



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**EFFECTO DEL ZUMO DE GRANADA EN LA EXPRESIÓN
DEL GEN DE LA PARAOXONASA 1(PON1) EN
RATONES CD-1 DIABETIZADOS Y ALIMENTADOS CON
UNA DIETA ATEROGÉNICA**

T E S I S

Que para obtener el título de
Licenciado en Nutrición

P R E S E N T A

José Antonio Guerrero Solano.

Bajo la Dirección de:
Dr. Gabriel Betanzos Cabrera.



Pachuca, Hgo., Mayo de 2010

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	v
1. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES.....	3
2.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA DIABETES.....	5
2.3 COMPLICACIONES DE LA DIABETES.....	7
2.4 DIABETES Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	8
2.5 ATEROSCLEROSIS.....	9
2.6 PARAOXONASA.....	10
2.6.1 PON 1.....	11
2.6.2 PON 1 y Aterosclerosis.....	12
2.7 INFORMACIÓN GENÉTICA.....	13
2.7.1 Replicación.....	14
2.7.2 Transcripción.....	15
2.7.3 Traducción.....	16
2.8 GENÓMICA NUTRICIONAL.....	16
2.8.1 Dieta y Expresión Génica.....	17
2.9 GRANADA.....	18
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	24
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. OBJETIVOS	26
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
6. HIPÓTESIS	27
7. DISEÑO METODOLÓGICO	28

7.1 ESQUEMA DEL DISEÑO METODOLÓGICO.....	28
7.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	29
7.3 DIETAS Y PROCEDIMIENTOS.....	29
7.4 EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PON1.	31
7.4.1 Aislamiento de ARN total.	31
7.4.2 Diseño de oligonucleótidos para PCR.....	31
7.4.3 Perfil de expresión por RT-PCR.....	32
7.5 Análisis Estadístico	33
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8.1 EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PON1.	34
8.2 VARIABLES DE PESO	37
9. CONCLUSIONES	41
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
11. ANEXOS	49

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
1. Diez principales países con mayor número de personas de entre 20 y 79 años afectadas con diabetes, con proyecciones para el año 2030	6
2. Complicaciones Agudas y Crónicas de la diabetes	7
3. Principales características de los productos génicos de <i>PON1</i> , <i>PON2</i> y <i>PON3</i> indicando los tejidos donde se expresan	10
4. Producción Anual Nacional 2008 de Granada Modalidad Riego+ Temporal	19
5. Producción Anual Estatal de Hidalgo 2008 de Granada modalidad Riego+ Temporal	20
6. Composición nutrimental de la granada roja por 100g de porción	21
7. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la PCR	31
8. Cuidados y parámetros fisiológicos y bioquímicos de <i>Mus musculus</i>	47
9. Expresión relativa <i>PON1/GAPDH</i> en los distintos tratamientos	48
10. Peso total de los animales por tiempo de sacrificio en los distintos tratamientos	48
11. Peso total del hígado de los animales por sacrificio en los distintos tratamientos	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
1. Flujo de la información genética. Replicación, transcripción y traducción	13
2. Destino y papel de los nutrientes en las células	17
3. Ilustración de <i>Púnica granatum L.</i>	18
4. Diseño metodológico del proyecto de investigación	27
5. Amplificación de los genes <i>PON1</i> y <i>GAPDH</i> . Peso molecular indicado por un MPM	33
6. Media de Expresión Relativa PON1/GAPDH con relación al tiempo de sacrificio	34
7. Peso total de los ratones entre grupos, en relación al tiempo de sacrificio	37
8. Peso del hígado animales de experimentación en relación al tiempo de sacrificio	39
9. Fotografía de ratón de grupo Experimental con visible obesidad	49
10. Comparación del hígado de ratón Control con uno del grupo Tratado	49

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

SIGLA/ ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ADA	Asociación Americana de Diabetes (del inglés American Diabetes Association)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BrEt	Bromuro de Etidio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DG	Diabetes gestacional
dNTP	2'-desoxinucleosidos 5'- trifosfatos (mezcla que contiene los cuatro nucleotidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
ECV	Enfermedad cardiovascular
GAPDH	Gliceraldehído 3P-deshidrogenasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad (del inglés High Density Lipoprotein)
LDL	Lipoproteína de baja densidad (del inglés Low Density Lipoprotein)
MMLV- RT	Transcriptasa reversa de virus de Leucemia Murina (del inglés Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)
Oligo (dT)	El oligo (dT) aparece con la cola poli(A) de un ARNm, pudiendo entonces actuar como cebador para que actúe luego la transcriptasa reversa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPs	Organofosforados
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)
PON	Paraoxonasa
PON1 PON2 y PON3	Paraoxonasa 1, Paraoxonasa 2 y Paraoxonasa 3
<i>PON1 PON2 y PON3</i>	Genes que codifican a las PON's
RT	Transcriptasa Reversa
<i>Taq</i> ADN polimerasa	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>

1. RESUMEN

La diabetes comprende un grupo de trastornos metabólicos que tienen como factor común la presencia de hiperglucemia. Una de sus complicaciones crónicas son las enfermedades cardiovasculares (ECV) secundarias a aterosclerosis, patología en la cual tiene función la enzima Paraoxonasa 1 (PON1). PON son una familia de enzimas (PON1, PON2 y PON3) las cuales además de participar en la destoxificación de organofosforados, tienen potencial antiaterogénico por su capacidad de hidrolizar lípidos oxidados, fosfolípidos y ésteres de colesterol peroxidados. Por otra parte, la granada es un fruto rico en polifenoles, a los cuales se le atribuyen propiedades antioxidantes y antiaterogénicas entre otras. El presente trabajo tuvo como finalidad determinar el efecto del zumo de granada en la expresión del gen de la PON1 en ratones diabetizados y alimentados con una dieta aterogénica. Se utilizaron 45 ratones cepa CD-1, 30 de los cuales fueron diabetizados con estreptozotocina (80 mg/ kg peso), se dividieron en 3 grupos [Control (C), Tratado (T) y Tratado+ Granada (T+G)] aleatoriamente, el grupo C recibió alimento comercial y agua común, ambos grupos T y TG recibieron una dieta aterogénica. El grupo TG recibió zumo de granada roja (12.5 mL/L agua). Tres animales de cada grupo fueron sacrificados periódicamente para extraer el hígado, del cual se obtuvo ARN total, el cual se utilizó para determinar la expresión de la PON1 por RT-PCR usando como gen de referencia a la Gliceraldehído 3P-deshidrogenasa (*GAPDH*). Igualmente se midieron parámetros de peso y peso del hígado. La expresión del gen de la PON1 aumentó en los tres grupos en relación al tiempo, el grupo C mostró la mayor expresión, siendo estadísticamente distinto a los grupos T y T+G en los meses 1-4. El grupo TG tuvo diferencias estadísticamente significativas con relación al grupo T en los meses 3 y 4. Los resultados indican que existe un mecanismo de acción antiaterogénico por parte de la granada, ya que estimula la expresión del gen de la PON1.

Palabras clave: diabetes, aterosclerosis, PON1, zumo de granada, expresión del gen de la PON1.

ABSTRACT

Diabetes is a condition characterized by hyperglycemia. One of the main complications of that condition are the cardiovascular diseases secondary to atherosclerosis disease, which is related with paraoxonase 1 enzyme (PON1). PON are a family of enzymes that includes PON1, PON2 and PON3. Besides its hydrolytic activity whit organophosphates, PONs. are also have antiatherogenic potential by it capability of hydrolyze oxidate lipids, phospholipids and peroxidated cholesterol esters. Otherwise, pomegranate is a polyphenols rich fruit which has antioxidant and antiatherogenic proprieties among others. The objective of this research was determinate the effect of pomegranate fruit on PON1 gene expression in a diabetized and feeded with atherogenic diet mice model. 45 CD-1 mice were used, 30 of them were diabetized with streptozotocin. All of them were divided in 3 groups [control (C), experimental (T) and experimental+ pomegranate (T+G)] randomly. The C group was fed with commercial food and the experimental group T and TG were fed with atherogenic diet. The TG group received also pomegranate juice (12.5 mL/L water). Three animals of each group were sacrificed periodically for a liver extraction of which was obtained total RNA, and after that an RT-PCR profile was realized using as reference gene Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH). Also weight parameters were measured. PON 1 gene expression increased in every groups, mainly in C group (statistical significance in 1-4 months), T+G group had statistical differences related with T group in months 3 and 4. Results indicated that a exists an antiatherogenic mechanism of pomegranate on the stimulation of a PON1 gene expression.

Key words: diabetes, atherosclerosis, PON1, pomegranate juice, PON1 gene expression

2. MARCO TEÓRICO

2.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES

En las últimas décadas y como resultado de una transición epidemiológica ha sido de gran importancia el estudio de las enfermedades crónico no transmisibles (diabetes, hipertensión arterial, obesidad, enfermedad cardiovascular, cáncer pulmonar, úlcera gástrica entre otras) las cuales en el pasado tenían poca incidencia y sin embargo, actualmente se han extendido ampliamente en las sociedades industrializadas y no industrializadas por igual, a tal grado que hoy en día se han convertido en el principal problema de salud pública, siendo las responsables del mayor número de decesos a nivel mundial (Federación Internacional de Diabetes (FID), 2010).

La Asociación Americana de Diabetes (ADA, 2006) define a la diabetes como una “enfermedad que comprende un grupo de trastornos metabólicos, que se caracterizan por la hiperglucemia, resultante de defectos en la producción de insulina, en la acción de la insulina o en ambas. La diabetes puede provocar graves complicaciones y muerte prematura, sin embargo, es una enfermedad de carácter controlable”.

La clasificación de la diabetes sugerida por el comité de expertos de la ADA (2003) incluye 4 clases clínicas descritas a continuación:

1. Diabetes tipo 1 (DT1): Autoinmune, Idiopática.

Causada por la destrucción de células β del páncreas, a menudo de tipo inmunitario, que origina la pérdida de la secreción de insulina y deficiencia insulínica absoluta. Aún no se conocen los elementos causales del proceso autoinmunitario y la destrucción de las células β representa entre 5 y 10% de los casos de diabetes.

2. Diabetes tipo 2 (DT2): Con insulinoresistencia, con insulinopenia.

Producida por una combinación de factores genéticos y no genéticos cuyas consecuencias son la resistencia insulínica y la deficiencia de la insulina. Se ha

investigado de manera intensiva y aunque se han relacionado algunos genes con la aparición de este tipo de diabetes, no se conocen todos los genes específicos ni su mecanismo de acción. Algunos de los factores no genéticos son la edad avanzada, consumo excesivo de calorías, sobrepeso, adiposidad central, vida sedentaria, microsomía y macrosomía al nacer. Corresponde a entre 90 y 95% de los casos de diabetes.

3. Diabetes gestacional (DG).

Este tipo de diabetes consiste en la presencia de hiperglucemia en ayuno o intolerancia a la glucosa leve, ocurre en 3 a 5% de los embarazos. Esta variedad se limita a las mujeres grávidas en quienes aparece o se diagnostica diabetes o intolerancia a la glucosa durante el embarazo. Por tanto las mujeres con diabetes que se embarazan no se incluyen en esta clase.

4. Otros tipos específicos de diabetes:

Esta subclase es pequeña desde el punto de vista numérico, puesto que sólo comprende entre el 1 y 2% de los casos de diabetes. Sin embargo, desde el punto de vista etiológico es bastante heterogénea, ya que la diabetes conlleva muchos otros trastornos y síndromes. En determinados casos, la tolerancia alterada a la glucosa es consecutiva al trastorno (por ejemplo algunas enfermedades endócrinas), mientras que en otros la relación aparentemente es causal pero aún no se ha explicado (por ejemplo ciertos síndromes genéticos). Por tal motivo esta subclase se define según la relación causal conocida o supuesta o su vinculación con otras enfermedades. Estos trastornos se enumeran a continuación:

- a) Defectos genéticos de la célula β .
- b) Defectos genéticos de la acción de la insulina.
- c) Enfermedades del páncreas.
- d) Endocrinopatías.
- e) Inducida por fármacos o agentes químicos.
- f) Infecciones.

- g) Formas infrecuentes autoinmunes.
- h) Síndromes genéticos asociados a diabetes.

2.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA DIABETES

Según reportes de la FID (2010) existen cerca de 285 millones de personas que padecen diabetes en el mundo, lo que representa 6.6% de la población adulta. Las proyecciones del número de personas que desarrollarán diabetes son alarmantes; se estima que para el año 2030, serán 438 millones de las cuales el 80% serán habitantes de países en vías de desarrollo económico. Cada año, seis millones de personas desarrollarán diabetes, las regiones con las mayores tasas de prevalencia son las del mediterráneo oriental y del oriente medio, donde 9,2% de la población adulta están afectadas, además la región de America del norte es otra zona de alta prevalencia con 8.4%. Siete de los 10 países con más casos de diabetes son aquellos denominados en desarrollo, siendo liderados por la India, con 50.8 millones de personas como se muestra en la Tabla 1, en la cual se describen los 10 países con mayor número de personas entre 20 y 79 años afectadas con diabetes en el año 2010, con proyecciones para el año 2030.

Tabla 1. Diez principales países con mayor número de personas de entre 20 y 79 años afectadas con diabetes, con proyecciones para el año 2030

Países		Personas con diabetes (millones) Año 2010	Países		Personas con diabetes (millones) Año 2030
1.	India	50.8	1.	India	87
2.	China	43.2	2.	China	62.6
3.	USA	26.8	3.	USA	36
4.	Rusia	9.6	4.	Pakistán	13.8
5.	Brasil	7.6	5.	Brasil	12.7
6.	Alemania	7.5	6.	Indonesia	12
7.	Pakistán	7.1	7.	México	11.9
8.	Japón	7.1	8.	Bangladesh	10.4
9.	Indonesia	7.0	9.	Rusia	10.3
10	México	6.8	10.	Egipto	8.6

Fuente: Adaptación de Federación Internacional de Diabetes, 2010.

La prevalencia de diabetes en México fluctúa entre 6.5 y 10 millones de personas (10.7% población entre 20 y 69 años). De este gran total, 2 millones de personas no han sido diagnosticadas (Federación Mexicana de Diabetes, 2009). Conforme al número de casos de diabetes reportados en México, éste ocupa el décimo lugar a nivel mundial y podría llegar a ocupar el séptimo lugar para el año 2030 según las proyecciones. Por si esto fuera poco la diabetes es la primera causa de muerte en México (Federación Mexicana de Diabetes, 2009) superando a las enfermedades cardiovasculares (las cuales muchas veces son secundarias a la diabetes) y a las enfermedades del hígado.

En México, en el 2002, Hidalgo fue el tercer estado con mayor tasa de prevalencia de diabetes. Según datos del Sistema Estadístico de Información en Salud, la prevalencia de la enfermedad en este estado, en edades entre 20 y 65 años de edad, fue de 15.1%, lo que significa que aproximadamente 150,529 personas, ese año fueron portadoras de diabetes a nivel local (Rodríguez- Saldaña, 2002). Los últimos

datos registrados de mortalidad general en Hidalgo (Secretaría de Salud de Hidalgo, 2007), muestran tendencia similar a la reportada a nivel nacional, ya que en la entidad la diabetes es la principal causa de desesos con 1427 defunciones en ese año, seguido de las enfermedades isquémicas del corazón (1252 defunciones), cirrosis y otras enfermedades hepáticas (932 defunciones) y enfermedad cerebro vascular (742 defunciones).

2.3 COMPLICACIONES DE LA DIABETES

Las complicaciones de la diabetes se originan debido al aumento o disminución de las concentraciones de glucosa sanguínea y a la cronicidad de estas condiciones. Estas se clasifican en complicaciones agudas y complicaciones crónicas. Éstas son descritas de manera general a continuación (Tabla 2).

Tabla 2. Complicaciones Agudas y Crónicas de la diabetes

Complicaciones agudas
• <i>Hipoglucemia</i>
• <i>Cetoacidosis diabética</i>
• <i>Síndrome hiperglucémico hiperosmolar no cetósico</i>
Complicaciones crónicas
• <i>Macrovasculares</i>
a) <i>Enfermedad coronaria</i>
b) <i>Accidente vascular encefálico</i>
c) <i>Enfermedad vascular arterial periférica</i>
• <i>Microvasculares</i>
a) <i>Nefropatía</i>
b) <i>Retinopatía</i>
c) <i>Neuropatía</i>

Fuente: Adaptado de Serrano-Ríos, 2004 y MedlinePlus Enciclopedia Médica: Diabetes, 2008

2.4 DIABETES Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son enfermedades que afectan el sistema circulatorio y el corazón y que pueden provocar eventos de infarto y la amputación de extremidades inferiores entre otros. La ECV aterosclerótica es la causa más importante de complicaciones y muerte en casos de DT1 y especialmente en casos de DT2 (Chait y Brunzel, 2003), convirtiéndose así en un problema de salud pública mundial (Federación Internacional de Diabetes, 2001).

La diabetes ha sido reconocida como un factor de riesgo independiente para varios tipos de ECV (enfermedad coronaria, enfermedad arterial periférica, cardiomiopatía etc.) en mujeres y especialmente en hombres, de hecho se sabe que las complicaciones crónicas de la diabetes, relacionadas con ECV, representan la primera causa de muerte en estos pacientes, ya que son más frecuentes, más extensas y más letales (NIDDK, 1999).

Se advierte un gran incremento en el riesgo de que surja enfermedad macrovascular en la DT2 incluso desde la fase prediabética (Jarrett, 1992), por lo anteriormente expuesto, los factores de riesgo cardiovascular que surgen en las situaciones mencionadas, seguramente aportarán datos que orienten sobre los mecanismos que intervienen en la patogenia de la aterosclerosis acelerada en la diabetes.

En la DT2 y en el síndrome de resistencia a la insulina, la hiperlipidemia podría ser marcador de otras anormalidades de las lipoproteínas, como la presencia de mayores valores de LDL densas y pequeñas, los valores bajos de HDL o la acumulación de lipoproteínas remanentes. La hipertrigliceridemia parece vincularse con un mayor riesgo cardiovascular en la diabetes. En el “Estudio Multinacional de Enfermedad Vascul ar en Diabetes” de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cardiopatía isquémica guardó una relación más estrecha con los triglicéridos plasmáticos que con el colesterol (West *et al.*, 1983). Se ha demostrado que la gravedad de la aterosclerosis en la diabetes guarda relación con el número de partículas circundantes de lipoproteínas ricas en triglicéridos, como las lipoproteínas “remanentes” (Tkac *et al.*, 1997). En la diabetes surgen a menudo anormalidades de los lípidos y las lipoproteínas plasmáticas que en conjunto se denominan

dislipidemia. Frecuentemente aparece hipertrigliceridemia, en particular en la DT2. Los valores plasmáticos totales de colesterol en éste tipo de diabetes comúnmente aumentan, pero es frecuente observar valores de colesterol LDL en el intervalo de normal a alto (<100 mg/ dL) y disminución de los valores de HDL (<40 mg/ dL) (Chait y Brunzel, 2003).

2.5 ATEROSCLEROSIS

Los dos principales procesos que conllevan a la ECV son la aterosclerosis y la hipertensión, ambas entidades patológicas relacionadas con la diabetes (Federación Internacional de Diabetes, 2001).

La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias grandes e intermedias en las que aparecen placas ateromatosas en las superficies internas de las paredes vasculares. Estas placas comienzan como depósitos de cristales minúsculos de colesterol LDL y VLDL, las cuales una vez retenidas en la íntima arterial y el músculo liso subyacente pueden ser objeto de modificación oxidativa. La LDL oxidada interviene tempranamente en la aterogénesis, con lo que se facilita el reclutamiento, la activación y la maduración de macrófagos. Varios receptores de macrófagos (SR-A1, CD-36, macrosialina etc) pueden captar LDL oxidada lo cual hace que con el tiempo, se formen células espumosas con abundantes lípidos. En la evolución que va de la estría grasa a una placa fibrograsienta, las células de músculo de fibra lisa migran desde la capa media hasta la íntima con la consecuente formación de placas más grandes, reduciendo en gran medida el flujo sanguíneo y provocando la formación de coágulos; con la resultante formación de trombos, bloqueando así todo el flujo sanguíneo de la arteria (Guyton, 2001; Witztum y Steinberg, 1991). El principal factor etiológico del desarrollo de la aterosclerosis son las dislipidemias causadas por una dieta rica en grasas saturadas y *trans* (Durrington *et al.*, 2001).

2.6 PARAOXONASA

Se conoce como paraoxonasas (PON) a un grupo de enzimas de una familia génica que en los mamíferos tiene al menos tres miembros PON1, PON2 y PON3, cuyas características se describen en la Tabla 3 y los cuales son codificados por los genes de mismo nombre (*PON1*, *PON2* y *PON3*). Esta familia de genes parece haberse formado por la duplicación de un precursor común, ya que los tres son muy parecidos (aproximadamente en el 70% de la secuencia de nucleótidos y en el 60% de la de aminoácidos). Se encuentran localizados en posiciones adyacentes del cromosoma 7 (7q21-q22) en la especie humana (*Homo sapiens*) y del cromosoma 6 en ratones (*Mus musculus*) (Primo- Parmo *et al.*, 1996; Ferré y Camps, 2004).

Tabla 3. Principales características de los productos génicos de *PON1*, *PON2* y *PON3* indicando los tejidos donde se expresan

	PON 1	PON 2	PON 3
Presenta actividad Paraoxonasa/ arilesterasa	Sí	No se ha observado	Débil
Presenta actividad tiolactasa	Sí	No se ha observado	Sí
Circula asociada a HDL	Sí	No	Sí
Protege la LDL de la oxidación	Sí	Sí	Sí
Se expresa en	Hígado	Hígado, riñón, cerebro	Hígado, placenta, pulmón, testículos

Fuente: Adaptado de Ferré y Camps, 2004.

La enzima PON1, facilita la hidrólisis de algunos xenobióticos como compuestos organofosforados (OPs), ésteres alifáticos insaturados, ésteres carboxílicos aromáticos y carbamatos (Davies *et al.*, 1996). La actividad enzimática determinada utilizando paraoxón (metabolito tóxico del insecticida *parathión* al cual se le atribuye el nombre de la enzima) como sustrato se denomina actividad paraxonasa, también tiene actividad arilesterasa (determinada utilizando fenilacetato) y actividad

tiolactonasa (es capaz de hidrolizar tiolactonas de homocisteína) (Billecke *et al.*, 2000). Las funciones fisiológicas de los productos de los genes *PON2* y *PON3* están siendo objeto de estudios preliminares. Algunas mutaciones del gen *PON2* presentan ciertas asociaciones con alteraciones en el metabolismo lipoprotéico y un aumento del riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular (Mackness *et al.*, 1999). Parece que *PON2* también es capaz de proteger las partículas de LDL de la oxidación (Ng *et al.*, 2001), a pesar de que esta enzima no se encuentra asociada a las HDL. Por otro lado, la *PON3* que circula unida a las partículas de HDL en el suero de conejos y humanos, presenta una actividad paraoxonasa y arilesterasa muy débil y es capaz también de hidrolizar lactonas aromáticas y lipoperóxidos. También se ha observado que la *PON3* tiene una capacidad mayor que la *PON1* de proteger a las LDL de la oxidación, pero como su expresión es muy inferior, su importancia relativa es menor (Reddy *et al.*, 2001).

2.6.1 PON 1

La *PON1* esterasa/lactonasa es el miembro más estudiado, tiene de un peso molecular de 43-45 Kda, conteniendo 3 cadenas de carbohidratos, que representan el 15.8% de su peso (Gan *et al.*, 1991). Mediante la tecnología del ADN recombinante, se determinó que *PON1* (gen constituido por 26,161 pares de bases en humano y 25,681 en ratones) codifica una proteína de 355 aminoácidos, de los cuales sólo el residuo metionina amino-terminal es removido durante la maduración y secreción de *PON1* (Hasset *et al.*, 1991).

PON1 circula por la sangre unida a las apolipoproteínas A-I y apolipoproteínas J de las HDL. Las HDL se unen débilmente a la membrana celular de los hepatocitos y remueve la *PON1* de la membrana (Deakin *et al.*, 2002). Esto es posible, debido a que *PON1* se asocia a la HDL a través de su secuencia hidrofóbica N-terminal altamente conservada (Sorenson *et al.*, 1999). La actividad de *PON1* esta ya presente desde recién nacidos, llegando a los niveles encontrados en adultos al primer año de vida sin haberse encontrado diferencias en su actividad entre sexos (Mackness *et al.*, 1998). Igualmente se ha encontrado que la actividad enzimática de

la PON1 varía de 10 a 40 veces entre poblaciones con diferentes raíces étnicas, también se ve disminuida su actividad en personas con diferentes patologías tales como diabetes, hipercolesterolemia familiar, enfermedad cerebrovascular, cirrosis hepática e insuficiencia renal crónica, de igual forma su actividad disminuye en el tabaquismo, el embarazo y en presencia de dieta aterogénica (Li *et al.*, 2003; Mackness *et al.*, 2003; Aynacioglu *et al.*, 1999).

Algunos otros estudios en las últimas dos décadas han confirmado que PON1 juega un papel importante en el rol protector de las HDL contra la aterosclerosis y recientemente se ha reportado que PON1 esta involucrada en el metabolismo de algunos fármacos (Mackness *et al.*, 1998; Rodríguez-Esparragón *et al.*, 2006).

2.6.2 PON 1 y Aterosclerosis

Como se mencionó anteriormente, en un inicio, PON1 fue investigada por su capacidad de hidrolizar *in vitro* diversos compuestos OPs. Sin embargo a principios de los años 90's del siglo pasado, Mackness *et al.* (1991) fueron los primeros en demostrar que la PON1 humana purificada podría inhibir la oxidación del colesterol LDL *in vitro*, afirmación que fue comprobada y complementada años después por Costa *et al.* (2003) demostrando que PON1 previene la oxidación del colesterol LDL una vez que éste se encuentra formado.

Se conoce desde hace tiempo que existe una relación inversa entre las HDL y el riesgo de desarrollar aterosclerosis (Guyton, 2001). Otros estudios también demuestran que PON1, siendo una enzima asociada a la HDL, es la responsable del papel protector de las HDL contra la aterosclerosis (Mackness *et al.*, 1999; Senti *et al.*, 2000). Esta afirmación es apoyada por un estudio realizado en ratones por Shih *et al.* (2002) en el cual se dividieron 2 grupos de ratones; al primer grupo se eliminó el gen *PON1* mientras que el segundo sirvió de control. Ambos grupos fueron sometidos a una dieta inductora de aterosclerosis. El primer grupo fue más susceptible para desarrollar aterosclerosis a comparación del segundo. Esto

demostró que PON1 puede proteger contra la aterosclerosis. Además otros estudios en ratones, humanos y otras especies demostraron que la baja actividad de PON1 está asociada con signos de aterosclerosis (Costa *et al.*, 2003). Como se mencionó anteriormente, la diabetes es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de ECV secundaria a aterosclerosis, por lo que altos niveles de PON1 puede retrasar la aparición de dichas complicaciones.

2.7 INFORMACIÓN GENÉTICA

La información genética se define como un conjunto de mensajes codificados en los ácidos nucleicos que origina la expresión de los caracteres hereditarios propios de los seres vivos mediante reacciones bioquímicas. El ácido desoxirribonucéico (ADN) posee la información necesaria para transmitir los caracteres de una especie de generación en generación. Por lo tanto la molécula de ADN constituye la base química de la herencia (Mathews y Van Holde, 2002). El flujo de la información genética (término global en el cual se ubican la replicación, transcripción y traducción) se muestra de manera sintetizada en la Figura 1.

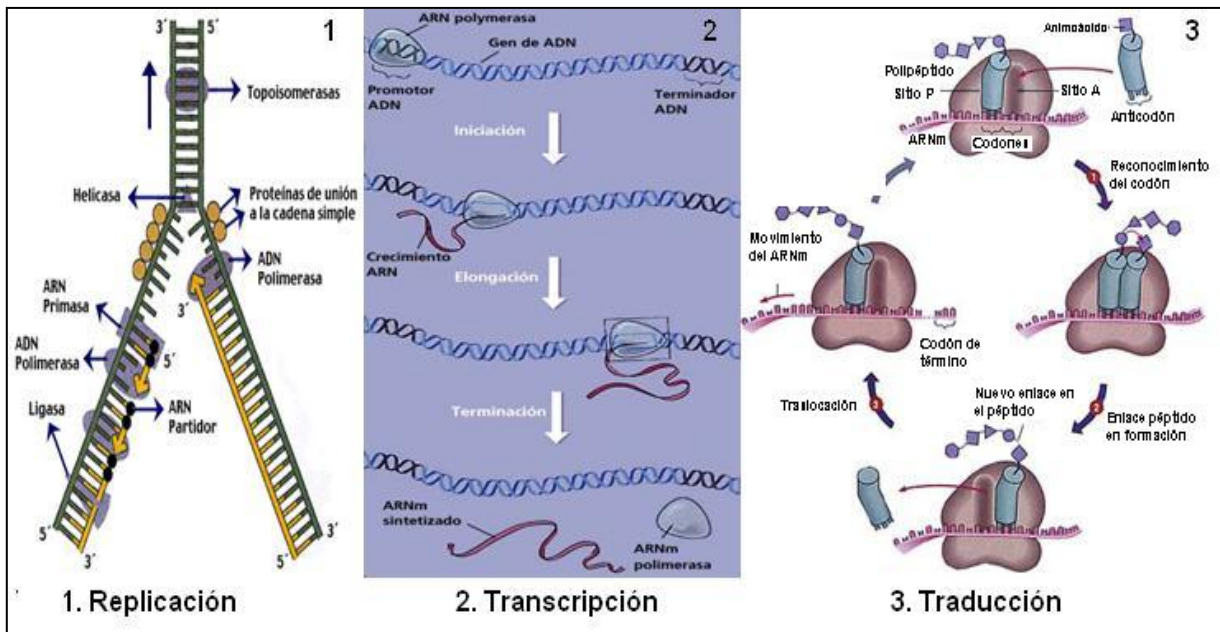


Figura 1. Flujo de la información genética. La figura resume los 3 procesos que intervienen en el flujo de la información genética. 1. Replicación de una cadena de ADN, 2. Transcripción de información del ADN al ARN y 3. Traducción o síntesis de aminoácidos a partir de ARN. Fuente: Adaptación de Bases moleculares de la heredabilidad genética. Facultad de Biología, PUCC, 2009.

2.7.1 Replicación

El proceso por el que las moléculas de ADN se copian a si mismas en el núcleo de las células recibe el nombre de replicación del ADN. La replicación pretende a partir de una cadena de ADN obtener cadenas iguales. La secuencia de pasos implicados en la replicación del ADN puede resumirse de la manera siguiente (Mathews y Van Holde, 2002).

La doble hélice del ADN sufre un desenrollamiento por acción de las helicasas. Posteriormente se sintetizan los cebadores por las primasas para que la ADN polimerasa III, cuando se alcanza el cebador del fragmento sintetizado anteriormente la polimerasa I sustituye a la polimerasa III y, haciendo uso simultáneo de sus actividades exonucleasa (degradadora de nucleótidos) y polimerasa, va sustituyendo los cebadores por el ADN correspondiente. Finalmente las ligasas cierran las muescas que hay entre cada dos fragmentos.

2.7.2 Transcripción

La transcripción consiste en la formación de una molécula de ácido ribonucleico (RNA) a partir de la información genética contenida en un segmento de ADN. Es decir, da lugar a una copia de ARN con secuencia complementaria y antiparalela, a partir de una secuencia molde en una de las hebras del ADN.

El proceso empieza cuando la ARN polimerasa I, se une a unas secuencias específicas llamadas promotores. La doble hélice del ADN se desenrolla formando la burbuja de transcripción para servir de molde para la síntesis del ARN, de tal manera que solamente una de las dos cadenas es la que transcribe la información al ARN. La cadena de ADN que sirve de molde se denomina "cadena molde", mientras que la complementaria se llama "cadena codificante", idéntica en secuencia de bases al ARN transcrito excepto que la timina es sustituida por uracilo. Los ribonucleótidos trifosfato existentes en el fluido celular (ATP, GTP, CTP y UTP) se desplazan hacia la parte desenrollada de la doble hélice del ADN y se sitúan complementando la cadena (T=A; A=U; C=G). Cuando estos nucleótidos se encuentran adecuadamente situados se unen entre sí por acción de la enzima ARN polimerasa (en el sentido 5' → 3'). Finalmente, el ARN se separa y el ADN recupera la estructura de doble hélice (López-Casillas, F., 2009).

El ARN mensajero (ARNm) en el caso de las eucariotas sufre importantes modificaciones postranscripcionales, eliminándose los intrones (secuencias del genoma no codificantes), formando así el ARNm maduro que será traducido a proteínas.

2.7.3 Traducción

La traducción se realiza utilizando una secuencia específica de tres bases del ARNm llamada triplete de bases o codón. Cada aminoácido está codificado por, al menos un triplete, que constituyen el código genético. Este código es degenerado (un aminoácido puede estar codificado por varios codones), pero no es ambiguo (un codón codifica uno y sólo un aminoácido). La traducción del ARNm tiene lugar en los ribosomas. Cada codón del ARNm determina un aminoácido específico. Las moléculas de ARN de transferencia (ARNt) portan el aminoácido correspondiente a un codón. El reconocimiento entre el ARNt y el codón tiene lugar gracias al anticodón. Entre los dos aminoácidos consecutivos debe formarse el enlace peptídico, este paso está catalizado por la enzima peptidil transferasa. Luego el ribosoma se transloca, desplazándose a lo largo de la cadena peptídica que se está formando y dejando un sitio vacante para un nuevo ARNt-aminoácido. La traducción continúa hasta que aparece un codón de terminación. El producto final de la traducción son las proteínas (Mathews y Van Holde, 2002).

2.8 GENÓMICA NUTRICIONAL

El concepto de genómica nutricional engloba a los términos nutrigenética y nutrigenómica. Ambos se refieren a la interacción gen- alimento o gen- dieta, sin embargo son relativamente distintos.

La nutrigenética, también llamada nutrición personalizada o individualizada, estudia el efecto de la variación en la interacción entre dieta y enfermedad. Esto incluye la identificación y caracterización de las variantes asociadas responsables de las respuestas diferenciales a los nutrientes. Su objetivo es generar recomendaciones con los riesgos y beneficios de las dietas o componentes dietéticos específicos para cada persona (Gorostiza- Langa y González- Martín, 2009).

La nutrigenómica (la cual es indirectamente abordada en éste estudio) pretende proporcionar un conocimiento molecular (genético) sobre los componentes de la

dieta que contribuyen a la salud o enfermedad mediante la alteración de la expresión y/o estructuras según la constitución del genoma (Gillies, 2003).

Un concepto básico es que la progresión desde un fenotipo sano a un fenotipo de disfunción crónica puede explicarse por cambios en la expresión genética o por diferencias en las actividades de proteínas y enzimas, y que los componentes de la dieta directa o indirectamente regulan la expresión de la información genética. Algunos principios de la nutrigenómica son: 1) existen acciones de los componentes de la dieta sobre el genoma humano, que directa o indirectamente, pueden alterar la expresión o estructura de los genes; 2) en algunos individuos y bajo ciertas circunstancias, la dieta puede ser un factor de riesgo de una enfermedad; 3) algunos genes regulados por la dieta (y sus variantes comunes) pueden jugar un papel en el inicio, incidencia, progresión, y/o severidad de las enfermedades principalmente crónicas; 4) el grado en el cual la dieta influye sobre el binomio salud-enfermedad puede depender de la constitución genética individual, y 5) cualquier intervención dietética basada en el conocimiento de las necesidades nutricionales, el estado nutricional, y el genotipo será útil para prevenir, mitigar, o curar las enfermedades crónicas (Marti *et al.*, 2005).

2.8.1 Dieta y Expresión Génica

Numerosos estudios epidemiológicos confirman la existencia de cierta asociación entre la dieta ingerida, la incidencia y la severidad de las enfermedades crónicas (Stover, 2004; Kaput y Rodríguez, 2004; Muller y Kersten, 2003), pero no resulta fácil distinguir cuales son las moléculas bioactivas de los alimentos que ejercen determinadas acciones beneficiosas (Figura 2).

Los componentes de la dieta pueden alterar la expresión genómica directa o indirectamente. A nivel celular, los nutrientes pueden: 1) actuar como ligandos para la activación de factores de transcripción que favorezcan la síntesis de receptores; 2) ser metabolizados por rutas metabólicas primarias o secundarias, alterando de ese modo las concentraciones de substratos o intermediarios; o 3) influir positiva o negativamente sobre las rutas de señalización. El hecho de que algunos

componentes de la dieta juegan un papel clave en la regulación de la expresión genética está fuera de dudas. El genoma humano es sensible al entorno nutricional, de forma que, algunos genes pueden modificarse en respuesta a los componentes de la dieta ya sean de origen vegetal o animal (Kaput y Rodríguez, 2004). Ejemplo de lo anterior puede ser el analizar como se modifica la expresión de un gen (PON1) ante la ingesta periódica del zumo de un fruto como la granada, ante condiciones específicas en la dieta y en la presencia de una enfermedad (diabetes).

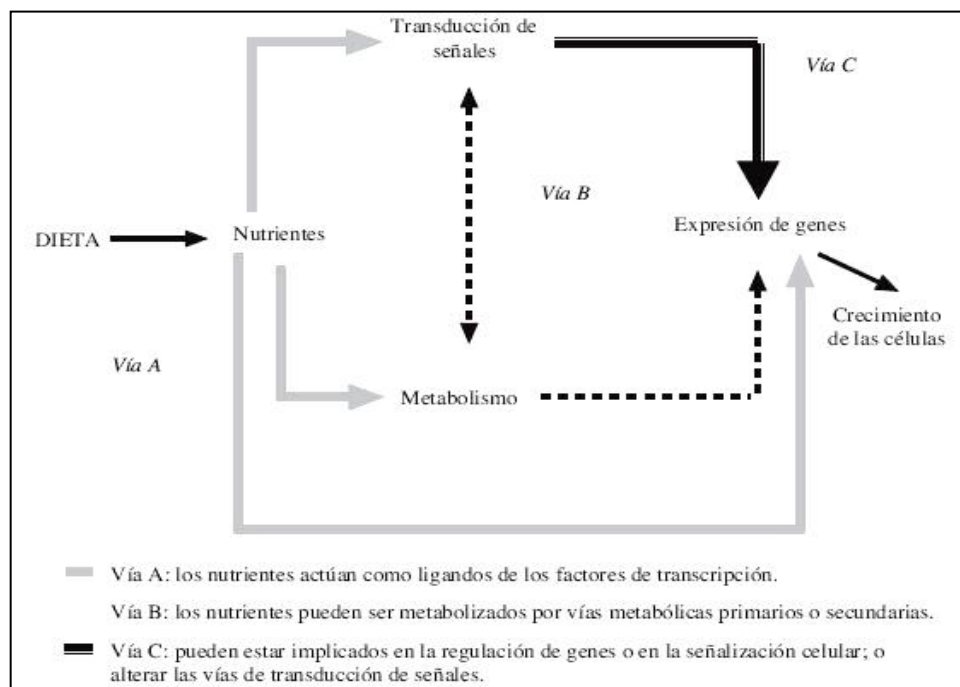


Figura 2. Destino y papel de los nutrientes en las células
Fuente: Marti *et al.*, 2005.

2.9 GRANADA

La granada roja (*Púnica granatum* L.) es una infrutescencia (fructificación formada por agrupación de varios frutillos con apariencia de unidad), fruto de un árbol llamado granado, de la familia de las punicáceas; pequeña familia de árboles y arbustos, cuyos frutos tienen semillas prismáticas y rugosas. Su género *Púnica* deriva de los Fenicios quienes fueron unos difusores activos de su cultivo y su especie deriva del adjetivo del latín *granatus* que significa 'con granos' (EROSKI, 2008). La fruta posee

una piel gruesa de color escarlata o dorada con tono carmesí en el exterior y una gran cantidad de semillas internas rodeadas de una jugosa pulpa de color rubí (Figura 3).



Figura 3. Ilustración de *Púnica granatum* L. en la cual se puede observar la morfología de la rama, flor rojo carmesí, fruto del mismo color y múltiples semillas internas rodeadas de una pulpa dulce carmesí, Fuente: Wilhelm- Thomé (1885).

Actualmente, su cultivo está extendido por diversos países de Europa, Asia y América, siendo destacable en países como Afganistán, Irán, Israel, Brasil y el estado de California (en los Estados Unidos de Norteamérica). España es uno de los principales productores del mundo y el mayor exportador europeo (EROSKI, 2008). México no figura dentro de los grandes productores a nivel mundial de granada a pesar de poseer en diversas regiones de su territorio tierra y condiciones climáticas óptimas para su cultivo. La introducción de ésta al país data del siglo VI d.C., periodo durante el cual se llevó a cabo la conquista española al país con la consiguiente introducción de diversas plantas, objetos, animales e insumos de origen europeo. Según datos reportados por SAGARPA (2009), durante el año 2008 México tuvo una producción nacional total de 3,740.10 toneladas de producto en bruto (Tabla 4).

Tabla 4. Producción Anual Nacional 2008 de Granada Modalidad Riego+ Temporal

Ubicación	Superficie Cosechada	Producción	Rendimiento	Precio Medio Rural	Valor Producción
	(Ha)	(Ton)	(Ton/Ha)	(\$/Ton)	(Miles de Pesos)
AGUASCALIENTES	2	18	9	2,000.00	36
BAJA CALIFORNIA	7	24.15	3.45	9,750.00	235.46
COAHUILA	8	104	13	17,000.00	1,768.00
COLIMA	7.5	45	6	3,600.00	162
GUANAJUATO	84	796	9.48	5,427.14	4,320.00
HIDALGO	95	1,030.00	10.84	4,251.46	4,379.00
JALISCO	10	65.3	6.53	7,214.40	471.1
ESTADO DEMEXICO	42	166.8	3.97	5,981.65	997.74
MICHOACAN	20	160	8	5,000.00	800
MORELOS	25	150	6	6,000.00	900
OAXACA	172	934.35	5.43	6,156.17	5,752.01
QUERETARO	2.5	12	4.8	4,850.00	58.2
SAN LUIS POTOSI	9	54	6	4,250.00	229.5
SONORA	14	170	12.14	11,529.41	1,960.00
ZACATECAS	3	10.5	3.5	3,500.00	36.75
TOTAL	501	3,740.10	7.47	5,910.47	22,105.77

Fuente: SAGARPA. Sistema Estatal de Información para El Desarrollo Rural Sustentable, Hidalgo, 2009.

Como se puede observar en la Tabla 4, el estado de Hidalgo representó la mayor producción en toneladas del año 2008 y el segundo lugar en cuanto al valor de producción. La región del estado de Hidalgo con mayor producción de granada es la región oeste en el llamado “Valle de Mezquital” (Tabla 5), en donde Tasquillo y Chilcuautla aportan el mayor porcentaje de la producción estatal total.

Al comparar los datos de SAGARPA (2009) de la producción (en toneladas) de la granada en el 2008 y el valor de ésta (en miles de pesos) con la producción de otras frutas de temporada como la tuna, de la cual se produjeron 35,791.72 toneladas en el mismo periodo, con un valor de \$77,567.50 e incluso el durazno del cual se produjeron 4507.50 toneladas en el 2008, se puede concluir que a pesar de que el estado de Hidalgo es el mayor productor de granada a nivel nacional, la producción de la misma es limitada en comparación con otros frutos de temporada, seguramente debido a la falta de cultura en cuanto a su consumo.

Tabla 5. Producción Anual Estatal de Hidalgo 2008 de Granada modalidad Riego+ Temporal

Municipio	Sup. Cosechada	Producción	Rendimiento	Precio Medio Rural	Valor Producción
	(Ha)	(Ton)	(Ton/Ha)	(\$/Ton)	(Miles de Pesos)
CHILCUAUTLA	16	208	13	3,500.00	728
METZQUITITLAN	12	60	5	10,000.00	600
METZTITLAN	15	75	5	9,000.00	675
TASQUILLO	42	630	15	3,500.00	2,205
TECOZAUTLA	6	37	6.17	3,000.00	111
ZIMAPAN	4	20	5	3,000.00	60
TOTAL	95	1,030.00	10.84	4,251.46	4,379.00

Fuente: SAGARPA. Sistema Estatal de Información para El Desarrollo Rural Sustentable, Hidalgo, 2009.

La composición nutrimental de la granada se describe en la Tabla 6. Es un fruto de muy bajo valor calórico debido a su escaso contenido de hidratos de carbono en comparación con otros frutos. El componente mayoritario es el agua y en lo que se refiere a otros nutrientes, destaca su aporte mineral de potasio, calcio y fibra. Otros componentes destacables son el ácido cítrico, ácido málico, flavonoides polifenólicos y los taninos. Estos últimos son compuestos con propiedades antiaterogénicas, astringentes, antiinflamatorias, antihipertensivas y antioxidantes entre otros.

Tabla 6. Composición nutrimental de la granada roja por 100 g de porción

Nutriente	Contenido
Humedad	84.4%
Hidratos de Carbono	17.7 g
Proteínas	1 g
Grasas	0.30 g
Fibra	2.7 g
Calcio	3 mg
Fósforo	8 mg
Hierro	0.30 mg
Sodio	3 mg
Potasio	259 mg
Ácido ascórbico	6 mg
Tiamina	0.03 mg
Riboflavina	0.03 mg
Niacina	0.30 mg
Piridoxina	0.11 mg

Fuente: Adaptación de Muñoz M, 1996. Tablas de valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en Latinoamérica.

Se ha probado que la granada contiene la mayor capacidad antioxidante en su zumo, comparado con otras bebidas ricas en polifenoles comúnmente consumidas. Por ejemplo, se ha visto que la capacidad antioxidante del zumo de granada es tres veces más alta que las del vino tinto y el té verde, basado en la evaluación de atrapamiento de radicales libres y la capacidad de oxidación de estos (Gil *et al.*, 2000). El zumo de granada también ha mostrado tener niveles significativamente más altos de antioxidantes en comparación con zumos de frutas comúnmente consumidas como el zumo de uva, arándano, toronja y naranja (Rosenblat y Aviram, 2006).

Los principales polifenoles antioxidantes en el zumo de granada incluyen a los elagitaninos y antocianinas. A los elagitaninos se les atribuye el 92% de actividad antioxidante del zumo de granada y éstos se concentran en la cáscara, membrana y

corteza blanca del fruto. Las punicalaginas son la mayor fuente de elagitaninos contenidos en el fruto y pueden ser hidrolizados a ácido elágico y otros polifenoles de menor tamaño *in vivo* (Seeram, *et al.*, 2004).

Se sabe que la suplementación dietaria de zumo de granada se asocia con la reducción del estrés oxidativo, de agregación plaquetaria, provoca la inhibición de modificaciones aterogénicas de LDL, disminuye la formación de células espumosas de macrófagos y aterosclerosis (Aviram *et al.*, 2000).

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La diabetes se ha convertido en la primera causa de muerte en México y en Hidalgo, y los lugares subsecuentes son ocupados por enfermedades íntimamente relacionadas con ésta, como las enfermedades cardiovasculares (dentro de la cuales se encuentra la aterosclerosis) las cuales representan la segunda causa de muerte en México y la primera en pacientes con esta enfermedad (FMD, 2009; Secretaría de Salud de Hidalgo, 2007). Como se describió anteriormente, existen reportes de que la PON1 juega un papel protector ante el desarrollo de la aterosclerosis en modelo animal diabético (condición en la cual disminuye la presencia de la PON1) o aterosclerótico (Mackness *et al.*, 1999; Senti *et al.*, 2000; Shih *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003). Esta afirmación también es apoyada por un estudio en ratones en el cual se eliminó el gen *PON1*, comparado con un control y ante una dieta aterogénica, el primer grupo fue más susceptible para desarrollar aterosclerosis (Shih *et al.*, 2002). En cuanto a la influencia del zumo de granada sobre la PON1, Aviram *et al.* (2002) reportaron que la actividad enzimática de la PON1 aumentó al suplementar con un tipo de zumo de granada (6.25 mL/ L agua) a ratones ateroscleróticos (inducidos genéticamente por deficiencia de apolipoproteína E), lo que ayudó a reducir en un 18% las lesiones ateroscleróticas en éstos. Dicho estudio no especifica que tipo de alimentación recibieron los ratones por lo que se puede suponer, se alimentaron con alimento comercial balanceado para roedor, además de que los ratones no fueron diabetizados.

No existen estudios en donde se utilice un modelo animal diabético inducido y alimentado con una dieta específica inductora de aterosclerosis de manera natural. Tampoco existen estudios en los cuales se ponga a prueba el efecto del zumo de granada sobre el peso total, peso del hígado y la expresión del gen de la PON1, a pesar de que como se sabe, los componentes de la dieta pueden alterar la expresión genómica directa o indirectamente ya sea como un factor de riesgo para la incidencia, y/o progresión de una enfermedad, o para prevenirla, mitigarla o curarla.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la pandemia en la que se ha convertido la diabetes, es de gran importancia abordar el estudio de la enfermedad desde el punto de vista biológico nutricional de una manera preventiva. La PON1 puede ser un determinante en la resistencia al desarrollo de la aterosclerosis (consecuencia común de la diabetes) protegiendo a las lipoproteínas de la modificación oxidativa. Considerando lo anterior, es necesario profundizar sobre el como influyen los nutrimentos sobre la expresión de la PON1, específicamente los antioxidantes los cuales está demostrado tienen una función de regulación en la expresión de los genes. Al mismo tiempo también se pretende poner a prueba la capacidad antioxidante propia de la granada, la cual según reportes en la literatura, por sí sola ha mostrado tener efectos benéficos en la reducción de placas de ateroma, estrés oxidativo, disminución de colesterol LDL y aumento en la actividad de la PON1 en suero. En éste estudio se consideró la utilización del zumo de granada, por sus comprobadas propiedades antioxidantes.

El fin último del presente es aportar nuevos conocimientos y fundamentos científicos que permitan establecer tratamientos alternativos para contrarrestar o atenuar el desarrollo de la aterosclerosis en la persona con diabetes. Por lo anteriormente expuesto se considera relevante conocer si el zumo de granada, en una dosis superior a la reportada en los estudios citados, estimula la expresión del gen de la PON1, en un modelo animal diabético inducido y alimentado con una dieta alta en grasa (50% del aporte energético total) típicamente aterogénica (destacando que es un modelo novedoso) y saber si influye en el peso total y del hígado de los animales. Finalmente es sabido que la granada no es un fruto considerado de alto consumo por la población mexicana e Hidalguense (a pesar de que la región favorece su cultivo y es de los principales productores a nivel nacional), por lo que se deben desarrollar más estudios en los que se pueda demostrar con rigor científico, los alcances de ésta como un alimento con otras propiedades benéficas para la salud y así fomentar a conciencia su consumo habitual.

.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del zumo de granada en la expresión del gen de la paraoxonasa 1 (PON1) en ratones CD-1 diabetizados y alimentados con una dieta aterogénica.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto del zumo de granada en la expresión del gen de la PON1 en hígado mediante RT-PCR.
- Determinar el efecto del zumo de granada sobre el peso total en ratones CD-1 diabetizados y alimentados con una dieta aterogénica.
- Determinar el efecto del zumo de granada sobre el peso del hígado en ratones CD-1 diabetizados y alimentados con una dieta aterogénica.

6. HIPÓTESIS

Hipótesis alterna. El zumo de granada aumenta la expresión del gen de la PON1 en ratones CD-1 diabetizados y alimentados con una dieta aterogénica.

Hipótesis nula. El zumo de granada no aumenta la expresión del gen de la PON1 en ratones CD-1 diabetizados y alimentados con una dieta aterogénica.

7. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1 ESQUEMA DEL DISEÑO METODOLÓGICO

La Figura 6, representa el esquema del diseño metodológico a realizar durante el proyecto de investigación.

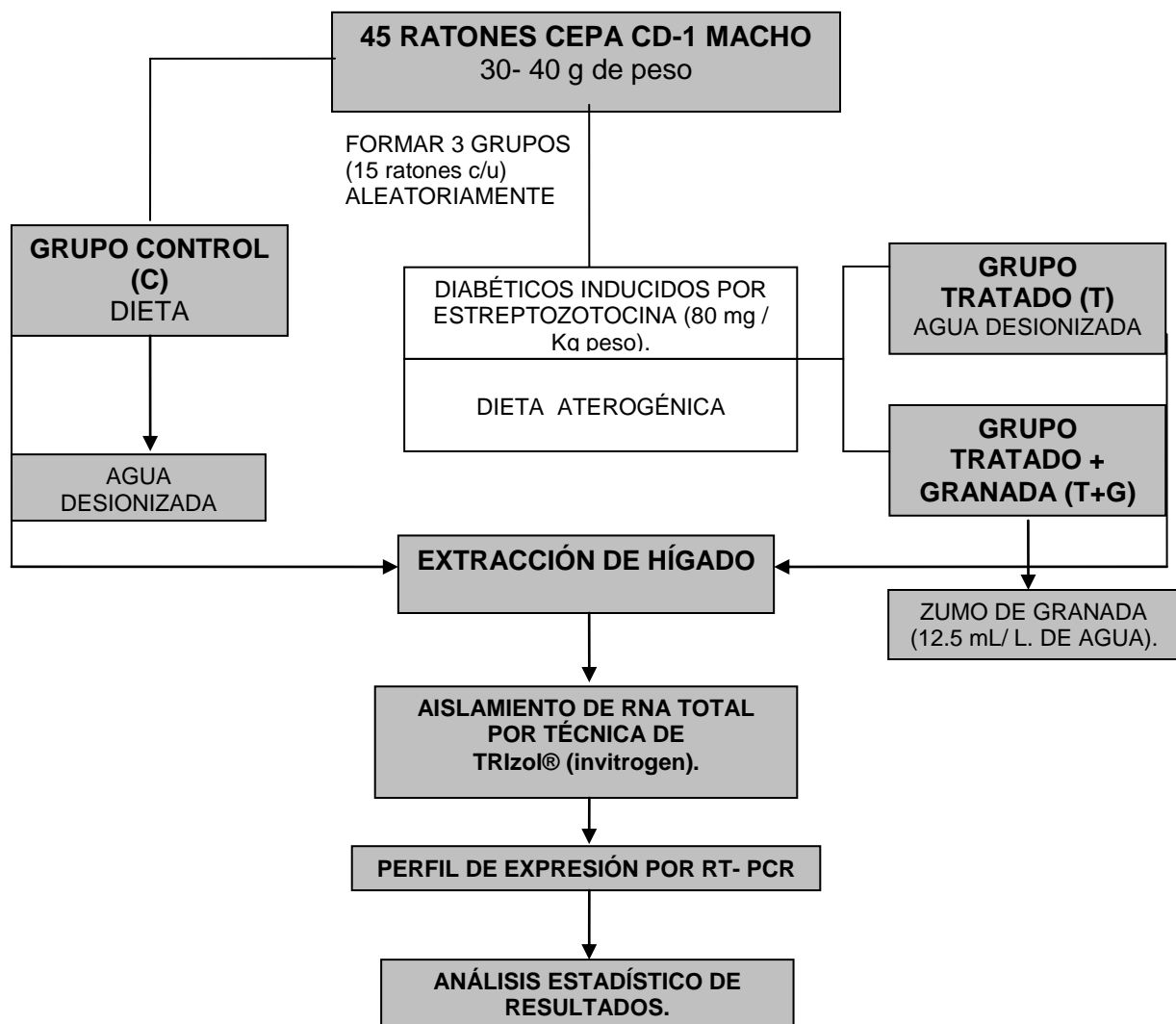


Figura 4. Diseño metodológico del proyecto de investigación.

7.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización del presente, se utilizaron 45 ratones macho cepa CD-1 de 8 semanas de edad y de entre 30 y 40 g de peso corporal obtenidos del Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Una vez adquiridos los ratones de estudio, se mantuvieron a temperatura y ciclos de luz controlados. Se alimentaron durante una semana con producto comercial no purificado Harlan Teklad[®] 18% proteína (Madison, WI, USA) y agua *ad libitum*. Posteriormente se formaron 3 grupos de 15 roedores cada uno de manera aleatoria [denominados Grupo Control (C), Grupo Tratado (T) y Grupo Tratado+ Granada (TG)]. Se llevó a cabo la diabetización inducida por estreptozotocina (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) administrada por vía intraperitoneal a razón de 80 mg/Kg peso con regulador de citratos pH 4.5, 0.1 M a los roedores del grupo T y el grupo T+G (Se confirmó el estado diabético tomando glucosas casuales una vez por semana durante un mes, con glucómetro Accu-trend[®] de Roche) .

7.3 DIETAS Y PROCEDIMIENTOS

Se obtuvo granada roja (*Púnica granatum L*) de temporada (año 2008) de Tasquillo, Hgo., se lavó y seleccionó antes de su almacenaje en forma de fruto entero a temperatura de -80°C para su uso posterior.

Los roedores del grupo C continuaron con alimento Harlan Teklad[®] 18% proteína. A los roedores del grupo T y T+G, en un principio se les sustituyó el alimento comercial por una dieta casera aterogénica cuya distribución de macronutrientes fue: Hidratos de carbono= 35%, Proteínas= 15%. Grasas= 50% (de las cuales aproximadamente 60% fueron grasas saturadas). Dicha dieta tuvo como componentes galletas dulces, mantequilla, leche entera de vaca en polvo, harina de trigo y azúcar. El cambio del alimento comercial a una dieta casera aterogénica, aunado a la diabetización de los ratones, resultó ser un tratamiento sumamente agresivo para éstos, resultando en el

deceso por hipoglucemia o inanición de casi 1/3 del total de animales de experimentación. Por lo anteriormente expuesto se acordó llevar a cabo la modificación de dicha dieta casera utilizando finalmente croquetas molidas de alimento comercial balanceado Harlan Teklad 18% de proteína, horneadas con mantequilla de leche de vaca (alimento elegido por tener el mayor contenido de grasas saturadas de una lista de posibles alimentos), en una proporción de 1:1, resultando así un balance de macronutrientos totales de: Hidratos de carbono: 27%, Proteínas: 18% y Grasas 55%, balance similar al establecido en un principio, aunque ésta vez sin el aporte de carbohidratos simples.

Se complementó el agua del grupo T+G con zumo de granada roja en una proporción de 12.5 mL/L de agua. Debido a que los ratones bebían un promedio de 5 mL de agua al día, bebían un exacto de 62 μ L de zumo de granada diariamente, lo cual es equivalente a 1.75 μ mol de polifenoles totales. La dosis utilizada de zumo de granada en el presente estudio y su equivalente en polifenoles totales, fue basada en los resultados de un estudio previo en el cual 6.25 mL/L de zumo de granada mostraron incrementar la actividad de PON1 y disminuir sustancialmente el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Kaplan *et al.*, 2001).

Se sacrificaron 3 roedores de cada grupo a partir de la diabetización incluyendo el tiempo cero y posteriormente cada 30 días, resultado así un tiempo final de 5 meses más el tiempo de reposición de animales fallecidos por dieta y el tiempo del grupo control desfasado resultando así un periodo final de 12 meses.

Registro de peso.

Se tomó el registro del peso total y peso del hígado de cada uno de los roedores por fecha de sacrificio a partir del tiempo cero de diabetización con una balanza (ADAM compact balance AQT-250, USA).

7.4 EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PON1.

Después de cada sacrificio se extrajo el hígado empleando un estuche de disección, una vez extraído éste se almacenó a -70°C para la posterior extracción del RNA total.

7.4.1 Aislamiento de ARN total.

El ARN total fue obtenido por la técnica de TRIzol[®], en la cual 0.1 g de muestra de hígado se homogeneizó en 1 mL de TRIzol[®] (Invitrogen). Para la separación de las fases, se adicionó 0.2 mL de cloroformo (J.T. Baker, México) se agitó y se centrifugó (Microcentrífuga Hettich Zentrifugen, MIKRO 22 R) por 15 min a 10500 rpm de 2 a 8°C . Para la precipitación del ARN se utilizó 0.5 mL de alcohol isopropílico (Sigma Aldrich, USA) se agitó, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 10 min a 10500 rpm de 2 a 8°C . Posteriormente se realizó un lavado del ARN con 1 mL de Etanol al 75% en H₂O DEPC libre de RNAsa (USB corporation, Cleveland, OH, USA), se mezcló y se centrifugó por 5 min a 8000 rpm de 2 a 8°C . Por último se disolvió el ARN en 30 μL de agua DEPC libre de RNAsa.

7.4.2 Diseño de oligonucleótidos para PCR.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 7) para el gen de la PON1 utilizando el programa DNAMAN[®] Versión 3.0, con base en la secuencia nucleotídica del ARNm de la *PON1* de ratón (*Mus musculus*) obtenido de la base de datos de GeneBank[®] (Número de acceso del gen: 18979).

Así mismo se utilizó como gen de referencia Gliceraldehído 3P-deshidrogenasa (GAPDH) cuyos oligonucleótidos fueron amablemente proporcionados por Dr. Juan Carlos Cancino Díaz (Instituto Politécnico Nacional).

Tabla 7. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la PCR.

Símbolo del gen	Secuencia	Temperatura (°C)	Producto esperado
<i>PON1</i> -Reverse	5' -GCAGCTATATCGTTGTAGCTAG-3'	55.0	335 pb
<i>PON1</i> -Forward	5' -GGACTAACTTTCTTTAGCACTG-3'	55.0	335 pb
<i>GAPDH</i> -Reverse	5' -GGTCATCCATGACAACCTTTGG-3'	55.0	350 pb
<i>GAPDH</i> -Forward	5' -GTCATACCAGGAAATGAGCTTGAC-3'	55.0	350 pb

7.4.3 Perfil de expresión por RT-PCR

Una vez obtenido el ARN total, se realizó una reacción de transcriptasa reversa (RT) con un volumen final de 20 μ L utilizando como reactivos: 1 μ L muestra de ARN total, 1 μ L Oligo dT (Invitrogen), 1 μ L dNTP 10 mM (Invitrogen), 10 μ L H₂O estéril. Se incubó a 65°C por 5 min en un termociclador (TECHNE, TC-512, UK Barloworld Scientific Ltd.). Al finalizar el ciclo, se pasó la reacción inmediatamente a hielo para provocar un choque térmico. Posteriormente se agregó 4 μ L de Regulador 5x First Strand (Invitrogen) y 2 μ L de DTT 0.1M (Invitrogen, Canadá). Se incubó 2 min a temperatura ambiente y se agregó 1 μ L de la enzima Transcriptasa Reversa MMLV-RT (Invitrogen), antes de incubar la reacción por 50 min a 37°C seguido de 13 min a 70°C.

Una vez que obtenido el ADNc se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen total de 50 μ L utilizando los siguientes reactivos: 5 μ L de Regulador 10x PCR (Invitrogen, Brasil), 1.5 μ L de MgCl₂ 50mM (Invitrogen, Brasil), 1 μ L de dNTP 10 mM (Invitrogen), 1 μ L de Oligonucleótido 1 y 1 μ L de Oligonucleótido 2, 39 μ L de H₂O estéril y 0.5 μ L de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen).

Posteriormente se procedió a incubar el tubo de reacción en el termociclador 35 ciclos de 1 min 94°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C, con desnaturalización inicial de 5 min 94°C y extensión final de 5 min 72°C.

Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% utilizando como regulador TAE1x (AMRESCO[®], Ohio, USA) y como marcador de fluorescencia Bromuro de Etidio (BrEt). Las muestras corrieron en una cámara para electroforesis (Thermo EC Minicell[®] EC320) a 85 V.

Se realizó la fotodocumentación de los geles utilizando una cámara de rayos UV (EpiChemi³Darkroom, UVP Biollmaging Systems). Finalmente se analizó la intensidad de las bandas con software LabWorks[®] para conocer los niveles de expresión mediante conteo de píxeles.

7.5 Análisis Estadístico

Los valores finales de expresión se obtuvieron mediante la división (PON1/ GAPDH) de los valores obtenidos por triplicado mediante intensidad de bandas de expresión. Los resultados se expresaron como la media (con sus respectivas desviaciones estándar) de cada una de las variables, las cuales fueron expresión relativa PON1/GAPDH, peso de los animales y peso del hígado. La diferencia entre las medias para cada variable fue evaluada por un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, y para evaluar estas diferencias entre las medias se aplicó una prueba de comparación de medias por Tukey-b y por Duncan, teniendo como variable independiente el factor tratamiento y como variables dependientes la expresión relativa PON1/GAPDH, peso de los animales y peso del hígado por meses de sacrificio. El análisis estadístico fue realizado con el programa computacional SPSS[®] (Statistical Package for Social Studies) Ver. 15.0 para Windows, con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PON1.

En la Figura 5 se pueden observar los productos de amplificación del gen *PON1* y *GAPDH*. Se muestran amplificados de 335 y 350 pares de bases (pb) para *PON1* y *GAPDH* respectivamente.

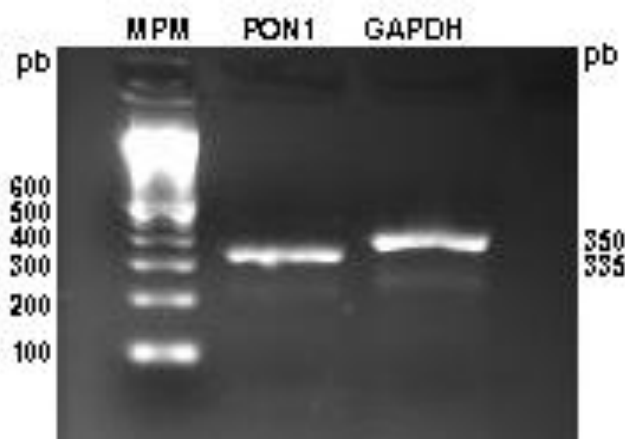


Figura 5. Amplificación de los genes *PON1* (izquierda) y *GAPDH* (derecha) cuyo peso molecular está indicado por un marcador de peso molecular (MPM). Se observa que *PON1* y *GAPDH* se encuentran entre los 300 y 350 pb.

La Figura 6 muestra los resultados finales de la variable expresión en un gráfico general el cual muestra la media de la expresión relativa de *PON1/GAPDH* en relación con el tiempo de sacrificio (en meses) en los tres grupos estudiados [Control (C), Tratado (T) y Tratado +Granada (T+G)]. En la parte superior del gráfico se encuentran las figuras de expresión representativas de cada grupo/ mes. En la figura se puede observar un marcado aumento en la expresión a partir del mes 1 de sacrificio sobre todo en el grupo C, seguido del T+G y por último el T. La tendencia observada del grupo C en relación a los tratados (mayor expresión de *PON1*) a partir del mes 1 de tratamiento, es concordante con los reportes de Li *et al.* (2003),

Mackness *et al.* (2003) y Aynaciuglu *et al.* (1999), en donde la actividad de la PON1 se ve disminuida en sujetos con diabetes y en presencia de dieta aterogénica entre otras afecciones.

Por otro lado e interesantemente, la expresión del gen de la PON1 en el mes 0 de tratamiento fue inferior en relación a los meses posteriores y similar entre los tres grupos. No se encontraron reportes en ratones, sin embargo, Mackness *et al.* (1998), reportaron que la actividad de PON1 en humanos es baja en el nacimiento, llegando a niveles estables al primer año de vida. A pesar de que no se evaluó la expresión en dicho estudio, éste comportamiento se observó en el presente experimento, ya que conforme pasó el tiempo, la expresión aumentó y en el grupo C llegó a estabilizarse al segundo mes de tratamiento.

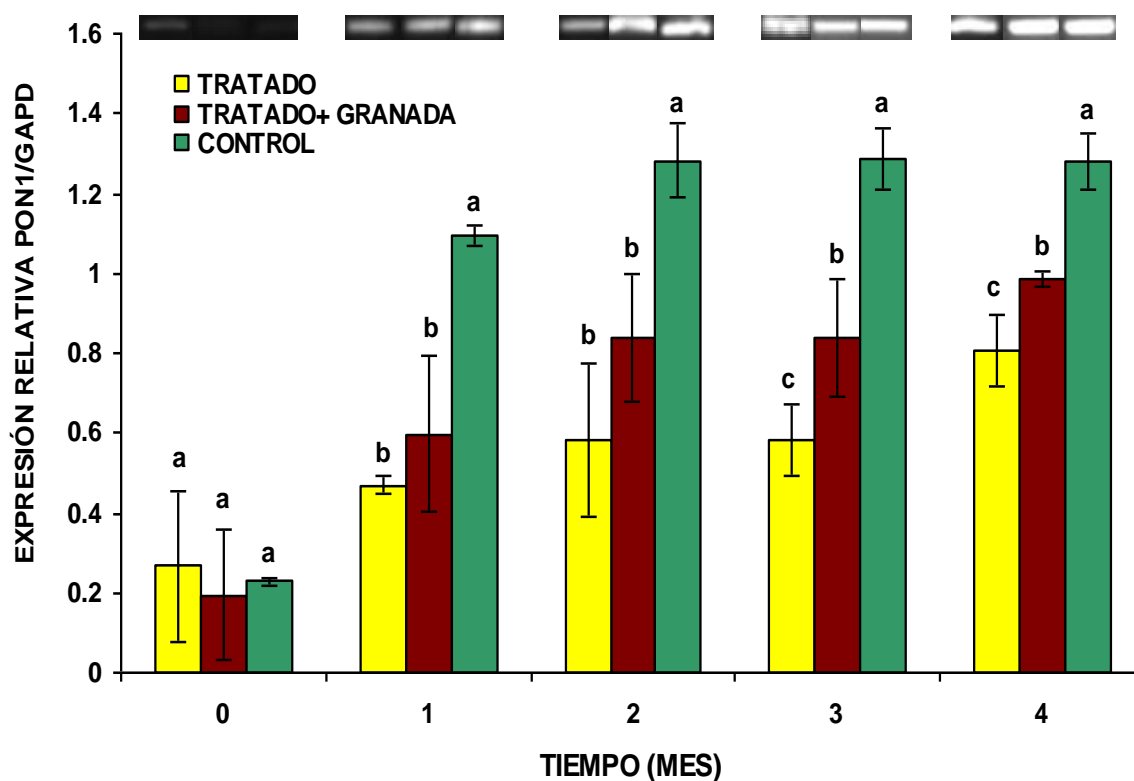


Figura 6. Media de Expresión Relativa PON1/GAPDH con relación al tiempo de sacrificio. La asignación de diferentes letras (a, b y c) indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Se encontró que el grupo C fue estadísticamente distinto a los grupos T y T+G del mes 1 al 4. De igual manera se observa diferencia estadística entre el grupo T y T+G en los meses 3 y 4.

No se observó diferencia estadísticamente significativa entre grupos en el tiempo cero, sin embargo, en el mes 1, 2, 3 y 4 de tratamiento, el grupo C tuvo diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en relación con ambos grupos tratados debido a que no se sometieron a tratamientos ni enfermedad. También se encontró que en los meses 1, 2, 3 y 4 de tratamiento, la expresión fue mayor en el grupo T+G con relación al T, aunque sólo hubo diferencia estadísticamente significativa en los meses 3 y 4. Al haber sido la suplementación de zumo de granada el único factor diferencial entre estos dos grupos, se puede sugerir que éste último, al ser un compuesto rico en polifenoles [sobre todo elagitaninos (principalmente punicalaginas) y antocianinas] influyeron positivamente en los animales estudiados, tal vez mediante un mecanismo molecular de activación transcripcional, como lo sugirieron Gouédard *et al.* (2004), quienes demostraron que polifenoles específicos de la dieta (flavonoides como la quercetina, naringenina, catequina y flavonas) incrementaron la expresión hepática del gen de la PON1 en ratones cepa BALB *in vitro*. A pesar de que los componentes polifenólicos de la granada tuvieron un efecto benéfico por aumentar la expresión del gen de la PON1 en los animales de experimentación, la utilización de ésta no hizo que los ratones del grupo T+G tuvieran los mismos niveles de expresión de los animales del grupo C (sanos), aunque éste es un resultado esperado debido a que los animales de los grupos tratados fueron sometidos a condiciones de salud desfavorables (diabetes inducida y dieta aterogénica con sus respectivas complicaciones) las cuales, como ya se mencionó, decremantan la actividad de la PON1 y por consiguiente la expresión de dicha enzima. No se encontraron reportes de estudios similares al presente y al anteriormente mencionado, sin embargo éstos tienen resultados concordantes y por tanto dan lugar a futuras investigaciones en donde se pruebe el efecto nutrigenómico de una dosis distinta de alguna fuente de antioxidantes exógenos sobre la expresión de la PON1. Cruz-Mayorga (2010) reportó el efecto de diversos tipos de dietas (Obesigénica, Baja en proteínas, Diabético inducido, Diabético + Obesigénica y Control) en la expresión del gen de la PON1 en 150 ratas Wistar por un periodo de 6 meses. Al comparar su grupo Control con el Diabético inducido+ Dieta obesigénica (factor que tiene en

común el presente estudio) encontró que el grupo Control tuvo una expresión mayor en los meses 1, 3 y 4 con valores significativos 1 ($P= 0.006$), 3 ($P= 0.005$) y 4 ($P= 0.006$) lo cual no coincide con el presente en el estudio. Los niveles de expresión fueron similares entre estos grupos a diferencia del presente estudio en el cual se nota una marcada diferencia en la expresión entre el grupo Tratado y el Control, lo que parece ser, concuerda más con la literatura revisada.

Como se mencionó anteriormente, la expresión en el grupo T+G fue mayor que en el grupo T (diferencia estadísticamente significativa en el mes 3 y 4) en todos los meses a excepción del mes 0. La posible explicación de esto es la heteroindividualidad que tienen los seres vivos y ya que al mes 0 los ratones no se habían sometido a ningún tipo de tratamiento, por tanto el resultado es relativo.

Este estudio forma parte de un proyecto global en donde Martínez-Pérez (2010) analizó la actividad enzimática de la PON1, la glucosa, el colesterol total y los triglicéridos en los mismos animales de experimentación (mismas condiciones de estudio y mismos tratamientos). Encontró que la actividad enzimática del grupo T en relación al T+G fue menor y tuvo un comportamiento muy similar a los resultados de expresión que aquí se reportan. Resulta interesante hacer mención que dicha relación parece ser lógica ya que al expresarse en mayor proporción el gen, habrá más niveles de enzima PON1 y por tanto, se verá más actividad de ésta en suero.

8.2 VARIABLES DE PESO

Durante el desarrollo de este proyecto se determinaron las variables de peso total en relación al tiempo de sacrificio de los animales así como el peso del hígado de los mismos. Los resultados de ambas variables se muestran graficados en la Figura 7 y la Figura 8 respectivamente.

En la Figura 7 se puede observar que a partir del segundo mes de estudio, la tendencia en todos los grupos fue de aumento de peso, sin embargo el grupo que al final tuvo una mayor ganancia de peso fue el grupo T. Se encontraron diferencias

estadísticamente significativas en el mes 0 y 1 de sacrificio (el grupo T+G tuvo mayor peso en relación al C y T) pero interesantemente en el mes 4 el mismo grupo T+G mostró una reducción de peso corporal estadísticamente significativa en relación a los grupos C y T.

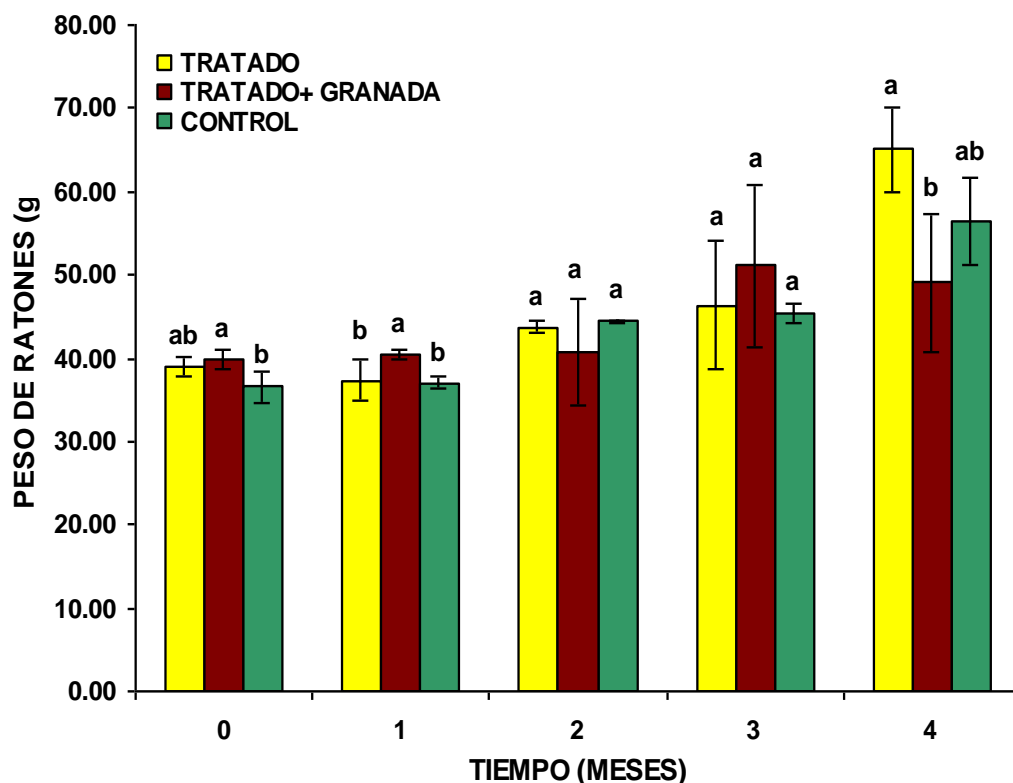


Figura 7. Peso total de los ratones entre grupos, en relación al tiempo de sacrificio. La asignación de diferentes letras (a, b y c) indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Se observa un aumento de peso en todos los grupos a partir del segundo mes, destacándose el mes 4 en donde el grupo T+G tuvo una disminución estadísticamente significativa de peso en relación al T.

Al haberse encontrado que el peso normal de un ratón adulto macho es de 25 a 40 g (Nowak, 1991) y al tomarse el rango alto de referencia, se concluye que al final del estudio (mes 4) los ratones del grupo T fueron los que en promedio, más aumento de peso tuvieron con un 62.75% de masa corporal arriba del rango normal alto, el grupo control 41.25% y sorpresivamente el grupo Tratado+ granada solamente 22.5% arriba del rango normal alto. Dado éste análisis es pertinente proponer la duplicación de esta parte del estudio con un seguimiento por más tiempo para ver si continua la tendencia y poder reafirmar que el zumo de granada tuvo efecto sobre el peso total

de los animales. Al respecto, Lei *et al.* (2007), reportaron que una suplementación de 400/800 mg/Kg peso de hoja de granada durante 5 semanas en ratones, tuvo un efecto de decremento del peso corporal estadísticamente significativo en ratones estudio con relación a los controles. Dentro de la revisión de literatura no se encontraron estudios en donde se pruebe al zumo de granada como posible tratamiento de la obesidad por lo que el presente puede ser un parteaguas para su estudio. Finalmente el marcado aumento de peso observado en los ratones reafirma que una dieta alta en grasas (55% del total de macronutrientes), es un factor predisponente para el desarrollo de la obesidad.

La finalidad de analizar el peso del hígado de los animales de experimentación fue el detectar posibles casos de esteatosis hepática y observar de que manera el zumo de granada pudiese influir disminuyendo este estado fisiopatológico característico en la presencia de obesidad. En la Figura 8 se observan los resultados del promedio de peso de hígado de los animales estudio. Al inicio del experimento, los hígados de los ratones tuvieron un peso de aproximadamente 2 gramos similar entre ellos (sin diferencia estadística), sin embargo, éste comportamiento se vio alterado encontrándose diferencias significativas del grupo T+G en el mes 1 y 3, el grupo C en el mes 2 y el grupo T en el mes 4 en donde el grupo T+G tuvo una disminución en el peso. Con la obtención de éstos resultados contradictorios se observa que el zumo de granada no tiene un efecto protector ante esta patología, sin embargo se propone dar seguimiento al comportamiento del último mes de sacrificio para poder saber si el zumo de granada tiene un efecto sobre la disminución de esteatosis hepática. Cabe mencionar que en el mes 4 el grupo T tuvo un peso de hígado mayor estadísticamente significativo, lo que indica que posiblemente en estas instancias existió un proceso inflamatorio. Se propone realizar estudios ultrasonográficos específicos en donde se mida la masa, tamaño, coloración entre otros criterios diagnósticos para la esteatosis hepática.

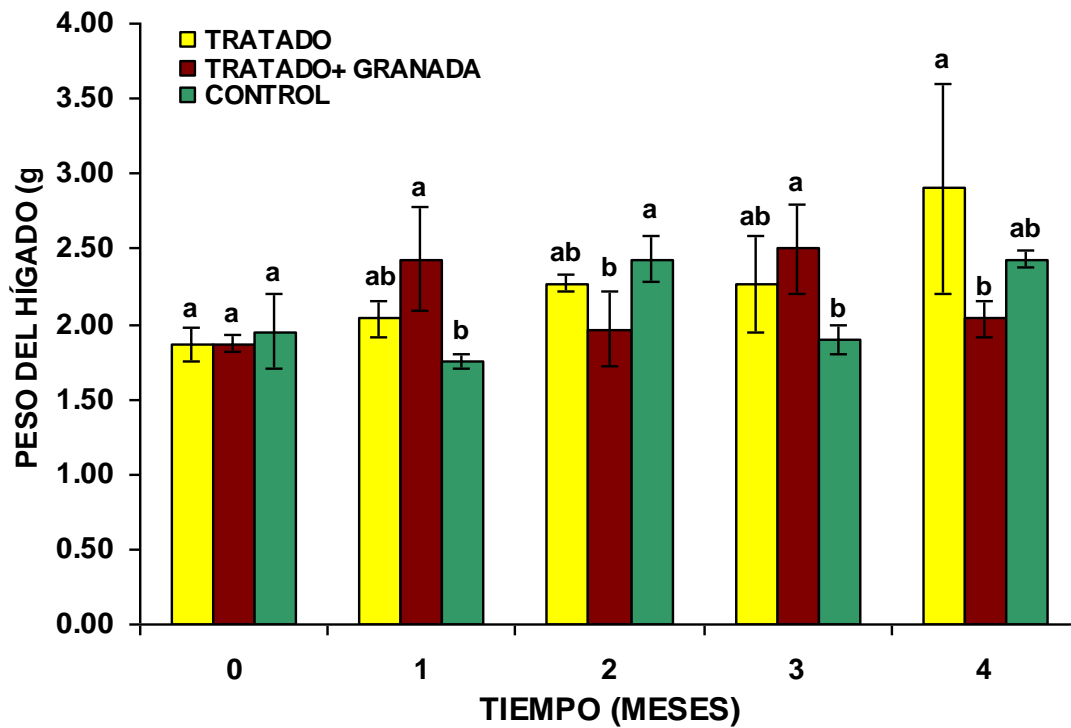


Figura 8. Peso del hígado animales de experimentación en relación al tiempo (meses) de sacrificio. La asignación de diferentes letras (a, b y c) indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

9. CONCLUSIONES

El zumo de granada presente en el grupo T+G aumentó la expresión del gen de la PON1 en aproximadamente un 20- 30% en los 4 meses de tratamiento con respecto al grupo T, habiendo diferencia significativa en los últimos 2 meses, Por tanto tiene un efecto ateroprotector en ratones CD-1 diabetizados y alimentados con dieta aterogénica.

El zumo de granada disminuyó el peso total de los animales al final del estudio.

El zumo de granada no disminuyó el peso del hígado de los animales en los primeros meses de estudio, sin embargo en el mes 4 de tratamiento sí, por lo que se propone dar seguimiento para afirmar que éste tiene un efecto benéfico ante el desarrollo de esteatosis hepática.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asociación Americana de Diabetes. 2003. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 26 (suppl1). pp: S5- S20.
- Asociación Americana de Diabetes. 2006. Dirección: <http://www.diabetes.org/uedocuments/dangerous-toll-spanish-2006.pdf>
Actualización: 12/06. Acceso: 24/03/09.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T. 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr*. 71:1062-76.
- Aynacioglu, A. S., Cascorbi, I., Mrozikiewics, P. M., Nacak M., Tapanyigit, E. E., Roots, I. 1999. Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population. *Toxicol Apl Pharmacol*. 157(3): 174-7.
- Bases moleculares de la heredabilidad génica. Facultad de Biología, Pontificia Universidad Católica de Chile. Dirección: http://www.puc.cl/sw_educ/biologia/bio100/html/portadaMIval3.0.html
- Billecke, S., Draganov, D., Counsell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C., La-Du, B. N. 2000. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos*. 28: 1335-1342.
- Chait, A. y Brunzel, D., 2003. Lípidos y aterosclerosis. En: Diabetes Mellitus texto básico y clínico. 2da edición. Mc Graw Hill Interamericana. (ed) Derek, L. R., Simeon, T. I., Jerrold, O. México, D.F. pp: 1162- 1163.
- Costa, L. G., Cole, T. B., Jarvik, G. P. y Furlong, C. E. 2003. Functional Genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med*. 54: 371-392.
- Cruz-Mayorga, D. 2010. Efecto de diversos tipos de dietas sobre la expresión del gen de la PON1 en ratas Wistar [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pendiente publicación.

- Davies, H. G., Richter, R. J., Keifer, M., Broomfield, C. A., Sowalla, J., Furlong, C. E. 1996. The effect of the human paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet.* 14: 334-336.
- Deakin, S., Leviev, I., Gomaraschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G. y James, R. W. 2002. Enzymatically active paraoxonase-1 is located as the external membrane of producing cells and released by a high-affinity, saturable, description mechanism. *J Biol Chem.* 277(6): 4301-4308.
- Durrington, P. N., Mackness, B. y Mackness, M. I. 2001. Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 473-480.
- EROSKI. GRANADA/ GUIA DE FRUTAS/ CONSUMER EROSKI
Dirección: <http://frutas.consumer.es/documentos/frescas/granada/intro.php>.
Actualización: N/R. Acceso: 8/12/08.
- Federación Internacional de Diabetes (FID). 2001. Diabetes and cardiovascular disease: double jeopardy. En: *Diabetes and Cardiovascular Disease; Time to act.* pp: 19- 43.
- Federación Internacional de Diabetes (FID). 2010. IDF Diabetes Atlas 4ª Edición, Diabetes and Impaired Glucose Tolerance. Dirección: <http://atlas.idf-bxl.org/content/diabetes-and-impaired-glucose-tolerance>. Actualización: 2009. Acceso: 15/03/2010.
- Federación Mexicana De Diabetes (FMD). Dirección: http://www.fmdiabetes.com/v2/paginas/d_numeros.php. Actualización: 16/03/09. Acceso: 16/03/09.
- Federación Mexicana De Diabetes (FMD). Dirección: http://www.fmdiabetes.com/v2/paginas/d_numeros.php. Actualización: 16/03/09. Acceso: 16/03/09.
- Ferré, N. J. y Camps, J. J. 2004. Paraoxonasas, acción antioxidante de las HDL y respuesta Inflamatoria. *Cardiovascular Risk Factors.* 13(2): 106-114.
- Gan, K. N., Smolen, A., Eckerson, H. W. y La Du, B. N. 1991. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos.* 19: 100-116.

- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., Kader, A. A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* 48:4581–4589.
- Gillies, P. J. 2003. Nutigenomics: the rubicon of molecular nutrition. *J Am Diet Assoc.* 103 (12 Supl. 2): S 50-55.
- Gorostiza- Langa, A. y González- Martín, A. 2009. Genómica Nutricional. En: *Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas.* (ed) Morales- González, J. A., Fernández- Sánchez, A. M., Bautista-Ávila, M., Vargas- Mendoza, N., Madrigal- Santillán, E. O. Editorial UAEH, México. pp: 639-653.
- Gouédard, C., Barouki, R. y Morel, Y. 2004. Dietary Polyphenols Increase Paraoxonase Gene Expression by an Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Mechanism. *Mol Cell Biol.* 24 (12): 5209-5222.
- Guyton, A. C. y Hall, J. E., 2001. Atherosclerosis. En: *Tratado de Fisiología Médica.* McGraw-Hill interamericana. (ed) Guyton, A.C. Madrid, España. pp: 948-949.
- Guyton, A. C. y Hall, J. E., 2001. Atherosclerosis. En: *Tratado de Fisiología Médica.* McGraw-Hill interamericana. (ed) Guyton, A.C. Madrid, España. pp: 948-949.
- Hasset, C., Richter, R. J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J. W. y Omiecinski, C. J. 1991. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature proteins retains its signal sequence. *Biochemistry.* 30: 10141-10149.
- Jarrett, J. 1992. Risk factors for coronary hearth disease in diabetes mellitus. *diabetes.* 41(supl2):1
- Kaplan, M., Hayek, T., Raz, A., Coleman, R., Dornfeld, L., Vaya, J. y Aviram, M. 2001. Pomegranate Juice Supplementation to Atherosclerotic Mice Reduces Macrophage Lipid Peroxidation, Cellular Cholesterol Accumulation and Development of Atherosclerosis. *J Nut.* 131: 2082-2089.
- Kaput, J., Rodríguez, R. L. 2004. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics.* 15:16:166-77.
- Lei, F., Zhang, X. N., Wang, W., Xing, D. M., Xie, W. D., Su, H., Du, L. J. 2007 Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *Int J Obes.* 31: 1023-1029.

- Li, H. L., Liu, D. P., Lian, C. C. 2003. Paraoxonase gene polymorphisms, oxid stress and diseases. *J Mol Med.* 81(12): 766-79.
- López-Casillas, F. 2009. La transcripción de los genes. En: Bioquímica de Laguna 6^a ED. (ed) Laguna, J., Piña, E. Ed Manual Moderno, México, D.F. pp. 611- 644.
- Mackness, B., Durrington, P., McElduff, P., Yamell, J., Azam, N., Watt, M. 2003. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly prospective study. *Circulation.* 107(22): 2775-9.
- Mackness, B., Durrington, P. N., Mackness, M. I. 1999. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet.* 353: 468-469.
- Mackness, B., Mackness, M. I., Arrol, S., Turkie, W. y Durrington, P. N. 1998. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS.* 423: 57-60.
- Mackness, M. I., Arrol, S. y Durrington, P. N. 1991. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low- density lipoprotein. *FEBS.* 286: 152-154.
- Marti, M. A., Moreno-Aliaga, M. J., Zulet, A. y Martínez, J. A. 2005. Avances en nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigenética. *Nutr. Hosp.* 20(3): 157-164.
- Martínez-Pérez, M.M. 2010. Efecto del zumo de granada en la actividad enzimática y valores bioquímicos en ratones diabetizados y alimentados con dieta aterogénica [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pendiente publicación.
- Mathews, K. C. y Van Holde, K. E. 2002. Información. En: Bioquímica. 3da Edición. (ed) Mathews, K. C. y Van Holde, K. E. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España. pp: 954- 1114.
- MedlinePlus Enciclopedia Médica: Diabetes, Dirección: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001214.htm>.
Actualización: 6/17/08. Acceso: 26/02/09
- Muller, M., Kersten, S. 2003. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat Rev Genet,* 4:315-22.
- Muñoz, M., Chávez-Villasana, A., Roldán-Amaro, J. A., Ledesma-Solano, J. A., Mendoza-Martínez, E., Pérez-Gil, R. F., Hernández-Cordero, S. y Chaparro-

- Flores, A. G. 1996. Granada roja, *Púnica granatum L.* En: Tablas de valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en Latinoamérica. Ed. Pax México. México D.F. pp: 121.
- Ng, C. J., Waldeigh, D. J., Gangopadhyay, A., Hama, S., Grijalva, V. R, Navab, M., Fogelman, A. M., Reddy, S. 2001. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 276: 44444-44449.
- NIDDK. Diabetes Mellitus: A Major Risk Factor for Cardiovascular Disease. 1999
Dirección: http://www2.niddk.nih.gov/News/SearchNews/09_01_1999.htm.
Actualización: 17/04/08. Acceso: 11/03/09
- Nowak, R. M. 1991. Walker's mammals of the world. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, EUA.
- Organización Mundial de la Salud. Diabetes. OMS
Dirección: http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/ Actualización: -
Acceso: 02/09.
- Primo-Parmo, S. L., Sorenson, R. C., Teiber, J. y La Du, B. N. 1996. The human paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 33: 498-507.
- Reddy, S. T., Wadleigh, D. J., Grijalva, V., Ng, C., Hama, S., Gangopadhyay, A. 2001. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 21: 542-547.
- Rodríguez-Esparragón, F., Hernández-Trujillo, Y., Macías-Reyes, A., Hernández-Ortega, E., Medina, A. y Rodríguez-Pérez, J. 2006. Sobre los genes paraoxonasa-1 y *SR-B1*, y su importancia en la aterosclerosis. *Rev Esp Cardiol.* 59: 154- 164.
- Rodriguez-Saldaña, J. 2002. Epidemiología. Servicios de Salud en Hidalgo, subdirección de investigación. Sistema Estadístico de Información en Salud para la Población en General.

- Rosenblat, M., Aviram, M. 2006. Antioxidative properties of pomegranate: in vitro studies. En: *Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine*. eds. Seeram, N. P., Heber, D. New York, NY: Taylor and Francis Group. 31–43.
- SAGARPA. Portal OEIDRUS. Sistema Estatal De Información Para El Desarrollo Rural Sustentable. Dirección: <http://www.campohidalguense.gob.mx/> Acceso: 26/10/09
- Secretaría de Salud de Hidalgo. 2007. DGIS. Datos obtenidos directamente de la base de datos de la subdirección de epidemiología, SSa Hidalgo.
- Seeram, N. P., Lee, R., Heber, D. 2004. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clin Chim Acta*. 348:63–68.
- Senti, M., Tomas, M., Elosua, R., y Marrugat, J. 2000. Interrelationship of serum paraoxonase genetic variants on atherosclerosis risk. *Cont Science*. 1(3):323-329.
- Serrano-Ríos, M. 2004. Diabetes mellitus. En: *Medicina interna Vol 2*. (ed) Díaz-Rubio, M., Espinos, D. ed. Editorial Médica Panamericana, Madrid. pp: 2112-2120.
- Shih, Y. S., Tward, A., Xia, Y. R., Wang, X. P., Park, C. y Castellani, L. W. 2002. Decreased Atherosclerotic Lesion Formation in Human Serum Paraoxonase Transgenic Mice. *Circulation*. 106: 184.
- Sorenson, R. C., Bisgaier, C. L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S. y La Du, B.N. 1999. Human Serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-1 stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19: 2214-2225.
- Stover, P. J. 2004. Nutritional genomics. *Physiol Genomics*. 16:161-5.
- Tkac, I., Kimball, B. P., Lewis, G., Uffelman, K., Steiner, G. 1997. The severity of coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus is related to the number of circulating triglyceride-rich lipoprotein particles. *arterioscler thromb Vasc Biol*. 17:3633.
- West, K. M., Ahuja, M. M. S., Bennet, P. H. 1983. The role of circulating glucose and trygliceride concentrations and their interactions with other “risk factors” as

determinants of arterial disease in nine diabetic population samples from WHO multinational study. *diabetes care*. 6:361

Wilhelm-Thomé, O. *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* 1885, Gera, Germany. Imagen Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Illustration_Punica_granatum1.jpg acceso: 16/10/09.

Witztum, J. L. y Steinberg, D. 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 88:1785.

11. ANEXOS

ANEXO 1.

Tabla 8. CUIDADOS Y PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE *Mus musculus*

Temperatura (°C)	20-24
Humedad relativa (%)	50-60
Ventilación (cambios/ hora)	15
Luz/ oscuridad (horas)	12-14/ 12-10
Parámetros fisiológicos	
Peso adulto (g)	
Macho	25-40
Hembra	20-40
Superficie corporal (cm ²)	20g: 36
Consumo de comida (g/ día)	4-5
Consumo de agua (mL/ 100 g/ día)	15
Parámetros sanguíneos y bioquímicos	
Volumen de sangre (mL/ Kg)	76-80
Glucosa (mg/ 100 mL)	89 (63-176)
Colesterol total	64 (26-82)

ANEXO 2.

Tabla 9. Expresión relativa PON1/GADPH en los distintos tratamientos.

TIEMPO	TRATAMIENTOS		
	TRATADO	TRATADO + GRANADA	CONTROL
MES 0	0.2657 ± 0.1873 ^a	0.1946 ± 0.1644 ^a	0.2273 ± 0.0122 ^a
MES 1	0.4679 ± 0.0226 ^b	0.5984 ± 0.1937 ^b	1.0938 ± 0.0262 ^a
MES 2	0.5829 ± 0.1919 ^b	0.8372 ± 0.1593 ^b	1.2802 ± 0.0928 ^a
MES 3	0.5829 ± 0.0902 ^c	0.8372 ± 0.1471 ^b	1.2876 ± 0.0758 ^a
MES 4	0.8056 ± 0.0901 ^c	0.9848 ± 0.0170 ^b	1.2816 ± 0.0698 ^a

ANOVA P<0.05

Tabla 10. Peso total de los animales por tiempo de sacrificio en los distintos tratamientos

TIEMPO	TRATAMIENTOS		
	TRATADO	TRATADO + GRANADA	CONTROL
MES 0	39.0000 ± 1.0536 ^{ab}	39.9333 ± 1.1590 ^a	36.6000 ± 1.9000 ^b
MES 1	37.3333 ± 2.3861 ^b	40.4333 ± 0.7234 ^a	37.0000 ± 0.7000 ^b
MES 2	43.7333 ± 0.6807 ^a	40.7000 ± 6.4094 ^a	44.4500 ± 0.1500 ^a
MES 3	46.3667 ± 7.7526 ^a	51.0667 ± 9.7002 ^a	45.4000 ± 1.2000 ^a
MES 4	65.1333 ± 5.1003 ^a	49.0333 ± 8.2809 ^b	56.5000 ± 5.3000 ^{ab}

ANOVA P<0.05

Tabla 11. Peso total del hígado de los animales por sacrificio en los distintos tratamientos

TIEMPO	TRATAMIENTOS		
	TRATADO	TRATADO + GRANADA	CONTROL
MES 0	1.8667 ± 0.1155 ^a	1.8667 ± 0.0577 ^a	1.9500 ± 0.2500 ^a
MES 1	2.0333 ± 0.1155 ^{ab}	2.4333 ± 0.3512 ^a	1.7500 ± 0.0500 ^b
MES 2	2.2667 ± 0.0577 ^{ab}	1.9667 ± 0.2517 ^b	2.4333 ± 0.1528 ^a
MES 3	2.2667 ± 0.3215 ^{ab}	2.5000 ± 0.3000 ^a	1.9000 ± 0.1000 ^b
MES 4	2.9000 ± 0.7000 ^a	2.0333 ± 0.1155 ^b	2.4333 ± 0.0577 ^{ab}

ANOVA P<0.05

ANEXO 3.**FOTODOCUMENTACIÓN**

Figura 9. Fotografía de ratón de grupo Tratado con visible obesidad.

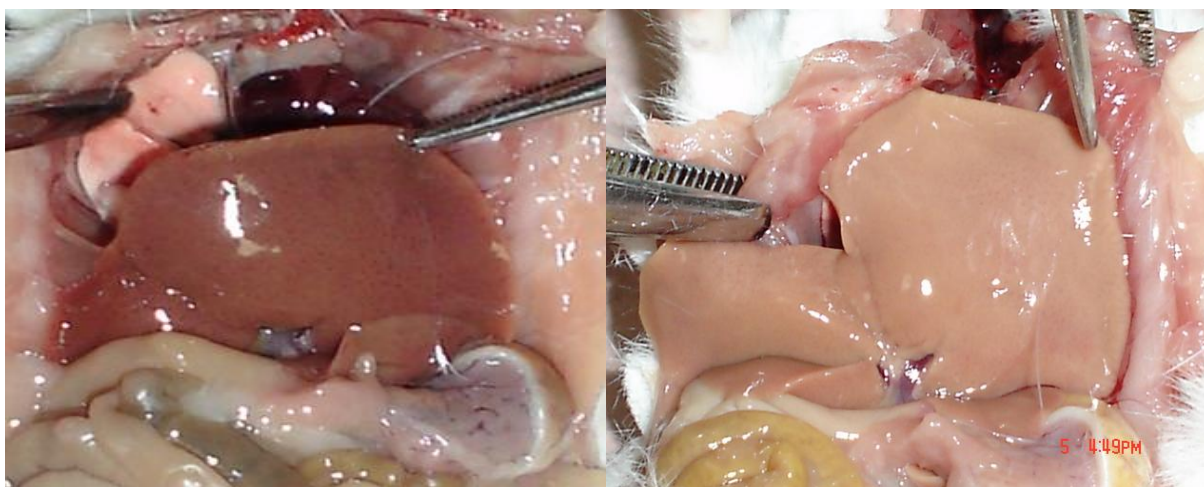


Figura 10. Comparativo de hígado de ratón Control con uno del grupo Tratado. Se puede observar a la izquierda el hígado de un ratón del grupo control, en comparación con un hígado cuya tonalidad puede indicar esteatosis hepática (derecha) del grupo Tratado.