobres (Martins J.B. et al., 2011). Esta nueva situación nutricional afecta aún más el impacto de los efectos a largo plazo de la desnutrición.

### **2.1.1 La desnutrición materna**

De acuerdo a la OMS el estado nutricional de mujeres y niños es particularmente importante, ya que es a través de estos que los efectos perniciosos de la desnutrición son propagados a las generaciones futuras. Una madre con desnutrición es probable que dé lugar a un hijo con un bajo peso al nacer que es susceptible a enfermedades y muerte prematura, lo que empeora aún más el desarrollo económico de las familias y la sociedad, continuando con el ciclo de pobreza y desnutrición.

Un suministro óptimo de nutrientes a la madre tiene un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de la placenta y del feto. Una nutrición deficiente durante el embarazo resulta en una restricción del crecimiento intrauterino (IUGR por sus siglas en inglés *Intrauterine growth restriction*), con lo cual los recién nacidos presentan un bajo peso al nacer. En países en desarrollo se ha observado que un bajo peso al nacer debido a la IUGR, contribuye a que se presente desnutrición en la infancia y la niñez. (Fishman S.M. et al., 2004). Dicha condición también se asocia con una mayor morbilidad y mortalidad perinatal, y además se ha observado que los recién nacidos con bajo peso al nacer como consecuencia de IUGR, tienen un mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico en la vida adulta (Belkacemi L. et al., 2010). El síndrome metabólico abarca un conjunto de factores de riesgo metabólicamente relacionados entre sí como son la obesidad, la resistencia a la insulina, dislipidemias e hipertensión (Desai M. et al., 2015). Aunque la fisiopatología del síndrome metabólico no está completamente comprendida se ha planteado a la resistencia a la insulina y la obesidad central como primordiales en el desarrollo de este síndrome y su asociación con otras patologías como diabetes, enfermedades cardiovasculares, daño renal entre otros.



Recientemente se ha reportado una asociación entre el entorno prenatal y el riesgo de desarrollar síndrome metabólico en la vida adulta (Jahan-Mihan A. et al., 2015). El deficiente suministro o calidad de nutrientes en la dieta materna influyen en el peso y composición corporal de la progenie, provocando un incremento acelerado de este síndrome y que se da como consecuencia de la transición nutricional, en la que el suministro deficiente de nutrientes durante la gestación es reemplazado por una dieta normal o incluso de alto contenido energético en la vida posterior, lo que se observa comúnmente en países en desarrollo en todo el mundo (de Oliveira J.C. et al., 2016).

El estado nutricional de una mujer antes y durante el embarazo es muy importante para lograr que éste llegue a término de manera saludable. Un índice de masa corporal (IMC) bajo se asocia con IUGR y como un factor de riesgo para la aparición de enfermedades perinatales. Aunque hacen falta estudios que permitan cuantificar los efectos relativos del bajo IMC materno, el grado de aumento de peso durante el embarazo o la carencia de micronutrientes maternos sobre la ocurrencia y severidad de la IUGR, se sabe que esta última es un factor de riesgo para las enfermedades neonatales (Black R. et al., 2008).

Una de las situaciones más conocidas y estudiadas a nivel mundial en la cual se pudo observar cómo la dieta materna influye en la salud de la progenie fue durante la época de la Segunda Guerra Mundial durante la hambruna holandesa, en la cual la ingesta calórica fue reducida severamente, con una ración diaria oficial de entre 400-800 calorías, durante un periodo de tiempo de 4 meses (diciembre de 1944 - abril 1945). Los estudios epidemiológicos han demostrado que la desnutrición materna durante el segundo o tercer trimestre del embarazo provocó una disminución del peso corporal y de la talla de los niños al nacer (Lakshmy R. et al. 2013). Mientras que los fetos que sufrieron desnutrición durante la gestación temprana tenían un perfil lipídico aterogénico y mayor riesgo de enfermedad cardiaca en la edad adulta, junto con una disminución de la función cognitiva (Rinaudo P. & Wang E., 2012). A su vez las pruebas de la tolerancia a la glucosa realizadas a estos grupos, mostraron que existe una capacidad alterada para



metabolizar la glucosa en todos los sujetos que *in utero* fueron expuestos a la hambruna, y fue particularmente evidente en aquellos que sufrieron de desnutrición durante la gestación tardía (Rinaudo P. y Wang E., 2012). Otra evidencia adicional de este tipo de escenario en el cual existe un periodo crítico de estrés se ha dado gracias al seguimiento de los niños concebidos mediante técnicas de reproducción asistida ya que existen datos que apoyan la hipótesis de que un ambiente de estrés en los cultivos de embriones durante el periodo de pre-implantación puede estar asociado a diferencias tempranas en el perfil metabólico (Rinaudo P. y Wang E., 2012).

## **2.2 Programación fetal y desnutrición materna**

Se sabe de la existencia de ventanas críticas de sensibilidad, durante las cuales el organismo es particularmente sensible al medio ambiente. Barker identificó el periodo del útero como un periodo clave de la plasticidad del desarrollo; sin embargo, ahora está claro que existen otras etapas sensibles adicionales, incluyendo el periodo antes de la concepción y principios de la vida postnatal (Rinaudo P. y Wang E., 2012).

A través de estudios experimentales se ha demostrado que el entorno nutricional en el útero y durante el periodo postnatal, influyen directamente en el estado de salud de un individuo durante la vida adulta. Es decir, cuando el feto es expuesto a condiciones adversas *in utero*, este, busca la manera de mantener un equilibrio energético y poder lograr su supervivencia en dicho ambiente adverso. Sin embargo, estas adaptaciones tienen como consecuencia el aumento del riesgo de presentar enfermedades en etapas posteriores de la vida, dado que una vez que dicho individuo se ve expuesto a un ambiente de abundancia energética la programación que se dio durante dicha etapa en el organismo, provoca que se dé la acumulación de nutrientes a pesar de que ya no existan estímulos adversos. (Sosa-Larios T. et al., 2015).

Entre las principales situaciones adversas que puede presentar el feto está la desnutrición. Especialmente se ha estudiado que el efecto de un deficiente



suministro de proteínas en las primeras etapas del desarrollo produce cambios en la estructura y fisiología de diversos órganos. Entre estos órganos se encuentra el páncreas, que se ve afectado de manera negativa en sus funciones fisiológicas, dando lugar a trastornos metabólicos como diabetes, dislipidemias, hipertensión y obesidad en la vida adulta (Sosa-Larios T. et al., 2015).

Actualmente, varios estudios se centran en los orígenes del desarrollo como determinantes de la salud y la enfermedad (de Oliveira J.C. et al., 2016). Existe una hipótesis conocida como “el fenotipo ahorrador”, la cual plantea que la desnutrición tanto intrauterina como infantil, es capaz de programar una expresión génica para favorecer la sobrevivencia. De esta manera se protegen ciertos órganos por encima de otros, lo que conduce a una programación metabólica condicionada por la escasez del sustrato energético. Los modelos experimentales de malnutrición intrauterina, y en particular de déficit proteico, han demostrado claramente una alteración en la estructura-función del páncreas con disminución de las células de los islotes de Langerhans junto con una menor capacidad secretora de insulina. Esta programación celular afecta igualmente la regulación del gasto energético (Schnell M. et al., 2007).

De acuerdo a esta hipótesis la desnutrición provocaría una programación *in utero* que explicaría la aparición de la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2 en un adulto que nació con bajo peso para la edad gestacional y que luego ha sido expuesto a un ambiente de abundancia alimentaria (Schnell M. et al., 2007).

La restricción de nutrientes durante la gestación y la lactancia provoca un deterioro general del crecimiento y desarrollo de feto. Investigaciones en diversas especies como roedores y ovejas han demostrado que la programación del desarrollo de la función de órganos y sistemas específicos es el resultado de la exposición del feto o neonato a un ambiente con condiciones no óptimas (Zambrano E. et al., 2005). Varios estudios con modelos animales experimentales han demostrado que una dieta materna deficiente en proteínas durante los periodos críticos del desarrollo (embarazo y lactancia) altera el desarrollo normal del páncreas y la sensibilidad de



los tejidos a la acción de la insulina. Se han llevado a cabo diversos estudios en los cuales se ha utilizado el modelo de restricción proteica en la rata, tanto en la gestación como en la lactancia. A partir de estos estudios se ha concluido que la restricción de proteínas en la dieta materna afecta a la descendencia de diferentes maneras. Por ejemplo, en los grupos de ratas provenientes de madres alimentadas con una dieta restringida en proteína durante la gestación, los islotes pancreáticos pierden la capacidad de aumentar la secreción de insulina en respuesta a niveles estimulatorios de glucosa (11mM), lo que muestra que la restricción de proteínas en la dieta materna durante la gestación tiene un impacto en la sensibilidad de la glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas (Morimoto S. et al., 2012a).

### **2.3 Páncreas**

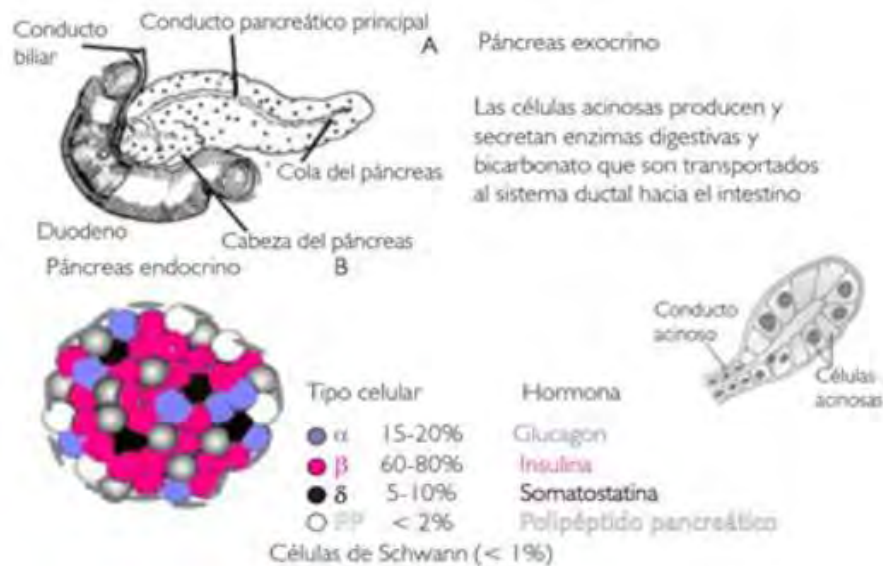
El páncreas es un órgano abdominal ubicado detrás del estómago, rodeado por el intestino delgado, hígado y el bazo. Tiene un papel central en el metabolismo, permitiendo que los alimentos ingeridos sean convertidos en energía por las células de todo el cuerpo (Leal-Lopes C. et al., 2015). El páncreas está compuesto por dos principales tipos de tejido, exocrino y endocrino. La porción exocrina secreta enzimas digestivas mientras que la porción endocrina, la cual consiste de islotes de Langerhans, secreta hormonas dentro del torrente sanguíneo. Cada islote está compuesto por un cierto número de células especializadas en la secreción de hormonas específicas (Figura 1). Existen cuatro tipos principales de células endocrinas contenidas dentro de un islote: células  $\beta$  que son las responsables de la síntesis y liberación de insulina; las células  $\alpha$  las cuales producen la hormona glucagon; las células  $\delta$  que son las responsables de liberar somatostatina y las células PP que secretan el polipéptido pancreático (O'Dowd J.F. y Stocker C.J., 2013).

El componente exocrino representa alrededor del 98.99% de la masa total del páncreas, la cual consiste en un red tubular altamente ramificada. Esta porción comprende principalmente células acinares, centroacinares y ductales. Los cúmulos de células acinares secretan enzimas digestivas, como la amilasa, hacia



un conducto central que transporta las enzimas al intestino. Así mismo, el páncreas exocrino también es responsable de secretar agua y iones dentro del intestino, ajustando así el pH ácido del quimo alimenticio (Leal-Lopes C. et al., 2015).

Mientras que el papel fisiológico del páncreas exocrino se enfoca en secretar las enzimas digestivas responsables de la digestión, absorción y asimilación de los nutrientes; el páncreas endócrino secreta las hormonas peptídicas necesarias para mantener la homeostasis de la glucosa. Todas las funciones pancreáticas son finamente reguladas por mecanismos de comunicación neurocrina, endocrina, paracrina e intracrina. De este modo, la falta de regulación de estas vías tiene un impacto significativo en el estado de salud y enfermedad (O'Dowd J.F. y Stocker C.J., 2013).



**Figura 1.** Partes del páncreas exocrino y endocrino y tipos celulares que componen al islote de Langerhans. A: Localización y divisiones anatómicas del páncreas. B: Del lado derecho se observan las células acinares del páncreas; del lado izquierdo se observa una representación esquemática de un islote de Langerhans y las células que lo componen (Olvera-Granados et al., 2008).

El desarrollo del páncreas es un proceso complejo. Durante la embriogénesis el páncreas se deriva del intestino y por medio de un proceso de señalización en



cascada que actúa sobre células precursoras, se generan tanto células exocrinas como endocrinas antes del nacimiento. Cualquier situación de estrés o estímulo en el ambiente durante los periodos críticos del desarrollo temprano puede alterar permanentemente la masa y la función de células  $\beta$  provocando consecuencias en la salud a largo plazo en el desarrollo del infante (O'Dowd J.F. y Stocker C.J., 2013).

Uno de los estudios más recientemente publicados por nuestro grupo de investigación, muestra que existen cambios en la morfología y la composición celular de los islotes pancreáticos en crías de rata hembra desde el periodo neonatal hasta la edad adulta temprana, debido a una dieta materna baja en proteínas durante la gestación (Calzada L. et al., 2016). En el estudio se encontró que el número de células beta fue menor en las ratas del grupo restringido en proteínas comparado con el grupo control a edades tempranas (7, 14 y 21 días) (Calzada L. et al., 2016). Se ha propuesto que la disminución de la masa de células  $\beta$  se debe a una reducción en la proliferación celular, acompañada de un aumento de la apoptosis durante el desarrollo, así como de una disminución de la densidad capilar en los islotes pancreáticos (Calzada L. et al., 2016).

### **2.3.1 Insulina**

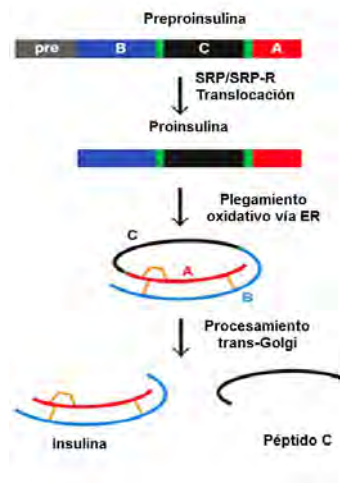
La insulina se sintetiza exclusivamente por las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos. El gen de la insulina codifica para la preproinsulina, una molécula proteica de una sola cadena. Durante la traducción, la secuencia señal de esta hormona inmadura se escinde en el retículo endoplásmico dando lugar a la proinsulina, después esta es transportada al aparato de Golgi, como parte de la ruta secretora. Una vez que la prohormona se encuentra almacenada dentro de los gránulos la parte conocida como péptido C se escinde del precursor dando lugar a la molécula madura de insulina compuesta por dos cadenas peptídicas unidas por enlaces disulfuro (Figura 2).

Una célula  $\beta$  en promedio contiene alrededor de 10,000 gránulos de insulina madura y cada gránulo a su vez es capaz de almacenar 200,000 moléculas de



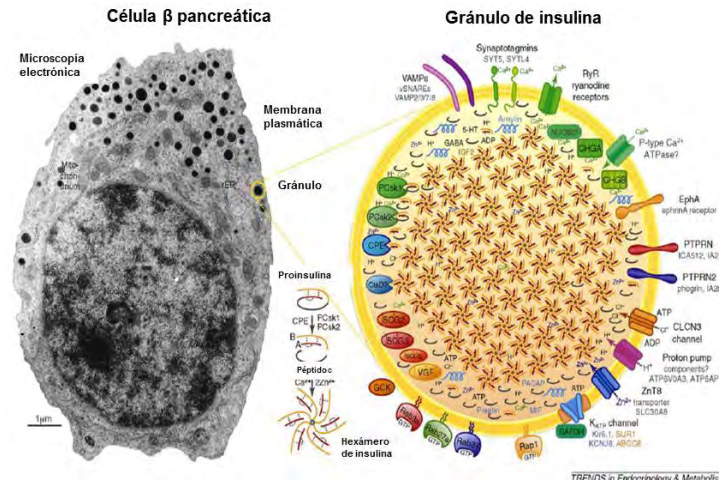
insulina, es decir que cada gránulo contiene aproximadamente unas 2 mil millones de moléculas de insulina, que se estabilizan formando una estructura de seis moléculas de insulina con la participación de iones calcio y zinc (Figura 3). Además de este componente principal, en estos gránulos están presentes otras proteínas tanto en su luz como en el espacio transmembranal, por ejemplo, canales transportadores para iones (calcio, potasio y zinc) que son de vital importancia en la estabilización de la estructura de la insulina como ya se mencionó; receptores de membrana, y algunas proteínas de la familia de las graninas entre otras, y cuya función es vital en el proceso de secreción de la insulina (Suckale J. y Solimena M., 2010).

La síntesis de insulina se controla tanto a nivel de la transcripción como de la traducción, siendo la glucosa el principal estímulo para que se lleve a cabo la expresión del gen de la insulina y regular su tasa de transcripción y traducción (Baumgard L.H. et. al., 2016).



**Figura 2.** Representación esquemática de la biosíntesis de insulina (Weiss M.A., 2009).





**Figura 3.** Célula  $\beta$  pancreática vista en microscopía electrónica y representación esquemática de un gránulo de insulina (Suckale J. y Solimena M., 2010).

La insulina es la señal endocrina primaria para el anabolismo y desempeña un papel crítico en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. La insulina incrementa la captación de glucosa por las células, estimula la glucólisis y promueve la síntesis de glucógeno hepático y muscular. Además estimula la síntesis de triglicéridos en el adipocito y de proteínas en el músculo esquelético; al tiempo que evita simultáneamente su degradación (Baumgard L.H. et al., 2016).

Estudios previos en ratas han demostrado que la restricción de proteínas en la dieta materna durante la gestación y la lactancia, puede dar lugar a la alteración en la respuesta de secreción de insulina estimulada por glucosa. Se ha observado que en islotes pancreáticos obtenidos de crías de ratas de 36 y 450 días de edad, de madres alimentadas con una dieta restringida en proteínas durante estas etapas del desarrollo, fueron incapaces de responder de manera diferente a una concentración basal (5 mM) o estimuladora de glucosa (11 mM). Así mismo se observó que estas ratas, comparadas con las ratas del grupo control, desarrollaron la mayor resistencia a la insulina (Morimoto S. et al., 2012b).



## **2.4 Falla de las células beta y su relación con la diabetes mellitus y la obesidad**

En general, la diabetes tipo 2 se desarrolla cuando las células  $\beta$  fallan en la secreción de cantidades suficientes de insulina para satisfacer la demanda metabólica. Una mayor demanda metabólica de insulina debido a la resistencia a la misma, que en muchos casos se debe a alteraciones de su receptor o en la cadena de señalización de la misma, normalmente precede al desarrollo de la hiperglucemia. Existe un periodo de glucemia normal o casi normal en el que las células  $\beta$  pancreáticas compensan la resistencia a la insulina por la hipersecreción de la insulina. Sin embargo, este periodo de compensación es seguido del agotamiento de las células  $\beta$ , en la que el páncreas no produce suficiente insulina y la diabetes se produce (Kasuga M., 2006).

La adecuada función de las células  $\beta$  pancreáticas requiere de la integridad de las mismas, lo cual es crítico para la demanda metabólica de la insulina. Se ha reportado que en la diabetes tipo 2 existe una disminución del 60% de las células  $\beta$  pancreáticas, paralelamente a la reducción que se observa en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Kasuga M., 2006).

Por otro lado entre el 60% y 90% de los casos de diabetes tipo 2 parecen estar relacionados con la obesidad. La obesidad es un factor de riesgo para la diabetes tipo 2, ya que desensibiliza a los órganos blancos de la acción de la insulina (Cerf M., 2013). La resistencia a la insulina que precede al desarrollo de la hiperglucemia está por lo tanto asociada a la obesidad.

En los últimos 10 años, la incidencia de diabetes tipo 2 se ha incrementado a un ritmo alarmante. Mientras que el estilo de vida y la sobrealimentación han contribuido a su incremento de casos en todo el mundo, el ambiente intrauterino del feto es un factor adicional que influye en la salud a largo plazo. Varios estudios epidemiológicos muestran una correlación directa entre un retardo en el crecimiento intrauterino y la aparición de resistencia a la insulina así como de diabetes tipo 2 en la vida adulta (Dumortier O. et. al., 2014).



Durante la IUGR, tanto en animales como en humanos, ocurre una disrupción funcional en múltiples órganos y tejidos (músculo, tejido adiposo, hígado y páncreas), que también afecta de manera negativa durante la edad adulta (Dumortier O. et. al., 2014). Sin embargo, el páncreas endocrino parece ser afectado más gravemente en las etapas tempranas del desarrollo, lo que sugiere que, en el contexto de las modificaciones intrauterinas, la diabetes tipo 2 podría producirse por defectos en el desarrollo de este órgano (Dumortier O. et. al. 2014).

## **2.5 Regulación de la transcripción de genes**

El proceso mediante el cual se transfiere la información codificada en una de las hebras del DNA a una molécula de RNA se llama transcripción y en las células eucariontes ocurre dentro del núcleo. Este proceso lo media la RNA polimerasa junto con una serie de proteínas llamadas factores de transcripción que se unen a secuencias específicas del DNA, conocidas como promotores. Estas secuencias suelen encontrarse cercanas al sitio de inicio de la transcripción. Entre los más comunes sitios consenso encontramos a la caja TATA, los elementos iniciadores, los elementos de reconocimiento para el factor TFIIB y los elementos promotores río arriba (Recillas F. y Escamilla M., 2004).

Sin embargo, las secuencias regulatorias de la transcripción no siempre se localizan en las proximidades del sitio de inicio de la misma. Existe un segundo grupo de secuencias regulatorias que se encuentran de manera distal a estos sitios promotores por lo cual se conocen como elementos distales de la regulación génica. Entre estas secuencias se encuentran los potenciadores, silenciadores y elementos aisladores; los cuales permiten una regulación de la transcripción de manera coordinada y precisa (Recillas F. y Escamilla M., 2004).

La regulación transcripcional se produce en dos niveles interconectados: la primera consiste en factores de transcripción y la segunda consiste en la cromatina y sus reguladores. Los factores de transcripción se pueden separar en dos clases basadas en sus responsabilidades regulatorias: control del inicio y control de la elongación. Los factores de transcripción se unen típicamente a



cofactores, que son complejos de proteínas que contribuyen a la activación (coactivadores) y a la represión (correpresores) pero no tiene propiedades de unión al DNA por su propia cuenta. Se cree que la mayoría de los factores de transcripción contribuyen con el inicio de la transcripción y lo hace mediante el reclutamiento de coactivadores. (Lee T. y Young R., 2013).

La expresión de genes que codifican proteínas en células eucariontes (también llamados de clase II o estructurales), puede ser regulada en diferentes pasos incluidos: el inicio de la transcripción, la elongación, el procesamiento, el transporte, la traducción y la estabilidad del RNA. Sin embargo la mayor regulación se lleva a cabo en el inicio de la transcripción. En eucariontes, la transcripción de genes codificantes de proteínas se lleva a cabo por la RNA polimerasa II. Los genes transcritos por esta enzima contienen típicamente 2 familias distintas de elementos reguladores de la transcripción que actúan en cis: un promotor (que está compuesto por un núcleo del promotor y elementos reguladores proximales) y elementos reguladores distales, que pueden ser potenciadores, silenciadores, aislantes, o regiones de control del locus (LCR). Estos elementos reguladores de la transcripción contienen sitios de reconocimiento para factores de transcripción de unión al DNA que actúan en trans, los cuales funcionan aumentando o reprimiendo la transcripción (Maston G.A. et al., 2006).

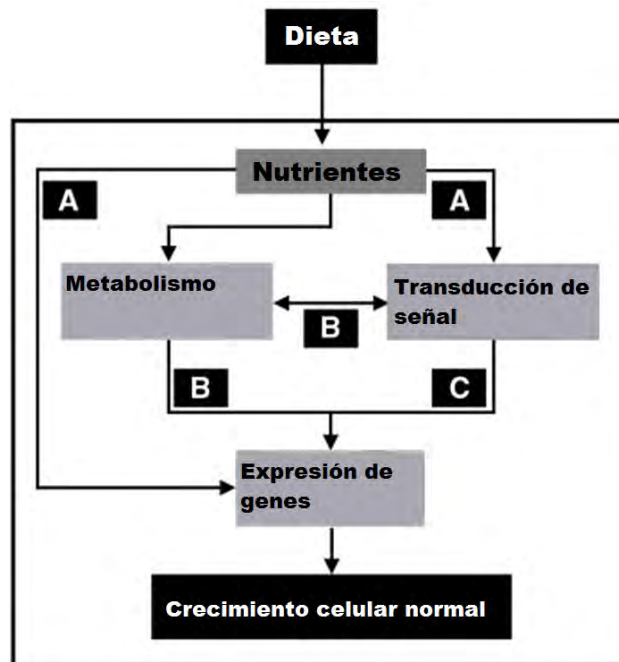
Por otro lado existe un gran número de genes que son transcritos en RNA no codificante (ncRNA) en las células de mamíferos. Actualmente se sabe que el genoma humano contiene más de 20,000 genes que codifican para proteínas y el resto en su mayoría se trata de genes ncRNA. Muchos de los ncRNAs contribuyen al control de la expresión génica mediante la modulación de los procesos transcripcionales o post-transcripcionales (Lee T. y Young R., 2013). Por ejemplo los microRNAs (miRNAs), son los encargados de ajustar los niveles de RNA mensajero. Por otra parte, algunos de los ncRNAs largos (lncRNAs) reclutan a los reguladores de la cromatina a regiones específicas del genoma y por lo tanto modifican la expresión génica (Lee T. y Young R., 2013).



## 2.6 Dieta y expresión génica

Los componentes de la dieta proporcionan los nutrientes y recursos energéticos necesarios para el crecimiento y la reparación de tejidos a lo largo de la vida. En los adultos, el balance energético o la homeostasis, ocurre cuando la ingesta energética es igual al gasto de energía. Este balance es necesario para el mantenimiento de un peso corporal estable (Gangemi J.D. y King D., 2009).

Estudios epidemiológicos muestran la asociación entre la ingesta de alimentos y la incidencia y severidad de las enfermedades crónicas (Kaput J. y Rodriguez R.L., 2004). Los compuestos químicos provenientes de la dieta pueden afectar la expresión génica de manera directa o de manera indirecta, como se muestra en la Figura 4, donde se observa que a nivel celular, los nutrientes que se obtiene a partir de los alimentos de la dieta pueden actuar como ligandos para los receptores de factores de transcripción y activar o reprimir la expresión de un gen específico. Los nutrientes también pueden ser metabolizados por rutas primarias o secundarias, alterando así las concentraciones de los sustratos o productos intermediarios o actuar en vías de señalización celular que permitan una regulación específica de la expresión que afectará directamente el crecimiento celular.



**Figura 4.** Interacción entre los nutrientes de la dieta y la expresión génica. A: Acción directamente por medio de ligandos. B: Los nutrientes pueden ser metabolizados y aumentar o disminuir las concentraciones de sustratos. C: Acción directa sobre las vías de señalización celular (Kaput J. y Rodriguez R.L., 2004).

La progresión desde un fenotipo sano hacia una enfermedad crónica puede deberse a cambios en la expresión de genes o cambios en la actividad de las proteínas y enzimas. Como los compuestos químicos alimenticios son ingeridos y participan directa e indirectamente en la regulación de la expresión génica, se deduce que un subconjunto de genes regulados por la dieta están involucrados en el inicio, progreso y severidad de la enfermedad. El ejemplo más claro de las interacciones genotipo-dieta en la enfermedad crónica, es la diabetes tipo 2, una condición que frecuentemente afecta a individuos sedentarios y obesos. Una vez diagnosticada la enfermedad, algunos individuos pueden controlar la enfermedad mediante el aumento de la actividad física y la reducción de la ingesta de calorías (específicamente grasas). De esta manera la expresión de la información genética cambia al modificar las variables ambientales (dieta y ejercicio) (Kaput J. Rodriguez R.L., 2004).

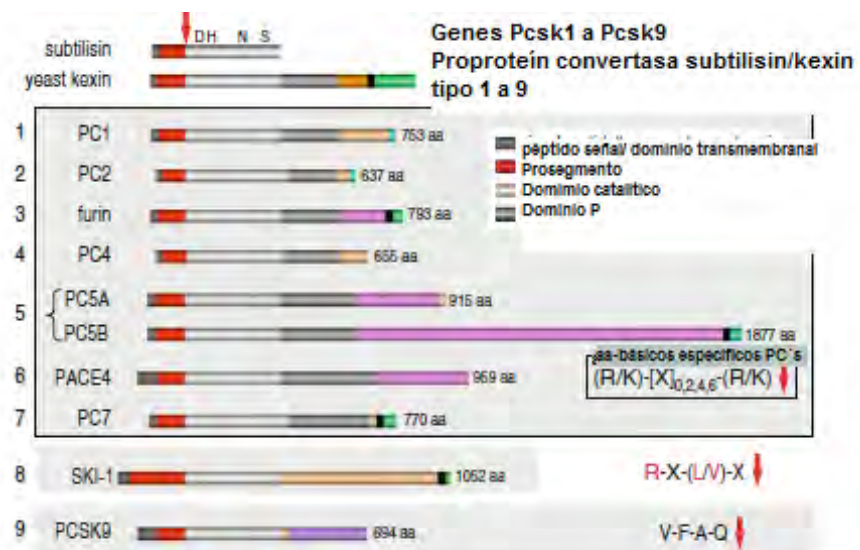


## 2.7 Genes estudiados y su relación con la obesidad y la diabetes

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 corte y procesamiento de la insulina durante la síntesis de esta última en las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos.

### 2.7.1 PCSK1

Las proprotein convertasas (PCs) son una familia de serin-endoproteasas que escinden propéptidos inactivos en péptidos biológicamente activos. La familia de PCs está compuesta por nueve miembros, PC1/3, PC2, furina, PC4, PC5/6, PACE4, PC7, SKI-1/S1P y PCSK9 (Figura 5). Mientras que los primeros siete miembros escinden después de los residuos básicos ya sean de forma individual o en pares, los dos últimos escinden en los residuos no básicos (Seidah N.G., 2011)



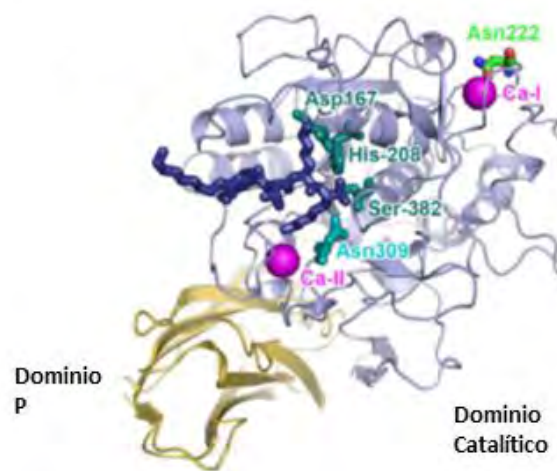
**Figura 5.** La familia de las proprotein convertasas. Se observa la representación de los miembros de esta familia y se ilustra la homología en el dominio del péptido señal, el segmento pro y los dominios catalíticos y P (Seidah N.G., 2011)

Dos miembros de esta familia, Proprotein convertasa subilisina/Kexin tipo 1 y 2 (*PCSK1* Y *PCSK2*) son expresados selectivamente en los tejidos



nuevoendocrinos y se encargan de realizar el corte a un amplio pero específico conjunto de prohormonas incluyendo: proopiomelanocortina (POMC), prohormona liberadora de tirotrópina (proTRH), proinsulina, proglucagón y prohormona liberadora de gonadotropina (proGnRH) (Frank G. et al., 2013).

El gen *PCSK1* se encuentra en el humano en el cromosoma 5q15-21 y está involucrado en la regulación del apetito y en consecuencia en la obesidad, a través de la actividad bioquímica de su proteína, PC1/3; en péptidos claves de la vía leptina-melanocortina (Choquet H. et al., 2013). PC1/3 se sintetiza de forma inactiva como proPC1/3, el cual se convierte rápidamente en PC1/3 por escisión autocatalítica del propéptido en el retículo endoplásmico. Posteriormente se requiere de un segundo corte del propéptido para la activación total de la proteína. Por otro lado, el procesamiento del extremo C-terminal de PC1/3 se realiza en compartimentos post-Golgi, con lo cual se ve afectada la cinética de la enzima y su estabilidad. También se conoce que la enzima tiene dos sitios de unión para calcio, el primero de ellos es necesario para estabilizar la estructura de la proteína mientras que el segundo es necesario para su especificidad (Creemers W. M., et al., 2012).



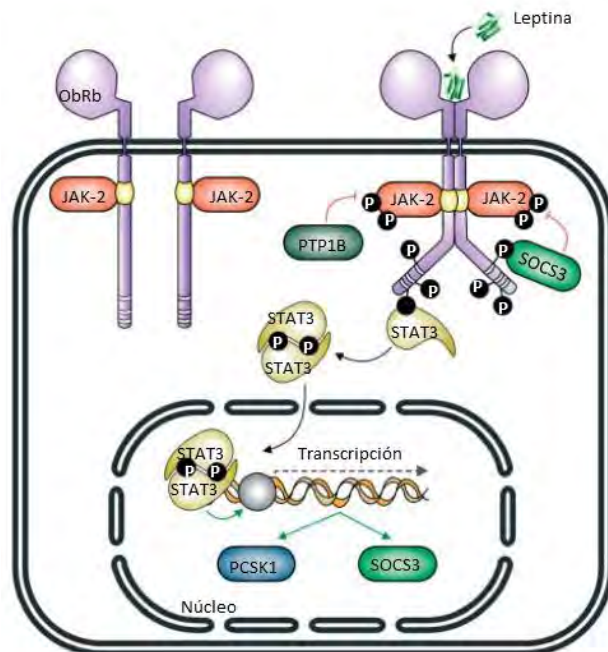
**Figura 6.** Estructura tridimensional de la enzima *PCSK1*. (Stijnen P., et al. 2016)

Se ha establecido que la regulación de la transcripción del gen *PCSK1* está íntimamente relacionada con la hormona leptina, la cual tiene un papel primordial





en la regulación y homeostasis de la glucosa. Los estudios revelan que la unión de la leptina a su receptor (específicamente del tipo ObRb) activa el promotor del gen PCSK1 por medio de la vía de señalización JAK/STAT. Al formarse el complejo hormona receptor las proteínas JAK fosforilan diversos residuos de tirosina en el receptor que a su vez provocan el reclutamiento y fosforilación de las proteínas STAT3, que al dimerizarse son translocados al núcleo en donde actúan regulando la transcripción del gen PCSK1, como se muestra en el esquema de la figura 7 (Marroquí L. et al., 2012). Aunque el mecanismo exacto por el cual actúan las proteínas STAT3 no se conoce, se especula que estas proteínas se unen a elementos del DNA de respuesta a STAT3 localizados en regiones próximas al promotor. Por otra parte, también se han descritos otros reguladores de la transcripción del gen PCSK1 como el factor inhibidor de la leucemia (LIF) y el AMPc, aunque de igual forma se desconocen los mecanismo por los que se lleva a cabo dicha regulación (Sanchez V.C. et al., 2004).



**Figura 7.** Esquema representativo de la vía de señalización JAK/STAT activada por la unión de la leptina a su receptor ObRb y que a su vez activa la transcripción del gen *PCSK1* (Marroquí L. et al., 2012).



Se ha encontrado que variantes raras en el gen *PCSK1* que causan una deficiencia parcial o total de la proteína PC1/3 producen o se relacionan con obesidad extrema. Algunas variantes comunes de *PCSK1* (en particular rs6232 y rs6234-rs6235) han demostrado que contribuyen al riesgo de obesidad en la población europea (Choquet H. et. al., 2013). Además de esto, la deficiencia congénita de *PCSK1* ha sido relacionada a la presencia de hiperproinsulinemia severa, diarrea por mala absorción, hipogonadismo hipogonadotrópico, defectos en los ejes centrales suprarrenales y de tiroides. Por lo tanto, se considera que la expresión del gen *PCSK1* desempeña un papel fundamental en el desarrollo de diversas enfermedades entre ellas la diabetes mellitus y el síndrome metabólico.

Recientemente, un estudio realizado en la población mexicana reportó una asociación significativa entre la variante rs6232 del gen *PCSK1* y la obesidad en 1206 niños; mientras que en 796 personas adultas existe una asociación significativa de la misma variante del gen y la presencia de obesidad grado III (Choquet H. et. al., 2013). Estos estudios proporcionan una visión más amplia de la asociación de las variantes de *PCSK1* y fenotipos relacionados con la obesidad en una población determinada.

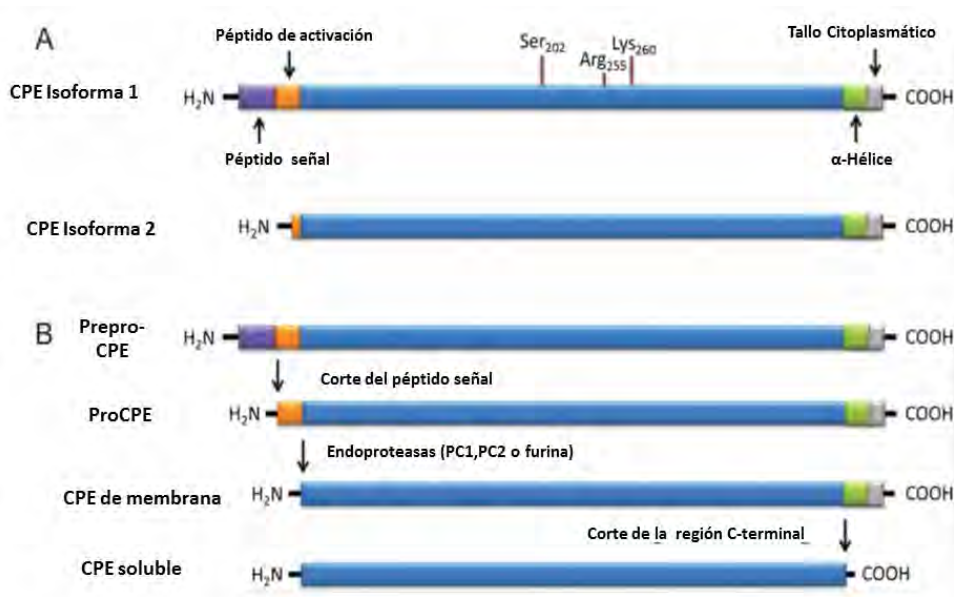
### 2.7.2 CPE

La carboxipeptidasa E (CPE) es un miembro de la familia de los genes de las metalocarboxipeptidasas implicadas en el corte de residuos básicos en pares del extremo C-terminal de los péptidos. El gen *CPE* en el humano se localiza en el cromosoma 4q32 y en la rata se localiza en el cromosoma 16p13, a pesar de ello la secuencia de la enzima CPE es altamente conservada entre estas y otras especies. (Ji L. et al., 2017). Se ha reportado la existencia de dos isoformas de la enzima CPE, la isoforma 1 es la más común y está presente tanto en tejido embrionario como en tejido adulto, en cambio, la isoforma 2 (también conocida como  $\Delta$ N-CPE) sólo se ha detectado en neuronas del tejido embrionario (Figura 8). La enzima se sintetiza como preproCPE la cual contiene el péptido señal y el péptido de activación. Al escindir el péptido señal se forma la proCPE sobre el cual actúan endoproteasas para liberar el péptido de activación y dar lugar a la



enzima activa (Figura 8). La CPE existe tanto en forma soluble en el citosol, como unida en la membrana (Figura 8), esta última funciona como receptor para prohormonas y proneuropéptidos que regulan vías secretoras (Ji L. et al., 2017).

Esta enzima también se conoce con el nombre de carboxipeptidasa H y encefalina convertasa ya que fue inicialmente descubierta y asociada a la producción de encefalina en la médula adrenal y posteriormente se encontró en todos los tejidos neuroendocrinos (Fricker L.D., et al., 1996). La carboxipeptidasa E es una de las enzimas que participan en la biosíntesis y procesamiento de numerosos precursores peptídicos, incluyendo los neuropéptidos y las hormonas que participan en el control del apetito y el metabolismo de la glucosa; por lo cual tiene su mayor actividad en los tejidos endocrinos (Alsters S.I., et al., 2015).



**Figura 8.** Representación esquemática de la enzima carboxipeptidasa E. En la letra A se observan la estructura de las dos isoformas de la enzima. En la letra B se aprecian las estructuras desde la preproCPE hasta la forma soluble de la enzima (Ji L. et al., 2017).

La regulación de la actividad de carboxipeptidasa E se da a diferentes niveles. El primero es debido al pH, ya que a diferencia de otras carboxipeptidasas de la misma familia, esta es activa a un pH ligeramente ácido entre 5.0-5.5 y no al pH neutro (Greene et al., 1992). A nivel del RNAm la regulación de CPE depende del



tejido y tipo celular en el cual se lleva a cabo la transcripción. Otra particularidad que tiene el gen de CPE es que no cuenta con la caja TATA en el promotor. Aunque se ha reportado la presencia de una secuencia similar a la caja TATA (AATA), no se ha demostrado que actúe de la misma manera. En la mayoría de los tejidos de rata se ha encontrado que la transcripción se origina de un solo sitio conocido como sitio principal, aunque en algunos tejidos puede comenzar 101 y 105 nucleótidos río arriba del sitio principal y se les conoce como sitios menores. La región cercana al sitio principal de inicio de la transcripción es suficiente para dirigir la expresión y es estimulada por secuencias que se encuentran río arriba (Jung Y. K y Fricker L.D., 1994).

Otra característica del gen CPE es que la región del extremo 5' 100-150 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción, es una zona rica en guanina y citosina (caja GC) que es reconocida por los factores de transcripción SP1, ETF, AP-2, NF-1 y Pan-1. Es probable que estos elementos contribuyan a la regulación del RNAm de CPE que se observa durante el desarrollo y en diferentes tejidos, aunque aún hacen falta estudios que lo determinen (Jung Y. K. et al., 1991).

La enzima CPE fue descubierta en el año de 1982, pero fue hasta el año de 1995 en el que se identificó que las mutaciones en el gen *CPE* causan el fenotipo *fat/fat* en los ratones. Se sabe que la ausencia funcional de la enzima CPE en ratones conduce a niveles anormalmente bajos de una serie de neuropéptidos y hormonas peptídicas que da lugar a diferentes fenotipos, incluyendo obesidad de inicio tardío, hiperproinsulinemia, infertilidad, ansiedad, degeneración neuronal del hipocampo y déficits de la memoria.

Una de las características observadas en la diabetes mellitus no insulino dependiente es una elevación en los niveles séricos de proinsulina y/o en la relación molar proinsulina/insulina lo cual sugiere que los cambios en la expresión de las enzimas relacionadas con el procesamiento de la proinsulina pueden contribuir al desarrollo de la diabetes (Utsunomiya N. et al., 1998). También se ha identificado que una mutación en el gen de CPE en ratones



conduce al desarrollo de hiperproinsulinemia, obesidad de inicio tardío y diabetes, lo cual sugiere que las mutaciones en el gen de *CPE* pudieran tener un papel fundamental en el desarrollo de la diabetes y obesidad en seres humanos. Por otro lado también se ha observado que en ratones obesos existen niveles circulantes de proinsulina elevados y se ha identificado que este cambio se debe a la mutación Ser202Pro en el gen de *CPE* (Chung W. K., 2012) lo que pone de manifiesto la importancia del correcto funcionamiento de esta enzima en el estado de salud de los individuos.

Estudios de mutaciones del gen *CPE* realizados en humanos en población caucásica europea, sugieren que la presencia de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs), especialmente los casos de individuos heterocigotos con la mutación Arg283Trp, favorece la aparición temprana de diabetes o modifican la gravedad del fenotipo para aquellos individuos que son susceptibles a la enfermedad (Chen H. et al., 2001). Estudios realizados recientemente en humanos, han reportado que la presencia de una mutación homocigota que conlleva a la falta de expresión completa del gen *CPE*, muestra similitudes con los fenotipos observados en los ratones *fat/fat*, relacionándose directamente con la presencia de los fenotipos de obesidad, diabetes, hipogonadismo y discapacidad intelectual (Alsters S.I., et al., 2015).



### **3. Objetivo**

Evaluar el efecto que tiene una dieta materna baja en proteínas durante la gestación, en la expresión de los genes *PCSK1* y *CPE* en las células del páncreas de la progenie en un modelo animal de rata.

### **4. Hipótesis**

Una dieta materna baja en proteínas durante la gestación, provocará una restricción del crecimiento intrauterino (IUGR), dando lugar a una disminución en la expresión de los genes involucrados en el procesamiento de la insulina: *PCSK1* y *CPE*, en el páncreas de la progenie.

### **5. Material y Métodos**

#### **5.1 Dietas**

Se elaboraron dos dietas, una dieta control y de una dieta baja en proteínas, ambas se produjeron en la planta piloto del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (DCyTA) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ). La composición de las dietas se muestra en la Tabla 1.



**Tabla 1.** Composición nutricional de las dietas control y restringida en proteína.

<b>Nutrimento</b>	<b>Dieta control (% p/p)</b>	<b>Dieta restringida (% p/p)</b>
Caseína	20	10
Cistina	0.3	0.15
Colina	0.165	0.165
Mezcla de vitaminas	1	1
Mezcla de minerales	5	5
Celulosa	5	5
Aceite de maíz	5	5
Almidón de maíz	31.76	37.34
Dextrosa	31.76	37.34
Contenido energético	3.85 kcal/g	3.85 kcal/g

## 5.2 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 al cumplir 90 días de edad, las hembras se aparearon con machos de fertilidad comprobada de la misma cepa. El criterio para determinar si estaban preñadas fue realizarles un frotis vaginal, que posteriormente se observó al microscopio, y la presencia de espermatozoides indicaba que las ratas estaban preñadas. Una vez confirmado el estado gestante, se separó a la rata hembra del macho para colocarla en una caja nueva y asignarle la dieta correspondiente: control (C) o restringida (R). Para el caso del grupo control (C) se siguió la misma dieta hasta el final de la lactancia, mientras que para el grupo restringido (R) se hizo un cambio de la dieta restringida a dieta control una vez que inició la lactancia y continuó hasta el final de esta. En ambos grupos una vez terminada la lactancia se continuó alimentando a las crías con



dieta control del bioterio hasta que cumplieron 36 días, momento en el cual se procedió a realizar la extracción de los islotes pancreáticos sólo de las crías macho.

### **5.3 Aislamiento de islotes pancreáticos**

Se realizó la eutanasia de los animales mediante decapitación rápida con guillotina. La sangre se recolectó en tubos falcon de 15 mL con ayuda de un embudo, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Al finalizar, con ayuda de una pipeta Pasteur, se separó el suero del coágulo y se traspasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la posterior determinación de glucosa, insulina y péptido C. La rata se colocó boca arriba y se limpió con alcohol. Se cortó la piel en el centro del vientre y posteriormente el músculo de la misma manera, realizando un corte diagonal de ambos lados hasta las costillas. Se llevó el músculo hacia atrás para poder cortar el esternón. Con pinzas de hemostasia se bloqueó el conducto de Wirsung para poder realizar un corte en la ampula de váter. Se procedió a canular. El páncreas se insufló con 8 mL de una solución salina de Hank's con colagenasa a una concentración de 0.15 g/mL. Después se retiró el páncreas cortando con microtijeras, colocándolo en un vaso de precipitados de 50 mL. Se colocó el vaso en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  y a 36 rpm durante 11 minutos. El vaso se sacó del baño y se procedió a picar el páncreas con tijeras hasta obtener trozos pequeños (2-3 mm) y de tamaño homogéneo. Con el fin de promover la separación de los islotes pancreáticos del tejido acinar, el páncreas se transfirió a un tubo falcon de 50 ml y se realizó un primer lavado con Hank's frío hasta completar un volumen de 30 mL. El tubo se agitó en vortex de manera horizontal durante 1 minuto y se colocó en baño de hielo durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y nuevamente se adicionó Hank's frío hasta un volumen de 30 mL, se agitó manualmente durante 30 segundos y se volvió a colocar en baño de hielo por 10 minutos. Se decantó nuevamente el sobrenadante, se adicionó Hank's frío hasta un volumen de 30 mL, se agitó manualmente durante 30 segundos y se volvió a colocar en hielo por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante, y los islotes se vaciaron en una caja negra para





recolectarlos con una micropipeta de 100  $\mu$ L, bajo un microscopio estereoscópico, colocándolos en otra caja Petri negra. Finalmente los islotes se colectaron en un tubo eppendorf, y por cada 250-300 islotes, se adicionó 400  $\mu$ L de *QIAzol Lysis reagent* para después almacenarlos a -70 °C.

#### 5.4 Extracción de RNA

Se utilizó el mini kit *RNeasy lipid tissue de Qiagen*, el cual es un kit optimizado para tejidos con alto contenido lipídico. La lisis de las células se basa en una combinación de fenol/guanidina seguida del aislamiento del RNA total con un alto rendimiento sin transferencia de fenol. 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 con el fin de promover la ruptura celular. Se incubó la muestra a temperatura ambiente por 5 minutos para después adicionar 200  $\mu$ L 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 minutos a 4 °C. Luego se transfirió la parte acuosa a un tubo nuevo y se adicionó el mismo volumen de etanol al 70% y se agitó en vortex. Se transfirió la muestra a un tubo de 2 mL con una columna para su purificación y se centrifugó por 15 segundos a 10000 rpm, descartando los residuos.

Se adicionaron 700  $\mu$ L 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  $\mu$ L de buffer RPE (*RNeasy lipid tissue kit, Qiagen*), centrifugándose a 10000 rpm por 2 minutos. Se colocó la columna en un tubo nuevo de 1.5 mL, se adicionaron de 30-50  $\mu$ L de agua libre de RNAsas, y se pasó a la centrifuga por un minuto a 1000 rpm.

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



## 5.5 RT-PCR en tiempo real

La síntesis del DNA complementario se llevó a cabo mediante la reacción de la transcriptasa reversa utilizando el kit de Roche “*Transcriptor first strand cDNA synthesis kit*” siguiendo las especificaciones del fabricante. De cada muestra de RNA se calculó la cantidad necesaria para obtener 250 ng de RNA total de cada muestra. Las condiciones para llevar a cabo la retotranscripción son las siguientes: 65 °C por 10 min para la alineación de los oligonucleótidos al RNA, 55 °C por 10 min para adicionar la enzima transcriptasa reversa a todas las muestras, 55 °C por 30 minutos para la síntesis del cDNA y finalmente se mantiene la temperatura 4 °C para el enfriamiento y conservación de la muestra de cDNA.

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 Taq polimerasa y desnaturalización del DNA fueron a 95 °C durante 10 minutos, 45 ciclos de amplificación (95 °C, 10 s; 60 °C 30 s; y 72 °C 1s).

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>). El diseño y los sitios de unión de los oligonucleótidos y de las sondas se muestran en el apéndice 1. 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 PCSK1, CPE y  $\beta$ -actina

Gen	Oligonucleótido sentido (5'-3')	Oligonucleótido antisentido (3'-5')	No. de sonda	Tamaño del amplicón
<b>PCSK1</b>	GGAGAGGAGTGGAAAAGATGG	GATTGCCATTCAGGCTGTTT	25	69 nt
<b>CPE</b>	GGCTGTCATTCAGTGGATCAT	GAGGTCTCCTCCGTGCAG	53	67 nt
<b><math>\beta</math>-actina</b>	CCCGCGAGTACAACCTTCT	CGTCATCCATGGCGAACT	17	72 nt

El uso de las sondas específicas para cada gen permiten la detección por medio de fluorescencia ya que estas tienen unidas un fluoróforo junto con un desactivador de fluorescencia, y una vez que se ha dado la amplificación, gracias a la actividad de la Taq polimerasa la sonda se escinde y el desactivador deja de tener acción sobre el fluoróforo por lo que este emite la fluorescencia que es detectada.

## 5.6 Determinación de insulina

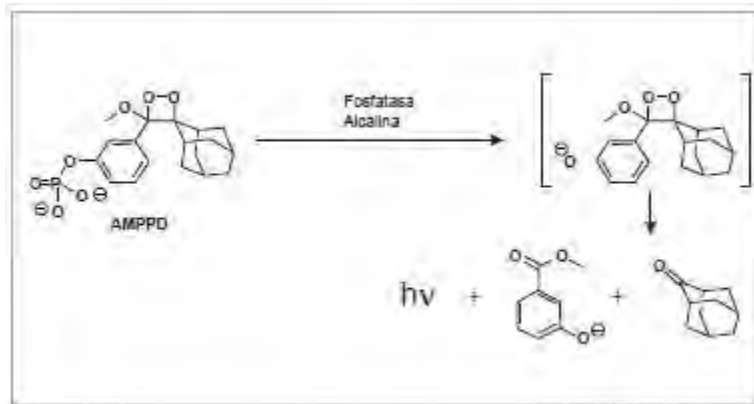
Las concentraciones de insulina en suero, se determinaron por un método radioinmunométrico utilizando el kit *rInsulin [<sup>125</sup>I] IRMA kit* y siguiendo las especificaciones del fabricante. Este ensayo usa dos anticuerpos monoclonales anti-insulina; uno de ellos está adsorbido en las paredes del tubo y marcado con biotina (anticuerpo de captura) y el otro anticuerpo está marcado con I<sup>125</sup>. Las muestras se incuban con el anticuerpo de captura formándose el complejo antígeno-anticuerpo. En la segunda etapa del ensayo se añade el anticuerpo monoclonal marcado radiactivamente (anticuerpo señal) y este se une a otro epítipo de la molécula de insulina, formando el complejo anticuerpo de captura-antígeno-anticuerpo señal. Se lava y elimina el anticuerpo no unido y se mide la reactividad por medio de un contador gamma. La concentración de insulina es directamente proporcional a la reactividad medida en los tubos. (Vezzosi D., et al., 2003). Para conocer dicho valor fue necesario la construcción de la curva patrón



utilizando una serie de estándares con concentraciones conocidas de insulina de rata (ver apéndice 2).

### **5.7 Determinación de péptido C**

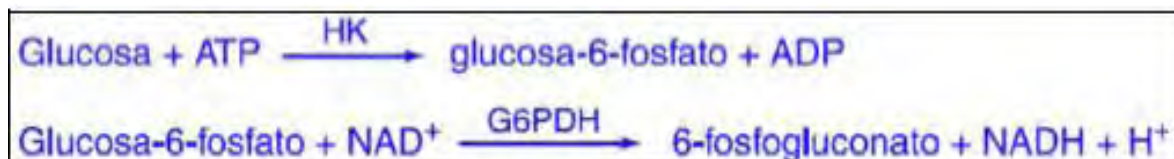
La determinación de péptido C en el suero de los sujetos experimentales, se realizó por medio del equipo IMMULITE 1000 de Siemens, basado en el principio de la inmunoquimioluminiscencia. El principio de la prueba es similar al ya mencionado en la determinación de insulina, sin embargo en este caso; se utilizan anticuerpos específicos para péptido C unidos a una fase sólida (perlas magnéticas). Las muestras (de un volumen de 50  $\mu$ L) se incuban con anticuerpo, se lava y se eliminan los péptidos no unidos. Posteriormente las muestras se incuban con otro anticuerpo que a su vez está unido a la enzima fosfatasa alcalina, se vuelve a lavar y eliminar los componentes no unidos. La cantidad del péptido unido se cuantifica utilizando el sustrato de dioxetano AMPPD (3-(2'-spiroadamantyl)-4-metoxi-4-(3"-fosforiloxi)-fenyl-1,2-dioxetano) que al desfosforilarse por acción de la fosfatasa alcalina produce la reacción luminosa (la reacción se muestra en la figura 9). La cantidad de luz que emite la muestra es proporcional a la cantidad de péptido C presente en la muestra (Bronstein I. et al. 1989). Esta emisión de luz es detectada por el tubo fotomultiplicador y la concentración se calcula para cada muestra de acuerdo con el uso de dos calibradores, uno bajo (0.5 ng/mL) y uno alto (7 ng/mL) obteniéndose la cuentas por segundo (CPS) de cada uno. La sensibilidad analítica del ensayo es de 0.3 ng/mL.



**Figura 9.** Esquema de la reacción quimioluminiscente de la molécula de AMPPD catalizada por la fosfatasa alcalina.

### 5.8 Determinación de glucosa en suero

En el caso de la determinación de la glucosa en suero se llevó a cabo por medio de la reacción de la hexoquinasa (con el apoyo del personal del laboratorio de Endocrinología del INCMNSZ). Se utilizó un sistema automatizado que dispensa en forma automática los volúmenes de muestra y reactivo. Durante la corrida en el sistema de análisis, la hexoquinasa cataliza la transferencia de un grupo fosfato a partir del ATP a la glucosa formándose ADP y glucosa-6-fosfato. Posteriormente la glucosa-6-fosfato se oxida a 6-fosfogluconolactona con la reducción concomitante de NAD a NADH por la acción catalítica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Neeley W.E., 1972) (Figura 10). El NADH se cuantifica por su absorción espectrofotométrica a 340 nm. El aumento de la concentración de NADH en el medio es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra analizada.



**Figura 10.** Reacciones químicas que suceden en el método de cuantificación de la glucosa sérica.

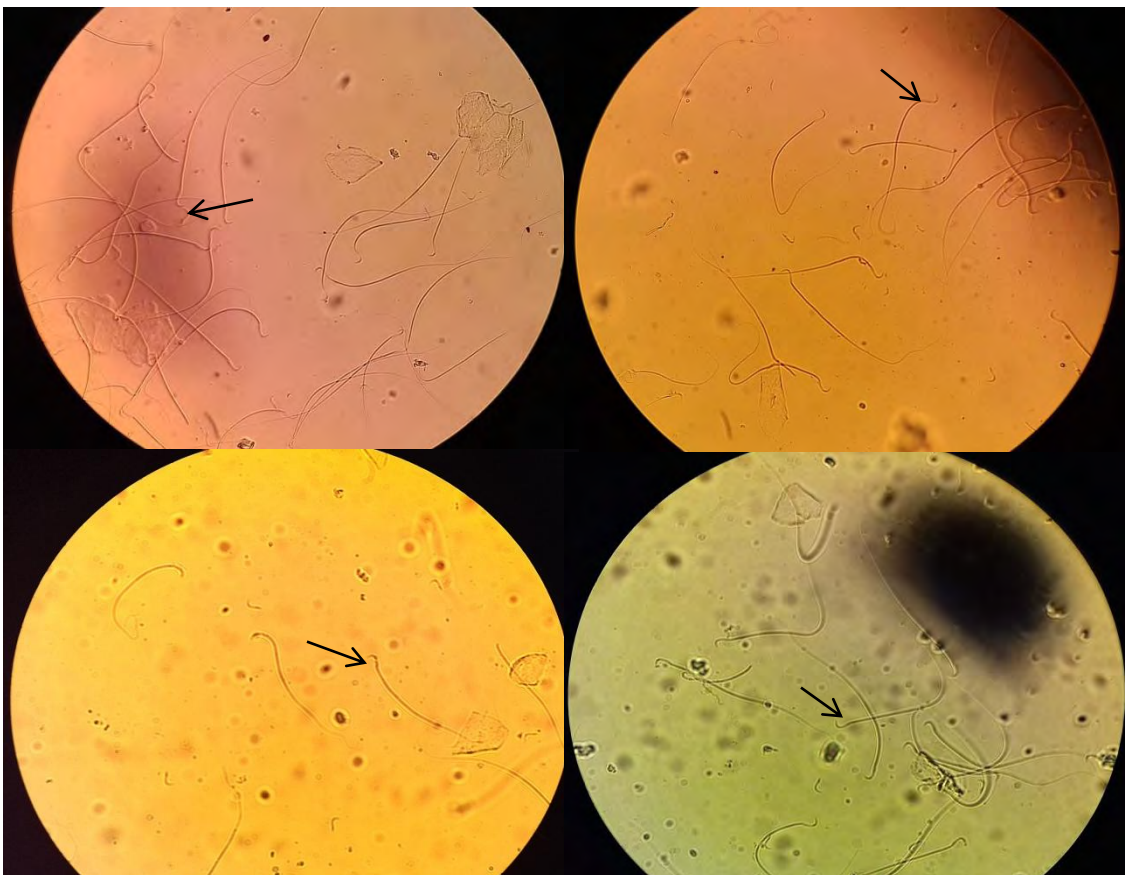


## 5.9 Análisis estadístico

Se utilizó el programa Sigma Plot versión 11.0. Para determinar la diferencia entre las medias se utilizó la prueba t de student. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativo.

## 6. Resultados y Análisis

Para llevar a cabo el estudio se aparearon 30 ratas hembras de la cepa Wistar. Para determinar que la hembra se encontraba preñada se realizó un frotis vaginal, y si se hallaban espermatozoides en este se consideró a la rata como gestante. Los espermatozoides de rata tienen una forma característica, son alargados y poseen una cabeza en forma de gancho. Las siguientes imágenes se obtuvieron de los frotis de las ratas gestantes.



**Figura 11.** Frotis vaginal positivo (se señala con una flecha la presencia de espermatozoides) de cuatro ratas diferentes, visto con microscopio óptico. Tinción con lugol 10X.



Al finalizar los apareamientos se obtuvieron 20 ratas gestantes las cuales se dividieron en dos grupos experimentales: Control (C) y Restringido (R) como se observa en la tabla 3.

**Tabla 3.** Grupos experimentales.

<b>Grupo control</b>	M3	M4	M7	M8	M10	M17	M19	M20	M25	M30
<b>Grupo restringido</b>	M6	M12	M14	M16	M18	M23	M24	M26	M27	M28

De cada madre (M) se sacrificaron entre 3 o 4 crías macho para el aislamiento de los islotes y posteriormente se seleccionaron aquellos en los cuales el número de islotes era mayor, para llevar a cabo la extracción RNA como se muestra en la tabla 4. Uno de los parámetros que permite determinar si la muestra de RNA se encuentra contaminada con otros componentes es la relación de absorbancia 260/280, la cual debe estar por encima de 1.9 para considerar que la muestra de RNA no está contaminada. Por esta razón se descartó la muestra M24C debido a su baja relación A260/280.

**Tabla 4.** Concentraciones de RNA obtenido a partir de las muestra de islotes de crías de ratas alimentadas con dieta control (C) y dieta restringida (R) en proteínas.

<b>Muestra</b>	<b>[RNA] µg/mL</b>	<b>A260/280</b>
<b>M4R</b>	1454.55	2.0285
<b>M7R</b>	746.4	2.0195
<b>M10R</b>	977.9	2.0145
<b>M8R</b>	562.05	2.0340
<b>M17R</b>	348.15	1.9905
<b>M25R</b>	288.3	1.9905
<b>M6C</b>	206.75	1.9665
<b>M12C</b>	294.2	1.9375
<b>M18C</b>	317.2	1.9630
<b>M23C</b>	300.1	1.9680
<b>M24C</b>	2372.2	1.6800
<b>M26C</b>	372.55	1.9855



Por otro lado, antes de realizar la eutanasia de las crías, estas se pesaron con el fin de determinar si se tiene un efecto en el peso de las mismas debido a la presencia del fenómeno de IUGR que se presenta por la deficiencia proteica en la dieta materna. En la figura 12 se observa que no hubo cambios significativos en el peso corporal a los 36 días de edad, entre los dos grupos experimentales. Se observa que el peso se mantuvo constante (alrededor de los 130 g), tanto en el grupo control como el restringido, a pesar del efecto de la dieta materna baja en proteína.

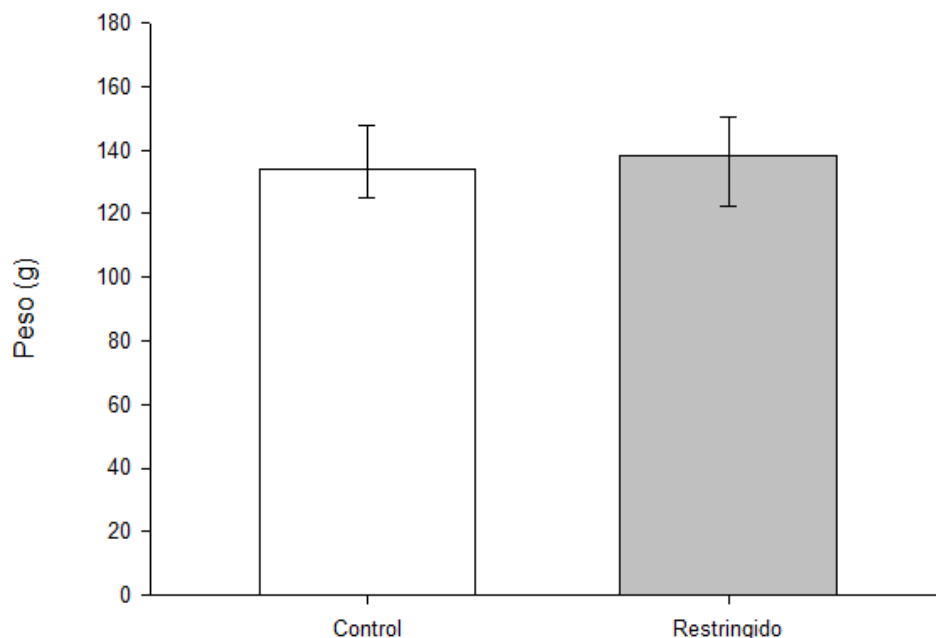


Figura 12. Peso corporal a los 36 días de edad de las crías de rata macho Control: crías provenientes de madres alimentadas con dieta control durante la gestación. Restringido: crías provenientes de madres alimentadas con dieta baja en proteínas durante la gestación. Los resultados representan la media  $\pm$  EE. n=58.

Para realizar el análisis de la expresión de los genes es necesario convertir el RNA en DNA de cadena sencilla, a esto se le conoce como síntesis de DNA complementario (cDNA) para lo cual se utiliza la enzima transcriptasa reversa, la cual tiene actividad de DNA polimerasa directamente sobre el RNA. Una vez sintetizado el cDNA se realizó el estudio de la expresión de los genes *PCSK1* y *CPE* por medio de la PCR en tiempo real, normalizando la expresión de estos





genes por medio del método de doble delta CT y utilizando como gen constitutivo a la  $\beta$ -actina.

En la figura 13 se observa la expresión del gen *PCSK1* tanto en el grupo control como en el grupo restringido. Se observa una tendencia a la disminución de la expresión de este gen en el grupo restringido sin embargo, esta disminución no es estadísticamente significativa con respecto al grupo control.

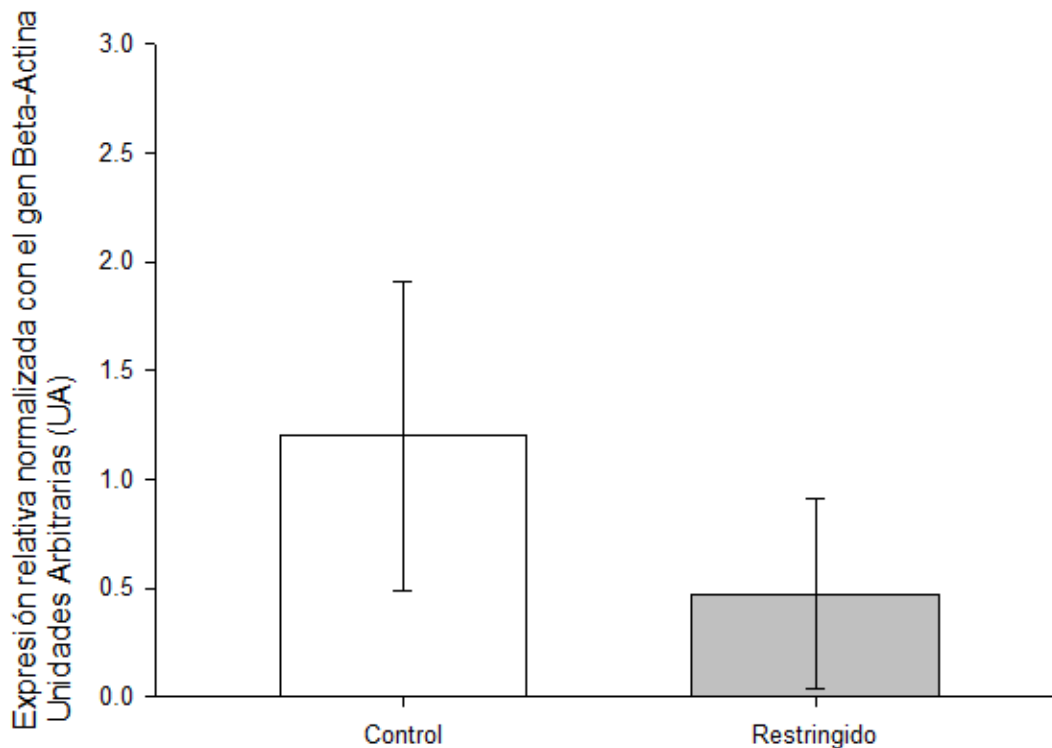


Figura 13. Expresión relativa del gen *PCSK1* con respecto al gen  $\beta$ -actina en islotes pancreáticos de ratas macho. Control: crías provenientes de madres alimentadas con dieta control. Restringido: crías provenientes de madres alimentadas con dieta baja en proteínas. Los resultados representan la media  $\pm$  EE. n=5 experimentos independientes

En la figura 14, se observa la expresión del gen *CPE* en los islotes pancreáticos de crías de ratas alimentadas con dieta baja en proteínas. Aquí se puede apreciar que existe una disminución cercana al 90 %, estadísticamente significativa en la expresión de este gen, debido al efecto de la disminución en la disponibilidad de proteínas de la dieta materna, durante la gestación.

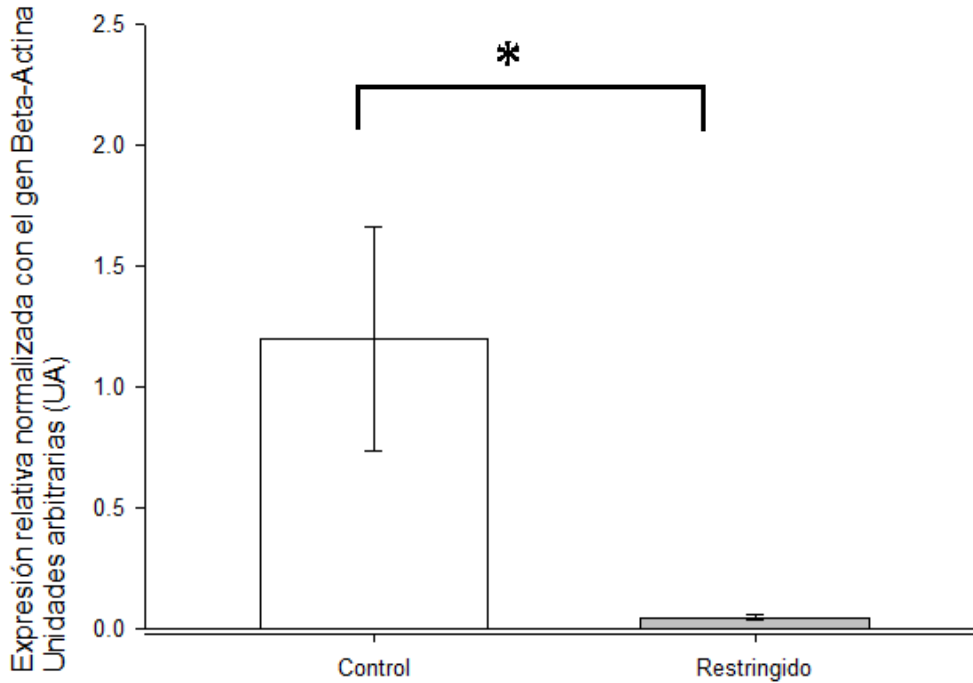


Figura 14. Expresión relativa del gen *CPE* con respecto al gen  $\beta$ -actina en islotes pancreáticos de ratas macho de 36 días de edad. Control: crías provenientes de madres alimentadas con dieta control durante la gestación. Restringido: crías provenientes de madres alimentadas con dieta baja en proteínas durante la gestación. Los resultados representan la media  $\pm$  EE. n=5 experimentos independientes \*p<0.05

Con el fin de analizar el efecto que tuvo la disminución del gen *CPE* se estudiaron los niveles de glucosa, insulina y péptido C en el suero de los crías de rata de ambos grupos. En la figura 15 se observa que los niveles de glucosa sanguínea no varían en el grupo restringido con respecto al grupo control. En el caso de la insulina circulante (figura 16) se observa un comportamiento similar ya que no existen cambios en la concentración de insulina en ambos grupos. Para el caso del péptido C en todas las muestras se obtuvo un resultado menor a 0.1 ng/mL, es decir que se encuentran por debajo de la concentración más baja detectable por el aparato y por lo tanto no se obtuvieron datos que se pudieran graficar. De esta forma se observó que la disminución de la expresión del gen *CPE* no provocó un cambio perceptible en dichos parámetros metabólicos.

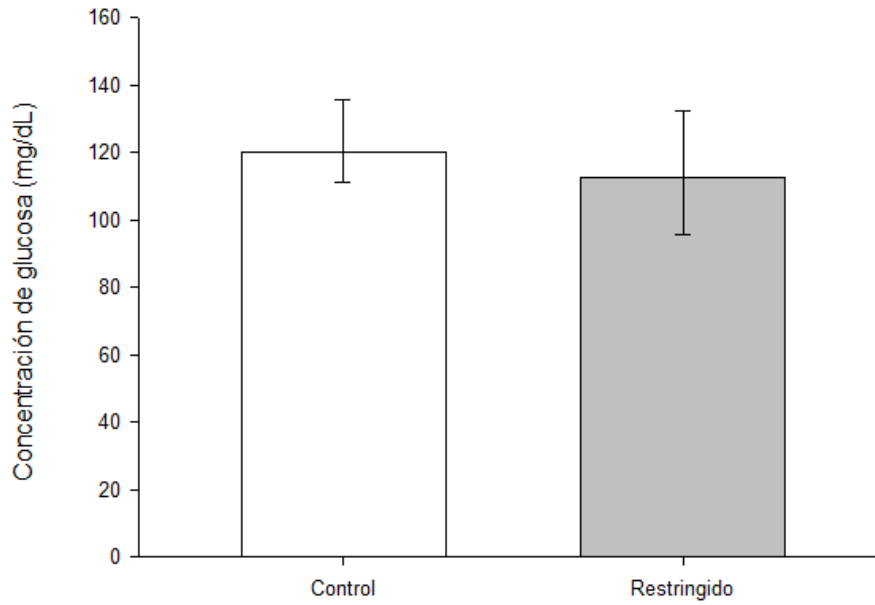


Figura 15. Concentración de glucosa en suero de crías de rata macho de 36 días de edad. Control: crías provenientes de madres alimentadas con dieta control durante la gestación. Restringido: crías provenientes de madres alimentadas con dieta baja en proteínas durante la gestación. Los resultados representan la media  $\pm$  EE. n=34.

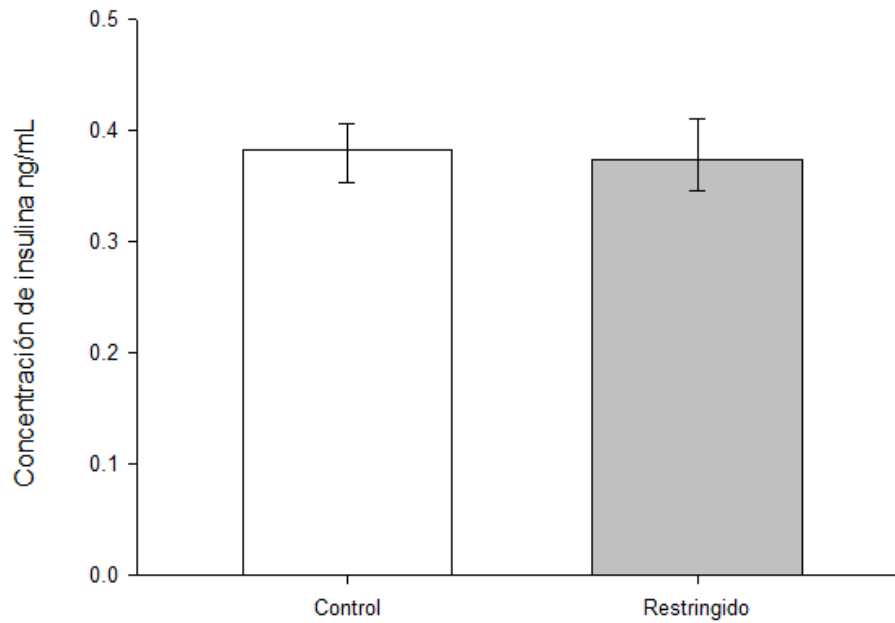


Figura 16. Concentración de insulina en suero de crías de rata macho de 36 días de edad. Control: crías provenientes de madres alimentadas con dieta control durante la gestación. Restringido: crías provenientes de madres alimentadas con dieta baja en proteínas durante la gestación. Los resultados representan la media  $\pm$  EE. n=34.



## 7. Discusión

Diversos estudios han demostrado que cualquier perturbación nutricional intrauterina tiene un profundo efecto durante el desarrollo del páncreas endocrino de la descendencia. Actualmente existe una gran evidencia de estudios en animales que indican la existencia de alteraciones estructurales en las células  $\beta$  causadas por un desarrollo nutricional no óptimo durante la vida temprana que puede contribuir al desarrollo de la intolerancia a la glucosa y del incremento de la susceptibilidad a desarrollar diabetes tipo 2 (Rodríguez-Trejo et al., 2012). En el presente trabajo se utilizó el modelo de restricción proteica durante la gestación para determinar el efecto que tiene en la progenie.

Uno de los efectos deletéreos mayormente reportados en la literatura es la aparición del fenómeno de IUGR debido a la desnutrición materna, el cual se manifiesta principalmente con un bajo peso al nacer y representa un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades durante la vida adulta (Molina G.S. et al. 2014). En el presente trabajo se analizó el efecto de la dieta materna baja en proteínas, en el peso corporal de la progenie sin encontrarse cambios entre los dos grupos estudiados a la edad de 36 días. Aunque esto es consistente con estudios previos reportados por Morimoto, los cuales sólo reportaron una disminución del peso cuando la restricción proteínica tiene lugar durante el periodo de la lactancia, se observa que los pesos en ambos grupos son ligeramente mayor es mayor de lo que ellos reportan para esta edad (entre 60 y 90 g) (Morimoto S. et al. 2012a). Por otro lado se ha observado que debido a la presencia de una dieta hipercalórica o abundante durante el crecimiento, se presenta el fenómeno conocido como fenotipo ahorrador provocando alteraciones en la homeostasis de la glucosa, con incremento del consumo de calorías, acumulación de grasas y la reducción en la producción de energía. Este exceso de calorías disponibles aumenta el riesgo de obesidad y otras condiciones relacionadas con el síndrome metabólico en la etapa adulta (Molina G.S. et al. 2014). Por esta razón sería importante determinar el efecto de la dieta materna hipoproteica durante la edad



adulta (110 días de edad) y no sólo a una edad temprana del desarrollo en el cual el efecto dañino aún no es notorio.

Por otro lado existen puntos de regulación en la biosíntesis de la insulina específicamente sobre las enzimas involucradas en el procesamiento de la insulina: PC1/3 y CPE. Estas enzimas tienen un papel fundamental en la correcta síntesis de la insulina, ya que se encargan de escindir el péptido C, dando lugar a la insulina madura. Aunque la insulina consiste en un péptido de 55 aminoácidos, ésta es codificada por un gen que da lugar a un precursor peptídico con 110 aminoácidos conocido como preproinsulina. Al igual que otras proteínas secretadas, la preproinsulina contiene un péptido señal hidrofóbico en el extremo N-terminal, el cual interacciona con la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) en el citosol y es transportada a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso hasta el lumen en donde se realiza el corte del péptido señal y posteriormente el plegamiento de lo que ahora es la proinsulina junto con la formación de los puentes disulfuro. Una vez que se tiene la conformación terciaria de la proinsulina, es transportada del retículo endoplásmico al aparato de Golgi donde entra en vesículas secretoras inmaduras (Fu Z. et al., 2013). En este punto es donde las enzimas PC1/3 y CPE actúan de manera conjunta, primero, la secuencia de la proinsulina cadena B-Arg-Arg- péptido C- Lys-Arg- cadena A, es cortada endoproteolíticamente en pares dibásicos por las prohormonas convertasas PC1/3 y PC2. Después los aminoácidos básicos del extremo carboxílico son removidos exoproteolíticamente por la carboxipeptidasa E (Nishigori T. et al., 1996) De esta manera se da la formación de una molécula madura de insulina y como consecuencia del péptido C.

Se ha observado que alteraciones en los genes descritos anteriormente conllevan a una disminución en la expresión de sus respectivas enzimas, dando lugar a una serie de problemas metabólicos, como la obesidad, hiperproinsulinemia y diabetes (Jackson R.S. et al., 1997). Por ejemplo estudios realizados en humanos por Jackson reportan que mutaciones en el gen *PCSK1* que provocan el cambio de los aminoácidos Gli-Arg<sup>483</sup>, impiden el procesamiento de proPC1/3 conllevando a



una retención de la enzima dentro del retículo endoplásmico e impidiendo que esta pueda llevar a cabo su actividad de endoproteasa, provocando los fenotipos que se han mencionado como obesidad temprana, alteraciones de la homeostasis de la glucosa, hipogonadismo hipogonadotrópico, hipocortisolismo y niveles plasmáticos elevados de proinsulina (Jackson R.S. et al., 1997). Por otro lado, diversos estudios han demostrado que las mutaciones homocigotas del gen *CPE* provocan los fenotipos de obesidad e infertilidad; además se ha observado que ciertas variantes del gen en humanos dan lugar a la aparición temprana de diabetes tipo 2 (Plum L. et al., 2009).

Los estudios realizados en humanos han demostrado que la disminución de la actividad de la enzima PC1/3 codificada por el gen *PCSK1* está estrechamente relacionada con fenotipos vinculados con enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus y obesidad mórbida. (Stijnen P. et al., 2015) Sin embargo actualmente no existen estudios sobre la influencia de la desnutrición materna sobre la expresión de este gen. En este estudio se observó una tendencia a la disminución de este gen, sin embargo este cambio no fue significativo, lo cual indica que la expresión se mantiene a pesar del entorno adverso que se tiene en útero durante la gestación. A pesar de esto sería necesario establecer un estudio durante la edad adulta y observar si esta tendencia a la disminución de la expresión se mantiene o se vuelve significativa.

En cuanto al gen *CPE* se observó una disminución significativa en su expresión en las crías, debido al efecto de la dieta baja en proteína durante la gestación. Esta disminución de la expresión podría estar asociada a su vez a una disminución en la actividad de la enzima correspondiente, y aunque en el presente trabajo no se determinó la cantidad de la proteína, podría esperarse que el comportamiento sea similar ya que estudios previos realizados por Yi Chu , han demostrado que las mutaciones que provocan una nula expresión de *CPE* provocan una severa proinsulinemia resultado de un incremento del estrés oxidante y la apoptosis en las células  $\beta$  (Yi Chu K. et al., 2011). A su vez estudios realizados por Jeffrey relacionan el incremento del estrés oxidante con un aumento de los ácidos grasos



circulantes, en específico el ácido palmítico, el cual provoca por sí mismo una rápida degradación de la enzima CPE (Jeffrey K.D. et al., 2008). Aunado a esto estudios realizados por Calzada L y colaboradores confirman los efectos deletéreos de la deficiencia de proteínas en la masa celular debido a un aumento de la apoptosis durante el desarrollo, así como una disminución de la densidad capilar dentro de los islotes (Calzada L. et al. 2016). Todo esto podría dar como resultado la alteración en la completa expresión del gen CPE dentro de las células beta, lo cual a su vez se esperaría que provoque una disminución en los niveles de insulina debido a la deficiencia de la actividad de dicha enzima. Sin embargo, de acuerdo a lo observado en este estudio los niveles de insulina en el grupo restringido no cambian con respecto al grupo control. Se pueden sugerir dos mecanismos que podrían explicar este fenómeno, el primero es considerar que existe una regulación post-transcripcional que permite mantener los niveles de la proteína sin alterar a pesar de la disminución en la expresión del gen. Por otro lado, también se piensa que otras carboxipeptidasas de la misma familia pueden suplir la función de esta exoproteasa. Aunque se ha sugerido que la carboxipeptidasa D pudiera cumplir esta función no se ha encontrado evidencia significativa de que pueda actuar como enzima redundante para CPE en las células  $\beta$  del páncreas (Yi Chu K. et al., 2011).

Se ha establecido que el deterioro de la homeostasis de la glucosa en la madre tiene efectos claramente definidos en el desarrollo de la progenie, especialmente en el páncreas. Aunque numerosos estudios han demostrado que la desnutrición provoca una disminución en la respuesta de las células  $\beta$  a los estímulos fisiológicos, en el presente trabajo se observó que los valores de glucosa en cada caso se encuentran cercanos al valor de 140 mg/dL reportado en ratas sanas de 3-4 semanas de edad (Vuguin P. et al., 2001). En tanto, los niveles de insulina se encuentran por debajo de 1.5 ng/mL, valor reportado en ratas de 3 meses de edad (Muzumdar R. et al., 2004). Esto puede explicarse debido a la existencia de mecanismos compensatorios desarrollados por el páncreas con el fin de mantener las condiciones fisiológicas. De hecho de Oliveira y colaboradores observaron que en las ratas provenientes de madres alimentadas con una dieta baja en proteínas,



se tenía una mayor cantidad de islotes así como islotes de mayor tamaño, esto como resultado de un mecanismo compensatorio del páncreas para mantener su capacidad secretora de insulina (de Oliveira J.C et al., 2016). Sin embargo, tomando en cuenta que en el presente estudio se analizó el efecto de la desnutrición materna en crías de 36 días de edad, es decir en sujetos de estudio que aún son jóvenes, es posible que estos animales desarrollen durante la edad adulta una hiperglicemia por consecuencia de la falla de las células  $\beta$  pancreáticas debido a dichos mecanismos de compensación, lo que finalmente conducirá al desarrollo de las diabetes mellitus tipo 2.

Por otro lado los estudios realizados por Portha B. y colaboradores, indican que una reducción del 50% de la ingesta durante las primeras dos semanas de la gestación no ejerce un efecto adverso en la secreción de insulina en la progenie masculina (Portha B, et al., 1995). En dicho trabajo se estudió la influencia de la desnutrición materna durante las 3 semanas de gestación, sin encontrar cambios significativos en la secreción de la insulina. Esto podría indicar que no existió una afectación al páncreas fetal durante la etapa crítica del desarrollo del páncreas, es decir, la última semana de la gestación, probablemente debida al efecto compensatorio, ya que es durante este lapso cuando se da la citodiferenciación del páncreas endocrino de la rata (Alvarez C. et al., 1997) y en la cual se aprecian los efectos deletéreos en este órgano debido a la desnutrición materna.

Por lo tanto se establece que el efecto de la dieta baja en proteínas en crías macho se da en mayor grado cuando la deficiencia proteínica no está presente durante un lapso largo de la gestación (Portha B, et al., 1995), lo cual también podría estar contribuyendo a la falta de impacto en los niveles de insulina y glucosa observados en este estudio. En este contexto sería útil caracterizar el efecto que tiene la desnutrición materna en las células  $\beta$  del páncreas del feto, según el tiempo de gestación, es decir, determinar el efecto de la desnutrición materna selectivamente aplicada durante el primer, segundo y tercer trimestre de la gestación.





## 8. Conclusiones

Una dieta materna baja en proteínas no provocó cambios en los niveles de la expresión del gen *PCSK1* en islotes pancreáticos de crías macho de rata, sin embargo en cuanto al gen *CPE* si se observa un efecto en la disminución de la expresión debida a dicha restricción sin que este cambio afecte los niveles de concentración de insulina, péptido C o glucosa en suero sugiriendo la existencia de un mecanismo compensatorio que regula dichos parámetros bioquímicos durante la edad temprana de la progenie.



## 9. Referencias

Alsters S. I., Goldstone A. P., Buxton J. L., et al. (2015) Truncating Homozygous Mutation of Carboxypeptidase E (CPE) in a Morbidly Obese Female with Type 2 Diabetes Mellitus, Intellectual Disability and Hypogonadotrophic Hypogonadism. *PLoS One*, 10(6):e0131417.

Alvarez C., Martín M.A., Goya L., et al. (1997). Contrasted impact of maternal rat food restriction on the fetal endocrine pancreas. *Endocrinology*, 138, 2267-2273.

Baumgard L.H., Hausman, G. J., y Sanz Fernández M. V. (2016). Insulin: Pancreatic secretion and adipocyte regulation. *Domestic Animal Endocrinology*, 54, 76-84.

Belkacemi L., Nelson D.M., Desai M., et al. (2010). Maternal undernutrition influences placental-fetal development. *Biology of Reproduction*, 83, 325-331.

Black R. E., Allen L. H., Bhutta Z. A., et al. (2008). Maternal and child undernutrition: Global and regional exposures and health consequences. *Lancet*, 371, 243-260.

Bronstein I., Voyta J. C., Thorpe G. H., et al. (1989). Chemiluminescent assay of alkaline phosphatase applied in an ultrasensitive enzyme immunoassay of thyrotropin. *Clinical Chemistry*, 35, 1441-1446.

Calzada L., Morales A., Sosa-Larios T. C., et al. (2016). Maternal protein restriction during gestation impairs female offspring pancreas development in the rat. *Nutrition Research*, 36, 855-862.

Cerf M.E., (2013). Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*, 4: 37.

Chen H., Jawahar S., Qian Y., et al. (2001). Missense polymorphism in the human carboxypeptidase E gene alters enzymatic activity. *Human Mutation*, 18, 120-131.



Choquet H., Kasberger J., Hamidovic A., et al. (2013). Contribution of common PCSK1 genetic variants to obesity in 8,359 subjects from multi-ethnic american population. *Plos One*, 8(2):e57857.

Chung W. K. (2012). An overview of monogenic and syndromic obesities in humans. *Pediatric Blood and Cancer*, 58, 122-128.

Creemers W. M., Choquet H., Stijnen P., et al. (2012). Heterozygous mutations causing partial prohormone convertase 1 deficiency contribute to human obesity. *Diabetes*, 61, 383-390.

de Oliveira J.C., Gomes R.M., Miranda R.A. et al. (2016). Protein restriction during the last third of pregnancy malprograms the neuroendocrine axes to induce metabolic syndrome in adult male rat offspring. *Endocrinology*, 157, 1799–1812.

Desai M., Jellyman J.K., Ross M.G., (2015). Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *International Journal of Obesity*, 39, 633-641.

Dumortier O., Hinault C., Gautier N., et al. (2014). Maternal protein restriction leads to pancreatic failure in offspring: Role of misexpressed microRNA-375. *Diabetes*, 63, 3416-3427

Fishman S. M., Caulfield L. E., De Onis M., et al. (2004). Childhood and maternal underweight. En: *Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors*, World Health Organization, Suiza, 1, 39-161.

Frank G.R., Fox J., Candela N., et al. (2013). Severe obesity and diabetes insipidus in a patient with PCSK1 deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 110, 191-194.

Fricker L.D., Berman Y., Leiter E., et al. (1996). Carboxypeptidase E Activity Is Deficient in Mice with the fat Mutation. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 30619–30624.



Fu Z., Gilbert E. y Liu D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 9, 25-53.

Gangemi J. D., y King, D. (2009). The potential for nutrigenomics in prevention of metabolic syndrome. *Journal of the South Carolina Academy of Science*, 7, 14-18.

Greene D., Das B. y Fricker L. D. (1992). Regulation of carboxypeptidase E. Effect of pH, temperature and  $Co^{2+}$  on kinetic parameters of substrate hydrolysis. *Biochemical Journal*, 285, 613-618.

Jackson R.S., Creemers J.W., Ohagi S., et al. (1997). Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone. *Nature Genetics*, 16, 303-306.

Jahan-Mihan A., Rodriguez J., Christie C., et al. (2015). The role of maternal dietary proteins in development of metabolic syndrome in offspring. *Nutrients*, 7, 9185–9217.

Jeffrey K.D., Alejandro E.U., Luciani D.S., et al. (2008). Carboxypeptidase E mediates palmitate-induced  $\beta$ -cell ER stress and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 8452-8457.

Ji L., Wu H.T., Qin X., et al. (2017). Dissecting carboxypeptidase E: properties, functions and pathophysiological roles in disease. *Endocrine Connections*, 6, R18-R38.

Jung Y. K. y Fricker L. D., (1994). Expression of the carboxypeptidase E gene: Characterization of the initiator-binding proteins. *Biochimie*, 76, 336-345.

Jung Y. K., Kunczt C. J., Pearson, R. K., et al. (1991). Structural characterization of the rat carboxypeptidase-E gene. *Molecular Endocrinology*, 5, 1257-1268.

Kaput J., y Rodriguez R. L., (2004). Nutritional genomics: The next frontier in the postgenomic era. *Physiological Genomics*, 16, 166-177.



Kasuga M., (2006). Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 1756-1760.

Lakshmy R., (2013). Metabolic syndrome: Role of maternal undernutrition and fetal programming. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 14, 229–240.

Leal-Lopes C., Velloso F.J., Campopiano J.C., et al. (2015). Roles of commensal microbiota in pancreas homeostasis and pancreatic pathologies. *Journal of Diabetes Research*, 2015:284680.

Lee T. y Young R., (2013). Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*, 152, 1237-1251.

Manser E., Fernandez D., Loo L., et al. (1990). Human carboxypeptidase E: Isolation and characterization of the cDNA, sequence conservation, expression and processing in vitro. *Biochemical Journal*, 267, 517-525.

Marroquí L., Gonzalez A., Neco P., et al. (2012). Role of leptin in the pancreatic  $\beta$ -cell: effects and signaling pathways. *Journal of Molecular Endocrinology*, 49, R9-R17.

Martins V. J., Toledo Florêncio T. M., Grillo L. P., et al., (2011). Long-lasting effects of undernutrition. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8, 1817-1846.

Martorell R., Melgar P., Maluccio J. A., et al. (2010). The nutrition intervention improved adult human capital and economic productivity. *Journal of Nutrition*, 140, 411-414.

Maston G.A., Evans S.K., Green M.R., (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7, 29-59.

Molina G.S., Correa D.M., Rojas J.L., et al. (2014). Orígenes fetales de la patología del adulto: la restricción del crecimiento intrauterino como factor de riesgo. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 79, 546-553.



Morimoto S., Calzada L., Sosa T. et al. (2012a). Emergence of ageing-related changes in insulin secretion by pancreatic islets of male rat offspring of mothers fed a low-protein diet. *British Journal of Nutrition*, 107, 1562-1565.

Morimoto S., Sosa T. C., Calzada L., et al. (2012b). Developmental programming of aging of isolated pancreatic islet glucose-stimulated insulin secretion in female offspring of mothers fed low-protein diets in pregnancy and/or lactation. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 3, 483-488.

Muzumdar R., Ma X., Atzmon G., et al. (2004). Decrease in glucose-stimulated insulin secretion with aging is independent of insulin action. *Diabetes*, 53, 441-446.

Neeley W. E., (1972). Simple automated determination of serum or plasma glucose by a hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase method. *Clinical Chemistry*, 18, 509-515.

Nishigori T., Yanagita M., y Takeuchi T. (1996). Proinsulin cleaved by furin is processed to chromatographically mature insulin by carboxypeptidases in nonneuroendocrine cells. *Peptides*, 17, 789-796.

O'Dowd J. F., y Stocker C. J. (2013). Endocrine pancreatic development: Impact of obesity and diet. *Frontiers in Physiology*, 4:170.

Olvera-Granados C. P., Leo-Amador G. E., y Hernández-Montiel H. L. (2008). Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración?. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 65, 306-324.

Plum L., Lin H.V., Dutia R., et al., (2009). The obesity susceptibility gene Cpe links FoxO1 signaling in hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons with regulation of food intake. *Nature Medicine*, 15, 1195-1201.



Portha B., Kergoat M., Blondel O., et al., (1995). Underfeeding of rat mothers during the first two trimesters of gestation does not alter insulin action and insulin secretion in the progeny. *European Journal of Endocrinology*, 133, 475-482.

Recillas F. y Escamilla M., (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. En: Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII. Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. 173-201.

Rinaudo P. y Wang E. (2012). Fetal programming and metabolic syndrome. *Annual Review of Physiology*, 74, 107–130.

Rodríguez-Trejo A., Ortiz-López M. G., Zambrano E., 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. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 302, E1431-1439.

Sanchez V. C., Goldstein J., Stuart R. C., et al. (2004). Regulation of hypothalamic prohormone convertases 1 and 2 and effects on processing of prothyrotropin-releasing hormone. *Journal of Clinical Investigation*, 114, 357-369.

Schnell M., Domínguez Z. y Carrera C. (2007). Aspectos genéticos, clínicos y fisiopatológicos del síndrome metabólico. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 20, 92-98.

Seidah N.G. (2011). The proprotein convertases, 20 years later. *Methods in Molecular Biology*. 768, pp. 23–57.

Sosa-Larios T. C., Cerbón M. A., y Morimoto S. (2015). Epigenetic alterations caused by nutritional stress during fetal programming of the endocrine pancreas. *Archives of Medical Research*, 46, 93-100.



Stijnen P., Ramos-Molina B., O'Rahilly S., et al. (2016). PCSK1 Mutations and Human Endocrinopathies: From Obesity to Gastrointestinal Disorders. *Endocrine Reviews*; 37, 347-371.

Suckale J. y Solimena M. (2010). The insulin secretory granule as a signaling hub. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21, 599-609.

Utsunomiya N., Ohagi S., Sanke T., et al. (1998). Organization of the human carboxypeptidase E gene and molecular scanning for mutations in japanese subjects with NIDDM or obesity. *Diabetologia*, 41, 701-705.

Vezzosi D., Bennet A., Fauvel J., et al. (2003). Insulin levels measured with an insulin-specific assay in patients with fasting hypoglycaemia related to endogenous hyperinsulinism. *European Journal of Endocrinology*, 149, 413-419.

Vuguin P., Ma X., Yang X., et al. (2001). Food deprivation limits insulin secretory capacity in postpubertal rats. *Pediatric Research*, 49, 468-473.

Weiss M.A., (2009). Proinsulin and the genetics of diabetes mellitus. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 19159-9163.

Yi Chu K. Meredith J.L., Tobias A., et al. (2011). Differential regulation and localization of carboxypeptidase D and carboxypeptidase E in human and mouse  $\beta$ -cells. *Islets*, 3, 155-165.

Zambrano E., Rodríguez-González G.L., Guzmán C., et al. (2005). A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *Journal of Physiology*, 563 (Pt 1), 275–284.





## 10. Apéndices

### Apéndice 1A. Diseño de los oligonucleótidos para el gen de PCSK1.

#### 1. NM\_017091.2

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:

NM\_017091.2 *Rattus norvegicus* proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 (Pcsk1), mRNA

Assay rank 1

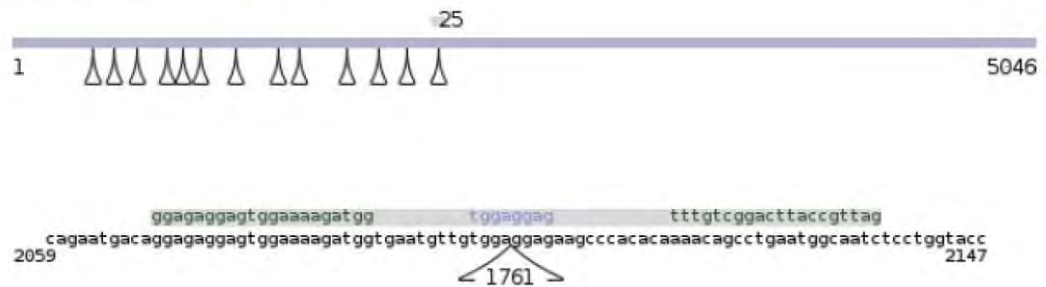
Use probe #25 (cat. no. 04686993001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	21	2069 - 2089	60	52	ggagaggagtggaaaagatgg
Right	20	2118 - 2137	60	45	gattgccattcaggctgttt
Amplicon (69 nt)					
ggagaggagtggaaaagatggtgaatgttgtggaggagaagccacacaaaaacagcctgaatggcaatc					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: [All criteria met.](#)

Length of intron(s) spanned by this assay: 1761 nt





## Apéndice 1B. Diseño de los oligonucleótidos para el gen de CPE.

### 1. NM\_013128.1

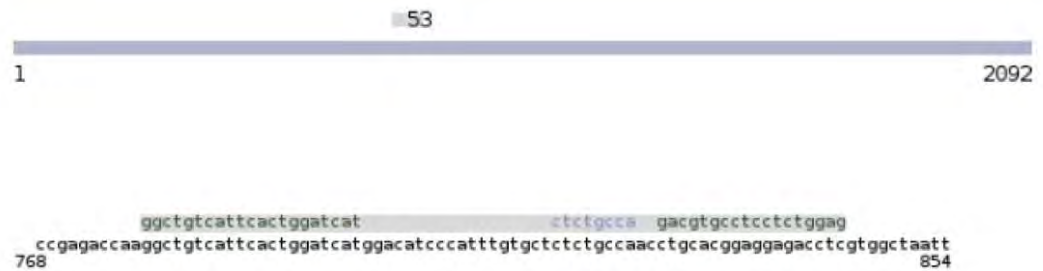
ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:  
NM\_013128.1 *Rattus norvegicus* carboxypeptidase E (Cpe), mRNA

Assay rank 1

Use probe #53 (cat. no. 04688503001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	21	778 - 798	59	48	ggctgtcattcactggatcat
Right	18	827 - 844	59	67	gaggtctctccgtgcag
Amplicon (67 nt)					
ggctgtcattcactggatcatggacatcccatttgtgctctctgccaacctgcacggaggagacctc					

This assay has: **All criteria met.**





## Apéndice 1C. Diseño de los oligonucleótidos para el gen de $\beta$ -Actina.

### 1. NM\_031144.2

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:  
NM\_031144.2 *Rattus norvegicus actin, beta (Actb)*, mRNA

Assay rank 1

Use probe #17 (cat. no. 04686900001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	19	20 - 38	60	58	cccgcgagtacaaccttct
Right	18	74 - 91	60	56	cgtcacccatggcgaact
Amplicon (72 nt)					
cccgcgagtacaaccttcttgcagctcctccgtcgccggtccacacccgccaccagttcgccatggatgacg					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 938 nt





Apéndice 2. Curva patrón para el cálculo de la concentración de insulina.

