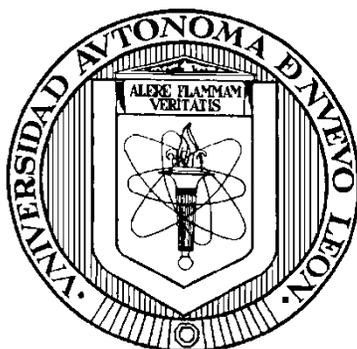


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EXPRESIÓN INDUCIBLE DE hPPAR γ EN EL HÍGADO DE RATONES

C57BL/6 CON DIABETES *MELLITUS* TIPO 2

Por

SONIA MONTERO MOLINA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

Junio, 2019

**“EXPRESIÓN INDUCIBLE DE hPPAR γ EN EL HÍGADO DE RATONES
C57BL/6 CON DIABETES *MELLITUS* TIPO 2”**

Aprobación de la Tesis:

DR. ISAÍAS BALDERAS RENTERÍA

Presidente

DR. OMAR GONZÁLEZ SANTIAGO

Secretario

DRA. PATRICIA GONZÁLEZ BARRANCO

Vocal

DR. JOSÉ ÁNGEL MERINO MASCORRO

Vocal

DRA. DVORAK MONTIEL CONDADO

Vocal

DRA. MA. ARACELI HERNÁNDEZ RAMÍREZ

Sub-Directora de Posgrado

RESUMEN

Sonia Montero Molina

Fecha de Graduación: Junio, 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título del Estudio: EXPRESIÓN INDUCIBLE DE hPPAR γ EN EL HÍGADO
DE RATONES C57BL/6 CON DIABETES *MELLITUS*
TIPO 2**

Número de páginas: 149

**Candidato para el grado de
Doctorado en Ciencias con
Orientación en Farmacia**

Área de Estudio: Farmacia

Propósito y Método del Estudio: La diabetes *mellitus* tipo 2 es una enfermedad crónica degenerativa caracterizada por una resistencia a la insulina. PPAR γ es un receptor nuclear implicado en el metabolismo lipídico y de la glucosa, favoreciendo la sensibilidad a la insulina. Se llevó a cabo una expresión inducida de *hPPAR γ* en el hígado de ratones C57BL/6 por medio de terapia génica hidrodinámica, en ratones con diabetes tipo 2. Se empleó una co-transfección de un sistema inducible Tet-On y se analizó la inducción de la expresión de *hPPAR γ* , así como los niveles de glucosa, insulina y adiponectina plasmática.

Contribuciones y Conclusiones: Se llevó a cabo la expresión inducible de *hPPAR γ* *in vitro* (células HEK293T) y también *in vivo*, en el hígado de ratones con diabetes tipo 2, generándose un incremento en la tolerancia a la glucosa y niveles de adiponectina plasmática similares a los de los animales sanos.

FIRMA DEL ASESOR:

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por darme la oportunidad de realizar los estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

Al Dr. Isaías Balderas Rentería, mi asesor de tesis, por su orientación y apoyo brindado durante este tiempo.

Al Dr. Eder Arredondo y a la Dra. Mónica Ramírez por su apoyo y ayuda durante todo este tiempo.

A la Dra. Lucía Cantú, Dra. Patricia González y Dr. Omar González por sus sugerencias y orientación para la realización de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Elizeth, Jorge Solís, Jorge Zacatecas, Evelyn, Rodrigo, Juan José, Adriana, Yuri, Jesús, Adela, Diego, Ceci, Tania, David, Bryan, Víctor, Alan y José Luis.

A mis padres y a Mónica Cruz por su apoyo incondicional durante todo este tiempo y por sus ánimos y consejos.

DEDICATORIA

A mi abuelo

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Antecedentes.....	3
1.2.1 Diabetes <i>mellitus</i>	3
1.2.1.1 Definición, características y tipos de diabetes.....	3
1.2.1.2 Características de la diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	4
1.2.1.3 Tratamiento de la diabetes tipo 2.....	6
1.2.2 Resistencia a la insulina.....	9
1.2.3 Modelos de diabetes en animales.....	11
1.2.4 PPAR gamma.....	14
1.2.5 Sistemas de expresión inducible.....	19
1.2.6 Terapia génica.....	20
1.3 Justificación.....	24
1.4 Hipótesis.....	25
1.5 Objetivos y metas.....	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1 MATERIALES	27
2.1.1 Animales.....	27

2.2 MÉTODOS	28
2.2.1 Diseño y construcción de los vectores para la expresión inducida de PPAR γ humano en el hígado de ratones C57BL/6.....	28
2.2.1.1 Clonación del gen <i>PPARγ</i> humano en el vector pTRE3G-ZsGreen1.....	30
2.2.1.2 Clonación del gen <i>TET-ON</i> en el vector pALB-GFP.....	39
2.2.2 Expresión transitoria de PPAR γ humano en células HEK293T.....	44
2.2.2.1 Mantenimiento de la línea celular HEK293T.....	44
2.2.2.2 Transfección transitoria en células HEK293T con el polímero Xfect Polymer (Clontech).....	46
2.2.2.3 Extracción de RNA total a partir de células HEK293T.....	48
2.2.2.4 Síntesis de DNA complementario por retrotranscripción y PCR tiempo real.....	49
2.2.2.5 Evaluación de la expresión de ZsGreen1 por medio de fluorescencia.....	53

2.2.3 Inducción del modelo de diabetes tipo 2 en ratones C57BL/6.....	53
2.2.4 Terapia génica hidrodinámica para la expresión de PPAR γ en el hígado de ratones C57BL/6.....	56
2.2.4.1 Extracción de plásmidos pTRE-ZsGreen1-PPAR γ y pALB-TETON.....	56
2.2.4.2 Estandarización de la expresión de PPAR γ en hígado de ratones C57BL/6.....	57
2.2.4.2.1 Inyección intravenosa de los plásmidos en la vena caudal.....	57
2.2.4.2.2 Estandarización de la expresión de PPAR γ en hígado de ratones C57BL/6 sanos por PCR punto final.....	58
2.2.5 Determinación de la expresión génica de PPAR γ en hígado por PCR punto final en ratones diabetizados y controles.....	60
2.2.6 Determinación de los niveles de glucosa, insulina y adiponectina plasmática.....	61
2.2.6.1 Niveles de glucosa en sangre y prueba de tolerancia a glucosa.....	61

2.2.6.2	Determinación de insulina plasmática en ratones diabetizados y grupo control.....	65
2.2.6.3	Determinación de adiponectina plasmática en ratones diabetizados y grupo control.....	66
2.2.7	Determinación de la expresión de PPAR γ en hígado por dot blot.....	67
2.2.8	Análisis estadístico.....	69
2.2.9	Disposición de residuos generados.....	70
3.	RESULTADOS.....	71
3.1	Diseño y construcción de los vectores para la expresión inducida de PPAR γ humano en el hígado de ratones C57BL/6.....	71
3.1.1	Clonación del gen PPAR γ en el vector pTRE3G-ZsGreen1.....	72
3.1.2	Clonación del gen TET-ON en el vector pALB-GFP.....	75
3.2	Transfección transitoria de hPPAR γ en células HEK293T.....	80
3.2.1	Evaluación de la expresión de hPPAR γ por PCR tiempo real en células HEK293T co-transfectadas.....	80
3.2.2	Evaluación de la expresión de ZsGreen1.....	88

3.3 Inducción del modelo de diabetes tipo 2 en los ratones C57BL/6.....	89
3.3.1 Estandarización del modelo de diabetes tipo 2.....	89
3.3.2 Inducción del modelo de diabetes tipo 2.....	94
3.4 Estandarización de la expresión de <i>PPAR</i> γ humano en hígado tras la administración plasmática por terapia génica hidrodinámica.....	101
3.5 Expresión inducida de <i>PPAR</i> γ humano en hígado evaluada por PCR punto final.....	105
3.6 Determinación de los niveles de glucosa, insulina y adiponectina plasmática en ratones diabetizados y control, antes y después del tratamiento.....	109
3.6.1 Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.....	109
3.6.2 Determinación de los niveles de insulina plasmática.....	112
3.6.3 Determinación de los niveles de adiponectina plasmática.....	115
3.7 Determinación de la expresión de <i>PPAR</i> γ en hígado por medio de dot blot.....	118
4. DISCUSIÓN.....	120

4.1 Diseño y construcción de los vectores para la expresión inducible de PPAR γ humano bajo un sistema de tetraciclina (Tet-On).....	120
4.2 Expresión transitoria de PPAR γ humano recombinante en células HEK293T bajo un sistema de expresión inducible Tet-On.....	120
4.3 Modelo de inducción de diabetes tipo 2.....	123
4.4 Expresión de PPAR γ humano en hígado de ratones C57BL/6 por medio de terapia génica hidrodinámica.....	127
4.5 Niveles de glucosa, insulina y adiponectina plasmática antes y después del tratamiento con terapia génica.....	130
4.6 Determinación de la expresión de PPAR γ en hígado por medio de dot blot.....	138
5. CONCLUSIONES.....	139
PERSPECTIVAS.....	141
BIBLIOGRAFÍA.....	142
RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....	149

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
I. Secuencia de los primers diseñados para la amplificación de <i>PPARγ</i> y un fragmento confirmatorio de pTRE3-ZsGreen1, además de las Tm y porcentaje de GC.....	33
II. Reacción de PCR punto final para la amplificación de <i>PPARγ</i>	34
III. Reacción de PCR para confirmar la naturaleza del vector de clonación pTRE3G-ZsGreen1.....	34
IV. Condiciones para la reacción de PCR de <i>PPARγ</i> empleando Platinum SuperFi Green Master mix PCR (Invitrogen).....	35
V. Reacción de digestión de <i>PPARγ</i> y pTRE3-ZsGreen1 con <i>Mlu</i> I.....	36
VI. Reacción de digestión de <i>PPARγ</i> y pTRE3-ZsGreen1 con <i>Nhe</i> I.....	37
VII. Condiciones de la reacción de ligación por medio de la DNA ligasa T4.....	38
VIII. Secuencia de los primers diseñados para la amplificación de <i>TET-ON</i> y pALB-GFP, además de las Tm y porcentaje de GC.....	40
IX. Reacción de PCR punto final para la amplificación de <i>TET-ON</i>	41

X.	Reacción de PCR para confirmar la naturaleza del vector de clonación pALB-GFP.....	41
XI.	Condiciones para la reacción de PCR de <i>TET-ON</i> empleando Platinum SuperFi Green Master mix PCR (Invitrogen).....	42
XII.	Reacción de digestión de <i>TET-ON</i> y pALB-GFP con <i>SaI</i>	43
XIII.	Reacción de digestión de <i>TET-ON</i> y pALB-GFP con <i>KpnI</i>	44
XIV.	Reacción de retrotranscripción de RNA por medio del kit SuperScript® IV Reverse Transcriptase para la generación del cDNA.....	50
XV.	Esquema general de la reacción de PCR tiempo real empleando el kit qPCR Master Mix, así como las condiciones generales.....	51
XVI.	Lista de primers correspondientes a <i>PPARγ</i> y los genes de referencia <i>GAPDH</i> y <i>ACTB</i>	51
XVII.	Primers diseñados para la amplificación de <i>PPARγ</i> , <i>TET-ON</i> y pTRE3-ZsGreen1.....	60
XVIII.	Orden y tiempos de las tomas de muestras para la realización del test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.....	64
XIX.	Información de los Cq (Cycle Threshold) del gen de interés y los genes de referencia, así como los resultados del nivel de expresión génica ($\Delta\Delta$ Cq).....	86
XX.	Consumo medio de alimento y agua o fructosa (media \pm SEM) en los grupos experimentales antes y después de la administración de estreptozotocina en los grupos con dieta suplementada con fructosa y/o grasa.....	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Representación gráfica del vector pCMV-Tet3G.....	29
2. Representación gráfica del vector pTRE3G-ZsGreen1.....	29
3. Representación gráfica del vector pALB-GFP.....	30
4. Esquema del ensayo de transfección transitoria en placas de 6 pocillos con el sistema inducible Tet-On en células HEK293T.....	47
5. Esquema de las reacciones llevadas a cabo por la glucosa oxidasa y la enzima peroxidasa.....	63
6. a) Colonias de <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con el vector pET-32a(+)-PPAR γ . b) Electroforesis en gel de agarosa de la extracción plasmídica de pET-32a(+)-PPAR (Carril 2) y pTRE3G-ZsGreen1 (Carril 3), empleándose como marcador λ DNA BstEII (NEB) (Carril 1). c) Gel de agarosa 1 % donde se observa la amplificación correspondiente a PPAR γ (1455 pb, carriles 2 y 3) y un fragmento del vector pTRE3G-ZsGreen1 (509 pb, carriles 4 y 5), así como el marcador Hyperladder IV de Bioline (100-1,000 pb) en el carril 1.....	72

7. Gel de agarosa al 1 % donde se comprueba la clonación del gen *PPAR γ* en el vector pTRE3G-ZsGreen1 por PCR punto final. En los carriles 4 y 5 se emplearon los primers específicos para el vector de clonación y se obtuvo un tamaño de banda aproximado de 1,964 pb, mientras que en el vector vacío el tamaño es de 509 pb. En el carril 1, se muestra el marcador Hyperladder IV de Bioline (100-1,000 pb).....74

8. a) Resultado de la transformación de bacterias *E. coli* DH5 α con pALB-GFP.
b) Gel de agarosa al 1 % donde se observa el resultado de la reacción de PCR del vector pALB-GFP, obteniéndose una banda de 791 pb.....75

9. Carril 1: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder; Carril 2: Extracción plasmídica de pALB-GFP; Carril 3: Digestión con *Nco*I y Carril 4: Digestión con *Xho*I.....76

10. a) Gel de agarosa 1 % donde en el carril 1 se muestra el marcador y en el carril 2 el plásmido pCMV-Tet3G. b) Gel de agarosa 1 % donde se observa el resultado de la amplificación por PCR punto final para pCMV-Tet3G (carriles 2 y 3) y pALB-GFP (carriles 4 y 5).....77

11. Gel de agarosa al 1 % donde se comprueba la clonación del gen *TET-ON* en el vector pALB-GFP por PCR punto final. En los carriles 4-7 se emplearon los primers específicos para el vector de clonación y se obtuvo un tamaño de banda aproximado de 2028 pb, mientras que en el vector vacío el tamaño esperado es de 791 pb.....78

12. Representación esquemática de las dos construcciones genéticas que se llevaron a cabo, así como las enzimas de restricción empleadas en cada caso.....	79
13. Ejemplo de extracción de RNA total a partir de un cultivo de células HEK293T.....	80
14. a) Gráfica de amplificación de <i>GAPDH</i> de las muestras de 100 a 0.16 ng. b) Melt curve de <i>GAPDH</i> . c) Curva estándar con una eficiencia de 101.4 %.....	82
15. a) Gráfica de amplificación de <i>ACTB</i> de las muestras de 100 a 6.25 ng. b) Melt curve de <i>ACTB</i> . c) Curva estándar con eficiencia de 100.04 %.....	83
16. a) Gráfica de amplificación de <i>hPPARγ</i> de las muestras de 100 a 6.25 ng. b) Melt curve de <i>hPPARγ</i> . c) Curva estándar con una eficiencia de 91.29 %.....	84
17. Expresión relativa de <i>hPPARγ</i> en células HEK293T, dándose un incremento de 530 y 84 veces en las muestras tratadas con doxiciclina ($p < 0.002$), con respecto al calibrador y a las muestras sin doxiciclina.....	85
18. Determinación de los niveles de fluorescencia de células HEK293T sin transfectar y co-transfectadas con pTRE-ZsGreen1-IRES2- <i>hPPARγ</i> , dándose un incremento significativo de la fluorescencia en presencia de doxiciclina, con respecto a las muestras no tratadas con este inductor.....	87

19. Evolución del peso corporal de los animales de los tres grupos experimentales durante las 9 semanas del protocolo de inducción de diabetes.....	90
20. Evolución de los niveles de glucosa sanguínea (mg/dL) a lo largo del protocolo de inducción de diabetes tipo 2 en ratones C57BL/6 en los tres grupos experimentales.....	92
21. Evolución del peso corporal de los animales de los cinco grupos experimentales desde la semana inicial a la semana 10 del protocolo de inducción de diabetes.....	94
22. Consumo promedio de alimento (g/día/ratón) en los diferentes grupos experimentales durante el protocolo de inducción de diabetes.....	95
23. Consumo medio de líquido (mL/día/ratón) en los cinco grupos experimentales durante las 10 semanas de duración del protocolo de inducción de diabetes.....	97
24. Niveles de glucosa plasmática en condiciones de ayuno en los diferentes grupos experimentales a lo largo de las diez semanas del protocolo de inducción de diabetes.....	99
25. Gel de agarosa al 1 % donde se muestra el RNA total extraído a partir de muestras de hígado de ratones C57BL/6.....	101
26. Geles de agarosa al 1 % con los productos de PCR para los genes <i>TET-ON</i> y <i>PPARγ</i> (a) muestras del control negativo y día 1, b) día 2 y 4, c) día 7.....	102

27. Ratio del peso hígado con respecto al peso corporal total en los cinco grupos experimentales, al final del protocolo.....	104
28. Fotografías de los hígados de los grupos control (a), diabetes (b), administrado con pioglitazona (c), PPAR γ sin Dox (d) y PPAR γ con Dox (e).....	105
29. Determinación de la expresión de PPAR γ y TET-ON en hígado por PCR punto final en los diferentes grupos experimentales. a y b) Expresión en grupo PPAR γ (con Dox) ratones 1-2 (a) y ratones 3-4 (b), c) Grupo PPAR γ (sin Dox) y d) Muestras de los grupos control, diabetes y pioglitazona.....	107
30. Resultados del test de tolerancia a glucosa intraperitoneal en ratones con dieta estándar y ratones con diabetes tipo 2.....	108
31. Test de tolerancia a glucosa intraperitoneal (IpGTT) en el grupo control y los grupos con diabetes, realizado al final del periodo de tratamiento. * $p < 0.05$ comparado con el grupo control.....	110
32. a) Insulina plasmática (ng/mL) en el grupo control y el grupo inducido con diabetes (semana 8 del protocolo), dándose menor concentración de insulina en el grupo con diabetes como consecuencia de la administración de estreptozotocina. b) Resultados de insulina plasmática (ng/mL) de los 5 grupos experimentales en la semana 10 del protocolo.....	112
33. Determinación del índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) a partir de los valores de glucosa (mmol/L) e insulina plasmática (μ U/mL) en ayuno en los	

5 grupos experimentales. * $p < 0.05$ con respecto al control.....114

34. Determinación de los niveles de adiponectina plasmática ($\mu\text{g/mL}$) por medio de un ensayo de ELISA en los diferentes grupos experimentales durante la semana 8 del protocolo y antes del periodo de tratamiento.....115

35. Determinación de los niveles de adiponectina plasmática ($\mu\text{g/mL}$) por medio de kit de ELISA en los diferentes grupos experimentales al final del periodo de tratamiento.....116

36. Determinación de la expresión de PPAR γ en muestras de hígado de ratones C57BL/6 por medio de dot blot, en las diferentes condiciones de experimentación.....118

NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
Cq	Ciclo de cuantificación
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
g	Gramos
H	Hora
L	Litro
M	Concentración Molar
min	Minuto
nm	Nanómetro
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido Ribonucleico
U	Unidades
v	Voltios

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

La diabetes *mellitus* es una de las enfermedades no transmisibles con mayor prevalencia en el mundo, afectando al 9 % de la población mundial mayor de 18 años y causando en torno a 1.5 millones de muertes (Global Report Diabetes, World Health Organization, 2016). La diabetes tipo 2 representa el 90 % de los casos mundiales, siendo la principal enfermedad endocrina y metabólica. Se caracteriza por una resistencia de los tejidos a la acción de la insulina, combinado con una deficiencia relativa en la secreción de la misma. A su vez, este desbalance afecta al metabolismo lipídico, dándose un incremento en los niveles de ácidos grasos libres y de triglicéridos, lo cual puede causar la disfunción de distintos órganos como consecuencia de una acumulación ectópica de lípidos. A pesar de la existencia de múltiples fármacos contra la diabetes tipo 2, éstos no siempre son efectivos y presentan efectos secundarios en los pacientes.

Uno de los principales factores reguladores del metabolismo lipídico es el factor transcripcional “Receptor activado por el proliferador de Peroxisomas” (Peroxisome proliferator-activated receptor), del que existen algunas variantes

denominadas principalmente como α , β/δ y γ . En concreto, PPAR γ se expresa principalmente en el tejido adiposo y en el hígado, estando implicado en la resistencia a la insulina, en la diferenciación de adipocitos, así como en procesos inflamatorios, entre otros. Las tiazolidinedionas son un grupo de fármacos conocidos como sensibilizadores de insulina, que tienen como blanco terapéutico al receptor nuclear PPAR γ . En los últimos años, se ha comprobado que la administración de estos agonistas permite generar una mayor sensibilidad a la insulina tanto en modelos animales como en humanos, en condiciones de diabetes *mellitus* tipo 2. El hígado es uno de los principales órganos reguladores de la lipogénesis, gluconeogénesis y del metabolismo del colesterol.

En los últimos años, ha surgido un gran interés en el desarrollo de modelos de terapia génica virales y no virales, con el objetivo de aportar estrategias diferentes que permitan combatir ciertas patologías. A su vez, es de gran importancia la expresión controlada del gen de interés, en el momento y lugar adecuado, para lo cual se han desarrollado sistemas condicionales o inducibles, como el sistema de tetraciclina, los cuales permiten tener un estrecho control de la expresión génica. Por todo lo anteriormente indicado, el objetivo de este proyecto fue generar un modelo para la expresión controlada e inducible de PPAR γ humano en hígado por terapia génica hidrodinámica en ratones C57BL/6 y en condiciones de diabetes tipo 2; esto con el propósito de profundizar en el conocimiento del papel que juega PPAR γ en la sensibilidad a la insulina así como en el metabolismo lipídico.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Diabetes *mellitus*

1.2.1.1 Definición, características y tipos de diabetes

La diabetes *mellitus* se define como un elevado nivel de glucosa plasmática asociado a una inadecuada o inexistente secreción de insulina pancreática, pudiendo verse afectada o no la acción de la insulina (Katzung *et al.* 2012). Existen distintos tipos de diabetes como son la diabetes tipo 1 (dependiente de insulina), diabetes tipo 2 (no dependiente de insulina), diabetes tipo 3 (otras causas) y diabetes tipo 4 (o gestacional). A nivel mundial, afecta a más de 422 millones de personas (Global Report Diabetes, World Health Organization, 2016), habiéndose incrementado su número en más de cuatro veces desde 1980 y se calcula que en 2012, ocurrieron alrededor de 1.5 millones de muertes causadas por diabetes. En México, la diabetes afecta al 10.4 % de la población (9.7 % de los hombres y 11.0 % de las mujeres).

La diabetes tipo 1 se caracteriza por una destrucción selectiva de las células beta del páncreas y por una deficiencia severa o absoluta de insulina. Por su parte, la diabetes *mellitus* tipo 2 es un desorden metabólico crónico, cuya prevalencia se ha incrementado en todo el mundo y que está caracterizado por hiperglucemia, resistencia a la insulina, una relativa deficiencia de insulina y eventualmente, un fallo de las células β pancreáticas (Olokoba *et al.* 2012). Esto genera un menor transporte de glucosa al hígado, tejido muscular y al tejido adiposo, por lo que se favorece una mayor liberación de lípidos. La diabetes tipo 2 es la forma más común de diabetes y resulta de la interacción de factores de riesgo genéticos, ambientales y comportamentales.

En cuanto a los factores relativos al estilo de vida, son destacables la inactividad física, una dieta desbalanceada, así como el consumo de tabaco y alcohol (Olokoba *et al.* 2012).

A su vez, se designó diabetes tipo 3 a otras múltiples causas específicas que generan valores elevados de glucosa, como la pancreatectomía, pancreatitis, enfermedades no pancreáticas o ciertos fármacos. Por último, la diabetes tipo 4 o diabetes gestacional (Gestacional diabetes *mellitus*, GDM) se define como una anomalía en los niveles de glucosa detectada por primera vez durante el embarazo (Katzung *et al.* 2012).

1.2.1.2 Características de la diabetes *mellitus* tipo 2

Los síntomas de la diabetes *mellitus* tipo 2 pueden no ser evidentes o tardar mucho en aparecer, por lo que es importante establecer criterios de diagnóstico. Los criterios de diagnóstico de la diabetes tipo 2 según la Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association, ADA) son valores de glucosa plasmática en ayuno mayores de 7 mmol/L (126 mg/dL), un porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA1c) mayor o igual al 6.5 % y un valor de glucosa plasmática mayor a 11.1 mmol/L (200 mg/dL) 2 horas después del test de tolerancia a glucosa oral (OGTT).

A su vez, entre las principales complicaciones de la diabetes se encuentran las complicaciones agudas, microvasculares y macrovasculares. Entre las complicaciones macrovasculares se encuentran el infarto de miocardio, hipertensión y enfermedades arteriales periféricas. Las

complicaciones agudas que pueden presentarse son: el estado hiperosmolar hiperglucémico (EHH), en el que la insulina producida es suficiente para evitar la cetosis, pero no para impedir una hiperglucemia y se caracteriza por una marcada hipovolemia, deshidratación, hipotensión, taquicardia y estado mental alterado (Pasquel *et al.* 2014); y la cetoacidosis diabética, la cual se da como consecuencia de una deficiencia absoluta de insulina. Se caracteriza por la generación de gran cantidad de cuerpos cetónicos (acetoacetato y β -hidroxibutirato) en el hígado como consecuencia de una deficiencia de insulina y por la liberación excesiva de ácidos grasos (Tran *et al.* 2017).

Las complicaciones microvasculares se clasifican en retinopatías, nefropatías y neuropatías. Las complicaciones oftalmológicas más comunes son las cataratas, la retinopatía diabética (microangiopatía que afecta las arteriolas capilares, vénulas post-capilares y capilares) y el glaucoma. La nefropatía diabética se caracteriza por una excreción urinaria de albúmina, también denominada microalbuminuria, causada por alteraciones estructurales y funcionales del riñón, viéndose afectada principalmente la membrana glomerular (Balderas-Rentería, 2015). Por otro lado, la neuropatía diabética se define como un conjunto de alteraciones morfológicas y funcionales del sistema nervioso periférico, basándose en una degeneración axonal y desmielinización segmentaria de fibras nerviosas.

Existen diversas causas que desencadenan estas complicaciones, como la generación de productos de glucosilación avanzada (PGA), los cuales se forman por la unión de azúcares a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, por lo

que afectan el correcto funcionamiento celular; la producción de sorbitol, por medio de la vía de los polioles (con la acción de la enzima aldosa reductasa), cuya acumulación desencadena estrés osmótico y daño neuronal y en los vasos sanguíneos; o el estrés oxidativo, generado por un incremento de radicales libres producidos por un exceso de intermediarios de la fosforilación oxidativa, como consecuencia de la elevación de los niveles de glucosa (Balderas-Rentería, 2015).

1.2.1.3 Tratamientos de la diabetes tipo 2

Las estrategias terapéuticas para tratar la diabetes tipo 2 se basan en la administración de insulina exógena, en la estimulación de la secreción pancreática de insulina (como es el caso de las sulfonilureas), en la reducción de la producción hepática de glucosa (biguanidas, como la metformina), así como en el retraso de la digestión y absorción intestinal de carbohidratos (inhibidores de la α -glucosidasa) y en mejorar la acción de la insulina (tiazolidinedionas), entre otras estrategias (Kahn *et al.* 2013).

Existen cinco tipos principales de insulinas inyectables: insulina de acción rápida, de acción breve, de acción intermedia, de acción larga y de acción ultra larga. Hay tres tipos principales de insulina de acción rápida: Lispro, Aspartato y Glulisina y se caracterizan porque su acción comienza en un plazo breve aunque también dura poco tiempo. Se trata de insulinas modificadas en ciertos aminoácidos por bioingeniería con el objetivo de evitar la autoagregación (Joshi *et al.* 2009).

La insulina de acción breve manifiesta su efecto a los 30 minutos y alcanza su máximo entre las 2-3 horas después de la inyección subcutánea. Por su parte, la insulina de acción intermedia o NPH (protamina neutra de Hagedorn o isofánica) presenta un periodo de absorción y comienzo de actividad más largos y está constituida por una combinación de la hormona con proteínas protaminas. Los dos tipos principales de insulina de acción larga son la insulina glargina y la insulina detemir, las cuales presentan un tiempo de acción de entre 11 y 24 horas, administrándose una vez al día en el caso de glargina y dos en el caso de detemir. Se utilizan estrategias que permiten ralentizar la disolución de la insulina en el organismo por medio de la formación de precipitados a pH corporal y por la unión a ácido mirístico (detemir), lo que prolonga su disponibilidad al intensificar la autoagregación en tejido subcutáneo (Wang *et al.* 2003).

La metformina es el tratamiento de primera línea en contra de diabetes tipo 2. Pertenece a la familia de las biguanidas, se trata de un fármaco ahorrador de insulina y no genera hipoglucemia. Su mecanismo de acción se basa en la disminución de la producción de glucosa hepática por medio de la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), retrasa la absorción de glucosa en el tubo digestivo, y estimula la glucólisis en los tejidos (Aguayo & Gomes, 2013). La metformina actúa inhibiendo el complejo I mitocondrial, lo que causa un incremento del adenosín difosfato (ADP) y adenosín monofosfato (AMP) disponible, lo cual activa la enzima AMP quinasa y en último término a la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC), favoreciéndose

así una mayor oxidación de los ácidos grasos. La metformina suele administrarse en conjunto con sulfonilureas. Las sulfonilureas incrementan la liberación de insulina por el páncreas por medio de la inhibición de los canales de potasio (K⁺) en las células beta del páncreas, lo que genera una despolarización, con la consecuente apertura de los canales de calcio y la secreción de insulina. Existen sulfonilureas de primera generación como la tolbutamida, clorpropamida y tolazamida y de segunda generación (glibenclamida, glimepirida, glipizida) las cuales presentan menores efectos adversos. En general, las sulfonilureas se caracterizan por generar hipoglucemia (Kudaravalli *et al.* 2013).

Otra de las estrategias empleadas son las tiazolidinedionas las cuales son sensibilizadores a la insulina de administración oral y que ejercen su acción actuando como agonistas del receptor nuclear PPAR γ . Las principales tiazolidinedionas son rosiglitazona y pioglitazona, cuyas diferencias en sus cadenas laterales se traducen en discrepancias en su acción metabólica, perfil de metabolitos y efectos adversos (Evans *et al.* 2013).

También existen análogos de GLP-1 (glucagon-like peptide-1), la cual es una hormona peptídica de 36-37 aa de la mucosa intestinal, que se secreta en respuesta a la presencia de comida. Tiene un tiempo de vida media muy bajo (1-2 minutos) ya que es degradado por la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP4), por lo que se han desarrollado análogos modificados para incrementar el tiempo de vida como son el exedin-4 (aislado de la saliva del lagarto de Gila), liraglutida, albiglutida o dulaglutida (Arulmozhi & Portha, 2006).

Los inhibidores de la α -glucosidasa, como la acarbosa y el miglitol son inhibidores competitivos de las glucosidasas α intestinales y disminuyen las oscilaciones y variaciones posprandiales de glucosa al retrasar la digestión y la absorción de almidones y disacáridos. Suelen causar efectos adversos gastrointestinales intensos. También suelen emplearse los secuestradores de ácidos biliares (como colestipol, colestiramina, colesevelam), los cuales son compuestos poliméricos que sirven como resinas de intercambio iónico que impiden que se dé la circulación enterohepática de los ácidos biliares, reduciendo el colesterol circulante (Takebayashi *et al.* 2010); y las glifozinas, que son fármacos antihiper glucémicos orales que inhiben los transportadores de sodio-glucosa tipo 2 (Sodium-glucose linked transporter type 2, SGLT2) del riñón, impidiendo de esta forma la reabsorción de glucosa por parte de los riñones (Haas *et al.* 2014).

1.2.2 Resistencia a la insulina

Una de las principales características de la diabetes *mellitus* tipo 2 es la resistencia a la insulina, la cual se define como una inhibición temporal de la acción de la insulina en los tejidos diana (Tsatsoulis *et al.* 2013). Uno de los factores más importantes que ayudan a la supervivencia humana es la capacidad de resistir la inanición en tiempos de hambre, gracias a un exceso de almacenamiento de energía en forma de grasa, además de la capacidad de sobreponerse a los estresores o amenazas por medio de una respuesta adaptativa al estrés. La regulación negativa de la señalización de la insulina se considera un mecanismo fisiológico adaptativo, que se activa siempre que el

organismo necesita un cambio del estado anabólico al catabólico. En estas condiciones, se requiere de una resistencia a la insulina para movilizar las reservas energéticas, obtenidas en forma de glucosa liberada por el hígado y de ácidos grasos liberados por los adipocitos (Trayhurn, 2005).

El tejido adiposo tiene un papel fundamental en el almacenamiento energético. Los adipocitos presentan dos funciones críticas, como son la síntesis de triglicéridos a partir de ácidos grasos y la absorción de la glucosa después de la alimentación, y además, de la liberación de ácidos grasos y su consecuente metabolismo en los tejidos periféricos en situaciones en las que se requiere un alto consumo energético. Es necesario un equilibrio dinámico entre la lipólisis de los triglicéridos, la liberación de los ácidos grasos y la adquisición y oxidación de éstos por parte de tejidos no adiposos, principalmente, el hígado y el músculo esquelético. Esta regulación se lleva a cabo por los propios adipocitos mediante la secreción de adipoquinas como leptina y adiponectina (Frayn *et al.* 2003; Lee *et al.* 2011). En cambio, cuando no existe una regulación apropiada, comienza a generarse una resistencia a la insulina, ya que las células no adiposas presentan una capacidad más limitada de almacenamiento de ácidos grasos libres en forma de triglicéridos. Cuando se excede esta capacidad de almacenamiento, los lípidos bioactivos o especies lipídicas tóxicas acumuladas generan una resistencia a la insulina. Un punto clave para el desarrollo de la resistencia a la insulina es cuando los adipocitos sobrepasan su capacidad de almacenamiento normal, resultando en una salida de lípidos a los tejidos periféricos, lo que se denomina “supersizing” (Schaffer, 2003).

Cuando el flujo de ácidos grasos excede la capacidad de oxidación de éstos por lo tejidos, así como la capacidad de almacenamiento, se produce una acumulación de ácidos grasos y de sus intermediarios metabólicos (diacilglicerol (DAG) y ceramidas entre otros) en los tejidos periféricos. Estos metabolitos lipídicos pueden activar a enzimas serin-quinasas como JNK, IKK y nPKC, las cuales regulan negativamente la acción de la insulina a través de la fosforilación de residuos de serina en proteínas IRS (o proteínas sustrato del receptor de la insulina) (Samuel & Schulman, 2012). En el caso de las ceramidas, también pueden impedir la acción de la insulina a través de la inhibición de la vía PKB/Akt (Blouin *et al.*, 2010). Esto sugiere que la acumulación de lípidos en forma de triglicéridos es neutral, y que es la acumulación de intermediarios lipídicos la que afecta el correcto funcionamiento de la acción de la insulina.

1.2.3 Modelos de diabetes en animales

Los modelos de diabetes en animales se dividen en genéticos y no genéticos (inducidos experimentalmente).

Algunos de los modelos genéticos más empleados son:

- **Ratones ob/ob:** es un modelo monogenético, caracterizado por una mutación autosómica recesiva en el cromosoma 6, en el gen que codifica para la leptina. Desarrollan obesidad, además de hiperglucemia, una severa hiperinsulinemia y una cierta intolerancia a la glucosa.
- **Ratones db/db:** es un modelo monogenético caracterizado por una mutación autosómica recesiva en el gen que codifica para el receptor de

la leptina. Estos ratones secretan altos niveles de insulina, lo que los convierte en obesos, hiperglucémicos y resistentes a la insulina. Suelen emplearse para la investigación de diabetes tipo 2, dislipidemias y para screening de agentes miméticos de la insulina o sensibilizadores a ésta (Srinivasan & Ramarao, 2007).

- **Ratón obeso New Zealand (NZO):** se trata de un modelo poligenético de obesidad y diabetes. Muestran hiperfagia, obesidad, hiperglucemia moderada, hipeinsulinemia y resistencia a la insulina. Una de las mutaciones que presenta es en la transferasa de acetilcolina (Ortlepp *et al.* 2000).

Por otro lado, los modelos no genéticos se caracterizan porque suelen representar un menor costo, mayor disponibilidad y facilidad de inducción de la diabetes. Los principales modelos no genéticos o inducidos experimentalmente son:

- **Modelos de aloxano o estreptozotocina:** el aloxano es un derivado de ácido úrico que destruye selectivamente las células beta del páncreas por mecanismos de estrés oxidativo. La estreptozotocina (STZ) es un antibiótico natural producido por *Streptomyces achromogenes*. Es un análogo estructural de la N-acetilglucosamina y actúa como un potente agente alquilante, afectando el transporte de la glucosa, la actividad glucoquinasa y roturas de doble cadena en el DNA, en las células beta del páncreas (Islam & Loots, 2009). La STZ suele inyectarse intraperitonealmente con dosis de 35-65 mg/kg de peso corporal en ratas

y de 100-200 mg/kg de peso corporal en ratones (Rees & Alcolado, 2005).

- **Pancreatectomía parcial:** fue desarrollado inicialmente por Pauls & Bancroft y suele darse una remoción de entre el 85-90 % del páncreas. La mayor limitación de este modelo es la cierta regeneración que puede darse por el páncreas remanente.
- **Dieta alta en grasa (High-fat diet):** estos modelos se caracterizan por un sobrepeso, obesidad, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. En este modelo, los ratones C57BL/6J son alimentados con una dieta en la que las grasas aportan entre 40-60 % de las calorías totales (un contenido de grasa aproximadamente 8 veces mayor que los ratones control) durante 8-16 semanas (Winzel *et al.* 2004).
- **Dieta alta en fructosa:** la fructosa induce hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. Puede administrarse en la dieta (con un contenido de entre 35-72 % de fructosa) o en solución (10-15 % de fructosa) durante un periodo de 2-12 semanas. Su principal limitante es que se requiere un largo periodo de tiempo para la generación de las principales características patogénicas de la diabetes tipo 2 (Benado *et al.* 2004).
- **Modelos de dieta alta grasa con STZ:** en este modelo los animales se alimentan con una dieta alta en grasa para generar la resistencia a la insulina, seguido de una inyección de STZ para inducir una disfunción parcial de las células beta del páncreas. La ventaja de este modelo sobre

los genéticos es que replica la patogénesis natural, produciendo varias características que son similares a la patogénesis de la diabetes tipo 2 en humanos (Chen & Wang, 2005).

1.2.4 PPAR gamma

Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) son miembros de una superfamilia de receptores nucleares inducibles por ligando. En mamíferos, es posible diferenciar tres tipos principales de PPAR: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ y PPAR γ ; los cuales por medio de su unión a elementos reguladores en respuesta a PPAR (Peroxisome proliferator response element, PPRE) y junto con receptores X retinoides (RXR) controlan la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico, inflamación, adipogénesis y mantenimiento del equilibrio metabólico (Ahmadian *et al.*, 2013). PPAR α se expresa predominantemente en hígado, corazón y en tejido adiposo marrón, favoreciendo la oxidación de ácidos grasos. PPAR β/δ tiene funciones similares a PPAR α , se expresa de forma ubicua y cuenta con una función clave en la oxidación de ácidos grasos en los principales tejidos metabólicos como en el corazón, hígado y músculo esquelético. Finalmente, PPAR γ es un importante regulador de la adipogénesis así como un potente modulador del metabolismo lipídico y de la sensibilidad a insulina. La generación de ratones knockout para PPAR γ permitió establecer que este receptor es un regulador clave tanto para la diferenciación de los adipocitos, como para la maduración de éstos (He *et al.*, 2003). Existen dos isoformas principales de PPAR γ : PPAR γ 1 y PPAR γ 2, que se

diferencian en que éste último cuenta con 30 aminoácidos adicionales a los 505 de PPAR γ 1, en la región aminoterminal. PPAR γ 2 se expresa únicamente en tejido adiposo mientras que la isoforma PPAR γ 1 se expresa en diferentes tejidos, entre ellos el hígado.

En cuanto a la estructura proteica, PPAR γ cuenta con un dominio transactivador N-terminal (AF1), un dominio de unión a DNA altamente conservado (DBD) y un dominio de unión a ligando C-terminal (LBD). Algunos de los principales ligandos naturales son los ácidos oleico, linoleico y linolénico, así como diversos metabolitos lipídicos (incluyendo prostaglandina J2 y diversos fosfolípidos oxidados). La unión del ligando al receptor induce un cambio conformacional en el receptor que permite el reclutamiento de cofactores y por lo tanto, la modulación de la actividad de PPAR. El receptor PPAR actúa principalmente en regiones intrónicas, secuencias potenciadoras intergénicas y en menor medida en las regiones promotoras.

PPAR γ también tiene un papel crucial en el control de la homeostasis de la glucosa en el organismo, afectando a la expresión del transportador de glucosa tipo 4 (Glut4), la proteína asociada a c-Cbl (Casitas b-lineage lymphoma) o CAP, y también incrementa la expresión de los genes que codifican para las proteínas IRS-1 y 2, las cuales favorecen la acción de la insulina.

Las funciones de PPAR γ están reguladas por diversas modificaciones post-traduccionales, como son fosforilación, ubiquitinación o sumoilación, entre otros. Por ejemplo, se ha observado que la fosforilación del residuo Ser112,

inhibe la actividad de PPAR γ , mientras que mutantes (Ser112Ala) en los que no se da dicha fosforilación, presentan una mayor actividad que el PPAR γ normal. En el caso de la sumoilación, PPAR γ es modificado de forma reversible por SUMO-1 (Small ubiquitin-related modifier 1) en ciertos residuos de lisina. Se ha comprobado que la sumoilación en Lys77 reprime fuertemente la actividad transcripcional de PPAR γ (Stephens *et al.* 2012).

Las tiazolidinedionas (TZD) son potentes sensibilizadores a la insulina que actúan a través de su interacción con PPAR γ , siendo una medicación oral altamente efectiva para la diabetes tipo 2. Sin embargo, se han caracterizado por presentar ciertos efectos secundarios como la retención de líquidos, afecciones cardíacas, ganancia de peso o pérdida de hueso (osteoporosis) (Evans *et al.* 2013). Las tiazolidinedionas contribuyen a la retención de líquidos por medio de una alteración de la reabsorción de agua y sodio en el ducto colector distal del riñón. En cuanto a la ganancia de peso, reportes recientes indican que es la activación de PPAR γ en el cerebro más que en el tejido adiposo, lo que contribuye a la ganancia de peso dependiente de TDZ (Lu *et al.* 2011). También se ha demostrado que PPAR γ inhibe la diferenciación de los osteoblastos y la formación de hueso, promoviendo por el contrario, la diferenciación de los osteoclastos, células encargadas de la destrucción del hueso. Por otro lado, se ha demostrado que la activación selectiva de PPAR γ en adipocitos resultó ser suficiente para una sensibilización a la insulina, de forma equivalente a un tratamiento sistémico con TZD (Sugii *et al.* 2009).

PPAR γ 1 está expresado a niveles bajos en el hígado de ratones, por lo que es poco probable que genere un efecto adipogénico bajo condiciones fisiológicas normales. Reddy *et al.* estudiaron los efectos biológicos de la sobreexpresión de PPAR γ 1 en el hígado de ratones, por medio de la inyección de adenovirus-PPAR γ 1 en la vena de la cola y observaron una inducción de esteatosis hepática en ratones knockout para el receptor PPAR α (PPAR- α^{-}/α^{-}) el cual está implicado en la β -oxidación de los ácidos grasos. Además de esto, observaron que esta sobreexpresión indujo la expresión de genes específicos de adipocitos y relacionados con lipogénesis, como son la adiponectina, aP2, caveolina-1, FSP27 o CD36, lo que implica una transformación adipogénica de los hepatocitos (Reddy *et al.* 2003). Por tanto, un alto nivel de PPAR γ en hígado es suficiente para la inducción de la transformación adipogénica de los hepatocitos y la acumulación lipídica.

Por otro lado, la generación de ratones knockout para PPAR γ en hígado bajo el control de un promotor humano específico (componente amiloide sérico P) permitió determinar una mayor protección a desarrollar esteatosis en presencia de una dieta alta en grasa. La esteatosis es una de las enfermedades más comunes en el hígado y presenta características similares a lo que sucede en el hígado durante el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 (Masuzaki *et al.* 2005). Sin embargo, el papel de PPAR γ en la esteatosis hepática es controversial, como sucede en la enfermedad de hígado graso no alcohólico, ya que una sobreexpresión de PPAR γ es característica de este tipo de patología, mientras que su activación por tiazolidinedionas permite reducir la esteatosis

hepática. La generación de ratones transgénicos mutantes para PPAR γ en hígado y en macrófagos utilizando un sistema condicional de expresión génica (tecnología Cre-loxP) permitió determinar un efecto protector frente a la esteatosis hepática inducida por dieta altas en grasas, dándose una menor expresión de genes implicados en lipogénesis y β -oxidación de ácidos grasos. Además, estos ratones knockout presentaron una mejor tolerancia a la glucosa y menor expresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). Esto permite establecer la expresión de PPAR γ en hígado como un factor pro-esteatótico (Clária *et al.* 2011).

En cambio, otros investigadores han demostrado la importancia de la inducción de la expresión de PPAR γ en hígado para la sensibilización a la insulina (Ge *et al.* 2015). Se ha reportado que la administración de eritropoyetina alivia la resistencia a la insulina hepática por medio de la activación de la vía PPAR γ -AKT tanto *in vitro* como en un modelo *in vivo* de ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa, lo que demuestra la importancia de PPAR γ en hígado para la sensibilización a la insulina.

Por otro lado, en cuanto al metabolismo de la glucosa, se ha comprobado en los últimos años que la administración de agonistas de PPAR γ ayuda a mejorar la resistencia a la insulina en los tejidos (afectando a la vía de señalización de la insulina y a los transportadores Glut4), ésto en diferentes modelos animales, como en ratas Zucker diabéticas, ratas resistentes a la insulina con dieta alta en fructosa y también alta en grasa (Olefsky, 2000; Chaudhary *et al.* 2012; Sato *et al.* 2016). También se ha comprobado que las

tiazolidinedionas mejoran la resistencia a insulina en el tejido endotelial (Huang *et al.* 2015). Además, se ha observado que la reducción en la expresión de PPAR γ en roedores no obesos que sufren diabetes tipo 2, ocasiona una disminución de la sensibilidad a insulina, así como se ve afectada la secreción de insulina inducida por glucosa (Kang *et al.* 2015).

Por todo lo anterior, y dada la importancia de PPAR γ en la regulación del metabolismo lipídico y de carbohidratos, en el presente proyecto de tesis se propuso la creación de un modelo de sobreexpresión controlada de PPAR γ en el hígado de ratones con diabetes tipo 2 empleando para ello la terapia génica hidrodinámica. Esto se realizó con el propósito de obtener mayor información sobre el papel de PPAR γ en el hígado en condiciones de diabetes tipo 2 y evaluar su uso potencial como diana farmacológica, así como determinar variaciones en la resistencia a insulina como consecuencia de esta modificación en la expresión.

1.2.5 Sistemas de expresión inducible

La posibilidad de encender o apagar la expresión génica en ciertos tipos celulares o tejidos, en un tiempo específico aporta una gran flexibilidad a la hora de investigar las funciones del gen de interés en condiciones de salud y enfermedad. En los últimos años, se han desarrollado distintos sistemas para la expresión génica controlada. Uno de los sistemas más extensamente usados tanto *in vitro*, como *in vivo* son los sistemas de expresión controlados por tetraciclina (como son los sistemas Tet-off y Tet-on), en concreto el sistema Tet-On o Reverse tetracycline-controlled transcriptional activator (rtTA).

Este sistema consiste en dos construcciones genéticas, una de ellas es una unidad reguladora transcripcional que cuenta con un promotor de citomegalovirus (pCMV) seguido de secuencia codificante para un represor Tet mutado fusionado a la proteína VP16, formando la proteína rtTA. La segunda construcción consta de una secuencia de respuesta *tetO* seguido del gen de interés. El agente inductor es la doxiciclina (Dox), un análogo de la tetraciclina, de forma que en ausencia de doxiciclina, rtTA no se une a la secuencia *tetO*, por lo que el gen diana no se transcribe. En cambio, en presencia de Dox, rtTA se puede unir a *tetO*, por lo que se activa la expresión del gen de interés. El sistema rtTA se ha empleado exitosamente en numerosos modelos de animales transgénicos y en terapia génica, permitiendo la expresión específica en diversos órganos, como en músculo, cerebro o hígado (Rolling *et al.* 2009).

De acuerdo a lo revisado en la literatura publicada previamente, no existen muchos reportes sobre la expresión inducida de PPAR γ empleando un sistema de tetraciclina. Tachibana *et al.* 2005 establecieron un sistema para la expresión inducida de PPAR γ humano de tipo Tet-Off con el objetivo de identificar los genes activados por PPAR γ . Esto lo realizaron en células HepG2 y por medio de cotransfección de dos plásmidos no virales: pTet-Off vector y pBI-EGFP-hPPAR γ (plásmido bicistrónico, para la expresión simultánea del gen de interés, hPPAR γ , y del gen reportero, EGFP). Por otro lado, Liu *et al.* 2013 llevaron a cabo la expresión de hPPAR γ y C/EBP por medio de un sistema inducible Tet-On de tipo viral (lentivirus) en líneas celulares de adipocitos y con diferentes elementos respuesta y proteínas activadoras.

1.2.6 Terapia génica

La investigación en terapia génica comenzó hace alrededor de 30 años, con el objetivo de tratar enfermedades y sus raíces genéticas, contrarrestando o reemplazando el mal funcionamiento de un gen dentro de células afectadas por una cierta condición. Para lograr este objetivo, la transferencia génica debe sobrepasar complejas barreras tisulares y celulares hasta entregar la nueva información genética en las células diana u objetivo (Naldini, 2015).

Existen diversas estrategias en la terapia génica, como el uso de vectores virales (como adenovirus y lentivirus) y vectores no virales (como el uso de DNA plasmídico desnudo) además la administración por medio de liposomas catiónicos y el uso de RNA de interferencia. Es necesario establecer métodos eficientes y seguros para la liberación de material genético en las células. Recientemente, se ha empleado la terapia génica hidrodinámica, por medio de una rápida inyección de un volumen grande de solución de DNA. Esta terapia aporta simplicidad, eficiencia y versatilidad.

La liberación hidrodinámica consiste en la aplicación de una presión hidrodinámica controlada en los capilares para incrementar la permeabilidad de las células endoteliales y parenquimales (Suda & Liu, 2007). Zhang *et al.* 1999 demostraron que se obtenía un alto nivel de expresión de DNA plasmídico en hepatocitos por medio de inyección en la vena de la cola, dándose los mayores niveles de expresión en presencia de un alto volumen (~2.5 mL) (Zhang *et al.* 1999). La terapia génica hidrodinámica (hydrodynamic gene delivery, HGD) combina un DNA desnudo y la presión hidrodinámica generada por una rápida

inyección de un volumen grande de fluido en un vaso sanguíneo, para la liberación de material genético en células parenquimales. La principal razón por la que las células parenquimales son el objetivo de la terapia hidrodinámica es porque el endotelio de los capilares y las células parenquimales están estrechamente relacionados, permitiendo el acceso del DNA a las células parenquimales una vez que la barrera endotelial se ha visto afectada. Además, la pared capilar es fina, elástica y relativamente fácil de romper. El gran volumen de la solución de DNA permite permeabilizar el endotelio, además de generar “poros” en la membrana plasmática de las células parenquimales contiguas, a través de los cuales, el DNA u otras moléculas de interés pueden entrar al citoplasma. Posteriormente, estos poros se cierran, dejando atrapadas las moléculas de interés en el interior celular (Zhang *et al.* 2004). Entre los dos tipos de capilares, los capilares fenestrados o sinusoides son más sensibles al procedimiento hidrodinámico que los capilares contiguos, ya que existen espacios entre las células endoteliales adyacentes y la lámina basal es más fina o incluso no existe. La aplicación más exitosa de esta técnica se ha conseguido en la liberación génica en los hepatocitos de roedores. El procedimiento estándar implica una inyección en la vena de la cola de 5-7 segundos de solución fisiológica, equivalente al 8-10 % del peso corporal. El gran volumen de solución de DNA entra directamente en la vena cava inferior y ensancha las fibras del miocardio más allá de la longitud óptima de contracción, lo que induce una congestión cardíaca y la solución retrocede hasta el hígado. Estudios microscópicos han confirmado que las células más impactadas se encuentran en la región peri-central del hígado (Suda *et al.* 2007).

Existen diversas hipótesis sobre si el DNA entra por medio de un receptor o por macropinocitosis. Estudios previos apoyan la noción de que los defectos en la membrana (poros) de los hepatocitos son responsables de la transferencia intracelular del DNA, por un mecanismo que lleva el nombre de hidroporación. Los animales suelen sobrevivir bien a la inyección a pesar de que el exceso de fluido induce una disfunción temporal del sistema cardiaco, un incremento agudo de la presión arterial a través del hígado, una expansión significativa del tamaño del hígado y una deformación estructural. La solución de DNA regresa al hígado por medio de la vena hepática, desplazando la sangre existente en el hígado por medio de la vena porta. De esta manera se evite la mezcla del DNA con las nucleasas presentes en la sangre (Bonamassa *et al.* 2011). También se ha reportado un incremento en la concentración de enzimas hepáticas en sangre, volviendo estos valores a la normalidad, alrededor de 72 horas post-inyección. El hígado regresa a su tamaño original a los 30 minutos, mientras que los poros se resellan aproximadamente a los dos minutos y los sinusoides afectados vuelven a su estructura y función original entre 24-36 horas después de la liberación génica hidrodinámica. Entre las aplicaciones de terapia génica hidrodinámica se encuentran: la hemofilia, deficiencia de la hormona del crecimiento, diabetes, obesidad, miocarditis, glomerulonefritis, regeneración del hígado y varios tipos de cáncer (Suda & Liu, 2007). Además, una ventaja en comparación con los sistemas convencionales bacterianos o de levaduras, es que la expresión del transgén en roedores evita problemas de mal plegamiento y una glicosilación alterada.

1.3 JUSTIFICACIÓN

La diabetes *mellitus* tipo 2 es un desorden metabólico crónico cuya prevalencia en la actualidad continúa incrementándose en todo el mundo. El estilo de vida actual de las sociedades occidentales favorece el hecho de que se dé una alta ingesta de calorías, baja actividad física, así como situaciones de estrés, lo cual facilita el desarrollo de diversas alteraciones en el metabolismo. Una de las principales características de la diabetes tipo 2 es la resistencia a la insulina, siendo éste un problema cada vez más abundante. Existen diversos tratamientos para la diabetes, entre ellos las tiazolidinedionas, las cuales tienen como blanco el factor de transcripción PPAR γ , el cual se encarga de favorecer el almacenamiento de lípidos y disminuir la resistencia a la insulina. Además, el hígado tiene una gran importancia en la regulación del metabolismo, y se ha observado que en ausencia de PPAR γ en tejido adiposo, el hígado se convierte en el principal sitio de acción de las tiazolidinedionas (Gavrilova *et al.* 2003).

Aún es mucho lo que se desconoce sobre la importancia de PPAR γ en el hígado y en el desarrollo y patología de la diabetes tipo 2, y dada la dificultad de realizar estudios en humanos a este respecto, se planteó el uso de terapia génica para la expresión inducida de PPAR γ humano en el hígado de ratones C57BL/6 en condiciones de diabetes tipo 2, con el objetivo de profundizar en el conocimiento del papel de PPAR γ en la regulación metabólica del hígado.

1.4HIPÓTESIS

La expresión de PPAR γ humano en hígado de ratones con diabetes tipo 2 por medio de un sistema inducible reduce la resistencia a la insulina.

1.5 OBJETIVOS Y METAS

Objetivo general:

Expresar PPAR γ humano en el hígado de ratones C57BL/6 por medio de terapia génica hidrodinámica y en condiciones de diabetes tipo 2.

Objetivos específicos:

1. Diseñar y construir los vectores para la expresión inducible de PPAR γ humano bajo un sistema de tetraciclina (Tet-On).
2. Expresar de manera transitoria e inducible PPAR γ humano en un modelo *in vitro* y analizar su expresión por PCR tiempo real.
3. Inducir diabetes tipo 2 en ratones C57BL/6 con un modelo combinado de dieta alta en grasa-fructosa y administración de estreptozotocina.
4. Inducir la expresión de PPAR γ humano en hígado de ratones C57BL/6 por medio de terapia génica hidrodinámica.
5. Determinar la expresión en hígado de PPAR γ humano por PCR punto final tras la inducción del sistema de tetraciclina.
6. Cuantificar los niveles de glucosa, insulina y adiponectina plasmática antes y después del tratamiento con terapia génica.
7. Determinar la expresión de PPAR γ humano en hígado por medio de dot blot.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Animales:

Se emplearon ratones machos C57BL/6 de entre 3-4 semanas al inicio del protocolo de inducción de diabetes tipo 2, los cuales se mantuvieron en jaulas con acceso a agua y alimento *ad libitum* con un ciclo luz/oscuridad de 12 h (6 AM-6 PM) y una temperatura ambiental aproximada de 22-25°C. Se empleó la alimentación estándar Teklad Global 18 % Protein Rodent Diet (Envigo). Los experimentos con animales se realizaron siguiendo las especificaciones indicadas en la NOM-062-ZOO-1999.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Diseño y construcción de los vectores para la expresión inducida de PPAR γ humano en el hígado de ratones C57BL/6

El sistema inducible por tetraciclina está basado en dos grupos de secuencias, siendo necesario por tanto dos plásmidos: pTRE3G-ZsGreen1 (también denominado plásmido respuesta, y donde se insertó el gen de interés, *PPAR γ* humano) (Figura 1) y pCMV-Tet3G (plásmido regulador) (Figura 2). El vector de clonación pTRE3G-ZsGreen1 (4,700 pb) consta de un marcador de resistencia a ampicilina, un promotor en respuesta a Tet de tercera generación (TRE3G), un marcador de fluorescencia (ZsGreen1), un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES2) y un sitio de clonación múltiple (MCS). Por otra parte, el vector de clonación pCMV-Tet3G (7,141 pb) consta de un promotor de citomegalovirus (CMV) y codifica para la proteína transactivadora, TET-ON. Con el objetivo de inducir la expresión de *PPAR γ* humano específicamente dirigida al hígado de ratones de la cepa C57BL/6, se clonó el gen codificante para la proteína TET-ON en el vector pALB-GFP (6,550 pb), el cual cuenta con un promotor/enhancer de albúmina de ratón, un sitio de clonación múltiple (MCS), un marcador de fluorescencia (EGFP) y un marcador de resistencia a kanamicina (Figura 3).

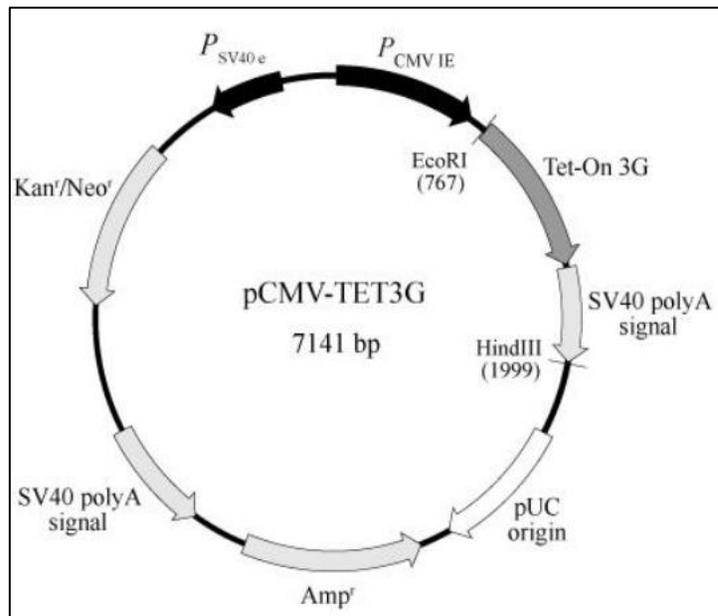


Figura 1. Representación gráfica del vector pCMV-Tet3G.

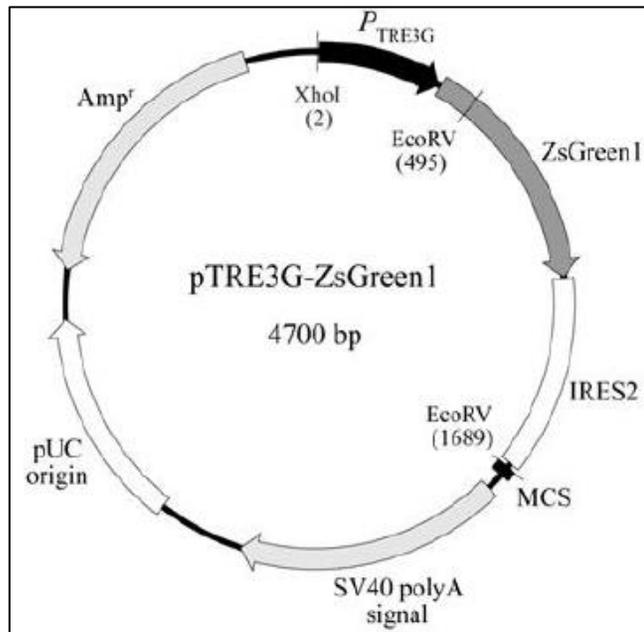


Figura 2. Representación gráfica del vector pTRE3G-ZsGreen1.

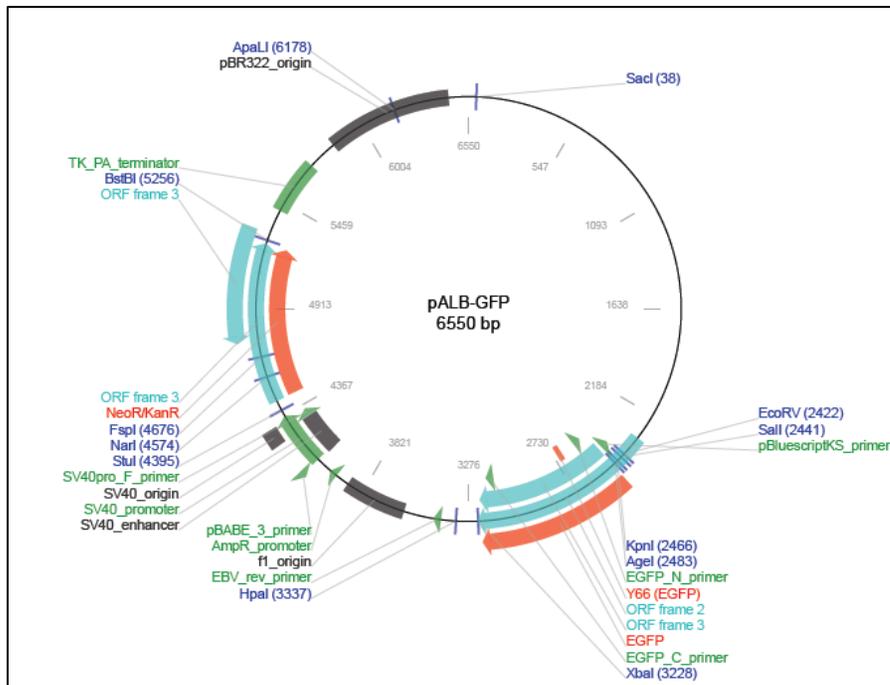


Figura 3. Representación gráfica del vector pALB-GFP.

El gen codificante para la proteína transactivadora, TET-ON, se insertó en el vector pALB-GFP empleando las enzimas de restricción *Sall* y *KpnI* en los extremos 5' y 3' del gen, respectivamente. A su vez, el gen *PPAR γ* se clonó en el sitio de clonación múltiple del vector pTRE3G-ZsGreen1 empleando las enzimas *MluI* y *NheI* en los extremos 5' y 3' del gen, respectivamente.

2.2.1.1 Clonación del gen *PPAR γ* humano en el vector pTRE3G-ZsGreen1

El gen codificante para la proteína PPAR γ humana se adquirió comercialmente a partir de la compañía General Biosystems, estando clonado en el vector pET-32a(+), el cual cuenta con un tamaño total de 7,286 pb. Se partió del vector en forma liofilizada, por lo que se resuspendió y diluyó a una concentración final de 50 ng/ μ L. A su vez, el vector pTRE3G-ZsGreen1

(Clontech, Cat. N° 631164) se diluyó en una relación 1:10, para obtener una concentración final de 50 ng/ μ L.

A partir de esto, se procedió a la transformación de bacterias *E. coli* DH5 α competentes a cloruro de rubidio (RbCl) (Apéndice A), empleando 20 μ L de la suspensión de bacterias, así como 1 y 3 μ L de cada plásmido, respectivamente.

Para el protocolo de transformación de bacterias DH5 α previamente tratadas con RbCl, se agregaron 20 μ l de la suspensión de bacterias a un tubo eppendorf enfriado, así como 1 μ l del plásmido (evaluación de la eficiencia de transformación) y 3 μ L. Después de eso, se mantuvo en hielo por 30 minutos, se pasó 45 segundos a 45 °C (baño maría) y se volvió a pasar 2 minutos al hielo. A continuación, se agregaron 800 μ l de medio Luria Bertani o LB y se dejó agitando 30 minutos a 90-100 rpm a 37 °C. Después de ese periodo, se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm y se retiraron 750 μ l. Posteriormente, se resuspendió el pellet y se realizó una siembra por extensión en placas de Petri con medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL) y se dejó incubando toda la noche a 37°C. Además, como control negativo se emplearon bacterias competentes a las que no se les agregó el plásmido.

A la mañana siguiente, se observó la presencia de colonias transformadas de cada uno de los plásmidos y se procedió a la inoculación de bacterias *E. coli* DH5 α transformadas en 6 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL) y se dejó incubando toda la noche a 37 °C en agitación (210 rpm).

Posteriormente, se realizó la extracción del plásmido a partir del cultivo obtenido. Para ello, se tomaron 1.5 mL del cultivo bacteriano, se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. A continuación, se adicionaron 300 µl del reactivo TENS (1 mL de Tris 0.5 M pH 7.5, 0.1 mL de EDTA 0.5 M pH 8, 1 mL NaOH 5N y 2.5 mL de SDS 10 % en un volumen total de 50 mL) al pellet, se resuspendió el pellet por pipeteo y se agitó en vórtex por 10 segundos. Después de esto, se añadieron 150 µl de acetato de sodio 3M (pH 4.8-5.2) y se volvió a dar vórtex por 10 segundos. Se centrifugó 10 minutos a toda velocidad y se separó el sobrenadante, pasándolo a un nuevo tubo eppendorf.

Posteriormente, se añadieron 900 µl de etanol absoluto, se mezcló y se mantuvo a -20°C por 30-40 minutos. Después se centrifugó 15 minutos a toda velocidad (13,300 rpm) y se descartó el sobrenadante. Se lavó con etanol 70 % (aproximadamente 500 µl) hasta despegar la pastilla, para eliminar el exceso de sales. Se descartó el sobrenadante, y se centrifugó 2 minutos a 13,000 rpm. Después de dejar secar los posibles restos de etanol, se agregaron 50 µl de agua estéril para resuspender el pellet.

A continuación, se cuantificó en Nanodrop 2000 la concentración de DNA plasmídico obtenido, y se corrió una electroforesis en gel de agarosa 1 % para confirmar la integridad de la muestra. Después de esto, se procedió a purificar el plásmido empleando un kit de purificación en gel de agarosa (QuickClean II Gel Extraction Kit, GenScript) y se cuantificó la cantidad obtenida del plásmido por medio de Nanodrop 2000. A continuación, se procedió a estandarizar la

reacción de PCR punto final. Para ello, se emplearon los oligonucleótidos o primers indicados en la TABLA I.

TABLA I. Secuencia de los primers diseñados para la amplificación de *PPAR γ* y un fragmento confirmatorio de pTRE3-ZsGreen1, además de las Tm y porcentaje de GC.

		Primers	Tm	GC %
PPARγ (1455 pb)	F	5'-GACT ACGCGT ATGACCATGGTTGACAC-3'	60.9°C	51.9 %
	R	5'-GCTC GCTAGC CTAGTACAAGTCCTTGTAG-3'	61.1°C	51.7 %
pTRE3-ZsGreen1 (509 pb)	F	5'-TGCCACGTTGTGAGTTGG-3'	55.9 °C	55.6 %
	R	5'-CCACCACTGCTCCCATTC-3'	56.0°C	61.1 %

En los primers diseñados para la clonación de *PPAR γ* se agregaron los sitios de restricción correspondientes para las enzimas *MluI* (primer forward) y *NheI* (primer reverse). A su vez, se diseñaron un par de primers para la identificación de pTRE3-ZsGreen1 (TABLA I), así como para posteriormente confirmar que la clonación del gen de interés fue correcta. Para la reacción de PCR se empleó la enzima Green Taq DNA Polimerase (GenScript) y las condiciones se indican en la TABLA II, con un total de 35 ciclos de reacción.

TABLA II. Reacción de PCR punto final para la amplificación de *PPAR γ* .

Reacción $V_{total}= 50 \mu\text{L}$		Condiciones (N° Ciclos=35)	
Agua libre de nucleasas	37.5 μL	94 °C	5'
Buffer 10X	5 μL	94 °C	45'
Mg ²⁺	2 μL	65 °C	1'
dNTP (2.5 mM)	1 μL	72 °C	2'
Primer forward (20 μM)	1 μL	72°C	10'
Primer reverse (20 μM)	1 μL	4°C	∞
DNAp (5 ng/ μL)	2 μL		
Taq polimerasa	0.5 μL		

TABLA III. Reacción de PCR para confirmar la naturaleza del vector de clonación pTRE3G-ZsGreen1.

Reacción $V_{total}= 50 \mu\text{L}$		Condiciones (N° Ciclos=35)	
Agua libre de nucleasas	37.5 μL	94 °C	5'
Buffer 10X	5 μL	94 °C	30''
Mg ²⁺	2 μL	60 °C	30''
dNTP (2.5 mM)	1 μL	72 °C	1'
Primer forward (20 μM)	1 μL	72°C	8'
Primer reverse (20 μM)	1 μL	4°C	∞
DNAp (5 ng/ μL)	2 μL		
Taq polimerasa	0.5 μL		

Una vez estandarizadas las condiciones necesarias para la reacción de PCR punto final, se realizó una PCR con la polimerasa de alta fidelidad Platinum SuperFi Green Master Mix PCR (Invitrogen). En la TABLA IV se muestran las condiciones de esta reacción, con un total de 35 ciclos. A continuación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 % (5 minutos a 80 V y 25 minutos a 120 V) para comprobar que se dio la amplificación. Para ello, se cargaron 7 μL de la muestra, 2 μL de buffer de carga 10X y 1 μL de tinción RedGel.

TABLA IV. Condiciones para la reacción de PCR de *PPAR γ* empleando Platinum SuperFi Green Master mix PCR (Invitrogen).

Reacción $V_{\text{total}}= 50 \mu\text{L}$	Condiciones		
	(N° Ciclos=35)		
Agua libre de nucleasas	21 μL	98 °C	4'
2X PlatinumSuperFi Green PCR Master Mix	25 μL	98 °C	30''
Primer forward (20 μM)	1 μL	65 °C	30''
Primer reverse (20 μM)	1 μL	72 °C	1'
DNA (1-10 ng)	2 μL	72°C	10'
		4°C	∞

Una vez que se obtuvo la amplificación de *PPAR γ* , se procedió a purificar la muestra empleando un kit de purificación de DNA en gel de agarosa (QuickClean II Gel Extraction Kit, GenScript, Cat No. L00418), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se cortó y pesó el fragmento de

interés agregándose Binding buffer II en proporción 1:3 (100 mg = 100 µl). A continuación, se incubó la muestra a 55°C por 10 minutos y se agitó en vórtex ocasionalmente. Una vez disuelto, se transfirió la muestra a la columna y se centrifugó a 12,000 por 1 minuto, descartándose el líquido. Después de eso, se agregaron 500 µl de Binding buffer II a la columna y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto, volviéndose a descartar el líquido. Posteriormente, se agregaron 750 µl de buffer de lavado a la columna, se incubó durante 5 minutos, y se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto en dos ocasiones, descartándose el líquido. Por último, se adicionaron 50 µl de buffer de elución a la columna, se dejó incubar durante dos minutos y por último, se volvió a centrifugar por un minuto.

A continuación, se cuantificó en Nanodrop 2000 la concentración de DNA obtenida y se llevó a cabo la primera reacción de digestión con la enzima *MluI* (Promega, Cat. No R6381, 1,000 u). Para ello se llevó a cabo la siguiente reacción (TABLA V).

TABLA V. Reacción de digestión de *PPAR γ* y pTRE3-ZsGreen1 con *MluI*.

Reacción	V _{total} = 50 µL
Agua libre de nucleasas	Hasta 50 µL
Buffer D 10X	5µL
BSA (10µg/µL)	0.5µL
DNA (1 µg)	-
<i>MluI</i> (10 u/µL)	0.5 µL

La digestión se realizó a una temperatura de incubación de 37 °C durante 3 horas. Una vez pasado este tiempo se procedió a inactivar la enzima *MluI* sometiéndola a 65 °C por 20 minutos.

Después de esto, se realizó una nueva electroforesis en gel de agarosa al 1 % para purificar las muestras digeridas de la reacción de PCR de *PPAR γ* y del vector pTRE3-ZsGreen1, empleándose de nuevo el kit QuickClean II Gel Extraction Kit. Una vez purificadas las muestras, se llevó a cabo la reacción de digestión con la enzima *NheI* (Promega, Cat. No R6501, 250 u) tal y como se muestra en la TABLA VI. Se dejó incubar por 3 horas a 37 °C y posteriormente, se inactivó sometiéndola a 65 °C por 20 minutos.

TABLA VI. Reacción de digestión de *PPAR γ* y pTRE3-ZsGreen1 con *NheI*.

Reacción	V _{total} = 50 μ L
Agua libre de nucleasas	Hasta 50 μ L
Buffer B 10X	5 μ L
BSA (10 μ g/ μ L)	0.5 μ L
DNA (1 μ g)	-
<i>NheI</i> (10 u/ μ L)	0.5 μ L

Al finalizar esta segunda reacción de digestión, se purificaron las muestras y se cuantificaron en Nanodrop 2000, para a continuación realizar la reacción de ligación a temperatura ambiente por 16 horas (TABLA VII).

Para esta reacción se empleó la enzima Ligasa T4 (Invitrogen, Cat. No 15224-017, 100 U). La relación en tamaño entre el inserto y el vector fue de 3.3 y la relación molar inserto/vector fue de 3:1.

TABLA VII. Condiciones de la reacción de ligación por medio de la DNA ligasa T4.

Reacción	V _{total} = 50 µL
BufferLigasa 5X	10 µL
Inserto	3-30 fmol
Vector	9-90 fmol
DNA total	0.01-0.1 µg
DNA Ligasa T4	0.5µL

Al día siguiente, se realizó la transformación de bacterias *E. coli* DH5α competentes con una cantidad de entre 50-100 ng de la reacción de ligación. A partir de las colonias transformantes obtenidas, se realizó una inoculación en medio LB suplementado con ampicilina, dejándose incubar a 37 °C durante 16 horas. Después de eso, se realizó una extracción plasmídica y se corroboró por PCR punto final que la clonación fue exitosa empleando las condiciones de reacción indicadas anteriormente en la TABLA III.

2.2.1.2 Clonación del gen *TET-ON* en el vector pALB-GFP

El plásmido pALB-GFP fue donado por Snorri Thorgeirsson (Addgene plasmid # 55759) en forma de DNA en papel de filtro. Para la recuperación del plásmido, se recortó el círculo contenedor del DNA en condiciones de esterilidad, se sumergió en 30 μL de buffer TE y se mezcló por medio de pipeteo. Tras esperar unos 10 minutos, se recuperó el buffer TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM) con DNA. Se cuantificó el material obtenido empleando Nanodrop 2000, obteniéndose una concentración de 6 ng/ μL . Posteriormente, se procedió a la transformación de bacterias *E. coli* DH5 α cloruro de rubidio competentes con 1 μL y 3 μL , respectivamente, empleando medio LB con agar, suplementado con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A partir de colonias transformantes se realizó un inóculo y al día siguiente se llevó a cabo la extracción plasmídica.

De igual manera, el vector pCMV-Tet3G (Clontech, Cat. N° 631164) se diluyó en una relación 1:10, para obtener una concentración final de 50 ng/ μL . Después de eso, se llevó a cabo la transformación de bacterias competentes. A la mañana siguiente, se observó la presencia de colonias transformadas de cada uno de los plásmidos y se procedió a la inoculación de bacterias *E. coli* DH5 α transformadas en 6 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se dejó incubando toda la noche a 37 °C en agitación (210 rpm). Posteriormente, se realizó la extracción plasmídica empleando el método de TENS, se purificaron las muestras y se cuantificó el DNA obtenido por medio del Nanodrop 2000.

A continuación, se procedió a estandarizar la reacción de PCR punto final. Para ello, se emplearon los primers indicados en la TABLA VIII.

TABLA VIII. Secuencia de los primers diseñados para la amplificación de *TET-ON* y pALB-GFP, además de las T_m y porcentaje de GC.

		Primers	T_m	GC %
TET-ON (1,237 pb)	F	5'-CGGAGTCGACATGTCTAGACTGGAC-3'	60 °C	56 %
	R	5'-GATAGGTACCGCTGGATACTTCCCG-3'	60.1 °C	56 %
pALB-GFP (791 pb)	F	5'-GTTCTCCAGCTTGGGATCG-3'	55.6 °C	57.9 %
	R	5'-CGGGTCTTGTAGTTGCCG-3'	56°C	61.1 %

En los primers diseñados para la clonación de *TET-ON* se agregaron los sitios de restricción correspondientes para las enzimas *Sa*II (primer forward) y *K*pnl (primer reverse). Para la reacción de PCR se empleó la enzima Green Taq DNA Polimerase (GenScript) y las condiciones se indican en la TABLA IX. A su vez, se diseñaron un par de primers para la identificación de pALB-GFP, para posteriormente confirmar que la clonación del gen de interés fue correcta (TABLA X). El número de ciclos fue de 35 en ambos casos.

TABLA IX. Reacción de PCR punto final para la amplificación de *TET-ON*.

Reacción	V _{total} = 50 µL	Condiciones (N° Ciclos=35)	
		Temperatura	Tiempo
Agua estéril	37.5 µL	94 °C	5'
Buffer 10X	5 µL	94 °C	45'
Mg ²⁺	2 µL	65 °C	1'
dNTP (2.5 mM)	1 µL	72 °C	2'
Primer forward (20 µM)	1 µL	72°C	10'
Primer reverse (20 µM)	1 µL	4°C	∞
DNAp (5 ng/µL)	2 µL		
Taq polimerasa	0.5 µL		

TABLA X. Reacción de PCR para confirmar la naturaleza del vector de clonación pALB-GFP.

Reacción	V _{total} = 50 µL	Condiciones (N° Ciclos=35)	
		Temperatura	Tiempo
Agua estéril	37.5 µL	94 °C	5'
Buffer 10X	5 µL	94 °C	30''
Mg ²⁺	2 µL	60 °C	30''
dNTP (2.5 mM)	1 µL	72 °C	1'
Primer forward (20 µM)	1 µL	72°C	8'
Primer reverse (20 µM)	1 µL	4°C	∞
DNAp (5 ng/µL)	2 µL		
Taq polimerasa	0.5 µL		

Una vez estandarizadas las condiciones necesarias para la reacción de PCR punto final, se realizó una PCR con la polimerasa de alta fidelidad Platinum SuperFi Green Master Mix PCR (Invitrogen) (TABLA XI).

TABLA XI. Condiciones para la reacción de PCR de *TET-ON* empleando Platinum SuperFi Green Master mix PCR (Invitrogen).

Reacción	V _{total} = 50 µL	Condiciones (N° Ciclos=35)	
		Agua libre de nucleasas	21 µL
2X PlatinumSuperFi Green PCR Master Mix	25 µL	98 °C	30''
Primer forward (20 µM)	1µL	65 °C	30''
Primer reverse (20 µM)	1 µL	72 °C	1'
DNA (1-10 ng)	2µL	72°C	10'
		4°C	∞

A continuación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 % (5 minutos a 80 V y 25 minutos a 120 V) para comprobar que se dio la amplificación. Para ello, se cargaron 7 µL de la muestra, 2 µL de buffer de carga 10X y 1 µL de tinción RedGel.

Una vez que se obtuvo la amplificación de *TET-ON*, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 % y se purificó el fragmento de interés. A continuación, se cuantificó en Nanodrop 2000 la concentración de DNA obtenida y se llevó a cabo la primera reacción de digestión con la enzima *SaI* (ThermoFisher, Cat. No VGN014-6, 1,500 U), indicada en la TABLA XII.

TABLA XII. Reacción de digestión de *TET-ON* y pALB-GFP con *Sall*.

Reacción	V _{total} = 50 µL
Agua libre de nucleasas	Hasta 50 µL
Buffer Anza 10X	5µL
DNA (0.2-1 µg)	-
<i>Sall</i> (20 u/µL)	1 µL

La digestión se realizó a una temperatura de incubación de 37 °C durante 3 horas. Una vez pasado este tiempo se procedió a inactivar la enzima *Sall* sometiéndola a 80 °C por 20 minutos.

Después de esto, se realizó una nueva electroforesis en gel de agarosa al 1 % para purificar las muestras digeridas. Una vez purificadas las muestras, se llevó a cabo la reacción de digestión con la enzima *KpnI* (Promega, Cat. No R6341, 2,500 u), indicada en la TABLA XIII. Se dejó incubar por 3 horas a 37 °C y en este caso, no se realizó la inactivación por calor, ya que la enzima *KpnI* no se inactiva completamente por medio de calor.

Al finalizar esta segunda reacción de digestión, se purificaron las muestras y se cuantificaron en el Nanodrop 2000, para a continuación realizar la reacción de ligación a temperatura ambiente por 16 horas. La relación en tamaño entre el inserto y el vector fue de 1:5 y la relación molar inserto/vector fue de 3:1. La reacción de ligación se realizó de la misma manera indicada anteriormente para la clonación de *PPARγ* (TABLA VII).

TABLA XIII. Reacción de digestión de *TET-ON* y pALB-GFP con *KpnI*.

Reacción	V _{total} = 50 µL
Agua libre de nucleasas	Hasta 50 µL
Buffer B 10X	5µL
BSA (10µg/µL)	0.5µL
DNA (1 µg)	-
<i>KpnI</i> (10 u/µL)	0.5 µL

Al día siguiente, se realizó la transformación de bacterias *E. coli* DH5α competentes con una cantidad de entre 50-100 ng de la reacción de ligación. A partir de las colonias transformantes obtenidas, se realizó una inoculación en medio LB suplementado con ampicilina, dejándose incubar a 37 °C durante 16 horas. Después de eso, se realizó una extracción plasmídica y se corroboró por PCR punto final que la clonación fue exitosa empleando las condiciones de reacción indicadas anteriormente en la TABLA X.

2.2.2 Expresión transitoria de PPARγ humano en células HEK293T

2.2.2.1 Mantenimiento de la línea celular HEK293T

La línea celular HEK293T (células embrionarias de riñón humano 293T) fue donada por el Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma Nacional de México. Las células HEK293T se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM,

high glucose, GIBCO Life Technologies) y suero fetal bovino al 10 %, a 37°C y en una atmósfera de 5 % de CO₂ en una incubadora de CO₂ (Thermo Fisher Scientific). Las células HEK293T son ligeramente adherentes por lo que para la realización del cambio de medio y pase celular, se evitó el uso de soluciones de lavado como buffer de fosfatos (PBS). Por ello, para el cambio de medio se retiró el contenido por aspiración y se volvieron a agregar 3 mL de medio fresco en el frasco de cultivo de 25 cm² (Thomas *et al.* 2004).

Cuando las células alcanzaron una confluencia de entre 70-80 % se llevó a cabo el pase celular. Se retiró el contenido por aspiración, se agregaron 0.5 mL de tripsina (Trypsin-EDTA (0.25 %) Gibco), se incubó el frasco durante 3-5 minutos a 37°C y posteriormente, se procedió a neutralizar la tripsina con 1 mL de medio de cultivo y se resuspendió bien el contenido. A partir del tercer pase celular, las células se emplearon para la realización de los ensayos de transfección. Para ello, se obtuvo una suspensión celular, la cual se pasó a un tubo falcon de 15 mL y se centrifugó a 1,300 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. Una vez obtenido el pellet, se retiró el sobrenadante y se agregó medio DMEM con suero fetal bovino libre de tetraciclinas (Tet System Approved FBS, US-Sourced, Cat. No 631105, Clontech). Se tomaron 10 µL de la suspensión celular y se colocaron en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de las células, ajustándose a 300,000 células/mL. Después, se sembraron 400,000 células/pocillo en placas de 6 pocillos (CLS3516, Corning), para que alcanzara una confluencia entre 50-70 % en el momento de la transfección, y se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C y 5 % de CO₂. Al día

siguiente, se observó la formación de la monocapa y se llevó a cabo el protocolo de transfección (Clontech, Takara).

2.2.2.2 Transfección transitoria en células HEK293T con el polímero Xfect Polymer (Clontech)

La transfección se realizó empleando el polímero catiónico comercial Xfect Polymer (Clontech). Antes de iniciar, se dio vórtex al polímero Xfect y al buffer de reacción Xfect. En tubos de microcentrífuga se diluyó la cantidad deseada (1-4 μg) del plásmido correspondiente, en un volumen final de buffer Xfect de 100 μL . Después de agregar el plásmido, se añadieron 0.3 μL de polímero por cada μg de plásmido y se mezcló bien con vórtex durante 10 segundos a alta velocidad. Se dejaron incubar los tubos por 10 minutos a temperatura ambiente, para permitir la formación de los complejos de nanopartículas. A continuación, se dio una ligera agitación y se agregaron los 100 μL de la solución de nanopartículas gota a gota a cada uno de los pocillos y finalmente, se agitó la placa ligeramente para mezclar bien el contenido.

Se realizó la cotransfección transitoria de los plásmidos del sistema Tet-On. El primer pocillo fue el control negativo (células HEK293T no transfectadas). En los pocillos 2 y 3 se agregaron 1 μg de pCMV-Tet3G y 4 μg de pTRE-ZsGreen1-PPAR γ , uno sin la adición de doxiciclina y otro con la adición de doxiciclina (Cayman Chemical) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A su vez, en el pocillo 4, las células se cotransfectaron con 1 μg de pCMV-Tet3G y 4 μg de pTRE-ZsGreen vacío, como un control de la expresión de ZsGreen1. Este ensayo se realizó por triplicado.

A continuación se muestra un esquema del experimento realizado:

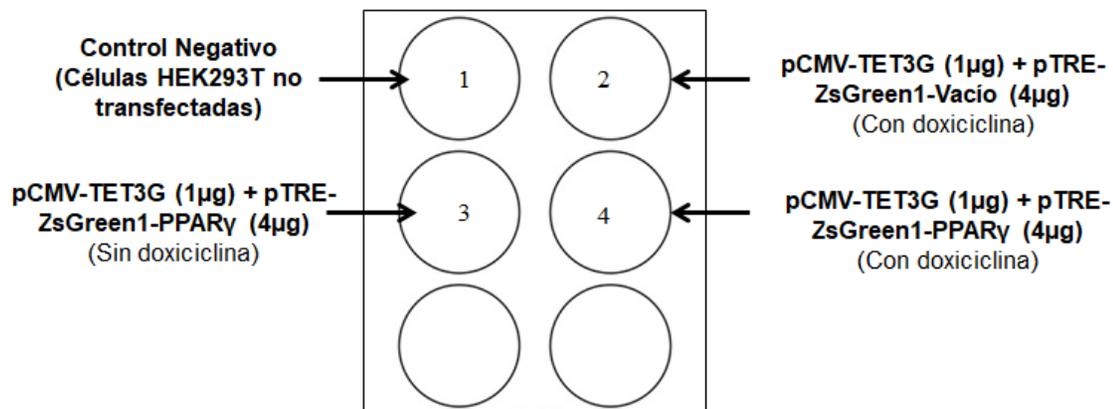


Figura 4. Esquema del ensayo de transfección transitoria en placas de 6 pocillos con el sistema inducible Tet-On en células HEK293T.

Se incubó la placa a 37°C toda la noche y a la mañana siguiente, se retiró por aspiración el medio con las partículas catiónicas formadas y se agregaron 2 mL de medio DMEM fresco suplementado con el inductor doxiciclina a una concentración de 1 µg/mL (en los pocillos indicados anteriormente) y se volvió a incubar a 37°C durante otras 24 horas. Por último, se obtuvo el pellet celular de cada uno de los pocillos para el análisis de los niveles de expresión de PPAR γ humano en las distintas condiciones experimentales.

2.2.2.3 Extracción de RNA total a partir de células HEK293T

La extracción del RNA se realizó con la técnica de TRIzol (TRIzol Reagent) también denominada extracción por tiocianato de guanidina y fenol-cloroformo (Chomczynski *et al.* 1987). La extracción se realizó 24 horas después de la adición del inductor doxiciplina, agregándose 0.5 mL de TRIzol directamente en cada pocillo. Se procedió a la resuspensión de las células y se dio vórtex durante 15 segundos. Se dejó reposar la muestra en hielo durante 2 minutos y después de esto, se adicionaron 200 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 60 segundos. Posteriormente, se dejó reposar en hielo durante otros 3 minutos y se centrifugó la muestra a 13,300 rpm por 8 minutos a 4°C. Una vez finalizada la centrifugación, se tomó cuidadosamente la fase acuosa (sobrenadante) y se pasó a un nuevo tubo eppendorf con 500 μ L de isopropanol previamente enfriado, mezclándose por inversión. A continuación, se incubó la muestra a -20°C durante unos 15-20 minutos y se volvió a centrifugar a 13,300 rpm durante 10 minutos, para la precipitación del RNA en presencia de isopropanol. Se decantó el sobrenadante y el pellet formado se lavó con 500 μ L de etanol al 70 %, para el lavado de la pastilla. Después, se centrifugó a 8,000 rpm durante 5 minutos, se retiró el etanol y se dejó secar el tubo. Por último, se disolvió la pastilla en 50 μ L de agua libre de RNasas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Se evaluó la integridad del RNA por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1 % (70 V durante 5 minutos y 90 V durante 30 minutos) y se llevó a cabo la cuantificación de la muestra por espectrofotometría empleando el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), determinándose la relación 260/280 para evaluar la pureza del RNA.

2.2.2.4 Síntesis de DNA complementario por retrotranscripción y PCR tiempo real

Una vez obtenido el RNA, se procedió a realizar la reacción de transcripción reversa, para la generación del DNA complementario (cDNA), y posteriormente la reacción de PCR tiempo real, empleando el equipo de PCR tiempo real One-Step (Applied Biosystems®). Para la retrotranscripción se empleó el kit SuperScript ® IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo la reacción mostrada en la TABLA XIV. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 10 minutos a 23 °C, 10 minutos a 55 °C y 10 minutos a 80°C (para la inactivación de la reacción).

TABLA XIV. Reacción de retrotranscripción de RNA por medio del kit SuperScript® IV Reverse Transcriptase para la generación del cDNA.

Reacción	Volumen total = 20 µL	Concentración final
Agua libre de RNAasas	Hasta 20 µL	N/A
Buffer SSIV 5X	4 µL	1X
10 mM dNTP mix	1 µL	0.5 mM cada uno
100 mM DTT	1 µL	5 mM
Inhibidor RNAsa (RNaseOUT, 40 U/µL)	1 µL	2.0 U/ µL
50 µM Oligo d(T)20 primer o 50 µM hexámeros aleatorios	1 µL	2.5 µM
RNA	2 µg	< 5 µg de RNA total

Una vez obtenido el cDNA se empleó el kit Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs) para llevar a cabo las reacciones de PCR en tiempo real (TABLA XV), empleando un protocolo de 40 ciclos.

En primer lugar, se realizaron las curvas de cuantificación relativa para el gen de interés, *PPAR γ* , y para los genes de referencia *GAPDH* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y β -Actina (*ACTB*), mostrándose en la TABLA XVI los primers diseñados para la amplificación por PCR.

TABLA XV. Esquema general de la reacción de PCR tiempo real empleando el kit qPCR Master Mix, así como las condiciones generales.

Reacción	Volumen total= 20 µL	Condiciones			
Luna Universal qPCR Reaction Mix (2X)	10 µL	Desnaturalización inicial	95°C	60 segundos	1 ciclo
Forward primer (10 µM)	0.8 µL	Desnaturalización	95°C	15 segundos	40 ciclos
Reverse primer (10 µM)	0.8 µL	Extensión	60-62°C	30 segundos	
cDNA	Variable	Melt curve	60-95°C		
Agua libre de nucleasas	Hasta 20 µL				

TABLA XVI. Lista de primers correspondientes a *PPAR γ* y los genes de referencia *GAPDH* y *ACTB*.

		Primers	Tm	GC %
PPAR γ (170 pb)	Forward	5'- GCCTTTTGGTGACTTTATGG -3'	59.3	45
	Reverse	5'- GTAGCAGGTTGTCTTGAATG -3'	58.6	45
GAPDH (113 pb)	Forward	5'-AGAAGGTGGTGAAGCAGG-3'	61.2	57.9
	Reverse	5'-GTCAAAGGTGGAGGAGTGG-3'	61.7	60
ACTB (165 pb)	Forward	5'-TCTGGCACCCACACCTTCTAC-3'	63.5	50
	Reverse	5'-GCACAGCCTGGATAGCAAC -3'	62.9	52.4

Para la realización de las curvas de cuantificación relativa se emplearon rangos de cDNA de entre 100 ng y 0.1 pg, con el objetivo de determinar las eficiencias de reacción. Para el gen *GAPDH* se realizó una curva con rangos de cDNA entre 100 y 0.16 ng (con una dilución de 1:5) y una temperatura de extensión de 62°C. Para el gen β -Actina (*ACTB*) el rango fue de 100 a 6.25 ng (con una dilución entre las muestras de 1:2) y una temperatura de extensión de 61°C. Finalmente, para la realización de la curva tipo o curva de cuantificación relativa se empleó como muestra el plásmido pTRE-ZsGreen-PPAR γ , en un rango de entre 1 ng y 0.1 pg (con una dilución de 1:10) y una temperatura de extensión de 60°C.

Posteriormente, se analizó la expresión relativa de *PPAR γ* en las distintas muestras experimentales, así como la expresión de los genes de referencia *GAPDH* y *ACTB*, agregándose 5 ng de cDNA en cada reacción. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado, teniéndose como control (o calibrador) las muestras de cDNA de células transfectadas con el plásmido pTRE-ZsGreen-Vacío y sin la adición de doxiciclina, además de agregarse controles negativos (agua), para descartar la presencia de contaminación.

Los resultados obtenidos se analizaron por el método $\Delta\Delta Cq$ (Bustin *et al.* 2009) en el que se tiene en cuenta tanto el Cq (ciclo de cuantificación) de los genes normalizadores o de referencia como el de la muestra calibradora o control. Se define el Cq como el ciclo en el cual es posible detectar la fluorescencia, estando ésta por encima del nivel umbral y siendo por tanto, significativamente mayor a la fluorescencia basal.

Las fórmulas utilizadas fueron las siguientes:

$$\Delta Cq = Cq \text{ Gen de interés} - Cq \text{ Gen referencia}$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ Muestra prueba} - \Delta Cq \text{ Muestra calibrador}$$

2.2.2.5 Evaluación de la expresión de ZsGreen1 por medio de fluorescencia

Para la cuantificación de la fluorescencia, las células HEK293T se sembraron en placas de 6 pocillos y se transfectaron, como se ha descrito previamente. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se analizó de manera indirecta la expresión de ZsGreen1 en un fluorómetro de microplacas, Fluoroskan Ascent (ThermoFisher), con una longitud de onda de excitación de 495 nm y de emisión de 538 nm. Esto se realizó por triplicado y para todas las muestras.

2.2.3 Inducción del modelo de diabetes tipo 2 en ratones C57BL/6

Para la estandarización de la inducción de diabetes tipo 2 en ratones machos C57BL/6 se llevó a cabo un experimento preliminar con el objetivo de establecer qué condiciones eran más adecuadas para la generación de esta patología. Para ello, se emplearon tres grupos de ratones:

- Grupo control (n=3): dieta estándar y agua.
- Grupo con dieta suplementada con fructosa y estreptozotocina (n=5).

- Grupo con dieta alta en grasa, suplementada con fructosa y estreptozotocina (n=5).

La fructosa (Biobasic) se suplementó en el agua en forma de solución al 15 % (15 g/100 mL) con el objetivo de inducir una resistencia a la insulina. Además, se administró intraperitonealmente una única dosis de 100 mg/kg de estreptozotocina (STZ 500mg, SIGMA) con la finalidad de generar hiperglucemia. El protocolo se basó en un total de 8 semanas, realizándose en la semana 4 la administración de la dosis de estreptozotocina (Luo *et al.* 1998).

La administración de fructosa al 15 % junto con dextrosa al 1 %, esta última con la finalidad de evitar la diarrea en los animales, se llevó a cabo desde el momento del destete, es decir, aproximadamente a partir las 3-4 semanas de edad.

La generación de una dieta alta en grasa tuvo lugar por medio de la suplementación de un 30 % de manteca de cerdo (967 kcal/100 g) a la dieta estándar (340 kcal/100 g). Para ello se molió el alimento o dieta estándar y se mezcló con la manteca hasta formar una masa compacta. Teniendo en cuenta que la dieta estándar contiene un 3 % de grasa, en esta nueva dieta, el 58 % de las calorías se obtuvieron a partir de las grasas, en lugar de los carbohidratos, como en la dieta estándar comercial de los ratones.

A su vez, la estreptozotocina se administró en una única dosis de 100 mg/kg. Dependiendo del peso total de los animales de experimentación, se pesó la cantidad requerida de estreptozotocina y se resuspendió en buffer

citrato 0.1 M (pH 4.5) frío justo antes de la administración, ya que la estreptozotocina es estable únicamente durante 15-20 minutos. Para la preparación del buffer de citrato 0.1 M, se mezclaron 7.425 mL de ácido cítrico con 7.575 mL de citrato sódico, teniendo un pH final de 4.5

Además, se midió semanalmente el peso corporal en los tres grupos experimentales (aproximadamente al mediodía) y se evaluó el consumo medio de líquido diario (agua o fructosa 15 %) y el consumo de comida de cada grupo (media \pm SD), antes y después de la administración de estreptozotocina. El modelo de inducción de diabetes que aportó mejores resultados, fue el empleado en los experimentos realizados posteriormente.

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes de interés y las condiciones para la inducción de diabetes, se establecieron 5 grupos experimentales:

- Grupo control: dieta estándar y agua (n=4)
- Grupo diabetizado (sin tratamiento) (n=4)
- Grupo diabetizado con co-administración de plásmidos por terapia génica hidrodinámica (sin doxiciclina) (n=4)
- Grupo diabetizado con co-administración de plásmidos por terapia génica hidrodinámica (con doxiciclina) (n=4)
- Grupo diabetizado tratado con pioglitazona (n=4)

De igual manera que en el experimento preliminar, los animales se comenzaron a diabetizar entre las 3-4 semanas, una vez finalizado el destete.

Se evaluó la variación de peso corporal durante todo el experimento, así como la cantidad de líquidos y comida consumida por grupo, antes y después de la administración de estreptozotocina, al igual que durante el tratamiento. El protocolo tuvo una duración de 8 semanas, seguido de 2 semanas de tratamiento (inducción de la expresión de PPAR γ , pioglitazona o sin tratamiento).

2.2.4 Terapia génica hidrodinámica para la expresión de PPAR γ en el hígado de ratones C57BL/6

2.2.4.1 Extracción de plásmidos pTRE-ZsGreen1-PPAR γ y pALB-TETON

Para la obtención de los plásmidos de interés, se llevó a cabo la inoculación en 3 mL de medio LB de colonias *E. coli* DH5 α transformadas con los plásmidos pTRE-ZsGreen1-PPAR γ o pALB-TETON, suplementado con ampicilina y kanamicina, respectivamente. Se incubaron a 37°C durante 16 horas y con una agitación de 210 r.p.m. A la mañana siguiente, se realizó la extracción plasmídica empleando el kit Monarch[®] Plasmid Miniprep (New England Biolabs, Cat. T1010S). De manera resumida, se centrifugaron 3 mL de cultivo bacteriano durante 1 minuto a 13,300 r.p.m. Se dejó secar el pellet durante unos 5-10 minutos y a continuación se resuspendió en 200 μ L del buffer B1 empleando vórtex o pipeteo. Después, se agregaron 200 μ L del buffer B2 y se invirtieron los tubos 5-6 veces hasta que adquirieron un color rosa

oscuro y se dejó incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente, se neutralizó añadiendo 400 μ L del buffer B3. Se invirtió varias veces y se dejó incubar por 2 minutos para después centrifugar durante 5 minutos a 13,300 r.p.m. El sobrenadante obtenido se transfirió a una columna de purificación y se centrifugó a 13,300 r.p.m. durante 1 minuto. En el siguiente paso, se agregaron 200 μ L del buffer de lavado 1 y se dejó incubar durante 5 minutos, ya que el uso dado fue el de transfección. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 1 minuto y se agregaron 400 μ L del buffer de lavado 2, para volver a centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto. Finalmente, se transfirió la columna a un nuevo tubo de 1.5 mL, se agregaron 50 μ L del buffer de elución (buffer TE) y después de incubar por unos minutos, se centrifugó durante 1 minuto a 13,300 r.p.m. Las muestras plasmídicas obtenidas se cuantificaron en Nanodrop 2000 y se evaluó su integridad y pureza por medio de un gel de agarosa al 1 %.

2.2.4.2 Estandarización de la expresión de PPAR γ en hígado de ratones C57BL/6

2.2.4.2.1 Inyección intravenosa de los plásmidos en la vena caudal

Con el objetivo de estandarizar la inyección intravenosa de los plásmidos así como evaluar la expresión de estos en el tiempo, se llevó a cabo la inyección de 20 μ g de pTRE-ZsGreen1-PPAR γ (plásmido respuesta) y 10 μ g de pALB-TETON (plásmido regulador) en la vena caudal de ratones machos sanos de unas 12-16 semanas de edad. Para ello, los plásmidos se diluyeron en

solución inyectable Hartmann (PiSA) en un volumen final de 1-1.5 mL (8-10 % peso/volumen del peso corporal del animal). De forma previa a la inyección, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (100 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina) por vía intraperitoneal. Este tipo de anestesia es de las más usadas en roedores y tiene una duración aproximada de 30-40 minutos. Una vez que estuvieron anestesiados completamente, se colocó la cola en agua caliente (37-40°C) durante 5 minutos para conseguir una vasodilatación de la vena caudal. Después de este periodo, se inyectaron los plásmidos empleando una aguja 27G y en un tiempo de 5-7 segundos. Por último, se vigiló a los animales hasta que se recuperaron totalmente de la anestesia.

2.2.4.2.2 Estandarización de la expresión de PPAR γ en hígado de ratones C57BL/6 sanos por PCR punto final

Con la finalidad de analizar la expresión de los plásmidos transfectados en hígado por medio de terapia génica, se inyectaron 4 ratones sanos con 20 μ g de pTRE-ZsGreen1-PPAR γ y 10 μ g de pALB-TETON. Se les administró doxiciclina en agua (2 mg/mL) para inducir la expresión del sistema Tet-On y se sacrificaron en los días 1, 2, 4 y 7, respectivamente. Se obtuvo el hígado, se colocó en una placa de Petri pequeña para lavarlo y se obtuvieron fragmentos, para por último, congelarlos a -80°C. Además, también se sacrificó y obtuvo el hígado de un ratón al que no se le administraron los plásmidos, actuando como un control negativo.

Posteriormente, se pesaron 30-50 mg de hígado en un tubo Eppendorf estéril y se agregaron 500 μ L del reactivo TRIzol. Con unos pistilos se procedió a disgregar el tejido, hasta conseguir una solución homogénea y siempre manteniendo la muestra en frío para evitar la degradación del RNA. El resto del procedimiento para la extracción de RNA fue igual que el descrito anteriormente en el apartado 5.2.2.3.

Una vez obtenido el RNA, se evaluó su integridad en un gel de agarosa al 1 % y se cuantificó espectrofotométricamente en el Nanodrop 2000. Para realizar la retrotranscripción (descrita previamente en la metodología) se agregaron 2 μ g de RNA y se diluyó el cDNA obtenido a una concentración de 1 ng/ μ L para realizar la PCR punto final empleando la enzima GreenTaq.

Por PCR punto final se evaluó la expresión en hígado de los genes transfectados: *TET-ON* (contenido en el plásmido regulador) y *PPAR γ* humano en los diferentes tiempos (día 1, 2, 4 y 7). Para ello se emplearon los primers utilizados anteriormente para la clonación de *TET-ON* y la confirmación de la clonación de *PPAR γ* en el plásmido respuesta (TABLA XVII).

TABLA XVII. Primers diseñados para la amplificación de *PPAR γ* , *TET-ON* y pTRE3-ZsGreen1

		Primers	Tm	GC %
PPARγ (1455 pb)	F	5'-GACT ACGCGT ATGACCATGGTTGACAC-3'	60.9°C	51.9%
	R	5'-GCTCG CTAGC CTAGTACAAGTCCTTGTAAG-3'	61.1°C	51.7%
pTRE3-ZsGreen1 (509 pb)	F	5'-TGCCACGTTGTGAGTTGG-3'	55.9 °C	55.6%
	R	5'-CCACCACTGCTCCCATTC-3'	56.0°C	61.1%
TET-ON (1237 pb)	F	5'-CGGAG TCGAC ATGTCTAGACTGGAC-3'	60 °C	56 %
	R	5'-GATAG GTACCG CTGGATACTTCCCG-3'	60.1 °C	56 %

Finalmente, se corrieron las reacciones de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se determinó la presencia o no de la expresión de los transgenes en el hígado de los ratones.

2.2.5 Determinación de la expresión génica de PPAR γ en hígado por PCR punto final en ratones diabetizados y controles

Tras ocho semanas de inducción de diabetes en los grupos experimentales, se llevó a cabo un periodo de tratamiento de 14 días. Para ello, los ratones de los grupos correspondientes fueron inyectados de manera intravenosa con 20 μ g de pTRE-ZsGreen1-PPAR γ (plásmido respuesta) y 10 μ g de pALB-TETON (plásmido regulador) en los días 0 y 7 del periodo de tratamiento. Durante todo este tiempo, tuvo lugar la administración de doxiciclina (2mg/mL) en el agua, junto con la fructosa, para la inducción del sistema Tet-on. La doxiciclina es sensible a la luz por lo que los bebederos

contenedores de la doxiciclina se envolvieron con papel de aluminio y se renovó el contenido cada segundo o tercer día.

De igual manera, en el grupo diabetizado tratado con pioglitazona (PiSA, 15 mg), ésta se administró diariamente de forma oral durante 14 días, a una concentración de 30 mg/kg de peso corporal.

Una vez finalizado este periodo de tiempo, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se obtuvieron muestras de hígado, las cuales fueron conservadas a -80°C para su posterior análisis. De forma similar al procedimiento de estandarización, se llevó a cabo la extracción de RNA total del tejido hepático empleando TRIzol. Se evaluó la integridad y pureza del RNA obtenido por medio de gel de agarosa al 1 % y en Nanodrop. A continuación, se realizó la retrotranscripción a cDNA, el cual fue empleado para las reacciones de PCR punto final.

2.2.6 Determinación de los niveles de glucosa, insulina y adiponectina plasmática

2.2.6.1 Niveles de glucosa en sangre y prueba de tolerancia a glucosa

Antes de iniciar el protocolo de diabetización, se determinó la concentración de glucosa sanguínea en los animales, empleando un kit de glucosa oxidasa (Glucosa GOD FS, Diagnostic Systems). La toma de muestra se realizó tras un periodo de ayuno de 5-6 horas (Han *et al.* 2008). Esta medición se realizó durante tres días consecutivos antes de iniciar con el

protocolo de diabetización. Posteriormente, se volvieron a evaluar los niveles de glucosa en la semana 4 (antes de la inyección de estreptozotocina), así como en las semanas 6-10. La muestra de sangre se obtuvo a partir de la vena caudal de los ratones realizándose un pequeño corte de 1 mm en la punta de la cola y obteniéndose una media de 30-40 μL de sangre. A los tubos empleados para la recolección de la muestra se les agregaron 5 μL de EDTA (0.5 M pH 8.0) filtrado para evitar la coagulación de la sangre. La muestra se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos, y se obtuvo el plasma.

La determinación se llevó a cabo mediante un test fotométrico enzimático "GOD-PAP" y se basa en la determinación de glucosa después de la oxidación enzimática por la enzima glucosa oxidasa. El indicador colorimétrico es la quinoneimina, la cual se genera de la 4-aminoantipirina y el fenol por el peróxido de hidrógeno bajo la acción catalítica de la peroxidasa (Figura 5).

La reacción que se llevó a cabo es la siguiente:

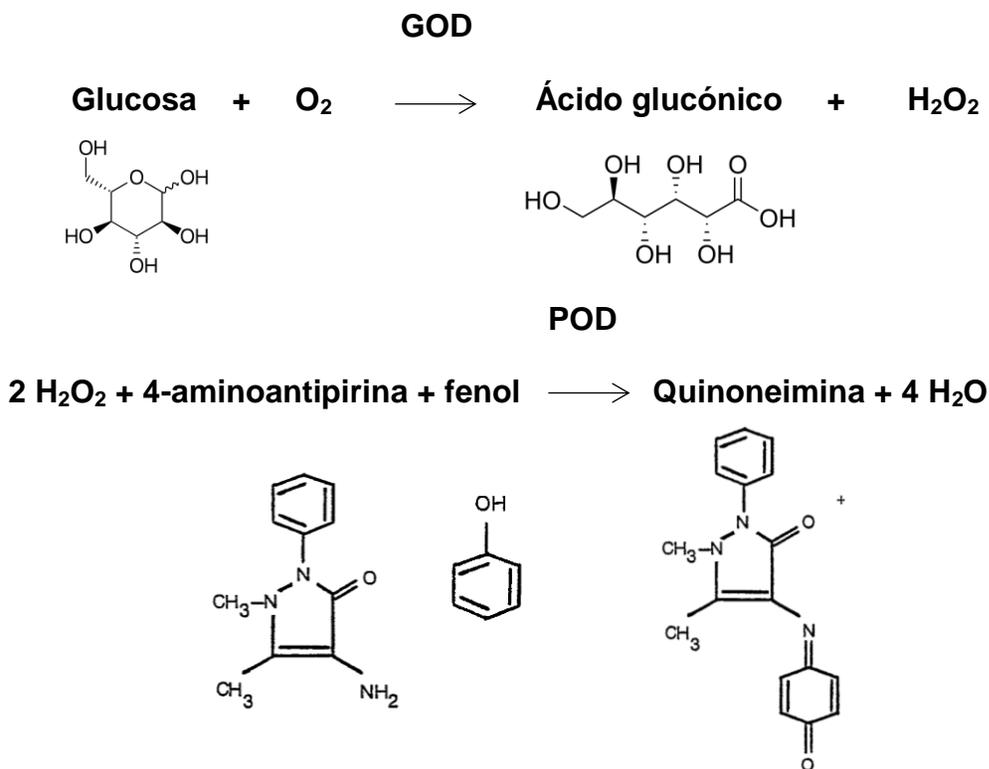


Figura 5. Esquema de las reacciones llevadas a cabo por la glucosa oxidasa y la enzima peroxidasa.

Para la realización del ensayo se mezclaron 10 μ L de muestra de suero o del estándar (100 mg/dL ó 5.55 mmol/L) con 1 mL del reactivo (contiene buffer fosfato, fenol, 4-aminoantipirina, glucosa oxidasa y peroxidasa) y se dejaron incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Como blanco se emplearon 10 μ L de agua destilada en 1 mL de reactivo. Después del tiempo de incubación, el blanco, el estándar y las muestras se leyeron a 546 nm en un espectrofotómetro y se calculó la concentración de glucosa en las muestras empleando la siguiente fórmula:

Ecuación 1. Determinación de glucosa (mg/dL) a partir de la absorbancia de la muestra.

$$\text{Glucosa } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Estándar}} \times \text{Concentración estándar } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right)$$

La determinación de la tolerancia a la glucosa antes y después de la sobreexpresión de PPAR γ , se llevó a cabo por medio de una prueba de tolerancia a glucosa intraperitoneal (IPGTT) tras 6 horas de ayuno.

TABLA XVIII. Orden y tiempos de las tomas de muestras para la realización del test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal.

Tiempo (minutos)	Muestra
0	Inyección glucosa Ratón n° 1
10	Inyección glucosa Ratón n° 2
15	Toma 1 del Ratón n° 1
20	Inyección glucosa Ratón n° 3
25	Toma 1 del Ratón n° 2
30	Toma 2 del Ratón n° 1
35	Toma 1 del Ratón n° 3
40	Toma 2 del Ratón n° 2
50	Toma 2 del Ratón n° 3
60	Toma 3 del Ratón n° 1
70	Toma 3 del Ratón n° 2
80	Toma 3 del Ratón n° 3
120	Toma 4 del Ratón n° 1
130	Toma 4 del Ratón n° 2
140	Toma 4 del Ratón n° 3

Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una solución de glucosa al 20 % (2 g glucosa/kg peso corporal) y a continuación, se determinaron los niveles de glucosa en sangre en los tiempos 0, 15, 30, 60 y 120 minutos (Harper *et al.* 2005) empleando el kit de glucosa oxidasa. Este ensayo se realizó con 3 ratones cada vez, siguiendo el esquema mostrado en la TABLA XVIII.

2.2.6.2 Determinación de insulina plasmática en ratones diabetizados y grupo control

La determinación de la insulina plasmática en condiciones de ayuno se evaluó en los ratones alimentados con dieta estándar y en ratones diabetizados antes y después del tratamiento correspondiente (inducción de la expresión de PPAR γ o pioglitazona). Se empleó el kit Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA kit (Crystal Chem, Cat. 90060) y se siguieron las instrucciones del fabricante. De forma breve, se añadieron 95 μ L del diluyente y 5 μ L de la muestra o de los estándares en su caso, y se incubaron durante 2 horas a 4°C. Se lavó la placa y se agregaron 100 μ L de la solución del conjugado, incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, se volvió a lavar la placa y se añadieron 100 μ L de solución sustrato en cada pocillo y se incubó la placa durante 40 minutos. A continuación, se agregaron 100 μ L de solución Stop y se midió la densidad óptica a 450/630 nm. Las muestras se evaluaron por duplicado.

2.2.6.3 Determinación de adiponectina plasmática en ratones diabetizados y grupo control

La activación de PPAR γ conlleva la modificación en la expresión génica de múltiples genes, entre ellos, la adiponectina, dándose un incremento en la producción de ésta, como se ha observado tras el suministro de agonistas de PPAR γ (Maeda *et al.* 2001; Yang *et al.* 2004). Tras la inducción de la expresión de PPAR γ , se llevó a cabo la determinación de los niveles plasmáticos de adiponectina por medio de la utilización de un ensayo ELISA comercial (Mouse Adiponectin ELISA Kit, Invitrogen Cat. KMP0041), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se prepararon los estándares con unas concentraciones de 8 a 0.125 ng/ μ L y se realizó una pre-dilución de la muestra de suero de 1:20,000, tal y como se indicaba en las instrucciones del fabricante. Se añadieron 100 μ L de los estándares, controles y muestras pre-diluidas, se cubrió la placa y se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de esto, se lavó la placa tres veces con buffer de lavado 1X. A continuación, se agregaron 100 μ L de la solución del anticuerpo de detección de adiponectina de ratón y se volvió a cubrir e incubar 1 hora a 37°C. Se lavó 3 veces con buffer de lavado 1X y se agregaron 100 μ L de Anti-Rabbit IgG HRP en cada pocillo incubándose otra hora a 37°C, seguido de 5 lavados. Tras los lavados, se añadieron 100 μ L de la solución sustrato TMB, la cual comenzó a volverse de color azul y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se añadieron 100 μ L de solución Stop mezclándose bien, y ocasionando un cambio de color azul al amarillo. Finalmente, se leyó la absorbancia a una

longitud de onda de 450 nm. Las muestras se evaluaron por duplicado, antes y después del tratamiento, en los cinco grupos experimentales.

2.2.7 Determinación de la expresión de PPAR γ en hígado por dot blot

Para corroborar la activación de PPAR γ en hígado, se realizó una extracción de proteínas totales empleando un buffer compuesto de Tris 125 mM pH 8.5 y Tritón X-100 al 10 %, el cual fue complementado con un inhibidor de proteasas (cOmplete Tablets Protease Inhibitor Cocktail, Mini EASYpack, Roche). Para ello, se pesaron 50 mg de hígado en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se maceraron en presencia del buffer de extracción y a una temperatura de 4°C. Una vez que se homogeneizó por completo, se centrifugó la muestra a 10,000 r.p.m. durante 10 minutos y el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo para llevar a cabo la precipitación con acetona. Para ello, se agregaron 4 volúmenes de acetona, por 1 volumen de muestra y se mantuvo a -20°C durante 1 hora. Después de eso, se realizó una nueva centrifugación, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet obtenido. Posteriormente, el pellet se resuspendió en buffer Tris-HCl 100 mM (pH 8.0) con Urea 8M, tras hervir las muestras en agua durante 5-10 minutos.

Posteriormente, el extracto obtenido se cuantificó por medio de un ensayo de Bradford en el que se usó como estándar la albúmina sérica. A partir de una solución stock de 10 mg/mL se llevaron a cabo diluciones para obtener concentraciones en el rango de 1 mg/mL a 0.05 mg/mL. Se agregaron 10 μ L de cada estándar o muestra por pocillo y 200 μ L de reactivo Bradford a una

concentración de 1X. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20-30 minutos y se evaluó la absorbancia a 630 nm empleando el lector de microplacas.

A continuación, las muestras de proteína se mezclaron con buffer de carga 4X (Laemmli buffer, 2 % SDS, 5 % 2-mercaptoetanol, 10 % glicerol, 0.001 % azul bromofenol y 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8) y se hirvieron a 95°C durante 5 minutos.

Se cargaron de 15 µg de proteínas por pocillo en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Para la preparación del gel concentrador al 4 % (stacking gel) se emplearon 6.1 mL de H₂O destilada, 1.3 mL de acrilamida, 2.5 mL de Tris 0.5 M (pH 6.8), 100 µL de SDS 10 %, 100 µL de persulfato de amonio (APS) al 10 % y 20 µL de TEMED. Para la preparación del gel separador al 10 % (resolving gel) se emplearon 4.1 mL de H₂O destilada, 3.3 mL de acrilamida, 2.5 mL Tris 1.5 M (pH 8.8), 100 µL de SDS 10 %, 100 µ de APS al 10 %, 10 µL de TEMED. Para la migración de las proteínas se aplicó un voltaje de 100 V durante 10 minutos y 140 V durante 2 horas. Esto se realizó con el objetivo de comprobar que se llevó a cabo la extracción de proteínas de forma exitosa.

Para realizar el protocolo de dot blot, se agregaron 2 µL de cada muestra (por triplicado) sobre la membrana de nitrocelulosa y se dejaron secar por unos 10 minutos aproximadamente. A continuación, se procedió a bloquear la membrana con buffer TBS-T con 5 % de leche en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente y en condiciones de agitación (15-20 r.p.m.). Después, se

lavó por 3 veces con buffer TBS-T (Tris Base pH 8.0, 40 g NaCl, 1 g KCl, 500 μ L de Tween-20 en 1 L de agua destilada).

A continuación, se realizó la incubación con el anticuerpo primario (Anti PPAR gamma antibody proceed in rabbit, Sigma) en una dilución de 1:2,000 en TBS-T (1 % leche en polvo, 0.02 % azida de sodio) durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. Después de esto, se realizaron 3 lavados con TBS-T de 5 minutos de cada uno.

De igual manera, se llevó a cabo la incubación del anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG-Alkaline Phosphatase antibody) durante 1 hora en agitación y en una dilución de 1:10,000 de TBS-T (1 % de leche, 0.02 % de azida de sodio). Posteriormente, se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno en TBS-T. Por último, se cubrió por completo la membrana con la solución de revelado (sustrato BCIP/NBT) durante 5-10 minutos en condiciones de oscuridad y se detuvo la reacción con agua destilada. Para la preparación de la solución de revelado, se disolvió una tableta de BCIP/NBT (0.4 mg/mL de NBT, 0.19 mg/mL BCIP, 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 50 mM $MgSO_4$) en 10 mL de agua ultrapura.

2.2.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó una prueba ANOVA de una vía, y la prueba de Tukey para la comparación de medias, cuando hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales.

2.2.9 Disposición de los residuos generados

La disposición de los residuos generados durante del proyecto se organizó siguiendo la reglamentación indicada por la Facultad de Ciencias Químicas. Se manejaron residuos tanto químicos como biológicos que se dispusieron en diversos contenedores como:

- Colector A: Soluciones salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas.
- Colector B: Sólidos inorgánicos, sales inorgánicas.
- Colector de colorantes y lugol.
- Vidrio Impregnado con Sustancias Peligrosas: Contenedores o Frascos vacíos de vidrio que contuvieron reactivos o residuos peligrosos.
- Plástico Impregnado con Sustancias Peligrosas: Contenedores vacíos que contuvieron reactivos o residuos peligrosos.
- Basura Industrial: Arena o diaper (sanitas, papel, magitel) impregnado con residuos peligrosos. Absorbente que se utilizan para contener derrames. Guantes de plástico y látex.
- RPBI (Residuos patológicos biológico-infecciosos)

Estos contenedores se encuentran estratégicamente ubicados en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica de la División de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS

3.1 Diseño y construcción de los vectores para la expresión inducida de *PPAR* γ humano en el hígado de ratones C57BL/6

3.1.1 Clonación del gen *PPAR* γ en el vector pTRE3G-ZsGreen1

Inicialmente, se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α con el plásmido pET-32a(+)-*PPAR* γ . A continuación se muestra una imagen de colonias transformadas (Figura 6a). Se emplearon 1 y 3 μ L respectivamente, con una concentración de 50 ng/ μ L. El mismo procedimiento se realizó para el vector pTRE3G-ZsGreen1.

Una vez obtenida la extracción plasmídica se procedió a estandarizar las condiciones de la PCR. Las reacciones se realizaron tal y como se indica en la metodología y se obtuvo amplificación del gen *PPAR* γ con una temperatura de apareamiento o de fusión (T_m) de los primers de 65°C. También se obtuvo amplificación de una región del vector pTRE3G-ZsGreen1, en este caso con una T_m de 60 °C. En la Figura 6c, se muestran los resultados obtenidos.

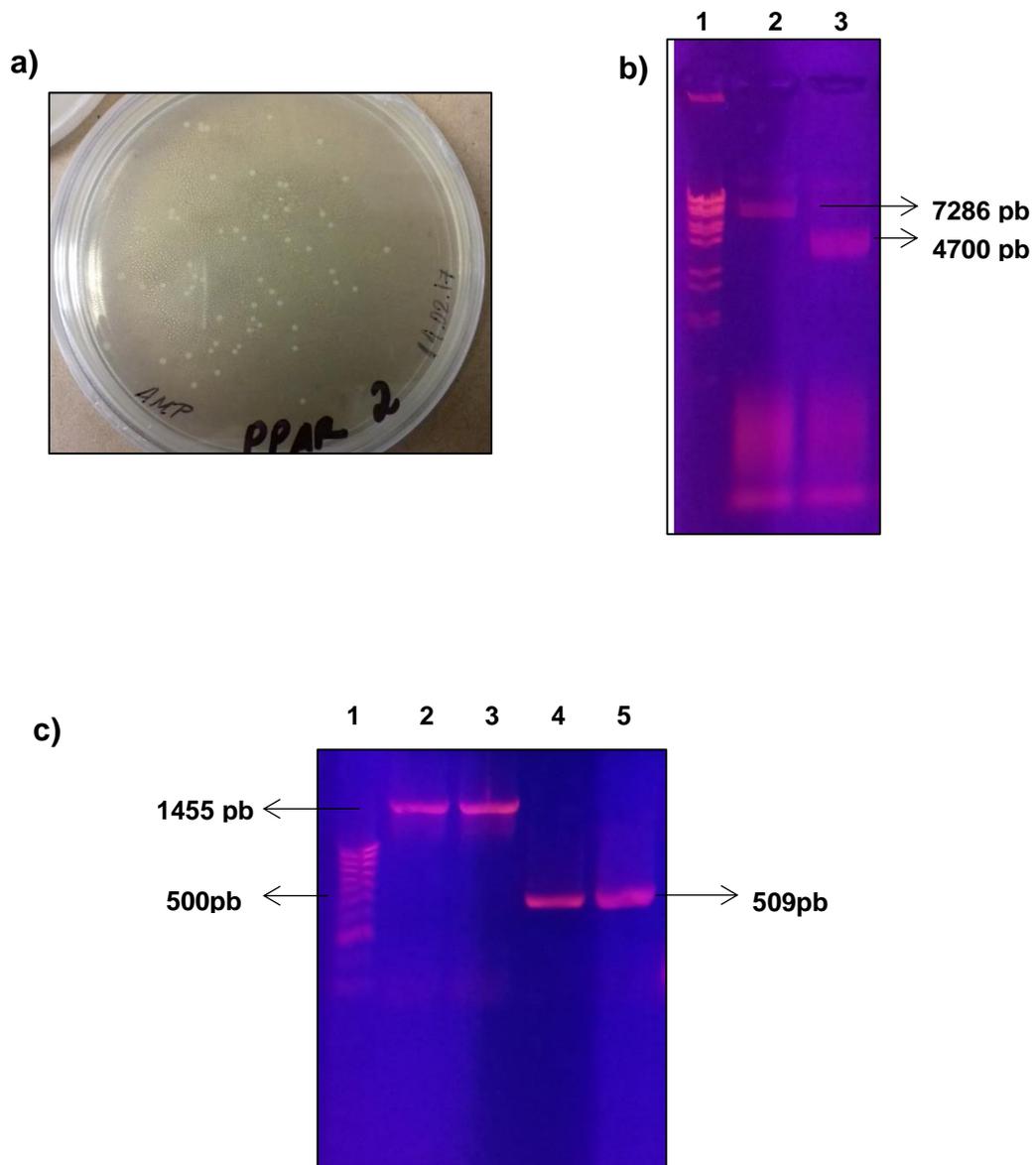


Figura 6. a) Colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con el vector pET-32a(+)-PPAR γ . b) Electroforesis en gel de agarosa de la extracción plasmídica de pET-32a(+)-PPAR (Carril 2) y pTRE3G-ZsGreen1 (Carril 3), empleándose como marcador λ DNA BstEII (NEB) (Carril 1). c) Gel de agarosa 1 % donde se observa la amplificación correspondiente a PPAR γ (1455 pb, carriles 2 y 3) y un fragmento del vector pTRE3G-ZsGreen1 (509 pb, carriles 4 y 5), así como el marcador Hyperladder IV de Bioline (100-1,000 pb) en el carril 1.

El producto de PCR del gen *PPAR γ* , así como el plásmido pTRE3G-ZsGreen1 se cargaron en un gel de agarosa al 1 % para llevar a cabo la purificación por medio de un kit de extracción en gel (QuickClean II Gel Extraction Kit, GenScript). Una vez purificados, se cuantificó la concentración obtenida en Nanodrop y se realizó una reacción de digestión con la enzima de restricción *MluI* con 1 μ g de muestra en cada caso. Se volvió a purificar tanto el vector como el producto de PCR de *PPAR γ* digeridos y se procedió a la segunda reacción de restricción con la enzima *NheI*. Tras esta última digestión, se obtuvo una concentración final de 7 ng/ μ L para *PPAR γ* y de 8.5 ng/ μ L para el vector pTRE3G-ZsGreen1. A partir de estos productos purificados se llevó a cabo la ligación con una relación 1:3. Tras 16 horas de reacción se llevó a cabo la transformación de bacterias *E. coli* DH5 α y a la mañana siguiente se observaron colonias transformantes. Para corroborar la clonación exitosa de *PPAR γ* en el vector, se inocularon 3 colonias en medio LB, se realizó la extracción plasmídica y posteriormente, una reacción de PCR punto final para corroborar la clonación exitosa. En la Figura 7, se muestran los resultados obtenidos. En el carril 1, se muestra el marcador de peso molecular; en el carril 2, el producto de PCR correspondiente al vector vacío (509 pb); en el carril 3, el producto de amplificación de *PPAR γ* de 1,455 pb (se usaron los mismos primers que para la clonación); y en los carriles 4 y 5 se observa una banda de un tamaño aproximado de 1,964 pb, por lo que se comprobó que la clonación de *PPAR γ* en el vector fue exitosa.

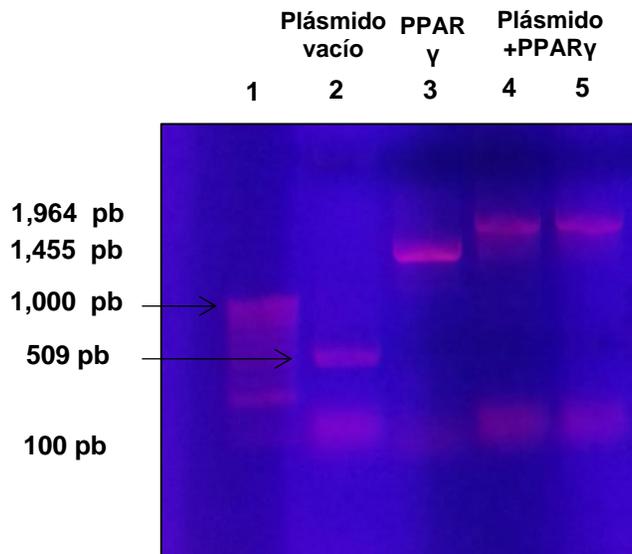


Figura 7. Gel de agarosa al 1 % donde se comprueba la clonación del gen *PPAR γ* en el vector pTRE3G-ZsGreen1 por PCR punto final. En los carriles 4 y 5 se emplearon los primers específicos para el vector de clonación y se obtuvo un tamaño de banda aproximado de 1,964 pb, mientras que en el vector vacío el tamaño es de 509 pb. En el carril 1, se muestra el marcador Hyperladder IV de Bioline (100-1,000 pb).

3.1.2 Clonación del gen *TET-ON* en el vector pALB-GFP

El plásmido pALB-GFP fue donado por Snorri Thorgeirsson (Addgene plasmid # 55759) en forma de DNA en papel de filtro. Después de la resuspensión del plásmido en buffer TE, se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α competentes con 1 y 3 μ L. A la mañana siguiente se observaron bacterias transformantes (Figura 8a), por lo que se realizó la inoculación de colonias en medio líquido LB suplementado con kanamicina (50 μ g/mL).

Después de esto, se procedió a la extracción plasmídica por medio del método TENS y acetato de sodio.

A continuación, para corroborar la identidad del vector de clonación, se realizó una reacción de digestión con las enzimas de restricción *Nco*I (5'-CCATGG -3') y *Xho*I (5'-CTCGAG-3') por separado y se obtuvo el patrón de bandas esperado: 4 Kb + 1.8 Kb + 703 pb para *Nco*I y 4.1 Kb + 2.4 Kb para *Xho*I (Figura 9). A su vez, se realizó una reacción de PCR empleando los primers diseñados para pALB-GFP, obteniéndose el fragmento esperado de 791 pb, por lo que se corroboró la naturaleza del plásmido (Figura 8b).

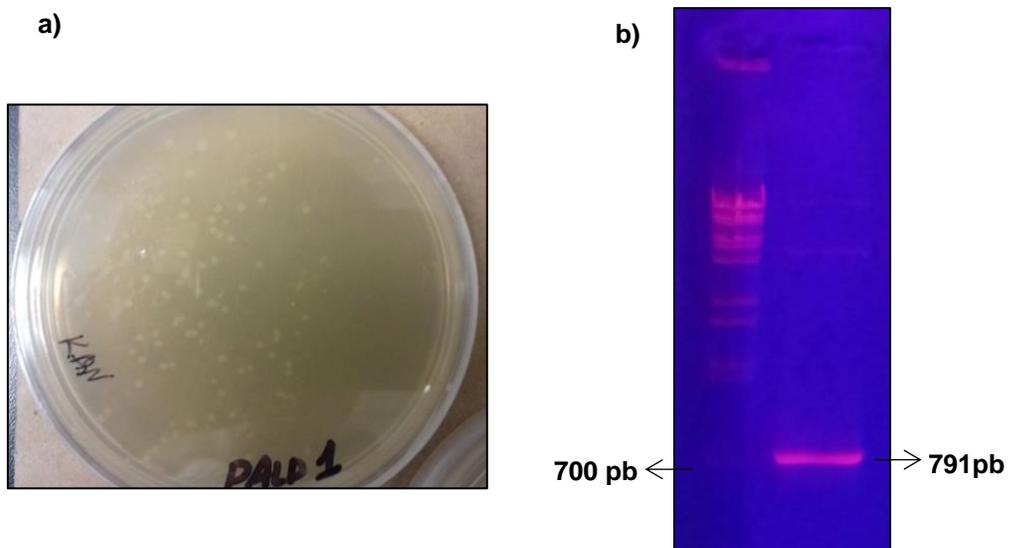


Figura 8. a) Resultado de la transformación de bacterias *E. coli* DH5 α con pALB-GFP. b) Gel de agarosa al 1 % donde se observa el resultado de la reacción de PCR del vector pALB-GFP, obteniéndose una banda de 791 pb.

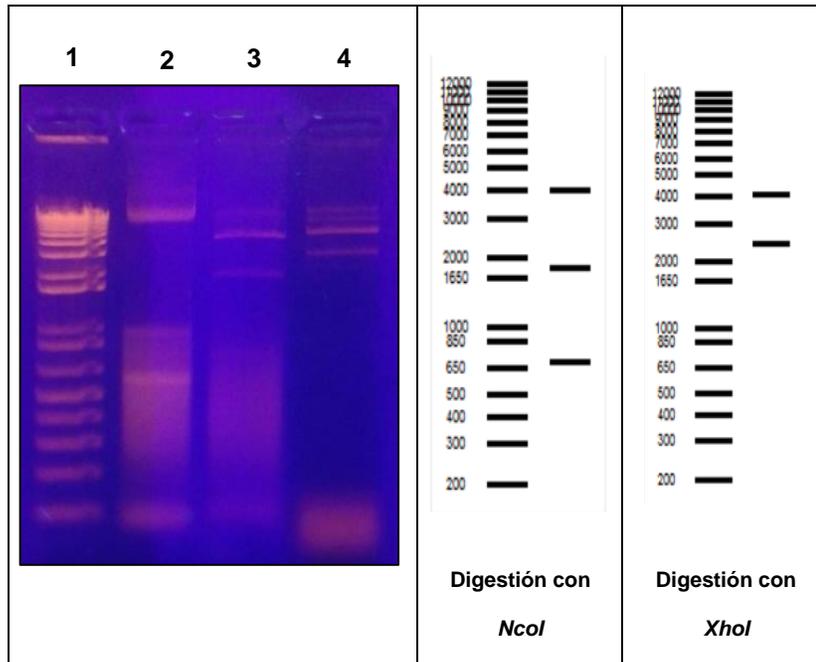


Figura 9. Carril 1: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder; Carril 2: Extracción plasmídica de pALB-GFP; Carril 3: Digestión con *NcoI* y Carril 4: Digestión con *XhoI*.

Por otro lado, también se realizó la transformación de bacterias con el vector pCMV-Tet3G, además de la extracción plasmídica y PCR, según las condiciones indicadas anteriormente en la metodología. En la Figura 10, se muestra el resultado de la extracción plasmídica de pCMV-Tet3G, así como el resultado de la amplificación por PCR.

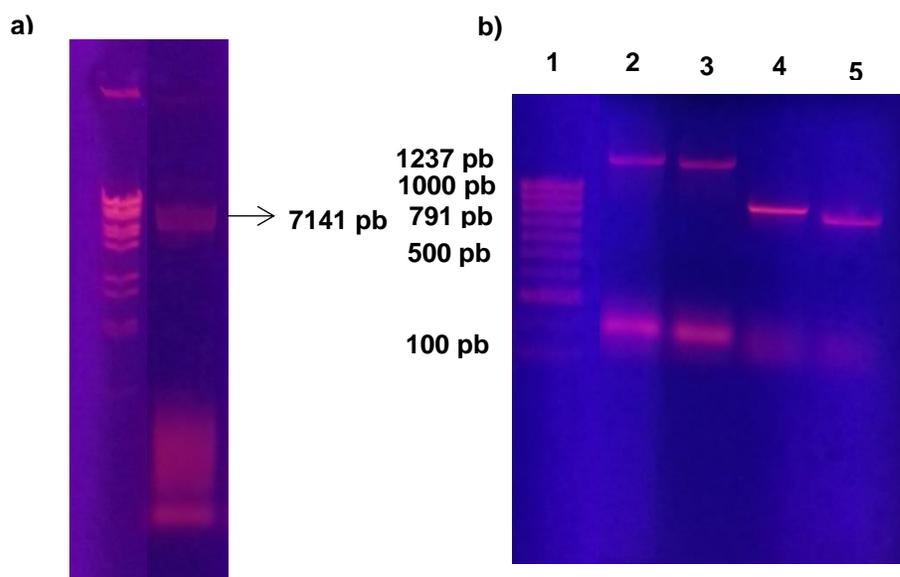


Figura 10. a) Gel de agarosa 1 % donde en el carril 1 se muestra el marcador y el carril 2 el plásmido pCMV-Tet3G. b) Gel de agarosa 1 % donde se observa el resultado de la amplificación por PCR punto final para pCMV-Tet3G (carriles 2 y 3) y pALB-GFP (carriles 4 y 5).

Una vez que se tuvo la PCR del gen *TET-ON* y la extracción plasmídica de pALB-GFP, se procedió a realizar una purificación, así como la digestión con las enzimas de restricción *SalI* y *KpnI*. Tras esta última digestión, se obtuvo una concentración final de 9.1 ng/μL para *TET-ON* y de 19.0 ng/μL para el vector pALB-GFP. A partir de estos productos purificados se llevó a cabo la ligación con una relación 1:5. Tras 16 horas de reacción se llevó a cabo la transformación de bacterias *E. coli* DH5α y a la mañana siguiente se observaron colonias transformantes. Para corroborar la clonación exitosa de *TET-ON* en el vector, se inocularon 3 colonias en medio LB, se realizó la extracción plasmídica y posteriormente, una reacción de PCR punto final para

corroborar la clonación exitosa. En la Figura 11, se muestran los resultados obtenidos. En el carril 1, se muestra el marcador de peso molecular; en el carril 2, el producto de PCR correspondiente al vector vacío (791 pb); en el carril 3, el producto de amplificación de *TET-ON* de 1,237 pb (se usaron los mismos primers que para la clonación); y en los carriles 4-7 se observa una banda de un tamaño aproximado de 2,028 pb, por lo que se comprobó que la clonación de *TET-ON* en el vector fue exitosa.

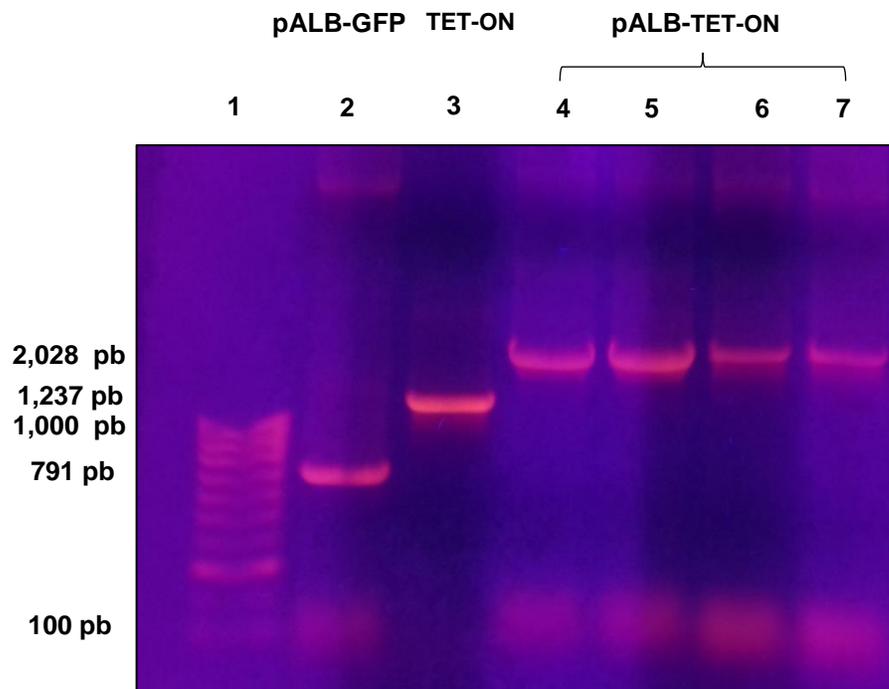


Figura 11. Gel de agarosa al 1 % donde se comprueba la clonación del gen *TET-ON* en el vector pALB-GFP por PCR punto final. En los carriles 4-7 se emplearon los primers específicos para el vector de clonación y se obtuvo un tamaño de banda aproximado de 2,028 pb, mientras que en el vector vacío el tamaño esperado es de 791 pb.

A continuación, se muestra un esquema de las dos construcciones que se generaron: pTRE3G-ZsGreen1-IRES2-PPAR γ y pALB-TETON (Figura 12).

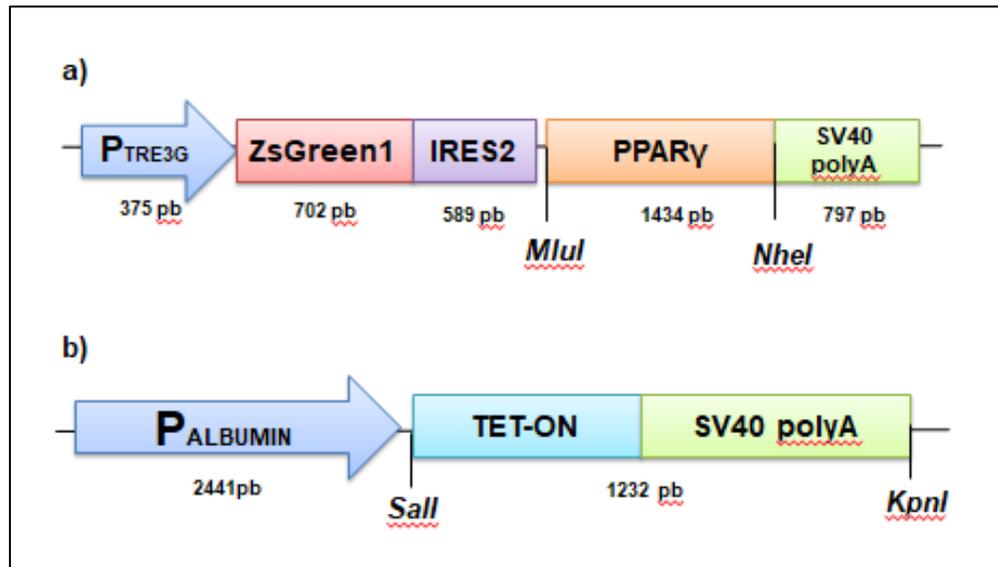


Figura 12. Representación esquemática de las dos construcciones genéticas que se llevaron a cabo, así como las enzimas de restricción empleadas en cada caso.

3.2 Transfección transitoria de hPPAR γ en células HEK293T

3.2.1 Evaluación de la expresión de hPPAR γ por PCR tiempo real en células HEK293T co-transfectadas

Las células HEK293T fueron co-transfectadas de manera transitoria con los plásmidos pCMV-Tet3G y pTRE-ZsGreen1-PPAR γ y en una proporción de 1:4 y se extrajo el RNA total 24 horas después de la inducción de la expresión con doxiciclina (Figura 13).

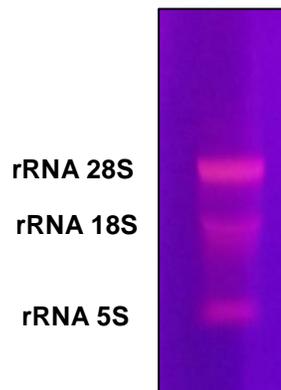
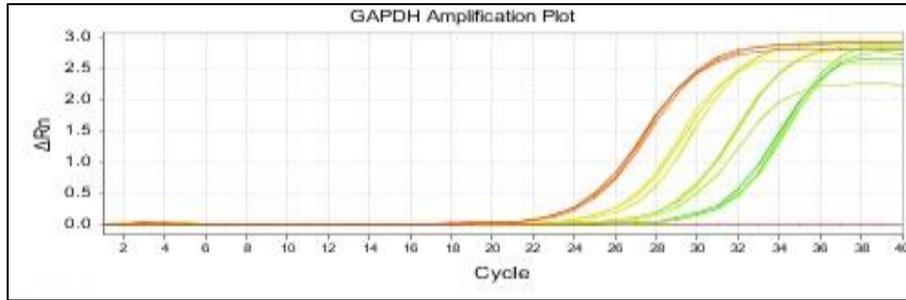


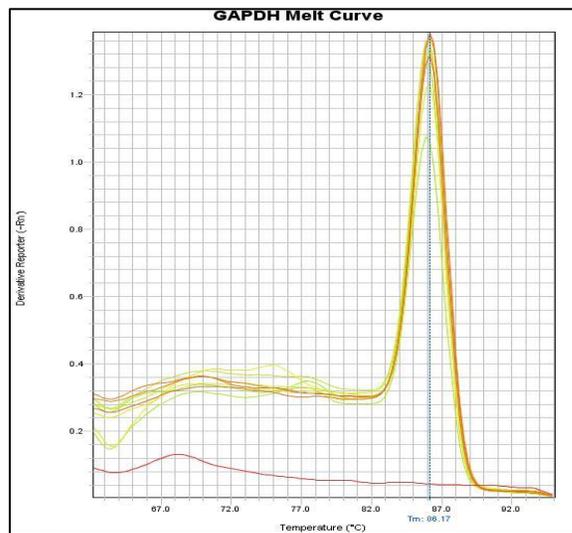
Figura 13. Ejemplo de extracción de RNA total a partir de un cultivo de células HEK293T.

Para llevar a cabo el análisis de la expresión relativa de *hPPAR γ* y de los genes de referencia *GAPDH* y *ACTB*, se realizaron las curvas tipo o curvas estándar, para analizar la eficiencia de los primers empleados en cada caso. Para el gen *GAPDH* se realizó una curva con rangos de cDNA entre 100 y 0.16 ng (con una dilución de 1:5) y una temperatura de extensión de 62°C. Para el gen *ACTB* el rango fue de 100 a 6.25 ng (con una dilución entre las muestras de 1:2) y una temperatura de extensión de 61°C. Finalmente, para la realización de la curva tipo o curva de cuantificación relativa se empleó como muestra el plásmido pTRE-ZsGreen-PPAR γ , en un rango de entre 1 ng a 0.1 pg (con una dilución de 1:10) y una temperatura de extensión de 60°C. En la Figura 14, se muestran los resultados obtenidos del gráfico de amplificación, la melt curve y la curva estándar del gen de referencia *GAPDH*, donde se indica, además, el porcentaje de eficiencia de la reacción.

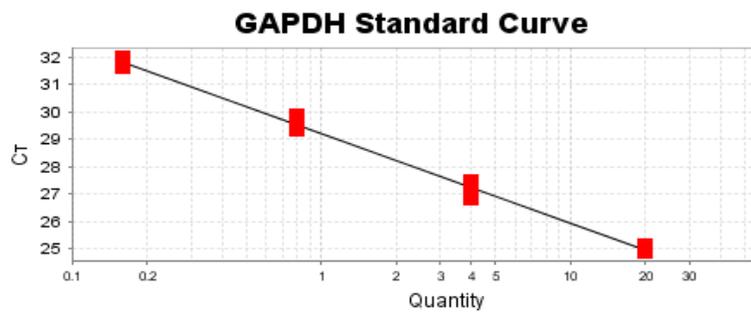
a)



b)



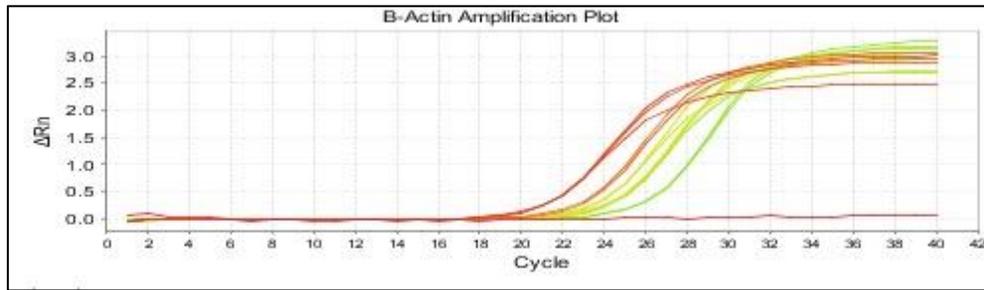
c)



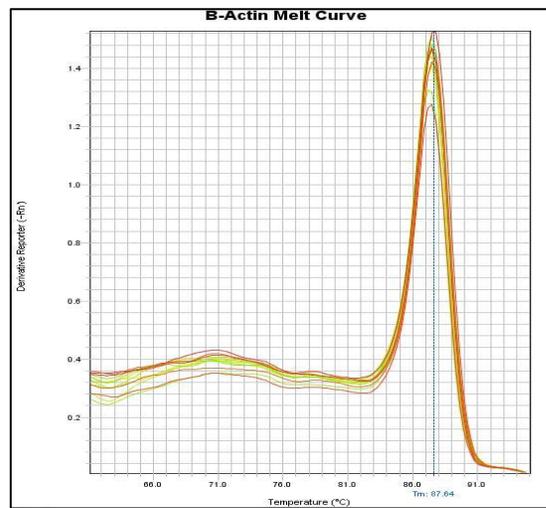
Target: GAPDH Slope: -3.288 Y-Inter: 29.211 R²: 0.993 Eff%: 101.418

Figura 14. a) Gráfica de amplificación de *GAPDH* de las muestras de 100 a 0.16 ng (representadas de izquierda a derecha b) Melt curve de *GAPDH*. c) Curva estándar con una eficiencia de 101.4 %.

a)



b)



c)

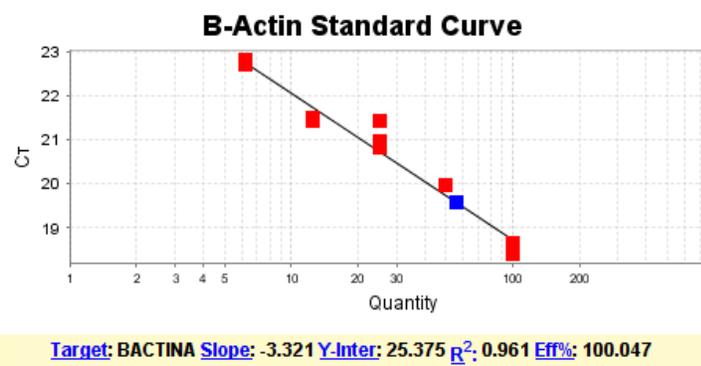
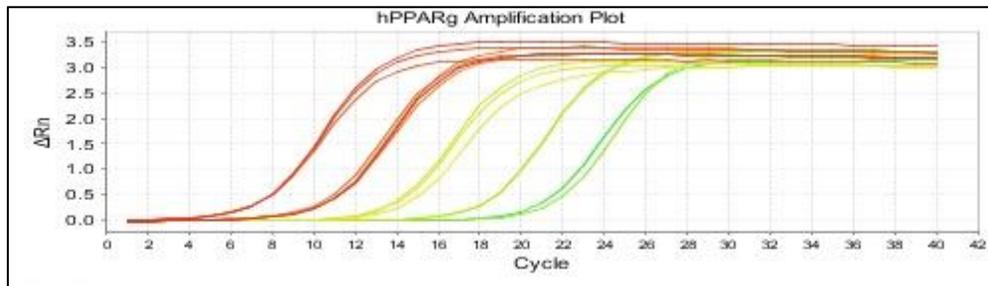
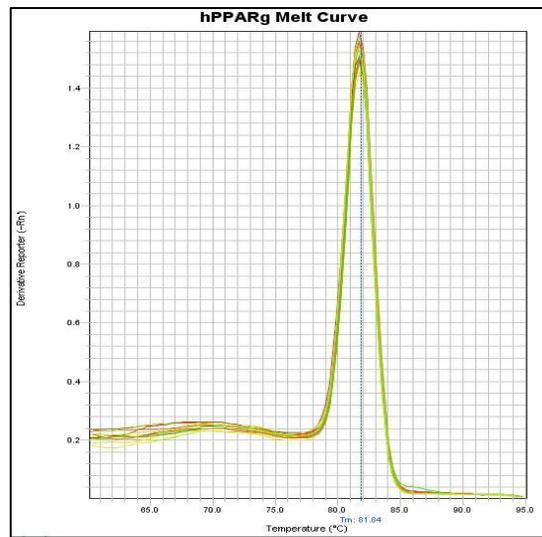


Figura 15. a) Gráfica de amplificación de β -Actina de las muestras de 100 a 6.25 ng. b) Melt curve de β -Actina. c) Curva estándar con eficiencia de 100.04 %.

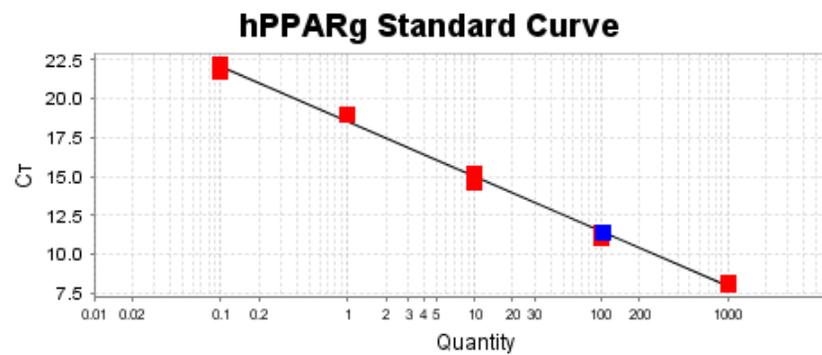
a)



b)



c)



Target: PPAR gamma **Slope:** -3.55 **Y-Inter:** 18.566 **R²:** 0.996 **Eff%:** 91.296

Figura 16. a) Gráfica de amplificación de hPPAR γ de las muestras de 100 a 6.25 ng. b) Melt curve de hPPAR γ . c) Curva estándar con una eficiencia de 91.29 %.

En la Figura 14b puede observarse la melt curve obtenida, con un único amplicón, lo que corrobora la especificidad de los primers. De igual manera, se observa la presencia de un único amplicón para los primers diseñados para *ACTB* y *PPAR γ* (Figura 15 y 16). En cuanto a las eficiencias de reacción fue de 101.4 %, 100.4 % y 91.29 %, para *GAPDH*, *ACTB* y *PPAR γ* , respectivamente. Generalmente, siempre que las eficiencias de reacción se encuentren en un rango de 100 \pm 10 %, es posible analizar los datos obtenidos por medio del método $\Delta\Delta Cq$, tal y como se realizó en este caso.

En este ensayo, se tomó como muestra calibradora o control el RNA de las células HEK293T co-transfectadas con pCMV-Tet3G y pTRE-ZsGreen1 (plásmido vacío). A partir de las muestras de RNA total, se obtuvo el cDNA por retrotranscripción y se evaluó la expresión de cada uno de los genes de acuerdo a sus valores de Cq obtenidos. Esto mismo se llevó a cabo para las muestras de células transfectadas con pCMV-Tet3G y pTRE-ZsGreen1-PPAR γ sin doxiciclina y con doxiciclina. Los datos obtenidos de los Cq (ciclo de cuantificación) para *PPAR γ* y los dos genes de referencia se muestran en la TABLA XIX, así como los valores de $\Delta\Delta Cq$, que son indicadores de los niveles de expresión relativa entre las muestras. El análisis estadístico mostró que hubo un incremento significativo de los niveles de expresión de mRNA de hPPAR γ ($p < 0.002$) en las muestras co-transfectadas con pTRE-ZsGreen1-IRES2-hPPAR γ y el plásmido regulador en presencia de doxiciclina con un incremento de 530 veces con respecto a la muestra calibradora y de 84 veces con respecto a las muestras co-transfectadas con pTRE-ZsGreen1-IRES2-hPPAR γ y el

plásmido regulador pero en ausencia del inductor doxiciclina (Figura 17). Estos resultados demostraron que los plásmidos recombinantes generados fueron altamente eficientes en la expresión del mRNA de hPPAR γ en células HEK293T transfectadas y en presencia doxiciclina.

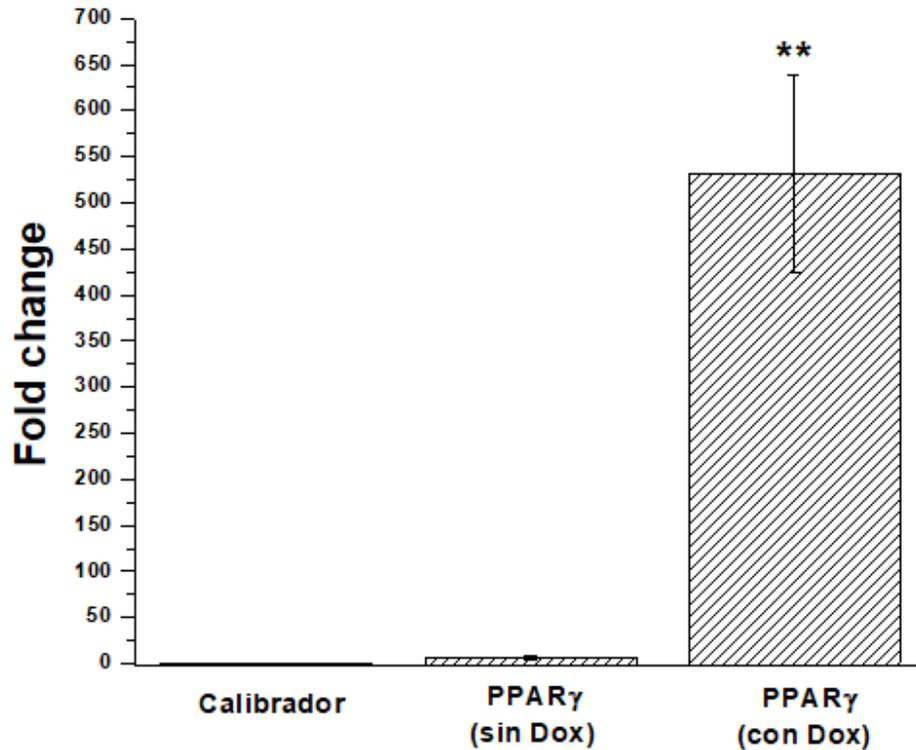


Figura 17. Expresión relativa de hPPAR γ en células HEK293T, dándose un incremento de 530 y 84 veces en las muestras tratadas con doxiciclina ($p < 0.002$), con respecto al calibrador y a las muestras sin doxiciclina.

TABLA XIX. Información de los Cq (ciclo de cuantificación) del gen de interés y los genes de referencia, así como los resultados del nivel de expresión génica ($\Delta\Delta Cq$).

Grupo	hPPARY (Media Cq \pm SD)	GAPDH (Media Cq \pm SD)	β -Actina (Media Cq \pm SD)	Genes de referencia (Valor Cq promedio)	ΔCq (hPPARY - Genes ΔCq calibrador)	$\Delta\Delta Cq$ (ΔCq - ΔCq calibrador)	Expresión hPPARY (fold change)
pTRE-ZsGreen1- IRES2 (Calibrador)	23,56 \pm 0,16	20,86 \pm 0,12	19,64 \pm 0,14	20,25 \pm 0,13	3,31 \pm 0,50	0 \pm 0,50	¹ (0,71-1,41)
pTRE-ZsGreen1- IRES2-hPPARY (sin Dox)	21,07 \pm 0,256	21,54 \pm 0,11	19,30 \pm 0,20	20,42 \pm 0,16	0,65 \pm 0,22	-2,66 \pm 0,22	6,32 (5,41-7,38)
pTRE-ZsGreen1- IRES2-hPPARY (con Dox)	16,60 \pm 0,39	23,02 \pm 0,13	21,67 \pm 0,21	22,35 \pm 0,17	-5,75 \pm 0,31	-9,05 \pm 0,31	530,97 (428,34-658,21)

3.2.2 Evaluación de la expresión de ZsGreen1

Para la evaluación de la expresión de ZsGreen1, las muestras se leyeron en el fluorómetro 48 horas después de la transfección. El valor medio de fluorescencia fue de 1.20 ± 0.34 para las muestras control (pTRE-ZsGreen1-IRES2-Vacío); 0.17 ± 0.08 para las muestras de células transfectadas con pTRE-ZsGreen1-IRES2-hPPAR γ (sin doxiciclina) y de 0.61 ± 0.13 para las muestras en las cuales se administró doxiciclina (Figura 18).

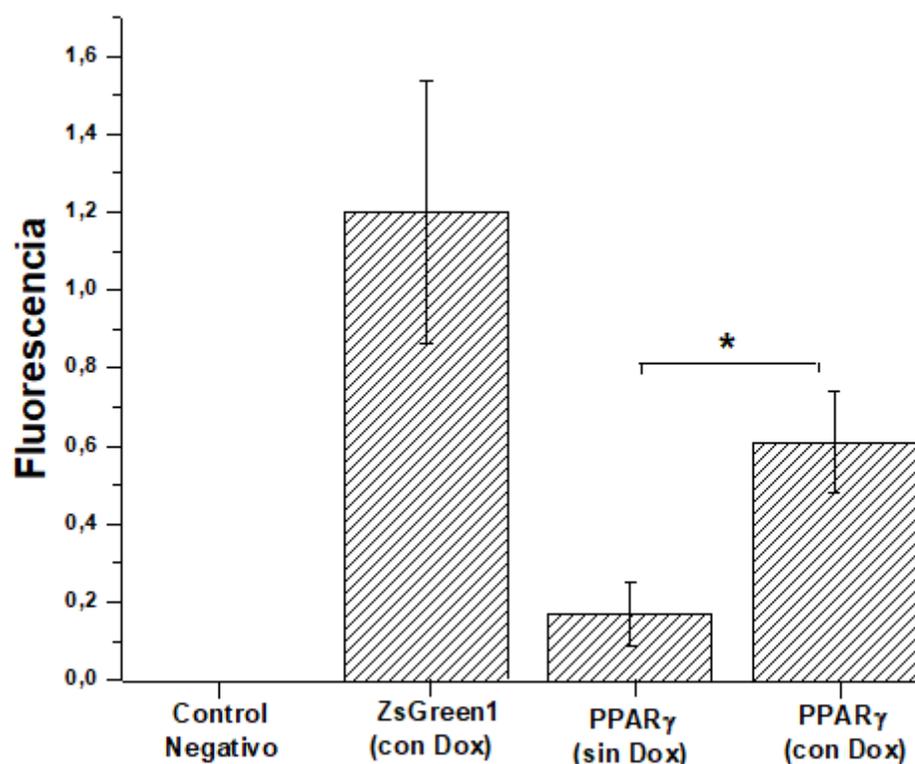


Figura 18. Determinación de los niveles de fluorescencia de células HEK293T sin transfectar y co-transfectadas con pTRE-ZsGreen1-IRES2-hPPAR γ , dándose un incremento significativo de la fluorescencia en presencia de doxiciclina, que con respecto a las muestras no tratadas con este inductor.

Estos datos se obtuvieron después de sustraer el valor medio de fluorescencia de células HEK293T no transfectadas (0.54 ± 0.11). Se observó un incremento significativo en la expresión (3.6-fold change, $p < 0.05$) en presencia de doxiciclina comparado con las muestras sin doxiciclina, lo que supone un indicador más, que corrobora que la transfección fue exitosa y que se induce el sistema Tet-on en un modelo *in vitro*.

3.3 Inducción del modelo de diabetes tipo 2 en ratones C57BL/6

3.3.1 Estandarización del modelo de diabetes tipo 2

Para la estandarización del protocolo de inducción de diabetes tipo 2 se empleó un protocolo de 9 semanas de duración, en el que se les administró a los animales una dieta estándar suplementada con una solución de fructosa al 15 % y/o 30 % extra de grasa (en forma de manteca de cerdo), así como una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (100 mg/kg) en la semana cuatro del protocolo. Los animales se dividieron en 3 grupos:

- Grupo control (n=3): se administró dieta estándar y agua.
- Grupo con dieta estándar suplementada con fructosa (n=5).
- Grupo con dieta suplementada con fructosa 15 % y con un 30 % extra de grasa (en forma de manteca de cerdo) (n=5).

Se evaluó el peso corporal de manera semanal durante todo el protocolo para los tres grupos experimentales y a continuación se muestran los resultados obtenidos en la Figura 19. El peso medio inicial del grupo control (10.8 g) fue inferior a los otros dos grupos de experimentación (16.4 y 14.5 g para el grupo de fructosa y fructosa/grasa, respectivamente) ya que los ratones del grupo control contaban con tres semanas de edad en el momento de inicio del experimento, mientras que los dos otros grupos contaban con casi cuatro semanas de edad. Se observó un incremento gradual del peso en los ratones, como era esperado, teniendo en cuenta que se encontraban en periodo de crecimiento. Sin embargo, en las dos primeras semanas del protocolo, el grupo experimental suplementado con grasa sufrió una disminución de peso, recuperándose posteriormente. Esto pudo deberse a que no asimilaban bien al inicio la nueva dieta que se les suministró. También puede observarse que el peso continuó incrementándose después de la administración de estreptozotocina en la semana 4. Al final del protocolo, en la semana 9, no se observaron diferencias significativas en el peso (24.4-25.5 g de media) entre los tres grupos experimentales.

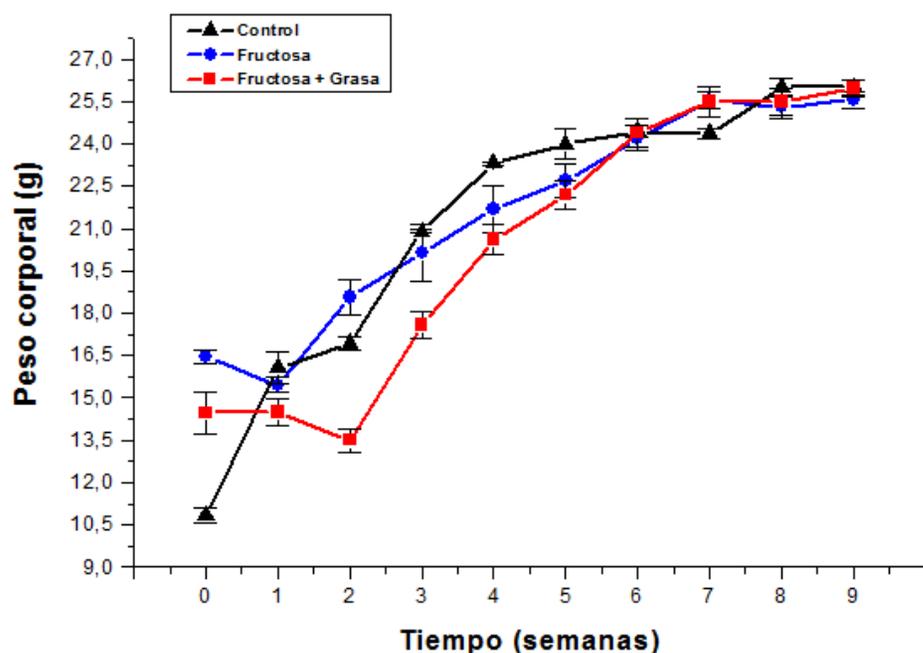


Figura 19. Evolución del peso corporal de los animales de los tres grupos experimentales durante las 9 semanas del protocolo para la estandarización de la inducción de diabetes.

TABLA XX. Consumo medio de alimento y agua/fructosa (media \pm SEM) en los grupos experimentales antes y después de la administración de estreptozotocina (STZ) en los grupos con dieta suplementada con fructosa y/o grasa.

GRUPO	Consumo de alimento (g/día/ratón)		Consumo de líquido (agua ó fructosa) (mL/día/ratón)	
	Antes de STZ	Después de STZ	Antes de STZ	Después de STZ
CONTROL	2.0 \pm 0.5	3.5 \pm 0.6	4.2 \pm 0.4	5.8 \pm 1.1
FRUCTOSA	2.3 \pm 0.2	2.8 \pm 0.7	5.1 \pm 1.4	6.4 \pm 2.7
FRUCTOSA + GRASA	3.0 \pm 0.3	5.2 \pm 0.9	5.4 \pm 1.7	5.5 \pm 0.9

Además, se determinó el consumo de agua o fructosa, así como el consumo de comida, antes y después de la administración de estreptozotocina en la semana 4 y los datos obtenidos se muestran en la TABLA XX.

En los grupos control y suplementado con fructosa, no se observaron diferencias significativas en cuanto al consumo de líquidos ni de alimento, antes y después de la administración de la estreptozotocina. Por otro lado, en el grupo suplementado con fructosa y un 30 % de grasa, se observó un incremento significativo en el consumo de alimento ($p < 0.05$), con una media de 3.0 ± 0.3 g antes de la administración de estreptozotocina y de 5.2 ± 0.9 g después de dicha administración. En cambio, el consumo de fructosa se mantuvo estable durante todo el protocolo.

Además, se cuantificaron los niveles de glucosa en sangre en condiciones de ayuno (5-6 horas) tomando muestras de sangre a partir de la cola de los animales. Los niveles de glucosa se midieron al inicio del protocolo y posteriormente, de forma semanal a partir de la semana 4 (Figura 20), para evaluar la evolución de la glucemia después de la administración de estreptozotocina.

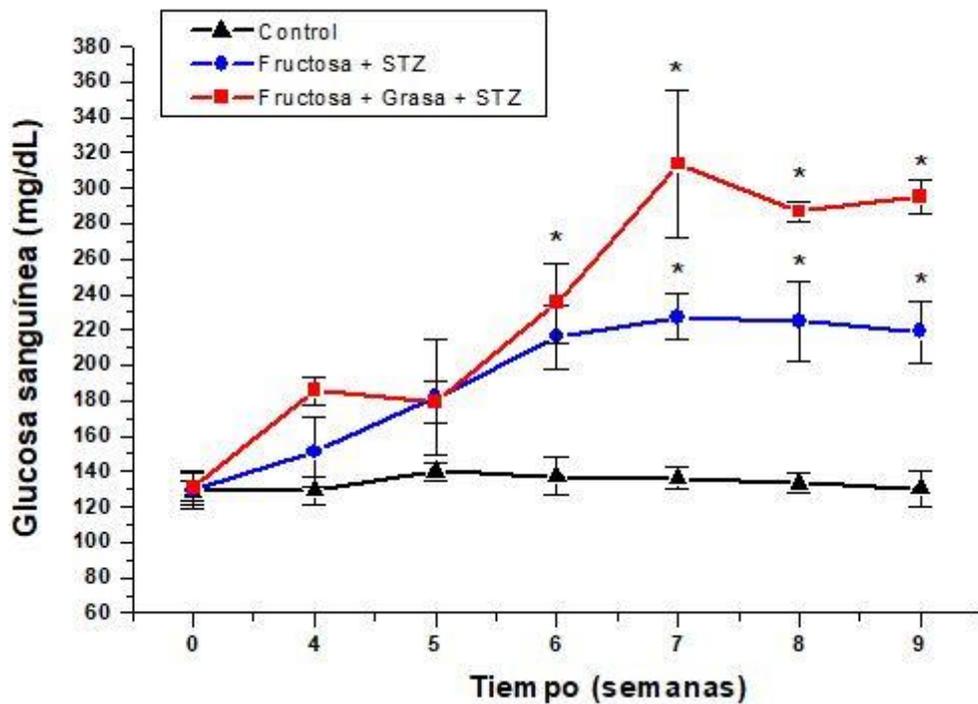


Figura 20. Evolución de los niveles de glucosa sanguínea (mg/dL) a lo largo del protocolo de inducción de diabetes tipo 2 en ratones C57BL/6 en los tres grupos experimentales.

En el grupo control, los niveles de glucosa se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo del experimento, variando entre 125.5 ± 5.8 - 140.8 ± 5.4 mg/dL en condiciones de ayuno. Por su parte, el grupo con dieta suplementada con fructosa al 15 % mostró un incremento gradual de los niveles de glucosa en ayuno después de la administración de estreptozotocina, pasando de niveles medios iniciales de 129.4 ± 10.0 mg/dL a 227.2 ± 13.0 mg/dL a partir de la semana 6 del experimento. Además, el grupo al que se suministró una dieta alta en grasa, también mostró un incremento importante de los niveles de glucosa

después de la administración de estreptozotocina, alcanzando valores promedio de 313 ± 40 mg/dL en la semana 7.

Se considera que la obtención de valores de glucosa sanguínea en ayuno superiores a 250 mg/dL por tres veces consecutivas, es indicativo de diabetes tipo 2 en ratones (Deeds *et al.* 2011). Por lo tanto, dado que los mejores resultados se obtuvieron en el grupo suplementado con una dieta alta en fructosa y alta en grasa, los experimentos posteriores se realizaron siguiendo este modelo.

3.3.2 Inducción del modelo de diabetes tipo 2

Para la inducción de diabetes, se establecieron 5 grupos experimentales:

- Grupo control: dieta estándar y agua (n=4)
- Grupo diabetizado (sin tratamiento) (n=4)
- Grupo diabetizado con co-administración de plásmidos por terapia génica hidrodinámica (sin doxiciclina) (n=4)
- Grupo diabetizado con co-administración de plásmidos por terapia génica hidrodinámica (con doxiciclina) (n=4)
- Grupo diabetizado tratado con pioglitazona (n=4)

Inicialmente, los cuatro grupos sometidos al protocolo de inducción de diabetes se denominaron grupos A, B, C y D, y posteriormente, se les asignó al azar uno de los tratamientos anteriormente mencionados. El protocolo tuvo una duración de 8 semanas, seguido de 2 semanas de tratamiento. De igual manera

que en el experimento de estandarización, se llevó a cabo un seguimiento del peso corporal de los diferentes grupos experimentales (Figura 21).

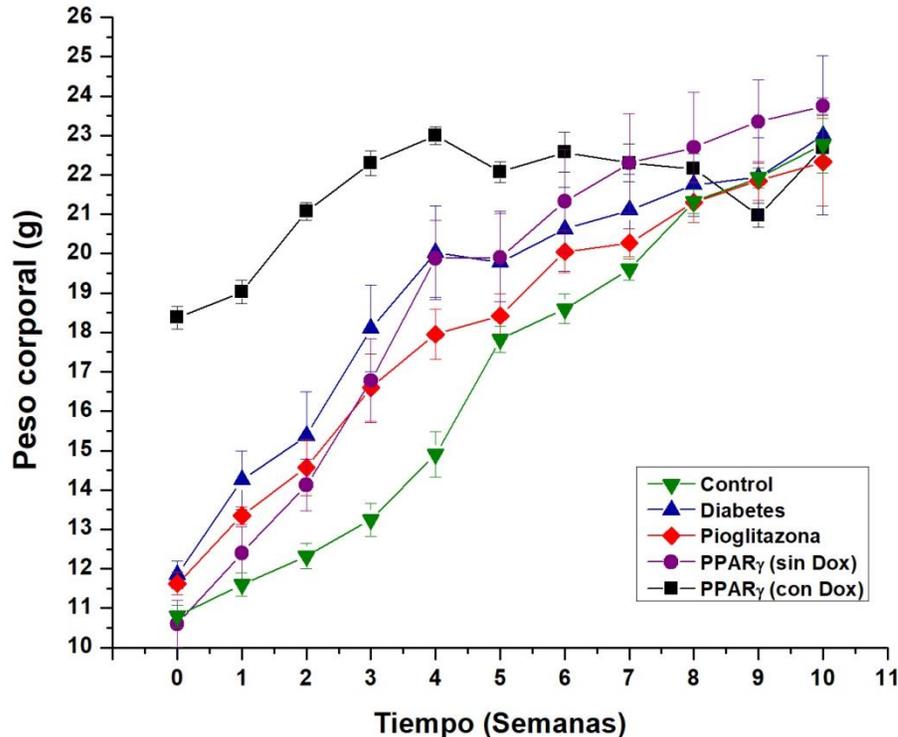


Figura 21. Evolución del peso corporal de los animales de los cinco grupos experimentales durante las 10 semanas del protocolo de inducción de diabetes.

El peso medio del grupo A en la semana 0 fue de 18.3 ± 0.3 g, siendo superior al resto de grupos, los cuales presentaron un peso medio inicial de 10.8-11.6 g. Esto fue debido a que en el momento de iniciar el experimento, los ratones del grupo A tenían una edad de 5 semanas, mientras que el resto de ratones contaban con 3 semanas de edad, debido a la disponibilidad de animales el momento de iniciar el experimento. Se observó un incremento gradual del peso corporal, como era esperado dado que los animales se encontraban en etapa de crecimiento.

Al final del protocolo, el peso promedio del grupo control fue de 24.02 ± 0.52 g; el del grupo inducido con diabetes sin tratamiento fue de 23.73 ± 2.30 g; el del grupo administrado con pioglitazona de 22.32 ± 1.11 g; el del grupo cotransfectado sin administración de doxiciclina fue de 23.65 ± 0.21 g y el del grupo cotransfectado con administración de doxiciclina fue de 22.93 ± 0.46 g. No hubo diferencias significativas entre el peso corporal final en los 5 grupos experimentales.

También se cuantificó la cantidad de alimento consumida por cada grupo, tanto antes como después de la administración de estreptozotocina (STZ) y durante las dos semanas de tratamiento (Figura 22).

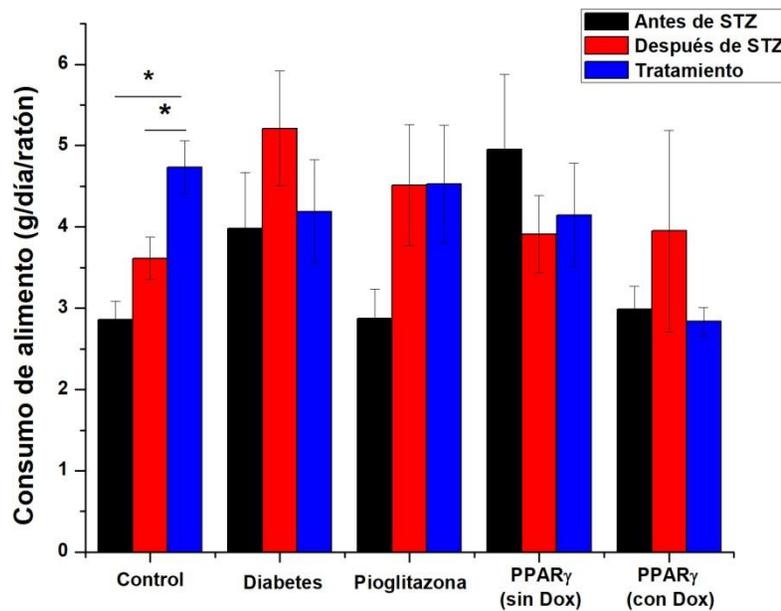


Figura 22. Consumo promedio de alimento (g/día/ratón) en los diferentes grupos experimentales durante el protocolo de inducción de diabetes.

Los valores obtenidos de consumo promedio de alimento para el grupo control fueron de 2.9 ± 0.5 g/ratón/día antes de la administración de estreptozotocina, 3.6 ± 0.6 g de la semana 4-8 y de 4.7 ± 0.7 g durante las dos semanas de tratamiento (semanas 9 y 10). A su vez, el resto de valores obtenidos fueron: grupo de diabetes sin tratamiento (4.0 ± 1.5 g; 5.2 ± 1.7 g y 4.2 ± 1.4 g); grupo administrado con pioglitazona (2.9 ± 0.8 g, 4.5 ± 1.8 g y 4.5 ± 1.6 g); grupo PPAR γ sin doxiciclina (5.0 ± 2.1 g, 3.9 ± 1.2 g y 4.1 ± 1.4 g) y grupo PPAR γ con doxiciclina (3.0 ± 0.6 g, 4.0 ± 3.0 g y 2.8 ± 0.4 g).

El análisis estadístico realizado por medio de ANOVA de una vía mostró que no hubo diferencias significativas en el consumo de alimento entre los distintos grupos experimentales en los tres periodos analizados. Únicamente en el grupo control hubo un mayor consumo de alimento ($p < 0.05$) en las semanas 9 y 10, que con respecto a las anteriores, probablemente debido al peso adquirido y al proceso de crecimiento. En el resto de grupos, no hubo diferencias significativas en el consumo de alimento durante todo el protocolo de inducción de diabetes.

A su vez, también se cuantificó el consumo de líquido (agua o solución de fructosa al 15 %) en los diferentes grupos experimentales. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23.

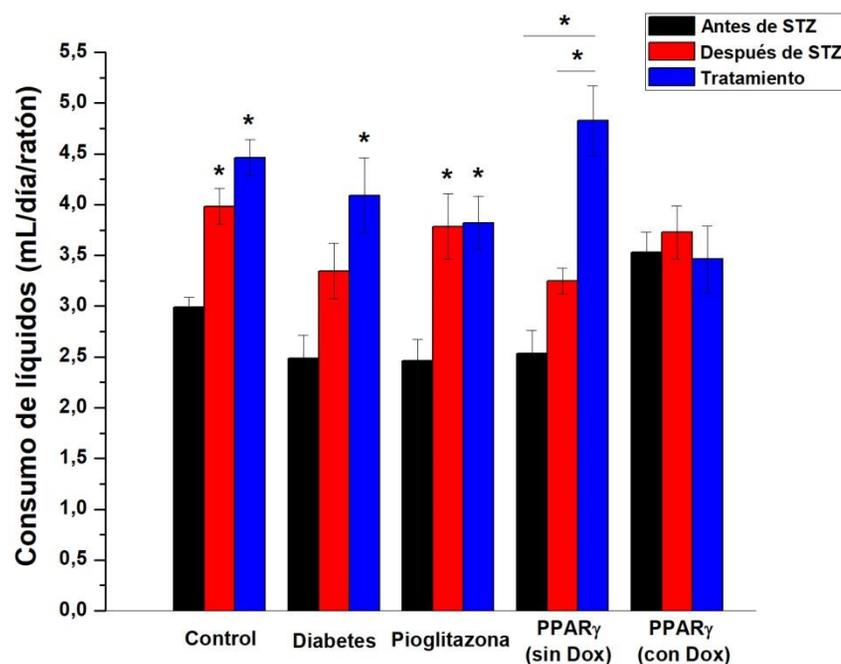


Figura 23. Consumo medio de líquido (mL/día/ratón) en los cinco grupos experimentales durante las 10 semanas de duración del protocolo de inducción de diabetes.

Los valores obtenidos para el grupo control fueron de 3.0 ± 0.1 , 3.9 ± 0.2 y 4.5 ± 0.6 mL/día/ratón antes de la administración de estreptozotocina, después de ésta (semana 4-8) y durante las dos semanas de tratamiento, respectivamente. Hubo un incremento significativo en el consumo de fructosa a partir de la semana 4 ($p < 0.001$). Este incremento en el consumo de líquido se debe probablemente a que los animales fueron incrementando su peso ya que se encontraban en la etapa de crecimiento.

En el grupo de diabetes sin tratamiento, el consumo promedio de líquido fue de 2.5 ± 0.2 , 3.3 ± 0.3 mL y 4.1 ± 1.2 mL, respectivamente, dándose un mayor

consumo promedio durante las dos últimas semanas, que con respecto a la primera etapa del protocolo ($p<0.02$). En el resto de grupos experimentales el consumo promedio fue de: 2.5 ± 0.2 , 3.8 ± 0.3 mL y 3.8 ± 0.8 mL para el grupo de pioglitazona; 2.5 ± 0.7 , 3.3 ± 0.4 mL y 4.8 ± 1.1 mL para el grupo de PPAR γ sin doxiciclina; y 3.5 ± 0.2 , 3.7 ± 0.3 y 3.5 ± 1.0 mL/día/ratón para el grupo de PPAR γ con doxiciclina. En este último grupo no hubo diferencias significativas según el análisis estadístico realizado, en cambio, en el grupo de diabetes sin tratamiento hubo un incremento significativo del consumo de fructosa en la etapa de tratamiento ($p<0.02$). De igual manera, en el grupo de pioglitazona se dio un incremento significativo a partir de la semana 4 del protocolo ($p<0.02$), mientras que en el grupo de PPAR γ sin doxiciclina hubo diferencias significativas entre la fase de tratamiento y las dos anteriores ($p<0.001$).

Otro de los parámetros evaluados fue el nivel de glucosa plasmática en ayuno (5-6 horas). Se determinaron en el día 0, antes de comenzar el protocolo y posteriormente, en las semanas 2, 4, 6, 7, 8 y 9 (Figura 24). Los datos obtenidos para el grupo control no presentaron variaciones significativas a lo largo del protocolo, con valores promedios de entre 97-154 mg/dL.

En los grupos en los que se indujo la diabetes tipo 2, se observó un incremento significativo en los niveles de glucosa plasmática a partir de la semana 6, dos semanas después de la administración de la estreptozotocina.

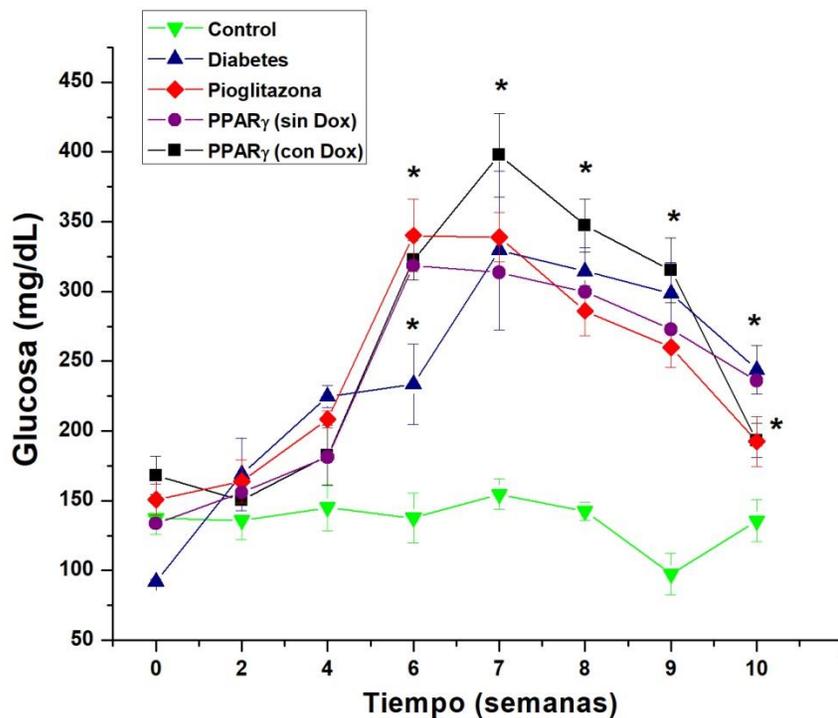


Figura 24. Niveles de glucosa plasmática en condiciones de ayuno en los diferentes grupos experimentales a lo largo de las diez semanas del protocolo de inducción de diabetes.

Los niveles máximos se alcanzaron en la semana 7 (en un rango de 313.5 ± 12.1 a 397 ± 29.8 mg/dL dependiendo del grupo) y posteriormente, se observó una disminución moderada, dándose valores promedios de entre 192.5 ± 17.8 y 243.8 ± 17.4 mg/dL en la semana 10 del protocolo.

El análisis estadístico realizado (test de ANOVA de una vía y prueba de Tukey) indicó que se dio un incremento significativo en los niveles de glucosa plasmática en ayuno a partir de la semana 6 ($p < 0.005$), en los cuatro grupos en los que se indujo la diabetes, con respecto al grupo control. Por lo tanto, el protocolo de inducción de diabetes generó un incremento en los niveles de

glucosa plasmática en los ratones con respecto al grupo control. Además, no hubo diferencias significativas entre los 4 grupos, por lo que se determinó al azar el tratamiento administrado (inyección de plásmidos con sistema Tet-on con y sin doxiciclina, y administración de pioglitazona).

Los datos de la semana 8 y 9 mostraron que no hubo diferencias significativas entre los 4 grupos en los que se realizó el protocolo de inducción de diabetes, pero sí con respecto al control. En cambio, en la semana 10, los niveles de glucosa plasmática en ayuno disminuyeron en los grupos de pioglitazona (192.5 ± 17.8 mg/dL) y PPAR γ con doxiciclina (193.2 ± 12.1 mg/dL), sin que hubiera diferencias significativas con el grupo control. Sin embargo, estos valores fueron significativamente menores que los grupos de diabetes sin tratamiento (243.81 ± 17.4 mg/dL) y PPAR γ sin doxiciclina (235.9 ± 25.8 mg/dL) ($p < 0.05$).

3.4 Estandarización de la expresión de PPAR γ humano en hígado tras la administración plasmática por terapia génica hidrodinámica

Para la estandarización de la expresión del sistema Tet-On y PPAR γ por medio de terapia génica hidrodinámica, se llevó a cabo la inyección por vena caudal de los plásmidos correspondientes en 4 ratones sanos, a los cuales se les administró doxiciclina en agua (2 mg/mL) y se sacrificaron en el día 1, 2, 4 y 7 después de la inyección. Se llevó a cabo la extracción de RNA total de muestras de hígado y en la Figura 25 se muestra un gel de agarosa al 1 % representativo. Esto se realizó para comprobar la integridad del RNA como

puede verse en las 3 bandas bien definidas y también se cuantificaron las muestras en el equipo Nanodrop 2000.

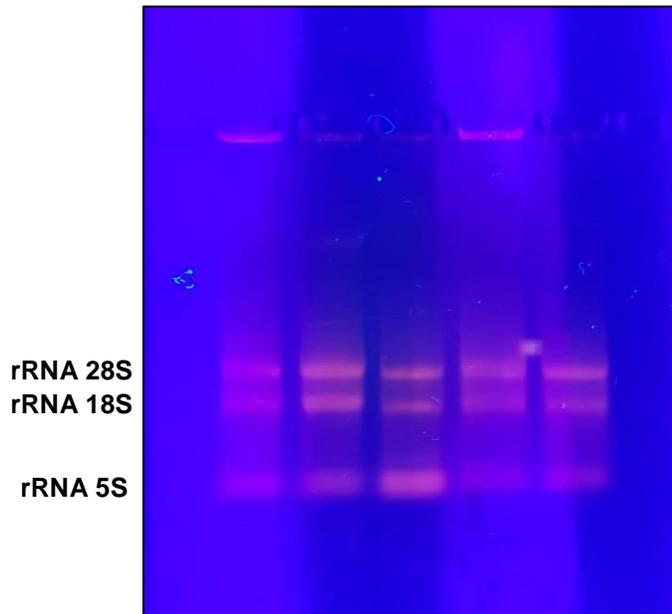


Figura 25. Gel de agarosa al 1 % donde se muestra el RNA total extraído a partir de muestras de hígado de ratones C57BL/6.

Una vez obtenido el RNA total, se sintetizó el cDNA por una reacción de retrotranscripción y se llevaron a cabo las reacciones de PCR punto final para determinar la expresión o no de los genes *TET-ON* y *PPAR γ* . En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos para el control negativo (ratón en el que no se administraron los plásmidos, sino únicamente la solución Hartmann) y el individuo en el que se expresaron los plásmidos durante 1 día (Figura 26a), así como los resultados obtenidos para los días 2 y 4 (Figura 26b) y para el día 7 (Figura 26c).

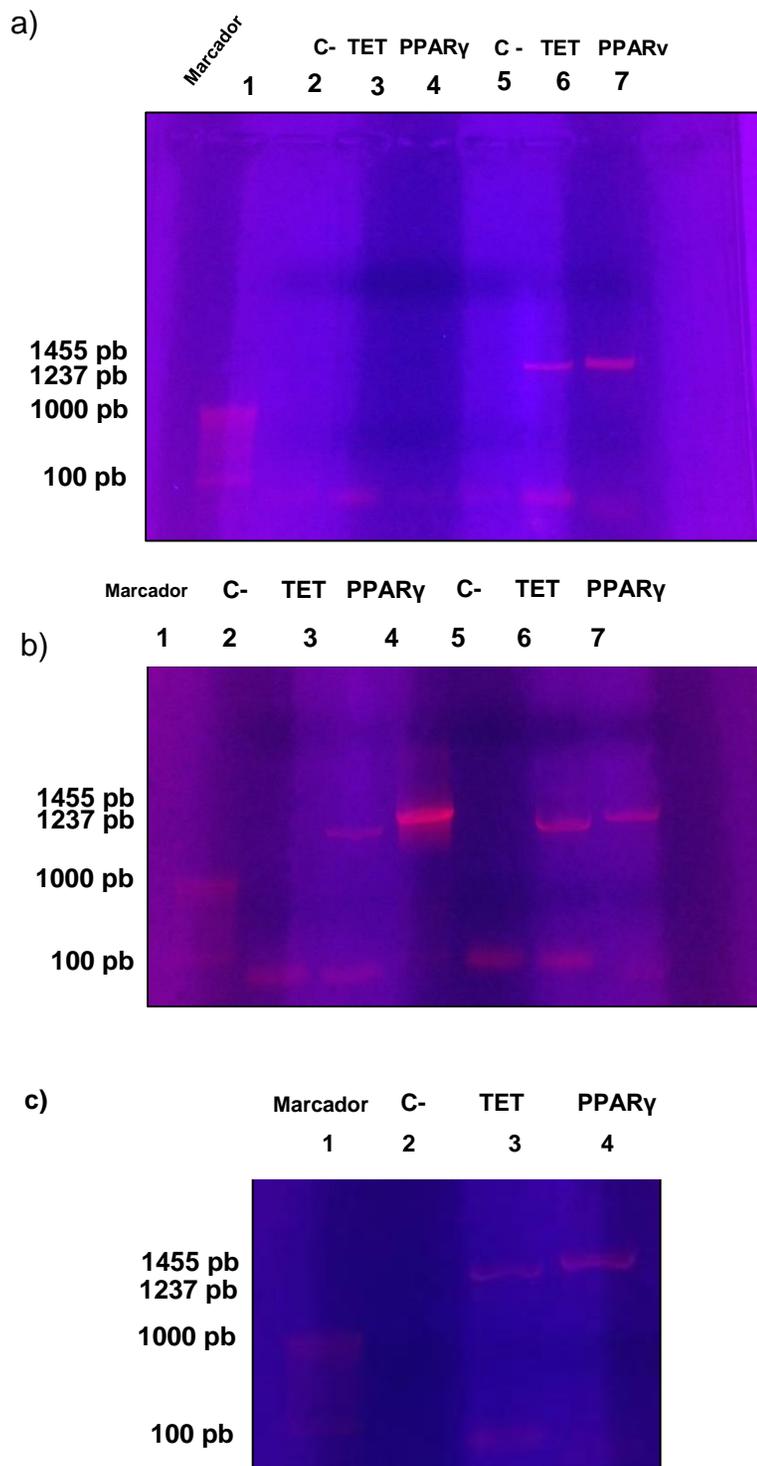


Figura 26. Geles de agarosa al 1 % con los productos de PCR para los genes *TET-ON* y *PPAR γ* (a) muestras del control negativo y día 1, b) día 2 y 4, c) día 7.

En la Figura 26a, puede observarse el marcador en el carril 1, los carriles 2-4 corresponden al cDNA obtenido del ratón control negativo. En el carril 2, se muestra un control negativo (agua como muestra), y en los carriles 3 y 4 se observa que no hubo expresión de *TET-ON* ni *PPAR γ* . Por otro lado, los carriles 5-7 se corresponden con las muestras obtenidas un día después de la administración de los plásmidos y el inductor doxiciclina. El carril 5 es un control negativo (agua) y en los carriles 6 y 7 puede observarse que hubo una amplificación de una única banda (superior a 1,000 pb) de alrededor de 1,237 pb para *TET-ON* y de 1,455 pb en el caso de *PPAR γ* , lo que demostró que el sistema Tet-On se está expresando en presencia de doxiciclina.

De igual manera, se analizaron por PCR punto final las muestras obtenidas del resto de los ratones y como puede observarse en la Figura 26 b y c, continuó expresándose en los días 2, 4 y 7 después de la administración de los plásmidos por terapia génica hidrodinámica.

Por lo tanto, se corroboró la activación de la expresión de *PPAR γ* en hígado y posteriormente, los ratones diabetizados a los que se les administraron los plásmidos fueron inyectados en tres ocasiones, en el día 0, 5 y 10 del tratamiento (después de las 8 semanas de diabetización).

3.5 Expresión inducida de *PPAR γ* humano en hígado evaluada por PCR punto final

Una vez finalizado el periodo de tratamiento de dos semanas, se llevó a cabo el sacrificio de los animales por dislocación cervical y se obtuvo el hígado, el cual se lavó con buffer PBS, se fragmentó y se guardó a -80°C hasta su uso. Antes de esto, se pesaron los hígados y se calculó el ratio peso hígado/peso corporal, y los resultados pueden observarse en la Figura 27.

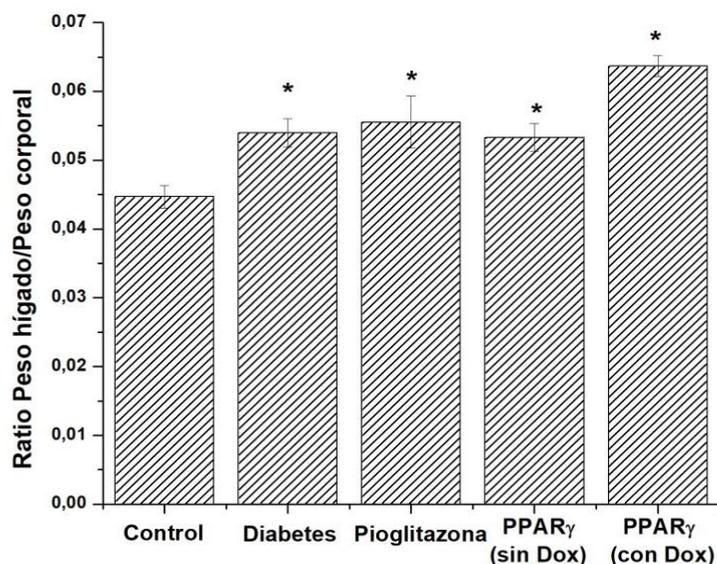


Figura 27. Ratio del peso hígado con respecto al peso corporal total en los cinco grupos experimentales, al final del protocolo.

El análisis de ANOVA de una vía, indicó que hubo diferencias significativas entre los grupos, dándose mayor ratio en los grupos con diabetes que en el grupo control ($p < 0.002$). A continuación, se muestran algunas imágenes de los hígados obtenidos al final del experimento (Figura 28).

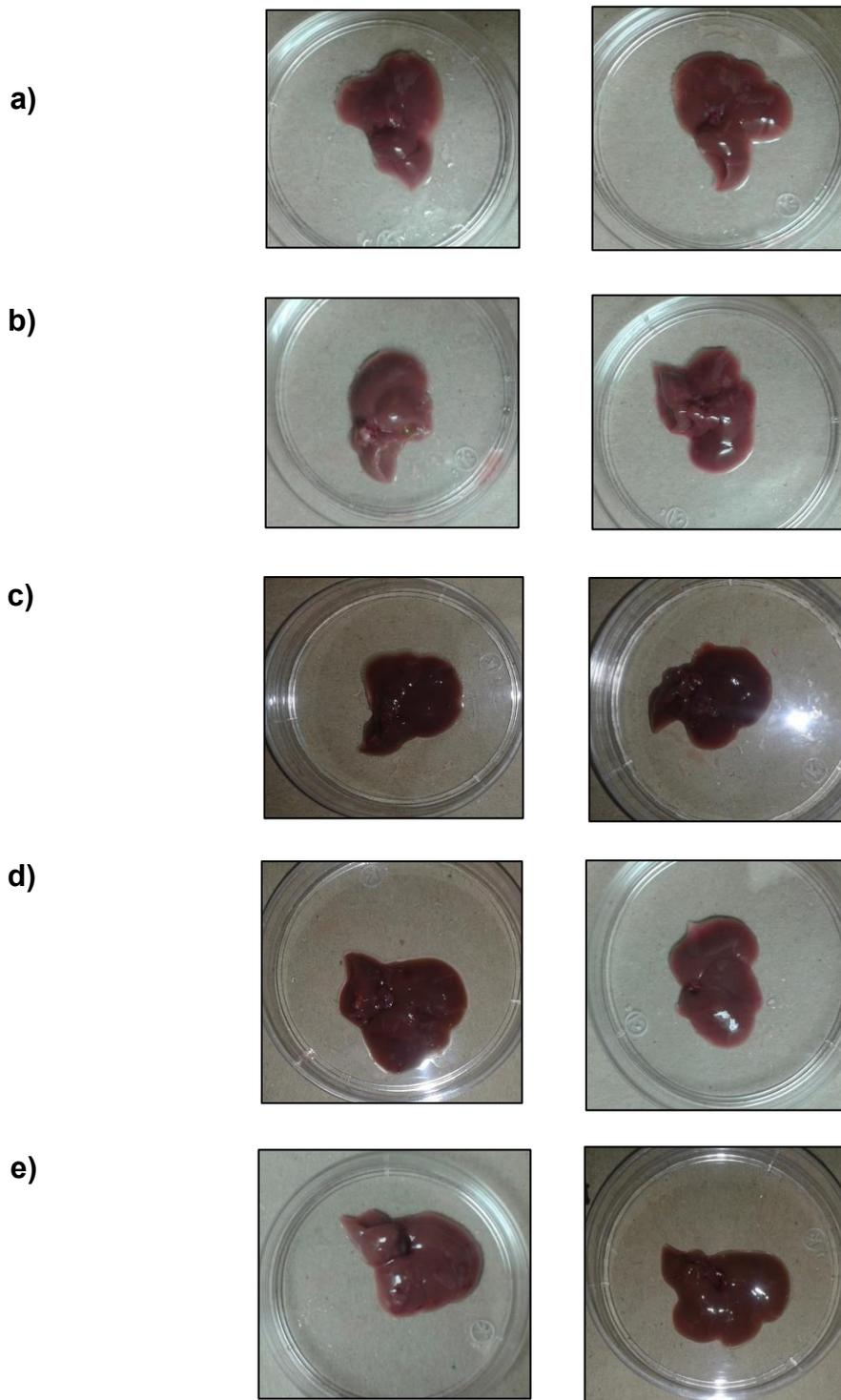


Figura 28. Fotografías de los hígados de los grupos control (a), diabetes (b), administrado con pioglitazona (c), PPAR γ sin Dox (d) y PPAR γ con Dox (e).

A continuación, se realizó la extracción de RNA por el método de TRIzol, la cuantificación por Nanodrop 2000 y la retrotranscripción a cDNA para por último, llevar a cabo la reacción de PCR punto final para *PPAR γ* y *TET-ON*. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 28. En la Figura 28 a y b, se muestran los geles de agarosa correspondientes a los ratones del grupo cotransfectado con los plásmidos del sistema Tet en presencia de doxiciclina. Fue posible observar una amplificación positiva tanto para la expresión de *TET-ON* (tamaño de banda aproximado de 1237 pb) como para *PPAR γ* (tamaño de banda aproximado de 1455 pb) en 3 de los 4 ratones del grupo. Por lo tanto, ratón número 3 se descartó en los experimentos posteriores. A su vez, en la Figura 28c, se muestra el gel de agarosa al 1 % de las muestras de hígado obtenidas del grupo de *PPAR γ* sin doxiciclina, donde puede verse que también en 3 de los 4 ratones hubo una expresión de *TET-ON*, pero no de *PPAR γ* , tal y como era esperado ya que no hubo administración del inductor doxiciclina. Por otro lado, en la Figura 28d se muestra que en las muestras obtenidas a partir del resto de grupos experimentales, no hubo amplificación de *PPAR γ* , tal y como era esperado.

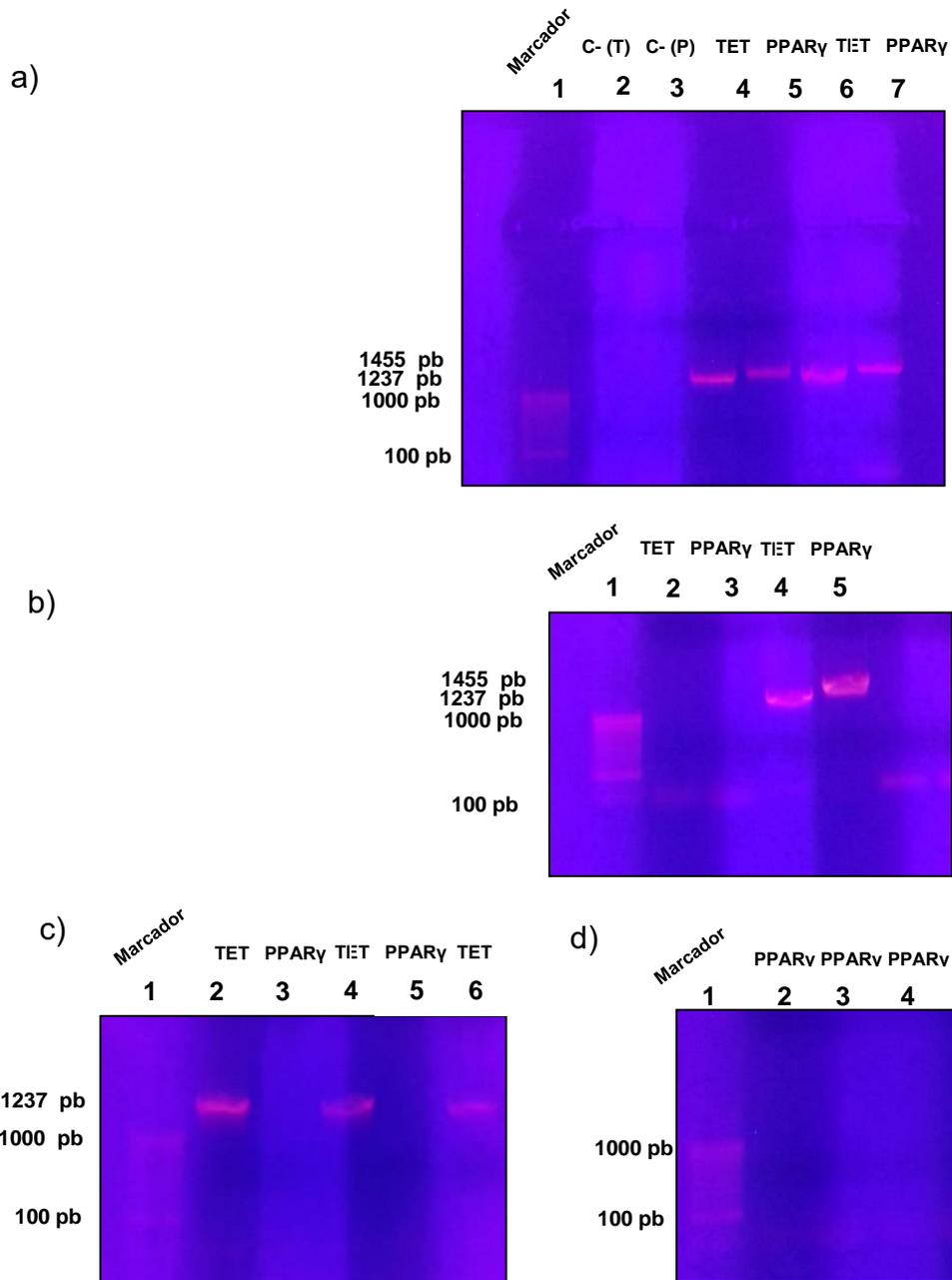


Figura 29. Determinación de la expresión de *PPAR γ* y *TET-ON* en hígado por PCR punto final en los diferentes grupos experimentales. a y b) Expresión en grupo *PPAR γ* (con Dox) ratones 1-2 (a) y ratones 3-4 (b), c) Grupo *PPAR γ* (sin Dox) y d) Muestras de los grupos control, diabetes y pioglitazona.

3.6 Determinación de los niveles de glucosa, insulina y adiponectina plasmática en ratones diabetizados y control, antes y después de los tratamientos

3.6.1 Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal

Junto con la determinación de los niveles de glucosa plasmática en ayuno (como se mostró anteriormente en los resultados, Figura 24) se llevó a cabo un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal con el objetivo de observar posibles diferencias entre los ratones alimentados con una dieta estándar y los ratones a los cuales se les indujo diabetes tipo 2. Antes de iniciar la fase de tratamiento, se tomaron muestras de sangre a los ratones en condiciones de ayuno (tiempo 0). A continuación, se administró una solución de glucosa (20 %, 2 g/kg peso corporal) por vía intraperitoneal y se evaluaron los niveles de glucosa en los tiempos 15, 30, 60 y 120 minutos (Figura 30).

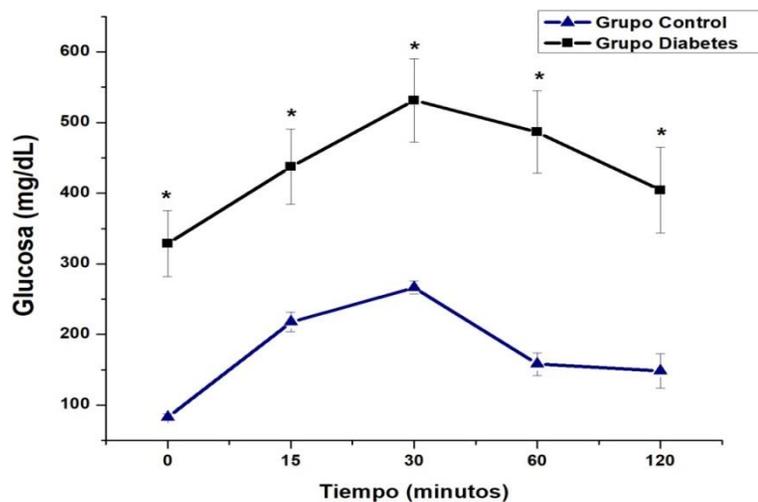


Figura 30. Resultados del test de tolerancia a glucosa intraperitoneal en ratones con dieta estándar y ratones con diabetes tipo 2.

En el grupo control, se observó un incremento de la glucemia con un valor promedio máximo de 266.4 ± 9.0 mg/dL a los 30 minutos. A partir de ese periodo, se observó un descenso progresivo del nivel de glucosa plasmática, alcanzando los 148.4 ± 24.0 mg/dL 2 horas después de la administración de la glucosa. Por otra parte, en los ratones diabetizados también se alcanzó el valor máximo a los 30 minutos, con una media de 511.5 ± 67.6 mg/dL. Después de ese tiempo, se observó una disminución del nivel de glucemia, aunque más moderado que en el grupo control, dándose un valor medio de 384.1 ± 71.9 mg/dL a las 2 horas. Como puede observarse en la gráfica, en los ratones con una dieta alta en grasa y alta en fructosa, se obtuvieron niveles de glucosa plasmática mucho más elevados que en el control con un valor de $p < 0.001$ en todos los tiempos. De igual manera, se llevó a cabo un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal después de las dos semanas de tratamiento (Figura 31). En este caso, el test se le realizó al grupo control, grupo de diabetes, pioglitazona y PPAR γ con doxiciclina. En primer lugar, es posible observar que los valores de glucosa plasmática fueron significativamente mayores ($p < 0.005$) en todos los tiempos en el grupo de diabetes sin tratamiento, con respecto al control. En el minuto 30 después de la inyección de la solución de glucosa al 20 %, hubo mayor nivel de glucosa en todos los grupos diabetizados con respecto al control ($p < 0.01$). Posteriormente, en el minuto 60, el análisis estadístico indicó que hubo diferencias significativas en los grupos de diabetes y PPAR γ con doxiciclina, con respecto al control ($p < 0.001$). En cambio, el grupo administrado con pioglitazona, que puede considerarse como un control positivo, no hubo diferencias con respecto al grupo control. Por último, dos

horas después de la administración de glucosa, puede observarse cómo únicamente el grupo de diabetes sin tratamiento presentó diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.001$). En cambio, se observa que hubo una disminución en el nivel de glucosa plasmática tanto en el grupo administrado con pioglitazona, como en el que se administró PPAR γ por medio de terapia génica hidrodinámica.

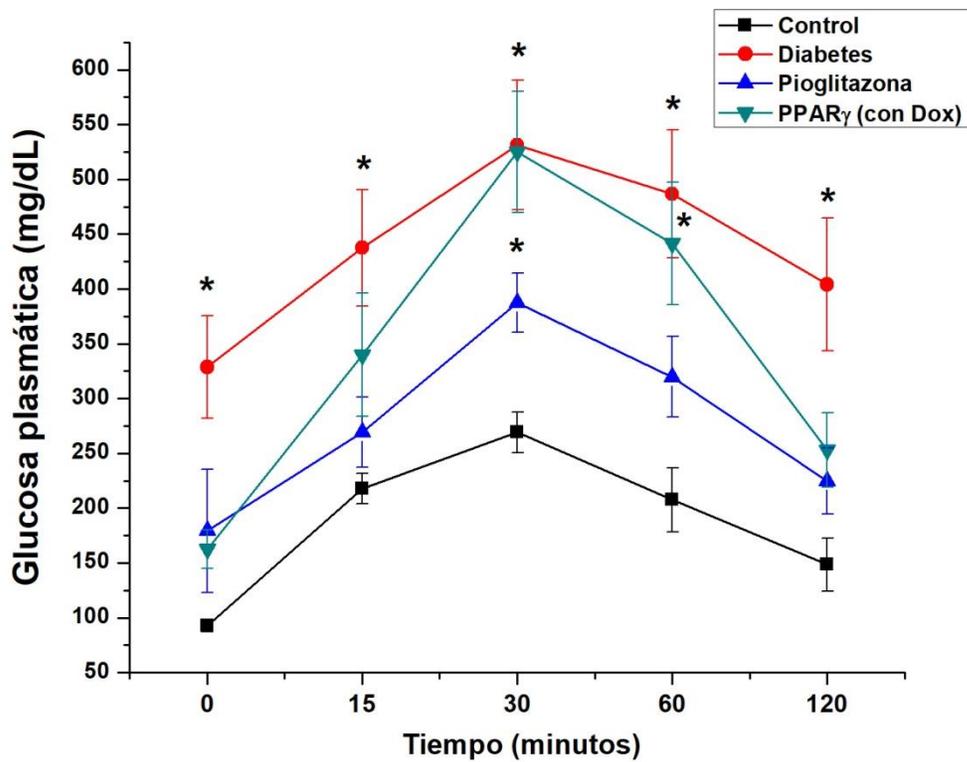


Figura 31. Test de tolerancia a glucosa intraperitoneal (IpGTT) en el grupo control y los grupos con diabetes, realizado al final del periodo de tratamiento.

* $p < 0.05$ comparado con el grupo control.

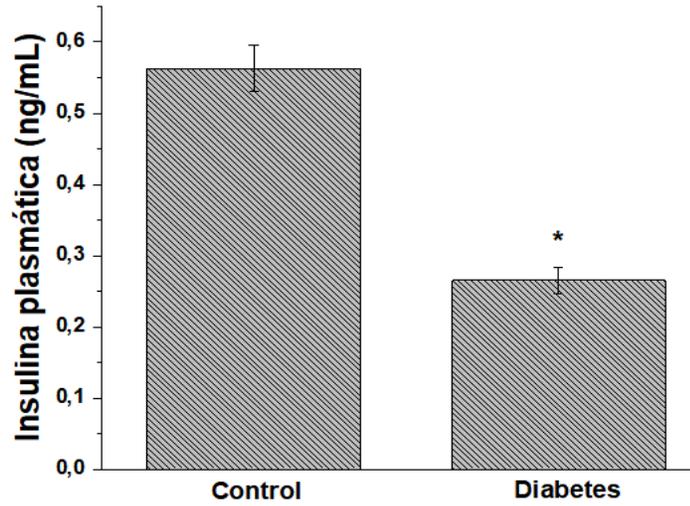
3.6.2 Determinación de los niveles de insulina plasmática

Se obtuvieron muestras de sangre de ratones diabetizados y del grupo control, las cuales fueron centrifugadas a 5,000 r.p.m. durante 10 minutos y se conservó el plasma obtenido a -80°C , para posteriormente realizar el ensayo de ELISA de insulina. Las muestras de sangre se obtuvieron tanto en la semana 8, antes de iniciar el tratamiento, como al final de este periodo, en la semana 10 del protocolo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32.

En la semana 8 del protocolo, se cuantificaron los niveles de insulina plasmática en ayuno en el grupo alimentado con dieta estándar y ratones del protocolo de inducción de diabetes. El nivel medio (\pm SEM) de insulina en el grupo control fue de 0.56 ± 0.03 ng/mL y de 0.27 ± 0.02 ng/mL en el grupo de ratones con dieta modificada (Figura 32a). Hubo una disminución significativa ($p < 0.005$) en el grupo de inducción de diabetes, esto debido a que el propio modelo incluye la administración de estreptozotocina en la semana 4, la cual daña a las células beta del páncreas, por lo que la cantidad de insulina disponible se ve disminuida en estas condiciones.

En la Figura 32b, se muestran los resultados correspondientes a los niveles de insulina plasmática en cada grupo de experimentación al final del protocolo.

a)



b)

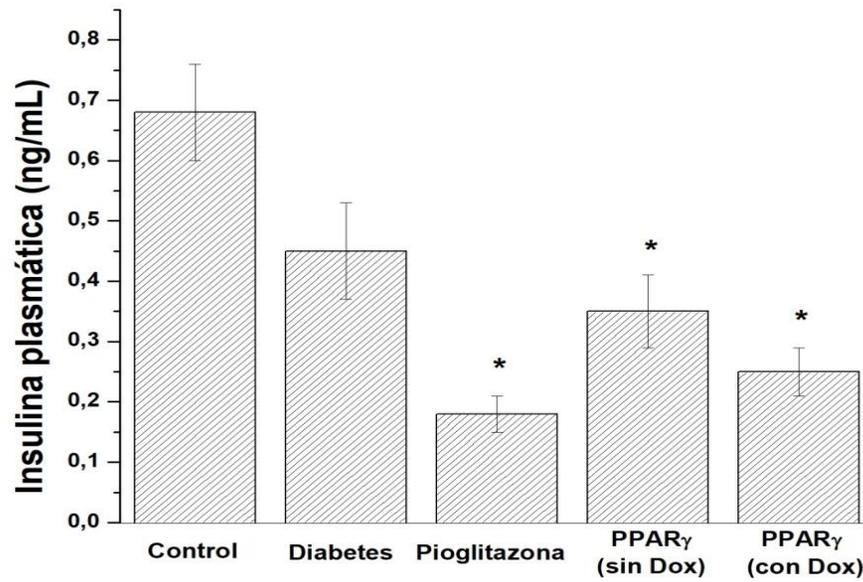


Figura 32. a) Insulina plasmática (ng/mL) en el grupo control y el grupo inducido con diabetes (semana 8 del protocolo), dándose menor concentración de insulina en el grupo con diabetes como consecuencia de la administración de estreptozotocina. b) Resultados de insulina plasmática (ng/mL) de los 5 grupos experimentales en la semana 10 del protocolo.

Los valores promedios de insulina plasmática obtenidos al final del protocolo fueron de 0.68 ± 0.08 ng/mL para el grupo control, 0.45 ± 0.11 ng/mL para el grupo de diabetes, 0.18 ± 0.02 ng/mL para el grupo administrado con pioglitazona, 0.35 ± 0.06 ng/mL para el grupo de PPAR γ sin doxiciclina y de 0.25 ± 0.03 ng/mL para el grupo de PPAR γ con doxiciclina. El análisis estadístico realizado (ANOVA de una vía y prueba de Tukey) reportó que hubo un nivel de insulina plasmática significativamente menor ($p < 0.05$) en los grupos administrados con pioglitazona y con PPAR γ (con y sin doxiciclina), que con respecto al grupo control.

Después de esto, se emplearon los datos obtenidos de glucosa e insulina plasmática en ayuno, para calcular el índice de resistencia a la insulina o índice HOMA-IR, y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 33. Los valores del índice HOMA obtenidos para cada uno de los grupos fue de: 5.00 ± 0.83 ; 7.03 ± 1.13 ; 1.36 ± 0.20 ; 5.03 ± 0.96 y 2.70 ± 0.66 , respectivamente, de acuerdo al orden en el que se representan en la Figura 33. Se observó un menor índice HOMA en el grupo administrado con pioglitazona y en el grupo administrado con PPAR γ por terapia génica, sin embargo, únicamente hubo diferencias significativas en el grupo administrado con pioglitazona ($p < 0.02$), dándose un menor índice de resistencia a la insulina, que con respecto al grupo de diabetes sin tratamiento. Por el contrario, el grupo de PPAR γ con doxiciclina no presentó una disminución significativa en la resistencia a insulina, por lo que de acuerdo a estos datos es posible afirmar que la hipótesis se rechaza.

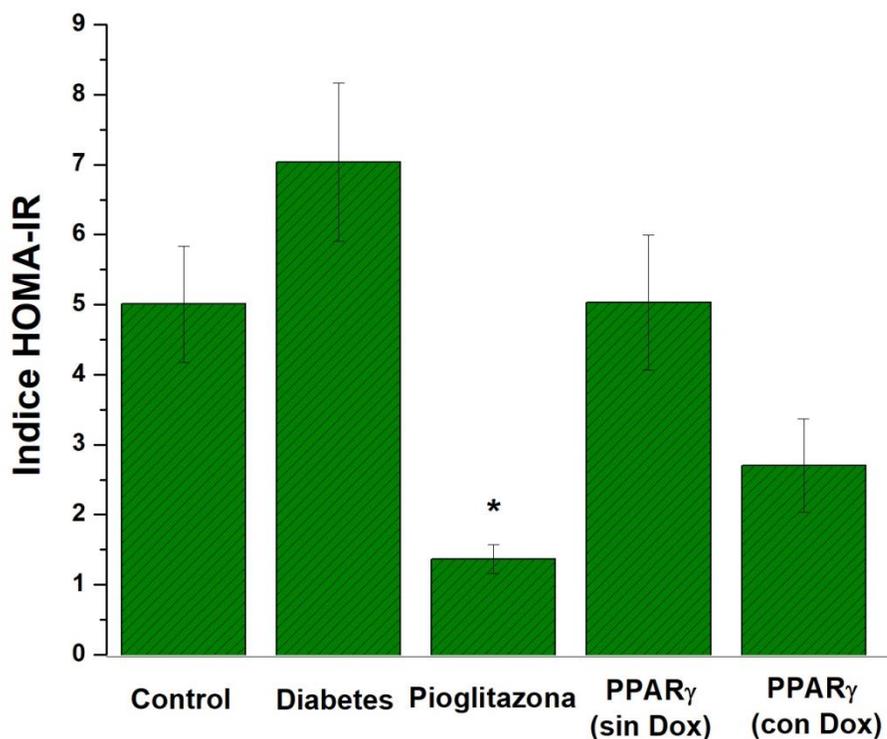


Figura 33. Determinación del índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) a partir de los valores de glucosa (mmol/L) e insulina plasmática (μ U/mL) en ayuno en los 5 grupos experimentales. * $p < 0.05$ con respecto al control.

3.6.3 Determinación de los niveles de adiponectina plasmática

Los niveles de adiponectina disminuyen con la obesidad y están directamente relacionados con la sensibilidad a la insulina. Se llevó a cabo la determinación de adiponectina plasmática en los cinco grupos experimentales, antes y después del periodo de tratamiento. Los resultados obtenidos para esta proteína antes de las dos semanas de tratamiento se muestran en la Figura 34. Los valores promedio de adiponectina plasmática fueron de 55.62 ± 2.16 μ g/mL en el grupo control; 52.34 ± 11.19 μ g/mL en el grupo de diabetes; 53.44 ± 3.92 μ g/mL en el grupo de pioglitazona; 51.59 ± 0.52 μ g/mL en el grupo de PPAR γ sin

doxiciclina y $53.06 \pm 8.37 \mu\text{g/mL}$ en el grupo de $\text{PPAR}\gamma$ con doxiciclina. Estos resultados se encuentran dentro del rango de valores normales esperados en roedores ($10\text{-}80 \mu\text{g/mL}$) y no hubo diferencias significativas con respecto al control.

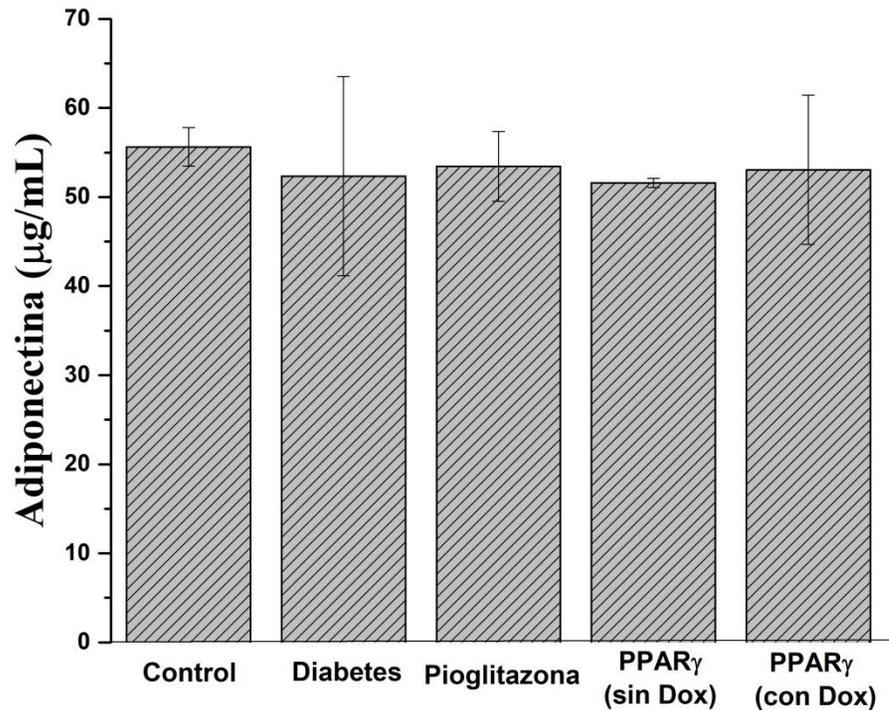


Figura 34. Determinación de los niveles de adiponectina plasmática ($\mu\text{g/mL}$) por medio de un ensayo de ELISA en los diferentes grupos experimentales durante la semana 8 del protocolo y antes del periodo de tratamiento.

Posteriormente, se determinaron los niveles de adiponectina plasmática en los cinco grupos después de las dos semanas de tratamiento (Figura 35). En este caso, en el grupo control el nivel de adiponectina fue de $64.79 \pm 4.18 \mu\text{g/mL}$. Por otro lado, tanto el grupo de diabetes como el de $\text{PPAR}\gamma$ sin doxiciclina ($41.57 \pm 1.69 \mu\text{g/mL}$ y $42.73 \pm 2.95 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) presentaron valores

significativamente menores ($p < 0.005$) que el grupo control y que el grupo tratado con pioglitazona ($63.37 \pm 9.49 \mu\text{g/mL}$). Por último, el grupo de $\text{PPAR}\gamma$ con doxiciclina presentó unos valores medios de $50.99 \pm 1.55 \mu\text{g/mL}$, siendo superiores al del grupo de diabetes sin tratamiento, pero no habiendo diferencias significativas entre ambos.

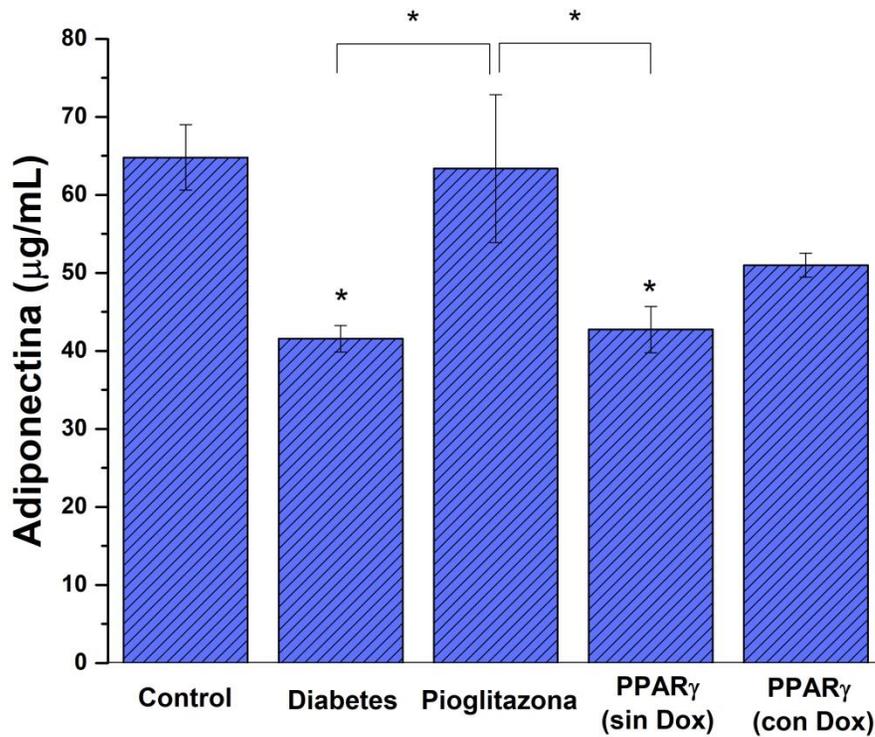


Figura 35. Determinación de los niveles de adiponectina plasmática ($\mu\text{g/mL}$) por medio de kit de ELISA en los diferentes grupos experimentales al final del periodo de tratamiento.

3.7 Determinación de la expresión de PPAR γ en hígado por medio de dot blot

A partir de las muestras de hígado congeladas, se realizó la extracción de proteínas totales empleando un buffer de lisis y en presencia del cocktail de inhibidores de proteasas. Después de llevar a cabo la concentración de las muestras con acetona, se disolvió el pellet obtenido y se cuantificó la concentración de proteína por medio de la técnica de Bradford y se obtuvieron valores en el rango de entre 0.5-2.0 mg/mL de proteína.

Posteriormente, se realizó el experimento de dot blot, por medio del cual se colocaron de 1-5 μ g de proteína sobre la membrana de nitrocelulosa y se esperó a que se secase. Esto se realizó por triplicado para muestras de cada uno de los cinco grupos experimentales (Figura 36). Después de esto, se continuó con el protocolo de dot blot tal y como fue indicado en la sección de metodología.

En la Figura 37, se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos, donde puede verse que hubo detección de PPAR γ en hígado en las diferentes condiciones de experimentación. Sin embargo, no fue posible establecer diferencias significativas en cuanto al nivel de expresión de esta proteína en el grupo transfectado con PPAR γ y el resto de grupos, incluido el control.

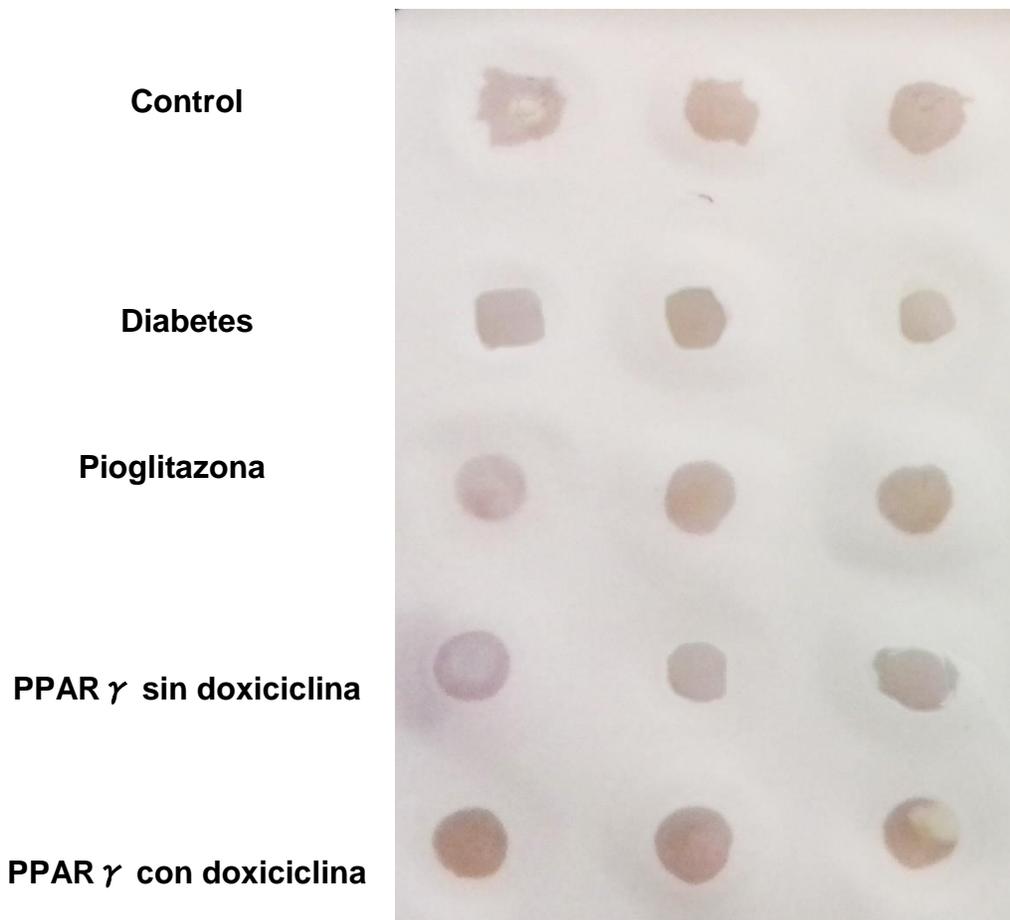


Figura 36. Determinación de la expresión de PPAR γ en muestras de hígado de ratones C57BL/6 por medio de dot blot, en las diferentes condiciones de experimentación.

CAPÍTULO 4

4. DISCUSIÓN

En este proyecto se propuso analizar el efecto de la expresión inducida de PPAR γ humano en el hígado de ratones C57BL/6 en condiciones de diabetes tipo 2 (generada por modificación en la dieta y administración de estreptozotocina). Esta expresión se llevó a cabo por medio de un sistema inducible Tet-On y empleando terapia génica hidrodinámica.

4.1 Diseño y construcción de los vectores para la expresión inducible de PPAR γ humano bajo un sistema de tetraciclina (Tet-On)

Con respecto al primero de los objetivos, se llevaron a cabo las dos construcciones genéticas de manera satisfactoria, como se pudo comprobar con las reacciones de PCR punto final. Además, se corroboró que el plásmido recombinante pTRE-ZsGreen1-IRES2-hPPAR γ se clonó correctamente, ya que se observó una expresión de hPPAR γ en células HEK293T co-transfectadas.

De acuerdo a lo revisado en la literatura publicada previamente, no existen muchos reportes sobre la expresión inducida de PPAR γ empleando un sistema de tetraciclina. Tachibana *et al.* 2005 establecieron un sistema para la expresión inducida de PPAR γ humano de tipo Tet-Off con el objetivo de

identificar los genes activados por PPAR γ . Esto lo realizaron en células HepG2 y por medio de cotransfección de dos plásmidos no virales: pTet-Off vector y pBI-EGFP-hPPAR γ (plásmido bicistrónico, para la expresión de simultánea del gen de interés, hPPAR γ , y del gen reportero, EGFP). En nuestro caso, también se empleó un sistema de dos plásmidos, con un vector respuesta que también cuenta con un gen reportero (ZsGreen1), aunque únicamente cuenta con un promotor y la expresión se da por medio de un único mRNA, con un elemento IRES entre los dos genes. Por otro lado, Liu *et al.* 2013 llevaron a cabo la expresión de hPPAR γ y C/EBP por medio de un sistema inducible Tet-On de tipo viral (lentivirus) en líneas celulares de adipocitos y con diferentes elementos respuesta y proteínas activadoras. Además, no se tiene conocimiento de reportes previos en los que se haya llevado a cabo la expresión de PPAR γ humano en modelos animales con sistemas de expresión inducible.

4.2 Expresión transitoria de PPAR γ humano recombinante en células HEK293T bajo un sistema de expresión inducible Tet-On

Dada la importancia de PPAR γ en la homeostasis y adipogénesis y su función esencial en enfermedades como la diabetes tipo 2, pero también en cáncer y obesidad, se han desarrollado distintos modelos para la expresión de hPPAR γ recombinante. No existen muchos artículos previos donde se hayan empleado modelos celulares para la expresión *in vitro* de hPPAR γ , siendo algunos ejemplos la transfección en células COS-1, HepG2, HEK293T y células de cáncer gástrico. Sin embargo, generalmente no se indica el nivel de expresión de PPAR γ en las células transfectadas (Elbrecht *et al.* 1996; Relic *et*

al. 2006; Guo *et al.* 2016). Tachibana *et al.* (2005) establecieron un sistema Tet-Off altamente regulado en células HepG2 para la expresión de hPPAR γ y con el objetivo de poder identificar genes que son activados por PPAR γ . Ellos reportaron un incremento en la expresión de 20 veces comparado con las células control, 6 días después de retirar el inductor doxiciclina del medio.

Además, Guo *et al.* lograron una transfección de células de cáncer gástrico con un vector pEGFP-N1-PPAR γ , obteniéndose un incremento significativo de 30 veces en la expresión de PPAR γ con respecto al control. También se ha llevado a cabo una transfección transitoria de células HEK293T empleando un vector phPPAR γ -IRES2-EGFP y pPPRE β 3-TK-LUC (plásmido reportero) con un incremento en el nivel de expresión de entre 2-3 órdenes de magnitud en comparación con el control (pIRES2-EGFP) (Ma *et al.* 2012). En nuestro estudio, se empleó también la co-transfección de células HEK293T con los plásmidos pCMV-Tet3G y pTRE-ZsGreen1-IRES2-hPPAR γ 1 para la expresión transitoria, e inducible de PPAR γ por medio de un sistema Tet-On. En nuestro caso, se obtuvo un incremento significativo de la expresión de PPAR γ (530 fold-change, $p < 0.002$), siendo un valor comparable al obtenido anteriormente por Ma *et al.* 2012. Además, el análisis de fluorescencia realizado indicó un incremento significativo de la fluorescencia en presencia de doxiciclina ($p < 0.05$), como consecuencia de la inducción de la expresión de la proteína reportera ZsGreen1, siendo esta una prueba más de que la transfección y expresión de PPAR γ se realizó de forma exitosa.

4.3 Modelo de inducción de diabetes tipo 2

Existen diversos modelos genéticos y no genéticos para el estudio de la diabetes tipo 2 en animales, tal y como se ha descrito previamente en la sección de antecedentes. En este caso, se empleó un sistema no genético o inducido experimentalmente basado en una dieta alta en grasa, dieta alta en fructosa y una dosis de estreptozotocina (100 mg/kg de peso corporal) por medio de un protocolo con una duración de 10 semanas.

Uno de los aspectos a tener en cuenta, es la evolución del peso corporal. El peso inicial de los ratones estuvo en un rango de entre 10.8 y 18.3 g. Uno de los grupos (n=4) comenzó el experimento con un peso medio de 18.3 ± 0.3 g, siendo superior al resto de los grupos (10.8-11.6 g). Esto fue debido a que el primer grupo contaba con 5 semanas de edad, mientras que el resto tenían 3 semanas, dada la disponibilidad de animales de la misma edad en el momento de comenzar el experimento.

Posteriormente, se observó un incremento gradual del peso corporal, como era esperado dado que los animales se encontraban en etapa de crecimiento. Una vez finalizado el protocolo (semana 10) el peso corporal promedio fue de entre 22.32 ± 1.11 g para el grupo administrado con pioglitazona y 24.02 ± 0.52 g para el grupo control, sin que hubiera diferencias significativas entre los cinco grupos experimentales. Por lo tanto, no hubo un incremento significativo en el peso de los animales alimentados con dieta alta en grasa tal y como se podría haber esperado.

A este respecto, Guo *et al.* 2009, determinaron que se daba un incremento significativo en la adiposidad y el peso corporal de ratones macho C57BL/6 a partir de las 12 semanas de ser alimentados con una dieta alta en grasa. Por otro lado, Williams *et al.* 2014 establecieron que el incremento en la adiposidad en ratones C57BL/6 de 12 semanas de edad tenía lugar a partir de la semana 16 de alimentarlos con una dieta alta en grasa (5.2 kcal/g). A su vez, Pang *et al.* 2016, emplearon ratones machos C57BL/6 de 6-8 semanas de edad y los alimentaron con dieta alta en grasa (5.24 kcal/g) o una dieta alta en fructosa. Observaron que se dio un incremento significativo en el peso corporal, después de 3 meses de dieta modifica en el grupo de dieta alta en grasa. En cambio, no hubo diferencias significas entre el grupo control y el alimentado con dieta alta en fructosa. Por todo lo anterior, una de las posibles causas de que no se haya observado un incremento significativo en el peso de los grupos diabetizados es que la duración de nuestro protocolo fue menor, teniendo una duración total de 10 semanas y los animales tenían entre 3-5 semanas al inicio del protocolo.

Por otro lado, se determinó el consumo promedio de alimento (g/día/ratón) y de líquido (mL/día/ratón) esto con el objetivo de verificar que los distintos grupos experimentales tuvieran un consumo normal y que éste no se viera afectado por la modificación en la dieta o bien por los fármacos que se les administraron.

Según Bachmanov *et al.* 2002, el consumo medio de alimento por día/ratón se encuentra en un rango de 3.1-6.3 g/día/ratón, mientras que el consumo medio de líquidos es de 3.9-8.2 mL/día/ratón. En este estudio, el consumo promedio fue de entre 2.9 y 5.2 g de alimento/día/ratón y de entre 2.5 y 4.8 mL/día/ratón, por lo que se trata de valores que se encuentra dentro del rango normal esperado, aunque al inicio del protocolo, el consumo fue un poco menor, como consecuencia de que solo contaban con alrededor de 4 semanas de edad y por lo tanto, su peso era menor. Hubo un mayor consumo promedio de líquido durante las dos últimas semanas del protocolo en todos los grupos, a excepción del grupo tratado con PPAR γ (con doxiciclina), en el que no hubo diferencias significativas en el consumo durante las tres etapas del protocolo. Esto puede ser debido a que dado que la edad inicial de este grupo (5 semanas) fue superior al resto, el consumo de líquidos fue algo mayor desde el comienzo.

Para realizar un seguimiento del efecto del protocolo de inducción de diabetes, se determinaron los niveles de glucosa plasmática en ayuno a distintos tiempos. Los niveles de glucosa plasmática en el grupo control se encontraron entre 97-154 mg/dL. Con relación a lo reportado previamente en la literatura, Andrikopoulos *et al.* 2008 observaron valores de glucosa basal de 7.88 ± 0.42 mmol/L o 141.8 ± 7.8 mg/dL en ratones C57BL/6 alimentados con dieta estándar (y con un periodo de ayuno de 6 horas), por lo que nuestros niveles son comparables a los de este otro estudio. También Pang *et al.* 2016

reportaron valores de glucosa en ayuno en ratones control C57BL/6 de 77.4 ± 10.8 mg/dL.

En cuanto a los niveles de glucosa plasmática de los cuatro grupos con dieta modificada, los niveles máximos se alcanzaron en la semana 7 (en un rango de 313.5 ± 12.1 a 397 ± 29.8 mg/dL dependiendo del grupo) y posteriormente, se observó una disminución moderada, dándose valores promedios de entre 192.5 ± 17.8 y 243.8 ± 17.4 mg/dL en la semana 10 del protocolo.

El análisis estadístico realizado (test de ANOVA de una vía y prueba de Tukey) indicó que se dio un incremento significativo en los niveles de glucosa plasmática en ayuno a partir de la semana 6 ($p < 0.005$), en los cuatro grupos en los que se indujo la diabetes, con respecto al grupo control. Por lo tanto, el protocolo de inducción de diabetes generó un incremento en los niveles de glucosa plasmática en los ratones con respecto al grupo control. Los datos de la semana 8 y 9 mostraron que no hubo diferencias significativas entre los 4 grupos en los que se realizó el protocolo de inducción de diabetes, pero sí con respecto al control. En cambio, en la semana 10, los niveles de glucosa plasmática en ayuno disminuyeron en los grupos de pioglitazona (192.5 ± 17.8 mg/dL) y PPAR γ con doxiciclina (193.2 ± 12.1 mg/dL), sin que hubiera diferencias significativas con el grupo control. Sin embargo, estos valores fueron significativamente menores que los grupos de diabetes sin tratamiento (243.81 ± 17.4 mg/dL) y PPAR γ sin doxiciclina (235.9 ± 25.8 mg/dL) ($p < 0.05$). Por lo tanto, puede determinarse que hubo un efecto positivo en cuanto a los

niveles de glucosa plasmática en ayuno como consecuencia de la administración de pioglitazona y la expresión de PPAR γ , respectivamente.

A su vez, Luo *et al.* 1998, emplearon un protocolo de inducción de diabetes con dieta alta en fructosa y una dosis de estreptozotocina (100 mg/kg), y 4 semanas después de la inyección de ésta, observaron valores de glucosa en ayuno de entre 366-388 mg/dL. Es nuestro caso, los datos obtenidos para la semana 8 y cuarta después de la inyección de estreptozotocina, fueron de entre 280-360 mg/dL (dependiendo de los grupos diabetizados), por lo que son muy similares a los obtenidos por Luo *et al.* 1998, aunque existió una mayor variabilidad entre los grupos. Además, se considera que la obtención de valores de glucosa sanguínea en ayuno superiores a 250 mg/dL por tres veces consecutivas, es indicativo de diabetes tipo 2 en ratones (Deeds *et al.* 2011). En el experimento, a partir de la semana 6 hasta la 9, se obtuvieron valores superiores a 250 mg/dL de glucosa en ayuno, por lo que puede determinarse que el modelo de inducción de diabetes tipo 2 fue efectivo.

4.4 Expresión de PPAR γ humano en hígado de ratones C57BL/6 por medio de terapia génica hidrodinámica

Una vez establecido el modelo de diabetes, se llevó a cabo la terapia génica hidrodinámica. Para ello, previamente se realizó una estandarización de la técnica con el objetivo de determinar la expresión o no de PPAR γ humano en el hígado, así como la duración de esta expresión. Se determinó que al menos hasta una semana después de la inyección intravenosa con los plásmidos del sistema Tet-On y en presencia de doxiciclina, continuó habiendo expresión de

la proteína activadora TET-ON y de PPAR γ . Con respecto a lo reportado previamente, He *et al.* 2004 llevaron a cabo una coinyección de plásmidos para la expresión de insulina en el hígado de ratones diabéticos, realizando una administración de forma semanal. En cambio, otros antecedentes reportaron la administración de una única inyección y la evaluación de la expresión en un periodo de tiempo que va de las 3-8 semanas, aproximadamente (Gao *et al.* 2014, Ma *et al.* 2015, Ma *et al.* 2016).

Uno de los factores que afectan en la duración de la expresión de los plásmidos transfectados por terapia génica hidrodinámica es el tipo de promotor. En nuestro experimento se empleó un promotor de albúmina con un enhancer y el promotor de citomegalovirus humano. En cuanto al promotor de albúmina, Wooddell *et al.* 2008 analizaron la estabilidad en la expresión empleando este promotor específico de hígado en combinación con diversos elementos enhancer. Determinaron que se puede conseguir una expresión estable y sin que sean necesarios elementos que propicien la integración en el genoma de los hepatocitos. Por otro lado, Nguyen *et al.* 2008 estudiaron el nivel de expresión de distintos promotores en células HEK 293 y en ratones FVB. Observaron que el promotor de citomegalovirus humano (hCMV) cuenta con una alta eficiencia de expresión aunque menor que otros promotores como el del factor de elongación 1 α (EF1 α), β -Actina de pollo, (CAG, chicken beta-actin/CMV enhancer). Por lo tanto, esto nos indica que los promotores empleados son adecuados para una expresión prolongada del gen de interés,

por lo que sería factible incrementarse el periodo de expresión de PPAR γ en hígado, ya que en esta ocasión el tiempo de tratamiento fue de dos semanas.

A su vez, en cuanto a la cantidad de plásmido inyectado, se ha determinado que aproximadamente el 40 % de los hepatocitos se transfectan con una dosis de 10 μ g de DNA plasmídico administrada por la vena de la cola del ratón (Liu *et al.*1999). En este estudio, se emplearon 10 μ g del vector regulador y 20 μ g de vector respuesta, por lo que se encuentra dentro del rango reportado previamente. Sin embargo, podría ser muy útil llevar a cabo un experimento de estandarización con un rango más amplio de cantidades de DNA plasmídico administradas, con el objetivo de incrementar el porcentaje de eficiencia de transfección. A su vez, en este estudio únicamente se determinó la expresión de los genes de interés por PCR punto final, por lo que para establecer posibles diferencias en el nivel de expresión entre los individuos transfectados, sería necesario llevar a cabo un ensayo de PCR tiempo real.

De manera adicional, se determinó el peso del hígado y el ratio peso hígado/peso corporal obteniéndose valores de: 1.018 ± 0.047 g para el grupo control con dieta estándar y de entre 1.175 ± 0.086 y 1.445 ± 0.041 g para los grupos con dieta modificada; y un ratio de 0.0447 ± 0.00165 para el grupo control, y de entre 0.053 y 0.063 para los grupos con dieta modificada. En ambos casos, se dio un incremento significativo en presencia de una dieta alta en grasa y alta en fructosa, con respecto al grupo de animales alimentados con una dieta estándar.

Con respecto a lo previamente reportado, Guo *et al.* 2009 reportaron un tamaño medio del hígado en ratones C57BL/6 con dieta estándar de 1.30 ± 0.125 g y de 1.54 ± 0.074 g para el grupo con dieta alta en grasa, por lo que nuestros resultados son comparables. Además, Park *et al.* 2010 también reportaron una mayor ganancia de peso corporal y del peso del hígado en presencia de dieta alta en grasa, así como un incremento en el contenido hepático de triglicéridos.

Por su parte, VanSaun *et al.* 2009 observaron que en presencia de dieta alta en grasa, los hepatocitos aumentaban su tamaño y que había un mayor grado de esteatosis, representada por medio de una vacuolización de estas células, lo cual estaba correlacionado directamente con el tiempo que llevaban los animales consumiendo una dieta modificada. El consumo de una dieta alta en grasa induce alteraciones estructurales en el hígado, incluyendo esteatosis micro y macrovesicular (Kang *et al.* 2017).

4.5 Niveles de glucosa, insulina y adiponectina plasmática antes y después del tratamiento con terapia génica

Además de la determinación de glucosa plasmática en ayuno, otra de las pruebas más empleadas es la de tolerancia a glucosa intraperitoneal (IpGTT). Esto se evaluó en la semana 8 y en la semana 10 del protocolo, es decir antes y después de la fase de tratamiento. Los resultados obtenidos en la semana 8 mostraron una menor tolerancia a la glucosa en los cuatro grupos diabetizados, que con respecto al grupo control ($p < 0.001$). Andrikopoulos *et al.* 2008, determinaron que las mayores diferencias en cuanto a la tolerancia de la glucosa entre grupos con alimentados con una dieta alta en grasa y grupos

control, se da después de 6 horas de ayuno, por lo que es el tiempo que se empleó en este estudio. Ellos observaron valores máximos de alrededor de 400 mg/dL en el minuto 15 después de la inyección de glucosa, tanto para animales alimentados con dieta alta en grasa, como los alimentados con dieta estándar, y valores finales de entre 120-210 mg/dL. En nuestro caso, los valores máximos se alcanzaron a los 30 minutos. Para el grupo control, el máximo fue 266.4 ± 9.0 mg/dL y para los grupos diabetizados de 511.5 ± 67.6 mg/dL, con valores finales (120 minutos) de 160 ± 2.1 y 384.1 ± 71.9 mg/dL. A continuación se muestra un resumen de otros resultados reportados previamente:

- Messier *et al.* 2007: reportaron que en ratones C57BL/6 machos tras 12 semanas con dieta alta en grasa, alta en fructosa o combinación los valores máximos fueron de 325-360 mg/dL y los finales de 145-216 mg/dL.
- Williams *et al.* 2014: mostraron que tras 16 semanas con dieta alta en grasa y tras 5 horas de ayuno los resultados de glucosa máximos fueron de 235-300 mg/dL y los finales de 145-200 mg/dL.
- Pang *et al.* 2016: reportaron que tras 12 semanas de una dieta alta en fructosa, alta en grasa o una combinación los valores máximos fueron de 380-410 mg/dL y los finales de 140-250 mg/dL.
- Feng *et al.* 2018: mostraron que tras un periodo de 16 semanas con dieta alta en grasa los valores máximos de glucosa fueron de entre 180-400 mg/dL y los valores finales de 130-270 mg/dL.

Por lo tanto, puede observarse que los datos obtenidos en este experimento pueden ser comparables con lo reportado previamente, aunque en nuestro experimento el rango de valores promedios entre el grupo control y los de diabetes fue algo mayor.

De igual manera, se llevó a cabo un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal después de las dos semanas de tratamiento. En el minuto 30 después de la inyección de la solución de glucosa al 20 %, continuó habiendo un mayor nivel de glucosa en todos los grupos en los que se indujo la diabetes con respecto al control ($p < 0.01$). Posteriormente, en el minuto 60, el análisis estadístico indicó que hubo diferencias significativas en los grupos de diabetes y PPAR γ con doxiciclina, con respecto al control ($p < 0.001$). En cambio, el grupo administrado con pioglitazona, que puede considerarse como un control positivo, no hubo diferencias con respecto al grupo con dieta estándar, por lo que puede observarse que la administración de este fármaco de la familia de las tiazolidinedionas ejerció un efecto positivo en cuanto a la tolerancia a la glucosa, tal y como era esperado. Por último, dos horas después de la administración de glucosa, únicamente el grupo de diabetes sin tratamiento presentó diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.001$). En cambio, tuvo lugar una disminución en el nivel de glucosa plasmática tanto en el grupo administrado con pioglitazona, como en el que se administró PPAR γ por medio de terapia génica hidrodinámica. Esto constituye un indicativo de que ambos tratamientos lograron mejorar la tolerancia a la glucosa intraperitoneal en animales con diabetes tipo 2.

A continuación, se llevó a cabo la determinación de los niveles de insulina plasmática en ayuno. En la semana 8 del protocolo el nivel medio (\pm SEM) de insulina en el grupo control fue de 0.56 ± 0.03 ng/mL y de 0.27 ± 0.02 ng/mL en el grupo de ratones con diabetes.

Con respecto a los valores reportados previamente en estudios de inducción de diabetes con dieta alta en grasa, tenemos que Ge *et al.* 2015 obtuvieron valores de insulina plasmática en ayuno entre 0.8-2.5 ng/mL (para el grupo control y el de diabetes); Andrikopoulos *et al.* 2008 obtuvieron valores de insulina plasmática de entre 0.72-1.28 ng/mL (grupo control y diabetes) y Gou *et al.* 2009 reportaron niveles de insulina de 0.7 ± 0.14 ng/mL para el grupo control y de 2.3 ± 0.42 ng/mL en condiciones de diabetes (dieta alta en grasa con 19 semanas de duración). Además, Wooten *et al.* 2016 realizaron un estudio con un protocolo de 14 semanas de duración (dieta alta en grasa o dieta alta en grasa y fructosa) dándose niveles de insulina fueron de: 0.61 ± 0.12 ng/mL en control y 1.71 ± 0.26 ng/mL en HFD, y 2.14 ± 0.31 ng/mL en HFD + Fructosa. En comparación con los resultados obtenidos en nuestro estudio, podemos observar que nuestros niveles de insulina en el grupo control (0.56-0.68 ng/mL) son similares y comparables a lo reportado anteriormente en la literatura.

En cuanto a los niveles de insulina en el modelo de dieta alta en grasa, lo esperado es que los niveles de insulina sean superiores, ya que se produce un incremento en la resistencia a la insulina (Ge *et al.* 2015, Andrikopoulos *et al.* 2008, Gou *et al.* 2009, Wooten *et al.* 2016). Sin embargo, como nuestro modelo se basa en una combinación de dieta alta en grasa y en fructosa, junto con la

administración de una dosis de estreptozotocina, se espera que los valores de insulina plasmática sean inferiores al control, dada la acción de la estreptozotocina sobre las células beta del páncreas.

Por ello, se analizaron estudios previos en los que se emplea la estreptozotocina para la inducción de diabetes tipo 2 en ratones. Carvalho *et al.* 2017 llevaron a cabo un modelo de diabetes en el que se combinó la estreptozotocina con una dieta alta en grasa (6 semanas) en ratones machos C57BL/6 y determinaron valores de 1.6 ± 0.3 ng/mL de insulina en el grupo control y de 0.7 ± 0.1 ng/mL en el grupo de diabetes. Puede observarse que esto es similar a los valores obtenidos en nuestro experimento, en el que los niveles de insulina en el grupo de diabetes fueron prácticamente la mitad que en el grupo control. Además, Chen *et al.* 2014 llevaron a cabo un modelo de diabetes con dieta alta en grasa y una dosis de 100 mg/kg peso corporal de estreptozotocina obteniendo valores de 2.64 ± 0.12 ng/mL y de 1.55 ± 0.09 ng/mL para el grupo de diabetes sin tratamiento; y también Yu *et al.* 2013 reportaron niveles de 1.024 ± 0.064 ng/mL en control y 0.299 ± 0.032 ng/mL en ratones diabetizados con STZ.

Tras las dos semanas de tratamiento, los niveles de insulina plasmática en ayuno en los grupos tratados con pioglitazona y en el grupo inyectado con los plásmidos en presencia de doxiciclina se mantuvieron bajos (0.18 ± 0.02 ng/mL y 0.25 ± 0.03 ng/mL, respectivamente) mientras que en los grupos de diabetes sin tratamiento y el grupo de PPAR γ sin doxiciclina los niveles se incrementaron a 0.45 ± 0.11 ng/mL y 0.35 ± 0.06 ng/mL, respectivamente, debido

a que se continuó suministrando una dieta alta en fructosa y en grasa por lo que la resistencia a la insulina se incrementó.

Uno de los indicadores empleados para evaluar la resistencia a la insulina es el índice HOMA. Yu *et al.* 2013 reportaron valores del índice HOMA de 1.9 ± 0.3 para los animales control y 21.6 ± 2.4 para el grupo con diabetes. También Pang *et al.* 2016 observaron niveles de 1.1 ± 0.46 y de 3.5 ± 1.6 para animales con dieta estándar y con dieta alta en grasa, respectivamente; y Wooten *et al.* 2016 reportaron que el índice HOMA fue de 5.9 ± 1.3 , 41.5 ± 10.6 y 34.5 ± 8.0 en el grupo control, dieta alta en grasa y una combinación de dieta alta en grasa y en fructosa, respectivamente.

En nuestro estudio los valores del índice HOMA obtenidos para cada uno de los grupos al final del protocolo fue de: 5.00 ± 0.83 ; 7.03 ± 1.13 ; 1.36 ± 0.20 ; 5.03 ± 0.96 y 2.70 ± 0.66 , respectivamente, para el grupo control, diabetes sin tratamiento, pioglitazona, PPAR γ sin doxiciclina y PPAR γ con doxiciclina. Por ello, pudo observarse que la administración de pioglitazona tuvo un efecto positivo, disminuyendo la resistencia a la insulina, ya que el índice HOMA fue significativamente menor que con respecto al grupo control. Además, en el grupo tratado con terapia génica hidrodinámica también hubo una disminución en el índice HOMA, sin embargo, no fue estadísticamente significativa. Por ello, podría determinarse que la expresión de PPAR γ en el hígado, no fue suficiente como para que se redujera significativamente la resistencia a la insulina.

La última parte del objetivo 6 fue determinar los niveles de la proteína adiponectina en plasma, ya que está directamente relacionada con la sensibilidad a la insulina y uno de sus principales reguladores es PPAR γ . Por lo tanto, niveles superiores de adiponectina serían indicativos de una mayor sensibilidad a la insulina. En ratones sanos, los niveles normales de adiponectina plasmática se encuentran en el rango de 10-80 $\mu\text{g/mL}$, siendo una de las proteínas más abundantes en el plasma (Hsu *et al.* 2013).

Anteriormente, Zayed *et al.* 2018 estudiaron un modelo de diabetes inducida con dieta alta en grasa y en fructosa durante 8 semanas y observaron niveles de adiponectina de 6.35 $\mu\text{g/mL}$ en ratones sanos y 4.68 $\mu\text{g/mL}$ en ratones diabéticos. A su vez, Chaolu *et al.* 2011 reportaron niveles de en torno a 21 y 16 $\mu\text{g/mL}$ en animales sanos y diabéticos; y Naitho *et al.* 2008 tras 7 semanas de dieta alta en grasa determinaron niveles de adiponectina de 23 y 18 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

En nuestro estudio, los niveles de adiponectina promedio fueron algo superiores al citado en el párrafo anterior, sin embargo, se encuentra dentro del rango normal (Hsu *et al.* 2012). Antes de iniciar el tratamiento los valores de adiponectina detectados fueron de 51.50-55.62 $\mu\text{g/mL}$, no habiendo diferencias significativas entre los grupos con diabetes y el grupo control. En cambio, al finalizar el protocolo, en el grupo control el nivel de adiponectina fue de 64.79 ± 4.18 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, tanto el grupo de diabetes como el de PPAR γ sin doxiciclina (41.57 ± 1.69 $\mu\text{g/mL}$ y 42.73 ± 2.95 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) presentaron valores significativamente menores ($p < 0.005$) que el grupo control

y que el grupo tratado con pioglitazona ($63.37 \pm 9.49 \mu\text{g/mL}$). Por último, el grupo de PPAR γ con doxiciclina presentó unos valores medios de $50.99 \pm 1.55 \mu\text{g/mL}$, siendo superiores al del grupo de diabetes sin tratamiento, pero no habiendo diferencias significativas entre ambos. Por lo tanto, se observó una menor sensibilidad a la insulina en los grupos de diabetes sin tratamiento y PPAR γ sin doxiciclina, que son respecto al control.

En cambio, en los animales tratados con pioglitazona hubo un incremento significativo en los niveles de adiponectina, tal y como era esperado. Finalmente, los animales tratados con terapia génica presentaron un leve incremento en los niveles de adiponectina plasmática con respecto al grupo con diabetes sin tratamiento, sin embargo, no hubo diferencias significativas. Previamente, se ha reportado la presencia de expresión de adiponectina en el hígado (Taniguchi *et al.* 2002), pero el principal tejido productor de esta proteína es el tejido adiposo. En este caso, la sobreexpresión de PPAR γ en el hígado no fue suficiente para generar un incremento significativo en los niveles de adiponectina en el plasma, por lo que algunos de los factores a considerar serían incrementar las cantidades de plásmidos transfectados, así como el periodo de tratamiento.

4.6 Determinación de la expresión de PPAR γ en hígado por medio de dot blot

Finalmente, a partir de las muestras de hígado congeladas, se procedió a la extracción de la fracción proteica para la realización de un ensayo de dot blot, con el objetivo de determinar la expresión de PPAR γ a nivel de proteína. Los resultados obtenidos mostraron que fue posible detectar la presencia en hígado de PPAR γ en todos los grupos experimentales, incluido el grupo control y sin que hubiera diferencias significativas. Se sabe que existe una expresión baja de PPAR γ 1 en hígado, lo que explicaría que todos los grupos hayan sido positivos para la presencia de PPAR γ . Además, hay que tener en cuenta que el anticuerpo primario empleado (Anti PPAR gamma antibody proceed in rabbit, Sigma) presenta reactividad para humano, ratón y rata. Por lo tanto, con la técnica empleada no fue posible determinar un incremento significativo en la expresión de PPAR γ en los animales tratados con terapia génica. Una opción alternativa sería evaluar la expresión en hígado de la proteína reportera ZsGreen1 que se expresa junto con PPAR γ a partir del plásmido respuesta.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES

- Se construyeron correctamente los dos vectores recombinantes pTRE-ZsGreen1-hPPAR γ y pALB-TETON.
- La co-transfección de las células HEK293T con los plásmidos del sistema Tet-On fue exitosa, generándose un incremento de la expresión de hPPAR γ de más de 500 veces, en presencia del inductor doxiciclina.
- Se estandarizó el modelo de inducción de diabetes tipo 2 en ratones C57BL/6, dándose un incremento significativo en los niveles de glucosa sanguínea en ayunas en los grupos con dieta alta en fructosa, alta en grasa y administrados con 100 mg/kg de estreptozotocina, con respecto al grupo control.
- Los ratones alimentados con una dieta alta en grasa y en fructosa, mostraron una menor tolerancia a la inyección de glucosa intraperitoneal con respecto al grupo control.
- Se estandarizó el modelo de terapia génica hidrodinámica en ratones C57BL/6, dándose satisfactoriamente la transfección de los hepatocitos con los plásmidos del sistema Tet-On y manteniéndose la expresión de hPPAR γ en hígado por un mínimo de 7 días.

- Al final del periodo de 2 semanas de tratamiento, los animales que fueron inyectados con los plásmidos del sistema Tet-On (en presencia de Dox) mostraron una mayor tolerancia a la glucosa, que el grupo de referencia inducido con diabetes.
- La administración de pioglitazona durante dos semanas logró una disminución significativa en el índice de resistencia a la insulina, sin embargo, el grupo administrado con hPPAR γ por medio de terapia génica hidrodinámica, no presentó una reducción significativa en el índice de resistencia a insulina por lo que la hipótesis establecida se rechaza.
- Al final del protocolo, los grupos administrados con pioglitazona y con hPPAR γ presentaron valores de adiponectina plasmática similares al control, mientras que los grupos con diabetes sin tratamiento presentaron valores significativamente menores, lo que es un indicativo de menor sensibilidad a la insulina.
- Se detectó la presencia de PPAR γ en hígado en los cinco grupos experimentales, y a ese nivel de resolución no fue posible observar diferencias significativas.

PERSPECTIVAS

- Análisis histológico del hígado de ratones sanos y ratones con diabetes para observar los efectos de la dieta alta en grasa a nivel hepático
- Análisis de la expresión genética en el hígado en condiciones de sobreexpresión de PPAR γ empleando microarreglos.
- Extensión del número de semanas del protocolo de diabetes
- Estandarización el nivel de expresión de hPPAR γ tras la inyección de diferentes cantidades de plásmidos por terapia génica hidrodinámica, así como el incremento en la duración del tratamiento.
- Evaluación de la expresión en hígado de la proteína reportera ZsGreen1 en animales transfectados por terapia génica hidrodinámica.
- Generación de un modelo de ratones transgénicos para la expresión inducible de hPPAR γ

BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo-Rojas, L.B., Gomes, M.B. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 5: 6-21. (2013).
- Ahmadian, M., Suh, S., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A., Downes, M., Evans M. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature Medicine* 19: 557-566. (2013).
- Andrikopoulos, S., Blair, A.R., Deluca, N., Fam, B.C., Proietto, J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: 1323-1332. (2008).
- Arulmozhi, D.K., Portha, B. GLP-1 based therapy for type 2 diabetes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 28: 96-108. (2006).
- Bachmanov, A.A., Reed, D.R., Beauchamp, G.K, Tordoff, M.G. Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behav. Genet.* 32: 435-443. (2002).
- Balderas-Rentería, I. Diabetes, obesidad y síndrome metabólico. Un abordaje multidisciplinario. *Mundo Moderno*. (2015).
- Benado, M. *et al.* Effects of various levels of dietary fructose on blood lipids in rats. *Nutr Res* 24:565–571. (2004).
- Bernard PS and Wittwer C.T. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clinical Chemistry* 48: 1178-85. (2002).
- Blouin, C.M., Prado, C., Takane, K.K., Lasnier, F., Garcia-Ocana, A., Ferre, P., Dugail, I., Hajduch, E. Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes*. 59:600–610. (2010).
- Bonamassa, B., Hai, L., Liu, D. Hydrodynamic Gene Delivery and Its Applications in Pharmaceutical Research. *Pharm Res*. 28: 694–701. (2011).
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 4:611-22. (2009)

- Carvalho, A.L., DeMambro, V.E., Guntur, A.R., Le, P., Nagano, K., Baron, R., Albuquerque de Paula, F. J. and Motyl, K.J. High fat diet attenuates hyperglycemia, body composition changes, and bone loss in male streptozotocin-induced type 1 diabetic mice. *Journal of Cellular Physiology*, 233(2): 1585–1600. (2017).
- Chaolu, H., Asakawa, A., Ushikai, M., Li, Y. X., Cheng, K. C., Li, J. B. and Inui, A. Effect of exercise and high-fat diet on plasma adiponectin and nesfatin levels in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2(2): 369–373. (2011).
- Chaudhary, S., Dube, T., Kothari, V., Sachan, N., Upasani, C.R. NS-1: A novel partial peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist to improve insulin sensitivity and metabolic profile. *European Journal of Pharmacology* 684: 154-160. (2012).
- Chen, D., Wang, M.W. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 7: 307–317. (2005).
- Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J. and Chen, W. Antidiabetic effect of *Lactobacillus casei* CCFM0412 on mice with type 2 diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Nutrition* 30(9): 1061–1068. (2014).
- Chomczynski, P., Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159. (1987).
- Deeds, M.C., Anderson, J.M., Armstrong, A.S., Gastineau, D.A., Hiddinga, H.J., Kudva, Y.C. Single dose streptozotocin induced diabetes: Considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Animal* 45(3): 131-140. (2011).
- Elbrecht, A., Chen, Y., Cullinan, C.A., Hayes, N., Leibowitz, M., Moller, D.E. and Berger, J. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun* 224:431-437. (1996).
- Ellacott, K.L.J., Morton, G.J., Woods, S.C., Tso, P., Schwartz, M.W. Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell Metabolism* 12: 10-17. (2010).
- Feng, H., Zhang, S., Wan, J. M. F., Gui, L., Ruan, M., Li, N. and Wang, H. Polysaccharides extracted from *Phellinus linteus* ameliorate high-fat high-fructose diet induced insulin resistance in mice. *Carbohydrate Polymers* 200: 144–153. (2018).
- Frayn, K.N., Karpe, F., Fielding, B.A., *et al.* Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:875–88. (2003)
- Gao, M., Ma, Y., Cui, R. and Liu, D. Hydrodynamic delivery of FGF21 gene alleviates obesity and fatty liver in mice fed a high-fat diet. *Journal of Controlled Release* 185:1–11. (2014)
- Gavrilova, O., Haluzik, M., Matsusue, K., Cutson, J.J., Johnson, L., Dietz, K.R., Nicol, C.J., Vinson, C., Gonzalez, F.J., Reitman, M.L. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic

- steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *Journal of Biological Chemistry* 278: 34268-34276. (2003).
- Ge, Z., Zhang, P., Hong, T., Tang, S., Meng, R., Bi, Y., Zhu, D. Erythropoietin alleviates hepatic insulin resistance via PPAR γ - dependent AKT activation *Scientific Reports* 5:17878 (2015).
- Guo, F., Ren, X., Don, Y., Hu, X., Xu, D., Zhou, H., Meng, F., Tian, W. and Zhao, Y. Constitutive expression of PPAR γ inhibits proliferation and migration of gastric cancer cells and down-regulates Wnt/ β -Catenin signaling pathway downstream target genes TERT and ENAH. *Gene* 584:31-37. (2016).
- Guo, J., Jou, W., Gavrilova, O., Hall, K.D. Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesogenic diets (2009).
- Han, B.G., Hao, C.H., Tchekneva, E.E., Wang, Y.Y., Lee, C.A., Ebrahim, B., Harris, R.C., Kern, T.S., Wasserman, D.H., Breyer, M.D., Qi, Z. Markers of glycemic control in the mouse: comparisons of 6-hour overnight-fasted blood glucoses to Hb A1c. *American Journal of Physiology-Endocrinology-Metabolism* 295: 981–986. (2008).
- Harper, J.M., Durkee, S.J., Smith-Wheelock, M., Miller, R.A. Hyperglycemia, impaired glucose tolerance and elevated glycated hemoglobin levels in a long-lived mouse stock. *Experimental Gerontology* 40: 303-314. (2005).
- Hass, B., Eckstein, N., Pfeifer, V., Mayer, P., Hass, M.D.S. Efficacy, safety and regulatory status of SGLT2 inhibitors: focus on canagliflozin. *Nutrition & Diabetes*. 4: 1-8. (2014).
- He, C. X., Shi, D., Wu, W. J., Ding, Y. F., Feng, D. M., Lu, B. and Xue, J. L. Insulin expression in livers of diabetic mice mediated by hydrodynamics-based administration. *World Journal of Gastroenterology* 10: 567–572. (2004).
- He, W., Barak, Y., Hevener, A., Olson, P., Liao, D., Le, J., Nelson, M., Ong, E., Olefsky, J.M., Evans, R.M. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor γ knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100:15712–15717. (2003).
- Hsu, W. H., Liao, T. H., Lee, B. H., Hsu, Y. W., & Pan, T. M. Ankaflavin regulates adipocyte function and attenuates hyperglycemia caused by high-fat diet via PPAR γ activation. *Journal of Functional Foods* 5(1): 124–132. (2013).
- Islam, M.S., Loots, D.T. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 31: 249–261. (2009).
- Joshi, S., Joshi, P. A review of insulin and insulin regimens in type 2 diabetes. *South African Family Practice*, 51:2, 97-102 (2009).
- Kang, J.-H., Kawano, T., Toita, R., Murata, M., and Fujita, S. Increased hepatic inflammation in a normal-weight mouse after long-term high-fat diet feeding. *Journal of Toxicologic Pathology* 31(1): 43–47. (2017).
- Katzung, B., Masters, S.B., Trevor, A. J. *Basic and Clinical Pharmacology*, 12th Edition. LANGE.

- Kudaravalli, J., Vijayalakshmi, G., Kishore, K.K. Safety and efficacy of sulfonylurea drugs in type 2 diabetes *mellitus*. *Apollo Medicine* 10: 165-168. (2013).
- Lee, Y.H., Magkos, F., Mantzoros, C.S., *et al.* Effects of leptin and adiponectin on pancreatic beta-cell function. *Metabolism* 60:1664–72. (2011).
- Schaffer, J.E. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 14(3):281–287. (2003).
- Liu, F., Song, Y. K., and Liu, D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy* 6(7): 1258–1266. (1999).
- Liu, Q., Hill, P. J., Karamitri, A., Ryan, K. J. P., Chen, H. Y., and Lomax, M. A. Construction of a doxycycline inducible adipogenic lentiviral expression system. *Plasmid* 69: 96–103. (2013).
- Lu, M., Sarruf, D., Talukdar, S., Sharma, S., Bandyopadhyay, G., Nalbandian, S., Fan, W., Gayen, J.R., Mahata, S.K., Webster, N.J., Schwartz, M.W., Olefsky, J.M. Brain PPAR γ promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones. *Nature Medicine* 17: 618–622. (2011).
- Luo, J., Quan, J., Tsai, J., Hobensack, C. K., Sullivan, C., Hector, R., and Reaven, G. M. Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes *mellitus*. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 47(6), 663–668. (1998).
- Ma, J., Zhang, T., Fang, N., Zou, Y., Gong, Q., Yu, L. and Chen, D. Establishment of a cell-based drug screening model for identifying agonists of human peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). *J Pharm Pharmacol* 64:719-726. (2012).
- Ma, Y., Gao, M. and Liu, D. Preventing High Fat Diet-induced Obesity and Improving Insulin Sensitivity through Neuregulin 4 Gene Transfer. *Scientific Reports* 6: 1–10. (2016).
- Ma, Y., Gao, M., Sun, H. and Liu, D. Interleukin-6 gene transfer reverses body weight gain and fatty liver in obese mice. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(5): 1001–1011. (2015).
- Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., Kihara, S., Nishizawa, H., Kishida, K., Nagaretani, H., Matsuda, M., Komuro, R., Ouchi, N., Kuriyama, H., Hotta, K., Nakamura, T., Shimomura, I., Matsuzawa, Y. PPAR γ Ligands Increase Expression and Plasma Concentrations of Adiponectin, an Adipose-Derived Protein. *Diabetes* 50:2094–2099. (2001).
- Messier, C., Whately, K., Liang, J., Du, L., and Puissant, D. The effects of a high-fat, high-fructose, and combination diet on learning, weight, and glucose regulation in C57BL/6 mice. *Behavioural Brain Research*, 178(1): 139–145. (2007).
- Morán-Salvador, E., López-Parra, M., García-Alonso, V., Titos, E., Martínez-Clemente, M., González-Pérez, A., López-Vicario, C., Barak, Y., Arroyo, V., Clària, J. Role of PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *The FASEB Journal* 25: 2538-2550. (2011)

- Naitoh, R., Miyawaki, K., Harada, N., Mizunoya, W., Toyoda, K., Fushiki, T., Seino, Y., Yamada, Y. and Inagaki, N. Inhibition of GIP signaling modulates adiponectin levels under high-fat diet in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376(1): 21–25. (2008).
- Naldini, L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 26: 351-360. (2015).
- Nguyen, A., Adrienne, B., Dow, B.A., Kupiec-Weglinski, J., Busuttil, R.W. and Lipshutz, G.S. Evaluation of Gene Promoters For Liver Expression By Hydrodynamic Gene Transfer. *J Surg Res.* 148(1): 60–66. (2008).
- Olefsky, J.M. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *The Journal of Clinical Investigation* 106: 467-472. (2000).
- Olefsky, J.M., Evans RM. PPAR γ activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization. *PNAS* 106: 22504-22509. (2009).
- Olokoba, A., Obateru, O. Olokoba, L. 2012 Type 2 Diabetes *Mellitus*: A review of current trends. *Oman Medical Journal* 27(4): 269-273. (2012).
- Ortlepp, J.R. *et al.* A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse. *Eur J Clin Invest* 30:195–202. (2000).
- Pang, J., Xi, C., Huang, X., Cui, J., Gong, H., Zhang, T. Effects of excess energy intake on glucose and lipid metabolism in C57BL/6 mice. *PLoS ONE* 11: e0146675. (2016).
- Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G., He, G., Ali, S.R. and Holzer, R. G. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell.* 140(2): 197–208. (2010).
- Park, S., Kim, D.S. Kang, S. Vitamin D deficiency impairs glucose-stimulated insulin secretion and increases insulin resistance by reducing PPAR γ expression in non-obese type 3 diabetic rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 27: 257-265. (2015).
- Pasquel, F.J., Umpierrez, G.E. Hyperosmolar hyperglycemic state: a Historic review of the clinical presentation, diagnosis and treatment. *Diabetes Care.* 37: 3124-3131. (2014).
- Rees, D.A., Alcolado, J.C. Animal models of diabetes *mellitus*. *Diabet Med* 22:359–370. (2005).
- Relic, B., Benoit, V., Franchimont, N., Kaiser, M.J., Hauzeur, J.P., Gillet, P., Merville, M.P., Bours, V. & Malaise, M.G. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 is dephosphorylated and degraded during BAY 11-7085-induced synovial fibroblast apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281: 22597-225604. (2006).
- Samuel, V.T., Schulman, G.I. Integrating Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell.* 148: 852–871. (2012).
- Sato, D., Oda, K., Kusunoki, M., Nishina, A., Takahashi, K., Feng, Z., Tsutsumi, K., Nakamura, T. PPAR γ activation alters fatty acid composition in adipose triglyceride, in addition to proliferation of small adipocytes, and

- insulin resistant high-fat fed rats. *European Journal of Pharmacology* 773: 71-77. (2016).
- Srinivasan, K., Ramaro, P. Animal models in type 2 diabetes research: An Overview. *Indian Journal of Medical Research* 451-472. (2007).
- Stephens, J.M., Floyd, Z.E. Controlling a Master Switch of adipocyte development and insulin sensitivity: Covalent Modifications of PPAR γ . *Biochimica et Biophysica Acta* 1882(7): 1090-1095. (2012).
- Stieger, K., Belbellaa, B., Le Guiner, C., Moullier, P., Rolling, F. *In vivo* gene regulation using tetracycline-regulatable systems. *Advanced Drug Delivery Review* 61: 527-541. (2009).
- Suda, T., Gao, X., Stolz, D.B., Liu, D. Structural impact of hydrodynamic injection on mouse liver. *Gene Ther* 14: 129–137. (2007).
- Suda, T., Liu, D. Hydrodynamic Gene Delivery: Its Principles and Applications. *Molecular Therapy* 12: 2063–2069 (2007).
- Tachibana, K., Kobayashi, Y., Tanaka, T., Tagami, M., Sugiyama, A., Katayama, T., Ueda, C., Yamasaki, D., Ishimoto, K., Sumitomo, M., Uchiyama, Y., Kohro, T., Sakai, J., Hamakubo, T., Kodama, T. and Doi, T. Gene expression profiling of potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target genes in human hepatoblastoma cell lines inducibly expressing different PPAR isoforms. *Nuclear receptors* 3:3. (2005).
- Takebayashi, K., Aso, Y., Inukai, T. Role of bile acid sequestrants in the treatment of type 2 diabetes. *World Journal of Diabetes* 15: 146-152. (2010).
- Tanaka, T., Masuzaki, H., Ebihara, K., Ogawa, Y., Yasue, S., Yokioka, H., Chusho, H., Miyanaga, F., Miyazawa, T., Fujimoto, M., Kusakabe, T., Kobayashi, N., Hayashi, T., Hosoda, K., Nakao, K. Transgenic expression of mutant peroxisome proliferator-activated receptor γ in liver precipitates fasting-induced steatosis but protects against high-fat diet-induced steatosis in mice. *Metabolism Clinical and Experimental* 54: 1490-1498. (2005).
- Taniguchi, M., Takahashi, K., Saito, K., Tomita, M., Choi-Miura, N.-H., Kawamata, S. and Yoda-Murakami, M. (2002). Change in Expression of GBP28/Adiponectin in Carbon Tetrachloride-Administered Mouse Liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285: 372–377. (2002).
- Tatsoulis, A., Mantzris, M.D., Bellou, S., Andrikoula, M. Insulin resistance: An adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment — An evolutionary perspective. *Metabolism Clinical and Experimental* 62: 622-633. (2013).
- Thomas, P., Trevor, G.S. (2004). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51:187–200. (2004).

- Tran, T.T., Pease, A., Wood, A.J., Zajac, J.D., MArtensson, J., Bellomo R., Ekinci, E.I. Review of Evidence for Adult Diabetic Ketoacidosis Management Protocols. *Front Endocrinol* 8:106. (2017)
- Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 184: 285–93. (2005)
- VanSaun, M. N., In, K. L., Washington, M. K., Matrisian, L., and Gordon, D. L. High fat diet induced hepatic steatosis establishes a permissive microenvironment for colorectal metastases and promotes primary dysplasia in a murine model. *American Journal of Pathology* 175(1): 355–364. (2009).
- Wang, F., Carabino, J.M., Vergara, C.M. Insulin Glargine: A systematic review of a long-acting insulin analoge. *Clinical Therapeutics* 25: 1541-1577 (2003).
- Williams, L. M., Campbell, F. M., Drew, J. E., Koch, C., Hoggard, N., Rees, W. D. and Tups, A. The development of diet-induced obesity and glucose intolerance in C57Bl/6 mice on a high-fat diet consists of distinct phases. *PLoS ONE* 9(8). (2014).
- Winzel, M.S., Ahrén, B. The high-fat dietfed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53:215–219. (2004)
- Wooddell, C., Reppen, T., Wolff, J.A. and Herweijer,H. Sustained liver-specific transgene expression from the albumin promoter in mice following hydrodynamic plasmid DNA delivery. *J Gene Med* 10: 551–563. (2008)
- Wooten, J. S., Nick, T. N., Seija, A., Poole, K. E., and Stout, K. B. High-Fructose Intake Impairs the Hepatic Hypolipidemic Effects of a High-Fat Fish-Oil Diet in C57BL/6 Mice. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 6(4) 265–274. (2016).
- Yang, B., Brown, K.K., Chen, L., Carrick, K.M., Clifton, L.G., McNulty, J.A., Winegar, D.A., Strum, J.C., Stimpson, S.A., Pahal, G.L. Serum adiponectin as a biomarker for in vivo PPAR γ activation and PPAR γ agonist-induced efficacy on insulin sensitization/lipid lowering in rats. *BMC Pharmacology* 4:23-32. (2004).
- Yu, Q., Takahashi, T., Nomura, M., and Kobayashi, S. Anti-Hyperglycemic Effect of Single Administered Gardeniae Fructus in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice by Improving Insulin Resistance and Enhancing Glucose Uptake in Skeletal Muscle. *Chinese Medicine* 04: 157–165. (2013).
- Yu, S., Matsusue, P., Kashireddy, P., Cao, W.Q., Yeldandi, V., Yeldani, A.V., Rao, M.S., Gonzalez, F.J., Reddy, J.K. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to Peroxisome Proliferator-activated receptor γ 1 (PPAR γ 1) overexpression. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 498-505. (2003).
- Zayed, E.A., AinShoka, A., El Shazly, K. and Abd El Latif, H.A. Improvement of insulin resistance via increase of GLUT4 and PPAR γ in metabolic syndrome-induced rats treated with omega-3 fatty acid or l-carnitine. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 32(11). (2018).
- Zhang Y, Zhan RX, Chen JQ, Gao Y, Chen L, Kong Y, Zhong XJ, Liu MQ, Chu JJ, Yan GQ, Li T, He M and Huang QR. Pharmacological activation of

PPAR gamma ameliorates vascular endothelial insulin resistance *via* a non-canonical PPAR gamma-dependent nuclear factor-kappa B trans-repression pathway. *European Journal of Pharmacology* 5: 41-51. (2015)

Zhang, G., Budker, V. and Wolff, J.A. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 10: 1735–1737. (1999).

Zhang, G., Gao, X., Song, Y.K., Vollmer, R., Stolz, D.B., GAsiorowski, J.Z., Dean, D.A., Liu, D. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery *Gene Ther.* 11: 675–682. (2004).

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Sonia Montero Molina

Candidato para el Grado de

Doctora en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: EXPRESIÓN INDUCIBLE DE hPPAR γ EN EL HÍGADO DE RATONES C57BL/6 CON DIABETES *MELLITUS* TIPO 2

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacido en La Rinconada, Sevilla, España, el 23 de Octubre de 1991, hija de Felipe Montero Alfonso e Ignacia Molina Venegas.

Educación: Egresado de la Universidad de Sevilla, grado obtenido Biología en 2013, primer lugar en la generación. Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. (Febrero 2016).