

**EFFECTOS DE LA DIETA POST ABLACTACIÓN SOBRE LA
MADURACIÓN POSTNATAL DEL ISLOTE PANCREÁTICO Y SU
RELACIÓN CON LA DIABETES MELLITUS TIPO 2.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN
BIOTECNOLÓGICA**

PRESENTA
IBP. YERENDIRA PAOLAH GAYTAN DÁVILA

TUTOR: DR. EMMANUEL DÍAZ MARTÍNEZ
CO- TUTOR: DR. EDUARDO PADILLA CAMBEROS
ASESORA: DRA. BRENDA VEGA RUIZ
ASESORA: DRA. MARIA JOSÉ RIVAS ARREOLA

GUADALAJARA, JAL. AGOSTO 2018



Guadalajara, Jalisco a 30 de Julio de 2018

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante **Yerendira Paolah Gaytan Dávila**, una vez leída y revisada la Tesis titulada "EFECTOS DE LA DIETA POST ABLACTACIÓN EN LA MADURACIÓN POSNATAL DEL ISLOTE PANCREÁTICO Y SU RELACIÓN CON LA DIEBETES MELLITUS TIPO 2" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción terminal en Biotecnología Médica Farmacéutica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 30 del mes de Julio del año dos mil dieciocho.

Dr. Emmanuel Díaz Martínez

Director de tesis

Dr. Eduardo Padilla Camberos

Co-director de tesis

Dra. Brenda Vega Ruiz

Asesora

Dra. María José Rivas Arreola

Asesora

AGRADECIMIENTOS

Al fondo CONACYT INFRA 271307 y a la Red Temática de Células Troncales y Medicina Regenerativa.

A la beca CONACYT No. 454233 por el apoyo económico otorgado como parte de la Convocatoria de Becas Nacionales 2016 Segundo Periodo.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco por el apoyo brindado para poder desarrollarme profesionalmente durante mi proyecto de Maestría en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

A mi director de Tesis, el Dr. Emmanuel Díaz Martínez que me permitió ser parte de su grupo de trabajo y me brindó la oportunidad de desarrollar mi proyecto de Maestría bajo su dirección.

A la Dra. Patricia Ramírez por su apoyo y asesoría para poder llevar a cabo del desarrollo de mi tesis.

A mis asesoras la Dra. Brenda Vega Ruiz y la Dra. María José Rivas Arreola por compartir sus conocimientos que me guiaron en vías de un mejor desempeño para desarrollar este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Guatemala por las facilidades otorgadas para la utilización de los equipos de Planta Piloto de CIATEJ Unidad Normalistas.

Al Dr. Miguel Beltrán por la confianza, las atenciones y las facilidades otorgadas en los laboratorios 309 y 314 del instituto de Ciencias Exactas y Terrestres de la Universidad Autónoma de Guadalajara.

Al M. en C. Agustín Cota por su amistad incondicional, apoyo constante y buenos consejos durante los momentos más difíciles, por sus ocurrencias y aventuras, pero sobre todo por motivarme a ser una mejor científica día con día.

Al M. en C. Armando Ávalos por sus lecciones de vida, su honestidad e invaluable amistad que me hicieron crecer como persona durante mi estancia en el posgrado.

A mi amiga y compañera de generación Denise Caudel por su valiosa amistad y complicidad, por compartir momentos de angustia y alegría que hicieron más amena mi estancia en CIATEJ.

A mi compañero y amigo Michel Aceves por su paciencia y asesoría, además de compartir su experiencia en el trabajo de laboratorio conmigo.

A mis profesores por transmitirme los conocimientos necesarios y seguir impulsando mi curiosidad científica.

A mis amigos y compañeros de CIATEJ, por las buenas experiencias compartidas.

DEDICATORIAS

Me tomo la libertad de dedicar enteramente esta tesis a mi familia, por permitirme seguir el camino de la ciencia a pesar de la distancia, y por apoyarme incondicionalmente siempre en todo.

A mi mamá le dedico todo el trabajo y esfuerzo puesto en este proyecto, porque siempre ha creído en mí y me impulsa a ser una mujer fuerte que lucha por sus sueños y nunca se conforma, por enseñarme a no darme por vencida a pesar de los obstáculos y su infinito amor que me mantuvo de pie en los momentos más difíciles.

A mi papá, por ser el pilar que sostiene a mi familia y un ejemplo de constancia y responsabilidad.

A mis sobrinos Sebastián y Zoe y mi hermanito Abraham, por ser la luz de mi vida y mi motivo principal para salir adelante y ser una mejor persona, para que se sientan orgullosos y poder ser un ejemplo para ellos en un futuro.

A mi hermano Uriel por su respaldo y cariño.

A mis roomies Carmen y Elizabeth por brindarme amor de familia en una ciudad extraña y a mi mejor amigo Héctor por hacer mi vida divertida y más feliz.

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico con múltiples etiologías, caracterizado por hiperglucemia crónica acompañada de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. Se han descrito dos formas principales: la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) y la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). La DMT2 es la forma más prevalente la cual representa el 90% de los casos a nivel mundial como resultado de una resistencia directa a la síntesis de insulina en tejidos insulino-dependientes y alteraciones en la secreción de insulina por las células β . En México se presenta una alta susceptibilidad a padecer enfermedades metabólicas debido al consumo de Dietas Altas en Grasas (DAG) desde la infancia, lo que en primera instancia produce obesidad, la cual es el principal factor de riesgo relacionado con DMT2. Poco se ha estudiado sobre los efectos que provoca la ingesta de DAG durante periodos críticos del desarrollo como la post-ablactación, que se ha descrito tiene una acción directa en la maduración postnatal del islote pancreático. En diversos estudios en modelos animales alimentados con DAG ($\geq 40\%$ de ácidos grasos saturados) se han encontrado alteraciones metabólicas caracterizadas por dislipidemia, respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y resistencia periférica a la insulina, por lo que, una mejor comprensión de estos eventos críticos que ocurren en etapas tempranas de la vida ayudará a aclarar las causas de la susceptibilidad individual de la diabetes en el adulto

El presente trabajo se presenta evidencia científica del efecto de una DAG en un modelo murino, en el cual se encontró que los roedores que fueron alimentados con este tipo de dieta mostraron un incremento del 90% en la curva de tolerancia a la glucosa a los 7 y 15 días de tratamiento correspondiente al periodo de post-ablactación, con una ganancia de peso significativa en comparación con el grupo control. Además, se observaron cambios histopatológicos con infiltración linfocítica inflamatoria severa en los animales bajo tratamiento, por lo que se sugiere que la administración de una DAG durante el periodo post-ablactación elude cambios anatómicos y funcionales en el metabolismo del páncreas.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos.....	i
Dedicatoria.....	iii
Resumen.....	iv
Marco teórico	1
1. Páncreas.....	1
1.1 Estructura y anatomía pancreática.....	1
1.2 Secreción de insulina en respuesta a glucosa.....	1
1.3 Organogénesis pancreática.....	3
1.4 Maduración postnatal del islote pancreático.....	6
2. Diabetes mellitus.....	7
2.1 Definición.....	7
2.2 Clasificación.....	7
2.3 Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)	8
2.4 Epidemiología.....	8
2.5 Fisiopatología.....	10
2.5.1 Resistencia a la insulina.....	11
2.5.2 Disfunción de las células β	13
2.5.3 Inflamación.....	15
3. Efectos metabólicos de la dieta alta en grasas (DAG).....	15
Antecedentes	17
Justificación	20
Hipótesis	21
Objetivos	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
Metodología	23

1. Diseño experimental.....	23
2. Tipo de estudio.....	23
3. Criterios de inclusión y exclusión.....	24
4. Grupos de estudio.....	24
5. Tamaño de la muestra.....	26
6. Aspectos bioéticos.....	26
Materiales y métodos.....	27
1. Formulación de la dieta experimental alta en grasas (DAG).....	27
2. Elaboración de la dieta experimental alta en grasas (DAG).....	28
3. Caracterización fisicoquímica de la dieta experimental alta en grasas (DAG) y la dieta control comercial (DC).....	28
4. Pruebas de palatabilidad.....	29
5. Ingesta de alimento y peso corporal.....	31
6. Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (PTGIP).....	31
7. Eutanasia.....	31
8. Pancreatectomía.....	32
9. Análisis histológico del páncreas.....	32
10. Análisis estadístico.....	32
Resultados.....	33
1. Contenido de grasa total de la Dieta control (DC) y la Dieta alta en grasas (DAG).....	33
2. Perfil de textura por punción (PTP) para la Dieta control (DC) y la Dieta alta en grasas (DAG).....	34
3. Pruebas de palatabilidad.....	35
4. Peso corporal e ingesta calórica.....	36
5. Respuesta a la glucosa Intraperitoneal.....	36
6. Histopatología de tejido pancreático.....	39
Discusiones.....	42
Conclusiones.....	45
Referencias	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la anatomía pancreática.....	2
Figura 2. Imágenes de islotes pancreáticos de ratón.....	4
Figura 3. Esquema jerárquico de linaje durante la organogénesis pancreática.....	5
Figura 4. Representación del panorama mundial de la Diabetes mellitus.....	9
Figura 5. Esquema general de las anomalías fisiopatológicas de la hiperglucemia en la DMT2.....	10
Figura 6. Esquema general de los mecanismos de resistencia a la insulina.....	12
Figura 7. Esquema de los efectos de la dieta alta en grasas y la composición lipídica en la disminución de la secreción de insulina estimulada por glucosa.....	19
Figura 8. Línea de tiempo de los periodos de evaluación de la Dieta control (A) y la Dieta alta en grasas (B) en roedores recién destetados.....	25
Figura 9. Diagrama general de proceso de elaboración de la Dieta Alta en Grasas....	30
Figura10. Determinación de grasa total (extracto etéreo) por Soxhlet con base en la NOM-086-SSA1-1994 (Apéndice Normativo C, Numeral 1) validado por la Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos para las 2 diferentes formulaciones.....	33
Figura 11. Perfil de textura por punción.....	34
Figura 12. Ganancia de peso corporal de los ratones bajo las dos diferentes dietas durante 7 días.....	35
Figura 13. Cambio en el peso corporal de los ratones post-destete a los 7 (A) y 15 días (B) y la ingesta calórica a los 7 (C) y 15 días (D) bajo las diferentes dietas.....	37
Figura 14. Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (A) de los ratones post-destete a los 7 (B) y 15 días (C) bajo las diferentes dietas.....	38
Figura 15. Cambios histopatológicos de los ratones post-destete a los 7 y 15 días bajo las diferentes dietas.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutrimental de las dietas administradas.....	27
Tabla 3. Sistema semicuantitativo de evaluación histopatológica.....	40
Tabla 4. Análisis histopatológico semicuantitativo.....	41

MARCO TEORICO

1. Páncreas

1.1 Estructura y anatomía pancreática

El páncreas tiene un papel clave en la regulación de la digestión de macronutrientes y en la homeostasis del metabolismo por la liberación de enzimas digestivas y hormonas pancreáticas. Anatómicamente se encuentra detrás del estómago dentro de la cavidad abdominal superior izquierda y se divide en cabeza, cuerpo y cola¹.

El páncreas es una glándula mixta, contiene dos componentes principales: el compartimento exocrino y el endocrino. El páncreas exocrino consiste en células acinares y de conducto productoras de enzimas digestivas, el páncreas endocrino productor de hormonas que regulan la homeostasis de glucosa representa el 2% del tejido pancreático y se organiza en grupos de células llamadas islotes de Langerhans². Cada islote está compuesto típicamente de cinco subtipos de células diferentes: alfa, beta, delta, épsilon y células PP, que sintetizan y secretan glucagón, insulina, somatostatina, grelina y polipéptido pancreático, respectivamente³. Estos grupos están contenidos en una estructura altamente organizada, donde las células β están en el interior del islote y el resto de los grupos celulares se encuentra en la periferia⁴ (Figura 1). A través de sus diversas hormonas, particularmente el glucagón e insulina, el páncreas mantiene los niveles de glucosa en sangre dentro de un rango de 4-6 mM.

1.2 Secreción de insulina en respuesta a glucosa

Las células endocrinas secretan sus respectivas hormonas en respuesta a señales externas, tales como la ingesta de nutrientes o estrés, a través de vías de señalización humorales, neuronales u hormonales⁵. El proceso molecular subyacente que traduce el estímulo en la liberación real de la hormona se denomina acoplamiento estímulo-secreción conocido como exocitosis dependiente de estímulos de una sustancia en particular, como la liberación de insulina estimulada por glucosa en células β .

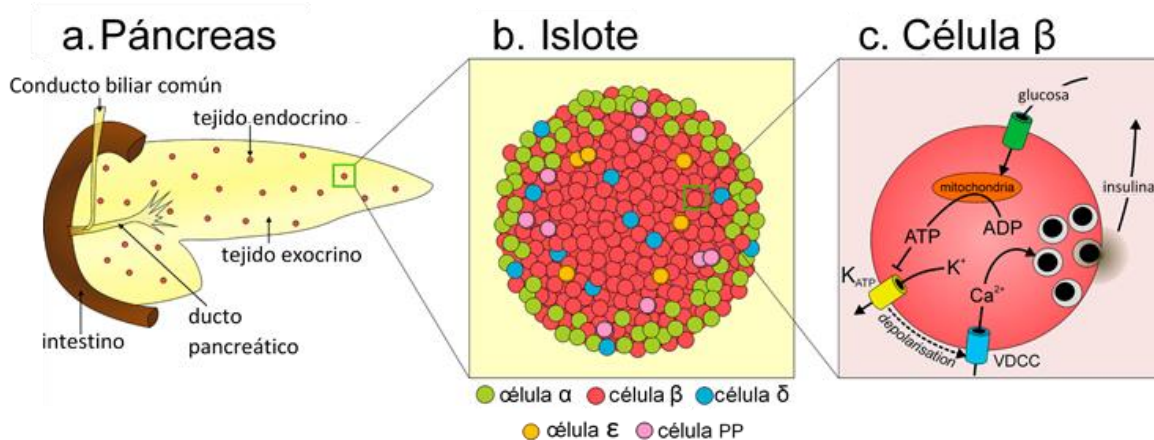


Figura 1. Representación de la anatomía pancreática. A) Se aprecia su localización en la segunda porción del duodeno, el conducto pancreático principal y las divisiones del páncreas (cabeza, cuerpo y cola). B) Representación esquemática de un islote de Langerhans con los respectivos subtipos celulares: α , β , γ , δ y ϵ . C) La secreción de insulina producida por las células β estimulada por glucosa depende del flujo de los iones Ca^{+2} y K^{+} provocando la despolarización de la membrana celular y la actividad eléctrica. (Modificado de MacDonald P. et al., 2016).

En las células β , el principal estímulo para la liberación de insulina se eleva por los niveles de glucosa post-prandial. La glucosa circulante en el torrente sanguíneo es absorbida por el transportador de glucosa facilitado GLUT2 (SLC2A2), que está ubicado en la superficie de las células β ⁶. En los islotes pancreáticos de roedores, GLUT2 es el único transportador involucrado en la captación de glucosa, mientras que en humanos tanto las isoformas GLUT1 como GLUT2 participan en este proceso⁷. Una vez que la glucosa se internaliza en la célula, se somete a la glucólisis, generando adenosina trifosfato (ATP), lo que resulta en un aumento de la relación ATP/ADP. Esta alteración conduce al cierre de los canales K^{+} sensibles a ATP. En condiciones no estimuladas, estos canales están abiertos para garantizar el mantenimiento del potencial de reposo mediante el transporte de los iones K^{+} cargados positivamente por su gradiente de concentración fuera de la célula. Tras el cierre, la disminución subsiguiente en la magnitud de la corriente de K^{+} dirigida hacia el exterior provoca la despolarización de la membrana, seguido de la apertura

de canales de Ca⁺ dependientes de voltaje (VDCC). Finalmente, el aumento en las concentraciones de calcio intracelular desencadena la fusión de gránulos que contienen insulina para su posterior liberación mediante exocitosis⁸. Las moléculas clave que median la fusión de las vesículas de alta densidad que contienen insulina son las proteínas asociadas a sinaptosomas de 25 kDa (SNAP-25), sintaxina-1 y sinaptobrevina 2 (o vesícula asociada a proteína de membrana VAMP2), los cuales pertenecen a la superfamilia de las proteínas de fusión sensible a la N-etilmaleimida (SNAP)⁹.

1.3 Organogénesis pancreática

El desarrollo pancreático es un proceso complejo y altamente regulado que controla la especificación y diferenciación de las células progenitoras y se guía por múltiples vías de señalización y cascadas de factores de transcripción (Figura 3). En el embrión de ratón en desarrollo, la gastrulación (un proceso en el que una blástula en capas se reorganiza en una estructura trilaminar) en el día embrionario (E) 7.5, conduce a la generación de 3 capas germinales, específicamente, el ectodermo, mesodermo y endodermo¹⁰. En el E9.5, el páncreas se origina en el endodermo del intestino anterior como 2 brotes pancreáticos independientes, a lo largo del eje dorsal y ventral. La organogénesis pancreática, diferenciación y maduración es clasificada en 3 etapas: transición primaria (E8.5-12.5), transición secundaria (E12.5-16.5) y transición terciaria (E16.5-postnatal)¹¹.

La **transición primaria** es un periodo de proliferación activo de células progenitoras pancreáticas que forman un epitelio estratificado acompañado por la formación de múltiples micro lumen que luego se fusionan. Algunos de los factores de transcripción involucrados en esta etapa son HB9/HLXB9, ISL1, FOXA2, SOX17, PDX1, PTF1A, SOX9 Y GATA6¹²⁻¹⁵.

Durante la **transición secundaria**, el epitelio pancreático sufre crecimiento, ramificación, diferenciación y se suscita la asignación de linaje celular pancreático,

un proceso logrado mediante la iniciación y el mantenimiento de perfiles específicos de expresión de genes controlados por distintas combinaciones espaciales y temporales de factores de transcripción, los cuales incluyen SOX9, señalización de NOTCH, HES1 y NGN3^{11,16-18}.

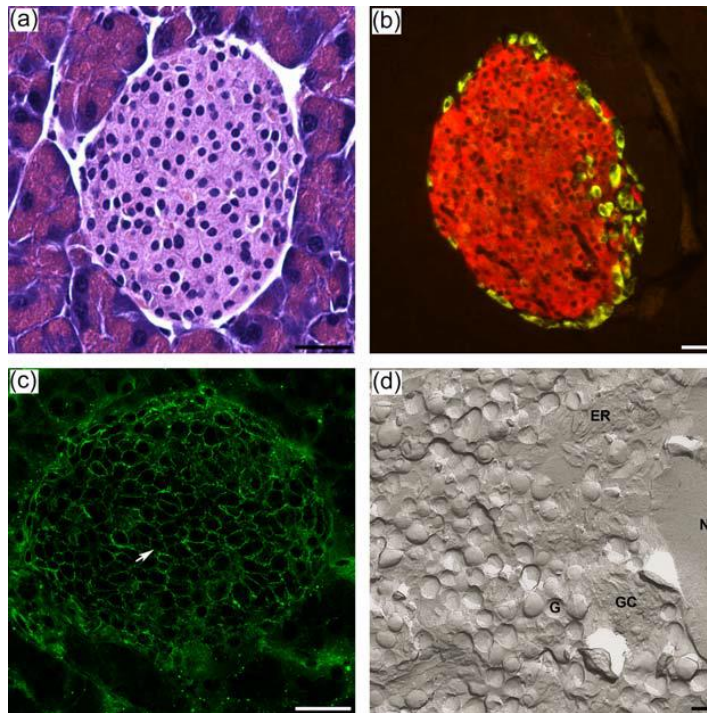


Figura 2. Imágenes de islotes pancreáticos de ratón. Tinción con hematoxilina-eosina (a), inmunomarcaje para insulina (rojo) y glucagón (amarillo). (b) Inmunomarcaje para n-cadherina para mostrar el contacto célula-célula (c, flecha). (d) Imagen de célula β obtenida por microscopía electrónica de barrido. ER, retículo endoplásmico áspero; G, gránulos de insulina; GC, complejo de Golgi; N, núcleo. Barras, 50 μ m (a); 25 μ m (b, c); 400 nm (d). (Obtenido de Molecular Nutrition and Diabetes., 2016).

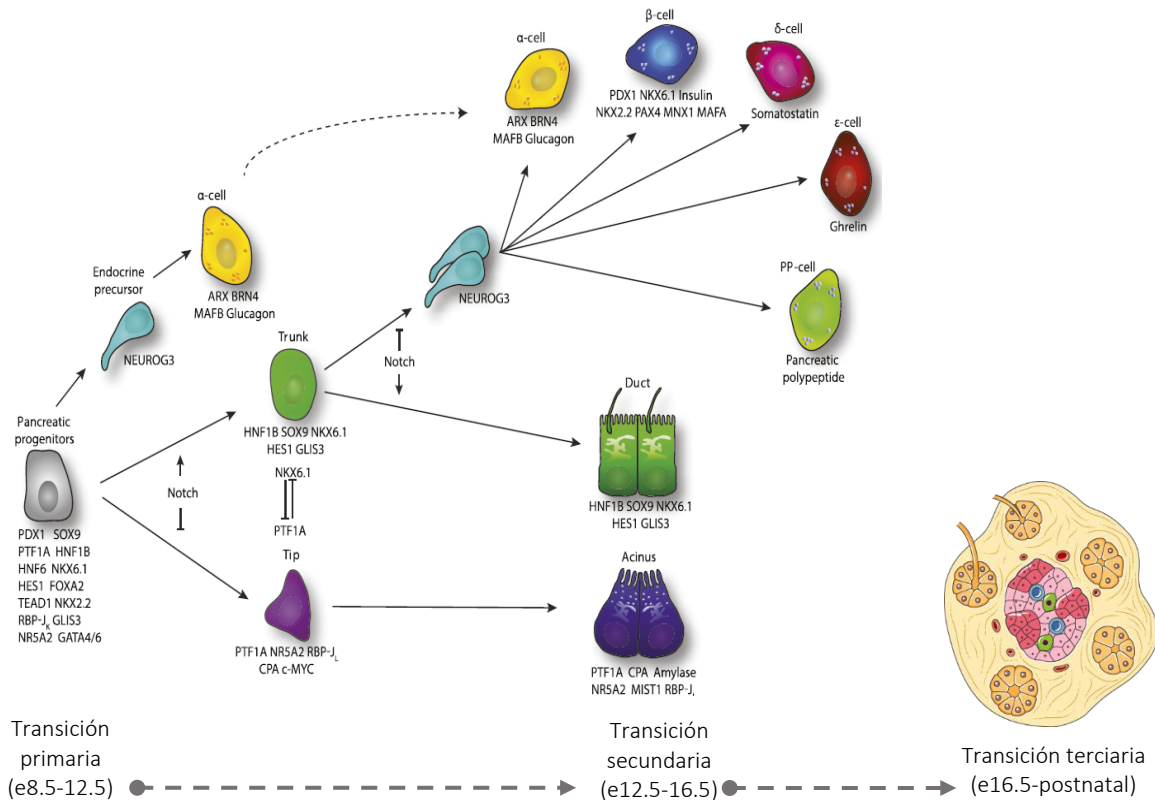


Figura 3. Esquema jerárquico de linaje durante la organogénesis pancreática. Después de la especificación, los progenitores pancreáticos expresan conjuntamente un rango de factores de transcripción asociados al páncreas que facilitan el establecimiento de la red reguladora de genes que media la multipotencia en las primeras etapas del desarrollo del páncreas. (Modificado de H. Larsen et al., 2016).

Durante la **transición terciaria**, las células pancreáticas diferenciadas experimentan remodelación y maduración adicional, en donde las células endocrinas diferenciadas individuales se deslaminan, migran al tejido exocrino vecino y se ensamblan en grupos celulares para iniciar la formación de isletos maduros^{11,16}. En el ratón, los isletos conforman un núcleo central con células β, en la periferia células α, δ y PP y una pequeña proporción de células ε dispersas por todo el islote^{19,20}.

1.4 Maduración postnatal del islote pancreático

Al nacer, aproximadamente el 80% de la masa de células β se origina en la neogénesis de células precursoras indiferenciadas y el 20% restante surge de la proliferación de células β ²¹. La proliferación de células β disminuye gradualmente desde las primeras 4 semanas postnatales hasta después del destete^{21,22}. Posteriormente, la masa de las células del islote se mantiene a través de la autorreplicación. Por lo tanto, la masa de células β adultas no se mantiene a través de la neogénesis²³, pero es capaz de una proliferación limitada²⁴. En roedores con edades comprendidas entre 30 y 40 días, la tasa de replicación de células β es estable²⁵. En humanos, la mayor tasa de proliferación se observa antes de los 2 años de edad, y después de los 5 años la masa de las células β permanece relativamente constante^{26,27}. En condiciones normales, la célula β adulta tiene una vida larga pero la proliferación disminuye con la edad²⁸. Durante la edad adulta, la masa del islote no se altera, excepto en respuesta a estados fisiológicos (p. ej., embarazo) y patológicos (p. ej., obesidad y resistencia a la insulina)^{29,30}. La diferenciación acinar, maduración y la proliferación también continúan después del nacimiento y se disipan hasta el destete³¹.

El desarrollo normal de la células β en el páncreas en el periodo de post ablactación, caracterizado por la introducción de alimentos complementarios a la leche materna, requiere adaptaciones metabólicas extensas y coordinadas para mantener la homeostasis de glucosa³², el cual culmina en dos eventos cruciales de maduración:

- i. Maduración funcional del islote pancreático: Se perfecciona la maquinaria sensora de glucosa y se aumenta la producción de insulina por célula, lo que resulta en la maduración de la secreción de insulina en respuesta a glucosa^{33,34}
- ii. Maduración morfológica del islote pancreático: Se establece un número suficiente de células β en proporción con el peso corporal del individuo, para lograr una masa apropiada y se lleva a cabo la remodelación del islote pancreático, el cual adquiere la citoarquitectura típica de un islote adulto para

la correcta función pancreática endocrina que depende de las uniones celulares y proteínas constitutivas que permiten la segregación, adhesión y comunicación entre las células del islote^{35,36}.

Dichos procesos determinan la maduración del islote, lo que marca el final de los procesos de desarrollo encaminados a alcanzar la plena capacidad funcional de la célula β ³⁷, sin embargo, se cree que los defectos en la maduración de las células β , así como un fracaso en su expansión determina la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades metabólicas, como diabetes mellitus³².

2. Diabetes mellitus

2.1 Definición

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico con múltiples etiologías, caracterizado por hiperglucemia crónica acompañada de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas que surge de la disfunción de la insulina para actuar sobre los tejidos periféricos.^{2,38}

Varios procesos como factores ambientales (p ej., la obesidad, una dieta no saludable e inactividad física) y factores genéticos contribuyen a las múltiples fisiopatologías que son responsables de la alteración de la homeostasis de la glucosa implicados en el desarrollo de DM³⁹.

2.2 Clasificación

Actualmente, la Federación Internacional de la Diabetes (FID) clasifica a la DM en tres formas principales: Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) y tipo 2 (DMT2) y diabetes gestacional, sin embargo, un estudio reciente publicado por Ahlqvist E. et. al (2018) en *The Lancet Diabetes Endocrinology*, mencionan que la DMT2 en particular es muy heterogénea, por lo que proponen una nueva estratificación en 6 clusters basados en seis variables clínicas (anticuerpos glutamato descarboxilasa, edad al

momento del diagnóstico, IMC, HbA1c, estimaciones de la evaluación del modelo homeostático 2 de la función de las células β y resistencia a la insulina) lo cual eventualmente podría ayudar a adaptar y dirigir el tratamiento temprano a los pacientes representando un primer paso hacia la medicina de precisión en la DMT2⁴⁰.

2.3 Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2)

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) se caracteriza por la desregulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y por la alteración de la secreción de insulina, la resistencia a la insulina o una combinación de ambos. De los tres tipos principales de diabetes, la DMT2 es mucho más común (representa más del 90% de los casos a nivel mundial) que DMT1 o la diabetes gestacional³⁹.

Su principal causa es la secreción progresiva de insulina por las células β pancreáticas, debido a un antecedente de resistencia a la insulina preexistente en el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo⁴¹.

2.4 Epidemiología

La DMT2 se ha convertido en un problema trascendental y sus cifras epidemiológicas son alarmantes³⁹. Datos de la FID obtenidos en 2017 arrojaron que a nivel mundial había alrededor de 425 millones de personas diagnosticadas con diabetes y para el año 2045 proyectan un estimado de 629 millones de pacientes con esta enfermedad crónica (Figura 4)⁴²; así mismo reportó un estimado de 12,030.1 millones de mexicanos con este padecimiento en ese mismo año.

Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la DMT2 en 2016 fue la segunda causa de muerte en mujeres y varones en México: se registraron 685,766 defunciones, cuyas principales causas fueron las enfermedades cardiovasculares (136,342 millones), diabetes mellitus (105,572 millones) y los tumores malignos (85,502 millones). La mortalidad es más prevalente en mujeres

(53,842 millones) que en hombres (51,784)⁴³. En México, se tiene una alta susceptibilidad a padecer DMT2 debido al gran consumo de azúcares refinados, grasas saturadas y sodio desde edades tempranas⁴⁴, por lo que la prevalencia de sobrepeso y obesidad (uno de los principales factores de riesgo relacionados con la DMT2) entre niños de 5 a 11 años ha aumentado dramáticamente en los últimos años, de acuerdo con los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino en 2016⁴⁵.

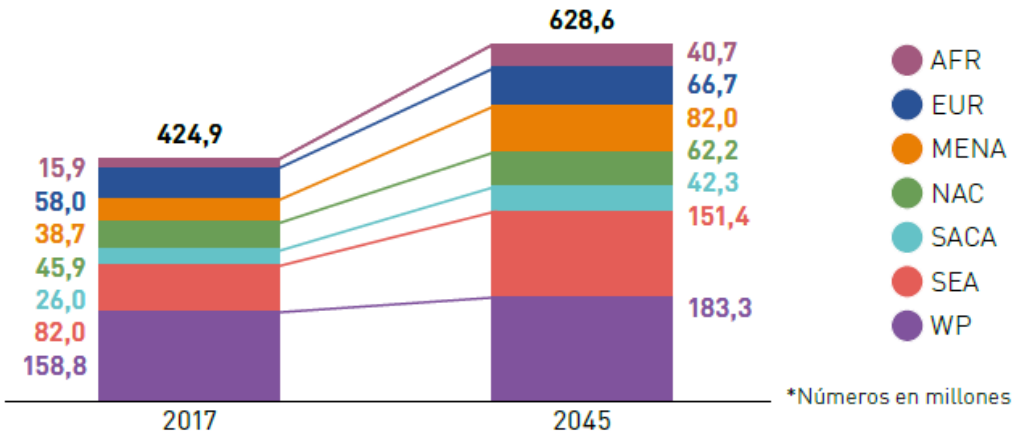


Figura 4. Representación del panorama mundial de la Diabetes mellitus. Se estima que para el año 2045 habrá un incremento del 48% de los casos de DM a nivel global. AFR, África; EUR, Europa; MENA, Oriente Medio y Norte de África; NAC, América del Norte y el Caribe; SACA, América del Sur y Central; SEA, Sudeste Asiático; WP, Pacífico Occidental (Obtenido de IDF Atlas, 8ª edición 2017).

Datos de la FID exponen que en 2017 México ocupaba el octavo lugar en el ranking de los países con el mayor gasto sanitario total en el tratamiento de la DMT2 y sus complicaciones (principalmente aquellas relacionadas con nefropatía diabética) en personas entre 20 y 79 años, el cual fue de más de 19 mil millones de dólares⁴², lo que representa casi una tercera parte del gasto médico total del sector salud⁴⁶. Con tal altos costos, la enfermedad supone un desafío significativo para los sistemas sanitarios y un obstáculo para el desarrollo económico sostenible del país⁴⁷.

2.5 Fisiopatología

Los cambios fisiopatológicos de la DMT2 se caracterizan por la resistencia a la insulina, disfunción de las células β y la inflamación crónica, lo cual obstaculiza progresivamente el control de los niveles de glucosa en sangre y conduce al desarrollo de complicaciones micro y macrovasculares³⁹. Al menos ocho anomalías fisiopatológicas distintas contribuyen a la alteración de la homeostasis de la glucosa provocando hiperglucemia (Figura 5)⁴⁸.

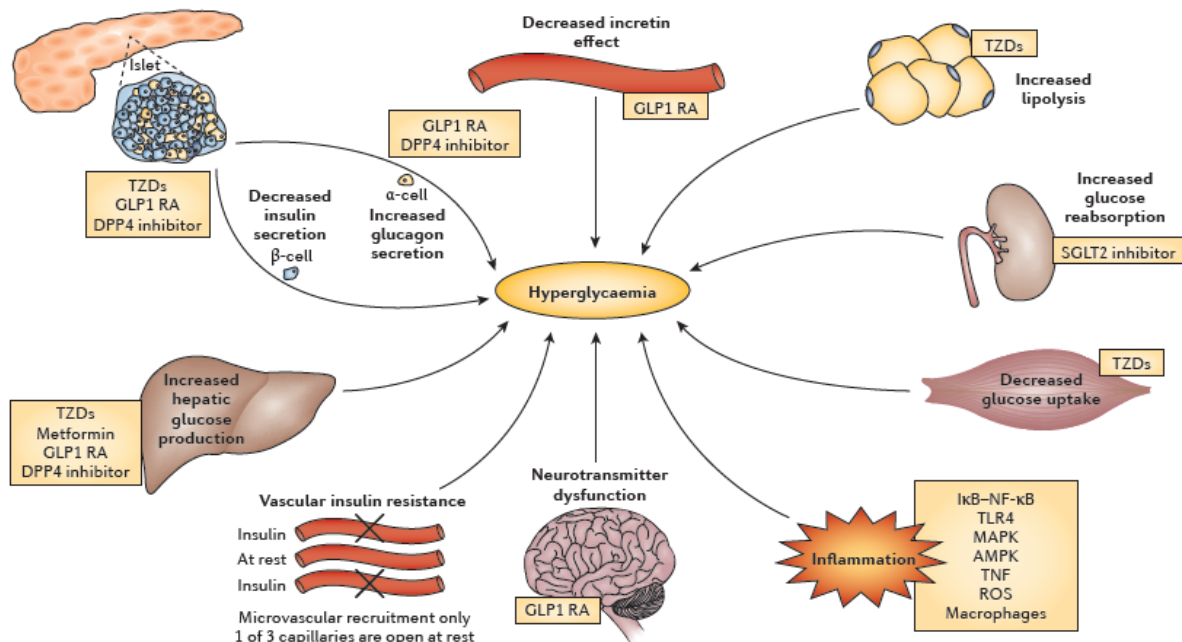


Figura 5. Esquema general de las anomalías fisiopatológicas de la hiperglucemia en la DMT2. Resistencia a la insulina en el músculo y el hígado, y la alteración de la secreción de insulina por las células β pancreáticas es el núcleo de los defectos en la DMT2. La resistencia de las células β al péptido similar al glucagón 1 (GLP1) contribuye al fallo progresivo en la función de las células β , mientras que el aumento en los niveles de glucagón contribuye a la producción excesiva de glucosa por parte del hígado. La resistencia a la insulina en los adipocitos da como resultado una lipólisis acelerada y un aumento de los niveles de ácidos grasos libres en plasma (FFA), los cuales acrecentan la resistencia a la insulina en el músculo e hígado y contribuyen a la falla de las células β . Aumento de la reabsorción de glucosa por GLUT2 y el incremento en el umbral de los

rastros de glucosa en la orina contribuyen al mantenimiento de la hiperglucemia. Resistencia a los efectos supresores del apetito de la insulina, leptina, GLP1, la amilina y el péptido YY, así como niveles bajos de dopamina en el cerebro y aumento de serotonina en el cerebro contribuyen al aumento de peso, lo que agrava la resistencia subyacente. (Obtenido de DeFronzo R. et al., 2016).

2.5.1 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina es la anomalía detectable más temprana en individuos que es probable que desarrollen DM2, sin embargo, la enfermedad no se manifiesta a menos que las células β no puedan secretar cantidades suficientes de insulina para compensar la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos⁴⁹. Múltiples factores contribuyen a la falla de las células β , incluyendo envejecimiento, anomalías genéticas, hormona incretina (péptido similar al glucagón 1 (GLP1) y resistencia y/o deficiencia al polipéptido gástrico (GIP), lipotoxicidad, glucotoxicidad, resistencia a la insulina que conduce al estrés de las células β , hipersecreción del polipéptido amiloide de los islotes (IAPP), estrés oxidativo y activación de las vías inflamatorias⁵⁰⁻⁵².

Mecanismo molecular de resistencia a la insulina: La unión de insulina a su receptor activa el receptor de insulina tirosina quinasa y la fosforilación de una familia de sustratos receptores de insulina (IRS), especialmente IRS1 e IRS2⁵³. Estas proteínas IRS fosforiladas se unen y activan las moléculas de señalización intracelular, la más importante de las cuales es el fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). PI3K promueve la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) a la membrana plasmática, lo que resulta en la captación de glucosa en el músculo esquelético y fosforila e inactiva el factor de transcripción de la proteína de la caja forkhead O1 (FOXO1) alterando la transcripción de genes río abajo. La insulina también estimula la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)³⁹.

La resistencia a la insulina en la obesidad y la DM2 se ha relacionado principalmente con la vía PI3K^{54,55}. La resistencia a la insulina generalmente se

asocia con una mayor fosforilación en la serina de las proteínas IRS, que inhibe la fosforilación de la tirosina, lo que conduce a la resistencia a la insulina^{56,57}. En algunos casos, la fosforilación de la serina también aumenta la degradación del IRS, contribuyendo aún más a la resistencia a la insulina⁵⁸. Las causas del aumento de la fosforilación de la serina son multifactoriales, incluida la acumulación de lípidos ectópicos, la disfunción mitocondrial, la inflamación y el estrés del retículo endoplásmico (ER)³⁹.

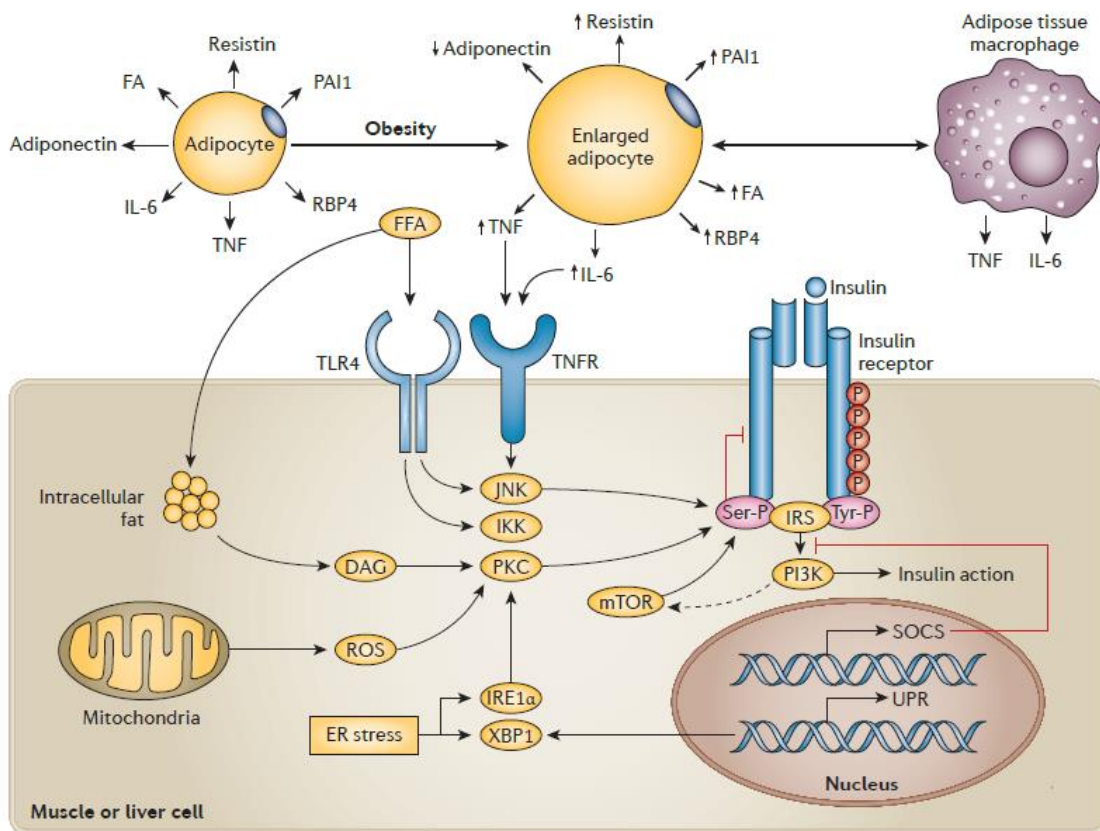


Figura 6. Esquema de los mecanismos de resistencia a la insulina. En los adipocitos, la resistencia a la insulina y la inflamación conducen a la producción y liberación de ácidos grasos libres (AGL) y citoquinas proinflamatorias que provocan resistencia a la insulina, como la interleucina 6 (IL -6), factor de necrosis tumoral (TNF) y resistina. Las adipocinas que sensibilizan a la insulina, como la adiponectina, a la inversa, mejoran la resistencia a la insulina. Además, la proteína de unión al retinol (RBP4) aumenta y podría contribuir a la

resistencia a la insulina. El inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI1) no afecta la resistencia a la insulina, pero se ha visto implicado en las complicaciones de la obesidad, incluida la aterosclerosis acelerada y DMT2. Estos factores contribuyen a la acumulación de metabolitos lipídicos tóxicos (diacilglicerol (DAG), ceramidas y acil-CoA) en miocitos y hepatocitos, que alteran la señalización de la insulina (vía IRS-fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)) y activan vías inflamatorias (JUN amino -terminal quinasa (JNK), I κ B quinasa (IKK) y proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK)), que deterioran aún más la vía de transducción de señal de insulina. La disfunción mitocondrial que predispone a la acumulación de DAG y la activación de la proteína quinasa C nuclear (PKC), así como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el aumento del estrés del retículo endoplasmático (ER) exacerban aún más la resistencia a la insulina. (Obtenido de DeFronzo R. et al., 2016).

2.5.2 Disfunción de las células β

La disfunción de las células β es el determinante crítico para el desarrollo de DMT2 que se ve agravada por la resistencia a la insulina⁵⁹. El inicio de la hiperglucemia puede desencadenar tanto la disfunción de las células β como la resistencia a la insulina, sin embargo, con la disfunción de las células β , la secreción de insulina se deteriora⁶⁰.

En condiciones fisiológicas, el mantenimiento de las concentraciones de glucosa en el torrente sanguíneo dentro de un estrecho rango fisiológico se basa en la regulación coordinada de la secreción de insulina a través de la disponibilidad de nutrientes, hormonas e insumos neuronales⁶¹. Entre estos factores, la glucosa es el regulador más potente y fisiológicamente importante en la función de las células β a través de la estimulación coordinada de la transcripción génica de insulina, la biosíntesis de proinsulina y la secreción de insulina por las células β ⁶².

Los insultos hacia las células β incluyen inflamación inducida por citoquinas, resistencia a la insulina y obesidad, así como el consumo excesivo de grasas saturadas y ácidos grasos libres (AGL), lo que conduce a una disminución progresiva de la función de las células β con la subsecuente pérdida de la masa y la función de

las mismas, lo cual es fundamental para el desarrollo de DMT2^{63,64}. En muestras post-mortem de pacientes con DMT2, la masa de las células β se reduce en un 30-40% en comparación con las muestras de sujetos no diabéticos⁶⁵. Este proceso de pérdida se cree que ocurre vía apoptosis y autofagia desregulada^{66,67}.

Obesidad y ácidos grasos saturados: La obesidad es un estado de inflamación de bajo grado que desensibiliza los órganos receptores de glucosa a la acción de la insulina. El tejido adiposo es una fuente importante de inflamación con la infiltración de macrófagos como fuente primaria de citoquinas en individuos obesos⁶⁸. Las grasas saturadas están fuertemente asociadas con la resistencia a la insulina y la disfunción de las células β . Las grasas saturadas en circulación, derivadas principalmente de las dietas o incluso de la hidrólisis de depósitos de grasa, conducen a ácidos grasos y glucosa que compiten por la absorción y el metabolismo en los tejidos. Con hiperglucemia persistente, el aumento de AGL saturados induce un estado glucolipotóxico que es perjudicial para las células β al aumentar el estrés, reduciendo subsecuentemente la síntesis y secreción de insulina, comprometiendo así la estructura y la función de las células beta.

Los efectos de los AGL en la función de la célula β dependen del tiempo. La exposición a corto plazo a AGL aumenta la secreción de insulina en respuesta a glucosa (GSIS), lo que resulta en un aumento de la secreción de insulina post prandial y permite el almacenamiento del exceso de calorías en forma de grasa que contribuye al sobrepeso y la obesidad⁵⁹. Por el contrario, la exposición a AGL a largo plazo suprime la GSIS y se ha sugerido que implica una alteración en el metabolismo de la glucosa, una reducción de la biosíntesis de insulina y la pérdida de células β ^{61,69}.

En ratas, los AGL saturados han demostrado aumentar la acumulación de ácido palmítico intramuscular que puede conducir a la resistencia a la insulina (Reynoso et al., 2003)⁷⁰. En humanos, se reportó una asociación positiva entre la composición de AGL en suero y la DMT2 (Coelho et al., 2011)⁷¹.

2.5.3 Inflamación

La inflamación de los islotes en la DMT2 se atribuye a la sobrecarga de nutrientes que conduce al agotamiento metabólico de las células β ⁷². Esto puede conducir a la síntesis localizada de citoquinas, lo que resulta en el reclutamiento de células inmunes al sitio de producción que desencadenará la disfunción de las células β y exacerbará la resistencia a la insulina⁷³. Los AGL saturados como el ácido palmítico, induce la disfunción de las células β *in vivo* mediante la activación de procesos inflamatorios en islotes de ratón aumentando la expresión de las principales citoquinas implicadas en la disfunción de las células β , como la interleucina 6 (IL6), TNF- α , IL8 (CXCL1), IP10 [quimiocina (C-X-Cmotif) ligando10 (CXCL10)], MCP1 (CCL2) y MIP1A (CCL3) como se reportó en un estudio por Choi e. tal., (2012), las cuales pueden influir en las células β de forma autocrina⁷⁴.

3. Efectos metabólicos de la Dieta alta en grasas (DAG)

Los lípidos de la dieta comprenden diferentes tipos de ácidos grasos, cuyas moléculas están constituidas por cadenas hidrocarbonadas que se diferencian por el número de carbonos (corto, medio o largo) y por la ausencia (saturación) o presencia de insaturación (monoinsaturados y poliinsaturados). Estas son algunas de las características que determinan la función de estos nutrientes en el metabolismo^{75,76}.

Aunque la DMT2 está influenciada principalmente por el estilo de vida, la composición de la dieta puede afectar el desarrollo de la enfermedad, así como la de cualquier complicación asociada. Los mecanismos moleculares de los nutrientes implicados en la inducción de la resistencia a la insulina, particularmente los diferentes tipos de ácidos grasos en una dieta son todavía poco conocidos⁷⁷.

El efecto obesogénico de los ácidos grasos saturados (AGS) se explica por el hecho de que se utilizan deficientemente para obtener energía, por lo que deben acilarse en triglicéridos y almacenarse en el tejido adiposo, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y monoinsaturados (MUFA) se utilizan fácilmente como

energía y logran almacenarse en menor cantidad, es decir, el contenido energético efectivo de una dieta es mayor cuando las grasas que contiene son altas en AGS⁷⁸. Además, la tasa de oxidación de AGS disminuye con el aumento de la longitud de la cadena de carbonos. Los efectos provocados por DAG serán por tanto específicos del tipo de cepa de los animales de estudio, tipo de grasa y periodo de administración de la dieta⁷⁹.

El modelo animal soporta el concepto de que una dieta alta en grasas ($\geq 40\%$ de grasa saturada) se asocia con un resultado metabólico adverso caracterizado por dislipidemia, sobrepeso/obesidad y resistencia a la insulina (IR)^{80,81}. Además, los efectos de una dieta alta en grasas (DAG) durante períodos críticos del desarrollo, incluido el período posnatal, tienen una acción directa sobre la falla de las células β pancreáticas⁸².

Está reportado que la alimentación con DAG a menudo desencadena obesidad, resistencia a la insulina y la disfunción de las células beta⁸¹. En el trabajo reportado por Lee YS. et. al (2011), un grupo de ratones desarrolló resistencia sistémica a la insulina e intolerancia a la glucosa (prediabetes) después de solo 3 días de alimentación con DAG⁸³, además la resistencia sistémica a la insulina empeoró de manera constante con el aumento de la inflamación del tejido adiposo después de 10 semanas de la ingesta con DAG. En otro estudio reportado por Wu Yu et. al, (2011), ratones de la cepa C57BL/6J con dieta DAG durante 14 semanas eran obesos, hiperlipidémicos, intolerantes a la glucosa e insensibles a la insulina, con alteraciones en los niveles de insulina que reflejaban resistencia a la insulina⁸⁴.

Estos estudios relacionan los efectos de DAG con la obesidad, la resistencia a la insulina, y disfunción de las células β , sin embargo, como se mencionó anteriormente, la prevalencia de obesidad en niños ha aumentado drásticamente en los últimos años, por lo que, los estudios en animales que emplean roedores jóvenes puede resultar de interés ya que los hallazgos experimentales pueden ser potencialmente aplicables en la población pediátrica⁸⁵. Pese a ello, los mecanismos subyacentes a una nutrición desequilibrada postnatal y las enfermedades metabólicas siguen sin estar claros.

ANTECEDENTES

Varios grupos de investigación se han centrado en estudiar los efectos de DAG en el período posterior al destete en roedores.

El trabajo publicado por Ohtubo et al., (2011) reportan un primer abordaje para identificar un mecanismo molecular que vincula la dieta, la obesidad y la DMT2 (Figura 4)³⁸. Demostraron que los altos niveles de lípidos (específicamente ácido palmítico) presentes en una dieta alta en grasa (58% kcal) inducen la exclusión nuclear de factores de transcripción como FOXA2 y HNF1A en células β aisladas a partir de islotes pancreáticos provenientes de ratones adultos y donadores humanos, lo que conduce a la alteración de la expresión y glicosilación de proteínas como GLUT2 que controlan la secreción de insulina estimulada por glucosa (Figura 4)³⁸.

El grupo de trabajo de Barbosa et al. (2012) demostraron que el período de gestación es más perjudicial que durante el período de lactancia, lo que ejerce efectos deletéreos sobre la morfología pancreática además de depósitos de grasa más grandes en la descendencia de ratones adultos⁸².

En un estudio reportado por Stolovich et. al. (2015), evaluaron el efecto inhibitorio de la secreción de insulina en respuesta a glucosa (GSIS) *in vivo* en roedores wild type al día post natal 25 que fueron destetados prematuramente (día post natal 18) como consecuencia de la administración de una dieta alta en grasas (54.8% kcal) en comparación con una dieta estándar⁸⁶. Los roedores destetados bajo una dieta estándar presentaban niveles séricos de insulina en ayunas más bajos que aumentaron bajo la estimulación de glucosa en comparación con los ratones destetados bajo una dieta alta en grasas, por lo que sugieren que el cambio en la dieta asociado con el destete afecta la funcionalidad de las células β al reducir la secreción basal de insulina y aumentar la secreción en respuesta a glucosa. Ellos proponen que los ácidos grasos libres circulantes en el torrente sanguíneo provenientes de la dieta actúan como mediadores en la regulación de la secreción de insulina en respuesta a glucosa y la replicación compensatoria de las células β , lo cual concuerda con un estudio llevado a cabo por

Pascoe et al., (2012) en donde demostraron que una corta exposición a una infusión lipídica (ácido palmítico y ácido linoleico) en ratones adultos inhibe la replicación inducida por glucosa⁸⁷.

En otro estudio reportado por Jacovetti C. et. al, (2015) evalúan el efecto en la secreción de insulina inducida por glucosa en roedores debido a la composición de una dieta alta en grasas en comparación con una dieta estándar. Se encontraron algunos cambios selectivos destacados de varios grupos y familias de miRNAs y observaron que la mayoría de estos cambios ocurren entre el día 20 y el 31 posnatal y se correlacionan con la adquisición de la capacidad de respuesta de la glucosa en las células β ³².

Otro estudio reportado por Cheng S. et. al, (2017) examinó los efectos de los tipos de dietas altas en calorías en dos etapas diferentes del desarrollo (post-destete y adulto joven) durante ocho semanas en la inducción del síndrome metabólico. Se observaron cambios físicos, bioquímicos y transcripcionales, así como permutas en histología hepática. Las ratas post-destete tuvieron un mayor aumento de peso, grasa visceral abdominal, glucosa en ayunas, colesterol de lipoproteína de alta densidad y un inicio más rápido de la hipertensión⁸⁵.

En conjunto estos hallazgos sugieren que la exposición de una dieta alta en grasas en diferentes etapas del desarrollo en roedores tiene un efecto deletéreo en las células β , sin embargo, no se han reportado cambios relacionados con la morfología y funcionalidad en el periodo post- ablactación, la cual es una ventana corta de tiempo crítica en la maduración pancreática donde no se ha demostrado el papel negativo de los lípidos en la supervivencia de las células β que puede desencadenar el desarrollo de enfermedades metabólicas como la DMT2 en la edad adulta.

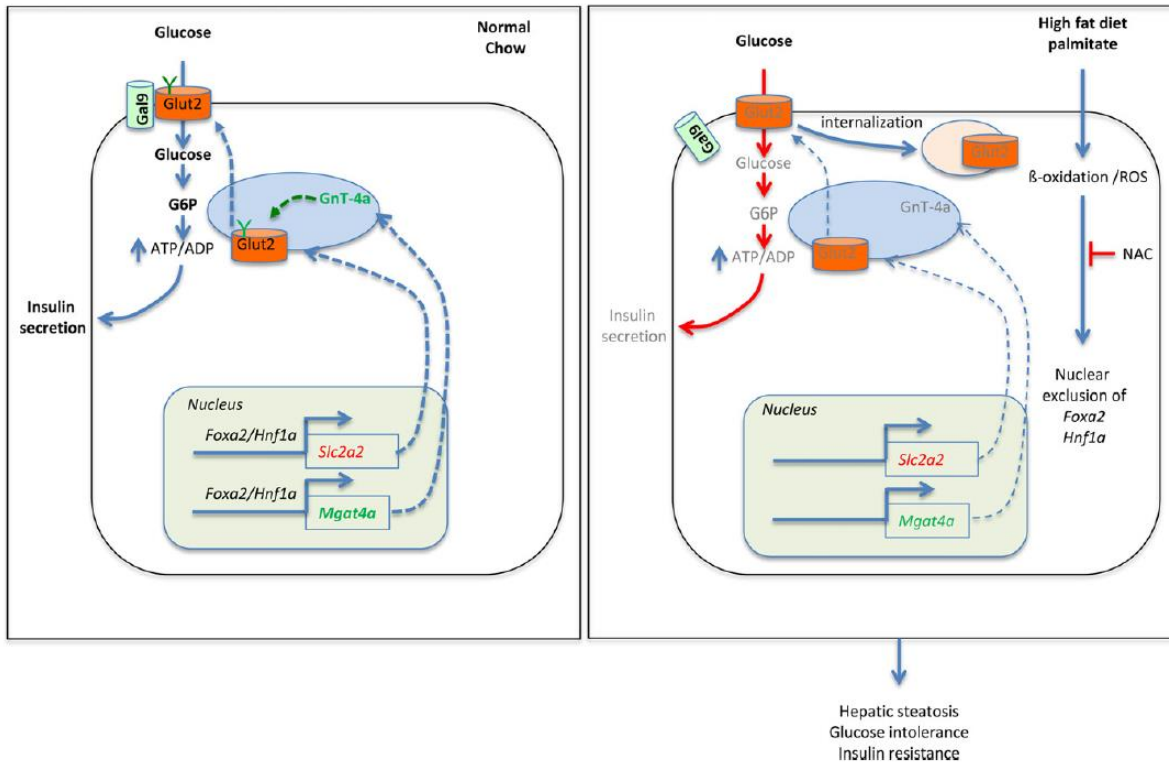


Figura 7. Esquema de los efectos de la dieta alta en grasas y la composición lipídica en la disminución de la secreción de insulina estimulada por glucosa. En islotes de ratones alimentados con una dieta control, FOXA2 y HNF1A controlan la expresión de GLUT2 y de MGAT4A (N-acetilglucosamina transferasa). En ratones alimentados con DAG o tras la exposición de islotes de ratón o humano al ácido palmítico, FOXA2 y HNF1A se excluyen del núcleo, por un mecanismo que puede ser inhibido por el antioxidante N-acetilcisteína (NAC), lo que sugiere que las especies reactivas de oxígeno (ROS), producido como resultado del catabolismo de lípidos, están involucrados en este proceso. La exclusión nuclear de los factores de transcripción reduce la expresión de GNT-4A y GLUT2, así como la glicosilación normal de GLUT2, lo que lleva a la internalización del transportador, la reducida expresión de la superficie celular y la reducción de GSIS. Esto causa intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y esteatosis hepática (Obtenido de Thorens B. et al., 2011).

JUSTIFICACIÓN

La DMT2 ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial en los últimos años, convirtiéndose en la primera causa de muerte en México. El diagnóstico de la enfermedad se da en etapas tardías por lo que la eficacia de los tratamientos actuales se ve disminuida, por lo que se propone analizar la correlación del patrón de la citoarquitectura y funcionalidad del islote pancreático en el periodo de post-ablactación con la administración de una dieta alta en grasas lo que nos permitirá dilucidar aspectos cruciales en la búsqueda de un diagnóstico temprano y/o esquema preventivo.

HIPÓTESIS

La administración de una dieta modificada alta en grasas exclusivamente durante una ventana crítica del desarrollo (período post-ablactación) tendrá un cambio sobre la maduración morfológica y funcional del islote pancreático.

OBJETIVOS

Objetivo general

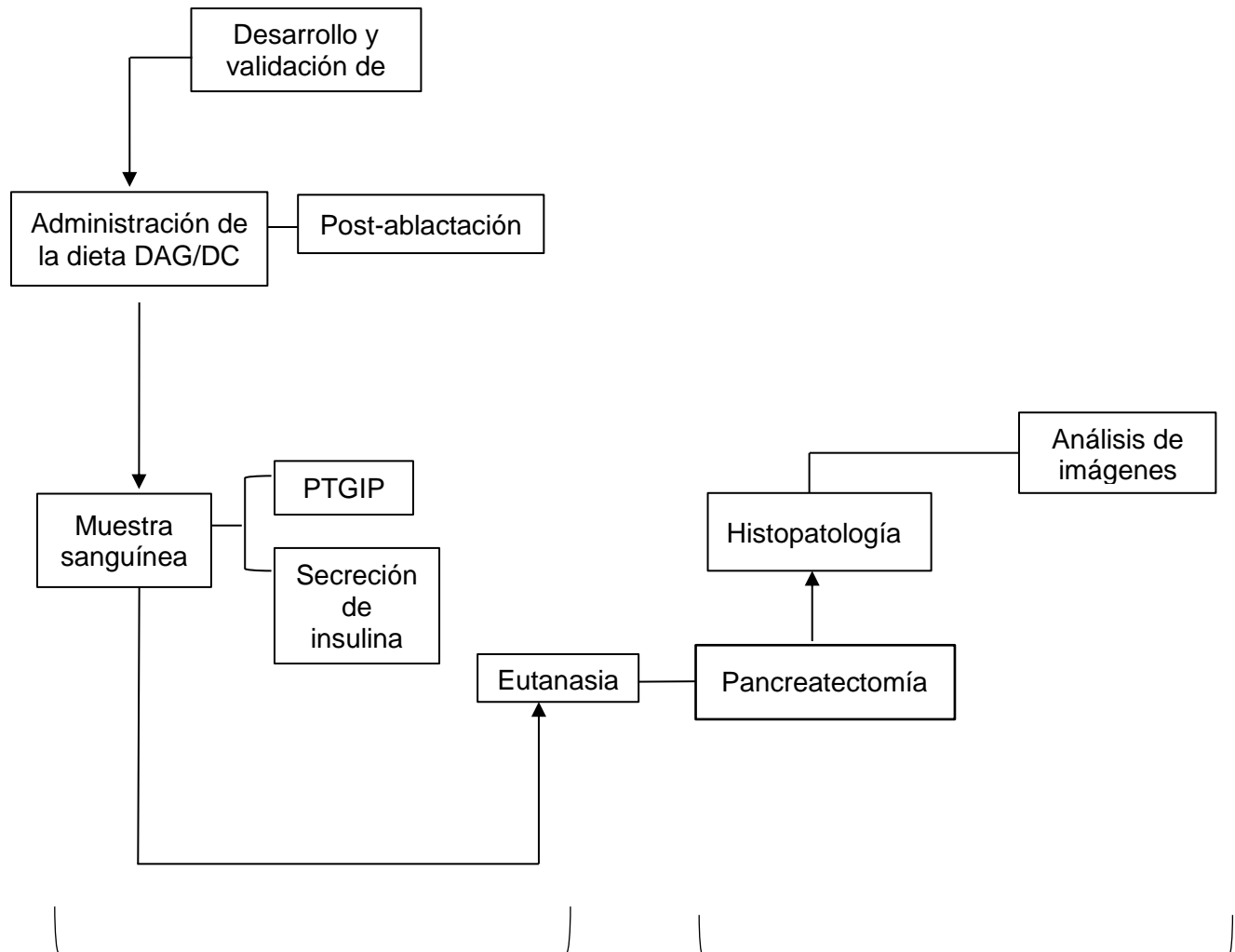
Analizar los cambios provocados por la administración de una dieta modificada alta en grasas durante el periodo de post-ablactación sobre la maduración morfológica y funcional del islote pancreático.

Objetivos particulares

1. Desarrollar un modelo de dieta modificada alta en grasas.
2. Validar de acuerdo con la literatura especializada una dieta modificada para roedores que tenga un contenido energético del ~60% en grasa.
3. Realizar y analizar pruebas de funcionalidad del islote pancreático mediante la dinámica de secreción de insulina en respuesta a glucosa.
4. Evaluar el proceso de maduración morfológica del islote pancreático a través de la distribución de sus componentes celulares y cambios histopatológicos.

METODOLOGÍA

1. Diseño experimental



1era etapa:

- Desarrollo, validación e implementación de un modelo DAG.
- Evaluación funcional.

2da etapa:

- Evaluación morfológica.

2. Tipo de estudio

Experimental exploratorio

3. Criterios de inclusión/exclusión

Criterios de inclusión:

- Ratones de la cepa Balb/c sanos.
- Sexo indistinto.
- 21 días de edad (recién destetados).
- Peso homogéneo entre 6 y 8 g.

Criterios de exclusión:

- Ratones con un peso inferior a los 6 g.
- Ratones con patologías aparentes durante el experimento que afecte los niveles de glucemia.

4. Grupos de estudio

En este estudio se utilizó un total de 24 ratones de la cepa Balb/c de 21 días de edad recién destetados, sexo indistinto, con un peso promedio inicial entre 6 y 8 g, los cuales se mantuvieron a una temperatura (23 ± 2 ° C) y humedad controlada (45-55%) con 12 horas de ciclo de luz/oscuridad. Los alimentos y el agua estéril se proporcionaron ad libitum durante todo el periodo de estudio. Los ratones post-destete se asignaron aleatoriamente en cuatro grupos (n=6), que recibieron una dieta control comercial (DC) y una dieta alta en grasas experimental (DAG) durante 7 y 15 días respectivamente de la siguiente manera:

Tomando el día 0 como el día del nacimiento donde comienza la lactancia y el día 21 postnatal ampliamente reportado como el inicio del destete en roedores⁸⁸, el periodo de evaluación contempló dos cortes de tiempo para cada grupo, resultando en un total de cuatro subgrupos, como se muestra en la Figura 6.

- Grupo DC7: ratones alimentados del día 21 al día 27 con dieta control.
- Grupo DAG7: ratones alimentados del día 21 al día 27 con dieta alta en grasas.
- Grupo DC15: ratones alimentados del día 28 al día 34 con dieta control.

- Grupo DAG15: ratones alimentados del día 28 al día 34 con dieta alta en grasas.

El periodo establecido del día 21 al día 34 constituye la etapa de post-ablactación, donde el objetivo fue evaluar los cambios ocasionados por el reto metabólico aplicado.

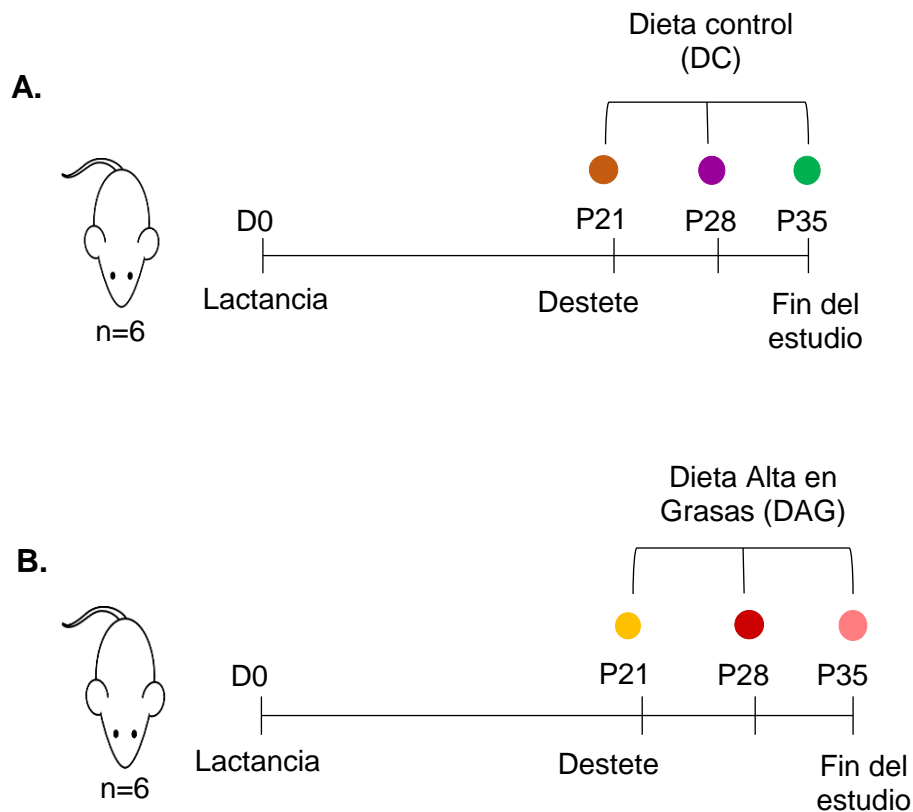


Figura 8. Línea de tiempo de los periodos de evaluación de la Dieta control (A) y la Dieta alta en grasas (B) en roedores recién destetados. El periodo de 7 días está marcado con el símbolo naranja y amarillo para DC y DAG respectivamente, así como el periodo de 15 días está marcado como morado y rojo para DC y DAG respectivamente. El fin del estudio está marcado por el símbolo verde y rosa para ambos grupos de estudio. El tamaño de la muestra fue de n=6. D0, Día 0; P21, postnatal 21; P28, postnatal 28; P35, postnatal 35.

5. Tamaño de muestra

Se utilizó el método de la Ecuación de Recursos que recomienda que el número de grados de libertad del error para el ANOVA se encuentre entre 10 y 20, para evitar un uso innecesario de recursos (animales). Tomando el límite superior, en el diseño experimental que se propuso de dos bloques (Dieta DC, Dieta DAG) con cuatro tratamientos (Periodo 1, Periodo 2, Periodo 3, Periodo 4) resulta en 20 individuos totales. Considerando el riesgo de muerte de ~80%, se inició el experimento con 24 individuos en total, esto es, formando grupos de 6 cada uno.

6. Aspectos bioéticos

Todos los procedimientos que utilizaron animales de experimentación fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco AC (Jalisco, México, 2017-007B) y se llevaron a cabo de conformidad con las especificaciones para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, NOM-062-ZOO-1999.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Formulación de la dieta experimental alta en grasas (DAG).

La dieta experimental alta en grasas fue formulada con base en la composición de la dieta comercial Teklad global 18% protein (Envigo) modificando la proporción de macronutrientes de acuerdo con los estándares recomendados por el Instituto Americano de Nutrición para dietas de roedores que soportan el crecimiento durante los períodos de embarazo, lactancia y post-destete (AIN-93G) Reeves et al., (1993)⁸⁹. La composición nutrimental de ambas dietas se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición nutrimental de las dietas administradas.

Nutrientes (g/Kg)	Dietas	
	DAG	DC
Caseína	202	200
Grasa (aceite de soya)	31.5	45
Grasa (manteca)	238	-
Fibra	50	50
Vitaminas	10	10
Minerales	35	35
Kcal/g	4.5	3.1
Proteínas (%)	16.5	24
Carbohidratos (%)	27.4	58
Grasa (%)	56.2	18

La dieta alta en grasas estaba compuesta por un 56.2% de energía en forma de grasa, 27.4% de carbohidratos y un 16.5% de proteína. La dieta control estaba compuesta de 18% de energía en forma de grasa, 58% de carbohidratos y 24% de proteína. DC, Dieta control; DAG, Dieta alta en grasas.

2. Elaboración de la dieta experimental alta en grasas (DAG).

Los ingredientes utilizados para la preparación de la dieta experimental alta en grasas consistieron en 6.2 % p/p de caseína renina grado alimenticio proporcionada por grupo Lactín (Jal., México), 23.3% p/p de manteca de origen animal (Rochin) y 70% p/p de dieta estándar comercial (Teklad global 18% protein, Envigo), la cual fue pulverizada en primera instancia con un martillo de bola y posteriormente en un molino de discos (ONTARIO 200, Pulvex) para homogenizar la muestra, la cual se acondicionó 1 hora antes del proceso de moldeo con todos los ingredientes, llevándola a un nivel de humedad inicial de 35% con el mezclador planetario (KitchenAid KSM) a una velocidad de rotación de 100 rpm, agregando el contenido de agua necesario durante 10 min. Para la formación de los pellets se utilizó un embutidor diseñado para moldeo con placas intercambiables con 4 orificios de 7.65 mm de diámetro. Los comprimidos se secaron en un horno de convección mecánica (Redline Binder RF115) a 45 °C por 20 h ajustando el contenido de humedad final de 12% para evitar la degradación de los aminoácidos esenciales presentes en la dieta según el protocolo reportado por Rodríguez-Miranda et al. (2014) y se almacenaron en bolsas de polietileno selladas al vacío en refrigeración a -4°C hasta su posterior uso. El diagrama general del proceso de elaboración de DAG se muestra en la Figura 5.

3. Caracterización fisicoquímica de DAG y DC.

La caracterización fisicoquímica para las dos formulaciones requerida para la validación de un modelo de dieta alta en grasas se llevó a cabo en dos etapas. La primera consistió en una determinación de grasa total (extracto etéreo) por método Soxhlet con base en la NOM-086-SSA1-1994 (Apéndice Normativo C, Numeral 1) validado por la Unidad de Estudios Analíticos y Metrológicos (USAM) de CIATEJ para los dos tipos de dieta. El procedimiento consistió en transferir 5 gramos de muestra pulverizada previamente en mortero en un cartucho de papel filtro y se colocó dentro del extractor Soxhlet cubriéndose la parte superior con algodón. Se

ajustó un matraz de bola con cuerpos de ebullición (llevados previamente a peso constante por calentamiento a 100-110°C) y posteriormente se añadió 100 ml de éter de petróleo. Se hizo circular el agua por el refrigerante y se calentó hasta obtener una frecuencia de 2 gotas por segundo durante 6 horas. Posteriormente se evaporó suavemente el contenido del matraz en un rotavapor (Buchi Rotavapor R-100) a 100°C a peso constante y se realizaron los cálculos pertinentes para obtener el porcentaje de extracto etéreo. La segunda etapa consistió en un Análisis de Perfil de Textura por punción (PTP) utilizando un texturómetro (TA.XT Plus100) en donde los pellets se sometieron a un ciclo de punción con un cilindro de acero inoxidable de 1.27 cm de diámetro y una distancia de penetración del 43% con respecto a la altura original del comprimido, a una velocidad de 0.2 cm/s, con un tiempo de espera entre ciclos de 5 s. La fuerza de contacto con la muestra fue de 0.05 N. Se calculó la resistencia inicial a la punción (pendiente inicial de la curva de punción durante el primer ciclo), fuerza de fractura (pico máximo de fuerza en el primer ciclo), distancia de fractura (distancia recorrida al momento de la fractura) y la pendiente de caída de fuerza posterior a la fractura.

4. Pruebas de palatabilidad.

Se implementó una prueba de palatabilidad con base en el reporte de Hsu C. et al (2010)⁹⁰ registrando el peso inicial y el peso final en un grupo de roedores de 2 meses de edad a los cuales se les administró una porción establecida de DC y DAG durante 7 días para conocer el grado de aceptación de la textura, olor y sabor del alimento experimental.

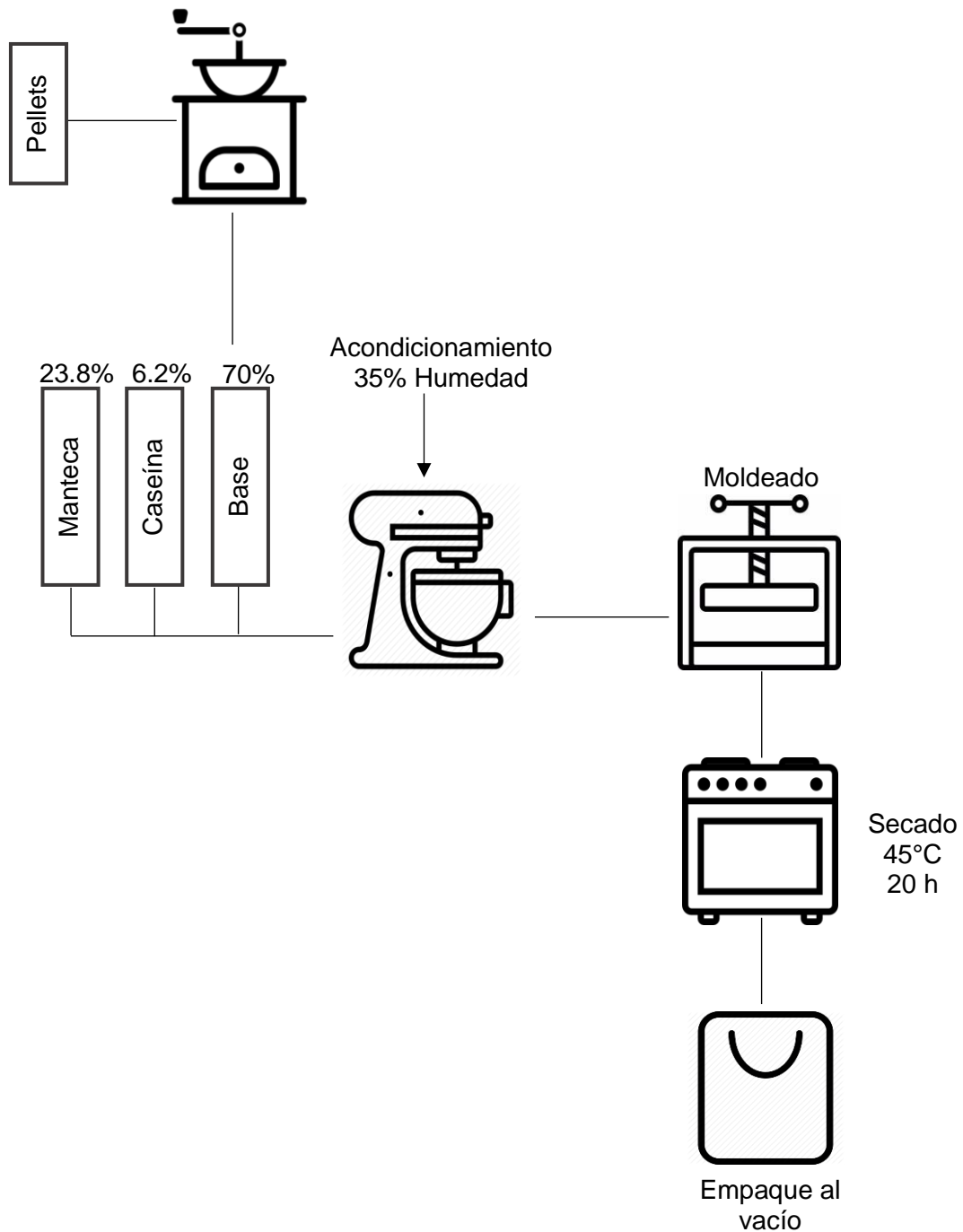


Figura 9. Diagrama general de proceso de elaboración de la Dieta Alta en Grasas. La base comercial de dieta control se pulveriza en un molino de discos para su posterior acondicionamiento con manteca y caseína en un mezclador planetario. En seguida la mezcla se moldea de forma tubular en un embudidor y se somete a secado por convección en un horno a 45°C durante 20 horas para su empaque final.

5. Ingesta de alimento y peso corporal.

Quince días de ingesta de alimentos se midió diariamente y se calculó un promedio recolectando y ponderando cuidadosamente el alimento remanente, incluido el derramado en jaula, y luego restando el resto de los alimentos sobrantes de la cantidad conocida dada un día anterior. La ingesta calórica total (kcal) consumida por los roedores se calculó multiplicando la ingesta de alimento (g) por la información energética (kcal/g) de acuerdo con la composición nutricional de la DC y la DAG administrada a los roedores. El peso corporal se midió diariamente a partir del destete para cada ratón.

6. Prueba oral de tolerancia a glucosa intraperitoneal (PTGIP)

Después de que los ratones habían ayunado durante 10 h al completar el tratamiento de 7 y 15 días, se administró por vía intraperitoneal una solución de glucosa (2,0 g / kg de peso corporal). Los niveles de glucosa en sangre (BG) se midieron antes de la inyección (tiempo 0) y a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección a través de un sangrado de la vena caudal usando un glucómetro (Accu-Check Performa, Roche, Mannheim, Alemania) como se muestra en la Figura 2A.

7. Eutanasia

Al completar el tratamiento los roedores fueron sacrificados humanamente por dislocación cervical de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999. Los animales fueron desechados de acuerdo con los estándares establecidos por el comité de ética concerniente.

8. Pancreatectomía

Para el aislamiento del páncreas se comenzó por embrocar el cuerpo entero del ratón con etanol al 70%. Posterior al procedimiento antiséptico se realizó una incisión en la línea media para realizar una exploración abdominal. Se retiró el intestino delgado al lado izquierdo del ratón expuesto con ayuda de pinzas hemostáticas para mostrar el páncreas, se separó suavemente del estómago y duodeno para evitar desgarres, siguiendo las secciones de yeyuno e íleon del intestino delgado hasta llegar al recto. Se exteriorizó el páncreas y el bazo adherido al tejido y se separaron las conexiones restantes de la cavidad torácica (tejido conectivo, grasa visceral y el tejido mesentérico del páncreas) con las pinzas para separar completamente el páncreas del bazo adyacente.

9. Análisis histológico del páncreas

Las muestras extraídas de páncreas se fijaron con 1 ml de paraformaldehído al 4% durante 3 días y se sometieron a un procesamiento de tejido convencional y se incrustaron en cera de parafina. Se produjeron secciones delgadas (5 μm) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E) para visualizar la morfología. Se capturaron tres imágenes microscópicas con un aumento de 20x para cada ratón con Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Tokio, Japón).

10. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se determinaron usando ANOVA seguido de pruebas de comparación múltiple usando análisis post hoc LSD. Se consideró que el valor de $p < 0,05$ indica significación estadística. Todos los análisis estadísticos se calcularon con Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.1.11.

RESULTADOS

1. Contenido de grasa total de la Dieta control (DC) y la Dieta alta en grasas (DAG).

La comparación del contenido de grasa de las dos formulaciones dietéticas diferentes (DAG y DC) determinado por el método Soxhlet (NOM-086-SSA1-1994) se muestra gráficamente en la Figura 10. El contenido lipídico representado como perfil de extracto etéreo fue mayor en DAG ($P < 0.005$) representando un 32.27% p/p de grasa total lo que corresponde a un aporte calórico del 56.2% en contraste con el obtenido en DC, el cual fue de 6.84%.

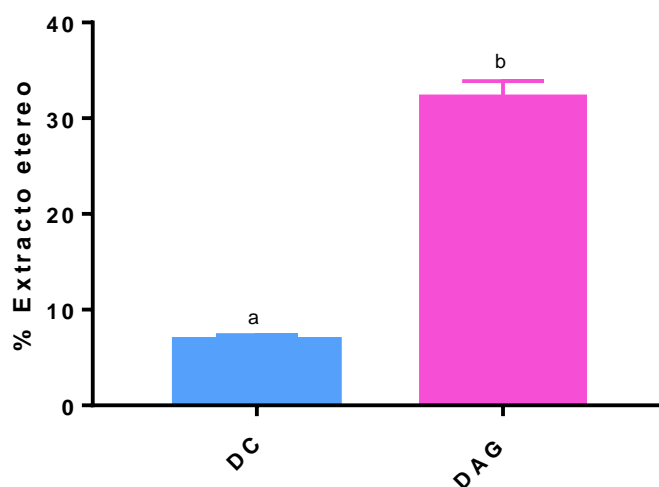


Figura 10. Determinación de grasa total (extracto etéreo) por soxhlet con base en la NOM-086-SSA1-1994 (Apéndice Normativo C, Numeral 1) validado por la Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos para las 2 diferentes formulaciones. La barra azul representa la Dieta control y la barra rosa la Dieta alta en grasa. Los datos se representan como la media \pm error estándar ($n=5$ para cada grupo). Las diferencias estadísticas se determinaron usando ANOVA de una vía con un 95% de confianza seguido de una prueba de rangos múltiples con el método LSD (Mínima diferencia significativa).

2. Perfil de textura por punción (PTP) para la Dieta control (DC) y la Dieta alta en grasas (DAG).

En la Figura 11, se muestran curvas de perfil de textura por punción para las dos formulaciones de dieta administradas. Se observó que los pellets presentaron fractura (pico máximo de fuerza en el primer ciclo), después de la cual la fuerza cae rápidamente, y los valores de la pendiente de caída de fuerza posteriores a la fractura, dependen de la concentración de lípidos. El área del segundo ciclo de punción correspondiente a DAG fue 12.5 veces menor que el primer ciclo de punción correspondiente a DC, indicando una pérdida en la dureza estructural del pellet.

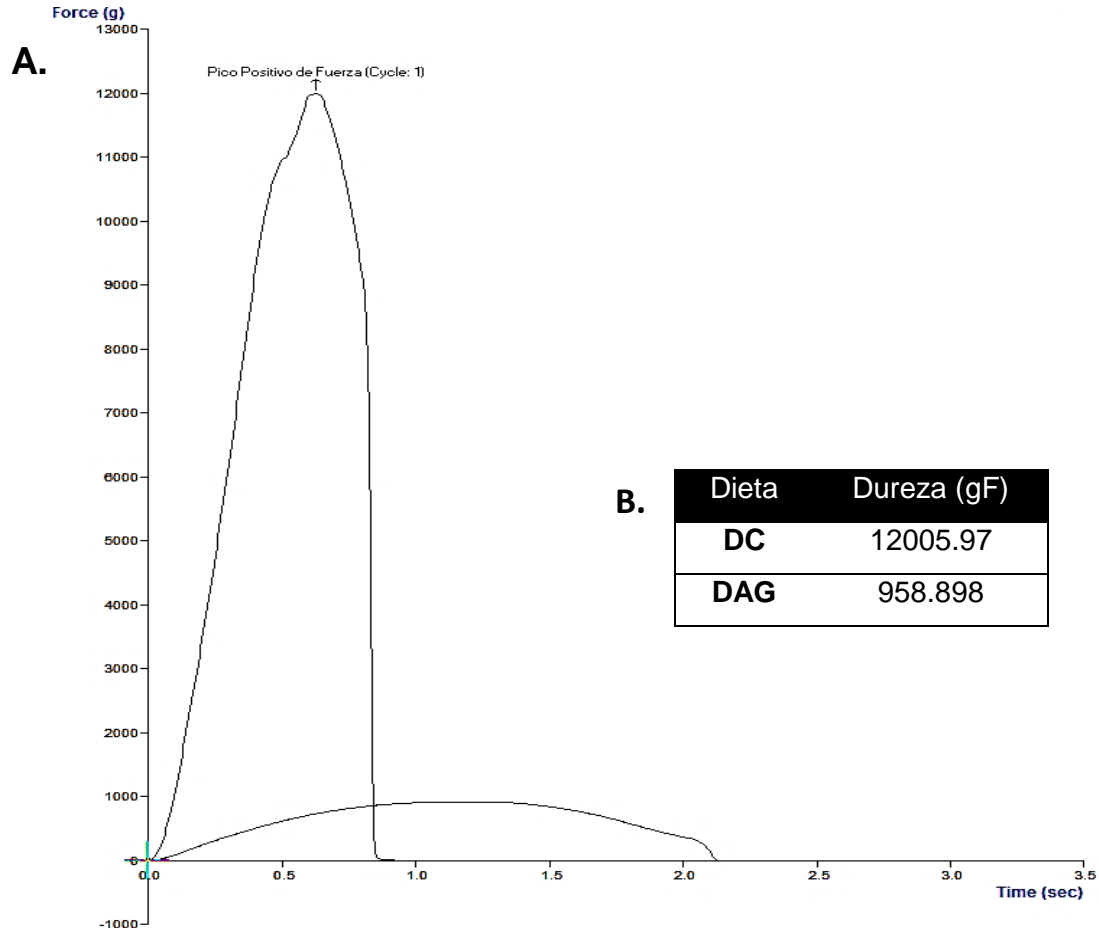


Figura 11. Perfil de textura por punción. A). Curva de perfil de textura por punción para DC y DAG. B) Tabla con los valores de dureza representados como gramos fuerza (F).

3. Pruebas de palatabilidad

La palatabilidad de un alimento para roedor es indispensable para su correcto desarrollo y crecimiento físico. En la Figura 12, se muestra la diferencia entre los dos grupos. Tras 7 días de iniciada la dieta, los dos grupos tuvieron el incremento de peso esperado ($p < 0.05$). De acuerdo con los datos obtenidos en la prueba de rangos múltiples, se formaron 3 grupos homogéneos distintos, por lo que sí hay diferencia significativa ($P < 0.005$) entre el peso corporal inicial y final relacionado con el tiempo de administración de ambas formulaciones dietéticas (DC y DAG), lo cual se traduce a que el alimento sí fue palatable para los roedores.

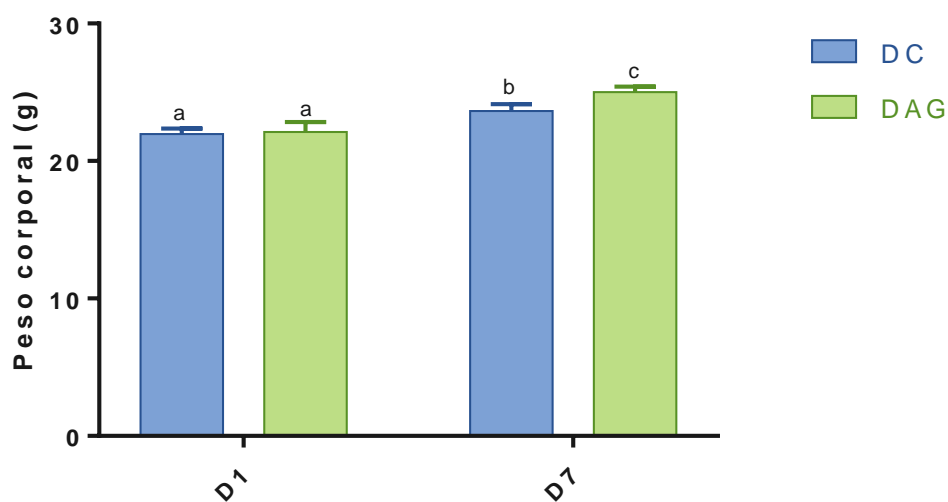


Figura 12. Ganancia de peso corporal de los ratones bajo las dos diferentes dietas durante 7 días. Las bandas azules representan a la Dieta Control y las bandas verdes a la Dieta alta en grasa. Los datos se representan como la media \pm error estándar ($n=5$ para cada grupo). Las diferencias estadísticas se determinaron usando ANOVA de una vía con un 95% de confianza seguido de una prueba de rangos múltiples con el método LSD (Mínima diferencia significativa).

4. Peso corporal e ingesta calórica

El peso corporal al destete fue similar entre los grupos bajo las diferentes dietas a los 7 (9.48 ± 0.30 g, 8.96 ± 0.30 g) y 15 días (6.1 ± 0.15 g, 7.81 ± 0.24 g). Los ratones de los grupos DAG a los 7 y 15 días de tratamiento aumentaron de peso a tasas constantes en comparación con los grupos DC (Figura 13). Específicamente, el grupo DAG tenía un peso corporal más alto que el grupo CD en el día 7 de edad ($P < 0.005$) (Figura 1A) y en el día 15 de edad ($P < 0.005$) (Figura 13B). El incremento de peso entre los grupos DC y DAG se asocia con un aumento en la ingesta diaria calórica ($P < 0.005$) debido al elevado contenido lipídico entre las diferentes dietas (Figura 13C, 13D).

5. Respuesta a la glucosa intraperitoneal

Los niveles de glucosa en sangre en los ratones post-destete a los 7 días bajo la dieta alta en grasas fue significativamente mayor a los 30 min ($P < 0.005$) y 60 min ($P < 0.005$) después de la administración de la glucosa intraperitoneal comparada con el grupo DC, mostrando un aumento aproximado del 46% (Figura 14A). Por otra parte, los niveles de glucosa sérica basal (0 min) en los ratones post-destete a los 15 días bajo la dieta alta en grasas fue significativamente mayor ($P < 0.005$) lo que indica que los ratones se volvieron hiperglucémicos al final del experimento comparado con el grupo DC como lo demuestra el nivel de glucosa en sangre elevado en ayunas en comparación con el grupo DC. Además, los niveles de glucosa a los 30 min ($P < 0.005$) y 120 min ($P < 0.005$) fue significativamente mayor comparada con el grupo DC (Figura 14B), mostrando un aumento aproximado del 90%.

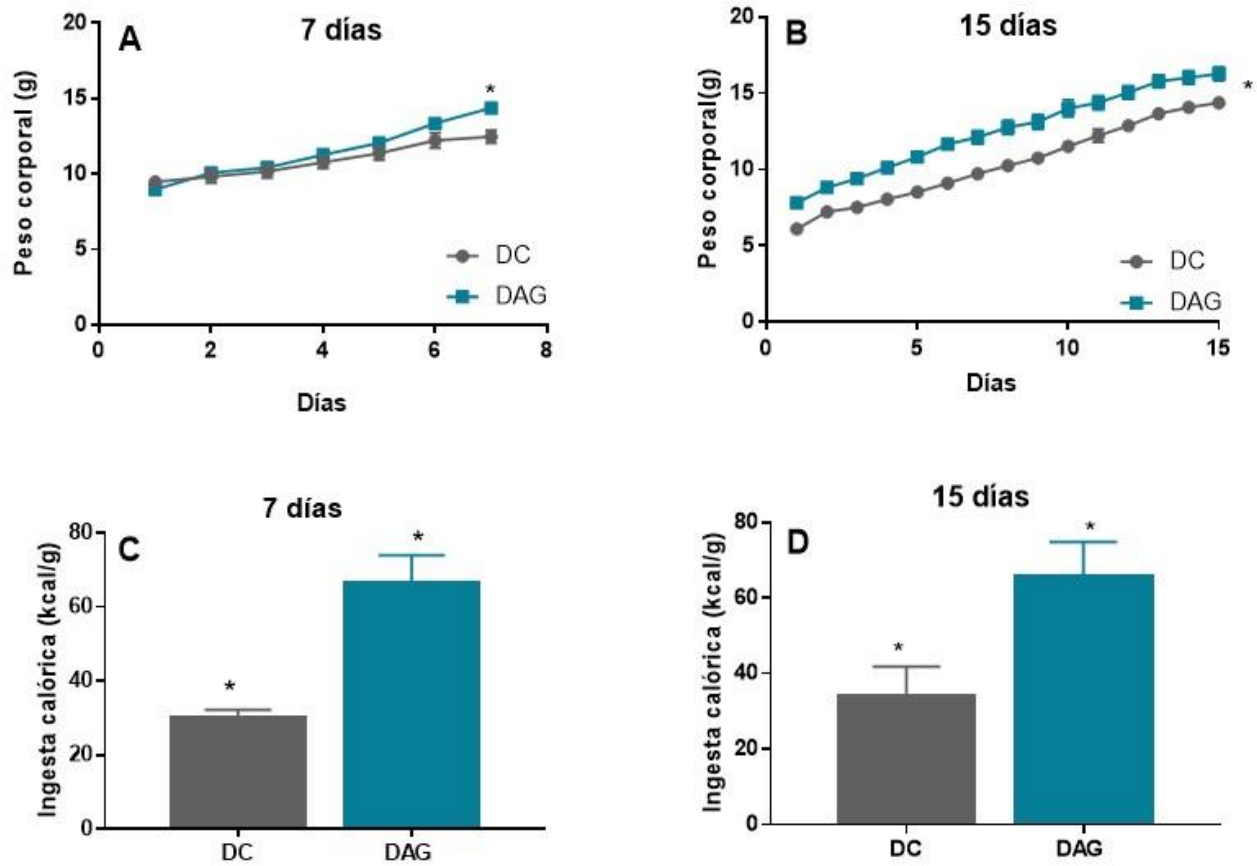


Figura 13. Cambio en el peso corporal de los ratones post-destete a los 7 (A) y 15 días (B) y la ingesta calórica a los 7 (C) y 15 días (D) bajo las diferentes dietas. Las barras de error indican el error estándar. El tamaño de la muestra fue de n=6 por grupo. * indica $P < 0.05$ entre los grupos. DC, dieta control; DAG, dieta alta en grasas.

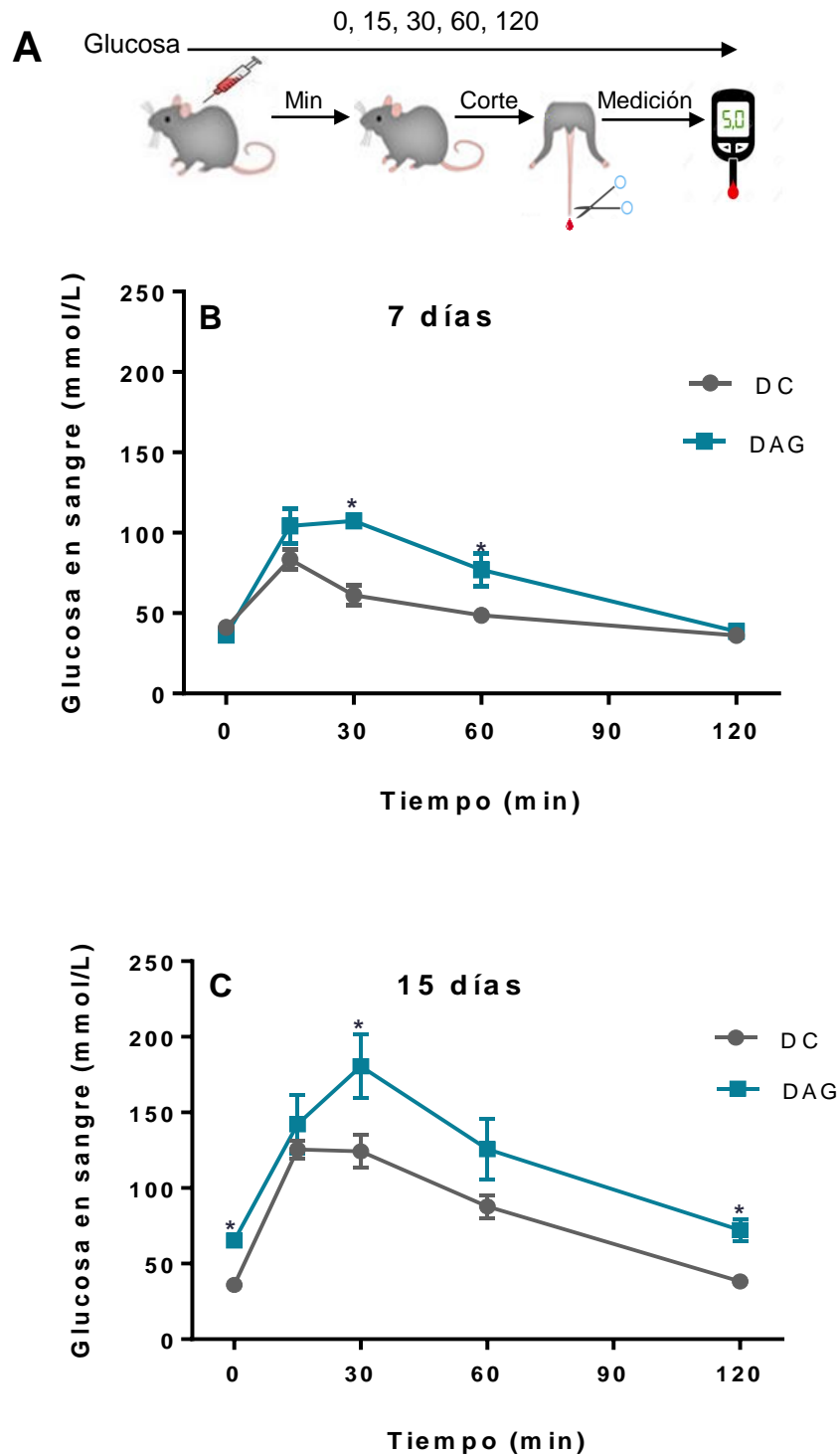


Figura 14. Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (A) de los ratones post-destete a los 7 (B) y 15 días (C) bajo las diferentes dietas. Las barras de error indican el error estándar. El tamaño de la muestra fue de n=6 por grupo. * indica $P < 0.05$ entre los grupos. DC, dieta control; DAG, dieta alta en grasas.

1. Histopatología de tejido pancreático

Las secciones de los grupos control examinadas a los 7 días (Figura 15A) y 15 días (Figura 15F) se aprecian dentro de los límites considerados normales, sin presentar alteraciones microscópicas significativas en acinos e islotes. Sin embargo, el grupo DAG a los 7 días se observa congestión y edema, con hemorragias interlobulares e inflamación interlobular linfocítica (Figura 15B, 15C) además de una inflamación linfoplasmocítica multifocal (Figura 15D). Por otro lado, las secciones del grupo DAG a los 15 días de tratamiento presentan inflamación neutrofílica y linfocítica intersticial (Figura 15G, 15H y 15I), edema y congestión (Figura 15H) e inflamación interlobular linfocítica leve (Figura 15I). Estos resultados indican cambios morfológicos severos dentro del tejido pancreático.

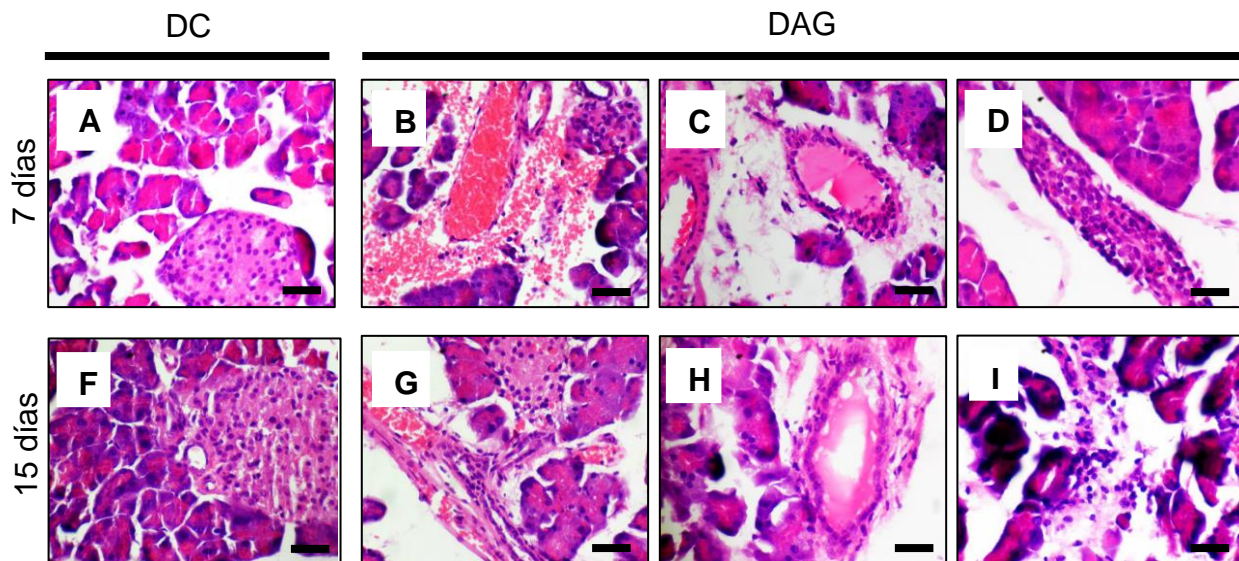


Figura 15. Cambios histopatológicos de los ratones post-destete a los 7 y 15 días bajo las diferentes dietas. Imágenes representativas de las secciones de tejido pancreático teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) del grupo DC a los 7 días de tratamiento (A), grupo DAG a los 7 días de tratamiento (B), (C) y (D), (F) Grupo DC a los 15 días de tratamiento, (G), (H) y (I) Grupo DAG a los 15 días de tratamiento. La barra indica escala de 100 μm .

Por otra parte, se llevó a cabo un procesamiento semicuantitativo de las alteraciones encontradas en las muestras de los cuatro subgrupos de estudio, tomando en cuenta el tiempo de exposición y tipo de dieta. Se tomó como referencia el Sistema semicuantitativo de evaluación histopatológica de la Norma para la evaluación biológica de dispositivos médicos ISO 10993-6 (Tabla 3), con base en el tipo de respuesta morfológica que se presentó: edema, congestión vascular, infiltración e inflamación linfocitaria/neutrofilica, hemorragia, hiperplasia y dilatación ductal.

Tabla 3. Sistema semicuantitativo de evaluación histopatológica.

Respuesta	Score				
	0	1	2	3	4
Edema	Sin alteración	Mínimo	Ligero	Moderado	Severo
Congestión vascular	Sin alteración	Mínimo	Ligero	Moderado	Severo
Infiltración (linfocitos/neutrófilos)	Sin alteración	Escasa	Ligero	Moderado	Extensiva
Inflamación (linfocitos/neutrófilos)	Sin alteración	Pequeños focos	Ligero	Moderado	Severo
Hemorragias	Sin alteración	Mínima	Ligera	Moderada	Extensiva
Hiperplasia	Sin alteración	Ocasional	Ligero	Moderado	Severo
Ductos dilatados con fluido	Sin alteración	Mínima	Ligera	Moderada	Extensiva

El nivel de puntuación asignado para cada respuesta morfológica se marca como 0, un tejido sin alteración; 1, mínima alteración; 2, alteración ligera; 3, alteración moderada y 4, alteración severa.

Bajo las condiciones de este estudio, las muestras de prueba se consideraron bajo los siguientes rangos:

- Sin alteraciones (0 hasta 2.9)

- Mínima alteración (300 hasta 8.9)
- Moderada alteración (9.0 hasta 15.0)
- Severa alteración (> 15)

En la Tabla 4 se muestran los resultados del enfoque semicuantitativo de las alteraciones arrojadas por la histopatología, en donde se observa una notoria diferencia entre la puntuación basada en la respuesta de los grupos de la dieta control (7 y 15 días) en comparación con los grupos de la dieta alta en grasas (7 y 15 días) respectivamente. Los grupos bajo el tratamiento con DC no presentaron alteraciones en el estudio (puntuación 0 y 2), por el contrario, los grupos bajo la exposición con DAG presentaron una moderada alteración (11 y 9).

Tabla 4. Análisis histopatológico semicuantitativo.

Periodo	DC		DAG	
	7 días	15 días	7 días	15 días
Edema	0	1	3	2
Congestión vascular	0	0	2	1
Infiltración (linfocitos/neutrófilos)	0	0	1	2
Inflamación (linfocitos/neutrófilos)	0	0	1	1
Hemorragias	0	0	1	1
Hiperplasia	0	0	0	2
Ductos dilatados con fluido	0	0	3	0
Sub total	0	1	11	9
Total	0	2	11	9
Total por grupo	2		20	

Se observan los valores totales por tiempo de exposición (7 y 15 días) y por tipo de dieta (DC y DAG).

DISCUSIÓN

Las dietas altas en grasas (DAG) en modelos animales, se han utilizado ampliamente con el fin de comprender la fisiopatología de diferentes dislipidemias en distintas etapas del desarrollo. El aumento en la ingesta de lípidos promueve la lipogénesis de novo y la deposición ectópica lipídica en diferentes órganos, que a su vez, conduce a la resistencia periférica a la insulina, respuesta inflamatoria, estrés oxidativo crónico y daño sistémico progresivo^{91,92}.

El presente trabajo permitió establecer y validar un modelo experimental de dieta modificada alta en grasas a través de métodos gravimétricos como PTP y Shoxlet, los cuales permitieron formular una dieta con características organolépticas específicas. La DAG fue palatable para los roedores, la cual aporta 56.2% kcal de grasa como consecuencia de la adición de ácidos grasos saturados presentes en la manteca de cerdo, principalmente el ácido palmítico, el cual se ha demostrado en estudios previos, tiene un efecto deletéreo en la secreción de insulina en respuesta a glucosa por parte de las células β ^{86,93}, además de ser el ácido graso saturado más común en la dieta humana, representando aproximadamente el 65% de los ácidos grasos libres saturados y el 32% de los ácidos grasos totales en el suero humano⁹⁴.

La importancia de establecer un modelo adecuado de DAG con una proporción mínima del 30% de energía total en forma de grasa es vital para conducir el desarrollo de obesidad en un modelo murino, el cual es el principal factor de riesgo para el desarrollo de DMT2, según lo reportado por Hariri, N. et al., (2010)⁹⁵.

En este estudio, demostramos que la interacción en una etapa temprana del desarrollo de los roedores y el tipo de dieta juega un papel crucial en la inducción de enfermedades metabólicas como lo reporta Cheng *et al.*, (2017). Además, se reportó que en el periodo post-destete, el metabolismo de glucosa es susceptible de sufrir alteraciones debido a una desregulación de la misma, lo que sugiere que existe una diferencia regulatoria metabólica inherente, relacionado con el desarrollo de un fenotipo de obesidad primario en este periodo.

La administración de una DAG durante un periodo corto de tiempo a ratones post-destete propició cambios significativos en el aumento de la masa corporal relacionados con la excesiva ingesta calórica diaria, lo cual de acuerdo con la literatura⁹⁶, este incremento en el aumento de peso es causado principalmente por la masa grasa.

Los resultados obtenidos indicaron que los ratones alimentados con una DAG durante 7 y 15 días post-destete, correspondiente al periodo de post ablactación, ventana de tiempo en la cual el páncreas es susceptible a factores externos como insultos metabólicos debido al proceso de maduración postnatal que exhibe, presentaron una tolerancia a la glucosa severamente deteriorada, en comparación con los ratones alimentados con DC, lo que puede provocar un nivel bajo de sensibilidad a la insulina afectando la funcionalidad normal del metabolismo de la glucosa a nivel sistémico.

Las células β pancreáticas son mas vulnerables al excedente de lípidos en comparación con otras células, y las posibles consecuencias es la reducida secreción de insulina en mediada por glucosa y lipoapoptosis^{97,98}. La evidencia experimental sugiere que los efectos nocivos de los ácidos grasos aportados por la dieta están mediados a través de metabolitos intracitosólicos derivados de lípidos no oxidados, además de lípidos endógenos sintetizados a partir del exceso de glucosa a través de la lipogénesis de novo, como lo plantea el reporte de Ruan J et al. (2018)⁹⁹, además, el estudio de Koshkin V. et al. (2013) reporta que las células β pancreáticas son extremadamente susceptibles a la hiperglucemia inducida por el daño de ROS generado por lipotoxicidad, ya que presentan bajos niveles de enzimas que atenúan radicales libres¹⁰⁰, por lo que, el efecto de desarrollo de hiperglicemia observado en los ensayos de funcionalidad podría sugerir una correlación fisiológica del efecto patológico de los lípidos de la formulación administrada (lipotoxicidad).

El estudio actual demostró que la ingesta elevada de lípidos proveniente de la dieta en forma de ácido palmitico puede exacerbar la respuesta inflamatoria en el páncreas, ya que se ha reportado con anterioridad en el trabajo de Horvat P. et al

(2015) que los lípidos pueden actuar como moléculas proinflamatorias¹⁰¹. Los resultados arrojados por el análisis histopatológico demuestra una alteración moderada en el tejido pancreático relacionado principalmente con infiltración tanto de leucocitos como de neutrófilos, en comparación con el tejido bajo la dieta control, lo cual resulta sumamente relevante ya que la literatura reporta que la infiltración de células inflamatorias principalmente en tejido adiposo, páncreas e hígado es un aspecto clave para el desarrollo de la resistencia a la insulina¹⁰².

Además, los cambios observados concuerdan con el trabajo previo de Gregorio et al., (2013) en donde reportan modificaciones pancreáticas morfológicas en la descendencia de roedores expuestos a una dieta materna alta en grasas referente a hipertrofia de islotes y adipocitos, así como un aumento en la masa corporal por la excesiva ingesta calórica y cambios funcionales relacionados con hiperinsulinemia y aumentos de porcentaje de glucosa en sangre¹⁰³.

CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue analizar los cambios provocados por la administración de una dieta modificada alta en grasas durante el periodo post-ablactación sobre la maduración morfológica y funcional del islote pancreático. Para lograr este objetivo, se formuló una dieta para roedores, la cual fue palatable y cumplió con las características necesarias para llevar a cabo el estudio. Tras un periodo corto de 7 y 15 días, la ingestión de la dieta alta en grasas provocó la desregulación de glucosa vía intraperitoneal, el aumento de peso y alteraciones histopatológicas. Estos resultados corroboran que la exposición de una dieta alta en grasas en ratones en un período corto después del destete es suficiente para causar cambios relacionados con la citoarquitectura y la funcionalidad del islote pancreático. En este sentido, se concluye que los insultos nutricionales durante la primera infancia podrían generar efectos perjudiciales en la morfología y fisiología del organismo.

Sin embargo, hace falta profundizar en los mecanismos fisiológicos, morfológicos y moleculares, involucrados en el desarrollo funcional del páncreas y el reto metabólico presente en el período post-ablactación, así como largos periodos de tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chandra, R. & Liddle, R. A. Neural and hormonal regulation of pancreatic secretion. *Curr Opin Gastroenterol* (2009). doi:10.1097/MOG.0b013e32832e9c41
2. Márquez-Aguirre, A. L., Canales-Aguirre, A. A., Padilla-Camberos, E., Esquivel-Solis, H. & Díaz-Martínez, N. E. Development of the endocrine pancreas and novel strategies for β -cell mass restoration and diabetes therapy. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. médicas e biológicas / Soc. Bras. Biofísica ... [et al.]* **48**, 765–76 (2015).
3. Collombat, P., Hecksher-Sørensen, J., Serup, P. & Mansouri, A. Specifying pancreatic endocrine cell fates. *Mech. Dev.* **123**, 501–512 (2006).
4. MacDonald, P. E. & Rorsman, P. Oscillations, intercellular coupling, and insulin secretion in pancreatic β cells. *PLoS Biology* **4**, 167–171 (2006).
5. Ashcroft, F. M. *et al.* Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem* (1994). doi:10.1002/jcb.240550007
6. Komatsu, M., Takei, M., Ishii, H. & Sato, Y. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *Journal of Diabetes Investigation* (2013). doi:10.1111/jdi.12094
7. Thorens, B. Of fat, β cells, and diabetes. *Cell Metab.* **14**, 439–440 (2011).
8. Henquin, J. C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* (2000). doi:10.2337/diabetes.49.11.1751
9. Wang, Z. & Thurmond, D. C. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J. Cell Sci.* (2009). doi:10.1242/jcs.034355
10. Mfopou, J. K., Chen, B., Sui, L., Sermon, K. & Bouwens, L. Recent advances and prospects in the differentiation of pancreatic cells from human embryonic stem cells. *Diabetes* (2010). doi:10.2337/db10-0439

11. Pictet, R. L., Clark, W. R., Williams, R. H. & Rutter, W. J. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev. Biol.* (1972). doi:10.1016/0012-1606(72)90083-8
12. Li, H., Arber, S., Jessell, T. M. & Edlund, H. Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat. Genet.* (1999). doi:10.1038/12669
13. Ahlgren, U., Pfaff, S. L., Jessell, T. M., Edlund, T. & Edlund, H. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* (1997). doi:10.1038/385257a0
14. Maestro, M. A. *et al.* Distinct roles of HNF1beta, HNF1alpha, and HNF4alpha in regulating pancreas development, beta-cell function and growth. *Endocr. Dev.* **12**, 33–45 (2007).
15. Offield, M. F. *et al.* PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* (1996). doi:10.1016/0076-6879(93)25031-v
16. Miller, K. *et al.* Islet formation during the neonatal development in mice. *PLoS One* (2009). doi:10.1371/journal.pone.0007739
17. Schwitzgebel, V. M. *et al.* Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* **127**, 3533–3542 (2000).
18. Wilson, M. E., Scheel, D. & German, M. S. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mechanisms of Development* **120**, 65–80 (2003).
19. Prado, C. L., Pugh-Bernard, A. E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B. & Sussel, L. Ghrelin cells replace insulin-producing cells in two mouse models of pancreas development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2004). doi:10.1073/pnas.0308604100
20. Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H. & Sundler, F. The ghrelin cell: A novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul. Pept.* (2002). doi:10.1016/S0167-0115(02)00067-8

21. Bouwens, L. & Rooman, I. Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass. *Physiol. Rev.* (2005). doi:10.1152/physrev.00025.2004
22. Teta, M., Rankin, M. M., Long, S. Y., Stein, G. M. & Kushner, J. A. Growth and Regeneration of Adult β Cells Does Not Involve Specialized Progenitors. *Dev. Cell* (2007). doi:10.1016/j.devcel.2007.04.011
23. Jiang, J. *et al.* Generation of Insulin-Producing Islet-Like Clusters from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* (2007). doi:10.1634/stemcells.2006-0761
24. Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I. & Melton, D. A. Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* (2004). doi:10.1038/nature02520
25. Finegood, D. T., Scaglia, L. & Bonner-Weir, S. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* (1995). doi:10.2337/diab.44.3.249
26. Meier, J. J. *et al.* β -cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of β -cell mass in humans. *Diabetes* (2008). doi:10.2337/db07-1369
27. Gregg, B. E. *et al.* Formation of a Human β -Cell Population within Pancreatic Islets Is Set Early in Life. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2012). doi:10.1210/jc.2012-1206
28. Teta, M., Long, S. Y., Wartschow, L. M., Rankin, M. M. & Kushner, J. A. Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* (2005). doi:10.2337/diabetes.54.9.2557
29. Weir, G. C., Laybutt, D. R., Kaneto, H., Bonner-Weir, S. & Sharma, A. β -cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. in *Diabetes* (2001). doi:10.2337/diabetes.50.2007.S154
30. Sorenson, R. L. & Brelje, T. C. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: β -cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. in *Hormone and Metabolic Research* (1997). doi:10.1055/s-2007-

31. Desai, B. M. *et al.* Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet beta cell, regeneration. *J. Clin. Invest.* (2007). doi:10.1172/JCI29988
32. Jacovetti, C., Matkovich, S. J., Rodriguez-Trejo, A., Guay, C. & Regazzi, R. Postnatal β -cell maturation is associated with islet-specific microRNA changes induced by nutrient shifts at weaning. *Nat. Commun.* **6**, 8084 (2015).
33. Gittes, G. K. Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review. *Developmental Biology* **326**, 4–35 (2009).
34. Rieck, S., Bankaitis, E. D. & Wright, C. V. E. Lineage determinants in early endocrine development. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **23**, 673–684 (2012).
35. Butler, P. C., Meier, J. J., Butler, A. E. & Bhushan, A. The replication of beta cells in normal physiology, in disease and for therapy. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **3**, 758–768 (2007).
36. Jain, R. & Lammert, E. Cell-cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes, Obesity and Metabolism* (2009). doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01102.x
37. Gilbert, S. Developmental Biology. *Dev. Biol.* **311**, 691 (2007).
38. Thorens, B. Of fat, β cells, and diabetes. *Cell Metab.* (2011). doi:10.1016/j.cmet.2011.09.006
39. DeFronzo, R. A. *et al.* Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, (2015).
40. Ahlqvist, E. *et al.* Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *Lancet Diabetes Endocrinol.* (2018). doi:10.1016/S2213-8587(18)30051-2
41. DeFronzo, R. A. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. in *Diabetes* (2009).

doi:10.2337/db09-9028

42. IDF. *IDF Diabetes Atlas 8th edition*. *idf.org* (2017). doi:10.1289/image.ehp.v119.i03
43. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. (2016). Available at: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>.
44. Ensanut. Ensanut 2012. *Instituto Nacional de Salud Pública* 200 (2012). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
45. ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *Ensanut 2016*, 1–154 (2016).
46. Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J. P. & Reynoso-Noverón, N. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Publica Mex.* **55**, 129–136 (2013).
47. Barraza-Llorens, M. *et al.* *Carga económica de la diabetes mellitus en México, 2013*. *Funsalud* (2015).
48. DeFronzo, R. A. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: The missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* (2010). doi:10.1007/s00125-010-1684-1
49. Gulli, G., Ferrannini, E., Stern, M., Haffner, S. & DeFronzo, R. A. The metabolic profile of NIDDM is fully established in glucose-tolerant offspring of two Mexican-American NIDDM parents. *Diabetes* (1992). doi:10.2337/diab.41.12.1575
50. Morris, A. P. *et al.* Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* (2012). doi:10.1038/ng.2383

51. Madsbad, S. The role of glucagon-like peptide-1 impairment in obesity and potential therapeutic implications. *Diabetes, Obesity and Metabolism* (2014). doi:10.1111/dom.12119
52. Bays, H., Mandarino, L. & DeFronzo, R. A. Role of the Adipocyte, Free Fatty Acids, and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Agonists Provide a Rational Therapeutic Approach. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (2004). doi:10.1210/jc.2003-030723
53. Kruger, M. *et al.* Dissection of the insulin signaling pathway via quantitative phosphoproteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2008). doi:10.1073/pnas.0711713105
54. Cusi, K. *et al.* Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J. Clin. Invest.* (2000). doi:10.1172/JCI7535
55. Krook, A. *et al.* Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* (2000). doi:10.2337/diabetes.49.2.284
56. Copps, K. D. & White, M. F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* (2012). doi:10.1007/s00125-012-2644-8
57. Bouzakri, K. *et al.* IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance in skeletal muscle from pancreas transplant recipients. *Diabetes* (2006). doi:55/3/785 [pii]
58. Hiratani, K. *et al.* Roles of mTOR and JNK in serine phosphorylation, translocation, and degradation of IRS-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005). doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.152
59. Ashcroft, F. M. & Rorsman, P. Diabetes mellitus and the β cell: The last ten years. *Cell* (2012). doi:10.1016/j.cell.2012.02.010

60. Cerf, M. E. Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology* (2013). doi:10.3389/fendo.2013.00037
61. Schrimpe-Rutledge, A. C. *et al.* Discovery of novel glucose-regulated proteins in isolated human pancreatic islets using LC-MS/MS-based proteomics. *J. Proteome Res.* (2012). doi:10.1021/pr3002996
62. Henquin, J. C., Dufrane, D. & Nenquin, M. Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes* (2006). doi:10.2337/db06-0868
63. Ferrannini, E. The stunned beta cell: a brief history. *Cell Metab.* (2010). doi:10.1016/j.cmet.2010.04.009
64. Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V., Sussel, L. & Accili, D. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell* (2012). doi:10.1016/j.cell.2012.07.029
65. Henquin, J. C. & Rahier, J. Pancreatic alpha cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetologia* (2011). doi:10.1007/s00125-011-2118-4
66. Marchetti, P. *et al.* The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia* (2007). doi:10.1007/s00125-007-0816-8
67. Masini, M. *et al.* Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia* (2009). doi:10.1007/s00125-009-1347-2
68. Stienstra, R., Duval, C., Müller, M. & Kersten, S. PPARs, obesity, and inflammation. *PPAR Research* (2007). doi:10.1155/2007/95974
69. Yaney, G. C. & Corkey, B. E. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* (2003). doi:10.1007/s00125-003-1207-4
70. Reynoso, R., Salgado, L. M. & Calderón, V. High levels of palmitic acid lead to insulin resistance due to changes in the level of phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor substrate-1. *Mol. Cell. Biochem.* (2003). doi:10.1023/A:1023423005187
71. Coelho, D. F. *et al.* Effect of high-fat diets on body composition, lipid

metabolism and insulin sensitivity, and the role of exercise on these parameters. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* (2011). doi:10.1590/S0100-879X2011007500107

72. Huang, S. *et al.* Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J. Lipid Res.* (2012). doi:10.1194/jlr.D029546
73. Donath, M. Y. & Shoelson, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* (2011). doi:10.1038/nri2925
74. Chiarle, R. *et al.* Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell* (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.07.049
75. Ley, S. H., Hamdy, O., Mohan, V. & Hu, F. B. Prevention and management of type 2 diabetes: Dietary components and nutritional strategies. *Lancet* **383**, 1999–2007 (2014).
76. Risérus, U., Willett, W. C. & Hu, F. B. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Progress in Lipid Research* **48**, 44–51 (2009).
77. *MOLECULAR NUTRITION AND DIABETES*. (Elsevier, 2016).
78. Storlien, L. H. *et al.* Diet composition and insulin action in animal models. *Br. J. Nutr.* (2000). doi:10.1017/S0007114500001008
79. Bray, G. *et al.* The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *J. Nutr.* (2002).
80. Fraulob, J. C., Ogg-Diamantino, R., Fernandes-Santos, C., Aguila, M. B. & Mandarim-de-Lacerda, C. A. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **46**, 212–223 (2010).
81. Cerf, M. E. High fat programming of beta cell compensation, exhaustion, death and dysfunction. *Pediatr. Diabetes* **16**, 71–78 (2015).

82. Bringhenti, I., Ornellas, F., Mandarim-de-Lacerda, C. A. & Aguila, M. B. The insulin-signaling pathway of the pancreatic islet is impaired in adult mice offspring of mothers fed a high-fat diet. *Nutrition* **32**, 1138–1143 (2016).
83. Lee, Y. S. *et al.* Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* (2011). doi:10.2337/db11-0194
84. Wu, Y. *et al.* Chronic inflammation exacerbates glucose metabolism disorders in C57BL/6J mice fed with high-fat diet. *J. Endocrinol.* (2013). doi:10.1530/JOE-13-0160
85. Cheng, H. S., Ton, S. H., Phang, S. C. W., Tan, J. B. L. & Abdul Kadir, K. Increased susceptibility of post-weaning rats on high-fat diet to metabolic syndrome. *J. Adv. Res.* **8**, 743–752 (2017).
86. Stolovich-Rain, M. *et al.* Weaning Triggers a Maturation Step of Pancreatic β Cells. *Dev. Cell* **32**, 535–545 (2015).
87. Pascoe, J. *et al.* Free fatty acids block glucose-induced β -cell proliferation in mice by inducing cell cycle inhibitors p16 and p18. *Diabetes* (2012). doi:10.2337/db11-0991
88. Dutta, S. & Sengupta, P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences* (2016). doi:10.1016/j.lfs.2015.10.025
89. Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* **123**, 1939–1951 (1993).
90. Hsu, C. T., Patton, D. F., Mistlberger, R. E. & Steele, A. D. Palatable meal anticipation in mice. *PLoS One* (2010). doi:10.1371/journal.pone.0012903
91. Zlobine, I., Gopal, K. & Ussher, J. R. Lipotoxicity in obesity and diabetes-related cardiac dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (2016). doi:10.1016/j.bbalip.2016.02.011

92. Lim, J. S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J. M. & Lustig, R. H. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (2010). doi:10.1038/nrgastro.2010.41
93. Sone, H. & Kagawa, Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* **48**, 58–67 (2005).
94. Yu, Y. *et al.* Serum levels of polyunsaturated fatty acids are low in Chinese men with metabolic syndrome, whereas serum levels of saturated fatty acids, zinc, and magnesium are high. *Nutr. Res.* (2012). doi:10.1016/j.nutres.2011.12.004
95. Hariri, N. & Thibault, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr. Res. Rev.* **23**, 270–299 (2010).
96. Shen, C.-L., Chen, L., Wang, S. & Chyu, M.-C. Effects of dietary fat levels and feeding durations on musculoskeletal health in female rats. *Food Funct.* (2014). doi:10.1039/c3fo60334b
97. Hirose, H. *et al.* Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1994). doi:10.1073/pnas.91.23.10878
98. Kusminski, C. M., Shetty, S., Orci, L., Unger, R. H. & Scherer, P. E. Diabetes and apoptosis: Lipotoxicity. *Apoptosis* (2009). doi:10.1007/s10495-009-0352-8
99. Ruan, J. S., Lin, J. K., Kuo, Y. Y., Chen, Y. W. & Chen, P. C. Chronic palmitic acid-induced lipotoxicity correlates with defective trafficking of ATP sensitive potassium channels in pancreatic β cells. *J. Nutr. Biochem.* **59**, 37–48 (2018).
100. Koshkin, V., Wang, X., Scherer, P. E., Chan, C. B. & Wheeler, M. B. Mitochondrial functional state in clonal pancreatic beta-cells exposed to free

fatty acids. *J. Biol. Chem.* (2003). doi:10.1074/jbc.M209709200

101. Horvath, P., Oliver, S. R., Zaldivar, F. P., Radom-Aizik, S. & Galassetti, P. R. Effects of intravenous glucose and lipids on innate immune cell activation in healthy, obese, and type 2 diabetic subjects. *Physiol. Rep.* (2015). doi:10.14814/phy2.12249
102. Lumeng, C. N. & Saltiel, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation* (2011). doi:10.1172/JCI57132
103. Gregorio, B. M., Souza-Mello, V., Mandarim-De-Lacerda, C. A. & Aguilu, M. B. Maternal high-fat diet is associated with altered pancreatic remodelling in mice offspring. *Eur. J. Nutr.* **52**, 759–769 (2013).