

# UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímica y Biotecnológicas

Escuela Profesional Ingeniería Biotecnológica



“Influencia de la dieta rica en grasas en la expresión de enzimas de las vías metabólicas del triptófano en animales de experimentación”

Tesis presentada por la bachiller:  
MARIA PIA SOTO RODRIGUEZ

Para obtener el título profesional de:  
INGENIERO BIOTECNOLOGO

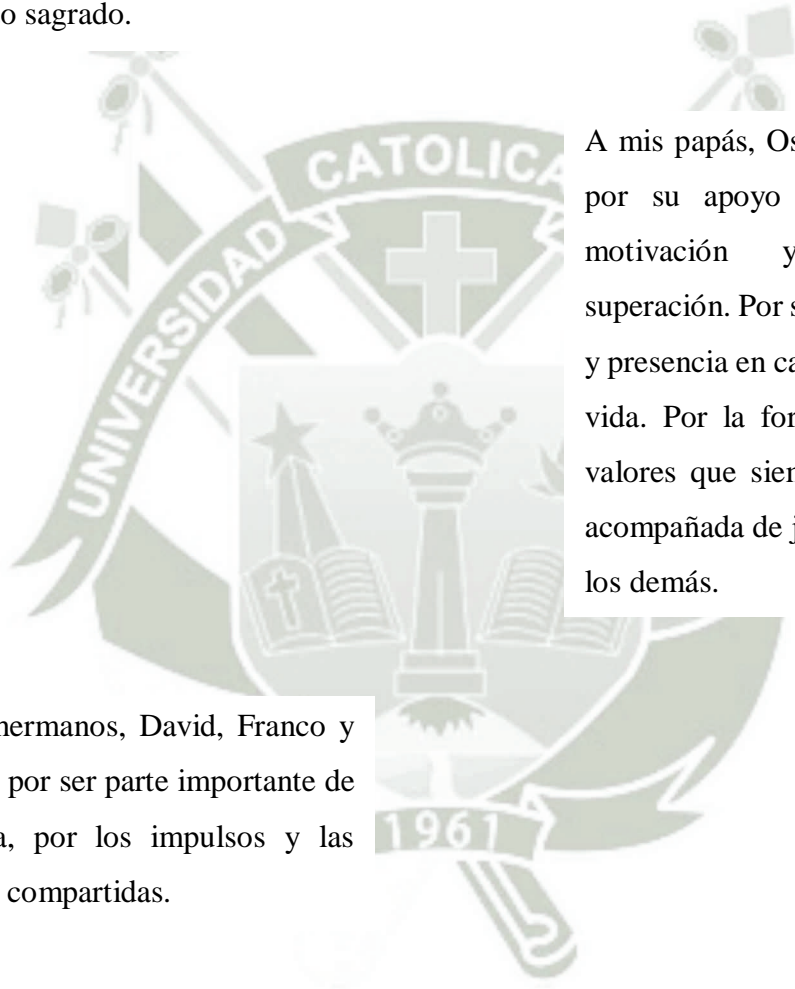
Asesor:  
SOPHIE LESTAVEL, PhD  
JOSE VILLANUEVA SALAS, PhD

LILLE – FRANCIA / AREQUIPA - PERU

2016

## Dedicatoria

A Dios, que guía siempre mis pasos  
y me da la oportunidad de hacer las  
cosas hoy mejor que ayer. Y a la  
Virgen, por cubrirme siempre con  
su manto sagrado.



A mis papás, Oscar y María Ynés,  
por su apoyo incondicional, su  
motivación y ejemplo de  
superación. Por su amistad, su amor  
y presencia en cada momento de mi  
vida. Por la formación basada en  
valores que siempre nos inculcan,  
acompañada de justicia y servicio a  
los demás.

A mis hermanos, David, Franco y  
Renato, por ser parte importante de  
mi vida, por los impulsos y las  
alegrías compartidas.

## Resumen

El triptófano, un aminoácido esencial, es utilizado tanto para la síntesis proteica como metabolizado mediante la vía serotonina y vía de las quinureninas. La vía de las quinureninas es la vía principal de degradación del triptófano y genera varios metabolitos llamados en conjunto quinureninas. La expresión de las enzimas participantes en la vía metabólica de las quinureninas, es estimulada principalmente por la inflamación; por lo que la síntesis de éstos metabolitos, es susceptible de estar incrementada en individuos con obesidad, ya que esta última está caracterizada por la inflamación del tejido adiposo, lo que libera muchos mediadores inflamatorios, que contribuyen a la aparición de la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo 2.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión de enzimas de las dos principales vías metabólicas del triptófano, es decir, vía de la serotonina y vía de las quinureninas, observando en dicha expresión la influencia que puede ejercer un régimen alimenticio rico en grasas frente a una dieta a base de cereales. Dicho estudio fue realizado a partir de las células enterocromafinas del duodeno de ratón.

En este estudio se mostró que existe una diferencia no significativa en la expresión de las enzimas analizadas, con tendencia a disminuir en la vía de las quinureninas y a aumentar en la vía de la serotonina, en los protocolos alimentados con dieta rica en grasas sobre la dieta de cereales.

*Palabras clave: Triptófano, serotonina, quinureninas, dieta rica en grasas, dieta a base de cereales.*

## Abstract

Tryptophan, an essential amino acid, is either used in protein synthesis or metabolized via the serotonin or the kynurenine pathway. The kynurenine pathway is the main route of tryptophan degradation. It collectively generates several metabolites called kynurenines. The expression of the kynurenine pathway enzymes is stimulated mainly by inflammation; so the synthesis of these metabolites is likely to be increased in obese individuals, in so much as the obesity is characterized by the inflammation of the adipose tissue, which releases many inflammatory mediators, that contribute to the start of insulin resistance and type 2 diabetes.

The aim of this study was to analyze the expression of enzymes of the two main metabolic pathways of tryptophan, that is to say, the serotonin and kynurenine pathways; observing in this expression, the influence it can produce a high fat diet versus a chow diet. The study was performed in enterochromaffin cells of the mice duodenum.

In this study, we have shown that there is a no significant difference in the expression of the enzymes analyzed, but this expression represents a tendency to decrease in the kynurenine pathway and a tendency to increase in the serotonin pathway, in mice fed with a high fat diet against the chow diet.

*Key words: Tryptophan, serotonin, kynurenine, high fat diet, chow diet.*

# Índice

CAPITULO I .....	16
1.1. Introducción .....	16
1.2. Objetivos.....	17
1.3. Hipótesis .....	18
CAPITULO II.....	19
2. Marco Teórico .....	19
2.1. El intestino y su rol endocrino .....	19
2.1.1. Células enteroendocrinas .....	20
2.2. El metabolismo del triptófano .....	21
2.2.1. Generalidades .....	21
2.2.2. Metabolización del triptófano a través de la vía de las quinureninas .....	23
A. Enzimas participantes en la vía de las quinureninas .....	24
i. IDO1, IDO2 y TDO .....	25
ii. KMO y KYNU .....	26
iii. KATs (quinureninas amino transferasas) .....	26
iv. QPRT y ACMSD.....	27
2.2.3. Metabolización del triptófano a través de la vía de la serotonina .....	27
2.3. El triptófano y las enfermedades metabólicas .....	28
2.3.1. Resistencia a la insulina, obesidad y diabetes .....	29
2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	30
2.4.1. Fundamento de la PCR punto final.....	30
2.4.2. Etapas de la PCR .....	31
A. Desnaturalización .....	31

B. Hibridación .....	31
C. Extensión .....	31
2.4.3. Detección de productos.....	32
2.4.4. PCR en tiempo real (qPCR) .....	33
CAPITULO III .....	36
3. Materiales y Métodos.....	36
3.1. Lugar de ejecución.....	36
3.1.1. Ubicación .....	36
3.1.2. Actividades que realiza la Unidad (U1011) .....	36
3.1.3. Aspectos técnicos .....	36
A. Ubicación Geográfica.....	36
B. Plano de Ubicación.....	37
3.1.4. Área.....	38
A. Funciones del área.....	38
3.2. Material experimental .....	39
3.2.1. Material biológico.....	39
3.2.2. Reactivos .....	39
3.2.3. Material de vidrio .....	39
3.2.4. Material de plástico.....	39
3.2.5. Kits.....	39
3.2.6. Equipos.....	39
3.3. Metodología.....	40
3.3.1. Protocolos animales .....	40
3.3.2. Diseño de los oligonucleótidos.....	40
A. Eficiencia por qPCR.....	40
B. Electroforesis .....	41

3.3.3. Análisis transcripcional.....	41
A. Extracción y dosaje de ARN.....	41
B. Tratamiento DNasa y Retro-transcripción.....	42
C. PCR cuantitativa (qPCR).....	42
3.3.4. Análisis estadístico .....	43
CAPITULO IV .....	44
4. Resultados y Discusión .....	44
4.1. Validación de los oligonucleótidos diseñados para los genes de interés .....	44
4.1.1. Eficiencia por qPCR .....	44
4.1.2. Electroforesis en gel.....	51
4.2. Dosaje de ARN.....	52
4.2.1. Concentración y pureza.....	52
4.3. Expresión de los genes de las enzimas participantes en las vías metabólicas del triptófano.....	54
4.3.1. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) 55	
4.3.2. Variación de la expresión de las enzimas entre una dieta basada en cereales (chow diet, CD) y una dieta rica en grasas (high fat diet, HFD) .....	56
Conclusiones.....	66
Referencias Bibliográficas .....	68
Anexos.....	73

## Índice de Figuras

Figura 1. Estructura del intestino delgado.....	19
Figura 2. Perfil de expresión de diferentes péptidos intestinales a lo largo del tracto gastrointestinal.....	21
Figura 3. Metabolitos producidos por la metabolización del triptófano. ....	22
Figura 4. Vías metabólicas del triptófano. ....	23
Figura 5. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (A) ADN a temperatura ambiente. (B) Desnaturalización. (C) Hibridación. (D) Extensión.....	32
Figura 6. Resultado de corrida electroforética en gel de agarosa, mostrando amplicones de 574 pb.....	33
Figura 7. Emisión de fluorescencia del SYBR Green.....	34
Figura 8. Eficiencia de oligonucleótidos para el gen <i>Ido1</i> sobre el protocolo 43 (RT realizada en mayo 2010) (A) Consolidado de resultados. (B) Curva de amplificación. (C) Curva de disociación. (D) Curva estándar, eficiencia de 112,4%. <i>Ido1</i> ; indoleamina 2,3-dioxigenasa.....	48
Figura 9. Eficiencia de oligonucleótidos para el gen <i>Kynu</i> sobre el protocolo 43 (RT realizada en mayo 2010) (A) Consolidado de resultados. (B) Curva de amplificación. (C) Curva de disociación. (D) Curva estándar, eficiencia de 92,0%. <i>Kynu</i> ; quinureninasa. ....	49
Figura 10. Eficiencia de oligonucleótidos para el gen <i>Tph1</i> sobre el protocolo 43 (RT realizada en mayo 2010) (A) Consolidado de resultados. (B) Curva de amplificación. (C) Curva de disociación. (D) Curva estándar, eficiencia de 117,1%. <i>Tph1</i> ; triptófano 2,3-dioxigenasa.....	50
Figura 11. Amplicones obtenidos por electroforesis horizontal (gel de agarosa 2%, marcador de peso molecular de 100 pb, 110 V) para genes participantes en las vías metabólicas del triptófano. A) Enzima <i>Ido1</i> B) Enzima <i>Kynu</i> C) Enzima <i>Tph1</i> .....	52
Figura 12. Amplificación por qPCR de los genes de control Actina y Ciclofilina en el protocolo 43 (RT 2010). (A) Curva de amplificación de Actina. (B) Curva de disociación de	

Actina. (C) Curva de amplificación de Ciclofilina. (D) Curva de disociación de Ciclofilina. ....	58
Figura 13. Amplificación por qPCR de los genes de interés Ido1, Kynu y Tph1 en el protocolo 43 (RT 2010). (A) Curva de amplificación de Ido1. (B) Curva de disociación de Ido1. (C) Curva de amplificación de Kynu. (D) Curva de disociación de Kynu. (E) Curva de amplificación de Tph1. (F) Curva de disociación de Tph1. ....	59
Figura 14. Amplificación por qPCR de los genes de control Actina y Ciclofilina en el protocolo 43 (RT 2016). (A) Curva de amplificación de Actina. (B) Curva de disociación de Actina. (C) Curva de amplificación de Ciclofilina. (D) Curva de disociación de Ciclofilina. ....	60
Figura 15. Amplificación por qPCR de los genes de interés Ido1, Kynu y Tph1 en el protocolo 43 (RT 2016). (A) Curva de amplificación de Ido1. (B) Curva de disociación de Ido1. (C) Curva de amplificación de Kynu. (D) Curva de disociación de Kynu. (E) Curva de amplificación de Tph1. (F) Curva de disociación de Tph1. ....	61
Figura 16. Amplificación por qPCR de los genes de control Actina y Ciclofilina en el protocolo 86 (RT 2016). (A) Curva de amplificación de Actina. (B) Curva de disociación de Actina. (C) Curva de amplificación de Ciclofilina. (D) Curva de disociación de Ciclofilina. ....	62
Figura 17. Amplificación por qPCR de los genes de interés Ido1, Kynu y Tph1 en el protocolo 86 (RT 2016). (A) Curva de amplificación de Ido1. (B) Curva de disociación de Ido1. (C) Curva de amplificación de Kynu. (D) Curva de disociación de Kynu. (E) Curva de amplificación de Tph1. (F) Curva de disociación de Tph1. ....	63
Figura 18. Expresión del ARNm de las enzimas Ido1, Kynu y Tph1 en un régimen CD y HFD, en el protocolo 43, trabajando con RT realizada en mayo 2010 (gráficos superiores) y RT actual (gráficos inferiores). Los resultados son expresados como media y desviación estándar. La prueba T-student fue realizada para el análisis estadístico (*P<0.05, **P<0.01). Ido1, indoleamina 2,3-dioxigenasa 1; Kynu, quinureninasa; Tph1, triptófano 2,3-dioxigenasa 1. ....	64
Figura 19. Expresión del ARNm de las enzimas Ido 1, Kynu y Tph1 en un régimen CD y HFD, en el protocolo 86, RT actual. Los resultados son expresados como media y desviación estándar. La prueba T-student fue realizada para el análisis estadístico (*P<0.05, **P<0.01).	

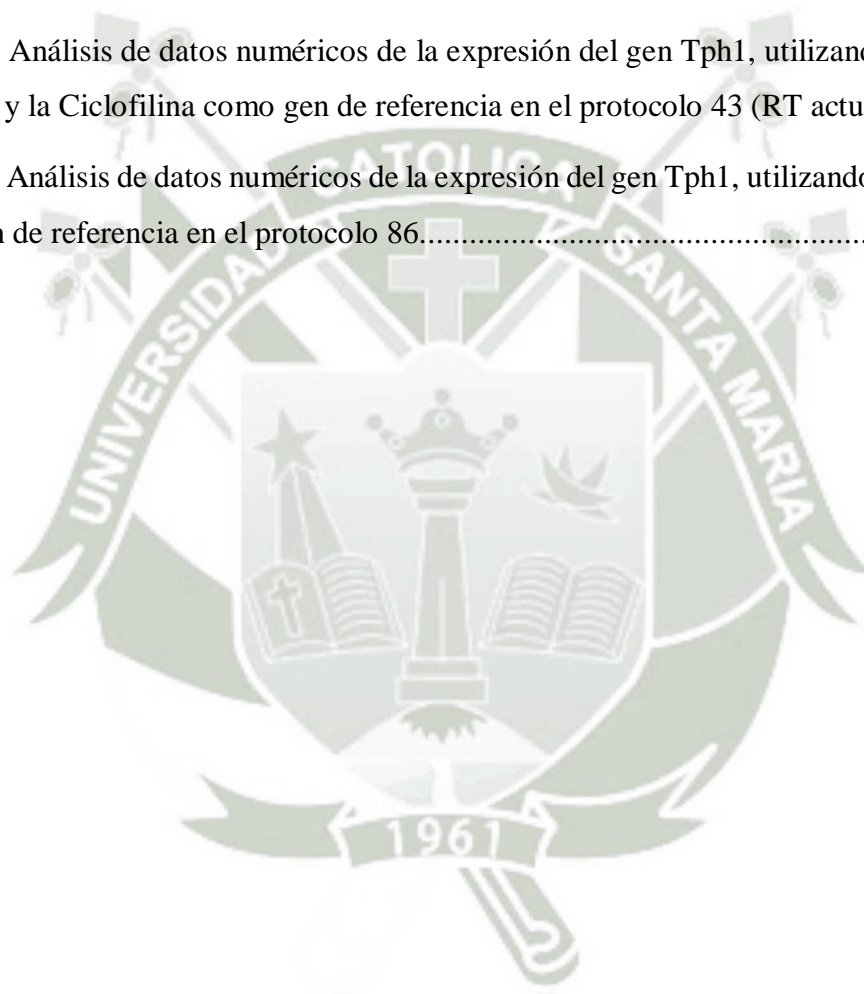
Ido1, indoleamina 2,3-dioxigenasa 1; Kynu, quinureninasa; Tph1, triptófano 2,3-dioxigenasa 1..... 64



## Índice de Tablas

Tabla 1. Genes de referencia utilizados para normalizar la expresión de los genes de interés. .....	43
Tabla 2. Diseño de oligonucleótidos para las enzimas elegidas a través de Primer3, mostrando su secuencia, longitud, temperatura de hibridación (T <sub>m</sub> ), porcentaje de GC (%GC) y posibilidad de formar horquillas (Hairpin).....	46
Tabla 3. Rediseño de los oligonucleótidos para las enzimas restantes, mostrando su secuencia, longitud, temperatura de hibridación (T <sub>m</sub> ), porcentaje de GC (%GC) y posibilidad de formar horquillas (Hairpin).....	47
Tabla 4. Eficiencias de los oligonucleótidos por qPCR.....	51
Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos para el análisis de los genes de las enzimas elegidas. .....	51
Tabla 6. Dosaje de ARN Protocolo 43 (RT realizada en mayo 2010), donde se muestra la concentración (ng/μL), absorbancias a 260 y 280, índice de contaminación por proteínas (260/280), índice de contaminación por sales (260/230).....	53
Tabla 7. Dosaje de ARN Protocolo 43 (RT realizada en enero 2016), donde se muestra la concentración (ng/μL), absorbancias a 260 y 280, índice de contaminación por proteínas (260/280), índice de contaminación por sales (260/230).....	53
Tabla 8. Dosaje de ARN Protocolo 86 (RT realizada en febrero 2016), donde se muestra la concentración (ng/μL), absorbancias a 260 y 280, índice de contaminación por proteínas (260/280), índice de contaminación por sales (260/230).....	54
Tabla 9. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Ido1, utilizando la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 43 (RT mayo 2010).....	75
Tabla 10. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Ido1, utilizando la media de la Actina y la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 43 (RT actual).....	76
Tabla 11. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Ido1, utilizando la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 86.....	77

Tabla 12. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Kynu, utilizando la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 43 (RT mayo 2010). .....	78
Tabla 13. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Kynu, utilizando la media de la Actina y la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 43 (RT actual) .....	79
Tabla 14. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Kynu, utilizando la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 86.....	80
Tabla 15. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Tph1, utilizando la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 43 (RT mayo 2010). .....	81
Tabla 16. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Tph1, utilizando la media de la Actina y la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 43 (RT actual). .....	82
Tabla 17. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Tph1, utilizando la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 86.....	83



## Abreviaturas

3-OHAA: ácido 3-hidroxiantranílico

3-OHK: 3-hidroxiquinurenina

5-HIAL: 5-hidroxi indol acetaldehído

5-HT: 5-hidroxitriptofano (serotonina)

5-HTOL: 5-hidroxitriptofol

AADAT: aminoadipata aminotransferasa (KAT2: quinurenina aminotransferasa 2)

AADC: L-aminoácido aromática descarboxilasa

AANAT: serotonina N-acetil transferasa

ACMSD: 2-amino-3-carboximuconato semialdehído descarboxilasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: AND complementario

AFMID: arilformamidasa

ALDH: aldehído deshidrogenasa

ALDR: aldehído reductasa

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: adenosín trifosfato

BET: bromuro de etidio

CCBL1: cisteína beta conjugada liasa 1 (KAT1: quinurenina aminotransferasa 1)

CCBL2: cisteína beta conjugada liasa 2 (KAT3: quinurenina aminotransferasa 3)

CD: *chow diet* (dieta a base de cereales)

Células EC: células enterocromafinas

Células EE: células enteroendocrinas

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

HAAO: 3-hidroxiantralinato 3,4-dioxigenasa

HFD: *high fat diet* (dieta rica en grasa)

HIOMT: hidroxindol O-metiltransferasa

IBS: síndrome del intestino irritable

IDO1: indoleamina 2,3-dioxigenasa 1

IDO2: indoleamina 2,3-dioxigenasa 2

IFN- $\gamma$ : interferón gamma

IR: resistencia a la insulina

KMO: quinurenina 3-monooxigenasa

KP: vía de las quinureninas

KYN: quinurenina

KYNA: ácido quinurénico

KYNU: quinureninasa

MAO: monoamina oxidasa

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido

NKF: N-formilquinurenina

OMS: organización mundial de la salud

P5P: piridoxal 5-fosfato

PBS: buffer fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

QA: ácido quinurénico

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

QPRT: quinolinato fosforibosil transferasa

RT: retro-transcripción

SNC: sistema nervioso central

TDO2: triptófano 2,3-dioxigenasa

TPH1: triptófano hidroxilasa 1

TPH2: triptófano hidroxilasa 2

TRP: triptófano

XA: ácido xanturénico



# CAPITULO I

## 1.1. Introducción

El triptófano, un aminoácido esencial requerido en la ingesta de alimentos para una buena nutrición, es utilizado para síntesis proteica e igualmente es metabolizado por el organismo a través de dos rutas mayores: la vía de la serotonina y vía de las quinureninas, así como también externamente es degradado bacteriológicamente. Este aminoácido es conocido por ser un precursor biosintético de numerosos componentes entre los cuales los de mayor importancia son la serotonina, que actúa como un neurotransmisor y el ácido nicotínico, precursor de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>).

Por otro lado, la generación de metabolitos llamados quinureninas es estimulada principalmente por la inflamación e infección, por lo que se la asocia y se encuentra directamente influenciada con la obesidad y diabetes tipo 2, desórdenes que van de la mano con la depresión; inicialmente se creía que los síntomas depresivos se daban por el agotamiento de la serotonina en el cerebro, sin embargo, estudios nos sugieren que un desequilibrio entre los metabolitos neurotóxicos y neuroprotectores de la vía de las quinureninas puede ser el motor principal de la depresión.

Por tanto, la expresión de las enzimas participantes en éstas vías metabólicas y el rol biológico de los metabolitos generados, despierta cierto interés, ya que probablemente estén envueltos en la patogénesis de numerosos desórdenes gastrointestinales, trastornos neurológicos y otras enfermedades crónicas como la obesidad y la diabetes.

## 1.2. Objetivos

### General

Observar la influencia de la dieta rica en grasas en la expresión de enzimas participantes en la metabolización del triptófano en animales de experimentación.

### Específicos

- Diseñar oligonucleótidos específicos para las enzimas participantes en las dos vías metabólicas del triptófano; es decir, tanto para la vía de las quinureninas como de la serotonina.
- Analizar la eficiencia de los oligonucleótidos diseñados, a través de una qPCR y posteriormente una electroforesis.
- Extraer el ARN a partir del duodeno de dos diferentes fondos genéticos murinos y realizar su respectivo análisis.
- Realizar un tratamiento de DNAsa y posteriormente la retro-transcripción del ARN.
- Evaluar la expresión del gen *Ido1* empleando qPCR, en los dos regímenes alimenticios (dieta a base de cereales y dieta rica en grasas).
- Evaluar la expresión del gen *Kynu* empleando qPCR, en los dos regímenes alimenticios (dieta a base de cereales y dieta rica en grasas).
- Evaluar la expresión del gen *Tph1* empleando qPCR, en los dos regímenes alimenticios (dieta a base de cereales y dieta rica en grasas).

### 1.3. Hipótesis

Dado que una dieta rica en grasas es causa directa de obesidad y ésta se encuentra caracterizada por la inflamación del tejido adiposo, es probable que la expresión de las enzimas participantes en la metabolización del triptófano se vea influenciada en una dieta rica en grasas.



## CAPITULO II

### 2. Marco Teórico

#### 2.1. El intestino y su rol endocrino

El aparato digestivo es un conjunto de órganos que se extienden desde la boca hasta el ano, permitiendo llevar a cabo la ingesta de alimentos, la digestión y posteriormente la absorción de nutrientes y evacuación de sales. El tracto digestivo comprende la boca, el esófago, el estómago, el intestino (dividido en duodeno, yeyuno e ileón) colon, recto y ano. En el hombre, el intestino mide aproximadamente 6 m de largo por 2 cm de diámetro<sup>1-3</sup> y se divide en 3 partes: duodeno (25 cm), yeyuno (2,5 m) e ileón (3,5 m)<sup>3</sup> (Figura 1) En el fondo genético murino C57BL/6 el intestino mide entre 35 y 45 cm.<sup>4</sup>

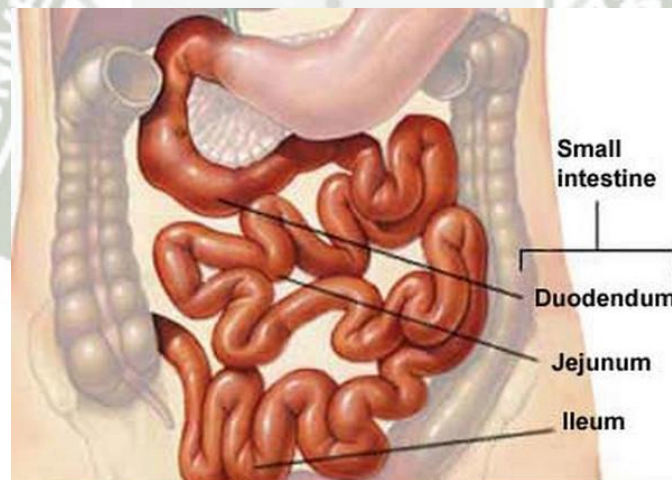


Figura 1. Estructura del intestino delgado.

*Fuente: Small bowel diseases. Laparoscopyindia. Disponible en: <http://www.laparoscopyindia.com/diseases/abdominal-diseases/small-bowel-diseases-2/>*

El intestino es reconocido como un órgano metabólico mayor capaz de sentir la calidad y cantidad de los alimentos y de emitir señales mecánicas, nerviosas y hormonales para regular la ingesta de alimentos. El epitelio intestinal está compuesto por diferentes

tipos celulares y posee varias funciones: absorción de nutrientes, formación de una barrera protectora contra los patógenos, así como importantes funciones de secreción endocrina y exocrina. La mayor parte de absorción de nutrientes se lleva a cabo en el intestino, a través de diferentes estructuras de absorción presentes en la superficie de dicho órgano, de las cuales las más importantes pertenecen a una población celular específica: las células enteroendocrinas.<sup>5</sup> La presencia de microvellosidades al contacto con la luz intestinal en las células enteroendocrinas, sugiere que estas células captan directamente los nutrientes, sin embargo, señales mecánicas, químicas, hormonales o nerviosas participan igualmente en la regulación de la actividad secretora de células enteroendocrinas. Las diferentes hormonas secretadas regulan las funciones digestivas, la homeostasia energética y la ingesta de alimentos.<sup>2</sup>

### 2.1.1. Células enteroendocrinas

El tracto gastrointestinal es conocido por ser hospedero de una gran variedad de células enteroendocrinas (EE) que colectivamente constituyen el tejido endocrino más largo del cuerpo. El estudio de los roles que cumplen estas células en la regulación del metabolismo se ha convertido en un área clave de la investigación. Dentro de estas células, las más comunes son las enterocromafinas (EC) y representan aproximadamente la mitad del total de las células EE.<sup>5</sup>

Se ha podido distinguir 11 subtipos dentro de las células enteroendocrinas<sup>6</sup> que muestran diferentes gradientes de expresión a lo largo del tracto intestinal. (Figura 2). Las células enteroendocrinas de tipo EC (enterocromafinas, llamadas así por su capacidad de fijar sales de cromo) son las células enteroendocrinas más abundantes del epitelio gastrointestinal, principalmente en el duodeno.<sup>7</sup> Estas células son secretoras de monoaminas, entre ellas la principal es la serotonina, que actúa como un neurotransmisor del sistema entérico y del nervio vago.<sup>8</sup>

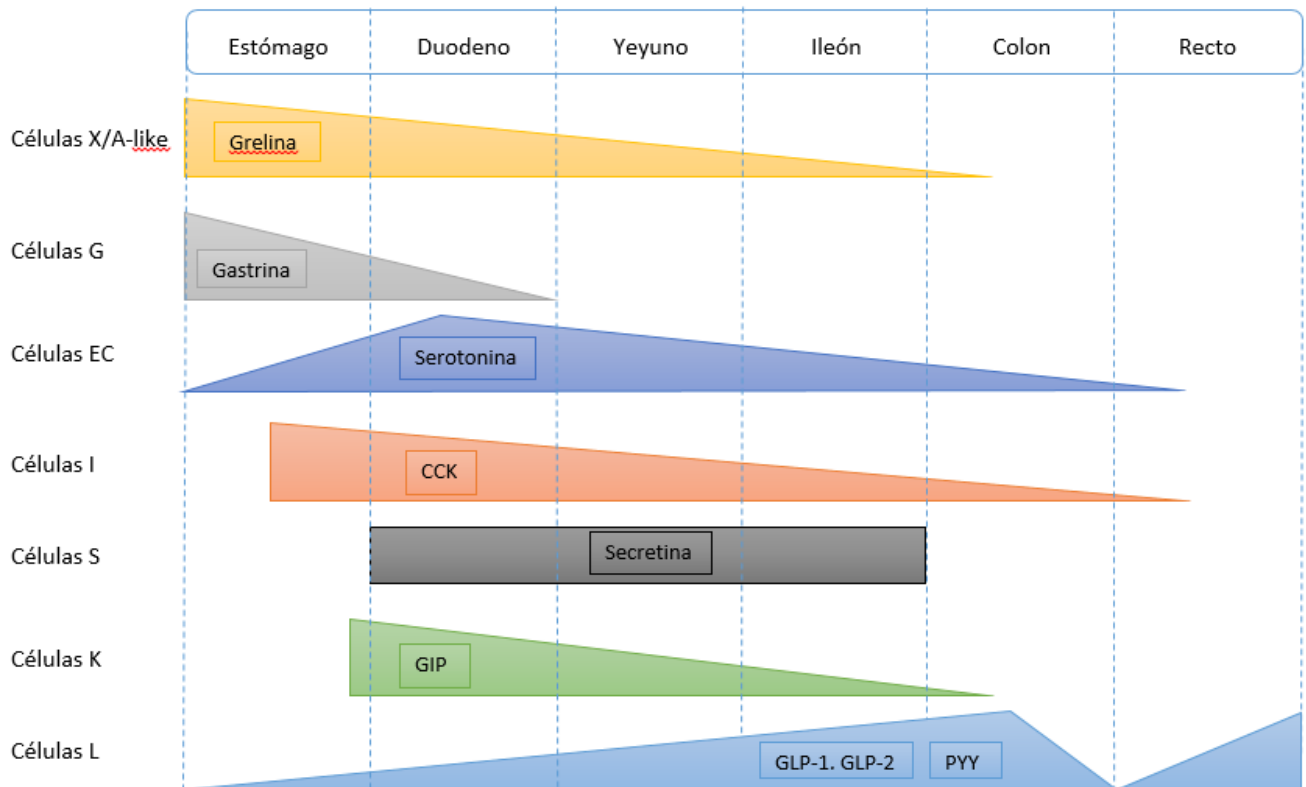


Figura 2. Perfil de expresión de diferentes péptidos intestinales a lo largo del tracto gastrointestinal.

Fuente: Trabelsi MS. *Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells.* [Tesis doctoral]. Francia 2015. <sup>8</sup>

## 2.2. El metabolismo del triptófano

### 2.2.1. Generalidades

El triptófano es un aminoácido esencial y el menos abundante de los aminoácidos requeridos para la síntesis proteica. Un aminoácido esencial es también llamado indispensable y es aquel que el organismo no puede sintetizar y necesita ser ingerido en la dieta diaria. Con respecto al triptófano, según la OMS se recomienda una ingesta de 4 a 5 mg kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. Aproximadamente, el 95% del triptófano es metabolizado por la vía de las quinureninas, mientras que entre el 1 al 5% es transportado hacia la formación de serotonina y melatonina y el resto es empleado para la síntesis proteica.<sup>9</sup> Este aminoácido participa activamente en el proceso fisiológico, en el estado de humor y en la inmunidad.<sup>10</sup>

Una vez dentro del tracto gastrointestinal, el triptófano puede entrar a diferentes vías metabólicas: síntesis proteica, vía de la serotonina, vía de las quinureninas o degradación bacteriana, por lo que es conocido por ser un precursor biosintético de numerosos componentes (Figura 3).

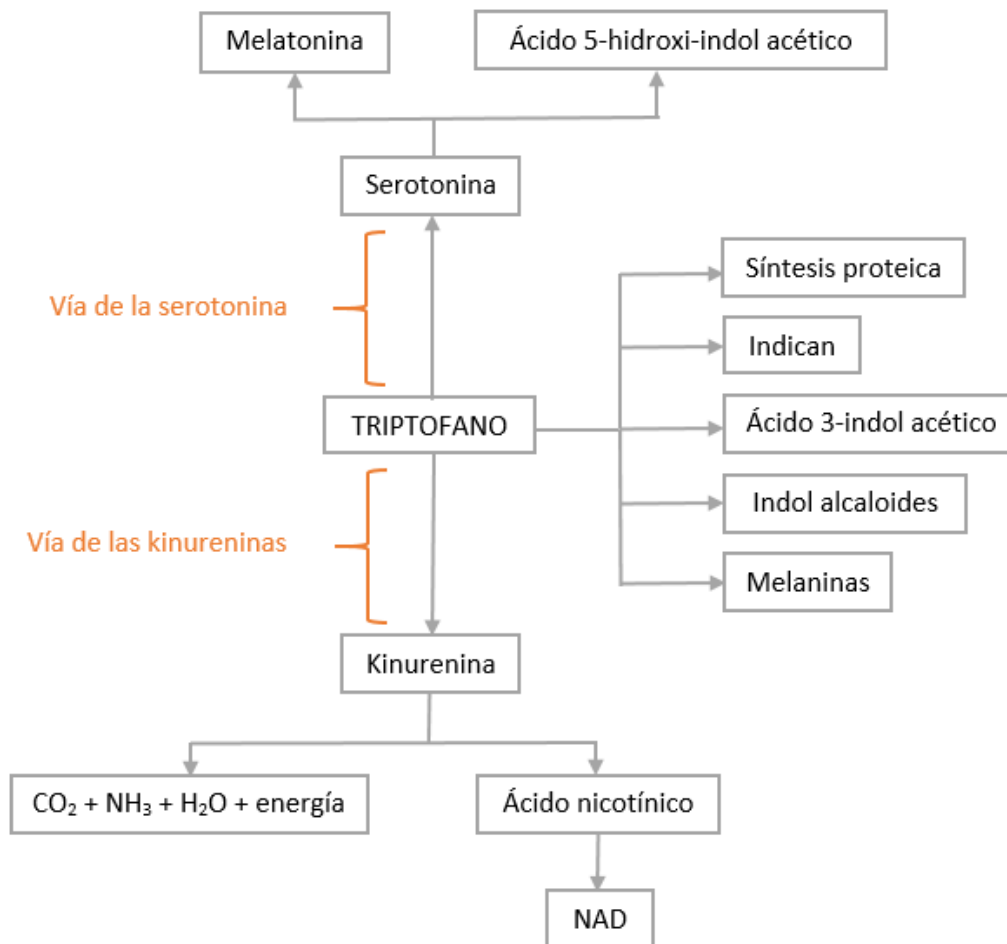


Figura 3. Metabolitos producidos por la metabolización del triptófano.

Gráfico realizado personalmente.

Aproximadamente 1-2% del triptófano es convertido a serotonina que juega un rol importante en la regulación de varias funciones en el cuerpo y además es precursor de la síntesis de melatonina en los pinealocitos. La mayor parte del triptófano, aproximadamente el 95% entra a la vía de las quinureninas (Figura 4), de la cual resulta la producción de  $\text{NAD}^+$  y otros metabolitos como la quinurenina, ácido quinurénico, ácido quinolínico, ácido picolínico, entre otros. Sin embargo, la mayoría del triptófano está metabolizado para producir  $\text{CO}_2$  y ATP a través de la vía del glutamato.<sup>10</sup> Dentro de la degradación bacteriana,

4-6% del triptófano se somete a esta degradación, produciendo indol, indican y otros derivados del ácido indólico y aproximadamente 0.5% del triptófano es excretado sin cambios mediante la orina.

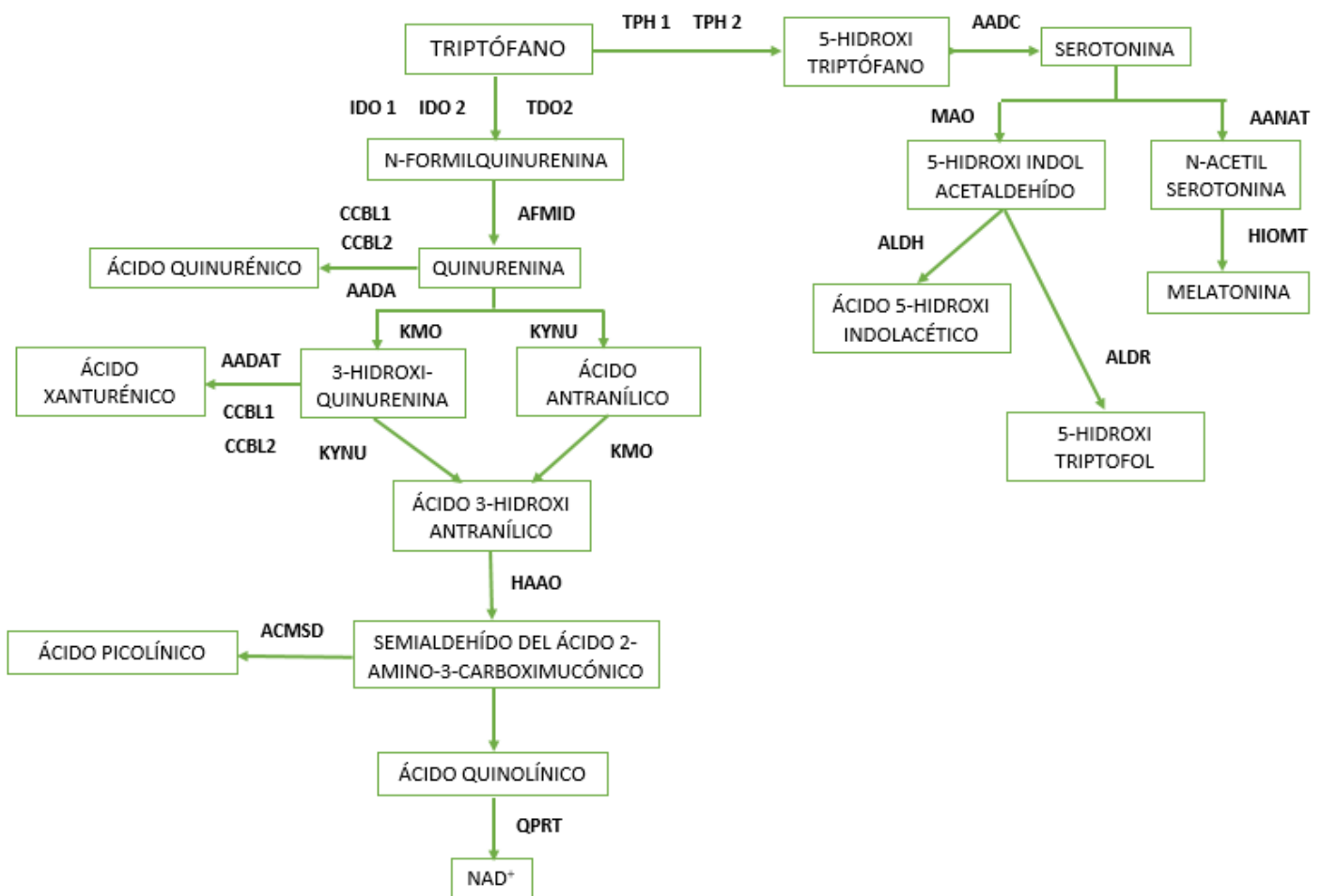


Figura 4. Vías metabólicas del triptófano.

*Gráfico realizado personalmente.*

### 2.2.2. Metabolización del triptófano a través de la vía de las quinureninas

En los adultos, aproximadamente el 95% del triptófano ingerido es metabolizado a través de la vía de las quinureninas, que tiene como principales funciones biológicas la metabolización del exceso de triptófano y la regulación de sus niveles en plasma, el mantenimiento de los niveles de ácido nicotínico, la regulación de la función del SNC y mejora de la función de defensa de los macrófagos. Durante mucho tiempo, esta vía fue

considerada únicamente como vía de síntesis de  $\text{NAD}^+$ ; posteriormente, propiedades neurotóxicas y neuroprotectoras de los metabolitos de ésta fueron demostrados en diferentes estudios. En los años 90, se descubre que la vía de las quinureninas es inducida por el sistema inmunitario, particularmente por el interferón gamma.<sup>9</sup>

IDO1 es la enzima inicial de la vía de las quinureninas (KP), en la que cataliza la oxidación del anillo indol del triptófano dando como producto NKF (N-formilquinurenina), que es convertido a ácido fórmico y posteriormente, por condiciones enzimáticas el producto final estable será la quinurenina. Dependiendo del tipo celular y de los diferentes niveles de expresión de las enzimas de la KP ocurre una cascada de reacciones produciendo diversos metabolitos bioactivos incluyendo ácido quinurénico, ácido antranílico, 3-hidroxiquinurenina (3-OHK), ácido 3-hidroxiantranílico (3-OHAA), ácido picolínico y ácido quinolínico y finalmente  $\text{NAD}^+$  que puede ser después generado a partir de este último.<sup>11</sup>

#### **A. Enzimas participantes en la vía de las quinureninas**

Dentro de ésta vía, el triptófano es oxidado por dos enzimas iniciales, la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) que está ampliamente distribuida en tejidos periféricos o la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) que está casi enteramente localizada en las células hepáticas. Los principales productos de ésta vía son el ácido quinolínico y nicotinamida, mientras que las cadenas laterales generan ácido quinurénico y ácido xanturénico. Las propiedades neurotóxicas y neuroprotectoras de éstos metabolitos han sido asociadas a severas patologías del SNC, por lo que el balance entre actividad pro-inflamatoria, es decir el ácido quinolínico excitotóxico y la anti-inflamatoria, ácido quinurénico neuroprotector podría tener efectos en la función motora y sensorial del intestino.<sup>10</sup>

Las enzimas que degradan el triptófano se encuentran muy activas en las ratas, lo que constituye a este animal como un modelo práctico para poder estudiar el metabolismo de este aminoácido a lo largo de sus vías metabólicas.<sup>12</sup> Estudios realizados han mostrado que la enzima que muestra mayor actividad es la 3-hidroxiantralinato 3,4-dioxigenasa (HAAO) y aquella que presenta menor actividad, la quinureninasa; ambos datos expresados en rata, ratón, conejo y cerdo. Por otro lado se observó que existe una progresiva disminución en la actividad enzimática dependiente de la edad en casi todas las enzimas

participantes, con excepción de la aminocarboximuconato semialdehído descarboxilasa (ACMSD) que por el contrario aumenta su actividad con el paso del tiempo; por tanto, se puede afirmar que el envejecimiento altera el metabolismo del triptófano, lo que conduce a una disminución en la síntesis del ácido nicotínico y por tanto de NAD, situación que puede afectar diferentes vías metabólicas del organismo.<sup>13</sup>

#### *i. IDO1, IDO2 y TDO*

IDO1 es una enzima intracelular que cataliza la conversión del triptófano, a lo largo de la vía de las quinureninas, teniendo como primer producto NFK. Pertenece a una única clase de enzimas dioxigenasas en mamíferos, que incluye también TDO (triptófano 2,3-dioxigenasa) y una isoforma recién descubierta, IDO2. Estas enzimas, a pesar de ser las iniciadoras de la vía de las quinureninas, presentan diferencias significativas entre ellas. A diferencia de IDO1, que es altamente inducida por diferentes estímulos inflamatorios en muchos tipos celulares y tejidos en mamíferos, TDO es principalmente localizada en el hígado y cerebro; en el hígado, se cree que su principal función es como enzima homeostática necesaria para mantener en condiciones normales las concentraciones fisiológicas de triptófano.<sup>14</sup> A pesar de que éstas dos enzimas catalizan la misma reacción dioxigenasa y contienen los mismos sitios activos, sólo el 10% de sus secuencias son idénticas. No sólo difieren en sus secuencias, también en algunas propiedades bioquímicas, por ejemplo, en la especificidad de sustrato, TDO se une principalmente a L-triptófano, 5-fluorotriptófano y 6-fluorotriptófano; por el contrario, IDO1 presenta una especificidad de sustrato más amplia, se une a D- y L-triptófano y a una variedad de indolaminas como la triptamina, 5-hidroxitriptófano, 5-metilriptófano, serotonina y melatonina.<sup>15</sup>

IDO1 es expresada en un amplio rango de tejidos y tipos celulares. La expresión de la proteína en condiciones fisiológicas normales se produce principalmente en los tejidos y subconjuntos de células inmunes de la mucosa. En los roedores, incluye la próstata, el tejido adiposo, la placenta durante el embarazo, el útero durante la fase secretora, los órganos linfoides tales como el timo, la zona marginal del bazo y ciertos ganglios, el tracto gastrointestinal (particularmente el intestino delgado), el SNC, riñón, páncreas, pulmón y en diversas regiones del ojo.<sup>16</sup> Los resultados en humanos indican que la expresión de IDO1 se da en la placenta, el ojo y el páncreas y en ciertos subgrupos de células dendríticas y eosinófilos.<sup>17</sup>

IDO1 no puede provocar sus efectos a menos que el triptófano entre en las células del medio extracelular a través de sistemas de transporte específicos. Por lo tanto, la función biológica de IDO1 depende de la expresión y la actividad del sistema de transporte que es responsable de la entrada de triptófano en las células que la expresan. A pesar de esta relación obligatoria entre IDO1 y el transporte de triptófano, no se ha investigado mucho acerca de estos mecanismos de transporte, las investigaciones se han enfocado más en la expresión de la enzima y en sus productos finales. Sin embargo, se ha demostrado que IFN- $\gamma$  además de ser conocido por inducir la expresión de IDO1, también induce el medio de transporte de triptófano en células epiteliales del colon y en células dendríticas y gracias a este, IDO1 es capaz de agotar el triptófano del medio extracelular para provocar interrupción de las células T y anergia de las mismas.<sup>18,19</sup>

**ii. KMO y KYNU**

Quinurenina monooxigenasa (KMO) y quinureninasa (KYNU) son las enzimas claves para la síntesis de ácido quinolínico y NAD<sup>+</sup> a partir del triptófano. La expresión de ambas es también inducida por citoquinas pro-inflamatorias. KYNU es dependiente del cofactor piridoxal 5-fosfato (P5P), la forma activa de la vitamina B6; por tanto, en caso de deficiencia de esta vitamina, la actividad de KYNU disminuye y se observa entonces una mayor cantidad de 3OHK y de XA que es sintetizado a partir de éste último.<sup>20</sup>

**iii. KATs (quinureninas amino transferasas)**

Estas enzimas catalizan la conversión de quinurenina en ácido quinurénico y de 3OHK en XA. Estas son cisteína beta conjugada liasa 1 (CCBL1) o también llamada quinurenina aminotransferasa 1 (KAT1), amino adipata aminotransferasa (AADAT) o quinurenina aminotransferasa 2 (KAT2) y cisteína beta-conjugada liasa 2 (CCBL2) o quinurenina aminotransferasa 3 (KAT3).<sup>21</sup> Se sabe que tanto el ácido quinurénico como el ácido xanturénico son productos finales de la vía de las quinureninas, sin embargo, estudios han mostrado que el ácido quinolínico es sintetizado a partir del ácido quinurénico, pero la enzima implicada en ésta síntesis aún no ha sido caracterizada.<sup>11</sup>

#### *iv. QPRT y ACMSD*

El 3-OHAA es metabolizado en 2-amino-3-carboximuconato semialdehído (ACMS) por la enzima 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa (HAAO), el cual enseguida puede ser metabolizado en ácido picolínico por la enzima ACMSD o de manera no enzimática en ácido quinolínico, siguiendo éste su metabolización hasta  $\text{NAD}^+$  por la enzima quinolinato fosforibosil transferasa (QPRT).<sup>48</sup>

#### **2.2.3. Metabolización del triptófano a través de la vía de la serotonina**

La serotonina (5-hidroxitriptofano, 5-HT) es una de las moléculas de señalización más importantes dentro del intestino, es un neurotransmisor y hormona implicada en el balance energético y que cumple con diversas funciones biológicas que incluye la modulación de la secreción y motilidad intestinal.<sup>22</sup> Aproximadamente el 95% de la 5-HT del cuerpo humano se encuentra presente en el intestino, del cual 90% es producida por las células enterocromafinas (EC) en la mucosa epitelial del intestino, almacenándose en gránulos de secreción y el 10% restante se atribuye a las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso entérico (ENS).<sup>23</sup>

5-HT es sintetizada a partir del triptófano por hidroxilación y descarboxilación. Estos procesos son catalizados por la triptófano hidroxilasa (TPH) y la aminoácido aromática descarboxilasa (AADC) respectivamente.<sup>24</sup> La expresión de TPH está limitada a ciertos tipos de células como las neuronas, pinealocitos, mastocitos, leucocitos mononucleares, células enterocromafinas intestinales y células epiteliales neuroendocrinas broncopulmonares. Existen 2 isoformas de esta enzima; TPH1 que está presente en células enterocromafinas y en la glándula pineal; mientras que TPH2, en neuronas.<sup>25</sup>

5-HT es metabolizada por diferentes vías metabólicas, pero la mayoría lo hace mediante la monoamina oxidasa (MAO), que se encuentra presente en la mitocondria de una amplia variedad de células y cataliza la desaminación oxidativa de varias aminas biogénicas. El 5-hidroxi indol acetaldehído (5-HIAL), producto de la desaminación oxidativa de la serotonina, puede ser metabolizado a ácido 5-hidroxi indolacético (5-HIAA) o 5-hidroxitriptofol (5-HTOL), resultando el primero el mayor producto en condiciones normales.<sup>22</sup>

La secreción de 5-HT es inducida esencialmente por estímulos mecánicos ligados a la presencia de nutrientes en el tubo digestivo. En las células enterocromafinas es conocida por ser un factor agravante de la inflamación intestinal y juega también un rol importante en el desarrollo óseo. Desequilibrios en los niveles de serotonina en el sistema nervioso e intestino han sido asociados a varios trastornos gastrointestinales, de los cuales el que ha tenido mayor atención y estudio ha sido el síndrome del intestino irritable (IBS) donde pacientes que lo sufren, presentan un aumento en el número de células enterocromafinas y alteración del metabolismo de 5-HT de la mucosa intestinal; por tanto una regulación estricta de los niveles de esta en el tejido nervioso y la mucosa intestinal son necesarias, sabiendo también que su catabolismo desempeña un papel importante en esta regulación.<sup>26</sup>

### **2.3. El triptófano y las enfermedades metabólicas**

Se ha sembrado la pregunta sobre en qué medida el metabolismo del triptófano y de la serotonina pueden estar influenciados por la dieta y cómo esto afecta a la función intestinal. El triptófano, es un aminoácido precursor de una amplia gama de metabolitos envueltos en la nutrición y el metabolismo del organismo. Estudios en las décadas pasadas,<sup>27</sup> se centraron en la serotonina (5-HT), una molécula de señalización que juega un papel importante, no sólo en el SNC, sino también en el intestino; sin embargo, hace algunos años ha despertado mayor interés la otra vía de metabolización del triptófano, la vía de las quinureninas.<sup>23</sup>

Décadas atrás, se ha manejado la dieta para la investigación del sistema serotoninérgico, que ha demostrado estar involucrado en la patogénesis de varios trastornos psiquiátricos, principalmente la depresión y también se conoce que estos trastornos con frecuencia coinciden con trastornos gastrointestinales funcionales y que la serotonina es un mediador entre el cerebro y el intestino, el llamado “eje cerebro-intestino”.<sup>28</sup> Además, la serotonina también tiene un papel fundamental en la regulación del apetito, la saciedad y la ingesta de alimentos.<sup>29</sup> Por otro lado, la vía de las quinureninas (KP) ha surgido en los últimos años como un regulador clave de la producción, tanto de metabolitos neuroprotectores (por ejemplo el ácido quinurénico y ácido picolínico y NAD) como de

neurotóxicos (ácido quinolínico, ácido 3-hidroxiquinurenina). El equilibrio entre la producción de estos dos tipos de metabolitos es controlado por enzimas clave, tales como indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO1), que a la vez es inducida por una señal molecular, el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ); que activa la vía de las quinureninas para el metabolismo de triptófano, en lugar de vías alternativas para la producción de serotonina y melatonina. La desregulación de la KP ha sido fuertemente asociada con enfermedades neurológicas en los últimos años, por lo que se viene estudiando cómo estos metabolitos son causantes de diversas patologías y a la vez se busca el desarrollo de fármacos a utilizar como inhibidores de enzimas de ésta vía, es decir bloquear la producción de neurotóxicos y tener una mayor biodisponibilidad de neuroprotectores.<sup>30</sup>

### **2.3.1. Resistencia a la insulina, obesidad y diabetes**

La resistencia a la insulina (IR) se ve en enfermedades como la diabetes, obesidad, hipertensión y trastornos psicológicos como la depresión. La primera parte de la vía de las quinureninas (TRP – KYN) es llevada a cabo por enzimas inducidas por factores pro-inflamatorios (interferón gamma, factor de necrosis tumoral, IL-1 y lipopolisacáridos) u hormonas de estrés (cortisol, estrógenos, prolactina); mientras que las enzimas encargadas de la segunda parte (KYN – NAD), necesitan como cofactor piridoxal 5-fosfato (P5P), una forma activa de la vitamina B6. La deficiencia de P5P, desvía la producción de NAD hacia una excesiva formación de ácido xanturénico (XA), metabolito que podría afectar negativamente la producción, liberación y actividad biológica de la insulina.<sup>16</sup>

La baja regulación de la quinureninasa a causa de la deficiencia de P5P, va a desviar el metabolismo del 3-HK hacia la producción de XA, lo que genera una producción reducida de NAD que conduce a la inhibición de la síntesis y la secreción de insulina y la muerte de las células beta pancreáticas.<sup>31</sup> Algunos metabolitos derivados de la vía de las quinureninas se han visto en niveles incrementados o disminuidos en la diabetes; por ejemplo, en pacientes con diabetes tipo 2 se ha observado una mayor excreción de orina de XA y de KYNA, ambos en modelos humanos y animales.<sup>32</sup>

La obesidad representa el mayor riesgo de desarrollar IR y es considerada como una causa independiente de esta. La obesidad está caracterizada por la inflamación del tejido adiposo blanco, que libera muchos mediadores inflamatorios, incluyendo

quinureninas. Tanto en tejido adiposo omental como subcutáneo, la expresión de IDO es mayor en obesidad.<sup>33</sup>

## 2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A tres décadas de su aparición, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar.<sup>34</sup>

Actualmente sabemos que la misión de la PCR es de copiar millones de veces una secuencia específica de ácido nucleico (ADN o ARN) mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas para analizarse con diferentes fines.<sup>34</sup>

Hoy en día, la PCR se aplica en diferentes áreas de ciencias biológicas y de la salud, formando parte del quehacer científico de muchos laboratorios de investigación molecular, que la utilizan principalmente para expresión génica, genotipificación, detección de patógenos, análisis de mutaciones, entre otros.<sup>35</sup>

### 2.4.1. Fundamento de la PCR punto final

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.<sup>35</sup>

Los elementos necesarios para que se lleve a cabo una PCR son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o *primers*, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), ión magnesio ( $Mg^{+}$ ), buffer o solución amortiguadora y  $H_2O$ . Todos estos componentes interactúan en tres etapas

principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, alineamiento o hibridación y extensión. Los equipos donde ésta se realiza son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada ciclo.<sup>34</sup>

#### 2.4.2. Etapas de la PCR

##### A. Desnaturalización

En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos; al final tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso (Figura 5B).

##### B. Hibridación

En esta etapa, los *primers* se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria (Figura 5C). Para que se forme el complejo templado-oligonucleótidos, es importante que la temperatura de hibridación ( $T_m$ ) sea la óptima, generalmente ésta oscila entre 50-60°C.

##### C. Extensión

En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo formado y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; se agrega dNTPs complementarios para crear las cadenas completas de ADN (Figura 5D). La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que ésta es la temperatura a la cual la enzima es funcional.

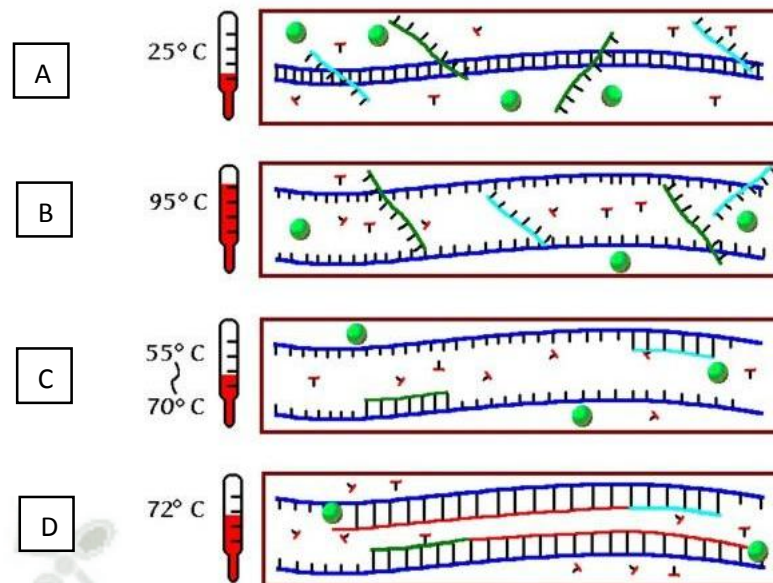


Figura 5. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (A) ADN a temperatura ambiente. (B) Desnaturalización. (C) Hibridación. (D) Extensión.

Fuente: *Reação em cadeia da polimerase. Biología 2009/2010. Disponible en: [http://biologia2009201012ano.blogspot.pe/2010\\_01\\_01\\_archive.html](http://biologia2009201012ano.blogspot.pe/2010_01_01_archive.html)*

### 2.4.3. Detección de productos

Para saber si la reacción fue exitosa, se debe realizar una electroforesis en gel de agarosa, para poder observar los amplicones producidos. La electroforesis consiste en la separación de moléculas a través de una matriz sólida que funciona como un filtro y separa moléculas de acuerdo a su tamaño en un campo eléctrico. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato proporciona la carga negativa; por tanto, en la corrida electroforética migran hacia el polo positivo. Al gel de agarosa, se le agrega bromuro de etidio, molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena; cuando es excitado con luz UV, emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas.<sup>35</sup>

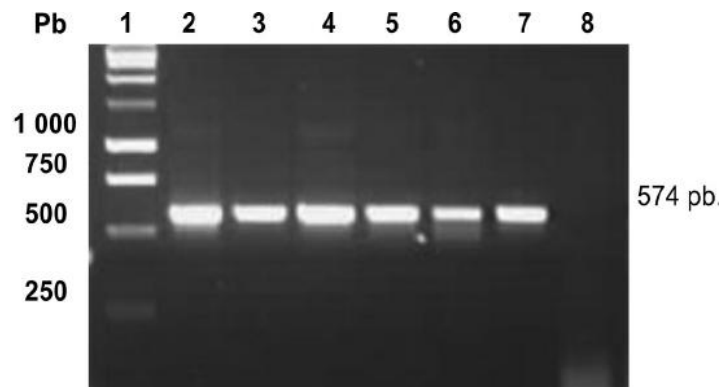


Figura 6. Resultado de corrida electroforética en gel de agarosa, mostrando amplicones de 574 pb.

*Fuente: Reyes O. Mutaciones que confieren resistencia a metronidazol y tetraciclina en Helicobacter pylori, su detección en aislados cubanos. Rev. CENIC. 2011 ; 42(1) : 29-34.*

#### 2.4.4. PCR en tiempo real (qPCR)

Los primeros en sentar las bases para el desarrollo de la PCR en tiempo real fueron Higuchi y sus colaboradores, cuando en 1992 grabaron en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al ADN durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV.<sup>36</sup>

El principio se basa en la PCR convencional, sólo que difiere en la forma cómo se detectan y analizan los productos de amplificación, características que representan grandes ventajas frente a la PCR punto final. La detección de los productos amplificados se da en cada ciclo de la reacción, por lo que la amplificación puede ser monitoreada conforme transcurre la reacción, sin necesidad de un gel de agarosa para saber si la reacción fue exitosa. Además, es posible cuantificar la cantidad de ADN de la muestra.<sup>37</sup> En la PCR cuantitativa, la cantidad de producto amplificado está vinculada a la intensidad de fluorescencia usando una molécula indicadora fluorescente.<sup>38</sup>

Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar ácidos nucleicos; aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Esta metodología está incrementando su uso en la investigación, incluyendo la cuantificación de expresión de genes, perfiles de expresión, análisis de polimorfismo de un solo nucleótido, pruebas de

organismos modificados genéticamente (OMG), monitoreo de la carga viral y otras aplicaciones de detección de patógenos.<sup>38</sup>

Para controlar el progreso de la reacción de amplificación, se utilizan reporteros fluorescentes que se clasifican en específicos y no específicos. Con cada ciclo de amplificación, la intensidad de fluorescencia aumenta proporcionalmente al aumento de la concentración del amplicon.<sup>38</sup> Dentro de los más utilizados por su bajo costo, se encuentra el SYBR Green, que representa el método no específico, el cual se basa en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan la señal fluorescente. El SYBR Green es una molécula cargada positivamente, que cuando se une al surco menor del ADN incrementa su fluorescencia (Figura 7); sin embargo, la desventaja que presenta es que puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo los dímeros de primers.<sup>39</sup>

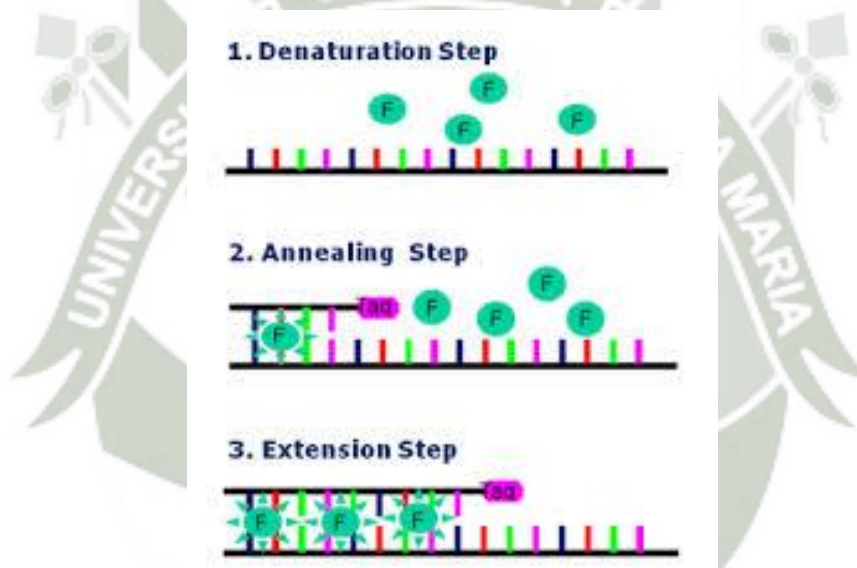


Figura 7. Emisión de fluorescencia del SYBR Green.

Fuente: *qPCR Array Service. Bioneer. Disponible en:*  
<http://eng.bioneer.com/products/genexpression/qPCRArrayService-detection.aspx>

Finalmente, para el análisis de los resultados, el software nos brinda gráficas de amplificación, que muestra el curso y el progreso de la reacción y la curva de disociación o curva *melting*, que nos da información sobre la especificidad de la reacción. Otro paso importante del análisis es elegir el tipo de cuantificación que se usará para determinar la amplificación. Existen dos tipos de cuantificación: la absoluta y la relativa. La primera generalmente se utiliza para conocer el número exacto de copias amplificadas del blanco o

la concentración precisa de ácidos nucleicos en una muestra. En la práctica, este tipo de cuantificación se usa para medir la carga viral o bacteriana en diferentes tejidos. La segunda se aplica cuando se desean evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos. Estos cambios se basan en los niveles del ARNm del gen blanco comparados con un gen de referencia (gen *housekeeping*) que no cambia su expresión a pesar de que los estados fisiológicos se modifiquen por diversas causas.<sup>34,38</sup>



## CAPITULO III

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Lugar de ejecución

##### 3.1.1. Ubicación

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio J&K. Unidad Mixta de Investigación 1011: Receptores nucleares, enfermedades cardiovasculares y diabetes. Laboratorio asociado a la Universidad de Lille 2. (Laboratoire J&K. Unité Mixte de Recherche (UMR) 1011 Inserm).

Director del Laboratorio: Bart Staels, PhD.

##### 3.1.2. Actividades que realiza la Unidad (U1011)

La unidad 1011 estudia los mecanismos biológicos y moleculares que controlan el desarrollo y la progresión de la diabetes tipo 2 y sus complicaciones cardiovasculares, con el fin de desarrollar estrategias preventivas y terapéuticas. Se estudia la regulación de los genes implicados en estas patologías y las complicaciones de su desregulación, con interés particular por los factores de transcripción específicos: los receptores nucleares, que constituyen blancos terapéuticos potenciales.

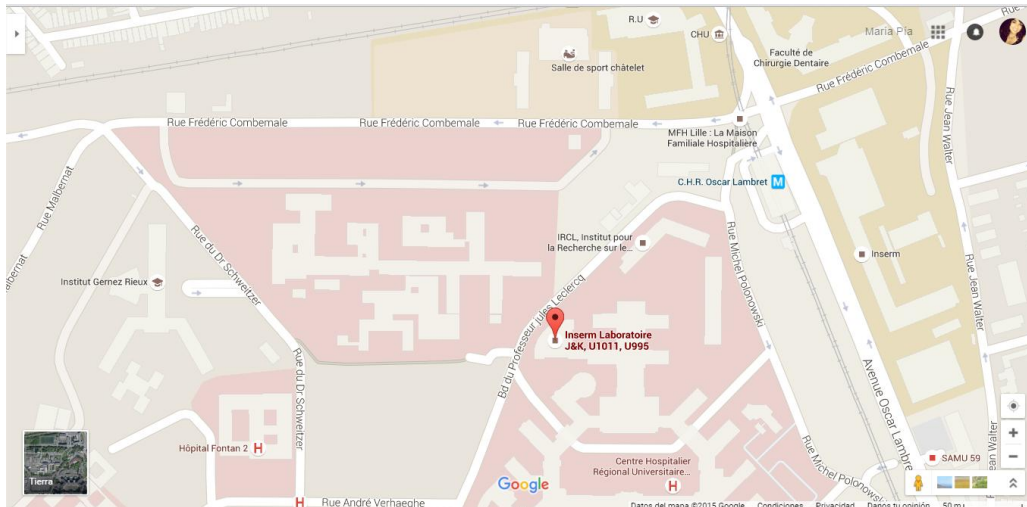
##### 3.1.3. Aspectos técnicos

###### A. Ubicación Geográfica

Bd. du Professeur Jules Leclercq

59000 Lille – Francia

## B. Plano de Ubicación



Fuente: Google Maps

### 3.1.4. Área

Equipo 1: Receptores nucleares en el síndrome metabólico. Dirigido por Bart Staels, PhD. Dentro del equipo se trabajó bajo la tutoría de Sophie Lestavel, PhD.

#### A. Funciones del área

Los estudios precedentes caracterizaron a los receptores nucleares, tales como PPAR y LXRs como reguladores metabólicos y blancos farmacológicos, lo que ha permitido una mejor comprensión de los efectos secundarios de los ligandos sintéticos de receptores nucleares utilizados actualmente en las terapias.

Durante los últimos años los estudios realizados han contribuido significativamente a:

- Demostrar la implicación de los receptores nucleares en las perturbaciones del metabolismo y el equilibrio energético: perturbaciones características de la diabetes tipo 2.
- Demostrar el rol regulador de los receptores nucleares en procesos inflamatorios en el tejido adiposo y la pared vascular.
- Comprender mejor los mecanismos moleculares por los cuales los receptores nucleares modulan la progresión de la diabetes tipo 2.

Sin embargo, los mecanismos de acción molecular de los receptores nucleares así como su rol exacto en la fisiopatología de los estadios precoces (síndrome metabólico) y tardíos de la diabetes de tipo 2, de la obesidad y de las enfermedades cardiovasculares no quedan todavía perfectamente comprendidas.

## 3.2. Material experimental

### 3.2.1. Material biológico

Intestino (duodeno) de dos diferentes fondos genéticos murinos: SV129 (ratones hembras) y C57BL/6J (ratones machos).

### 3.2.2. Reactivos

Agua ultrapura grado biología molecular, PBS, Agarosa, Buffer TAE 0.5X, bromuro de etidio (BET), Lood dye (DNA6X), marcador de peso molecular (*leader*) de 100 pb, Extract-All (Eurobio), cloroformo, isopropanol, etanol 70%, oligonucleótidos, Master Mix SYBR Green Brilliant II Fast (Agilent), nitrógeno líquido.

### 3.2.3. Material de vidrio

Matraz Erlenmeyer 250 mL.

### 3.2.4. Material de plástico

El material con el que se trabajó en el laboratorio es desechable: probetas 250, 500 y 1000 mL tubos Falcon 50 ml, tubos Eppendorf 1,5 y 2 mL, tubos Eppendorf PCR (200  $\mu$ L), placas de PCR de 96 pozos, tira de tapas para los tubos de PCR, tips para micropipetas, gradilla para tubos y frascos de 250 mL.

### 3.2.5. Kits

Kit DNase I, RNase-free (Thermo Scientific)

Kit High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

### 3.2.6. Equipos

Los equipos principales fueron el de lectura de densidad óptica (Nanodrop ND-1000) y el termociclador Mastercycler® gradiente (Eppendorf) para realizar la retro-transcripción y Mx3005P (Agilent) para la qPCR. También se utilizó micropipetas de 10, 20, 100, 200 y 1000  $\mu$ L, vortex, balanza analítica, centrifuga, microcentrífuga, cámara

electroforética horizontal, lámpara UV, cámara de flujo laminar, microondas y congeladora.

### 3.3. Metodología

#### 3.3.1. Protocolos animales

Se trabajó con ratones de dos fondos genéticos diferentes: SV129 (hembras) y C57BL/6J (machos), alimentados con un régimen estándar a base de cereales (*chow diet*, CD) o un régimen rico en grasa (*high fat diet*, HFD). El sacrificio se llevó a cabo siguiendo las exigencias institucionales (CEEA 02/2008), después de 6 horas de ayuno se sacrificó a los animales por dislocación cervical y los intestinos fueron extraídos, lavados con PBS y se cortaron en cuatro partes correspondientes al duodeno, yeyuno, ileón y colon. Las mucosas intestinales fueron raspadas transfiriéndose a un criotubo conteniendo nitrógeno líquido, los cuales fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  antes de la extracción de ARN.

#### 3.3.2. Diseño de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos (*primers* y/o cebadores) específicos de los genes de interés fueron sintetizados por la empresa Sigma y poseen temperaturas de hibridación ( $T_m$ ) cercanas a  $60^{\circ}\text{C}$ , lo que permite realizar el programa de qPCR Fast. Los oligonucleótidos se diseñaron gracias al software Primer3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) y se comprobó su especificidad verificando *in silico* por NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### A. Eficiencia por qPCR

Después de la validación *in silico*, se realizó una PCR para evaluar la eficiencia de los cebadores (1  $\mu\text{L}$  ADNc con soluciones a  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{5}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{25}$ ,  $\frac{1}{50}$ ,  $\frac{1}{100}$  y  $\frac{1}{500}$  mezclado con 19  $\mu\text{L}$  de MIX que contenía 300 nM de los *primers*).

## B. Electroforesis

Se preparó un gel de agarosa al 2%, para lo cual se pesó 3 g de agarosa que se diluyó en 150 mL de buffer TAE 0.5X y se calentó para una dilución completa. Posteriormente, la mezcla se transfirió a un frasco de plástico donde se agregó 2 gotas de BET, se colocó en la cámara que contenía los peines y se dejó gelificar. Una vez listo el gel, se traspasó a la cámara electroforética y se procedió a cargar el gel, en dos pozos se cargó 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular (o *leader*) de 100 pb y los demás pozos se cargaron con 15  $\mu$ L de la preparación de las muestras (20  $\mu$ L de producto de qPCR + 4  $\mu$ L de load dye). Se dejó correr a 110 V durante aproximadamente 40 minutos. Finalmente se hizo la lectura UV del gel para evaluar la integridad de los amplicones generados.

Para validar los oligonucleótidos o *primers*, se vio que solo un producto sea amplificado (un solo pico en la curva de disociación y una sola banda en la separación en gel de agarosa) y que su eficiencia comprenda entre 90 y 120%.

### 3.3.3. Análisis transcripcional

#### A. Extracción y dosaje de ARN

Las mucosas intestinales murinas fueron lisadas añadiendo Extract-All (Eurobio). Luego se agregó cloroformo (1/5 del volumen del Extract-All) para la extracción de ARN total. Se centrifugó (13000 rpm, 10 minutos, 4°C) y luego se añadió isopropanol a la fase acuosa superior para hacer precipitar el ARN. Se realizó una segunda centrifugación a las mismas condiciones, el precipitado de ARN se lavó dos veces con etanol al 70%, se dejó secar, manteniendo siempre los tubos en hielo y finalmente se resuspendió en agua ultrapura. El dosaje de ARN se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 260 nm y la pureza se midió por las absorbancias a 260/280 (contaminación con proteínas) y 260/230 (contaminación por sales) (Nanodrop ND-1000).

## B. Tratamiento DNasa y Retro-transcripción

Se utilizó el kit comercial “High capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems), realizando previamente un tratamiento DNasa para eliminar el ADN genómico residual con el kit DNase I, RNase-free (Thermo Scientific): se agregó 1  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción 10X y 1  $\mu\text{L}$  de DNasa a 1  $\mu\text{g}$  de ARN disuelto en 8  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura, se incubó durante 30 minutos a 37°C (programa DNase1) y luego se agregó 1  $\mu\text{L}$  de EDTA y se incubó 10 minutos a 65°C (programa DNase2). Posteriormente se adicionó la mezcla reaccionante (2  $\mu\text{L}$  tampón RT 10X, 0,8  $\mu\text{L}$  de mezcla de dNTPs 25X, 2  $\mu\text{L}$  de mezcla de iniciadores hexaméricos de secuencias aleatorias (random primers) 10X, 1  $\mu\text{L}$  de Multiscribe Reverse Transcriptasa, 1  $\mu\text{L}$  de RNAsin y 3,2  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura). Después de una incubación de 10 minutos a 25°C, las muestras se mantuvieron a 37°C durante 2 horas y finalmente a 85°C por 5 minutos. El ADNc se guardó a -20°C hasta su utilización.

## C. PCR cuantitativa (qPCR)

Se realizó gracias al programa Mx3005P (Agilent), utilizando SYBR Green como agente intercalante del ADN. Se utilizó un segundo fluoróforo, Rox, para normalizar las variaciones de fluorescencia no ligadas a la PCR. La reacción de qPCR se realizó utilizando el modelo Fast: 2 minutos a 95°C, 40 ciclos de amplificación (5 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C), 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 95°C. El valor de Ct (ciclo *threshold*) fue determinado en la fase exponencial, en la intersección de la línea de ruido de fondo y la curva de fluorescencia y permite evaluar la expresión del gen de interés. La expresión del gen de interés fue normalizada por la expresión de un gen de control (Ciclofilina, Actina). La mezcla reaccionante, de un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  (5  $\mu\text{L}$  ADNc diluido a 1/10 en agua ultrapura + 10  $\mu\text{L}$  Master Mix SYBR Green Brilliant II Fast (Agilent) + 300 nM oligonucleótidos (*forward primer* y *reverse primer*) específicos para el gen de interés + 0,14  $\mu\text{L}$  Rox (dilución 1/200 en agua ultrapura) y lo que resta de agua. Cada muestra fue colocada en duplicado en placa de 96 pozos.

Tabla 1. Genes de referencia utilizados para normalizar la expresión de los genes de interés.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
Ciclofilina	5'-GCATACGGGTCCTGGCATCTTGTC-3'	5'-ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGC-3'
Actina	5'-GTCATTGTAGAAGGTGTGG-3'	5'-CATCCTCACCTGAAGTACC-3'

### 3.3.4. Análisis estadístico

Los resultados numéricos obtenidos de las diferentes experiencias se expresaron bajo la forma de la media y desviación estándar. El significado de las diferencias entre ambos grupos se evaluó con la prueba T de student, gracias al software GraphPad Prism5.



## CAPITULO IV

### 4. Resultados y Discusión

#### 4.1. Validación de los oligonucleótidos diseñados para los genes de interés

Se eligió trabajar con 7 enzimas participantes en las dos vías mayores de metabolización del triptófano, hablamos de la vía de las quinureninas y de la serotonina, trabajando inicialmente con 6 y 1 enzima respectivamente.

A través de las herramientas bioinformáticas, Primer3 y BLAST se diseñaron los oligonucleótidos para las siguientes enzimas: Ido1, Ccbl2, Kynu, Kmo, Acmsd, Qprt y Tph1, como se observa en la Tabla 2, tomando en consideración las características de un buen oligonucleótido o *primer* como son tener una longitud de 18 a 25 pb, una temperatura de hibridación ( $T_m$ ) entre 52°C a 65°C, un contenido promedio de GC entre 40 y 60% y evitar que sean capaces de dimerizar y formar horquillas.

El estudio se redujo al análisis de tres enzimas, ya que en el diseño de oligonucleótidos para las otras cuatro enzimas participantes no se obtuvieron buenos resultados en la eficiencia, por lo que se decidió rediseñarlos, obteniéndose nuevamente resultados poco favorables (Tabla 3). Por otro lado, bibliográficamente se encontraron trabajos precedentes sobre el análisis de enzimas de estas vías metabólicas, pero en los cuales se trabajó con sondas TaqMan, por lo que no fue posible tomarlas como referencia para nuestro estudio.

##### 4.1.1. Eficiencia por qPCR

Se realizaron qPCR para comprobar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados. Para el análisis de la eficiencia, se observó la curva de amplificación (A), la curva de disociación (B) y la curva estándar (C) generadas por las qPCR.

Para validar los oligonucleótidos, se vio que un único producto sea amplificado, es decir que exista un solo pico en la curva de disociación; ya que cuando se observa más de un pico, quiere decir que existen más productos amplificados, encontrándose con el problema de dimerización. En nuestros resultados, se observa que la amplificación es un poco tardía en las tres enzimas, con valores de Ct a partir de 26 (Figura 8B, 9B y 10B), lo que nos indica que no existe gran cantidad de material genético. Respecto al análisis de la curva de disociación, tanto Ido1 (Figura 8C) como Tph1 (Figura 10C) nos muestran un único pico bien marcado, lo que nos asegura un único producto amplificado que viene a ser nuestro producto deseado; por el contrario, Kynu (Figura 9C) muestra un pico grande bien marcado y uno mucho más pequeño a su costado, siendo nuestra primera impresión que es parte del ruido de fondo. Sin embargo, para hacer frente a la posibilidad que éste pequeño pico represente un producto no específico o dímero<sup>40</sup> se llevó a cabo la electroforesis, para comprobar la integridad de los oligonucleótidos para este gen. Cabe resaltar que el método de análisis de la curva de disociación o de fusión es análogo al de electroforesis en gel de agarosa<sup>41</sup>, sin embargo, éste último nos va a servir para corroborar la presencia del producto específico de acuerdo a su longitud.

Por otro lado, con la curva estándar se determinó la eficiencia de los oligonucleótidos o *primers* (Tabla 4) considerando que presenten una eficiencia que comprenda entre 90 y 120%; basándonos en estos criterios se descartaron varias enzimas quedándonos únicamente con tres (Tabla5), como se mencionó anteriormente; Ido1 (Figura 8D), Kynu (Figura 9D) y Tph1 (Figura 10D), de las cuales sus resultados de eficiencia fueron 112,4%, 92,0% y 117,1% respectivamente.

Tabla 2. Diseño de oligonucleótidos para las enzimas elegidas a través de Primer3, mostrando su secuencia, longitud, temperatura de hibridación (Tm), porcentaje de GC (%GC) y posibilidad de formar horquillas (Hairpin).

	<b>Secuencia</b>	<b>Longitud</b>	<b>Tm</b>	<b>GC%</b>	<b>Hairpin</b>
<b>Ido1</b>	Forward	23	58.57	43.48	0.00
	5'-CATGACATACGAGAACATGGACA-3'				
	Reverse	20	58.75	50.00	0.00
	5'-TCTTGACGCTCTACTGCACT-3'				
<b>Cebl2</b>	Forward	19	59.12	57.89	0.00
	5'-GAAATCCTTGTGGCCGTGG-3'				
	Reverse	21	59.18	52.38	0.00
	5'-CAGGGGAATAAACACAGGCAC-3'				
<b>Kynu</b>	Forward	22	58.61	45.45	0.00
	5'-GTCACAGATTCAACTTCACGGA-3'				
	Reverse	20	59.67	55.00	0.00
	5'-AGCCCACTGAACAGGATCAC-3'				
<b>Kmo</b>	Forward	20	58.03	50.00	0.00
	5'-AAACAAGGACCTGCTGACTG-3'				
	Reverse	20	59.02	55.00	0.00
	5'-AGCACTGTGAGTACCCCTTC-3'				
<b>Acmsd</b>	Forward	21	59.12	52.38	0.00
	5'-CCAAGCTCTTTCCACAGTTCC-3'				
	Reverse	20	59.17	55.00	0.00
	5'-CCTTCGAGGGTATCTGGCAA-3'				
<b>Qprt</b>	Forward	20	58.80	55.00	0.00
	5'-TGGTGGAGAAGTATGGGCTC-3'				
	Reverse	20	59.46	55.00	0.00
	5'-GGCTGCTACATTCCACCTCT-3'				
<b>Tph1</b>	Forward	20	57.73	50.00	0.00
	5'-CATGCACTTTCTGGACATGC				
	Reverse	21	58.57	47.62	0.00
	CGGTCTTGGCAAATTCTCTCA				

Tabla 3. Rediseño de los oligonucleótidos para las enzimas restantes, mostrando su secuencia, longitud, temperatura de hibridación (Tm), porcentaje de GC (%GC) y posibilidad de formar horquillas (Hairpin).

	<b>Secuencia</b>	<b>Longitud</b>	<b>Tm</b>	<b>GC %</b>	<b>Hairpin</b>
<b>Cebl2</b>	Forward 5'-TTTACACGTGTGCGACTCCT-3'	20	59.36	50.00	0.00
	Reverse 5'-GGCAGAGAATTAAGTAACACTCAGG-3'	26	60.85	42.31	0.00
<b>Kmo</b>	Forward 5'-CCAGATGCTATCCCTCTGATG-3'	21	59.66	52.38	0.00
	Reverse 5'-GGTGGAAGGGAGAGCACTT-3'	19	59.24	57.89	0.00
<b>Acmsd</b>	Forward 5'-CCTGGTTCACGATCCTCTGTC-3'	21	62.03	57.14	0.00
	Reverse 5'-CTGCTCGCCCAGAGGAAA-3'	18	62.63	61.11	0.00
<b>Qprt</b>	Forward 5'-CCGGGCCTCAATTTTGCATC-3'	20	60.18	55.00	0.00
	Reverse 5'-GGTGTTAAGAGCCACCCGTT-3'	20	60.25	55.00	0.00

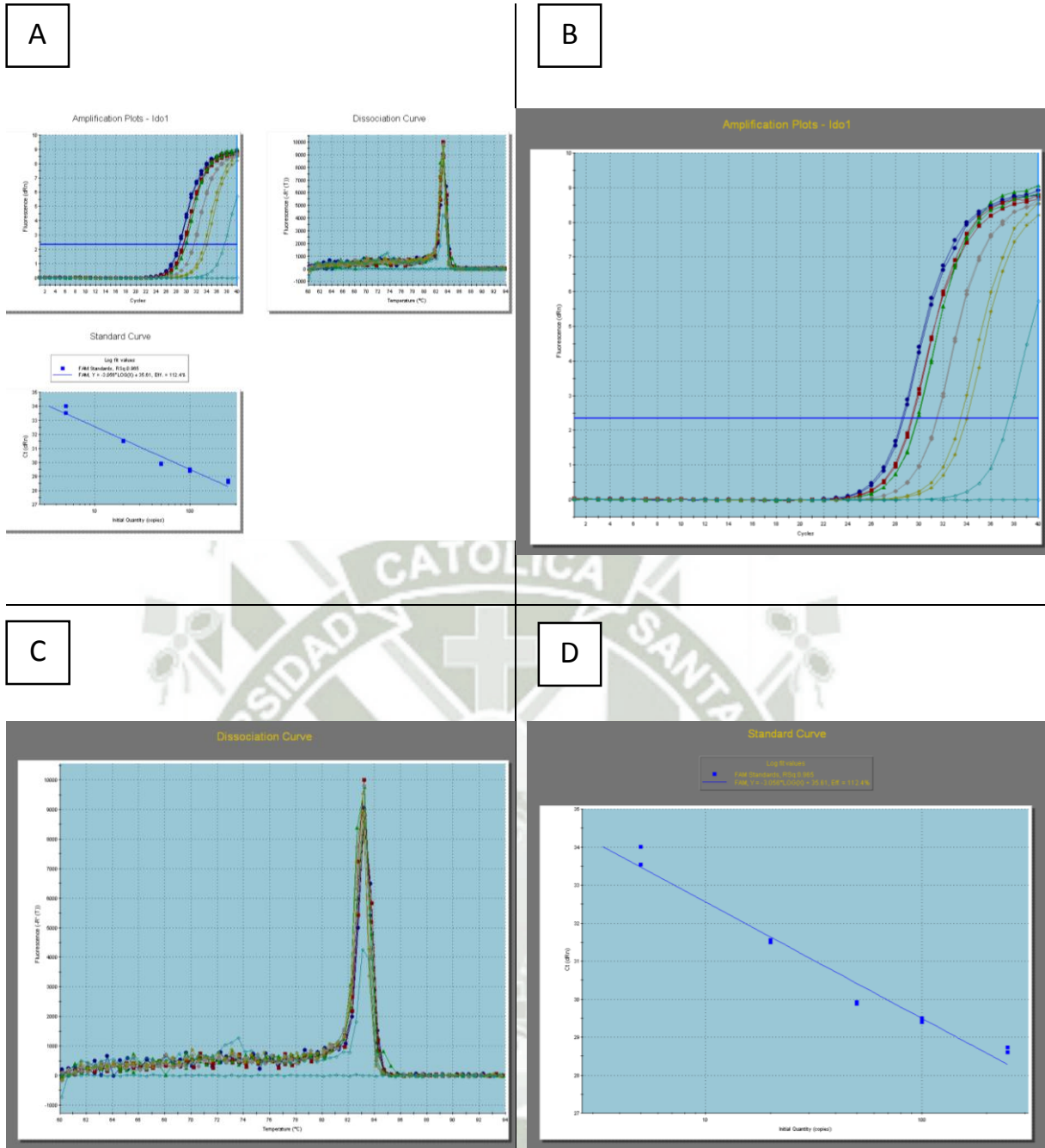


Figura 8. Eficiencia de oligonucleótidos para el gen Ido1 sobre el protocolo 43 (RT realizada en mayo 2010) (A) Consolidado de resultados. (B) Curva de amplificación. (C) Curva de disociación. (D) Curva estándar, eficiencia de 112,4%. Ido1; indoleamina 2,3-dioxigenasa.

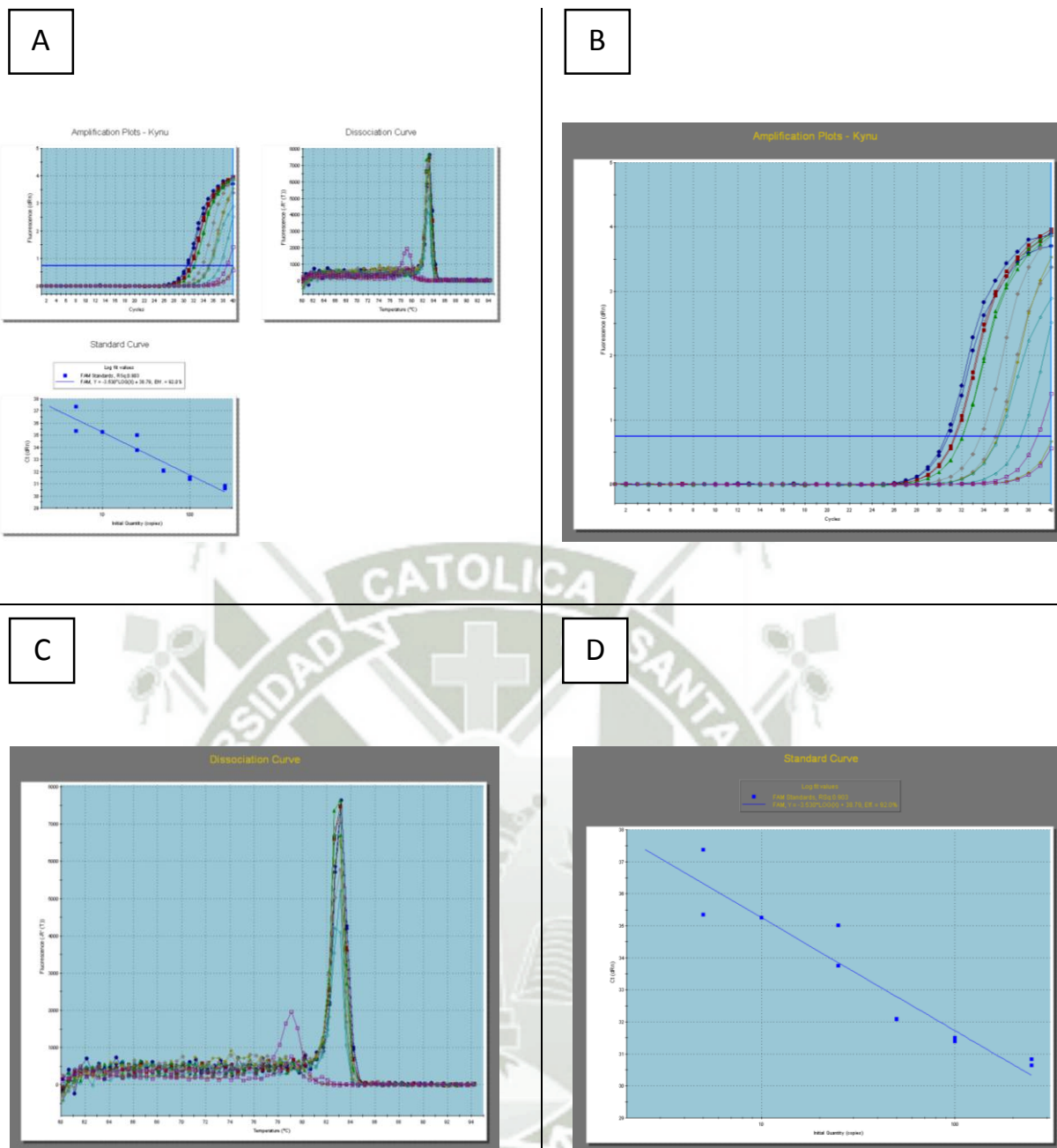


Figura 9. Eficiencia de oligonucleótidos para el gen Kynu sobre el protocolo 43 (RT realizada en mayo 2010) (A) Consolidado de resultados. (B) Curva de amplificación. (C) Curva de disociación. (D) Curva estándar, eficiencia de 92,0%. Kynu; quinureninasa.

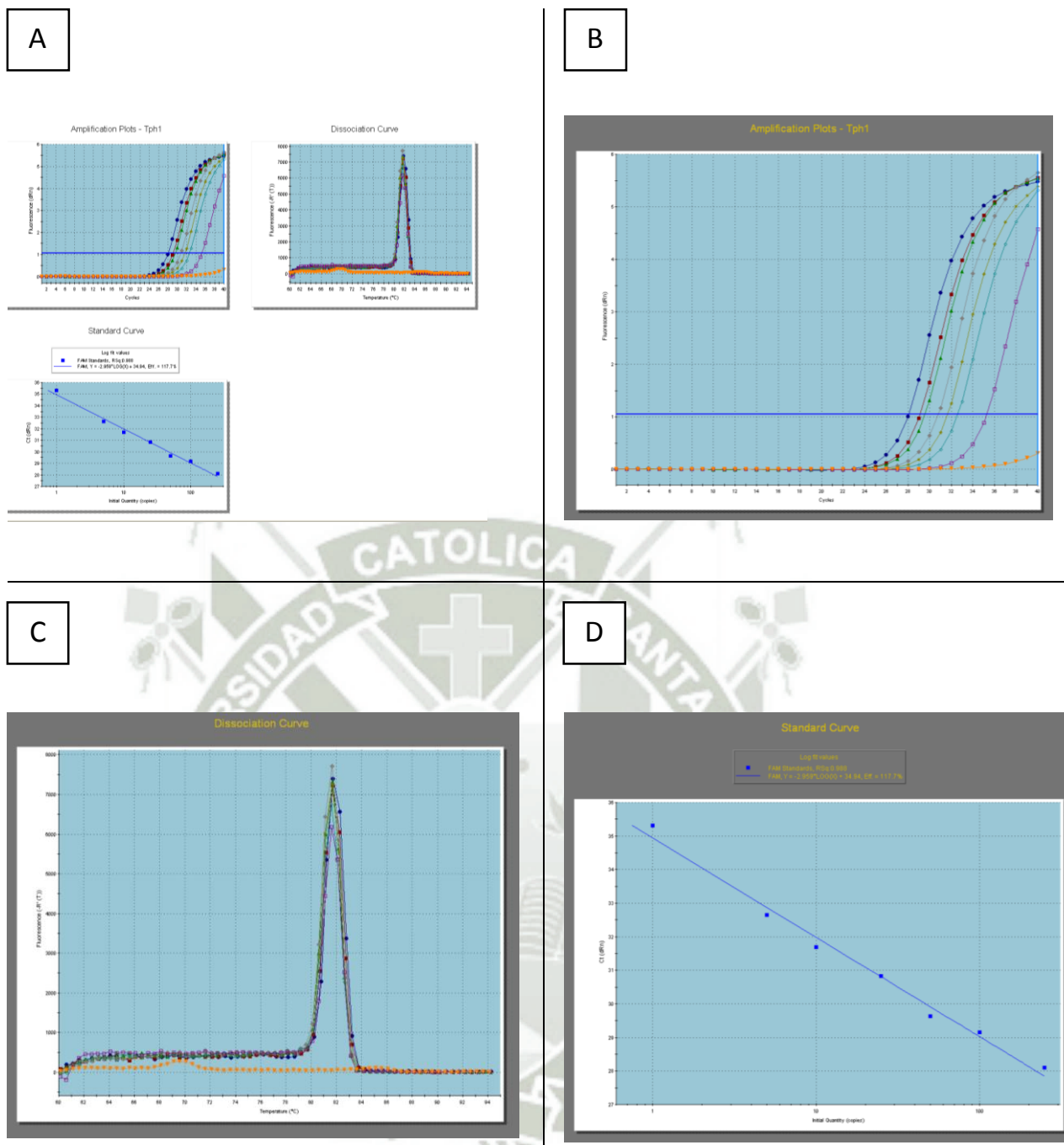


Figura 10. Eficiencia de oligonucleótidos para el gen Tph1 sobre el protocolo 43 (RT realizada en mayo 2010) (A) Consolidado de resultados. (B) Curva de amplificación. (C) Curva de disociación. (D) Curva estándar, eficiencia de 117,1%. Tph1; triptófano 2,3-dioxigenasa.

Tabla 4. Eficiencias de los oligonucleótidos por qPCR.

Gen	Eficiencia qPCR (%)
<b>Ido1</b>	112.5
<b>Ccbl2</b>	359.5
<b>Kynu</b>	92.0
<b>Kmo</b>	>1000
<b>Acmsd</b>	>1000
<b>Qprt</b>	>1000
<b>Tph1</b>	117.1

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos para el análisis de los genes de las enzimas elegidas.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
<b>Ido1</b>	5'-CATGACATACGAGAACATGGACA-3'	5'-TCTTGACGCTCTACTGCACT-3'
<b>Kynu</b>	5'-GTCACAGATTCAACTTCACGGA-3'	5'-AGCCCACTGAACAGGATCAC-3'
<b>Tph1</b>	5'-CATGCACTTTCTGGACATGC-3'	5'-CGGTCTTGGCAAATTCTCTCA-3'

#### 4.1.2. Electroforesis en gel

Como se dijo anteriormente, uno de los criterios para validar los cebadores, es que presenten un único producto de amplificación, es decir, al realizar la corrida electroforética en gel de agarosa, se observe una sola banda, resultado que representaría la amplificación de nuestro producto deseado; además que, gracias al marcador de peso molecular, es posible observar el tamaño del amplicón generado.

Con respecto a nuestras enzimas, se obtuvo un buen resultado en la corrida electroforética (Figura 11), ya que en las tres podemos observar un único amplicón bien marcado de 150 pb aproximadamente; lo que concuerda con la bibliografía que indica tanto para Ido1 como para Kynu, un amplicón de 150 pb y para Tph1, uno de 151 pb; razón por la cual se puede verificar que nos dan el transcripto que representa nuestro producto deseado.

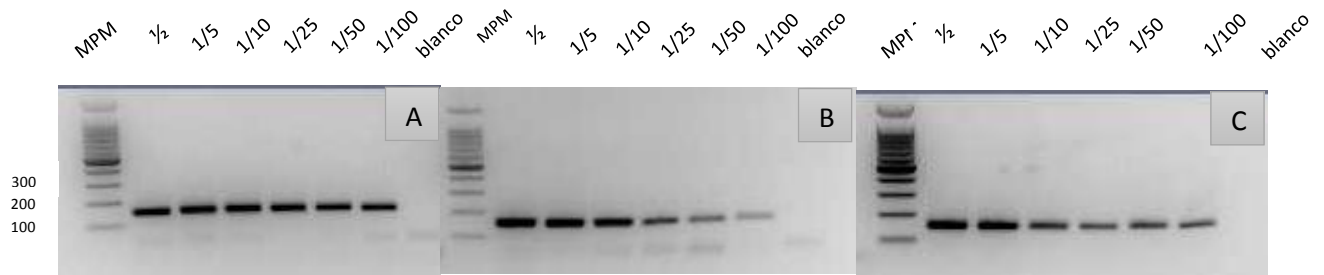


Figura 11. Amplicones obtenidos por electroforesis horizontal (gel de agarosa 2%, marcador de peso molecular de 100 pb, 110 V) para genes participantes en las vías metabólicas del triptófano. A) Enzima Ido1 B) Enzima Kynu C) Enzima Tph1.

MPM: marcador de peso molecular en el primer pozo, en los siguientes pozos se depositaron las diferentes concentraciones:  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{5}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{25}$ ,  $\frac{1}{50}$  y  $\frac{1}{100}$  y finalmente un blanco.

## 4.2. Dosaje de ARN

### 4.2.1. Concentración y pureza

Se realizó el dosaje de los ARN de los dos protocolos, para hallar la concentración de las muestras en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y de esta manera poder ver si existe contaminación por proteínas ( $260/280 > 1,8$ ) o por sales ( $260/230 > 1,5$ ); valores menores a los índices dados indican contaminación.

Se trabajó con 2 protocolos (43 y 86), de los cuales en uno de ellos ya se había realizado la extracción y retro-transcripción del ARN anteriormente en el laboratorio (mayo 2010), por lo que se realizó el dosaje de ésta, comparando los resultados (Tabla 6) con los obtenidos en el dosaje de la nueva extracción de ARN sobre el mismo protocolo (Tabla 7); en esta comparación no se observaron grandes diferencias, por lo que se decidió trabajar con ambas muestras. Por otro lado, se trabajó con un segundo protocolo, del cual no existía una extracción de ARN anterior, por lo que los resultados fueron únicamente de la extracción hecha recientemente (Tabla 8).

Los diferentes ARN analizados nos muestran índices de pureza con valores superiores al mínimo indicador de contaminación por proteínas y sales; por tanto, la técnica de aislamiento y manipulación fue buena.

Tabla 6. Dosaje de ARN Protocolo 43 (RT realizada en mayo 2010), donde se muestra la concentración (ng/μL), absorbancias a 260 y 280, índice de contaminación por proteínas (260/280), índice de contaminación por sales (260/230).

<b>Sample ID</b>	<b>ng/μL</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>771</b>	656.46	16.412	8.516	1.93	2.25
<b>47</b>	388.64	9.716	5.115	1.9	2.33
<b>786</b>	418.05	10.451	5.566	1.88	2.38
<b>46</b>	416.09	10.402	5.543	1.88	2.38
<b>45</b>	415.63	10.391	5.539	1.88	2.42
<b>51</b>	653.22	16.331	8.485	1.92	2.35
<b>751</b>	518.57	12.964	6.801	1.91	2.31
<b>782</b>	368.18	9.204	4.964	1.85	2.44
<b>745</b>	514.25	12.856	6.701	1.92	2.34
<b>756</b>	935.69	23.392	11.951	1.96	2.35
<b>48</b>	566.72	14.168	7.386	1.92	2.32
<b>761</b>	550.44	13.761	7.217	1.91	2.44

Tabla 7. Dosaje de ARN Protocolo 43 (RT realizada en enero 2016), donde se muestra la concentración (ng/μL), absorbancias a 260 y 280, índice de contaminación por proteínas (260/280), índice de contaminación por sales (260/230).

<b>Sample ID</b>	<b>ng/μl</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>771</b>	649.93	16.248	8.328	1.95	2.34
<b>47</b>	386.26	9.657	5.106	1.89	2.3
<b>786</b>	416.73	10.418	5.51	1.89	2.37
<b>46</b>	408.03	10.201	5.444	1.87	2.37
<b>45</b>	413.29	10.332	5.573	1.85	2.38
<b>51</b>	655.72	16.393	8.577	1.91	2.34
<b>751</b>	464.11	11.603	6.125	1.89	1.89
<b>782</b>	368.38	9.21	4.989	1.85	2.42
<b>745</b>	513.86	12.846	6.769	1.9	2.35

<b>756</b>	944.63	23.616	11.969	1.97	2.3
<b>48</b>	568.79	14.22	7.393	1.92	2.19
<b>761</b>	553.47	13.837	7.287	1.9	2.28

Tabla 8. Dosaje de ARN Protocolo 86 (RT realizada en febrero 2016), donde se muestra la concentración (ng/ $\mu$ L), absorbancias a 260 y 280, índice de contaminación por proteínas (260/280), índice de contaminación por sales (260/230).

<b>Sample ID</b>	<b>ng/<math>\mu</math>L</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>111</b>	938.69	23.467	11.802	1.99	2.32
<b>104</b>	541.81	13.545	6.924	1.96	2.01
<b>106</b>	914.18	22.854	11.394	2.01	2.09
<b>103</b>	781.43	19.536	9.709	2.01	1.71
<b>105</b>	775.98	19.399	9.665	2.01	2.29
<b>107</b>	686.13	17.153	8.608	1.99	2.26
<b>129</b>	628.42	15.71	7.943	1.98	1.84
<b>128</b>	591.58	14.79	7.585	1.95	2.21
<b>123</b>	677.65	16.941	8.448	2.01	2.23
<b>125</b>	679.04	16.976	8.541	1.99	2.22
<b>124</b>	659.48	16.487	8.28	1.99	2.23
<b>126</b>	703.29	17.582	8.769	2.01	1.83
<b>110</b>	793.48	19.837	10.054	1.97	2.28
<b>113</b>	705.59	17.64	8.794	2.01	1.78
<b>130</b>	517.71	12.943	6.59	1.96	2.12

#### **4.3. Expresión de los genes de las enzimas participantes en las vías metabólicas del triptófano**

El estudio se realizó en dos diferentes protocolos murinos, de fondo genético SV129 (ratones hembras) y C57BL/6J (ratones machos).

Dentro de la expresión de los genes de interés, que fue realizada por qPCR, para normalizar su expresión<sup>42</sup>, es necesario utilizar genes de referencia. Los genes de referencia (inicialmente llamados *housekeeping*<sup>43</sup> o de control interno, se caracterizan por presentar una expresión constante en todas las muestras, por lo que generalmente son utilizados genes que regulan funciones estructurales o muy básicas relacionadas con el metabolismo celular; sin embargo, no se han identificado genes de referencia óptimos,<sup>44</sup> ya que los utilizados habitualmente varían considerablemente entre muestras.

En nuestro caso, se probaron tres genes de referencia (Actina, Ciclofilina y TFIIB), que ya habían sido utilizados anteriormente en el laboratorio en trabajos sobre muestras de intestino; cabe resaltar que sobre estas muestras se probaron otros, pero dentro de todos, aunque ninguno dio resultados óptimos, la actina y la ciclofilina fueron los que presentaron mejores resultados. Teniendo en cuenta que para normalizar las expresiones de genes cuando se trabaja con qPCR, es necesario utilizar más de un gen de referencia, sobre todo cuando no se puede encontrar un único gen de referencia con características óptimas,<sup>45</sup> se decidió trabajar con ambos (Figuras 12, 14 y 16) y elegir el que presente mejores resultados, incluso en un caso se trabajó con la media de ambos. Al analizar las curvas de disociación de los genes de referencia, podemos resaltar que en todas se muestra un pico grande y bien marcado; sin embargo, no es un resultado 100% óptimo ya que existe bastante ruido de fondo.

#### 4.3.1. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Con respecto a la expresión de las tres enzimas trabajadas, se puede observar en las curvas de amplificación la fase linear o ruido de fondo que representa el momento en el cual comienza la desnaturalización<sup>36,37</sup> y no hay amplificación de producto (aproximadamente los 15 primeros ciclos), ésta es una fase de “acondicionamiento” y en nuestros resultados se observa que la amplificación de los genes de interés comienza un poco tarde, sobre todo en el protocolo 86 (Figura 17).

Analizando el primer protocolo (43), trabajado con un ADNc pasado, se observa en las 3 enzimas la presencia de un pico bien marcado (Figura 13); sin embargo, tanto para Ido1 (Figura 13B) como Kynu (Figura 13D) se observa además ruido de fondo bastante pronunciado. Por otro lado, en la qPCR trabajada con el nuevo ADNc, estos pequeños picos desaparecen (Figura 15), lo que nos indica un mejor resultado al trabajar con éste último, a pesar que las

muestras de ADNc estuvieron guardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , siempre el paso del tiempo, genera una degradación en el material genético.

Comparando los valores de Ct entre ambos, se puede ver que existe una variación pequeña entre ellos, mostrando una amplificación más temprana para Ido1 (Figura 13A y 15A) al igual que Tph1 (Figura 13E y 15E) en el ADNc actual, caso contrario a Kynu, donde la amplificación es un poco más tardía (Figura 13C y 15C). En cuanto la curva de disociación de las enzimas del protocolo 86, se observa para el caso de Ido1 (Figura 17B) y Kynu (Figura 17D) ruido de fondo acompañando al gran pico bien marcado de nuestro producto deseado, contrariamente a Tph1 (Figura 17F), que presenta una amplificación limpia con poco ruido de fondo.

En general los resultados nos indican, que la presencia de material genético en ambos protocolos es un poco baja y en consecuencia la amplificación resulta un poco tardía. En la amplificación trabajada con muestras de ADNc pasado, además del pico del producto deseado, se ven picos pequeños, los cuales desaparecen en la amplificación con el nuevo ADNc, situación que ocurre tanto para los genes de referencia como para los de interés; por lo que se puede concluir que existe una degradación y posible contaminación en algunas muestras del ADNc pasado. Una posible explicación a esta situación es que, al descongelarse, la muestra está expuesta a la degradación por las nucleasas.

#### **4.3.2. Variación de la expresión de las enzimas entre una dieta basada en cereales (*chow diet*, CD) y una dieta rica en grasas (*high fat diet*, HFD)**

Como objetivo principal del trabajo, se buscó observar la influencia de una dieta rica en grasas en comparación a una basada en cereales en la expresión de tres enzimas participantes en la metabolización del triptófano.

El primer gen, Ido1, mostró una mayor expresión en la dieta a base de cereales en comparación a la dieta rica en grasas, para ambos protocolos. Por otro lado; para Kynu, se observó en el primer protocolo una mayor expresión en la dieta a base de cereales; inversamente al segundo protocolo, donde la expresión mayor, aunque con muy poca diferencia, se da en el régimen rico en grasas. Finalmente, para nuestro último gen, Tph1, la expresión resultante en el primer protocolo, difiere entre ambas muestras utilizadas, ADNc obtenido en mayo 2010 y

uno actual, para el primer caso se observó una mayor expresión en la dieta basada en cereales, contrariamente al segundo, donde la mayor expresión se da en la dieta rica en grasas. Para el segundo protocolo, situación similar a Kynu, se vio una mayor expresión, con una mínima diferencia, en el régimen rico en grasas.

Los resultados obtenidos, nos muestran en general una baja expresión de las enzimas analizadas Ido1, Kynu y Tph1 en ambos regímenes alimenticios, además de una ligera variación en la expresión de éstas entre el régimen rico en grasas (HFD) y el basado únicamente en cereales (CD); sin embargo, ésta expresión no fue significativamente diferente, como se puede observar en los gráficos de las Figuras 18 y 19. De todas maneras, ésta diferencia sugiere una tendencia en disminución en la expresión de las enzimas de la vía de las quinureninas y una tendencia en incremento de la enzima inductora de la vía de la serotonina los protocolos alimentados con la dieta rica en grasas. Li y sus colaboradores,<sup>46</sup> demostraron una menor expresión de las enzimas iniciales de la vía de las quinureninas y por tanto la disminución de concentración de quinurenina en ratones alimentados con una dieta rica en grasas; estudio que asemeja sus resultados a los nuestros.

Estudios precedentes, señalan que la mayoría de enzimas participantes en la vía de las quinureninas incrementa su expresión en tejido adiposo de pacientes obesos<sup>47,48</sup> sin embargo, al trabajar con modelos murinos,<sup>49</sup> nos damos con la sorpresa que el metabolismo del triptófano es totalmente diferente, ya que, a pesar de la inflamación presente en el tejido adiposo, no hay expresión de varias enzimas de ésta vía metabólica, caso contrario a muestras humanas, donde su expresión se ve fuertemente incrementada.<sup>47</sup> Con esto se puede concluir que existe una limitación en el uso de modelos murinos para el estudio de la metabolización del triptófano en obesidad humana. Pero incluso cuando las características sean diferentes entre humanos y ratones, es obvio que las vías metabólicas del triptófano se ven afectadas por la obesidad.

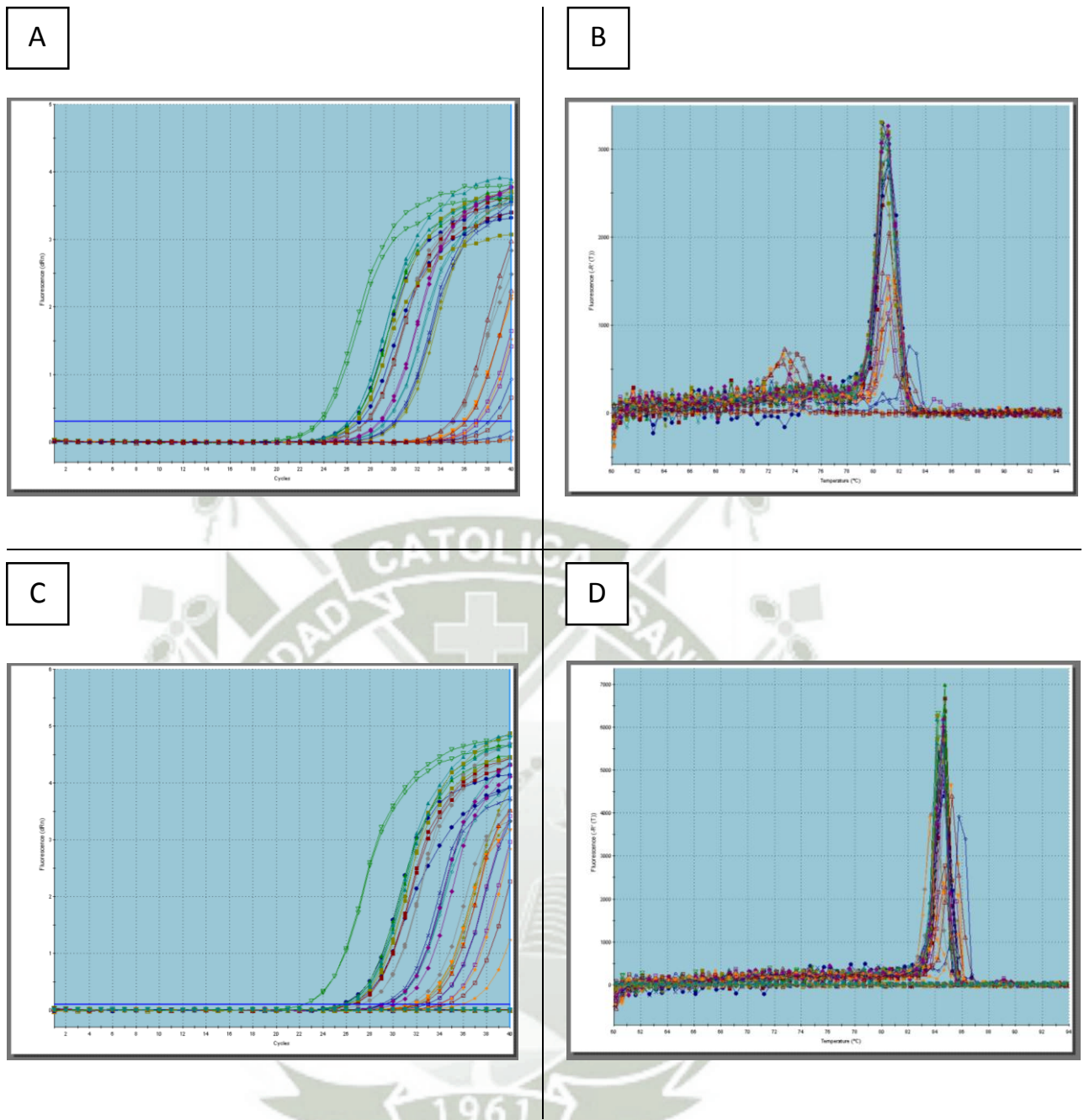


Figura 12. Amplificación por qPCR de los genes de control Actina y Ciclofilina en el protocolo 43 (RT 2010). (A) Curva de amplificación de Actina. (B) Curva de disociación de Actina. (C) Curva de amplificación de Ciclofilina. (D) Curva de disociación de Ciclofilina.

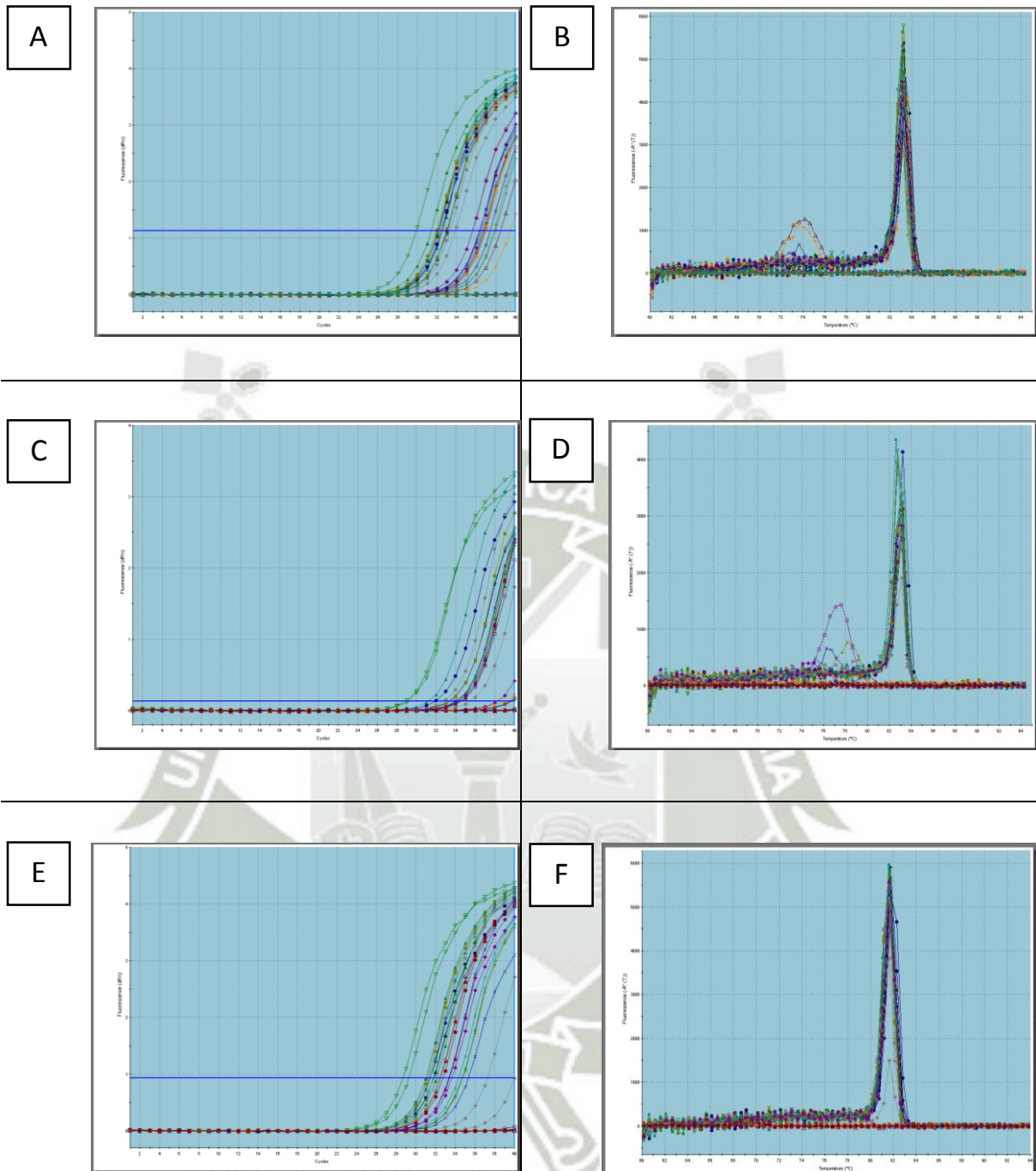


Figura 13. Amplificación por qPCR de los genes de interés Ido1, Kynu y Tph1 en el protocolo 43 (RT 2010). (A) Curva de amplificación de Ido1. (B) Curva de disociación de Ido1. (C) Curva de amplificación de Kynu. (D) Curva de disociación de Kynu. (E) Curva de amplificación de Tph1. (F) Curva de disociación de Tph1.

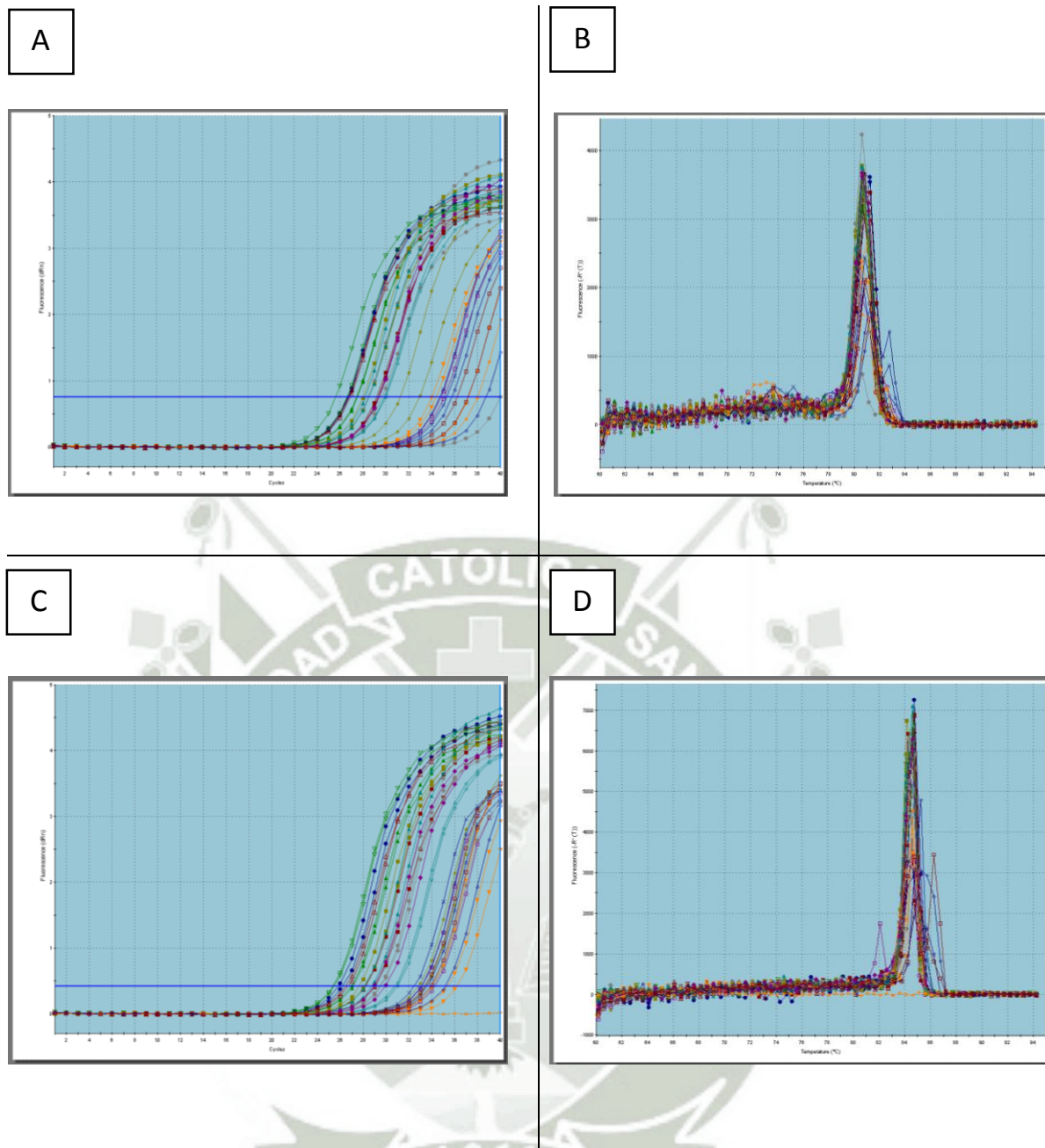


Figura 14. Amplificación por qPCR de los genes de control Actina y Ciclofilina en el protocolo 43 (RT 2016). (A) Curva de amplificación de Actina. (B) Curva de disociación de Actina. (C) Curva de amplificación de Ciclofilina. (D) Curva de disociación de Ciclofilina.

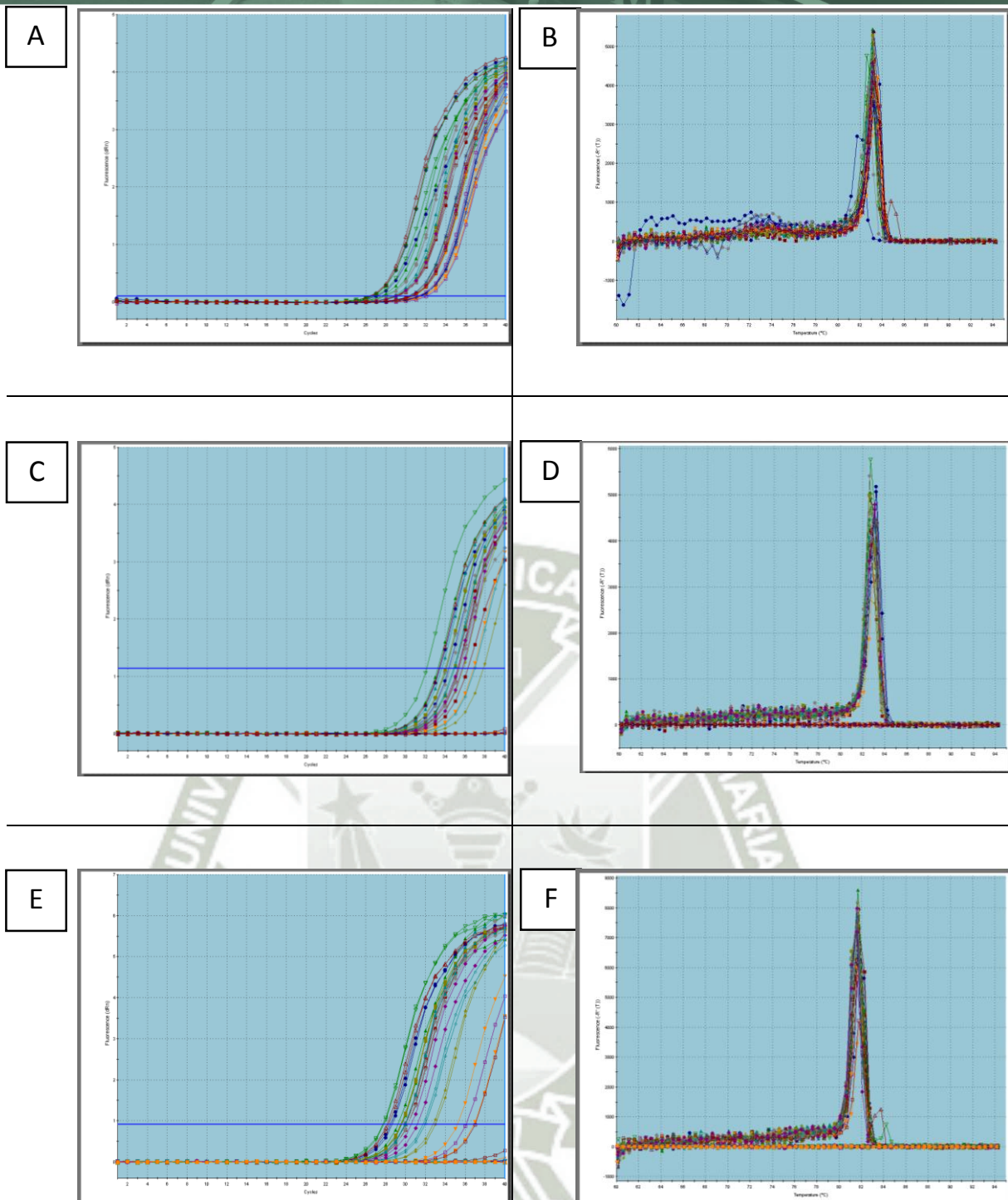


Figura 15. Amplificación por qPCR de los genes de interés Ido1, Kynu y Tph1 en el protocolo 43 (RT 2016). (A) Curva de amplificación de Ido1. (B) Curva de disociación de Ido1. (C) Curva de amplificación de Kynu. (D) Curva de disociación de Kynu. (E) Curva de amplificación de Tph1. (F) Curva de disociación de Tph1.

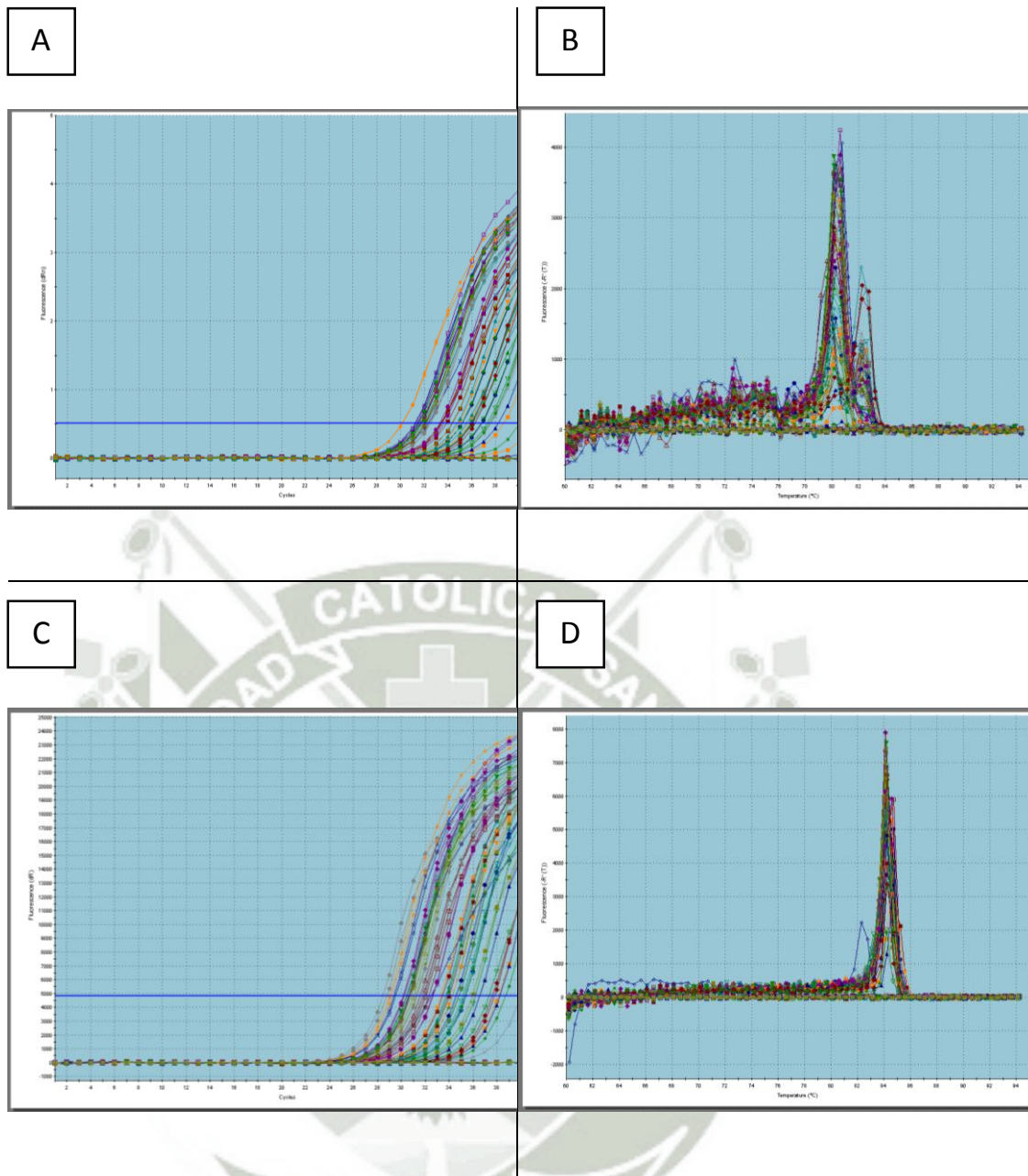


Figura 16. Amplificación por qPCR de los genes de control Actina y Ciclofilina en el protocolo 86 (RT 2016). (A) Curva de amplificación de Actina. (B) Curva de disociación de Actina. (C) Curva de amplificación de Ciclofilina. (D) Curva de disociación de Ciclofilina.

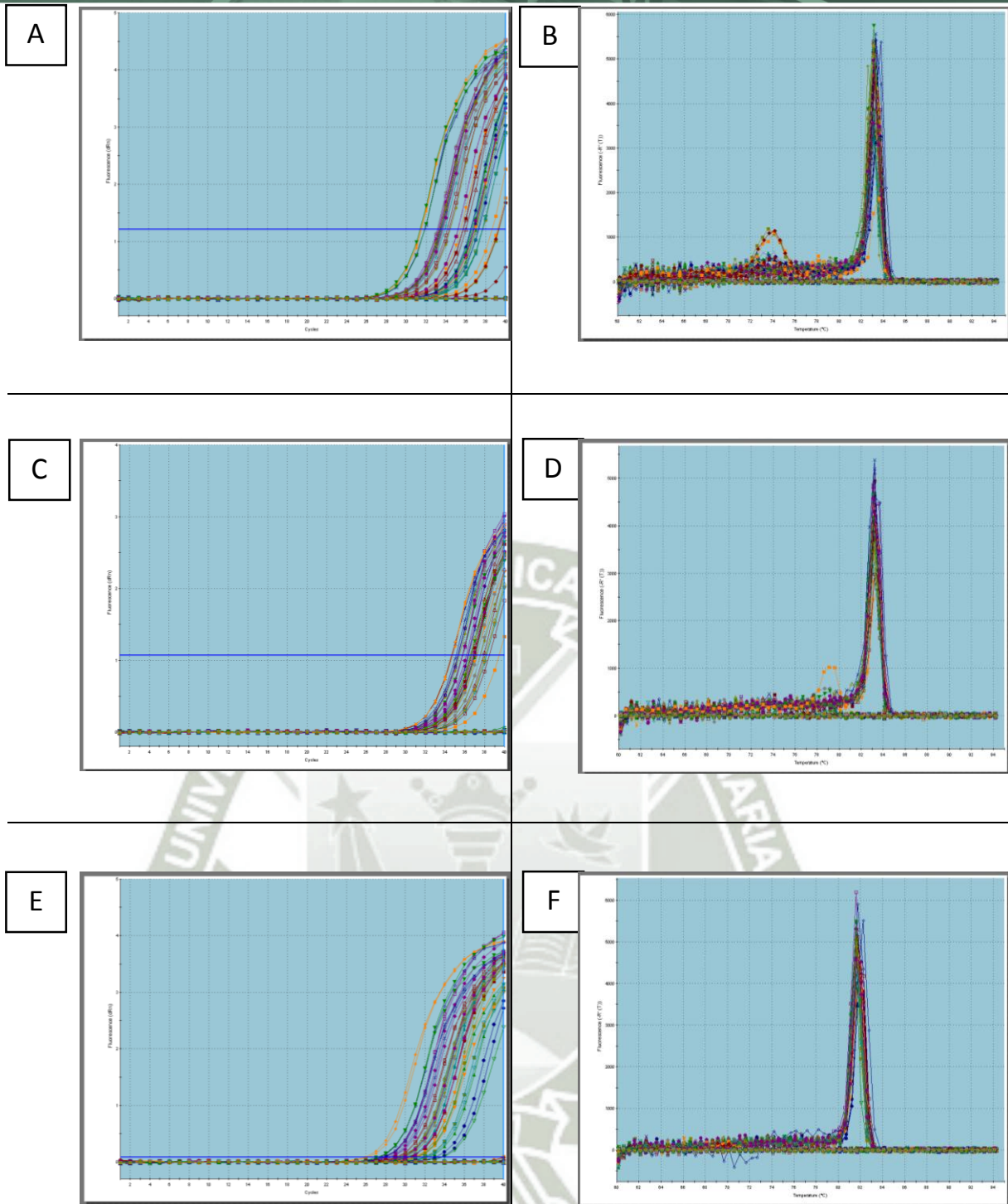


Figura 17. Amplificación por qPCR de los genes de interés Ido1, Kynu y Tph1 en el protocolo 86 (RT 2016). (A) Curva de amplificación de Ido1. (B) Curva de disociación de Ido1. (C) Curva de amplificación de Kynu. (D) Curva de disociación de Kynu. (E) Curva de amplificación de Tph1. (F) Curva de disociación de Tph1.

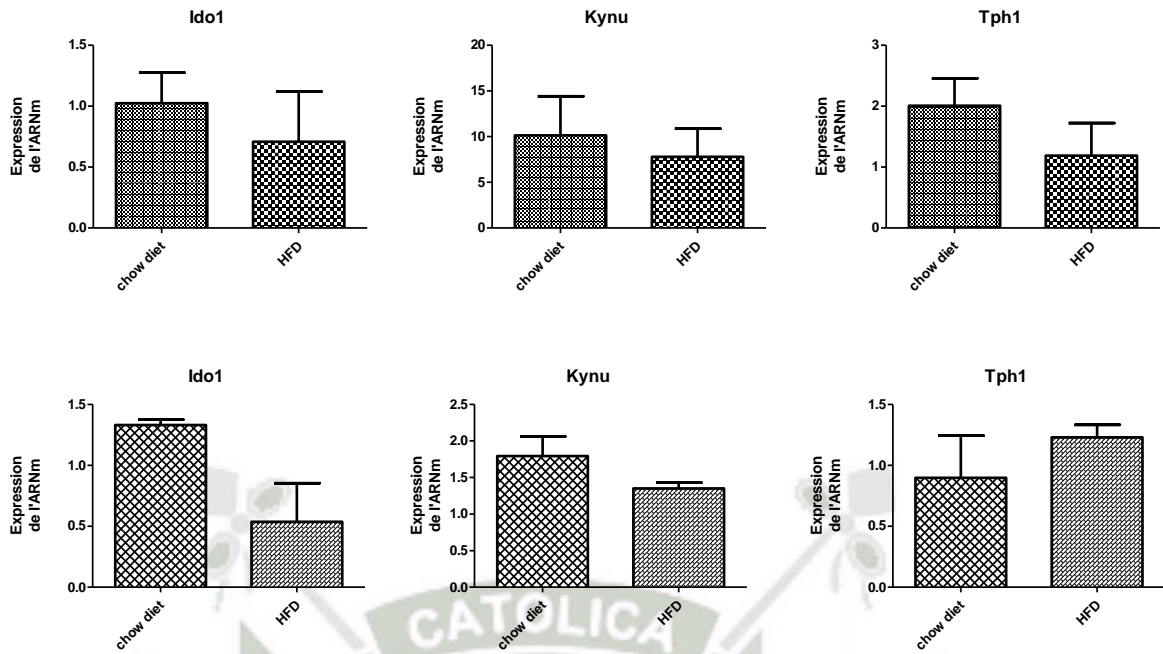


Figura 18. Expresión del ARNm de las enzimas Ido1, Kynu y Tph1 en un régimen CD y HFD, en el protocolo 43, trabajando con RT realizada en mayo 2010 (gráficos superiores) y RT actual (gráficos inferiores). Los resultados son expresados como media y desviación estándar. La prueba T-student fue realizada para el análisis estadístico (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ). Ido1, indoleamina 2,3-dioxigenasa 1; Kynu, quinureninasa; Tph1, triptófano 2,3-dioxigenasa 1.

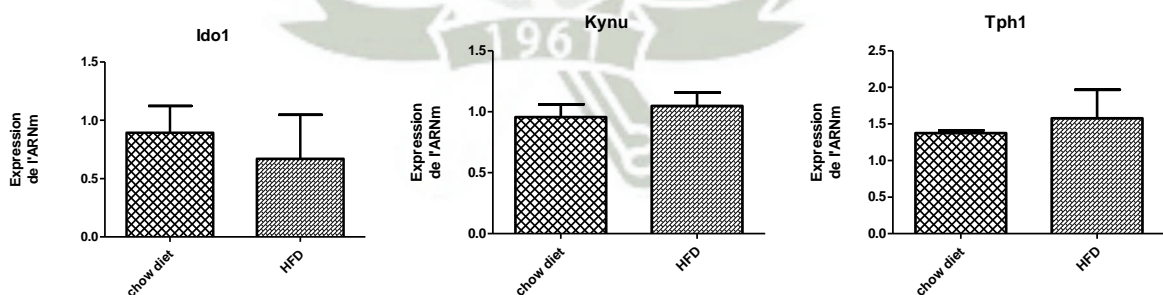


Figura 19. Expresión del ARNm de las enzimas Ido 1, Kynu y Tph1 en un régimen CD y HFD, en el protocolo 86, RT actual. Los resultados son expresados como media y desviación estándar. La prueba T-student fue realizada para el análisis estadístico (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).

Ido1, indoleamina 2,3-dioxigenasa 1; Kynu, quinureninasa; Tph1, triptófano 2,3-dioxigenasa 1.

Diferentes estudios sugieren que las dos principales vías metabólicas del triptófano (5-HT y quinureninas) compiten por su precursor<sup>50,51</sup> lo que conduce a tener concentraciones más bajas de quinureninas en aumento de la síntesis de 5-HT. Viceversa, la desviación de triptófano a la vía de quinureninas puede dar lugar a una deficiencia relativa de la síntesis de 5-HT y por lo tanto a la disfunción serotoninérgica.

La activación de IDO1 y el metabolismo resultante del triptófano y la formación de quinurenina y sus metabolitos, tienen ramificaciones biológicas considerables, que, dependiendo de las circunstancias, puede ser beneficioso o perjudicial para el anfitrión. Por otro lado, según el estudio de Nonogaki y Kaji<sup>52</sup> se sugiere que el aumento de la serotonina periférica está asociado con la obesidad y también a niveles bajos de triptófano circulante; por tanto, la inhibición de la señalización de la vía de la serotonina o de su síntesis en el tejido adiposo puede resultar un tratamiento efectivo para ésta y sus alteraciones.

Otros estudios muestran que procesos inflamatorios pueden desempeñar un papel causal en el desarrollo de la enfermedad depresiva, teniendo como evidencia que una proporción de individuos deprimidos presentan procesos inflamatorios. En roedores se demostró que la activación de la vía de las quinureninas es esencial para el desarrollo del comportamiento depresivo<sup>53</sup> y en pacientes con hepatitis C o cáncer que reciben tratamientos con medicamentos que inducen la inflamación, se mostró un aumento de la activación de la KP y disminución de los niveles de triptófano que se correlacionan con la depresión inducida por la inflamación; además, se ha demostrado que estos tratamientos conducen a una mayor producción de metabolitos neurotóxicos de la KP, tales como el ácido quinolínico (QA) y el ácido xanturénico (XA).<sup>54,55</sup>

Inicialmente, se creía que los síntomas depresivos se daban por el agotamiento de la serotonina en el cerebro, sin embargo, estos estudios nos sugieren que un desequilibrio entre los metabolitos neurotóxicos y neuroprotectores de la vía de las quinureninas puede ser el motor principal de la depresión.<sup>56</sup>

## Conclusiones

- Se diseñaron los oligonucleótidos específicos para siete enzimas participantes en las dos vías metabólicas mayores del triptófano, seis para la vía de las quinureninas y una para la vía de la serotonina; considerando que tengan una longitud de 18 a 25 pb, una temperatura de hibridación ( $T_m$ ) entre 57 a 63 °C, un GC% de 41 a 62 y que no formen horquillas, como se observa en la Tabla 2 y 3.
- Se analizó la eficiencia de los oligonucleótidos diseñados, a través de qPCR (Figura 8, 9 y 10), donde se consideraron aquellos que mostraban un único pico en la curva de disociación y que presentaran valores de eficiencia entre 90 y 120%, por lo que finalmente de las siete enzimas nos quedamos sólo con tres; de las cuales se realizó posteriormente una electroforesis para comprobar su especificidad, obteniendo como resultado amplicones de aproximadamente 150 pb (Figura 11).
- Se extrajo el ARN a partir del raspaje de mucosa del duodeno de los diferentes fondos genéticos murinos y se realizaron sus respectivos dosajes para observar la concentración y pureza (contaminación por proteínas o sales) que presentaban; como resultado, en ambos protocolos, se obtuvieron valores superiores al mínimo indicador de contaminación, como podemos observar en las Tablas 6, 7 y 8.
- Se realizó el tratamiento de DNAsa a los ARN extraídos y posteriormente la retro-transcripción. El ADNc obtenido se guardó a -20°C hasta su utilización, para evitar su degradación.
- Se observó que la expresión del ARNm del gen *Ido1* es mayor en la dieta a base de cereales en comparación a la dieta rica en grasas, para ambos protocolos (Figura 18 y 19).
- En cuanto al gen *Kynu*, se mostró en el primer protocolo una mayor expresión en la dieta a base de cereales; caso contrario al segundo protocolo, donde la expresión mayor, aunque con muy poca diferencia, se da en el régimen rico en grasas (Figura 18 y 19).
- Para nuestro último gen, *Tph1*, la expresión resultante en el primer protocolo, difiere entre ambas muestras utilizadas, ADNc obtenido en mayo 2010 y uno actual, para el primer caso se observó una mayor expresión en la dieta basada en cereales,

contrariamente al segundo, donde la mayor expresión se da en la dieta rica en grasas. Para el segundo protocolo, al igual que en el caso de Kynu, se vio una mayor expresión, con una mínima diferencia, en el régimen rico en grasas (Figura 18 y 19).

- Finalmente, se demostró que la dieta puede influenciar en la expresión de enzimas de las vías metabólicas del triptófano, pero a la vez, se ha demostrado que existen ciertas limitaciones en el uso de modelos murinos para el estudio de éstas vías metabólicas. En nuestro estudio, gracias al análisis estadístico por medio de la prueba T-student, se observó una diferencia no significativa en la expresión de las tres enzimas analizadas; sin embargo, existe una tendencia a disminuir la expresión en la vía de las quinureninas y a aumentar, en la vía de la serotonina en los protocolos alimentados con la dieta rica en grasas.



## Referencias Bibliográficas

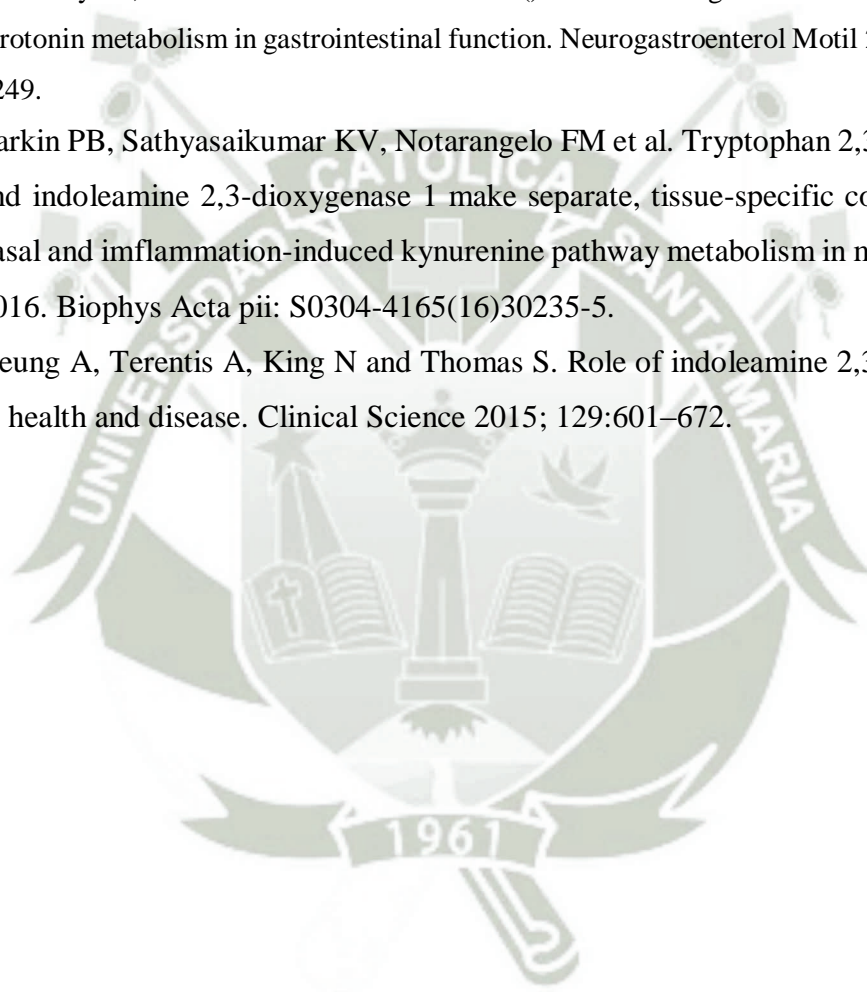
1. Landois L. and Stirling W. Textbook of Human Physiology. P. Blakiston. 1889.
2. Curtis H. and Barnes N. Biology, 5ta edición. Worth. 1999: 544.
3. Avraham R. The digestive system. Chelsea House. 2000: 353.
4. Kaur S. and Gill S. Age-related changes in the activities of epoxide hydrolases in different tissues of mice. *Drug Metab Dispos* 1985; 13(6):711-5.
5. Thomas Aranas Effect des lipids alimentaires sur l-abondance et la fonction de les cellules enteroendocrines au cœur de l'obesite et de la diabete type 2
6. Sjölund K., Sandén G., Hakanson R. and Sundler F. Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study. *Gastroenterology* 1983; 85(5):1120-30.
7. Hansen MB. and Witte AB. The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. *Acta Physiol (Oxf)* 2008; 193(4):311-23.
8. Trabelsi MS, Daoudi M, Prawitt J. et al. Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nat Commun.* 2015; 6: 7629.  
[Tesis doctoral y Artículo científico]
9. Oxenkrug GF. Tryptophan kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environmental impacts in major depressive disorder: the serotonin hypothesis revisited 40 years later. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 2010; 47(1):56-63.
10. Peters JC. Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. *Adv Exp Med Biol.* 1991; 294:345-358.
11. Thomas SR and Stocker R. Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Rep.* 1999; 4(5):199-220.
12. Allegri G, Ragazzi E, Bertazzo A, Costa C. and Rocchi R. Tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in rats. En: Allegri G, Costa C, Ragazzi E et al. *Developments in tryptophan and serotonin metabolism.* New York: Kluwer/Academic Plenum Publishers. 2003; p.481-496.
13. Comai S, Costa C, Ragazzi E, Bertazzo A, Allegri G. The effect of age on the enzyme activities of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in rats. *Clinica Chimica Acta.* 2005; 360:67-80.

14. Mellor AL and Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4:762–774.
15. Basran J, Rafice SA, Chauhan N. et al. A kinetic, spectroscopic, and redox study of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochemistry* 2008; 47:4752–4760.
16. Dai X. and Zhu BT. Indoleamine 2,3-dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice: implications for its biological functions. *J. Histochem. Cytochem.* 2010; 58:17–28.
17. Munn DH, Sharma MD, Lee JR et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 2002; 297:1867–1870.
18. Katz JB; Muller AJ and Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape, *Immunol. Rev.* 2008; 222:206–221.
19. Buthua Y; Babu E and Ganapathy V. Interferon- $\gamma$  induces a tryptophan-selective amino acid transporter in human colonic epithelial cells and mouse dendritic cells. *Biochim. Biophys Acta* 2015; 1848:453-462.
20. Deac OM, Milss JL, Shane B et al. Tryptophan catabolism and vitamin B-6 status are affected by gender and lifestyle factors in healthy young adults. *J Nutr* 2015; 145(4):701-7.
21. Han Q, Cai T, Tagle DA and Li J. Thermal stability, pH dependence and inhibition of four murine kynurenine aminotransferases. *BMC Biochem* 2010; 19:11-19.
22. Mawe GM and Hoffman JM. Serotonin signalling in the gut—functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 10:473–486
23. Crane D, Palanivel R, Motillo E et al. Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat Med.* 2015; 21:166-172.
24. Gershon MD. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2013; 20:14–21.
25. Lesurtel M, Soll C, Graf R and Clavien PA. Role of serotonin in the hepatogastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:940–52.
26. Mawe GM, Coates MD and Moses PL. Review article: intestinal serotonin signaling in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23:1067–76.

27. Beattie DT and Smith JA. Serotonin pharmacology in the gastrointestinal tract: a review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008; 377:181–203.
28. Kim DY and Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:2698–709.
29. Gruninger TR, LeBoeuf B, Liu Y and Garcia LR. Molecular signaling involved in regulating feeding and other motivated behaviors. *Mol Neurobiol* 2007; 35:1–20.
30. Lovelace MD, Varney B, Sundaram G. et al. Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases. *Neuropharmacology* 2016; pii: S0028-3908(16)30096.
31. Okamoto H. Recent advances in physiological and pathological significance of tryptophan – NAD metabolites: lessons from insulin-producing pancreatic beta-cells. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 527:243–252.
32. Munipally PK, Agraharm G, Valavala K, Gundae S, Turlapati N. Evaluation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression and kynurenine pathway metabolites levels in serum samples of diabetic retinopathy patients. *Archives of Physiology and Biochemistry* 2011; 117(5):254–258.
33. Wolowczuk I, Hennart B, Leloire A et al. Tryptophan metabolism activation by indoleamine 2,3-dioxygenase in adipose tissue of obese women: an attempt to maintain immune homeostasis and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012; 303:R135–43.
34. Tamay de Dios L, Ibarra C and Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en Salud* 2013; Vol.2:70-78.
35. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 2012; 62:3923.
36. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* 1992; 10:413-417.
37. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* 1993; 11:1026-1030.
38. Stratagene. Introduction to quantitative PCR: Methods and applications guide. 2007.
39. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32:103.

40. Ririe, KM, Rasmussen RP and Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 1997; 245(2):154-160.
41. Giglio S, Monis PT and Saint CP. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research* 2003; 31(22):e136.
42. Bustin SA and Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004; 15(3):155-66.
43. Ambion Biosystems. 2008. «Use of Internal and External Standards or Reference RNAs for Accurate Quantitation of RNA Levels.
44. Bustin SA. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR.: a snapshot of current procedures and preferences. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005; 5(4):493-8.
45. Huggett, J, Dheda K, Bustin S and Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immun.* 2005; 6(4): 279-284.
46. Li L, Hu Y, Wang L, Mitchell M, Berger A and Coleman R. Early hepatic insulin resistance in mice: a metabolomics analysis. *Mol Endocrinol.* 2010; 24(3):657-66.
47. Wolowczuk I, Hennart B, Leloire A et al. Tryptophan metabolism activation by indoleamine 2,3-dioxygenase in adipose tissue of obese women: an attempt to maintain immune homeostasis and vascular tone. *AJP Regul Integr Comp Physiol* 2012; 303:R135-R143.
48. Favennec M, Hennart B, Caiazzo R et al. The kynurenine pathway is activated in human obesity and shifted toward kynurenine monooxygenase activation. *Obesity* 2015; 23:2066-2074.
49. Poulain-Godefroy O, Eury E, Leloire A et al. Induction of TDO2 and IDO2 in liver by high-fat feeding in mice: discrepancies with human obesity. *Int J Tryptophan Res.* 2013;6(Suppl. 1):29-37.
50. Keszthelyi D, Troost F, Jonkers D et al. Does acute tryptophan depletion affect peripheral serotonin metabolism in the intestine? *Am J Clin Nutr.* 2012; 2(95):603-8.
51. Myint AM. Kynurenines: from the perspective of major psychiatric disorders. *FEBS J.* 2012; 279(8):1375-1385.
52. Nonogaki K and Kaji T. Pharmacological stimulation of serotonin 5-HT1B receptors enhances increases in plasma active glucagon-like peptide-1 levels induced by

- dipeptidyl peptidase-4 inhibition independently of feeding in mice. *Diabetes Metab.* 2015; 41(5):425-428.
53. Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ and Wu HQ. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012; 13(7):465–477.
54. Myint AM, Schwarz MJ and Müller N. The role of the kynurenine metabolism in major depression. *J. Neural Transm.* 2012; 119(2):245–251.
55. Savitz J. Role of kynurenine metabolism pathway activation in major depressive disorders. *Curr Top Behav Neurosci.* 2016
56. Keszthelyi D, Troost FJ and Masclee AAM. () Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21:1239–1249.
57. Larkin PB, Sathyaikumar KV, Notarangelo FM et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 make separate, tissue-specific contributions to basal and inflammation-induced kynurenine pathway metabolism in mice. *Biochim.* 2016. *Biophys Acta pii: S0304-4165(16)30235-5.*
58. Yeung A, Terentis A, King N and Thomas S. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. *Clinical Science* 2015; 129:601–672.



## Anexos

Protocolo 43: ratones hembras (fondo genético SV129), Rev-erba CD/HDF

Sacrificio: 26 de mayo del 2010

<b>ID</b>	<b>Grupo</b>
771	R $\alpha$ WT CD
47	R $\alpha$ WT CD
786	R $\alpha$ WT CD
46	R $\alpha$ WT CD
45	R $\alpha$ WT CD
51	R $\alpha$ WT HFD
751	R $\alpha$ WT HFD
782	R $\alpha$ WT HFD
745	R $\alpha$ WT HFD
756	R $\alpha$ WT HFD
48	R $\alpha$ WT HFD
761	R $\alpha$ WT HFD

## Protocolo 86: ratones machos (fondo genético C57BI6/J), CD/HDF

Sacrificio: 8 de enero del 2015

ID	Grupo
111	CD
104	CD
106	CD
103	CD
105	CD
107	CD
110	CD
113	CD
129	HFD
128	HFD
123	HFD
125	HFD
124	HFD
126	HFD
130	HFD

Tabla 9. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Ido1, utilizando la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 43 (RT mayo 2010)

	Pozo	Gen	N° raton	Ct Ido1	media Ct	sd Ct	Ct Ciclo	media Ct Ciclo	dCt	media control	ddCt	potencia	media	sd
CHOW	A1	Ido1	771	32.29	32.35	0.08	26.22	25.97	6.38	5.54	0.84	0.5583	0.6247	0.1749
	A2	Ido1	771	32.41			25.71							
	B1	Ido1	47	32.87	33.12	0.35	26.59	26.55	6.56		1.02	0.4928		
	B2	Ido1	47	33.36			26.51							
	C1	Ido1	786	31.69	31.57	0.18	25.78	25.74	5.83		0.28	0.8230		
	C2	Ido1	786	31.44			25.7							
	D1	Ido1	46	36.39	36.39	#¡DIV/0!	31.18	31.56	4.84		-0.71	1.6347		
	D2	Ido1	46	No Ct			31.93							
E1	Ido1	45	36.1	37.62	2.14	31.83	31.99	4.11	-1.43	2.7019				
E2	Ido1	45	39.13			32.15								
HFD	F1	Ido1	51	37.49	36.54	1.35	29.44	29.45	6.14	0.59	0.6639			
	F2	Ido1	51	35.58			29.45							
	B3	Ido1	751	38.52	38.52	#¡DIV/0!	32.31	32.31	6.21		0.67	0.6303		
	B4	Ido1	751	No Ct			No Ct							
	C3	Ido1	782	29.79	29.77	0.04	22.53	22.50	7.27		1.72	0.3033		
	C4	Ido1	782	29.74			22.47							
	D3	Ido1	745	34.29	34.27	0.04	27.3	27.33	6.935		1.39	0.3813		
	D4	Ido1	745	34.24			27.36							
	E3	Ido1	756	32.53	32.49	0.06	26.22	26.16	6.33		0.79	0.5799		
	E4	Ido1	756	32.44			26.09							
	F3	Ido1	48	31.8	31.89	0.13	26.08	25.95	5.95		0.40	0.7573		
	F4	Ido1	48	31.98			25.81							
G3	Ido1	761	35.54	35.48	0.09	29.29	29.72	5.76	0.22	0.8609				
G4	Ido1	761	35.41			30.14								
Blancos	H3	Ido1	A	39.09	39.09	#¡DIV/0!	35.83	35.83						
	H4	Ido1	A	No Ct			34.09							
	A5	Ido1	E	37.52	37.84	0.45	No Ct	No Ct	No Ct					
	A6	Ido1	E	38.15			32.88							
	B5	Ido1	Q	39.29	39.29	#¡DIV/0!	34.7	34.7	No Ct					
	B6	Ido1	Q	No Ct			No Ct							

Tabla 10. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Ido1, utilizando la media de la Actina y la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 43 (RT actual)

	Pozo	Gen	N° raton	Ct Ido1	media Ct	sd Ct	Ct Actina	Ct Ciclo	media Ct Ciclo/Act	dCt	media control	ddCt	potencia	media	sd	
CHOW	A1	Ido1	771	27.29	27.04	0.35	26.73	24.3	25.47	1.58	0.69	0.89	0.5398	1.3627	1.2983	
	A2	Ido1	771	26.79			26.83	24								
	B1	Ido1	47	29.34	29.40	0.08	29.26	26.2	27.96	1.43		0.75	0.5958			
	B2	Ido1	47	29.45			29.41	27								
	C1	Ido1	786	27.99	27.86	0.19	27.5	25.1	26.33	1.53		0.84	0.5579			
	C2	Ido1	786	27.72			27.57	25.2								
	D1	Ido1	46	28.27	28.31	0.05	29.72	27.1	28.27	0.04		-0.65	1.5697			
	D2	Ido1	46	28.34			28.52	27.8								
	E1	Ido1	45	30.92	30.73	0.27	32.97	30.9	31.68	-1.14		-1.83	3.5504			
	E2	Ido1	45	30.54			31.29	31.6								
	HFD	F1	Ido1	51	30.5	30.66	0.22	30.02	29	29.44		1.07	0.38			0.7687
		F2	Ido1	51	30.81			29.92	28.8							
B3		Ido1	751	26.68	26.60	0.12	26.78	24.7	25.70	0.89	0.21	0.8663				
B4		Ido1	751	26.51			26.93	24.4								
C3		Ido1	782	26.98	26.86	0.17	25.68	23.7	24.89	1.98	1.29	0.4091				
C4		Ido1	782	26.74			26.67	23.5								
D3		Ido1	745	29.41	30.06	0.91	29.5	32	29.65	0.40	-0.28	1.2167				
D4		Ido1	745	<del>30.7</del>			No Ct	27.6								
E3		Ido1	756	29.02	29.12	0.14	28.05	26.2	27.16	1.96	1.28	0.4127				
E4		Ido1	756	29.22			28.59	25.8								
F3		Ido1	48	28.85	29.03	0.25	28.26	26.9	27.52	1.51	0.83	0.5637				
F4		Ido1	48	29.21			28.6	26.3								
G3	Ido1	761	<del>30.65</del>	29.90	1.07	29.46	28.1	28.53	0.61	-0.07	1.0519					
G4	Ido1	761	29.14			29.47	27.1									
Blancos	H3	Ido1	A	30.86	31.38	0.73	38.04	32.1	34.88							
	H4	Ido1	A	31.89			No Ct									
	A5	Ido1	E	31.55	31.56	0.01	38.78	33.1	34.67							
	A6	Ido1	E	31.57			35.8	31								
	B5	Ido1	Q	30.66	30.73	0.09	37.22	31.5	34.235							
	B6	Ido1	Q	30.79			36.27	31.9								

Tabla 11. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Ido1, utilizando la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 86.

	Pozo	Gen	N° raton	Ct Ido1	media Ct	sd Ct	Ct Ciclo	media Ct Ciclo	dCt	media control	ddCt	potencia	media	sd
CHOW	B1	Ido1	111	35.2	35.47	0.38	33.53	33.80	1.68	2.63	-0.96	1.9428	1.2380	0.8574
	B2	Ido1	111	35.74			34.06							
	D1	Ido1	104	33.47	33.30	0.24	28.85	28.69	4.61		1.98	0.2532		
	D2	Ido1	104	33.13			28.52							
	E1	Ido1	106	33.43	33.96	0.74	30.78	31.05	2.91		0.28	0.8254		
	E2	Ido1	106	34.48			31.31							
	F1	Ido1	103	33.62	33.76	0.20	30.51	30.56	3.20		0.57	0.6751		
	F2	Ido1	103	33.9			30.61							
	G1	Ido1	105	33.39	33.3	0.13	30.69	30.73	2.58		-0.06	1.0411		
	G2	Ido1	105	33.21			30.76							
	A3	Ido1	107	31.88	31.87	0.01	29.35	29.47	2.41		-0.23	1.1713		
	A4	Ido1	107	31.86			29.58							
C5	Ido1	110	31.87	31.64	0.33	30.52	30.59	1.05	-1.58	2.9962				
C6	Ido1	110	31.41			30.66								
E5	Ido1	113	33.51	33.455	0.08	30.57	30.82	2.64	0.00	0.9987				
E6	Ido1	113	33.4			31.07								
HFD	B3	Ido1	129	35.76	35.88	0.16	31.78	31.65	4.23	1.59	0.3317			
	B4	Ido1	129	35.99			31.52							
	D3	Ido1	128	33.66	33.71	0.06	31.37	31.63	2.08		-0.56	1.4724		
	D4	Ido1	128	33.75			31.89							
	G3	Ido1	123	33.32	33.515	0.28	30.07	30.20	3.32		0.68	0.6234		
	G4	Ido1	123	33.71			30.33							
	H3	Ido1	125	31.48	31.53	0.06	29.03	29.13	2.40		-0.24	1.1795		
	H4	Ido1	125	31.57			29.23							
	A5	Ido1	124	33.43	33.485	0.08	30.4	31.57	1.92		-0.72	1.6450		
	A6	Ido1	124	33.54			32.74							
B5	Ido1	126	34.17	34.27	0.14	31.93	32.12	2.15	-0.48	1.3978				
B6	Ido1	126	34.37			32.31								
G5	Ido1	130	35.22	36.01	1.12	32.68	32.66	2.57	-0.07	1.0484				
G6	Ido1	130	36.8			32.63								
Blancos	A7	Ido1	E	No Ct	36.52	#DIV/0!	38.29	37.44						
	A8	Ido1	E	36.52			36.58							
	B7	Ido1	A	39.31	39.31	#DIV/0!	37.8	37.78						
	B8	Ido1	A	No Ct			37.75							
	C7	Ido1	Q	No Ct	#DIV/0!	#DIV/0!	38.75	37.05						
	C8	Ido1	Q	No Ct			35.34							

Tabla 12. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Kynu, utilizando la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 43 (RT mayo 2010).

	Pozo	Gen	N° raton	Ct Kynu	media Ct	sd Ct	Ct Ciclo	media Ct Ciclo	dCt	media control	ddCt	potencia	media	sd	
CHOW	A7	Kynu	771	31.88	31.88	#iDIV/0!	26.22	25.97	5.92	7.27	-1.36	2.5624	1.2723	0.9689	
	A8	Kynu	771	No Ct			25.71				0.56	0.6795			
	B7	Kynu	47	No Ct			34.38				7.83	0.56			0.6795
	B8	Kynu	47	34.38			26.51								
	C7	Kynu	786	34.54	34.35	0.27	25.78	25.74	8.61		1.34	0.3957			
	C8	Kynu	786	34.16			25.7				-0.54	1.4515			
	D7	Kynu	46	No Ct			38.29								
	D8	Kynu	46	38.29			31.18	31.56	6.74						
E7	Kynu	45	33.33	33.765	0.62	31.83	31.99	1.34	-5.93	61.0746					
E8	Kynu	45	34.2			32.15									
HFD	F7	Kynu	51	33.37	33.76	0.55	29.44	29.45	4.32	4.0391	-2.96	7.7678	2.5942		
	F8	Kynu	51	34.15			29.45				#iDIV/0!	#iDIV/0!			
	B9	Kynu	751	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	32.31	32.31	#iDIV/0!		#iDIV/0!	#iDIV/0!			
	B10	Kynu	751	No Ct			No Ct								
	C9	Kynu	782	29.18	29.02	0.23	22.53	22.50	6.52		-0.75	1.6847			
	C10	Kynu	782	28.86			22.47				-1.83	3.5615			
	D9	Kynu	745	35.53	34.15	1.95	27.3	27.33	5.44						
	D10	Kynu	745	32.77			27.36				-0.01	1.0052			
	E9	Kynu	756	39.49	36.455	4.29	26.22	26.16	7.27						
	E10	Kynu	756	33.42			26.09				-2.00	3.9931			
F9	Kynu	48	31.22	35.36	5.85	26.08	25.95	5.28							
F10	Kynu	48	39.5			25.81			-2.64	6.2225					
G9	Kynu	761	38.29	36.32	2.79	29.29	29.72	4.64							
G10	Kynu	761	34.35			30.14									
Blancos	H9	Kynu	A	39.03	39.36	0.47	35.83	34.96							
	H10	Kynu	A	39.69			34.09								
	A11	Kynu	E	39.63	39.63	#iDIV/0!	No Ct	32.88							
	A12	Kynu	E	No Ct			32.88								
	B11	Kynu	Q	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	34.7	34.70							
	B12	Kynu	Q	No Ct			No Ct								

Tabla 13. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Kynu, utilizando la media de la Actina y la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 43 (RT actual)

	Pozo	Gen	N° raton	Ct Kynu	media Ct	sd Ct	Ct Actina	Ct Ciclo	media Ct Ciclo/Act	dCt	media control	ddCt	potencia	media	sd
CHOW	A7	Kynu	771	32.75	33.215	0.66	26.73	24.3	25.47	7.29	5.74	1.54	0.3433	1.6040	1.9845
	A8	Kynu	771	<del>33.68</del>			26.83	24							
	B7	Kynu	47	<del>35.52</del>	34.88	0.91	29.26	26.2	27.96	6.27		0.52	0.6950		
	B8	Kynu	47	34.23			29.41	27							
	C7	Kynu	786	<del>34.54</del>	33.56	1.39	27.5	25.1	26.33	6.24		0.50	0.7071		
	C8	Kynu	786	32.57			27.57	25.2							
	D7	Kynu	46	<del>34.71</del>	34.26	0.64	29.72	27.1	28.27	5.53		-0.21	1.1587		
	D8	Kynu	46	33.8			28.52	27.8							
E7	Kynu	45	<del>37.13</del>	36.1	1.46	32.97	30.9	31.68	3.39	-2.36	5.1159				
E8	Kynu	45	35.07			31.29	31.6								
HFD	F7	Kynu	51	<del>36.27</del>	35.19	1.53	30.02	29	29.44	4.67	-1.08	2.1104			
	F8	Kynu	51	34.1			29.92	28.8							
	B9	Kynu	751	<del>34.66</del>	33.68	1.39	26.78	24.7	25.70	7.00	1.26	0.4190			
	B10	Kynu	751	32.7			26.93	24.4							
	C9	Kynu	782	<del>33.4</del>	32.415	1.39	25.68	23.7	24.89	6.55	0.80	0.5734			
	C10	Kynu	782	31.43			26.67	23.5							
	D9	Kynu	745	33.38	34.07	0.97	29.5	32	29.65	3.73	-2.02	4.0418			
	D10	Kynu	745	<del>34.75</del>			No Ct	27.6							
	E9	Kynu	756	33.33	33.785	0.64	28.05	26.2	27.16	6.17	0.43	0.7423			
	E10	Kynu	756	<del>34.24</del>			28.59	25.8							
F9	Kynu	48	<del>34.22</del>	33.58	0.91	28.26	26.9	27.52	5.42	-0.32	1.2483				
F10	Kynu	48	32.94			28.6	26.3								
G9	Kynu	761	34.53	34.76	0.33	29.46	28.1	28.53	6.23	0.49	0.7120				
G10	Kynu	761	34.99			29.47	27.1								
Blancos	H9	Kynu	A	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	38.04	32.1	34.88						
	H10	Kynu	A	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	37.26	No Ct							
	A11	Kynu	E	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	38.78	33.1	34.67						
	A12	Kynu	E	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	35.8	31							
B11	Kynu	Q	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	37.22	31.5	34.235							
B12	Kynu	Q	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	36.27	31.9								

Tabla 14. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Kynu, utilizando la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 86.

	Pozo	Gen	N° raton	Ct Kynu	media Ct	sd Ct	Ct Ciclo	media Ct Ciclo	dCt	media control	ddCt	potencia	media	sd
CHOW	B1	Kynu	111	36.82	36.87	0.07	33.53	33.80	3.08	5.02	-1.95	3.8520	1.2839	1.1003
	B2	Kynu	111	36.92	36.87	0.07	34.06	33.80	3.08		1.79	0.2893		
	D1	Kynu	104	35.29	35.50	0.29	28.85	28.69	6.81		-0.59	1.5007		
	D2	Kynu	104	35.7	35.50	0.29	28.52	28.69	6.81		-0.22	1.1652		
	E1	Kynu	106	35.48	36.56	1.52	30.78	31.05	4.44		-0.16	1.1178		
	E2	Kynu	106	37.63	36.56	1.52	31.31	31.05	4.44		0.22	0.8560		
	F1	Kynu	103	36.93	36.15	1.11	30.51	30.56	4.80		0.18	0.8831		
	F2	Kynu	103	35.36	36.15	1.11	30.61	30.56	4.80		0.72	0.6074		
	G1	Kynu	105	35.81	35.585	0.32	30.69	30.73	4.86					
	G2	Kynu	105	35.36	35.585	0.32	30.76	30.73	4.86					
	A3	Kynu	107	35.1	34.905	0.28	29.35	29.47	5.25					
	A4	Kynu	107	34.71	34.905	0.28	29.58	29.47	5.25					
C5	Kynu	110	35.79	36.215	0.60	30.52	30.59	5.20						
C6	Kynu	110	36.64	36.215	0.60	30.66	30.59	5.20						
E5	Kynu	113	36.56	37.325	1.08	30.57	30.82	5.74						
E6	Kynu	113	38.09	37.325	1.08	31.07	30.82	5.74						
HFD	B3	Kynu	129	37.93	37.31	0.88	31.78	31.65	5.04		0.02	0.9867	1.4032	1.2085
	B4	Kynu	129	36.69	37.31	0.88	31.52	31.65	5.04		0.79	0.5766		
	D3	Kynu	128	37.6	37.45	0.22	31.37	31.63	5.82		1.41	0.3765		
	D4	Kynu	128	37.29	37.45	0.22	31.89	31.63	5.82		0.57	0.6739		
	G3	Kynu	123	36.93	36.63	0.42	30.07	30.20	6.43		-1.26	2.3960		
	G4	Kynu	123	36.33	36.63	0.42	30.33	30.20	6.43		-0.16	1.1178		
	H3	Kynu	125	34.66	34.72	0.08	29.03	29.13	5.59		-1.89	3.6951		
	H4	Kynu	125	34.78	34.72	0.08	29.23	29.13	5.59					
	A5	Kynu	124	36.4	35.865	0.76	30.4	31.57	3.76					
	A6	Kynu	124	35.33	35.865	0.76	32.74	31.57	3.76					
B5	Kynu	126	38.52	37.75	1.09	31.93	32.12	4.86						
B6	Kynu	126	36.98	37.75	1.09	32.31	32.12	4.86						
G5	Kynu	130	35.79	35.97	0.25	32.68	32.66	3.14						
G6	Kynu	130	36.15	35.97	0.25	32.63	32.66	3.14						
Blancos	A7	Kynu	E	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	38.29	37.44						
	A8	Kynu	E	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	36.58	37.44						
	B7	Kynu	A	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	37.8	37.78						
	B8	Kynu	A	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	37.75	37.78						
	C7	Kynu	Q	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	38.75	37.05						
C8	Kynu	Q	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	35.34	37.05							

Tabla 15. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Tph1, utilizando la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 43 (RT mayo 2010).

	Pozo	Gen	N° raton	Ct Tph1	media Ct	sd Ct	Ct Ciclo	media Ct Ciclo	dCt	media control	ddCt	potencia	media	sd
CHOW	A7	Tph1	771	31.84	31.675	0.23	26.22	25.97	5.71	6.01	-0.30	1.2311	2.7501	3.7843
	A8	Tph1	771	31.51			25.71							
	B7	Tph1	47	32.53	32.65	0.17	26.59	26.55	6.10		0.09	0.9395		
	B8	Tph1	47	32.77			26.51							
	C7	Tph1	786	32.11	31.96	0.21	25.78	25.74	6.22		0.21	0.8645		
	C8	Tph1	786	31.81			25.7							
	D7	Tph1	46	37.3	37.3	#iDIV/0!	31.18	31.56	5.75		-0.27	1.2016		
	D8	Tph1	46	No Ct			31.93							
E7	Tph1	45	34.78	34.75	0.04	31.83	31.99	2.76	-3.25	9.5137				
E8	Tph1	45	34.72			32.15								
HFD	F7	Tph1	51	34.38	34.55	0.24	29.44	29.45	5.11	-0.91	1.8725			
	F8	Tph1	51	34.72			29.45							
	B9	Tph1	751	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	32.31	32.31	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!			
	B10	Tph1	751	No Ct			No Ct							
	C9	Tph1	782	28.72	29.025	0.43	22.53	22.50	6.53	0.51	0.6998			
	C10	Tph1	782	29.33			22.47							
	D9	Tph1	745	31.49	31.98	0.69	27.3	27.33	4.65	-1.36	2.5669			
	D10	Tph1	745	32.47			27.36							
	E9	Tph1	756	31.23	31.135	0.13	26.22	26.16	4.98	-1.03	2.0420			
	E10	Tph1	756	31.04			26.09							
F9	Tph1	48	31.02	31.21	0.27	26.08	25.95	5.27	-0.75	1.6760				
F10	Tph1	48	31.4			25.81								
G9	Tph1	761	33.46	33.58	0.17	29.29	29.72	3.87	-2.15	4.4229				
G10	Tph1	761	33.7			30.14								
Blancos	H9	Tph1	A	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	35.83	34.96						
	H10	Tph1	A	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	34.09							
	A11	Tph1	E	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	No Ct	32.88						
	A12	Tph1	E	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	32.88							
	B11	Tph1	Q	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	34.7	34.70						
	B12	Tph1	Q	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	No Ct							

Tabla 16. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Tph1, utilizando la media de la Actina y la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 43 (RT actual).

	Pozo	Gen	N° raton	Ct Tph1	media Ct	sd Ct	Ct Actina	Ct Ciclo	media Ct Ciclo/Act	dCt	media control	ddCt	potencia	media	sd
CHOW	A7	Tph1	771	28.7	28.62	0.11	26.73	24.3	25.47	3.16	2.32	0.84	0.5592	1.1427	0.6532
	A8	Tph1	771	28.54			26.83	24							
	B7	Tph1	47	30.27	30.16	0.16	29.26	26.2	27.96	2.19		-0.12	1.0898		
	B8	Tph1	47	30.04			29.41	27							
	C7	Tph1	786	29.29	29.48	0.27	27.5	25.1	26.33	3.15		0.84	0.5602		
	C8	Tph1	786	29.67			27.57	25.2							
	D7	Tph1	46	30.27	30.13	0.21	29.72	27.1	28.27	1.86		-0.46	1.3770		
	D8	Tph1	46	29.98			28.52	27.8							
	E7	Tph1	45	32.8	32.91	0.16	32.97	30.9	31.68	1.23		-1.09	2.1273		
	E8	Tph1	45	33.02			31.29	31.6							
HFD	F7	Tph1	51	31.97	31.88	0.13	30.02	29	29.44	2.44	0.12	0.9180			
	F8	Tph1	51	31.78			29.92	28.8							
	B9	Tph1	751	28.35	28.26	0.13	26.78	24.7	25.70	2.56	0.24	0.8462			
	B10	Tph1	751	28.17			26.93	24.4							
	C9	Tph1	782	27.82	27.785	0.05	25.68	23.7	24.89	2.90	0.58	0.6673			
	C10	Tph1	782	27.75			26.67	23.5							
	D9	Tph1	745	29.95	30.00	0.07	29.5	32	29.65	0.35	-1.97	3.9150			
	D10	Tph1	745	30.05			No Ct	27.6							
	E9	Tph1	756	29.63	29.605	0.04	28.05	26.2	27.16	2.45	0.13	0.9132			
	E10	Tph1	756	29.58			28.59	25.8							
F9	Tph1	48	30	29.985	0.02	28.26	26.9	27.52	2.47	0.15	0.9006				
F10	Tph1	48	29.97			28.6	26.3								
G9	Tph1	761	31.2	30.91	0.41	29.46	28.1	28.53	2.38	0.07	0.9553				
G10	Tph1	761	30.62			29.47	27.1								
Blancos	H9	Tph1	A	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	38.04	32.1	34.88						
	H10	Tph1	A	No Ct			No Ct								
	A11	Tph1	E	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	38.78	33.1	34.67						
	A12	Tph1	E	No Ct			35.8	31							
	B11	Tph1	Q	No Ct	37.03	#iDIV/0!	37.22	31.5	34.235						
	B12	Tph1	Q	37.03			36.27	31.9							

Tabla 17. Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Tph1, utilizando la Ciclofilina como gen de referencia en el protocolo 86.

	Pozo	Gen	N° raton	Ct Tph1	media Ct	sd Ct	Ct Ciclo	media Ct Ciclo	dCt	media control	ddCt	potencia	media	sd
CHOW	B1	Tph1	111	30.41	29.965	0.63	33.53	33.80	-3.83	-1.68	-2.15	4.4518	1.5627	1.5037
	B2	Tph1	111	29.52			34.06							
	D1	Tph1	104	29.8	29.62	0.25	28.85	28.69	0.93		2.61	0.1637		
	D2	Tph1	104	29.44			28.52							
	E1	Tph1	106	29.93	30.46	0.74	30.78	31.05	-1.12		0.56	0.6780		
	E2	Tph1	106	30.98			31.31							
	F1	Tph1	103	29.5	29.66	0.22	30.51	30.56	-0.91		0.77	0.5862		
	F2	Tph1	103	29.81			30.61							
	G1	Tph1	105	27.88	27.92	0.06	30.69	30.73	-2.81		-1.13	2.1876		
	G2	Tph1	105	27.96			30.76							
	A3	Tph1	107	27.94	28.26	0.45	29.35	29.47	-1.21		0.47	0.7217		
	A4	Tph1	107	28.58			29.58							
C5	Tph1	110	27.2	27.34	0.20	30.52	30.59	-3.25	-1.57	2.9781				
C6	Tph1	110	27.48			30.66								
E5	Tph1	113	29.64	29.59	0.07	30.57	30.82	-1.23	0.45	0.7343				
E6	Tph1	113	29.54			31.07								
HFD	B3	Tph1	129	30.52	30.52	0.01	31.78	31.65	-1.14	0.54	0.6875	2.0658	1.4515	
	B4	Tph1	129	30.51			31.52							
	D3	Tph1	128	29.54	29.83	0.40	31.37	31.63	-1.81		-0.13			1.0938
	D4	Tph1	128	30.11			31.89							
	G3	Tph1	123	28.28	28.45	0.24	30.07	30.20	-1.75		-0.07			1.0529
	G4	Tph1	123	28.62			30.33							
	H3	Tph1	125	26.32	26.19	0.19	29.03	29.13	-2.95		-1.27			2.4106
	H4	Tph1	125	26.05			29.23							
	A5	Tph1	124	27.68	27.58	0.14	30.4	31.57	-3.99		-2.31			4.9739
	A6	Tph1	124	27.48			32.74							
	B5	Tph1	126	29.26	29.165	0.13	31.93	32.12	-2.96		-1.28			2.4273
	B6	Tph1	126	29.07			32.31							
G5	Tph1	130	30.53	30.12	0.58	32.68	32.66	-2.54	-0.86	1.8143				
G6	Tph1	130	29.71			32.63								
Blancos	A7	Tph1	E	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	38.29	37.44						
	A8	Tph1	E	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	36.58							
	B7	Tph1	A	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	37.8	37.78						
	B8	Tph1	A	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	37.75							
	C7	Tph1	Q	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	38.75	37.05						
	C8	Tph1	Q	No Ct	#iDIV/0!	#iDIV/0!	35.34							