



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la dieta baja en proteínas durante la gestación, en la metilación de los promotores de los genes *Pdx-1* y *MafA* en los islotes pancreáticos de las crías macho F1

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Q.A. ANA LAURA ORTEGA MÁRQUEZ

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. LIDYA SUMIKO MORIMOTO MARTÍNEZ  
[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES  
[Facultad de Química, UNAM](#)

DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIOS  
[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán](#)

Ciudad de México. Marzo, 2019



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.

<b>Índice.....</b>	<b>1</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>5</b>
1.1 Programación del desarrollo.....	5
1.1.2 Programación del desarrollo y el modelo de una dieta materna baja en proteínas.....	6
1.2 El páncreas.....	8
1.2.1 Desarrollo del páncreas .....	12
1.2.2 Factores transcripcionales que regulan el desarrollo y función de las células beta: Pdx1 y MafA .....	14
1.3. Regulación transcripcional.....	15
1.3.1 Regulación transcripcional del gen Pdx1 en roedores.....	17
1.3.2 Regulación transcripcional del gen MafA en roedores.....	18
1.4 Regulación epigenética.....	20
1.4.1 Metilación del DNA.....	21
1.4.2 Modificaciones de histonas.....	25
1.5 Epigenética y estrés nutricional en el páncreas endocrino.....	26
<b>2. Planteamiento del problema.....</b>	<b>27</b>
<b>3. Hipótesis.....</b>	<b>27</b>
<b>4. Objetivo.....</b>	<b>28</b>

<b>5. Material y Métodos</b> .....	<b>28</b>
5.1 Grupos experimentales.....	28
5.2 Aislamiento de islotes pancreáticos por digestión con colagenasa.....	31
5.3 Extracción de RNA.....	32
5.4 RT-qPCR.....	33
5.5 Extracción de DNA genómico.....	34
5.6 Estudios de metilación.....	34
5.6.1 Metilación global de DNA genómico.....	34
5.6.2 Estudio de metilación del DNA en los promotores de los genes Pdx1 y MafA.....	36
5.7 Análisis estadístico.....	41
<b>6. Resultados</b> .....	<b>42</b>
6.1 Medición de glucosa e insulina en suero.....	42
6.2 Estudio de la expresión del gen Pdx1 en ratas macho F1.....	43
6.3 Estudio de la expresión del gen MafA en ratas macho F1.....	44
6.4 Análisis de metilación global de DNA genómico en islotes pancreáticos de ratas macho de 36 días.....	45
6.5 Análisis de metilación de los promotores de Pdx1 y MafA con la técnica de bisulfito de sodio.....	47
<b>7. Discusión</b> .....	<b>52</b>
<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>58</b>
<b>9. Perspectivas</b> .....	<b>58</b>
<b>10. Referencias</b> .....	<b>59</b>

## Abreviaturas

**5mC** 5 metil citosina

**ATP** Adenosín trifosfato

**ADP** Adenosín difosfato

**BHMT** Betaína homocisteína metil transferasa

**DHA** Ácido docosaheptaenoico

**DMG** Dimetilglicina

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**DNMT** Metil transferasa de DNA

**E16.5** Día embrionario 16.5 (murino)

**GLUT2** Transportador de Glucosa 2

**HNF-3 $\beta$**  Factor nuclear hepático 3 beta

**IUGR** Restricción del crecimiento intrauterino

**Kir6.2** Una de las subunidades del canal de potasio dependiente de ATP

**MAT** Metionina adenosiltransferasa

***Pdx-1*** Gen que codifica al Factor pancreático duodenal homeobox 1 (murino)

**Pdx-1** Factor pancreático duodenal homeobox 1 (murino)

**PDX-1** Factor pancreático duodenal homeobox 1 (humano)

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

***MafA*** Gen que codifica al Factor de transcripción homólogo A del oncogén de fibrosarcoma musculoaponeurótico (murino)

**MafA** Factor de transcripción homólogo A del oncogén de fibrosarcoma musculoaponeurótico (murino)

**MafB** Factor de transcripción homólogo B del oncogén de fibrosarcoma musculoaponeurótico

**MBD** Proteína con dominio de unión a CpG metilada

**MeCP** Proteína de unión a CpG metiladas de la familia MBD

**miRNA** Micro RNA

**RNA** Ácido ribonucleico

**SAM** S-adenosil metionina

**SAH** S-adenosil homocisteína

**SUR1** Receptor de sulfonilureas

**USF1** Factor 1 estimulador de la transcripción río arriba

**VDCC** Canales de calcio dependientes de voltaje

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Programación del desarrollo

El estado nutricional es un aspecto fundamental para la salud y bienestar antes y durante el embarazo porque se producen cambios fisiológicos tanto en la mujer como en el feto; en la vida nutricional de la mujer representa una mayor vulnerabilidad, ya que se requiere de un mayor aporte de nutrimentos para el crecimiento y metabolismo tanto de la madre como del feto debido al aumento en la actividad anabólica (Allen, 2006). La provisión de nutrimentos a éste, depende del estado de salud de la mujer embarazada (Reusens y Remacle, 2006), por lo que la nutrición materna, además del ambiente intrauterino, tiene un papel fundamental en la salud y desarrollo fetal (Buttriss et al, 2013).

De acuerdo con la “Hipótesis de Barker” o “del fenotipo ahorrador”, la desnutrición *in utero* induce adaptaciones fisiológicas y/o metabólicas por parte del feto para asegurar el suministro de nutrimentos a órganos vitales como el cerebro, a expensas de otros, por ejemplo, el páncreas endocrino; y estos cambios o adaptaciones aunque son benéficas en condiciones postnatales de desnutrición, se vuelven perjudiciales en condiciones de una nutrición balanceada o una sobrenutrición, llevando al desarrollo de enfermedades en la vida adulta, como la diabetes tipo 2 (Duque-Guimarães y Ozanne, 2013).

Barker y colaboradores asociaron el término “programación” al cambio permanente o a largo plazo en la estructura o función de un órgano, resultado de un estímulo dañino en un periodo crítico durante etapas tempranas de la vida (Hales y Barker, 1992). Los resultados de esta programación en el adulto, dependen de la naturaleza de dicho estímulo, el momento en el que ocurre y la duración de éste (Gluckman et al, 2005; Gluckman y Hanson, 2004). La gestación se considera un período crítico, ya que en esta etapa se lleva a cabo la diferenciación celular, así como el desarrollo de los diferentes órganos, y algún estímulo dañino puede llevar a una función incorrecta de los mismos (Buttriss et al,

2013) determinando la salud metabólica de la progenie a largo plazo (Lima et al, 2011).

Las primeras evidencias de dicho fenómeno fueron observadas en individuos expuestos *in utero* a la hambruna holandesa en 1944, revelándose que una pobre nutrición materna, especialmente durante el último trimestre del embarazo, conlleva a una restricción en el crecimiento del feto y está asociada con una baja tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Ravelli et al, 1998).

### **1.1.2 Programación del desarrollo y el modelo de una dieta materna baja en proteínas**

Uno de los modelos que más se ha utilizado para el estudio de la programación del desarrollo es el de una dieta materna baja en proteínas y se sabe que tiene efecto sobre diversos órganos, por ejemplo, en la rata, este estímulo dañino durante la gestación y/o la lactancia, se ha asociado con alteraciones en la función reproductiva de las crías hembra, un retraso en el inicio de la pubertad, teniendo como consecuencia una disminución en la fertilidad y un envejecimiento reproductivo prematuro (Guzmán et al, 2014), mientras que en las crías macho, tiene efectos sobre el crecimiento testicular, lo que conlleva a un retraso en la maduración sexual (Zambrano et al, 2005).

También puede tener un impacto negativo sobre el desarrollo normal del cerebro del feto a través de cambios en el metabolismo de lípidos en el hígado de la madre alimentada con una dieta restringida en proteínas, ya que, en la madre, existe una disminución en la cantidad de aminoácidos y DHA, así como una menor expresión de las enzimas desaturasa y elongasa, mientras que en los fetos, una menor cantidad de DHA (Torres et al, 2010).

Se ha reportado que durante la gestación y/o la lactancia, se produce una deficiencia en la secreción de insulina estimulada por glucosa y un envejecimiento prematuro de la función secretora de las células beta pancreáticas en las crías de rata (Morimoto et al, 2012a; 2012b), además de que se alteran las proporciones

en el tamaño del islote y hay reducción del número de células beta postnatalmente, modificando la ontogenia celular en el islote pancreático, lo cual pudiera impactar la función pancreática en la vida adulta (Calzada et al, 2016).

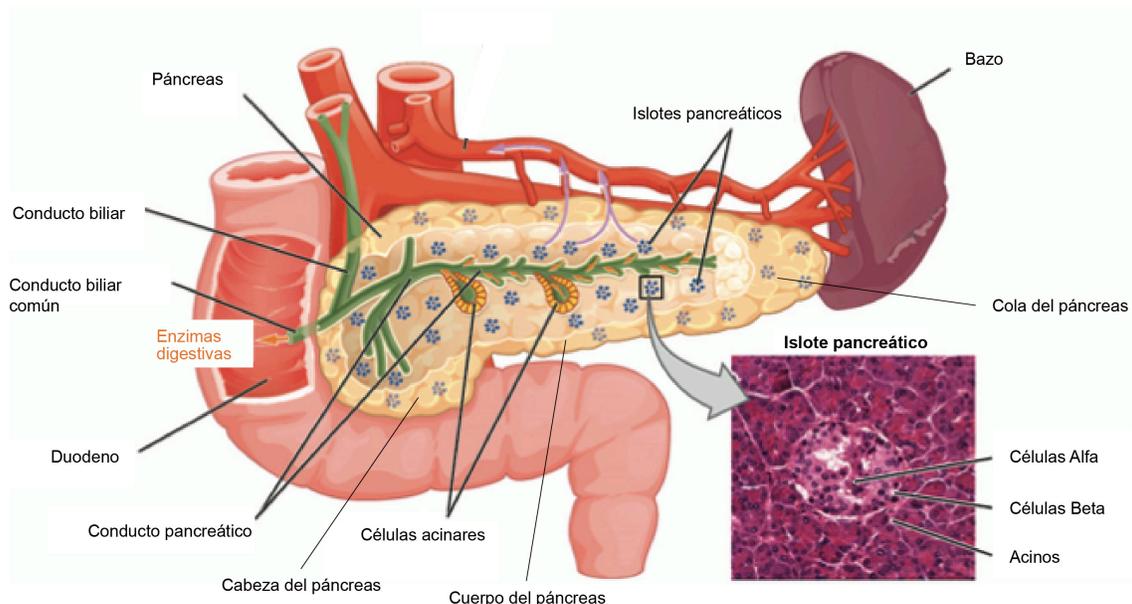
En un estudio diferente, la disminución en la secreción de insulina inducida por glucosa y en la proliferación de las células beta, se asoció con el incremento del miR-375, y, al normalizar sus niveles, se restaura la secreción de la insulina, concluyendo que los niveles del miR-375 son importantes para establecer una adecuada función y masa de las células beta. La perturbación de la expresión de micro RNAs clave en el páncreas endocrino de la progenie, contribuye a los efectos de la nutrición temprana en el establecimiento de la masa de las células beta (Dumortier et al, 2014).

Adicionalmente, la dieta materna baja en proteínas aumenta la expresión del gen de insulina I y II, el transportador de glucosa GLUT2, así como de los factores transcripcionales KLF11 y ATF2, en los islotes pancreáticos de crías de rata, siendo la edad de 36 días, la más importante en la programación de la expresión de estos genes (Sosa, 2013).

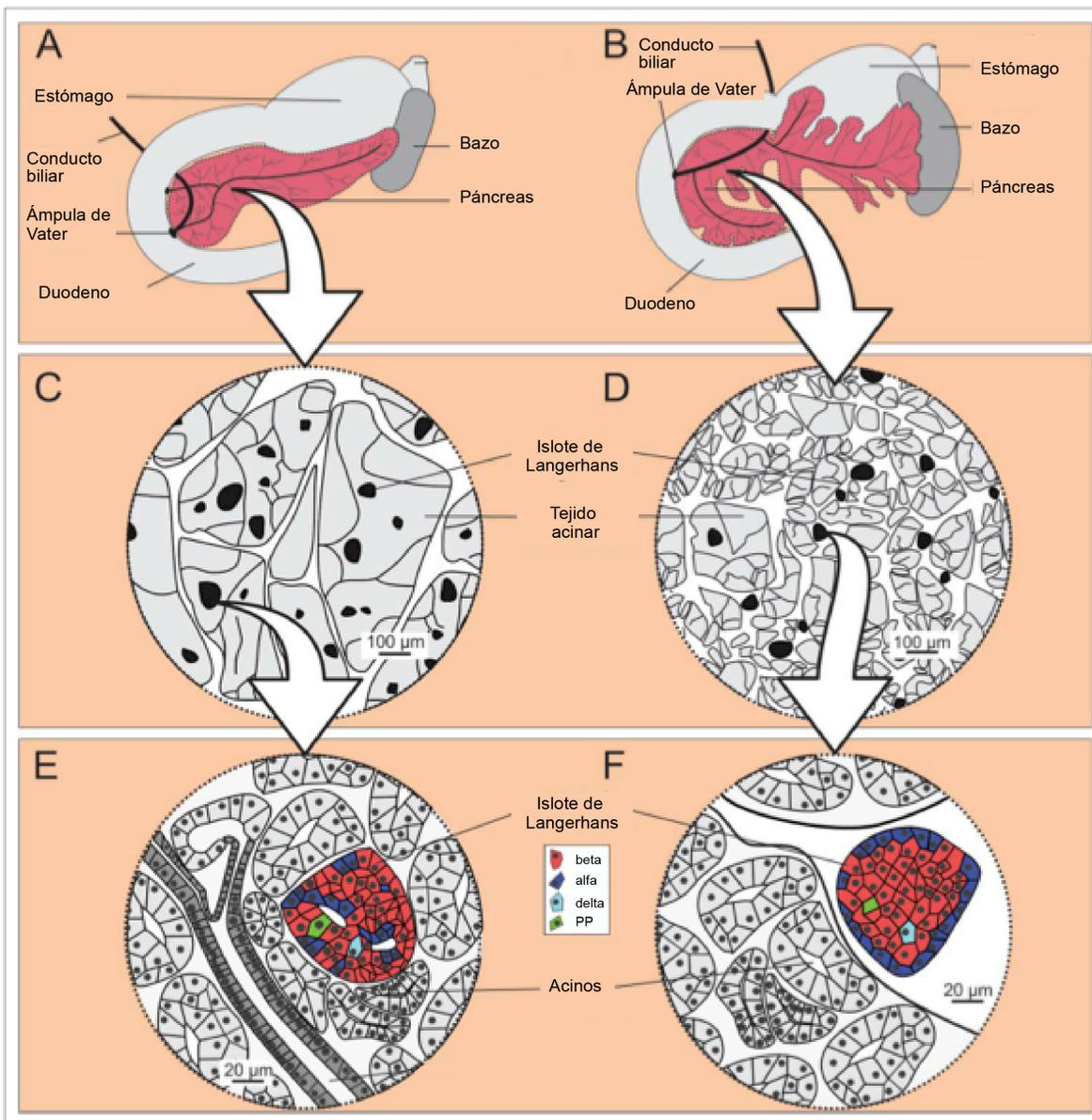
Recientemente, Oliveira y colaboradores describieron, que en el último trimestre de la gestación, una dieta materna baja en proteínas puede malprogramar la capacidad de producción de corticosterona en las crías de rata e incrementar la susceptibilidad a esteatosis hepática, además de un mal funcionamiento del páncreas endocrino a largo plazo (de Oliveira et al, 2016).

## 1.2 El páncreas

El páncreas es una glándula vital debido a que tiene un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa y en la digestión, además, es de gran interés por las enfermedades que le afectan, como la diabetes (Johansson y Grapin-Botton, 2002). En humanos consiste en un órgano de 70-150 g y de 15-25 cm de largo; está conectado al duodeno por la ámpula de Vater, donde el principal conducto pancreático se une con el colédoco (conducto biliar común) y se utilizan los términos cabeza, cuerpo y cola para designar las regiones del órgano, de proximal a distal (Figura 1), mientras que en roedores (Figura 2), el páncreas muestra una forma irregular y menos definida (Slack, 1995).



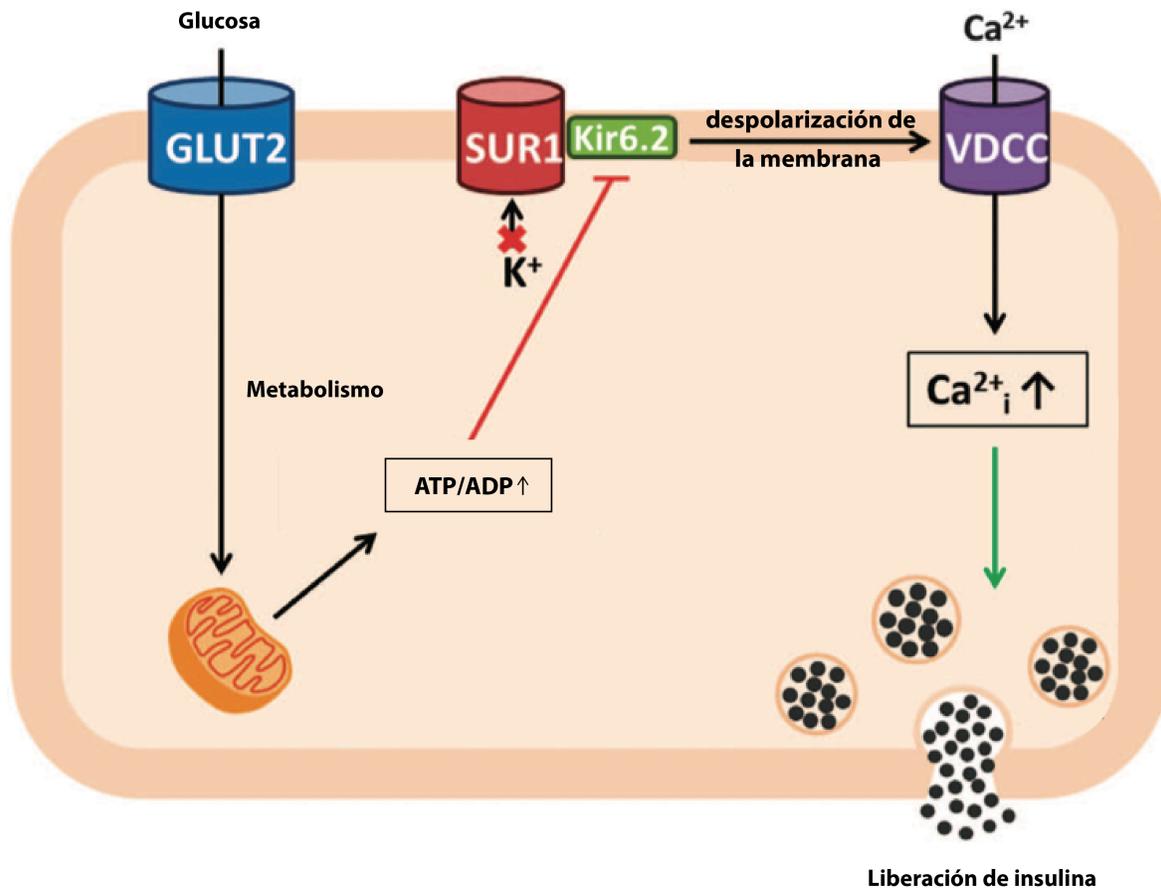
**Figura 1.** Esquema de la anatomía del páncreas humano. En la imagen se muestran las regiones en las que se divide el páncreas: cabeza, cuerpo y cola. La parte de la cabeza está alineada con la curvatura alta del duodeno, el cuerpo se localiza por debajo del estómago y la cola a un costado del bazo. También se pueden observar sus componentes de la parte exocrina en el tejido acinar (células acinares) y de la parte endocrina (islotes pancreáticos). Tomado y modificado de Röder et al, 2016.



**Figura 2.** Esquema comparativo del páncreas humano y de ratón. A) Esquema del páncreas humano; B) Esquema del páncreas de ratón; C) Islole de Langerhans en el humano; D) Islole de Langerhans en el ratón; E) Distribución de las células endocrinas alfa, beta, delta y PP en islole de humano; F) Distribución de las células endocrinas alfa, beta, delta y PP en islole de ratón. Tomado y modificado de Dolenšek et al, 2015.

Su función es tanto endocrina, como exocrina. Los componentes del páncreas endocrino son los islotes de Langerhans, conformados por células epiteliales endocrinas separadas de la porción exocrina por una capa de fibras de colágena, miden alrededor de 75 a 225  $\mu\text{m}$  de diámetro y se distribuyen en mayor proporción en la cola del páncreas. Están compuestos por 4 tipos de células secretoras de hormonas. Las células alfa, beta, delta y PP (Figura 2), secretan glucagón, insulina, somatostatina y péptido pancreático, respectivamente (Johansson y Grapin-Botton, 2002). El glucagón incrementa los niveles de glucosa en sangre, mientras que la insulina los reduce; la somatostatina inhibe a ambas hormonas y el péptido pancreático regula la actividad de la secreción exocrina y endocrina del páncreas, por lo que, en conjunto, estas hormonas regulan la homeostasis de la glucosa en los vertebrados (Röder et al, 2016).

Las células beta, secretan insulina en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa en la sangre, por ejemplo, después de la ingesta de alimentos (Layden et al, 2010). Conforme la glucosa es metabolizada por las células beta, aumenta la producción de ATP, lo cual hace que se incremente la proporción ATP/ADP, provocando el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP y la despolarización de la membrana celular, conforme aumenta la despolarización, se abren los canales de calcio dependientes de voltaje, permitiendo el flujo de este ion al interior de la célula, la acumulación de calcio tiene como consecuencia la fusión de los gránulos que contienen insulina con la membrana y la subsecuente liberación de su contenido (Figura 3) (Layden et al, 2010; Henquin, 2000).



**Figura 3.** Esquema simplificado de la secreción de insulina inducida por glucosa. ATP adenosin trifosfato; ADP, adenosin difosfato; Ca<sup>2+</sup>, calcio; GLUT2, transportador de glucosa 2; Kir6.2, subunidad del canal de potasio dependiente de ATP; SUR1, receptor de sulfonilureas; VDCC, canales de calcio dependientes de voltaje. Tomado y modificado de Röder et al, 2016.

El deterioro de la función de secreción de insulina estimulada por glucosa, así como una disminución en la masa de las células beta tienen un papel central en el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Martin-Gronert y Ozzane, 2012).

La insulina es regulada a nivel de la transcripción del gen hasta la secreción de la insulina. La transcripción del gen de la insulina depende de la interacción de factores de transcripción específicos, como el Pdx-1, MafA y NeuroD1/Beta2, con elementos *cis* presentes en el promotor del gen, denominadas elementos E , elementos A (en donde abundan adeninas) y C1/RIPE3b (Melloul D, 2002). En el

presente trabajo, se estudiaron los genes *Pdx-1* y *MafA*, de los cuales se hablará más adelante.

### **1.2.1 Desarrollo del páncreas**

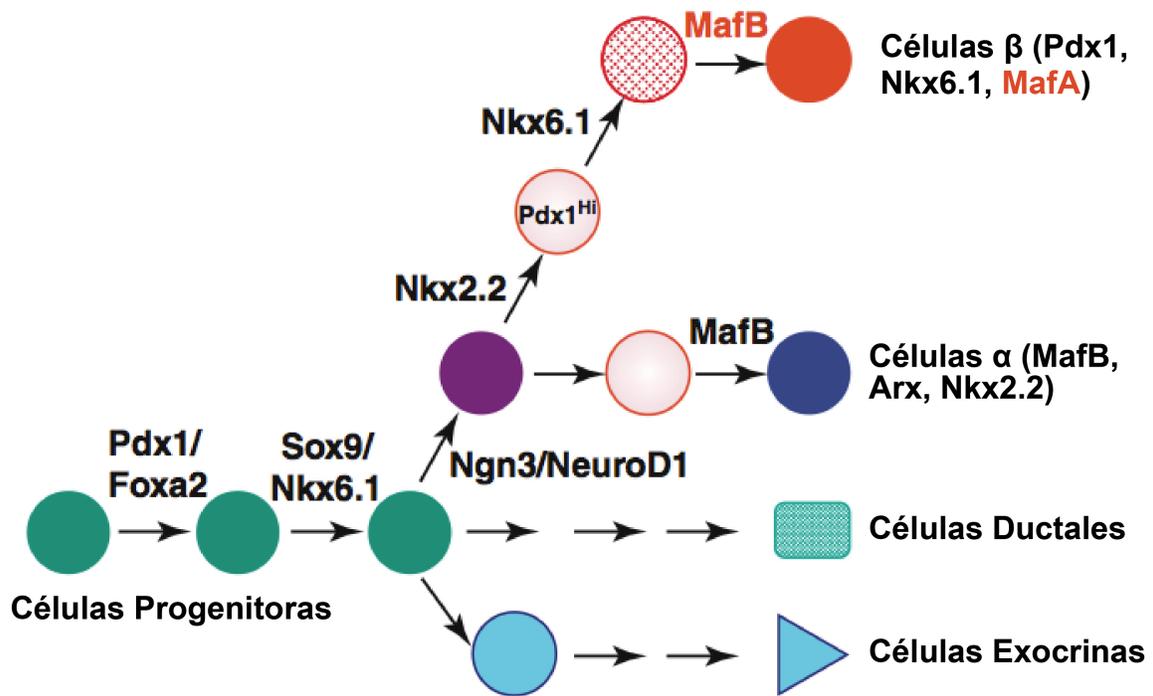
A partir de un conjunto de células progenitoras, el páncreas en estado embrionario se transforma en un órgano maduro en donde se pueden distinguir tres tipos de células: exocrinas, endocrinas y ductales.

Se puede dividir en tres etapas el desarrollo del páncreas, en la primera se inicia la organogénesis pancreática, en donde se presenta una proliferación activa de las células progenitoras pancreáticas. Durante la segunda hay crecimiento, diferenciación y asignación de los diferentes linajes de las células pancreáticas, mientras que, en la tercera, las células pancreáticas ya diferenciadas llevan a cabo una remodelación a través de procesos como la apoptosis, replicación y neogénesis que finalmente llevarán a la maduración del órgano (Dassaye et al, 2016)

Los factores transcripcionales son clave para el desarrollo del páncreas, ya que están involucrados en la organogénesis, el control de los mecanismos de diferenciación y el mantenimiento del fenotipo celular (Frantz, 2012), funcionan en múltiples niveles en donde se regulan el uno al otro o incluso se pueden autorregular. La interacción entre señales extrínsecas de tejidos no pancreáticos y factores transcripcionales intrínsecos, forman una compleja red de regulación génica, la cual culmina en los diferentes linajes celulares y tipos de tejido en el páncreas en desarrollo (Figura 4) (Dassaye et al, 2016). Dicha complejidad se debe a que algunos de los factores se expresan en más de una ocasión durante la diferenciación y tienen más de un papel durante el desarrollo (Frantz, 2012).

En roedores, durante la primera etapa participan los factores Hb9, Isl1, Hnf1 $\beta$ , Hnf3- $\beta$ /Foxa2, Hnf6/Onecut1, Sox17, Pdx1, Ptf1a, Sox9, Gata4, Gata6, mientras que en la segunda y tercera etapa participan Ngn3, Hes1, Hnf6, Sox9, Pdx1, Ptf1a, NeuroD1, Rfx3, Rfx6, Isl1, Arx, Pax4, Pax6, Nkx2.2, Nkx6.1, MafB, MafA y

Glis3 (Dassaye et al, 2016).



**Figura 4.** Esquema simplificado de la red transcripcional involucrada en el desarrollo del páncreas. Tomado y modificado de Hang y Stein, 2011.

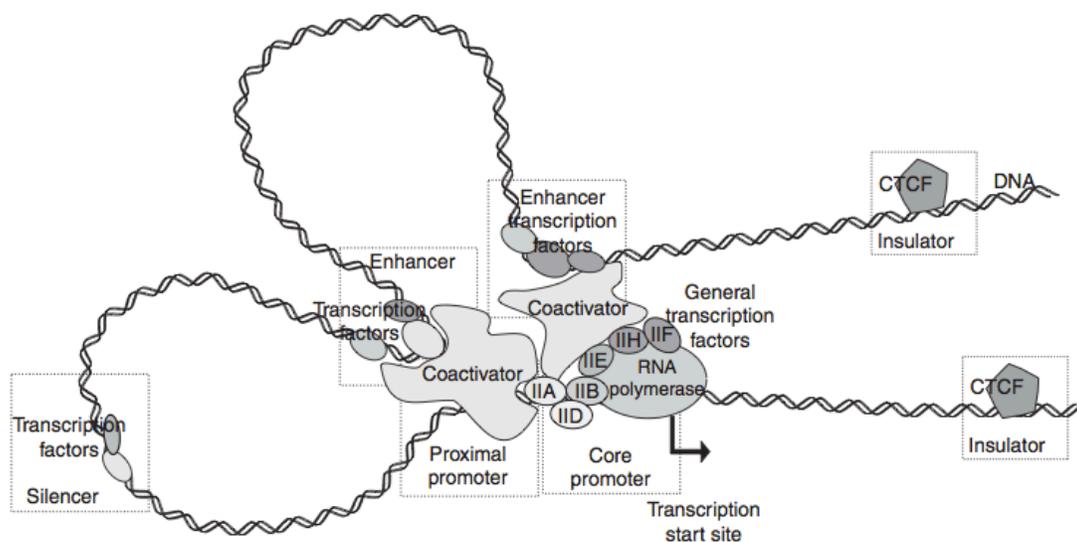
## **1.2.2 Factores transcripcionales que regulan el desarrollo y función de las células beta pancreáticas: Pdx1 y MafA**

Como se mencionó anteriormente, los factores de transcripción tienen un papel vital en el desarrollo normal del páncreas, asegurando la diferenciación de las células endocrinas, y algunos de ellos, modifican la expresión de genes fundamentales para el funcionamiento de las células beta pancreáticas, como lo es el factor de transcripción homeobox 1 pancreático duodenal (Pdx1), el cual regula la transcripción del gen de insulina, del transportador de glucosa GLUT2, la glucocinasa y el Nkx6.1, por lo que se le considera el regulador maestro del desarrollo pancreático y de la diferenciación de las células beta (Cerf et al, 2005). En humanos, la pérdida de la función del PDX1 tiene como consecuencia agenesia del páncreas, además, se ha reportado que los ratones heterocigotos para Pdx1<sup>(+/-)</sup> son intolerantes a la glucosa, tienen un incremento en la apoptosis de los islotes, así como una disminución en la masa de éstos (Kaneto et al, 2007).

Otro de los genes fundamentales para la función de las células beta pancreáticas es el factor de transcripción homólogo A del oncogén de fibrosarcoma musculoponeurótico (MafA), ya que es un regulador de la transcripción del gen de insulina y se ha visto que una reducción en su actividad está implicada en el desarrollo de la disfunción de las células beta (Zhang et al, 2005). La expresión del gen de MafA se observa en etapas tardías en el desarrollo de la célula beta, sugiriendo su importancia en el mantenimiento de ésta (Matsuoka et al, 2004); además, se ha reportado que ratones knock out de este gen, desarrollan diabetes como resultado de una disminución en la expresión de genes específicos de las células beta, una reducción en la secreción de la insulina y en la cantidad de estas células, así como una alteración en la en la arquitectura del islote (Zhang et al, 2005).

### 1.3 Regulación transcripcional

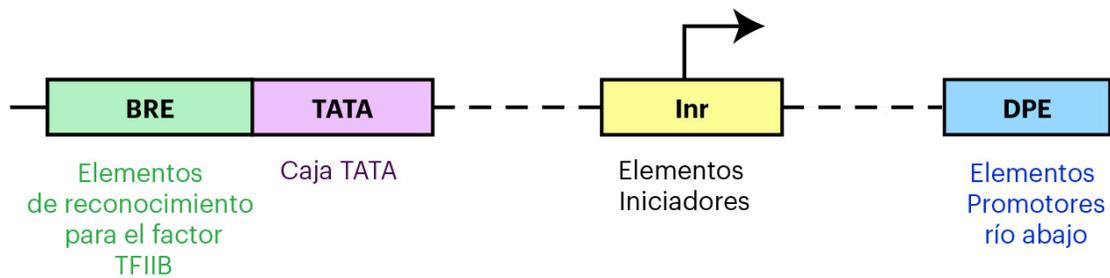
La regulación transcripcional (Figura 5) ocurre a nivel genético y epigenético (Lee y Young, 2013); en este apartado, solamente el primero de ellos será descrito.



**Figura 5.** Esquema simplificado de la regulación transcripcional. En la figura se muestra la región promotora, que comprende el *core* o núcleo del promotor y el promotor proximal que contiene sitios de unión para los factores generales de transcripción, así como para factores transcripcionales (FT) específicos. Los *enhancers* (potenciadores) y *silencers* (silenciadores) también tienen sitios de unión para FT, y activan o previenen la transcripción de los genes regulados. Los *enhancers* y *silencers* interactúan con el promotor a través de la formación de bucles. Los *insulators* (*elementos aisladores*) actúan como límites, asegurando que sólo el gen apropiado sea transcrito. Tomado y modificado de Taher et al, 2015.

Los factores transcripcionales regulan la expresión génica mediante la unión a diferentes secuencias regulatorias, tales como los promotores o los elementos

potenciadores, así como a través del reclutamiento de cofactores y la RNA polimerasa II (Lee y Young, 2013).



**Figura 6.** Esquema del promotor mínimo (core o núcleo del promotor). Tomado y modificado de Butler y Kadonaga, 2002.

El promotor mínimo (*core* o núcleo del promotor) (Figura 6) se define como la secuencia de DNA que dirige el inicio preciso de la transcripción de un gen mediada por la RNA polimerasa II (Juven-Gershon y Kadonaga, 2010). En las secuencias promotoras, existen diferentes motivos consenso de unión al DNA, entre los más comunes encontramos a la caja TATA, los elementos iniciadores (Inr), los elementos de reconocimiento para el factor TFIIB (BRE) y los elementos promotores río abajo (DPE). Distintas combinaciones de estas secuencias constituyen lo que se conoce como la "arquitectura" del promotor, la cual permite establecer una combinación única y selectiva para el reconocimiento de moléculas reguladoras. Estas secuencias suelen encontrarse cercanas al sitio de inicio de la transcripción dentro de un intervalo que va de +20 a -30 pares de bases en relación con el sitio de inicio de la transcripción (Recillas y Escamilla, 2004). Adicionalmente, existen los elementos distales, como los enhancers y silencers, los cuales son mediadores positivos y negativos de la regulación de la transcripción, respectivamente, además, los insulators que contribuyen a la formación de dominios transcripcionalmente activos (Taher et al, 2015).

A continuación, se describe lo que se sabe de la regulación transcripcional de los genes estudiados en este trabajo.

### 1.3.1 Regulación transcripcional del gen *Pdx1* en roedores

Ya que el *Pdx1* tiene un papel fundamental en el desarrollo pancreático, la diferenciación, así como en el mantenimiento de las células beta, es muy importante conocer la manera en que se regula su expresión en el páncreas.

La región codificante del *Pdx1* se compone de 2 exones; el primero codifica para la región amino terminal y el segundo, para el homeodominio y la región carboxilo terminal (Melloul et al, 2002). En el humano se localiza en el cromosoma 13 (Stoffel, 1995), mientras que en la rata en el cromosoma 12 (Yokoi, 1997).

El *Pdx1* no posee caja TATA, por lo que utiliza 3 sitios principales de inicio de la transcripción, seguido de una secuencia corta no traducida (UTR) en el extremo 5' de aproximadamente 100 nucleótidos (Sharma, 1996); además contiene elementos distales. En la rata, esta región se encuentra aproximadamente a -6.2 y -5.67 kb del sitio de inicio de transcripción, en donde se unen los factores transcripcionales HNF-3 $\beta$  y Beta2 (Figura 7), los cuales actúan de manera cooperativa para inducir la expresión del *Pdx1* (Sharma, 1997).

La regulación específica del *Pdx1* recae en una secuencia del promotor proximal que contiene un motivo caja E localizada a -104 pares de bases del sitio de inicio de transcripción, a la que se une un complejo en el cual se encuentra el factor transcripcional USF1. Una forma dominante negativa de USF2 reduce la actividad el promotor de *Pdx1*, así como los niveles del mRNA y la proteína, lo cual conlleva a una reducción en la unión del *Pdx1* al promotor del gen de la insulina y consecuentemente una disminución en la expresión del gen de la insulina (Qian, 1999). La interacción entre el USF1 y USF2 con la secuencia de la caja E en el

promotor de *Pdx1* parece tener una contribución preferencial en la expresión de este gen en la célula beta (Melloul et al, 2002).

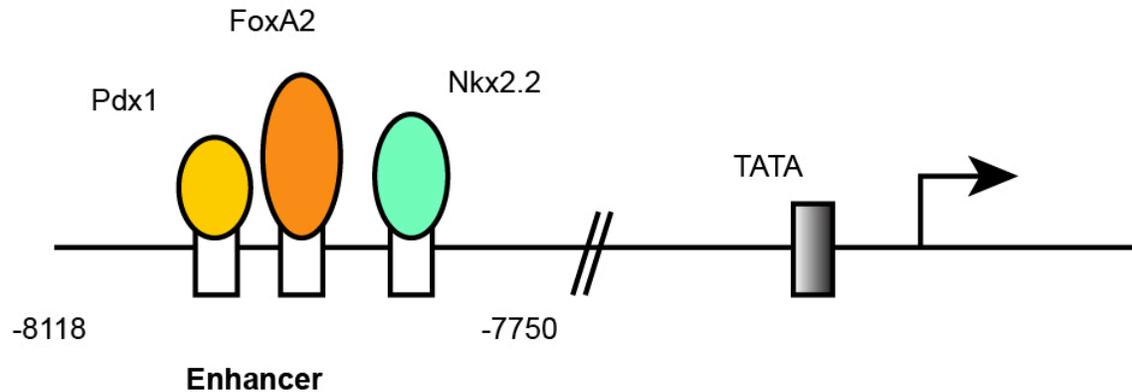


**Figura 7.** Esquema de las regiones regulatorias de *Pdx1*. En la figura se muestra el promotor proximal en donde se une USF1 y la región del *enhancer* a -6.2kb con respecto al sitio de inicio de la transcripción en donde se unen HNF-3β y Beta2. Tomado y modificado de Melloul, 2002.

### 1.3.2 Regulación transcripcional del gen *MafA*

Además del *Pdx1*, conocer la regulación del gen *MafA* en el páncreas es necesario ya que su correcto funcionamiento está relacionado con el mantenimiento de la identidad de la célula beta. El gen *MafA* se localiza en el cromosoma 8 en el humano, mientras que en la rata se encuentra en el 7, consta de 2448 pares de bases y su región codificante se conforma por un exón (Yates et al, 2016).

Para dirigir la transcripción del gen *MafA*, los factores transcripcionales *Pdx1*, *FoxA2*, *Nkx2.2* (Raum et al, 2006) y *HNF1α* (Chad et al, 2011), se unen a una región regulatoria denominada R3, la cual se encuentra de -8118 a -7750 pares de bases con respecto al sitio de inicio de transcripción (Figura 8). En ausencia de dichos factores, la expresión génica de *MafA* se ve reducida (Raum et al, 2006).



**Figura 8.** Esquema de la región reguladora de *MafA* de -7750 y -8118 pares de bases con respecto al sitio de inicio de la transcripción. En la figura se muestra el sitio regulatorio denominado R3, en donde se unen los factores transcripcionales que participan en la regulación de *MafA*, los cuales son Pdx1, FoxA2 y Nkx2.2. Tomado y modificado de Aramata et al, 2007.

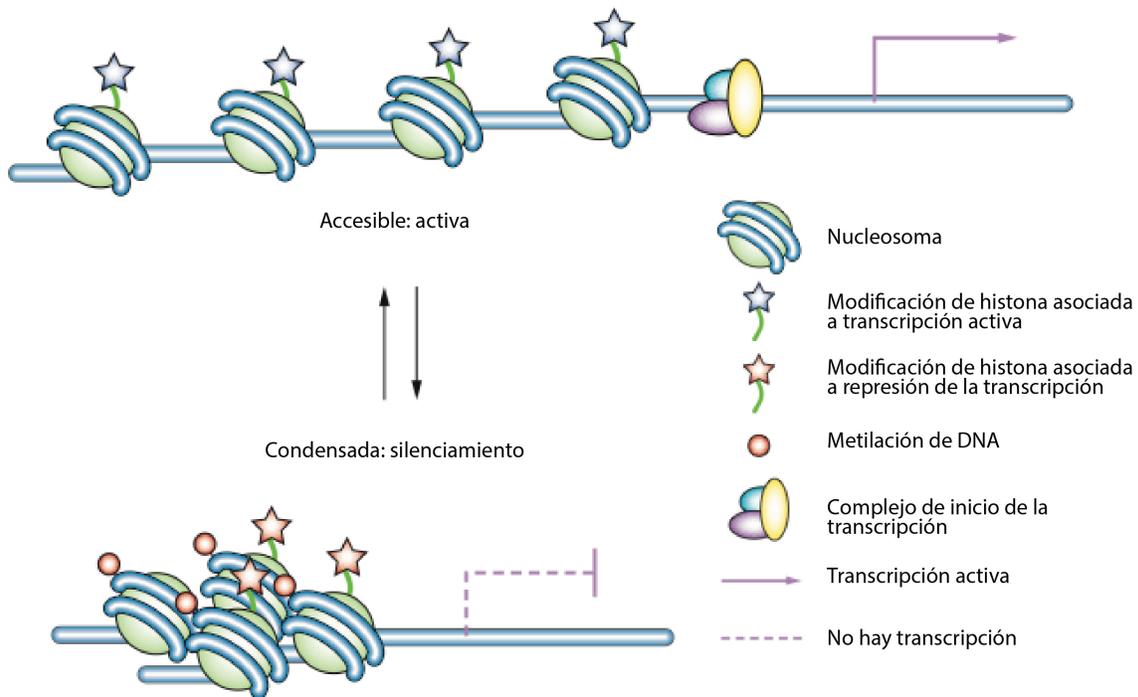
El gen de *MafA* se expresa en etapas tardías (día embrionario e16.5-postnatal) del desarrollo de las células beta, y como ya se mencionó, uno de los factores que regula su transcripción es FoxA2, y se ha visto que una proteína llamada Onecut1 es un regulador negativo de la expresión de este gen. Mediante experimentos de sobreexpresión de Onecut1 se encontró que la expresión de *MafA* se veía disminuida ya que se alteraba la unión de FoxA2 a la región del *enhancer* de *MafA*. Se encontró que la expresión de Onecut1 se ve aumentada en ratones diabéticos mientras que la de *MafA* disminuye, por lo que en este estudio se concluyó que Onecut1 es un regulador negativo directo para la expresión de *MafA* (Yamamoto, 2013).

## 1.4 Regulación epigenética

La definición clásica de epigenética, se refiere a los cambios heredables en la función génica que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia de DNA (Bird, 2002). La regulación epigenética gira en torno a la arquitectura de la cromatina y su efecto regulador sobre la expresión de los genes (Recillas y Escamilla, 2004). Los organismos eucariontes tienen su DNA compartimentalizado en el núcleo, formando la cromatina, la cual está distribuida como heterocromatina (regiones condensadas) y eucromatina (cromatina abierta) (Hughes y Hawley, 2009). La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, el cual está formado por un octámero de histonas (dos de cada una, H2A, H2B, H3 y H4) y 147 pares de bases de DNA (Felsenfeld y Groudine, 2003).

La estructura de la cromatina puede verse alterada de diversas maneras por ejemplo, mediante el remodelamiento del nucleosoma que puede ser inducido por los complejos SWI/SNF diseñados específicamente para esa tarea, y típicamente requiere la energía de la hidrólisis de ATP; por modificaciones covalentes de las histonas que ocurren en la región N-terminal y, por variantes de histonas que pueden reemplazar una o más de las histonas *core*.

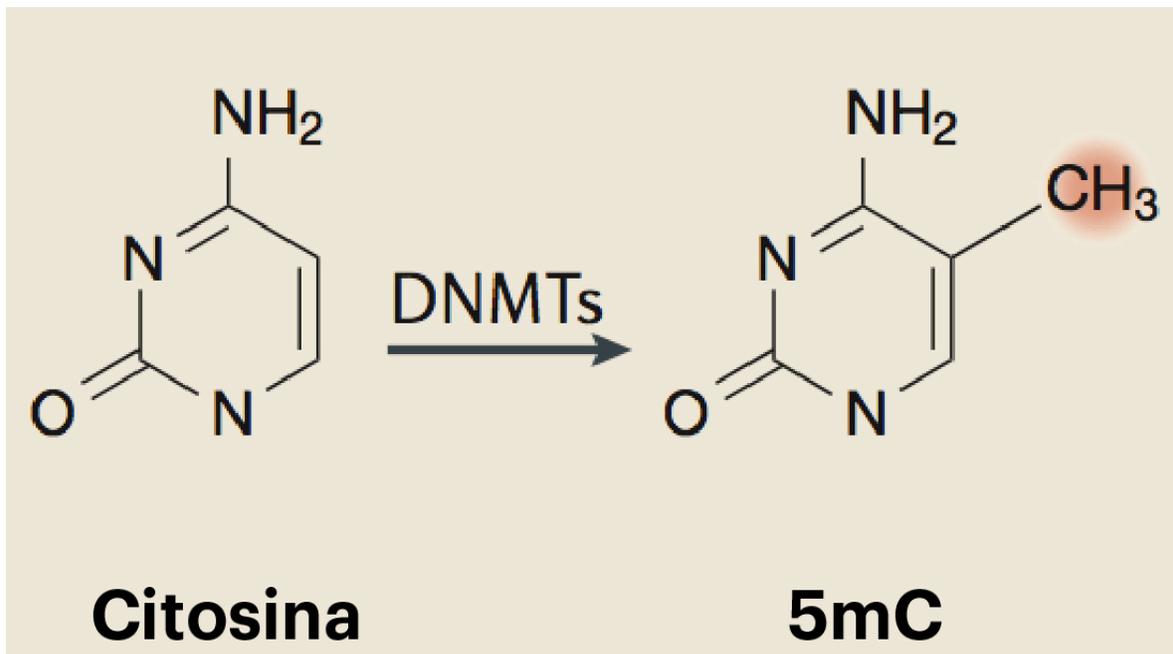
Algunos de los elementos que participan en la regulación epigenética responsables de permitir que la expresión génica tenga un vínculo muy estrecho con la estructura de la cromatina son la metilación del DNA y las modificaciones post-traduccionales de las histonas (Figura 9) (Recillas y Escamilla, 2004) procesos de los cuales se hablará a continuación.



**Figura 9.** Representación de una transcripción activa con una cromatina laxa y del silenciamiento de la transcripción a través de la metilación del DNA y modificaciones de histonas asociadas a éste. En la figura se muestran cuatro nucleosomas, en la parte superior se observa a la cromatina accesible, en donde hay modificaciones de histonas asociadas a la transcripción activa (estrellas azules), mientras que, en la parte inferior, se muestra una cromatina condensada en donde se observa metilación del DNA (círculos rojos) y modificaciones de histonas asociadas a represión de la transcripción (estrellas rojas). Tomado y modificado de Ozanne y Constância, 2007.

### 1.4.1 Metilación del DNA

La metilación del DNA consiste en la adición de un grupo metilo en la posición 5' de las citosinas (Figura 10), se requiere para el desarrollo embrionario, la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X; alteraciones en la metilación del DNA se han asociado a diversas enfermedades., como el cáncer.

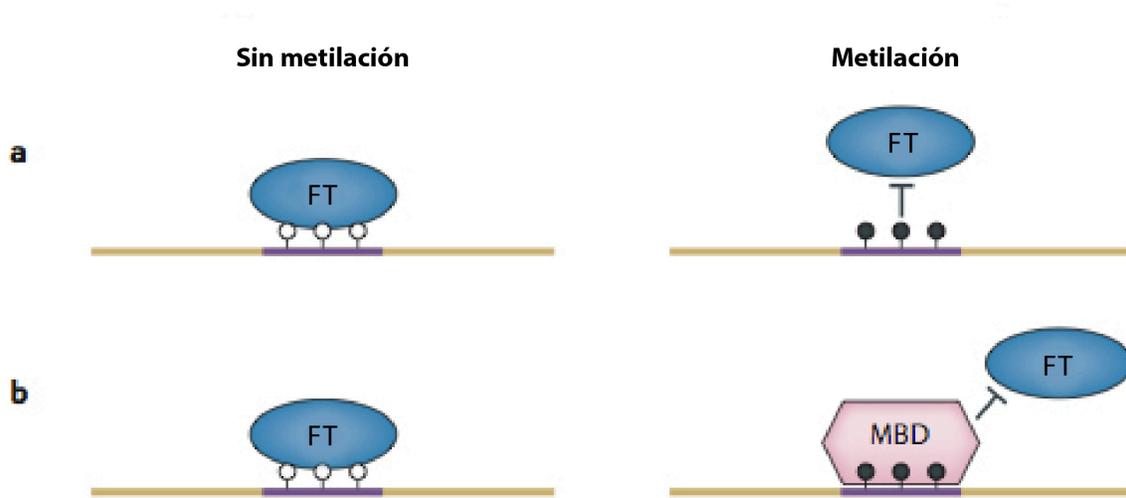


**Figura 10.** Metilación de la citosina. Se adiciona un grupo metilo en la posición 5' de la citosina por acción de las DNMTs. Tomada y modificada de Zhu et al, 2016.

Las citosinas metiladas se encuentran principalmente en dinucleótidos citosina-guanina, también llamados dinucleótidos CpG (Li y Zhang, 2014), CpG se refiere a una abreviatura que corresponde a una citosina seguida de una guanina separadas por un fosfato, el cual une a los dos nucleótidos en el DNA. A las regiones libres de metilación en donde la frecuencia de CpGs es aproximadamente 10 veces mayor que el promedio en el genoma (1 cada 100 nucleótidos) se les conoce como islas CpG (Antequera, 2003).

En el genoma, el DNA se encuentra metilado en los dinucleótidos CpG aproximadamente del 70 a 80% (Li y Zhang, 2014), mientras que, el promotor de los genes normalmente está desmetilado (Kim et al, 2009). La metilación de la citosina puede interferir con la unión de factores transcripcionales en el promotor provocando represión en la expresión génica sin embargo, existen estudios (Weber, 2007) en donde se ha encontrado que promotores con bajas cantidades de CpGs se encuentran metilados tanto en su estado activo como inactivo, lo cual implica que bajas concentraciones de citosinas metiladas no impide la expresión génica. La metilación de la citosina en sitios CpG se puede llevar a cabo de

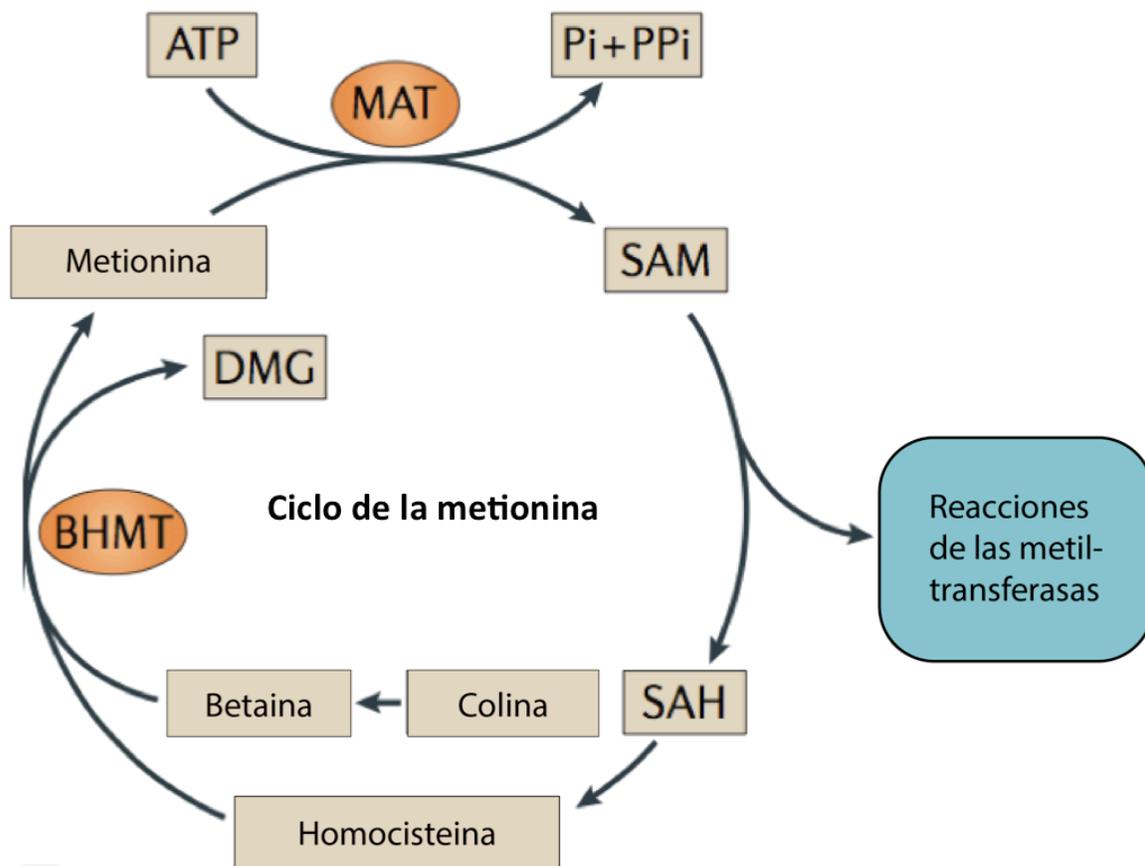
manera indirecta, con la participación de una familia de proteínas conocidas como MBDs (proteínas con dominio de unión a CpGs), como lo son MeCP1 y MeCP2, las cuales son atraídas y se unen a las citosinas metiladas (Li y Zhang, 2014), reclutando proteínas con propiedades represivas asociadas a la cromatina (Figura 11), como lo son las desacetilasas de histonas (Bell et al, 2011). Sin embargo, se ha encontrado que además de las MBDs, factores transcripcionales que carecen de dominio de unión a CpGs también pueden interactuar con DNA metilado (Zhu et al, 2016).



**Figura 11.** Metilación del DNA. La metilación de DNA está asociada al silenciamiento de los genes, impidiendo la unión de factores transcripcionales a la región del promotor (a) o mediante el reclutamiento de proteínas con sitios de unión a citosinas metiladas (b). Los círculos blancos representan citosinas no metiladas, mientras que los negros, citosinas metiladas. Tomado y modificado de Zhu et al, 2016.

El donador de grupos metilo es la S-adenosilmetionina (SAM), la cual, a través de una reacción dependiente de ATP, es sintetizada a partir de metionina (Figura 12) (Anderson, 2012). Las metiltransferasas de DNA (DNMTs) son las enzimas encargadas de catalizar la reacción de metilación a partir de SAM y añadir el

grupo metilo al carbono 5' de la citosina. Existen dos tipos de DNMTs, la de mantenimiento (DNMT1), cuya función es mantener los patrones de metilación en el DNA, adicionando grupos metilo al DNA hemimetilado durante la replicación; y las de novo (DNMT3a y DNMT3b) las cuales establecen los patrones de metilación temprana en etapa embrionaria y durante la diferenciación (Subramaniam et al, 2014).



**Figura 12.** Ciclo de la metionina. En el ciclo de la metionina, ésta es convertida en SAM, donador de grupos metilo, por la enzima MAT en un proceso dependiente de ATP. Los grupos metilo son utilizados por la familia de las metiltransferasas dependientes de SAM para la metilación de DNA. ATP, adenosin trifosfato; BHMT, betaína homocisteína metil transferasa; DMG, dimetilglicina; MAT, metionina adenosiltransferasa; Pi, monofosfato; PPi, difosfato; SAM, S-adenosilmetionina; SAH S-adenosil homocisteína. Tomado y modificado de Yang y Vousden, 2016.

La metilación es un proceso dinámico, es decir, los grupos metilo pueden ser removidos, ya sea mediante la inhibición de la DNMT1 durante las divisiones celulares (desmetilación pasiva) o mediante la participación de una familia de DNA hidroxilasas llamadas proteínas TET (desmetilación activa).

Los patrones de metilación pueden ser transmitidos de célula a célula, sin embargo, puede haber cambios a lo largo de la vida de un individuo debido a respuestas fisiológicas ante cambios en el ambiente o a procesos patológicos.

#### **1.4.2 Modificaciones de las histonas**

Las regiones amino terminales de las histonas sobresalen de la estructura globular del nucleosoma, y pueden presentar modificaciones post-traduccionales (PTM) como la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación, las cuales marcan a las histonas para regular su función, afectando la compactación de la cromatina, ya que debido a estas modificaciones se favorecen o relajan las uniones de estas proteínas con el DNA, aumentando o disminuyendo la expresión génica (Fischle et al, 2003; Recillas y Escamilla, 2004).

## 1.5 Epigenética y estrés nutricional en el páncreas endocrino

Los factores ambientales pueden alterar el estado epigenético de ciertos genes y modular su actividad (Jaenish y Bird, 2003). Dichas señales pueden influir en la función celular, fisiología de los tejidos y en la salud metabólica (Jirtle y Skinner, 2007). Se ha demostrado que la nutrición modula la metilación del DNA y la modificación de las histonas (Sandovici et al, 2008). Aunque está bien establecido que la dieta puede influir en el epigenoma, existe evidencia de que la dieta durante periodos críticos del desarrollo puede tener un efecto permanente sobre las modificaciones epigenéticas de los promotores de algunos genes (Burdge y Lillycrop, 2010).

La modulación de estados epigenéticos provee un posible mecanismo por el cual la dieta materna tiene efectos a largo plazo sobre la progenie (Ozanne y Constância, 2007). Esta programación ha sido asociada a la metilación de DNA y a modificaciones en las histonas, influyendo así en la regulación de la expresión génica y en la memoria celular.

Como se mencionó anteriormente, en el páncreas existen diversos factores de transcripción fundamentales para un desarrollo y funcionamiento adecuado, uno de ellos es el Hnf4 $\alpha$ , el cual es necesario para la diferenciación de las células beta y la homeostasis de la glucosa, este gen cuenta con dos promotores, el proximal P1 y el distal P2. Estudios realizados por Sandovici y colaboradores demostraron que una dieta materna baja en proteínas afecta la interacción del promotor 2 del Hnf4 $\alpha$  con la región *enhancer* de este mismo gen, vía metilación del DNA y modificaciones de histonas, comprometiendo así, la salud metabólica (Sandovici et al, 2011).

Por otro lado, en el modelo de restricción de crecimiento intrauterino (IUGR), se ha reportado que la expresión del gen Pdx1 disminuye mediante mecanismos epigenéticos. Se realizaron ensayos de metilación de DNA y de modificaciones de histonas, y se observó que, en la rata, a la edad de 2 semanas, no había cambios en la metilación del promotor, sin embargo, la acetilación en las histonas H3 y H4 disminuyó en el grupo IUGR, lo cual indica que la regulación está dada,

principalmente, a través de modificaciones de las histonas (Park et al, 2008).

También se ha reportado que en islotes pancreáticos de pacientes diabéticos la metilación en el promotor del gen *Pdx1* se ve afectada, disminuyendo su expresión comparado con los controles (Yang et al, 2012).

## **2. Planteamiento del problema**

Una dieta baja en proteínas tiene efectos deletéreos en el páncreas de la progeñie, los cuales están asociados con enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2, caracterizada por la disfunción de las células beta pancreáticas. Su correcto funcionamiento depende de la expresión de diversos genes, entre los que se encuentran *Pdx1* y *MafA*, que regulan la expresión del gen de insulina, hormona de importancia vital en la homeostasis energética. Recientemente nuestro grupo de trabajo reportó que una dieta materna restringida al 50% de proteínas durante la gestación y la lactancia, produce en las crías, un envejecimiento prematuro de la función secretora del islote pancreático, así como un incremento en la expresión del gen de la insulina. Ya que la nutrición es un factor que influye en el desarrollo del feto y en mecanismos epigenéticos, es necesario estudiar en un modelo animal el efecto de este tipo de dieta materna durante la gestación sobre la regulación epigenética de los genes antes mencionados, específicamente, sobre la metilación de sus promotores.

## **3. Hipótesis**

Dado que los factores transcripcionales *Pdx1* y *MafA* regulan la expresión del gen de la insulina y que por literatura se sabe que la dieta materna y la nutrición intrauterina afectan el epigenoma de las crías, se piensa que los genes que codifican a estos factores transcripcionales podrían regularse a la baja por la metilación de sus promotores.

#### **4. Objetivo**

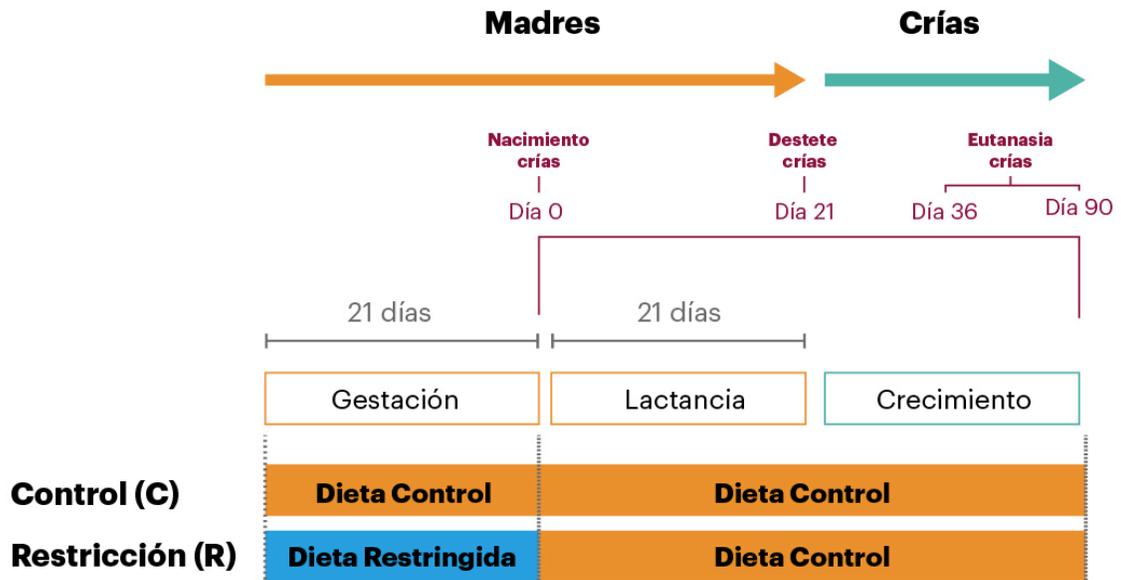
Estudiar la regulación por metilación de los promotores de los genes *Pdx-1* y *MafA* y el efecto sobre su expresión génica en islotes pancreáticos de ratas macho F1 provenientes de madres con restricción proteínica durante la gestación.

#### **5. Material y Métodos**

##### **5.1 Grupos experimentales**

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

Se utilizaron 30 ratas hembras de la cepa Wistar, que, al cumplir 90 días de edad, se aparearon con ratas macho de la misma cepa, colocando en cajas 2 hembras por cada macho. Para determinar el momento en el que quedaron preñadas, se les realizó un frotis vaginal, considerándose un resultado positivo la presencia de espermatozoides. Las ratas preñadas fueron separadas del macho para colocarla en una caja nueva y asignarle aleatoriamente la dieta correspondiente, dieta control (C) o dieta restringida en proteínas (R), la cual consumiría durante el periodo de gestación (ver composición de las dietas en la Tabla1). Después del periodo de lactancia, se les dio eutanasia a las madres, mientras que a las crías se les alimentó con dieta control. Los estudios se llevaron a cabo en las crías macho a dos edades, 36 (juveniles) y 90 días (adultos jóvenes) (Figura 13).



**Figura 13.** Esquema del modelo experimental. Las ratas preñadas del grupo control (C) fueron alimentadas con dieta control durante el período de gestación, cuya duración es de 21 días, y lactancia, mientras que las ratas preñadas del grupo con restricción (R), fueron alimentadas durante la gestación con dieta restringida en proteínas y en el momento de la lactancia, se les asignó dieta control. Las crías de ambos grupos fueron alimentadas con dieta control hasta los 36 y 90 días, que fue cuando se les dio eutanasia.

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

**Tabla 1.** Composición (%) de la dieta control y la dieta restringida en proteínas. Zambrano et al, 2005.

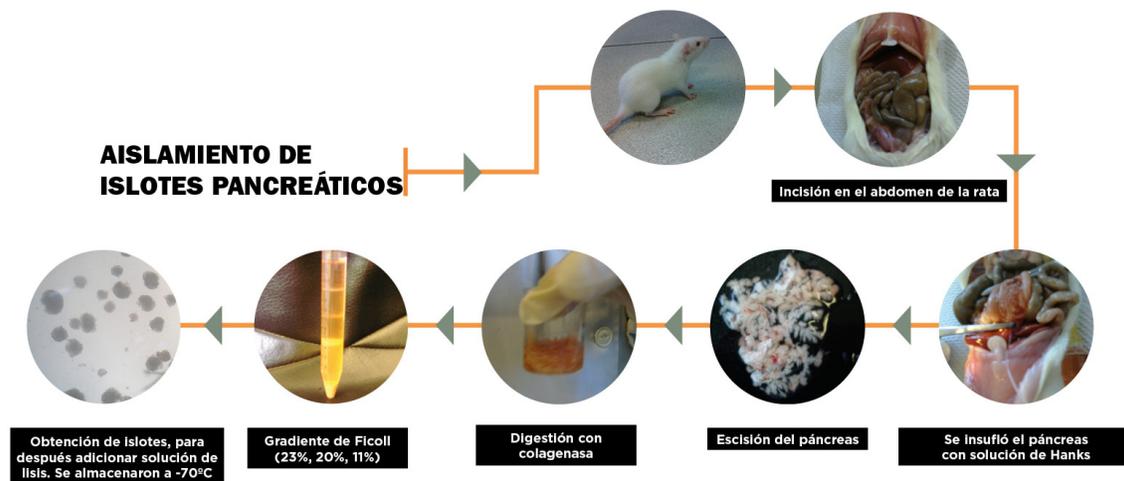
Los islotes pancreáticos se obtuvieron por el método de digestión con colagenasa, y a partir del RNA total se llevó a cabo una RT-PCR para después estudiar la expresión de los genes *Pdx1* y *MafA* con la técnica de PCR en tiempo real.

Con el fin de conocer el estado de metilación de los promotores de los genes *Pdx-1* y *MafA*, se realizó la obtención del DNA genómico de los islotes pancreáticos y los ensayos de detección de la metilación de los promotores de los genes de interés por la técnica de bisulfito de sodio y finalmente, se llevó a cabo una secuenciación de Sanger.

## 5.2 Aislamiento de islotes pancreáticos por digestión con colagenasa

Se decapitó a la rata con una guillotina e inmediatamente se colectó su sangre para la posterior obtención del suero y cuantificación de glucosa e insulina, una vez hecho esto, se colocó a la rata en posición supina y se le limpió con alcohol. Se cortó la piel en el centro del vientre y el músculo por el centro, realizando un corte diagonal de ambos lados hasta las costillas. Se llevó el músculo hacia atrás para poder cortar el esternón. Con pinzas de hemostasia se bloqueó el conducto de Wirsung para poder realizar un corte en el ámpula de váter y canular. El páncreas se insufló con 10 mL de solución de Hanks, para después escindirlo cortando con microtijeras, colocándolo en un vaso de precipitados con solución de Hanks. Se fragmentó el páncreas en otro vaso de precipitados junto con 3 mg de colagenasa, completando a 5 mL con la misma solución. Se vació en un matraz de plástico y colocó en el baño de agitación a 37° C y una velocidad de 170 golpes por minuto durante 5 min. El matraz se sacó del baño y sacudió con la mano fuertemente 10 veces, después, se regresó al baño de agitación por 4 minutos. Se vació a un tubo de plástico de 50 mL y se llevó a 25 mL ó 30 mL según el número de páncreas. Se centrifugó a 1000 rpm 3 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante dejando de 2 a 3 mL con la pastilla. Se completó el volumen a 25-30 mL con solución de Hanks y luego se centrifugó a 1000 rpm por 3 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante dejando de 2 a 3 mL con la pastilla y se resuspendió para después hacerlo pasar a través de una coladera; el volumen que se obtuvo se pasó a un tubo de plástico de 50 mL y se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se procedió a hacer un gradiente de ficol. A la pastilla se le agregó 6 mL de ficol al 27% y se homogenizó en vortex, posteriormente se adicionaron 3 mL de ficol a 23%, 20% y 11% por las paredes del tubo. Se centrifugó a 2100 rpm por 15 minutos. Se colectaron los islotes de la interfase de la última capa (11%) con una pipeta de plástico, tipo Pasteur, para proseguir con

dos lavados, éstos se llevaron a cabo pasando los islotes a un tubo de plástico con 15 mL de solución de Hanks, posteriormente se centrifugó a 800 rpm por 5 minutos. Después del segundo lavado, se decantó el sobrenadante y los islotes se vaciaron en una caja petri negra para recolectarlos con una micropipeta de 10 µL, bajo el microscopio estereoscópico (Figura 14). Los islotes se colectaron en un tubo de plástico de 1.5 mL, y por cada 250-300 islotes, se adicionó 1 mL de QIAzol Lysis reagent para después almacenarlos a -70°C.



**Figura 14.** Proceso para la obtención de islotes pancreáticos

### 5.3 Extracción de RNA

Para la extracción del RNA total se utilizó el *mini kit RNeasy lipid tissue* de Qiagen (no. cat. 74804) siguiendo las indicaciones del fabricante, y la concentración del RNA se cuantificó en un Luminómetro Biotek Synergy HT a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

## 5.4 RT-qPCR

Se llevó a cabo la síntesis de DNA complementario a partir del RNA total con el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* de Roche (no. catálogo 04379012 001) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

El estudio de la expresión génica se llevó a cabo mediante la técnica de PCR en tiempo real utilizando el equipo Light Cycler 2.0 de Roche. Las condiciones activación de la Taq DNA 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, 1 s). 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 (Tabla 2).

(<http://qpcr.probefinder.com/roche3.html>)

Gen	Oligonucleótido sentido (5'-3')	Oligonucleótido antisentido (5'-3')	Exón	Cromosoma
<b>MafA</b>	GACTTGCACAAGGGTCAAAGA	CCGGGTTCAAAGGTGAGTTA	1	7
<b>Pdx-1</b>	GGAGGTGTTGTGCCCTCA	CTAAGGCCGGAAGGCAGT	1	12
<b><math>\beta</math>-actina</b>	AAGGCCAACCGTGAAAAGAT	ACCAGAGGCATACAGGGACA	---	----

**Tabla 2.** Secuencia de los oligonucleótidos de los genes de interés para la PCR en tiempo real.

## **5.5 Extracción de DNA genómico**

Para la extracción de DNA genómico de islotes pancreáticos de rata se utilizó el *QIAmp DNA minikit* de Qiagen (no. catálogo 51306) siguiendo las indicaciones del protocolo para tejido y se cuantificó en un Luminómetro Biotek Synergy HT a una longitud de onda de 260 y 280nm. Para verificar la integridad del DNA, se llevó a cabo una electroforesis horizontal, preparando un gel de agarosa al 1% y cargando 250 ng de DNA en cada pozo. Se utilizó una escalera de DNA de 1kb como marcador de peso molecular (invitrogen no. cat. 10787018).

## **5.6 Estudio de metilación**

### **5.6.1 Metilación global de DNA genómico**

Se utilizó el kit *Imprint Methylated DNA Quantification* de Sigma-Aldrich (no. cat. MDQ1) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este kit se basa en el ensayo de ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima) que utiliza un anticuerpo anti-5-metil citosina.

## Procedimiento

### \* Unión del DNA al pozo

Se utilizó una caja de 96 pozos y a cada uno se le agregaron 200 ng de DNA diluido en solución de unión. Esta solución se utilizó como blanco. Se cubrió e incubó a 37°C durante 60 min.

Se adicionaron 150  $\mu$ L de solución de bloqueo directamente a cada pozo. Se cubrió e incubó a 37°C durante 60 min.

Se removió el DNA y la solución de bloqueo de cada pozo. Se lavó tres veces con 150  $\mu$ L de amortiguador de lavado 1X.

### Captura de DNA metilado

Se diluyó el anticuerpo de captura 1:1000 en amortiguador de lavado 1X. Se adicionaron 50  $\mu$ L de anticuerpo de captura diluido a cada pozo. Se cubrió e incubó a temperatura ambiente durante 60 min. Se removió el anticuerpo de captura diluido del pozo.

Se lavó cuatro veces con 150  $\mu$ L de amortiguador de lavado 1X. Se diluyó el anticuerpo de detección 1:1000 en amortiguador de lavado 1X. Se agregaron 50  $\mu$ L de anticuerpo de detección diluido a cada pozo. Se cubrió e incubó a temperatura ambiente durante 30 min.

Se removió el anticuerpo de detección del pozo. Se lavó cinco veces con 150  $\mu$ L de amortiguador de lavado 1X.

## Detección

Se agregaron 100  $\mu$ L de solución reveladora a cada pozo. Se cubrió e incubó a temperatura ambiente protegido de la luz durante 1-10 min.

Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas. Se calculó el nivel de metilación global relativa.

Para calcular los niveles de metilación relativa al DNA control metilado se realizó el siguiente procedimiento.

### ***Single Point Method***

Se obtuvo el promedio de la  $A_{450}$  ( $A_{450av}$ ) de las réplicas para el blanco, las muestras y el DNA control metilado.

Se realizó el siguiente cálculo para obtener el porcentaje de metilación de las muestras relativa al DNA metilado control:

$$[(A_{450\ av} \text{Muestra} - A_{450\ av} \text{Blanco}) / (A_{450\ av} \text{DNA control metilado} - A_{450\ av} \text{Blanco})] \times 100$$

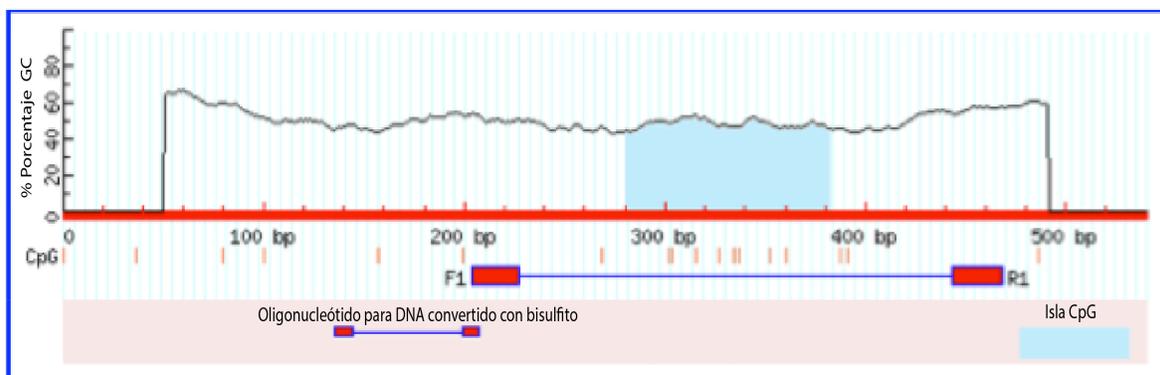
### **5.6.2 Estudio de metilación del DNA en los promotores de los genes *Pdx1* y *MafA***

Se utilizó el kit *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit* de ZIMO Research (no. cat. D5006), que se fundamenta en el método de conversión de DNA genómico con bisulfito de sodio, en el cual, las citosinas no modificadas se convierten en uracilos, mientras que las citosinas modificadas no cambian durante el tratamiento.

Para la amplificación del DNA convertido, se diseñaron oligonucleótidos especiales con el software *Methprimer* (<http://www.urogene.org/methprimer/>) (Figura 15) para la región del promotor de MafA (Raum et al, 2006), y en el caso de la región del promotor proximal del Pdx1, en donde se estudiaron 12 sitios CpG, se tomaron como referencia los oligonucleótidos reportados por el grupo de trabajo de la Dra. Rebeca Simmons (Park et al, 2008), cuyas secuencias se muestran en la Tabla 3. Para las PCRs de punto final, se utilizó la polimerasa *Platinum Taq DNA Polymerasa* de Invitrogen (no. cat. 10966-030).

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño del amplicón (pb)
<b>Pdx1</b>	AGGATAGGAGAGATTAGTTTGTGA	CTACAAACCAAACCTTAAACACT	269
<b>MafA</b>	TGGGGTTTGGTAAATGTTTTTATT	CCCTCCAACAAACACTTCAATATACT	265

**Tabla 3.** Secuencia de los oligonucleótidos para el estudio del perfil de metilación de los promotores de Pdx1 y MafA.



**Figura 15.** Representación de los oligonucleótidos sentido y antisentido en la zona del promotor de MafA obtenidos con el software Methprimer express. Las líneas rojas verticales corresponden a los 11 sitios CpG, el área iluminada de color azul indica una isla CpG.

A partir de los productos de PCR, el DNA se sub-clonó en el vector pGEM-T Easy de Promega (no. cat A1360) (Tabla 4), con el que se transformaron bacterias competentes DH5 $\alpha$  Top 10 para generar un gran número de copias del plásmido para su análisis por secuenciación de Sanger de 10 clonas independientes por cada tratamiento.

El procedimiento se llevó a cabo adicionando las cantidades de los reactivos mencionados a continuación:

Reactivo	Volumen 1X ( $\mu$ L)
<b>Vector</b>	0.5
<b>T4 DNA Ligasa</b>	1
<b>Buffer 2X</b>	6
<b>Inserto</b>	4.5

**Tabla 4.** Reactivos utilizados para la clonación de los productos de PCR.

El volumen final de cada reacción fue de 12 $\mu$ L, una vez adicionados todos los reactivos y el inserto, se incubó toda la noche y al día siguiente las muestras se dejaron a temperatura ambiente.

Después de la incubación a temperatura ambiente, en zona estéril, se colocaron 20  $\mu$ L de Xgal y 7  $\mu$ L de IPTG [0.8M] y se distribuyeron con una varilla de vidrio (previamente flameada) en placas con agar LB y ampicilina. Se colocó la caja en una incubadora a 37°C durante 1h.

Por otro lado, se descongelaron las células competentes (bacterias competentes DH5 $\alpha$  Top 10). Una vez descongeladas, se agregaron 70 $\mu$ L de éstas a 6 $\mu$ L de cada reacción de ligación, se procedió a una incubación en hielo durante 30 minutos, agitando manualmente cada 5 minutos.

Posteriormente, se dio un choque térmico de 1 minuto a 42°C y se incubó en hielo por 3 minutos. Se adicionó 1 mL de medio LB y se transfirió a un tubo de cultivo. Se incubó durante 1h, a 37°C con agitación de 250rpm.

Una vez transcurrida la hora de incubación a 37°C, se transfirió el volumen de los tubos de cultivo a tubos de plástico de 1.5mL nuevos y estériles y centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos.

Se descartó el sobrenadante, procurando que quedara un volumen alrededor de 100µL en el cual se resuspendió el pellet. Se colocó todo el volumen de la resuspensión en la caja Petri con el agar LB (previamente adicionada con IPTG y con Xgal), y se sembró en toda la placa con una varilla de vidrio. Se llevó a cabo una incubación de 37°C durante 12h. Después de la incubación, se dejaron a temperatura ambiente. Los cultivos se colocaron a 4°C. Se preparó el volumen equivalente de medio LB tal que se adicionaron 4mL de éste a cada tubo por clona de la siguiente manera: 50µL de Ampicilina 200 µg/µL---100mL de medio.

Se agregó a cada tubo 4mL de LB adicionado con ampicilina en zona estéril. Se seleccionaron 15 colonias blancas de cada tratamiento, numerándolas y marcándolas con un círculo en el anverso de la caja.

Se requirieron 2 cajas con agar LB, las cuales se marcaron a la mitad y cada mitad correspondía a un tratamiento. Con palillos estériles, se tomó la colonia seleccionada y se sembró estriando en el lugar correspondiente. Después, se sumergió el palillo en los tubos con el medio LB líquido. Se incubaron los tubos a 37°C con una agitación de 250rpm y las cajas a la misma temperatura por 12h.

De cada tubo de ensayo, se tomaron 1.5mL y se colocaron en tubos y se centrifugó a 6000rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y nuevamente del tubo de ensayo, se vació al tubo de 1.5mL, se centrifugó hasta utilizar todo el cultivo.

Se adicionó a cada muestra 100 µL de solución P1(glucosa 50mM, Tris-Cl 25mM, EDTA 10mM) se agitó en vortex para resuspender el pellet, después se adicionaron 200 µL de la solución P2 (NaOH 10M, SDS 10%), se agitó

suavemente por inversión y se dejó a temperatura ambiente por 10 min, después se adicionó 150  $\mu$ L de la solución 3 (acetato de potasio 5M, ácido acético glacial, agua), se dejó 10 min en hielo y se agitó por inversión 3 veces.

Se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante (decantando a un tubo nuevo de 1.5mL). Se lavó con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Se centrifugó a 14 000 rpm. Se agregó 1 mL de etanol absoluto y dejó precipitando toda la noche a -20°C.

Se centrifugó a 14000 rpm a temperatura ambiente durante 5 min. Se decantó el etanol y en una sanita se voltearon los tubos para dejar secar el pellet entre 15 y 20 min. Para después adicionar 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O con RNasa.

Se prosiguió con las digestiones utilizando la enzima EcoRI (no. cat. R0101S), las cantidades de los reactivos que se utilizaron se mencionan a continuación:

Reactivo	Volumen 1X ( $\mu$ L)
DNA	3
Buffer	2.5
Enzima EcoRI	0.2
H <sub>2</sub> O	19.3

**Tabla 5.** Reactivos utilizados para las digestiones.

El volumen final fue de 25  $\mu$ L. Se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se llevó a cabo una electroforesis para observar los insertos de interés. Corroborado esto mediante el gel, entonces se tomaron las muestras de los parches con un palillo estéril y se colocaron dentro de un tubo de ensayo con 5mL de medio LB líquido adicionado con ampicilina. Se incubaron a 37°C, 250 rpm durante 12h. De cada tubo de ensayo, se tomaron 1.5mL y se colocaron en tubos y se centrifugó a 6000rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y nuevamente del tubo de ensayo, se vació al tubo de 1.5mL, se centrifugó hasta utilizar todo el cultivo. Ya

que quedaron los pellets, se procedió a la extracción del DNA con el kit GeneAll Hybrid-Q (no. catálogo 100-102) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez extraído el DNA, las muestras se mandaron al laboratorio GENEWIZ para su análisis por secuenciación de Sanger, 10 clonas independientes por cada tratamiento.

### **5.7 Análisis estadístico**

Los valores son expresados como la media  $\pm$  EE. del número de experimentos realizados (indicado en cada pie de las gráficas). El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba de t de student. Un valor de  $p < 0.05$  consideró estadísticamente significativo. Para el porcentaje de la metilación en los promotores se realizó una prueba no paramétrica. Un valor de  $p < 0.05$  consideró estadísticamente significativo.

## 6. Resultados

### 6.1 Medición de glucosa e insulina en suero

Se cuantificaron los niveles de glucosa en suero de las crías macho de 36 y 90 días de edad con un analizador automático y la insulina con el método de radioinmunoanálisis (RIA). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Edad (días)	36		90	
	C	R	C	R
n=5				
[Glucosa] mg/dL	108±7.61	106.4±8.37	119.6±6.329	119.6±12.52
[Insulina] ng/mL	0.161±0.05	0.167±0.05	1.127±0.214*	1.129±0.2*

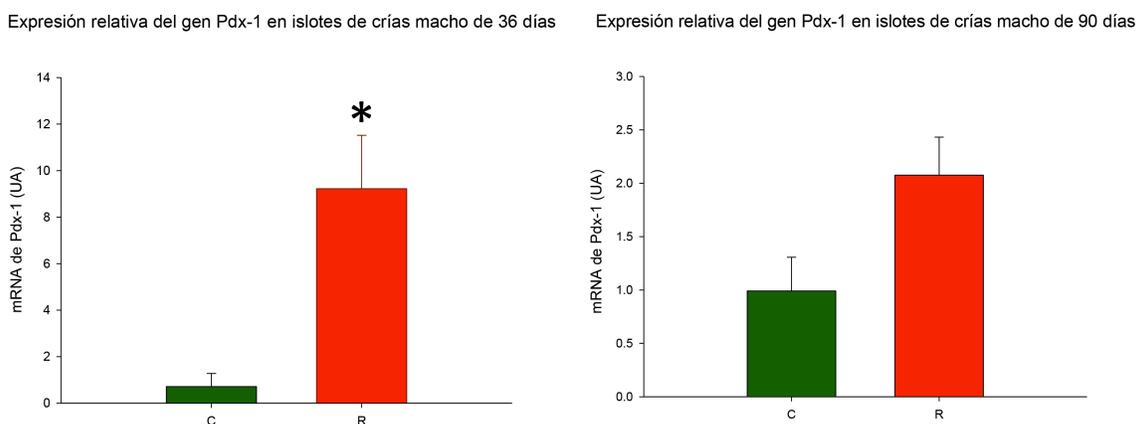
**Tabla 6. Resultados de glucosa e insulina en suero.** Concentración de glucosa e insulina sérica en crías macho de 36 y 90 días de edad provenientes de madres alimentadas con dieta control (C) o dieta restringida en proteínas (R) durante la gestación. Los resultados representan la media ± EE. n=5 \*P<0.05 comparado contra el mismo grupo a 36 días de edad.

Se encontró que los valores de glucosa no variaron entre grupos ni entre las dos edades, en cuanto a la insulina, tampoco se hallaron diferencias significativas entre grupos a la misma edad, sin embargo, al comparar este parámetro a los 36 y a los 90 días dentro del mismo grupo, C o R, hubo un aumento estadísticamente significativo en las crías de 90 días de edad.

Para determinar el efecto de una restricción proteínica materna sobre la expresión de los factores transcripcionales Pdx1 y MafA, se llevaron a cabo ensayos de PCR en tiempo real utilizando como control el gen constitutivo  $\beta$ -actina.

## 6.2 Estudio de la expresión del gen Pdx1 en ratas macho F1

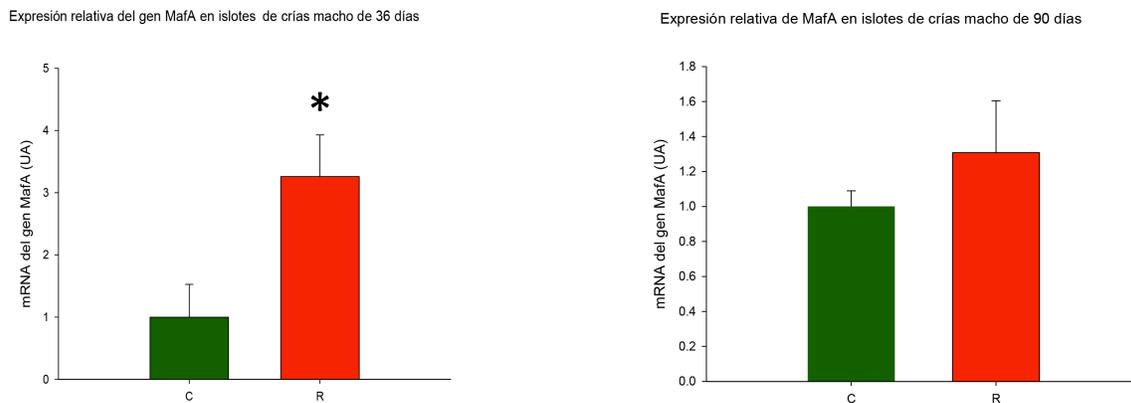
A los 36 días de edad, se observa un aumento significativo en la expresión del gen Pdx1 en los islotes pancreáticos de las crías provenientes de madres con una dieta restringida en proteínas durante la gestación con respecto al grupo control, mientras a la edad de 90 días, existe una tendencia al incremento en la expresión de este gen en el grupo restringido comparado con el grupo control, sin embargo, no fue un cambio estadísticamente significativo, por otro lado, al comparar entre edades, existe una disminución estadísticamente significativa en el grupo R a 90 días comparado con el grupo R a 36 días de edad (Figura 16).



**Figura 16.** Expresión relativa en unidades arbitrarias (UA) del gen Pdx1 con respecto al gen  $\beta$ -actina en islotes pancreáticos de ratas macho F1 de 36 y 90 días de edad. C: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta control, R: crías provenientes de madres alimentadas con dieta restringida durante la gestación. Los resultados representan la media  $\pm$  EE. n=3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$  comparado con el control.

### 6.3 Estudio de la expresión del gen MafA en ratas macho F1

Al igual que el gen Pdx1, a los 36 días de edad, se observó un aumento significativo en la expresión del gen MafA en los islotes pancreáticos de las crías provenientes de madres con una dieta restringida en proteínas durante la gestación con respecto al grupo control, mientras que a la edad de 90 días, existe una tendencia al incremento en la expresión de este gen en el grupo restringido con respecto al grupo control, aunque estadísticamente no fue un cambio significativo, al comparar entre mismo grupo y diferente edad, no se encontró diferencia significativa (Figura 17).

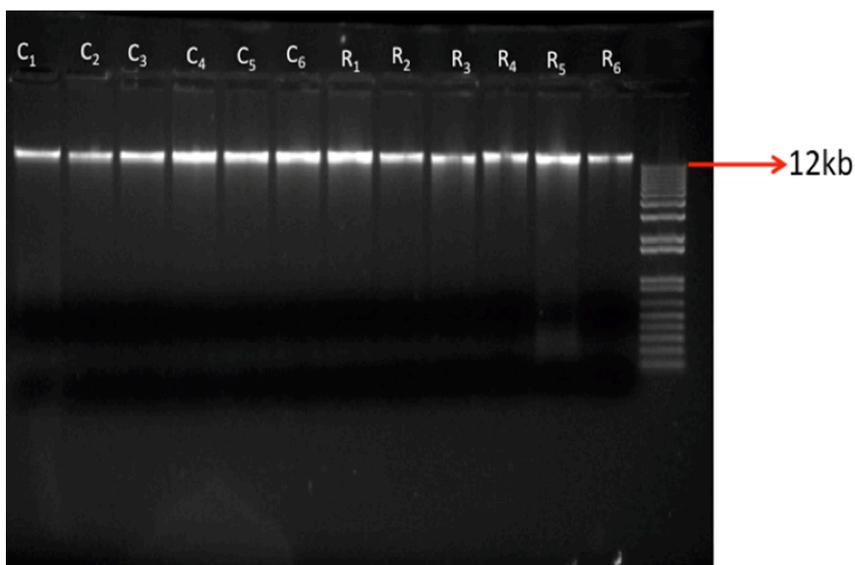


**Figura 17.** Expresión relativa en unidades arbitrarias (UA) del gen MafA con respecto al gen  $\beta$ -actina en islotes pancreáticos de ratas macho F1 de 36 días de edad. C: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta control, R: Crías provenientes de madres alimentadas con dieta restringida durante la gestación. Los resultados representan la media  $\pm$  EE. n=6 experimentos independientes. \*p<0.05 comparado con el control.

Debido a que a la edad de 36 días se encontraron cambios significativos en los niveles de expresión de ambos genes, y que a las modificaciones epigenéticas se les ha descrito como potenciales mecanismos detrás de la programación del desarrollo (Bianco-Miotto, 2017), se decidió evaluar si la regulación de estos factores de transcripción era vía metilación del DNA.

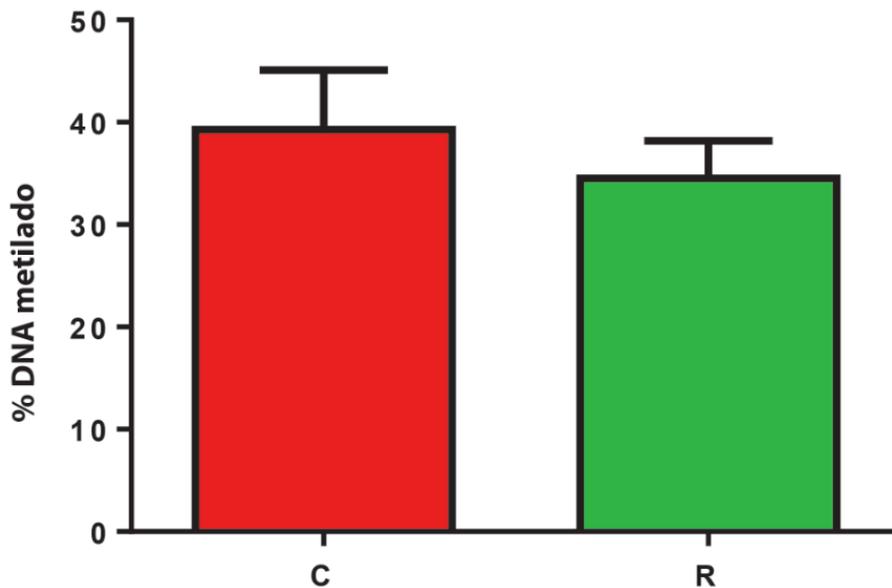
#### 6.4 Análisis de metilación global de DNA genómico de islotes pancreáticos de ratas macho de 36 días

Se verificó la integridad de las muestras de DNA genómico que se utilizarían para los ensayos de metilación mediante un gel de agarosa al 1% (Figura 18). Se observa que todas las bandas tienen un tamaño mayor a 12kb, por lo que la integridad es adecuada para los experimentos posteriores.



**Figura 18.** Integridad de las muestras de DNA genómico utilizadas en el ensayo de metilación global. En el gel se observan seis muestras diferentes correspondientes al grupo control, representadas con C y seis muestras correspondientes al grupo restringido, representadas con R. Escalera de DNA de 12kb.

Una vez comprobada la integridad de las muestras de DNA, se llevó a cabo el ensayo de la metilación global, los resultados se muestran en la Figura 19.

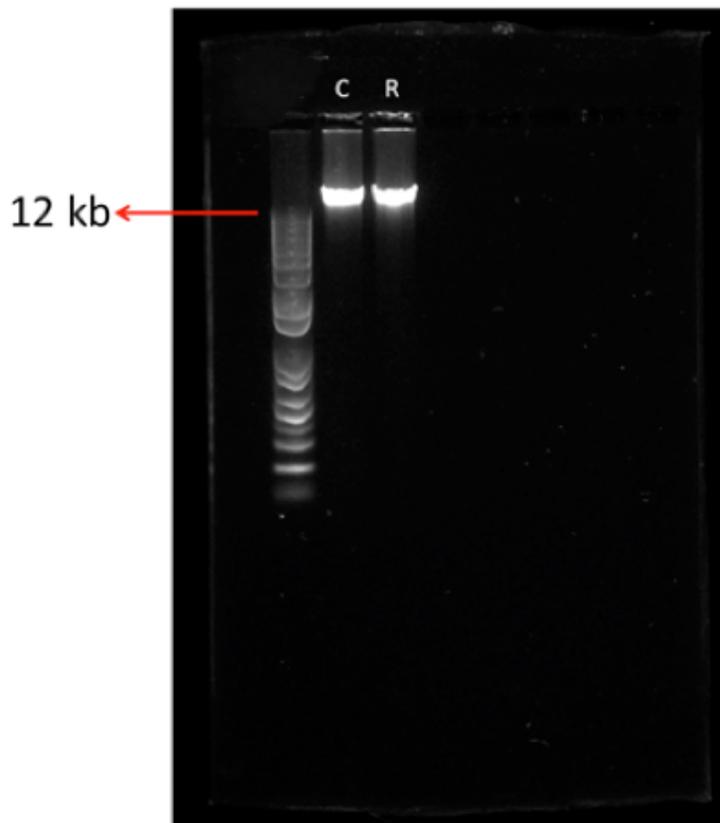


**Figura 19.** Porcentaje de DNA metilado en islotes pancreáticos en crías macho de 36 días de edad. C: Grupo control, R: Grupo con restricción proteínica. n=5, los datos representan la media ± EE.

Se observa una tendencia a la disminución en la metilación global del grupo restringido comparado con el grupo control. Dada esta tendencia observada, se decidió estudiar la metilación en cada residuo de citosina en los promotores de los genes de interés.

## 6.5 Análisis de metilación de los promotores de Pdx1 y MafA con la técnica de bisulfito de sodio

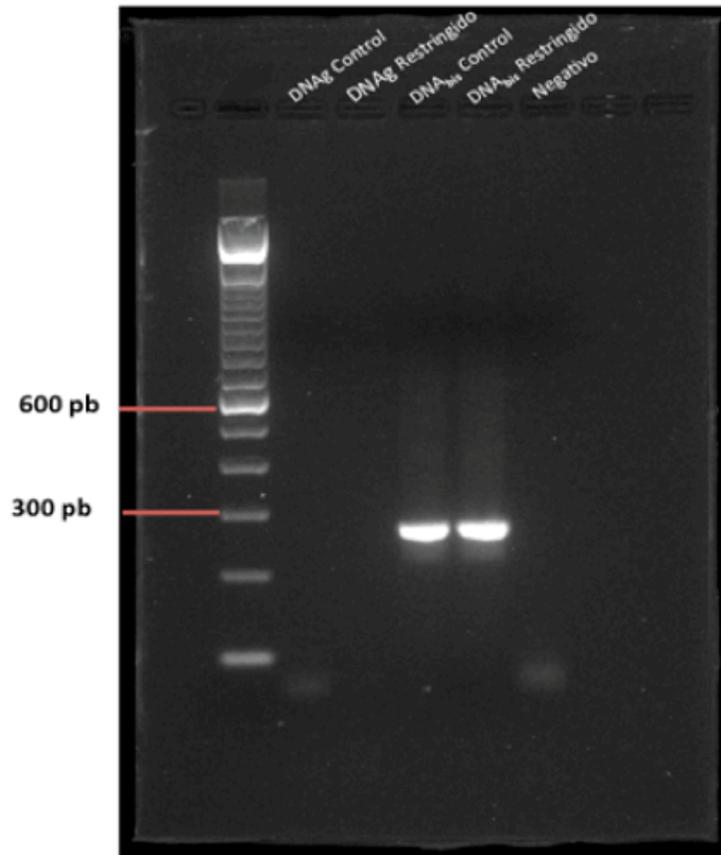
Se utilizó el DNA genómico de dos ratas macho de 36 días de edad del grupo control y dos del grupo restringido de madres diferentes y se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1% como se muestra en la Figura 20.



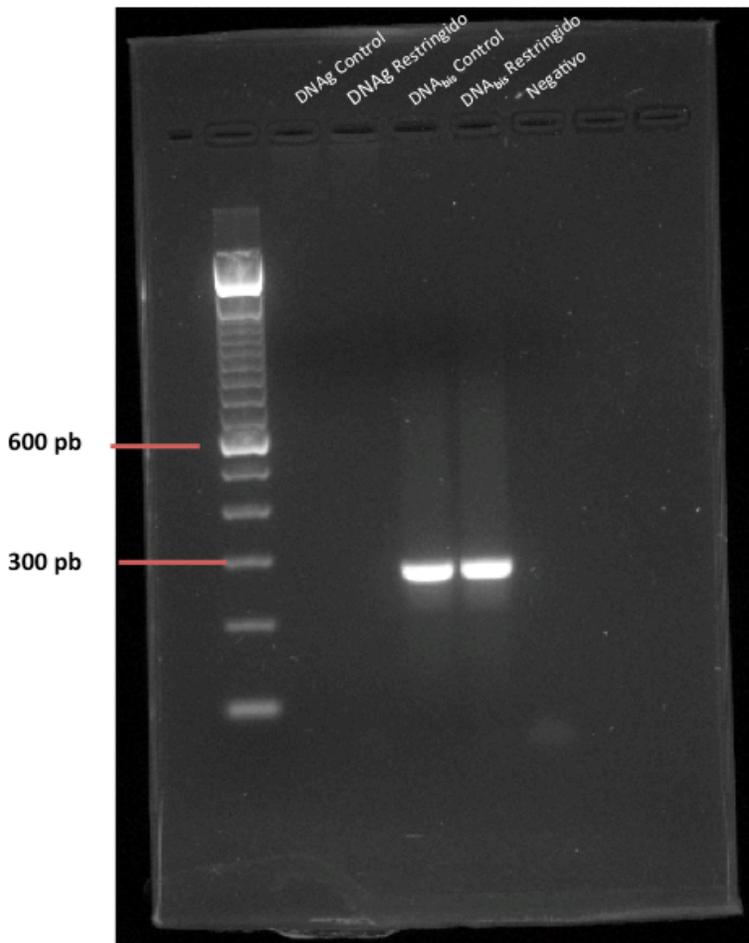
**Figura 20.** Integridad de las muestras de DNA genómico utilizadas en el análisis de metilación de los promotores. En el gel se observan dos muestras diferentes correspondientes al grupo control, representada con una C y la otra muestra correspondiente al grupo restringido, representada con una R.

Una vez comprobada la integridad, se procedió a la conversión de ese DNA genómico y la subsecuente PCR de punto final. A continuación, se muestra un gel

representativo de agarosa al 2% de los productos de PCR de MafA (Figura 21) y Pdx1 (Figura 22) en donde se utilizaron los oligonucleótidos especiales que hibridarían con un DNA convertido. Como control se utilizó DNA genómico en donde estos oligonucleótidos no deberían hibridar. El tamaño del amplicón es de 265 y 269 pares de bases, respectivamente, lo cual concuerda con lo que se observó en los geles.



**Figura 21.** Gel de agarosa que muestra los productos de PCR convertidos con bisulfito de sodio correspondiente al promotor de MafA para el grupo control y restringido. Tamaño del amplicón: 265 pares de bases.

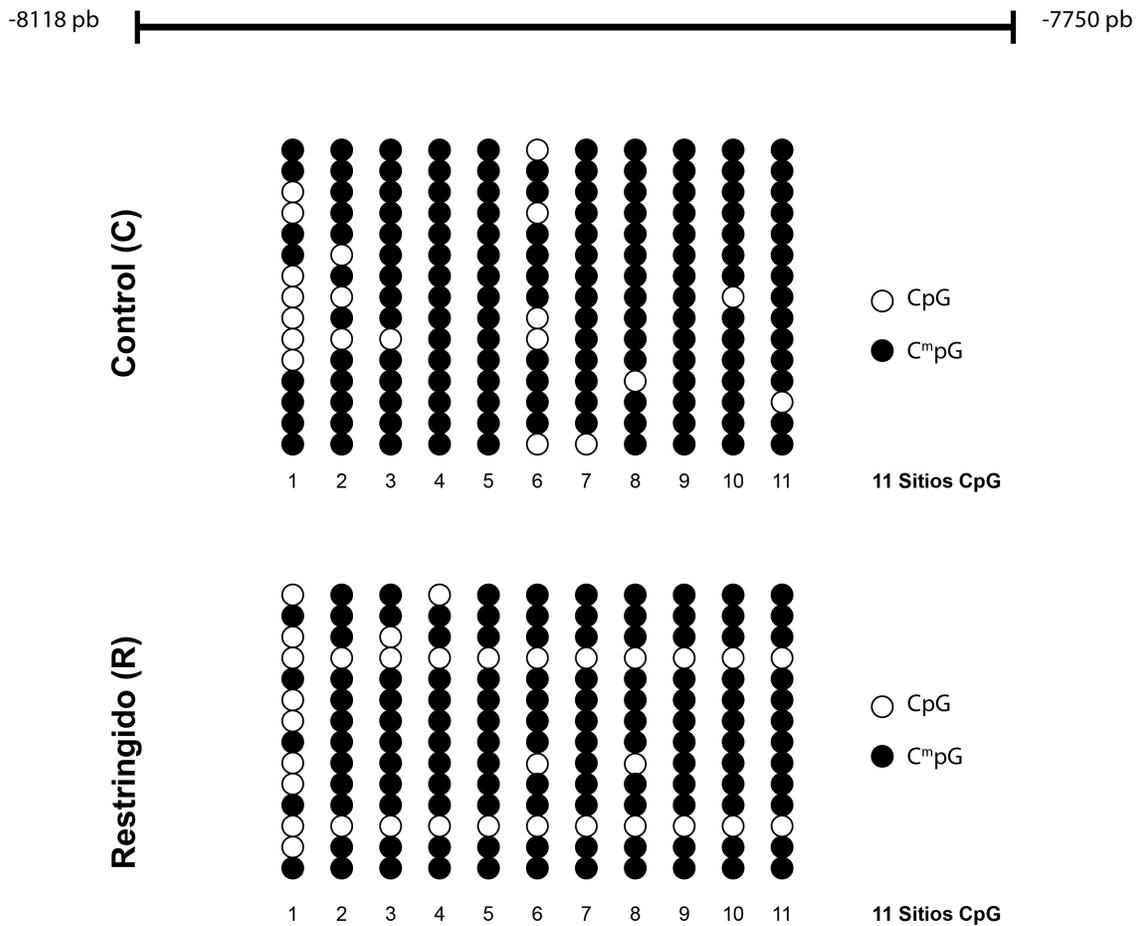


**Figura 22.** Gel de agarosa que muestra los productos de PCR convertidos con bisulfito de sodio correspondiente al promotor de Pdx1 para el grupo control y restringido. Tamaño del amplicón: 269 pares de bases.

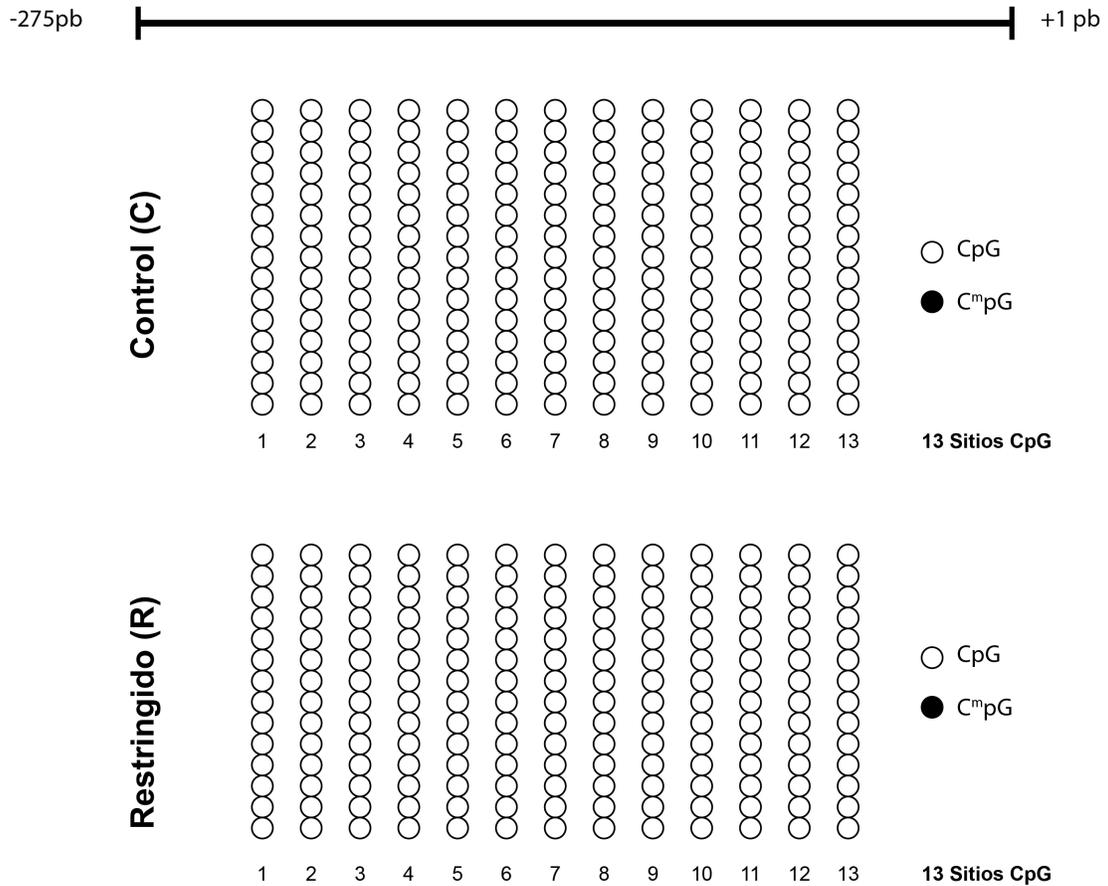
Una vez obtenidos los productos de PCR deseados, el DNA se sub-clonó en el vector *pGEM-T Easy* con el que se transformaron bacterias competentes DH5 $\alpha$  Top 10 para generar un gran número de copias del plásmido para su análisis por secuenciación de Sanger de 10 clones independientes por cada tratamiento. En las figuras 23 y 24 se muestra la representación de los resultados obtenidos.

Para la región regulatoria de MafA, se encontró que el número de citosinas metiladas en el grupo restringido fue significativamente menor comparado con el

grupo control, indicando una hipometilación (Figura 23). Para la región regulatoria de Pdx1 no se observaron citosinas metiladas en ninguno de los dos grupos estudiados (Figura 24).



**Figura 23.** Estado de metilación de DNA de la región regulatoria R3 de MafA (Raum et al, 2006). Los círculos blancos representan citosinas no metiladas y los círculos negros citosinas metiladas. Se analizaron 11 sitios CpG. Las líneas horizontales representan a las clonas. n= 2.



**Figura 24.** Estado de metilación de DNA del promotor proximal de Pdx1 (Park et al, 2008). Los círculos blancos representan citosinas no metiladas y los círculos negros citosinas metiladas. Se analizaron 13 sitios CpG. Las líneas horizontales representan a las clonas. n= 2

## 7. Discusión

La hipótesis de Barker o programación del desarrollo propone que, si existe un estímulo dañino durante ventanas críticas del desarrollo, como la gestación, el feto desarrollará mecanismos compensatorios para beneficiar a órganos vitales, como el cerebro, a expensas de otros, como el páncreas endocrino (Barker 1995; Gluckman et al, 2008). Durante el presente estudio, se trabajó con un modelo de rata, de una dieta materna baja en proteínas durante la etapa de gestación para estudiar su efecto en el páncreas de las crías macho a la edad de 36 y 90 días. Lo primero que se midió, fueron los niveles de glucosa e insulina en sangre en ambas edades, en donde no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y restringido, sin embargo, en estudios previos dentro del grupo de trabajo (Morimoto et al, 2012a) se observó en islotes pancreáticos de rata *in vitro*, que a la edad de 36 días, la respuesta secretora de la insulina a dos concentraciones diferentes de glucosa (5mM y 11 mM) aumentó en crías macho provenientes de madres alimentadas con una dieta baja en proteínas durante la gestación con respecto al grupo control, lo cual sugiere un mecanismo compensatorio que incrementa la secreción de insulina para mantener las concentraciones normales en de esta hormona en sangre.

La expresión del gen de la insulina está regulada por diversos factores transcripcionales, entre los que se encuentran Pdx1 y MafA, los cuales son de vital importancia para la secreción de insulina inducida por glucosa. En este trabajo, se observó que, a los 36 días de edad, la expresión génica de ambos factores en islotes pancreáticos de rata aumenta de manera significativa en el grupo restringido (R) comparado con el control (C), mientras que a la edad de 90 días no se observa tal diferencia y los niveles de expresión génica vuelven a estar al mismo nivel que el grupo control. Este aumento en la expresión, a su vez, podría estar provocando el aumento en la expresión del gen de la insulina observado en otros estudios de nuestro grupo de trabajo (Sosa, 2013).

El modelo de restricción proteínica materna es uno de los más utilizados en el

estudio de la programación del desarrollo, y podemos comparar los resultados obtenidos en este trabajo con lo demostrado por Arantes y colaboradores en 2002, quienes manejaron tres grupos experimentales, en el primero, a las madres se les alimentó con dieta control durante la gestación y la lactancia (C), en el segundo con una dieta baja en proteínas durante la gestación y lactancia (LP), y en el tercero, solamente se les alimentó con dieta restringida (R) en proteínas durante la gestación y al comienzo de la lactancia se les cambió la dieta a control. Estos autores encontraron que, en ratas de 28 días de edad, los niveles de mRNA de Pdx1 en el grupo C y LP eran iguales y en el grupo R aumentaban con respecto al control (Arantes et al, 2002).

Por otro lado, Rodríguez-Trejo y colaboradores también observaron un aumento en la expresión del gen Pdx1 en ratas de 7 días de edad provenientes de madres alimentadas con dieta restringida en proteínas durante la gestación y control durante la lactancia (Rodríguez-Trejo et al, 2012).

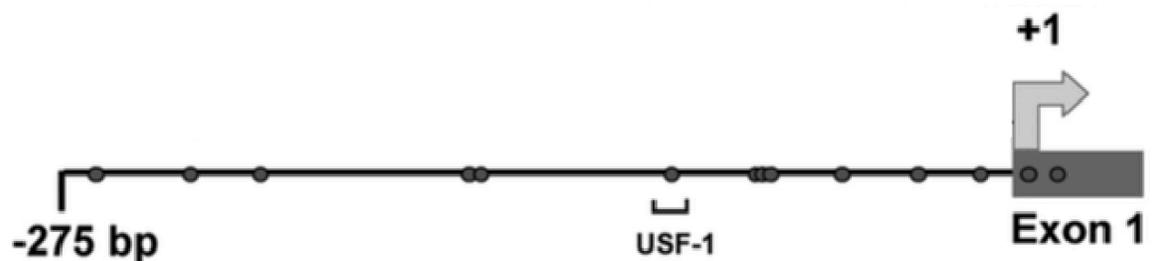
Los datos de Pdx1 obtenidos en este trabajo sugieren que el aumento en la expresión en el grupo restringido, con respecto al control, puede representar un mecanismo compensatorio para inducir la transcripción del gen de la insulina y mantener los niveles de glucemia, que como lo muestra en la Tabla 2 son similares en ambos grupos; y aunque al principio podría ser benéfico este aumento en la expresión del gen de la insulina, a largo plazo, podría darse un agotamiento de la célula beta pancreática. Además de que sería importante determinar la cantidad de proteína para saber si se está presentando otro tipo de regulación, ya que Arantes y colaboradores encontraron que, a nivel de la proteína, Pdx1 en el grupo C y R no presentaban diferencias, mientras que el LP mostraba una disminución, indicando una regulación postranscripcional del gen (Arantes, 2002).

Los mecanismos detrás de la programación del desarrollo se le atribuyen a la epigenética, principalmente a la metilación del DNA y a las modificaciones de histonas, y ya que se observaron cambios en la expresión génica a la edad de 36 días, se decidió llevar a cabo un estudio de metilación global, en donde, aunque

no se observa un cambio estadísticamente significativo, la tendencia muestra que en el grupo R disminuye, indicando una hipometilación en este grupo comparado con el control. El donador de grupos metilo es SAM (S-adenosilmetionina), y se ha visto que en dietas deficientes en proteínas podría disminuir esta donación debido a la baja en la fuente, que en este caso sería la metionina (Pogribny et al. 2006).

A pesar de esto, no se tienen datos de la regulación epigenética del Pdx1 en el modelo de restricción de proteínas. Lo que se conoce es que, en el modelo de restricción del crecimiento intrauterino (IUGR, por sus siglas in inglés), en donde hay un déficit de nutrimentos en general, Park y colaboradores evaluaron la regulación epigenética del Pdx1, para ello, estudiaron diferentes edades, 2 semanas y 3 meses de edad, en donde no observaron cambios en la metilación sino en el enriquecimiento de marcas de histonas asociadas a la represión de la transcripción (Park et al, 2008), y en el presente trabajo, tampoco se encontró una diferencia en los niveles de metilación del promotor proximal de Pdx1 entre grupos ni entre edades.

Después de obtener los datos de metilación global, se decidió averiguar si esta tendencia se veía a nivel de los promotores de los genes de interés y se llevó a cabo el ensayo de metilación mediante la conversión con bisulfito de sodio.



**Figura 25.** Región proximal del promotor de Pdx-1 (Park, 2008).

La región del promotor proximal (Figura 25), en donde se asocia el factor de transcripción USF1, es muy significativa, ya que incluye una isla CpG altamente conservada y, según algunos reportes, es la región más importante para la regulación de la transcripción de Pdx1 (Qian, 1999; Melleoul, 2002). En el presente estudio, se encontró, que esta región no se encuentra metilada en los islotes pancreáticos de las crías de 36 días de edad del grupo control, así como del grupo restringido, lo cual sugiere, que el mecanismo de regulación epigenética no es vía metilación del DNA o que en esta región en particular no se ve afectada, ya que existe otra área para su regulación que se encuentra a -6.2kb con respecto al sitio de inicio de la transcripción (Melloul, 2002). Además, existen otros mecanismos epigenéticos, tales como, las modificaciones de histonas. Por ejemplo, la marca de H3K4me3 está asociada a genes transcripcionalmente activos, y se reportó que en ratas fetales del modelo de IUGR (Park, 2008) no hubo diferencia entre los niveles de metilación de la H3K4 entre las ratas control y las del grupo IUGR, mientras que a las de dos semanas de edad disminuyó y a los 6 meses estaba totalmente ausente. La pérdida de la trimetilación de H3K4, puede iniciar la dimetilación de la lisina 9 en la H3, modificación asociada a un estado de heterocromatina. En el trabajo de Park y colaboradores (Park et al, 2008), se observó que las marcas de histonas tuvieron una mayor influencia en la regulación epigenética del gen Pdx-1, y aunque se observaron resultados distintos en este modelo y en el de restricción de proteínas, la regulación epigenética en nuestro modelo, podría estar dada por esa vía.

En el mismo modelo de restricción de proteínas, pero en hígado, se observa que la acetilación global de H3 aumenta (Nowacka-Wozuk, 2018). La evaluación de la acetilación global de H3 mostró un aumento significativo en hígados fetales en la F1, mientras que a las 4 semanas de edad esta diferencia no se mantenía. En los fetos del grupo con restricción de proteínas el incremento de la acetilación en la H3 tuvo una correlación positiva con la expresión génica de los genes estudiados. Estos resultados indican que la dieta con restricción proteínica en etapa prenatal puede afectar la actividad de los genes involucrados en mecanismos epigenéticos

en el hígado a lo largo de generaciones, además de influir en el estado de acetilación global de la H3 en hígado fetal.

El gen MafA, a diferencia de otros factores de transcripción, solamente se expresa en células beta en etapas tardías del desarrollo, se han descrito seis áreas que regulan la expresión de este gen mediante la unión de factores transcripcionales como el FoxA2 y Pdx1, concluyendo que la región distal localizada de -7772 a -8888 pares de bases con respecto al sitio de inicio de la transcripción es la más importante para su regulación (Raum et al, 2006). A pesar de la importancia de este gen, no existen muchos estudios que describan su regulación a nivel epigenético, en el presente trabajo, debido a los cambios observados en la expresión génica de MafA en los islotes de crías de rata macho de 36 días de edad, se decidió explorar el papel de la metilación del DNA en la regulación de la expresión de este gen y se observó que en el grupo restringido hay un número menor de citosinas metiladas comparadas con el grupo control, lo cual concuerda con el incremento en la expresión del gen en los islotes pancreáticos de estas crías. Se sabe, que la no metilación en los promotores, está asociada a un aumento en la transcripción y a una cromatina relajada, ya que, al no estar presentes los grupos metilo en las citosinas que forman parte de los dinucleótidos CpG, no habría impedimento para la unión de factores de transcripción importantes para la expresión génica o bien, ya que las proteínas MBDs reconocen al grupo metilo, no tendrían donde unirse por lo que no reclutarían a los remodeladores de la cromatina, desacetilasas de histonas ni metilasas asociadas a la represión de la expresión de los genes.

Alejandro y colaboradores, reportan que, en un modelo de restricción de proteínas, la expresión del gen MafA en ratones a una edad de 90 días (adultos) no mostró una diferencia significativa comparado con el grupo control (Alejandro et al, 2014), lo cual concuerda con lo encontrado en el presente trabajo, sin embargo, a edades juveniles, no hay información reportada.

La metilación es un proceso que se lleva a cabo durante la replicación, los patrones de metilación se mantienen debido a la actividad de la DNA

metiltransferasa Dnmt1 La pérdida de la actividad de metilación puede resultar de una desmetilación pasiva, que está asociada a una pérdida gradual de la actividad de la DNA metil transferasa de mantenimiento DNMT1 cuyo blanco es el DNA hemimetilado, o de una activa, en donde se involucran las proteínas TET y la oxidación de la 5mC a 5hmC (Hill et al, 2014; Branco et al, 2011), por lo que una posible explicación a lo encontrado en este trabajo en el grupo R, en el que se observa la tendencia a un menor porcentaje de metilación en el promotor distal de MafA, es que el patrón de metilación del DNA cambia, lo que haría que se expresara más el gen a consecuencia de la deficiencia de proteínas en la dieta materna, específicamente del aminoácido metionina, y se ha visto que dietas deficientes en donadores de grupos metilo resulta en hipometilación global del DNA en roedores (Pogribny et al, 2006).

Una de las limitantes del presente estudio es que la técnica utilizada para medir los niveles de metilación, es que no detecta diferencia entre la 5-metil citosina e hidroximetil citosina, que indica el proceso de oxidación relacionado con la desmetilación activa. (Huang, 2010).

Por otro lado, el aumento en la expresión del gen se tendría que corroborar con los niveles de proteína. Podría estar llevándose a cabo una compensación con el fin de expresar la suficiente cantidad del factor MafA para regular al gen de la insulina, sin embargo, como se mencionó previamente, a largo plazo esto podría llevar al agotamiento de la célula beta, lo cual traería efectos negativos para la cría en términos metabólicos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que una dieta materna baja en proteínas aumenta la expresión génica de *Pdx-1* y *MafA*, sin embargo, en el primer caso no se observó diferencia en los niveles de metilación entre los grupos, sugiriendo que otros mecanismos epigenéticos podrían estar involucrados. En el caso de MafA, aunque se observó menor metilación en el grupo de restricción de proteínas, y que podría ser en parte responsable del aumento en la expresión génica de MafA, se deben estudiar otros mecanismos epigenéticos que podrían estar involucrados.

## 8. Conclusiones

Una dieta materna baja en proteínas aumenta la expresión de los genes *Pdx-1* y *MafA* en islotes pancreáticos de ratas macho a los 36 días de edad.

A los 90 días de edad, una dieta materna baja en proteínas no afecta la expresión de *Pdx-1* ni de *MafA* en islotes pancreáticos de ratas macho.

La regulación de la expresión de *Pdx-1* en crías macho de ratas alimentadas con una dieta restringida en proteínas, no es vía metilación del DNA en la región estudiada.

Para *MafA*, aunque se observó una hipometilación en la región estudiada en los islotes pancreáticos de crías macho por efecto de una dieta materna restringida en proteínas, no se descartan otros mecanismos regulatorios de la expresión génica.

## 9. Perspectivas

- Estudiar las modificaciones post-traduccionales de histonas en el promotor proximal de *Pdx-1* y de *MafA*
- Estudiar las modificaciones post-traduccionales de histonas en la región distal del *Pdx-1*
- Estudiar la expresión del gen que codifica a la DNMT1 y ver la correlación con los niveles de metilación de los genes estudiados en este trabajo.

## 10. Referencias

Alejandro EU, Gregg B, Wallen T, et al. Maternal diet-induced microRNAs and mTOR underlie  $\beta$  cell dysfunction in offspring. *J Clin Invest* 2014;124:4395e4410.

Allen L (2006). "Pregnancy and lactation" In: Present knowledge in nutrition, Ed Bowman BA, Russell RM, 9a Edition. International Life Sciences Institute. 2: 403–425.

Anderson OS, Sant KE y Dolinoy DC (2012). Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem*; 23(8):853-9.

Andrali SS, Sampley ML, Vanderford NL, Ozcan S (2008). Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem J*; 415(1):1-10.

Antequera F (2003). Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci.* ;60(8):1647-58

Aramata S, Han SI, Kataoka K (2007). Roles and regulation of transcription factor MafA in islet  $\beta$ -cells. *Endocrinol J*; 54: 659–666.

Arantes VC, Teixeira VP, Reis MA, Latorraca MQ, Leite AR, Carneiro EM, Yamada AT, Boschero AC (2002). Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. *J Nutr*; 132(10):3030-5.

Barella LF, de Oliveira JC, Mathias PC (2013). Pancreatic islets and their role in metabolic programming. *Nutrition*; 30 (4): 373-379.

Barker DJ (1995). "The fetal and infant origins of disease." *Eur J Clin Invest*; 25:457–63.

Butler JE y Kadonaga JT (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev*;16(20):2583-92.

Bell O, Tiwari VK, Thomä, NH y Schübeler D (2011). Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nature Rev Genet*; 12, 554–564.

Bianco-Miotto T, Craig JM, Gasser YP, van Dijk SJ y Ozanne SE (2017). Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond. *J Dev Orig Health Dis*. 2017 Oct;8(5):513-519.

Bird (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*;16:6–21.

Branco MR, Ficz G, Reik W (2011). Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat Rev Genet*; 13(1):7-13.

Burdge GC y Lillycrop KA (2010). Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: Implications for understanding human disease. *Annu Rev Nutr*; 30:315–339.

Buttriss JL, Stanner SA y Wyness LA (2013). Nutrition and development: short- and long-term consequences for health. Londres: British Nutrition Foundation. 1<sup>a</sup> ed; 356 pp.

Calzada L, Morales A, Sosa-Larios TC, Reyes-Castro LA, Rodríguez-González GL, Rodríguez-Mata V, Zambrano E, Morimoto S (2016). Maternal protein restriction during gestation impairs female offspring pancreas development in the rat. *Nutr Res*; 36(8):855-62.

Cerf ME, Muller CJ, Du Toit DF, Louw J, Wolfe-Coote SA. (2005). Transcription factors, pancreatic development, and beta cell maintenance. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 326:699–702.

Choi SW y Friso S (2010). Epigenetics: A new bridge between nutrition and health. *Adv Nutr*; 1:8–16.

Dassaye R, Naidoo S, Cerf ME (2016). Transcription factor regulation of pancreatic organogenesis, differentiation and maturation, *Islets*, 8:1, 13-34.

de Oliveira JC, Mello Gomes R, Aparecida Miranda R, Barella L, Malta A, Peixoto Martins I, da Silva Franco C, Pavanello A, Torrezan R, Marçal Natali M, Lisboa P, de Freitas Mathias PC y de Moura E (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

Dikstein, R (2011). The unexpected traits associated with core promoter elements. *Transcription*; 2, 201–206.

Dolenšek J, Marjan Slak Rupnik y Stožer A (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*; 7:1, e1024405.

Dumortier O, Hinault C, Gautier N, Patouraux S, Casamento V, van Obberghen E (2014). Maternal protein restriction leads to pancreatic failure in offspring: Role of misexpressed microRNA-375. *Diabetes*; 63:3416–3427.

Duque-Guimarães DE, Ozanne SE (2013). Nutritional programming of insulin resistance: causes and consequences. *Trends Endocrinol Metab*; 24(10):525-35.

Fan YM, Hernesniemi J, Oksala N, Levula M, Raitoharju E, Collings A, Hutri-Kähönen N, Juonala M, Marniemi J, Lyytikäinen LP, Seppälä I, Mennander A, Tarkka M, Kangas AJ, Soininen P, Salenius JP, Klopp N, Illig T, Laitinen T, Ala-Korpela M, Laaksonen R, Viikari J, Kähönen M, Raitakari OT, Lehtimäki T (2014). Upstream Transcription Factor 1 (USF1) allelic variants regulate lipoprotein metabolism in women and USF1 expression in atherosclerotic plaque. *Sci Rep*; 4:4650.

Felsenfeld G y Groudine M (2003). Controlling the double helix. *Nature*; 421: 448-453.

Fischle W, Wang Y, Allis CD (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol*; 15:172–183.

Frantz ED, Peixoto-Silva N, Pinheiro-Mulder A (2012). Endocrine pancreas development: effects of metabolic and intergenerational programming caused by a protein-restricted diet. *Pancreas*; 41:1-9.

Gluckman PD y Hanson MA (2004). Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Semin Fetal Neonat M*; 9: 419–425.

Gluckman PD, Cutfield W, Hofman P, Hanson MA (2005). The fetal, neonatal, and infant environments the long-term consequences for disease risk. *Early Hum Dev*; 81:51–59.

Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL (2008). Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med*; 359, 61–73.

Guzmán C, García-Becerra R, Aguilar-Medina MA, Méndez I, Merchant-Larios H, Zambrano E (2014). Maternal protein restriction during pregnancy and/or lactation negatively affects follicular ovarian development and steroidogenesis in the prepubertal rat offspring. *Arch Med Res*; 45:294–300.

Hales CN y Barker DJ (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*; 35: 595–601.

Hang Y, Stein R (2011). MafA and MafB activity in pancreatic  $\beta$  cells. *Trends Endocrinol Metab*; 22:364-273.

Henquin JC (2000) Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*. 49: 1751–1760.

Hill PW, Amouroux R, Hajkova P (2014). DNA demethylation, Tet proteins and 5-hydroxymethylcytosine in epigenetic reprogramming: an emerging complex story. *Genomics*;104:324–333.

Huang Y, Pastor WA, Shen Y, Tahiliani M, Liu DR, Rao A (2010). The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS One* ;5: e8888.

Hughes SE, Hawley RS. Heterochromatin: A rapidly evolving species barrier. *PLoS Biol*. 2009;7: 1–4.

Hunter CS, Maestro MA, Raum JC, Guo M, Thomson F, Ferrer J, stein R (2011). Hnf1 $\alpha$  (MODY3) regulates  $\beta$ -cell-enriched MafA transcription factor expression. *Mol Endocrinol*; 25:339–347.

Jaenisch R y Bird A (2003). Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*; 33:245–254.

Jirtle RL, Skinner MK (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet*; 8:253–262.

Johansson KA y Grapin-Botton A (2002). Development and diseases of the pancreas. *Clin Genet*; 62: 14–23.

Juven-Gershon T, Kadonaga JT (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol*. 339(2):225-9.

Kaneto H, Miyatsuka T, Fujitani Y, Noguchi H, Song KH, Yoon KH y Matsuoka TA. (2007). Role of PDX-1 and MafA as a potential therapeutic target for diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*; 77 (Suppl. 1), S127–S137.

Kim JK, Samaranyake M y Pradhan S (2009). Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci*; 66: 596 – 612.

Layden BT, Durai V y Lowe Jr WL (2010). G-Protein-Coupled-Receptors, Pancreatic Islets, and Diabetes. *Nature Education*; 3(9):13.

Lee TI, Young RA (2013). Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*; 152(6):1237-51.

Lenhard B, Sandelin A, Carnici P (2012). Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat Rev Genet*; 13(4):233-45.

Li E y Zhang Y (2014). DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 1;6(5): a019133.

Lima NS, de Moura EG, Passos MC, Nogueira Neto FJ, Reis AM, de Oliveira E, Lisboa PC (2011). Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. *Br J Nutr*; 105:1405–1413.

Martin-Gronert MS y Ozanne SE (2012). Metabolic programming of insulin action and secretion. *Diabetes Obes Metab*; 14 (3): 29–39.

Matsuoka TA, Artner I, Henderson E, Means A, Sander M y Stein R (2004). The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci*; 101: 2930–2933.

Melloul D, Marshak S, Cerasi E (2002). Regulation of pdx-1 gene expression. *Diabetes*; 51(Suppl 3): S320–S325.

Morimoto S, Calzada L, Sosa TC, Reyes LA, Rodriguez-González GL, Morales A, Nathanielsz PW and Zambrano E (2012a). Emergence of ageing-related changes in insulin secretion by pancreatic islets of male rat offspring of mothers fed a low-protein diet. *Br J Nutr*; 107:1562-1565.

Morimoto S, Sosa TC, Calzada L, Reyes-Castro LA, Díaz-Díaz E, Morales A, Nathanielsz PW and Zambrano E (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. *J Dev Orig Hlth Dis*; 3:483-488.

Nowacka-Woszuik J, Szczerbal I, Malinowska AM, Chmurzynska A (2018) Transgenerational effects of prenatal restricted diet on gene expression and histone modifications in the rat. *PLoS ONE* 13(2): e0193464.

Ozanne SE y Constância M (2007). Mechanisms of disease: The developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*; 3:539–546.

Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA. (2008). Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest*; 118:2316e2324.

Pogribny IP, Ross SA, Wise C, Pogribna M, Jones EA, Tryndyak VP, James SJ, Dragan YP, Poirier LA (2006). Irreversible global DNA hypomethylation as a

key step in hepatocarcinogenesis induced by dietary methyl deficiency. *Mutat Res*; 593:80–7.

Qian J, Kaytor EN, Towle HC, Olson LK (1999). Upstream stimulatory factor regulates Pdx-1 gene expression in differentiated pancreatic beta-cells. *Biochem J* 341:315–322.

Raum JC, Gerrish K, Artner I, Henderson E, Guo M, Sussel L, Schisler JC, Newgard CB, Stein R (2006). FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 regulate islet b-cell-specific mafA expression through conserved sequences located between base pairs -8118 and -7750 upstream from the transcription start site. *Mol Cell Biol*; 26:5735–5743.

Ravelli ACJ, Van der Meulen JH, Michels RPJ, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP (1998). Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet*; 351: 173–177.

Recillas-Targa F y Escamilla del Arenal M (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje Bioquímico*; 28:173-201.

Reusens B y Remacle C (2006). Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment. *Int J Biochem Cell Biol*;38(5-6):913-22.

Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med*; 48: e219.

Rodríguez-Trejo A, Ortiz-López MG, Zambrano E, Granados-Silvestre Mde L, Méndez C, Blondeau B, Bréant B, Nathanielsz PW, Menjivar M (2012). Developmental programming of neonatal pancreatic  $\beta$ -cells by a maternal low-protein diet in rats involves a switch from proliferation to differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 302(11): E1431-9.

Sandovici I, Smith NH, Ozanne SE, Constância M (2008). In: *Epigenetics*. Tost J, editor. Norfolk, UK: Caister Academic; pp. 343–370.

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

Sharma S, Leonard J, Lee S, Chapman HD, Leiter EH, Montminy MR (1996). Pancreatic islet expression of the homeobox factor STF-1 relies on an E-box motif that binds USF. *J Biol Chem*; 271:2294–2299.

Sharma S, Jhala US, Johnson T, Ferreri K, Leonard J, Montminy M (1997). Hormonal regulation of an islet-specific enhancer in the pancreatic homeobox gene STF-1. *Mol Cell Biol*; 17:2598–2604.

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

Sosa T (2013). Estudio de la expresión de los genes de la insulina, Glut2, glucosina, Pdx1, Klf11 y ATF en crías de rata con restricción de proteínas durante la gestación y la lactancia. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional.

Stoffel M, Stein R, Wright CV, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Bell GI (1995). Localization of human homeodomain transcription factor insulin promoter factor 1 (IPF1) to chromosome band 13q12.1. *Genomics*; 28:125–126.

Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S (2014). DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol*; 1;4:80

Taher L, Narlikar L, Ovcharenko I (2015). Identification and computational analysis of gene regulatory elements. *Cold Spring Harb Protoc*; 2015(1), [pdb.top083642](https://doi.org/10.1101/083642).

Torres N, Bautista CJ, Tovar AR, Ordaz G, Rodriguez-Cruz M, Ortiz V, Granados O, Nathanielsz PW, Larrea F, Zambrano E (2010). Protein restriction during pregnancy affects maternal liver lipid metabolism and fetal brain lipid composition in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 298: E270–E277.

Weber M, Hellman I, Stadler M, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M y Schübeler D (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*; 39, 457–466.

Yamamoto K, Matsuoka T, Kawashima S, Takebe S, Kubo N, Miyatsuka T, Kaneto H, y Shimomura I (2013). A novel function of Onecut1 protein as a negative regulator of MafA gene expression. *J Biol Chem*; 288 (30): 21648–21658.

Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, Kirkpatrick CL, Malmgren S, Jing X, Renström E, Wollheim CB, Nitert MD, Ling C (2012). Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol*; 26(7):1203-12.

Yang M, Vousden KH (2016). Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nat Rev Cancer*; 16(10):650–62.

Yates A, Wasii Akanni, M. Ridwan Amode, Daniel Barrell, Konstantinos Billis, Denise Carvalho-Silva, Carla Cummins, Peter Clapham, Stephen Fitzgerald, Laurent Gil, Carlos Garcín Girón, Leo Gordon, Thibaut Hourlier, Sarah E. Hunt, Sophie H. Janacek, Nathan Johnson, Thomas Juettemann, Stephen Keenan, Ilias Lavidas, Fergal J. Martin, Thomas Maurel, William McLaren, Daniel N. Murphy, Rishi Nag, Michael Nuhn, Anne Parker, Mateus Patricio, Miguel Pignatelli, Matthew Rahtz, Harpreet Singh Riat, Daniel Sheppard, Kieron Taylor, Anja Thormann, Alessandro Vullo, Steven P. Wilder, Amonida Zadissa, Ewan Birney, Jennifer Harrow, Matthieu Muffato, Emily Perry, Magali Ruffier, Giulietta Spudich, Stephen J. Trevanion, Fiona Cunningham, Bronwen L. Aken, Daniel R. Zerbino, Paul Flicek. Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res.* 44 Database issue: D710-6.

Yokoi N, Serikawa T, Walther R (1997). Pdx1, a homeodomain transcription factor required for pancreas development, maps to rat chromosome 12. *Exp Anim*; 46:323–324.

Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Garcia-Becerra R, Boeck L, Diaz L, Menjivar M, Larrea F & Nathanielsz PW (2005). A maternal low protein diet

during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol.* 563: 275–284.

Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, Esaki R, Harada A, Shimohata H, Oishi H, Hamada M, Morito N, Hasegawa K, Kudo T, Engel JD, Yamamoto M, Takahashi S (2005). MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion, *Mol. Cell. Biol.* 25 :4969–4976.

Zhu H, Wang G, Qian J (2016). Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nat Rev Genet*; 17: 551–565.