



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA**

EFFECTO INTERGENERACIONAL DE LA OBESIDAD MATERNA EN RATA, INDUCIDA
POR DIETA RICA EN GRASA, SOBRE LA PROPORCIÓN DE CÉLULAS BETA
MADURAS E INMADURAS DE LOS ISLOTOS PANCREÁTICOS DE LA
DESCENDENCIA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

RICARDO VILCHIS LÓPEZ

DIRECTOR: DR. CARLOS ALFONSO LARQUÉ VELÁZQUEZ



CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
CARRERA DE BIOLOGÍA
FORMATO F-5



OFICIO DE FECHA DE EXAMEN

QFB GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente

Le comunico que al alumno: **VILCHIS LOPEZ RICARDO** con número de cuenta **312148296** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **14 de Febrero de 2022** a las **13:00 hrs.**, para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DRA. ROSAS SAUCEDO PATRICIA	
VOCAL	DR. LARQUE VELAZQUEZ CARLOS ALFONSO	
SECRETARIO	DRA. AYALA ESCOBAR MARIA ELENA	
SUPLENTE	DRA. MORALES LEDESMA LETICIA	
SUPLENTE	DR. RODRIGUEZ MERCADO JUAN JOSE	

El título del trabajo escrito que se presenta es:

Efecto intergeneracional de la obesidad materna en rata, inducida por dieta rica en grasa, sobre la proporción de células beta maduras e inmaduras de los islotes pancreáticos de la descendencia.

En la modalidad de: **TESIS**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
CDMX, a 10 de Diciembre de 2021

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

DEDICATORIAS

No tengo palabras para agradecerle a mi mamá todo el amor y apoyo que me ha brindado. Te amo

Doy gracias:

A mí hermana por estar siempre al pendiente de todas mis metas y por procurar que estas se cumplan

A Jocelyn por tu comprensión y amor

A mi abuela Lala (Q.E.P.D) por tú crianza. Cada vez que logro algo pienso en ti

A Moisés por tú cariño

A mi papá (Q.E.P.D), solo guardo las cosas buenas

A mis hermanos Edwin e Isra por su amistad

A Analy, Tez, Ana y Rodrigo por su compañía durante la carrera

A Charly, Rene y Haydee por ser tan pacientes y entender que a veces el cerebro del alumno no agarra señal

A Aby, Rodrigo, Estefa, Hector, Dany, Emiliano y todos los que conforman el embrioteam. Perdón si me hace falta alguien, cada vez el labo es más grande....

“Moon river wider than a mile. I'm crossing you in style someday. Two drifters off to see the world. There's such a crazy world to see” *Henry Mancini*

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la UNAM y FES ZARAGOZA por brindarme el conocimiento y humanismo necesarios para desempeñarme como Biólogo

Al departamento de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina por permitirme realizar la tesis en sus instalaciones

Al Dr. Carlos Alfonso Larqué por sus observaciones y correcciones para la elaboración de la tesis

A las Dras. Leticia Morales, María Ayala, Patricia Rosas por nutrir con sus conocimientos la tesis

Al Dr. Mercado por brindarme su apoyo desde el 7mo semestre de la carrera y ahora siendo parte importante en la realización de mi proyecto de titulación

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
I. INTRODUCCIÓN	4
II. MARCO TEÓRICO	8
Morfología del páncreas y arquitectura de los islotes de Langerhans	8
<i>Células β y la secreción de insulina estimulada por glucosa</i>	9
Organogénesis del páncreas; diferenciación y maduración de las células β	13
<i>Heterogeneidad de las células β</i>	18
Epidemia de la obesidad	21
<i>Tejido adiposo durante la obesidad</i>	21
<i>La masa de células β durante la obesidad y DM2</i>	24
Papel de la obesidad materna sobre la descendencia	25
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVO GENERAL	29
Objetivos particulares	29
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	30
Diseño del estudio	30
Procedimientos	33
Análisis estadístico	38
VII. RESULTADOS	39
Generación F0	39
Generación F1	49
VIII. DISCUSIÓN	59
IX. CONCLUSIONES	67
X. REFERENCIAS	68

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
AGL	Ácidos grasos libres
ATP	Adenosín trifosfato
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
E	Día embrionario
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
FLTP	<i>Gen</i> y proteína Flattop
FTs	Factores de transcripción
GK	Glucocinasa (<i>glucokinase</i>)
GPCR	Receptor acoplado a proteína g (<i>G-protein coupled receptor</i>)
GSIS	Insulina estimulada por glucosa (<i>glucose-stimulated insulin secretion</i>)
HFD	Dieta alta en grasa (<i>high fat diet</i>)
IL-6	Interleucina-6
IPGTT	Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (<i>intraperitoneal glucose tolerance test</i>)
ITT	Prueba de sensibilidad a la insulina (<i>insulin tolerance test</i>)
K _{ATP}	Canales de K ⁺ sensibles a ATP
KCa	Canales de K ⁺ dependientes de calcio
K _m	Constante de Michaelis
K _v	Canales de K ⁺ dependientes del voltaje
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MCB	Masa de células beta (β)
MPC	Células progenitoras multipotentes (<i>multipotent progenitor cells</i>)
Ngn3	Neurogenina 3
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos salina (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCP	Vía de polaridad de la célula plana (<i>planar cell polarity</i>)
Pdx1	Homeobox pancreático y duodenal (<i>pancreatic and duodenal homeobox</i>)
Ptf1a	Subunidad alfa del factor de transcripción del páncreas 1
SM	Síndrome metabólico
SNARE	Proteína receptora de unión a NSF soluble (<i>Soluble NSF Attachment Protein</i>)
SPN	Semana Postnatal



TAG	Triacilglicerol
TASC	Tejido adiposo subcutáneo
TAV	Tejido adiposo visceral
VAMP	Sinaptobrevina
VDCC	Canales de calcio dependientes de voltaje (<i>voltage dependent calcium channel</i>)
VGNS	Canales de sodio dependientes de voltaje (<i>voltage gated sodium channel</i>)
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (<i>very low density lipoprotein</i>)
WAT	Tejido adiposo blanco (<i>white adipose tissue</i>)



RESUMEN

Recientemente, se han descrito dos subpoblaciones de células β maduras e inmaduras, las cuales podrían tener un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa en el organismo. Además, se ha propuesto que dichas subpoblaciones surgen durante el desarrollo embrionario. En este contexto, se ha sugerido que la obesidad materna podría alterar su proporción y, por lo tanto, ser el detonante de la aparición de enfermedades metabólicas de su descendencia durante el transcurso de su vida posnatal. Por lo tanto, nuestro objetivo fue conocer los efectos de la obesidad materna sobre la proporción de las subpoblaciones de células β . En nuestro estudio se indujo obesidad materna a través del consumo de HFD (dieta alta en grasa, high fat diet) 60% (antes y durante la gestación). El grupo F0 OBS, se caracterizó por desarrollar obesidad con un incremento del peso corporal, del TASC (tejido adiposo subcutáneo) y del TAV (tejido adiposo visceral), glucosa de ayuno elevada, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, en comparación con el grupo F0 CTRL alimentado con una dieta normocalórica. Sin embargo, no se observaron cambios en la masa de los islotes y en la proporción de células β maduras e inmaduras. Por su parte, los machos gestados por madres obesas (F1 OBS), se caracterizaron por tener intolerancia a la glucosa y disminución en la proporción de células β maduras y un aumento en la proporción de células β inmaduras, a la SPN 18, en comparación con el grupo gestado por madres con normopeso (F1 CTRL); aun cuando ambos grupos de hijos fueron alimentados con dieta estándar desde el destete. Esto nos permitió conocer el efecto de la obesidad materna sobre las subpoblaciones de células β en la descendencia y su papel en la predisposición para el desarrollo de enfermedades metabólicas. En vista de que en México gran parte de mujeres en edad reproductiva padece obesidad, es fundamental entender los procesos subyacentes de los efectos intergeneracionales de la obesidad materna sobre los hijos durante etapas tempranas del desarrollo y que durante la vida adulta podrían comprometer su calidad de vida.



I. INTRODUCCIÓN

Las células β se localizan dentro del páncreas en los islotes de Langerhans y mantienen la homeostasis nutrimental en el organismo mediante la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS, Glucose-Stimulated Insulin Secretion) (1). Se han identificado diferentes subpoblaciones de células β con heterogeneidad en sus características moleculares, fenotípicas y funcionales. Además, se ha propuesto que estas subpoblaciones pudiesen surgir durante el desarrollo embrionario, por un lado, debido a la participación de diferentes estructuras embrionarias que dan origen al páncreas y por el otro, a las diferentes señales locales que reciben las células β dentro del islote durante su formación y maduración (2). Actualmente, se han descrito dos subpoblaciones de células β con base en sus características moleculares y fenotípicas relacionadas con un estado de madurez o inmadurez. Se ha observado que las células β más funcionales tienen polaridad, es decir, se encuentran en forma de roseta alrededor de los vasos capilares, con los transportadores GLUT2 localizados hacia las caras adyacentes a otras células β y gránulos de insulina almacenados en sitios cercanos al polo apical que está en contacto directo con el capilar. Posiblemente, este sea un mecanismo que le permite a la célula β , llevar la secreción de cantidades robustas de insulina al ser estimulada con glucosa (3,4).

Actualmente, la proteína Flattop (FLTP), ha sido un útil marcador para diferenciar a la subpoblación madura de la inmadura, ya que sus concentraciones aumentan cuando la vía Wnt/ polaridad de células planas (PCP) se encuentra activa. Se ha observado que, las células β que expresan (FLTP+) constituyen el 80% del total de células β de los islotes. Asimismo, estas células muestran características que se relacionan con un estado de madurez avanzado, con poca capacidad proliferativa, mayor expresión de genes relacionados con la maduración funcional de las células β (*NKX6.1*, *MafA*, y *GLUT2*), así como una mayor capacidad de síntesis y secreción de insulina en respuesta a glucosa (5).

Por otro lado, las células β que no expresan FLTP (FLTP-) muestran un fenotipo inmaduro en el que se observa una mayor capacidad proliferativa, caracterizado por el aumento en



la actividad de cinasas activadas por mitógenos (MAPK); una expresión baja de *GLUT 2*, así como una secreción deficiente de insulina en respuesta a la glucosa (4,5).

Se ha propuesto que la proporción de las subpoblaciones de células β maduras (FLTP+) e inmaduras (FLTP-) confiere flexibilidad en la plasticidad y el recambio de dichas células ante diferentes escenarios de estrés metabólico como la obesidad. De forma que se ha sugerido que la población de células β maduras responde a la demanda de insulina: mientras que la población de células β inmaduras podría funcionar como un reservorio de células β maduras que ayuda a mantener la masa de células β (MCB). Asimismo, se ha propuesto que las células β inmaduras sustituyen (a través de un proceso de maduración) a las células β maduras que muestran daño irreversible por agotamiento, por ejemplo, en escenarios como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (4,5).

En México, el porcentaje de adultos de 20 años y más con sobrepeso y obesidad es del 75% (6). Por su parte, la obesidad y el sobrepeso se caracterizan por la acumulación anormal de tejido adiposo corporal provocada principalmente por el consumo en exceso de alimentos con alto contenido calórico. Además, la obesidad y sobrepeso se consideran como un factor de riesgo para la aparición del síndrome metabólico (SM), la DM2, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (7).

El tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés) es un órgano endocrino importante en la regulación del metabolismo energético y se encuentra compuesto principalmente por adipocitos de una sola vacuola lipídica. Estos tienen la capacidad de liberar adipocinas, las cuales, incluyen a proteínas como la adiponectina y la leptina que juegan un papel importante en la homeostasis metabólica. Además, el WAT constituye un reservorio energético importante en forma de triglicéridos (TAG) sintetizados a partir de AGL y glicerol (8).

Diversos estudios han demostrado que durante la obesidad el incremento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia), principalmente del TAV, está relacionado con alteraciones en la secreción de adipocinas. También se ha demostrado que los adipocitos hipertróficos de TAV liberan cantidades elevadas de ácidos grasos libres (AGL) y glicerol (9).



El aumento en la concentración plasmática de AGL provocada por la disfunción de los adipocitos hipertróficos, provoca un aumento en la formación y liberación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés, las cuales contienen colesterol y TAG) sintetizados en el hígado. Además, las concentraciones elevadas de AGL en plasma, favorecen su acumulación ectópica en diversos órganos (lipotoxicidad), alterando diferentes vías de señalización. Asimismo, el glicerol derivado del metabolismo de triglicéridos puede ser utilizado como sustrato para la gluconeogénesis lo que puede conllevar a un aumento en los niveles de glucosa, lo que genera glucotoxicidad. A si mismo se puede definir a la glucolipotoxicidad (glucotoxicidad y lipotoxicidad), como a las alteraciones estructurales y funcionales de los órganos a causa de las concentraciones elevadas de lípidos y glucosa durante largos periodos de tiempo (1,8,10,11).

Entre las adipocinas liberadas durante la obesidad, algunas son proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la resistina, la interleucina-6 (IL-6), las cuales, promueven un estado de inflamación crónica en todo en el organismo, el cual contribuye aún más a la disfunción de los órganos (1,8). En conjunto, la glucolipotoxicidad e inflamación, en los órganos blanco de la insulina, pueden provocar alteraciones en su respuesta a dicha hormona (resistencia a la insulina).

La disminución de los efectos de la insulina relacionados con la internalización y el metabolismo de la glucosa promueven el aumento de la glucemia. Esto resulta en una sobreestimulación de las células β para secretar insulina, lo cual, aunado a la glucolipotoxicidad y la inflamación conlleva a un estado de estrés metabólico en la célula β . Bajo estas condiciones adversas, la célula β pierde progresivamente la capacidad para secretar insulina, lo cual resulta en DM2 (1). En etapas avanzadas de la DM2, la tasa de apoptosis en las células β , supera a la tasa de proliferación, esto conlleva a la reducción de la MCB, y la disminución de los niveles de insulina plasmática (12).

En la actualidad, el 76.8% de las mujeres en edad reproductiva tiene obesidad y sobrepeso (6). Múltiples evidencias epidemiológicas han mostrado que la descendencia de madres obesas puede heredar el fenotipo de la madre (herencia intergeneracional)



aún sin que los descendientes hayan sido expuestos a un entorno nutricional obesogénico durante su vida adulta (13).

La incorporación de modelos en roedores de obesidad materna inducida a través de dietas altas en grasa (HFD, por sus siglas en inglés), han permitido conocer el efecto de la condición nutrimental de las madres sobre algunos parámetros metabólicos de la descendencia (peso, glucemia en ayuno, tolerancia a la glucosa, niveles plasmáticos de insulina, entre otros) y sobre las células β del páncreas (masa de células β , morfología del islote, entre otras) (14–18).

A pesar de la amplia evidencia actual, ningún estudio se ha enfocado a analizar el efecto de la obesidad materna sobre las subpoblaciones de células β maduras e inmaduras y su papel en el metabolismo de la descendencia masculina en la etapa adulta. Por lo tanto, en el presente trabajo se planteó como objetivo principal, conocer los efectos producidos por la obesidad materna sobre las subpoblaciones de células β maduras/inmaduras (a través del marcador FLTP) y su influencia en el metabolismo de la descendencia en la edad adulta. Esto proporcionará información relevante acerca del papel de la obesidad materna como factor de riesgo asociado al aumento de la susceptibilidad de desarrollar enfermedades metabólicas en los hijos y el papel que desempeñan los cambios en las subpoblaciones de células β en el aumento de dicha susceptibilidad.



II. MARCO TEÓRICO

Morfología del páncreas y arquitectura de los islotes de Langerhans

El páncreas es una glándula mixta localizada detrás del estómago y adherida al duodeno, en la cavidad abdominal (Figura 1A). El componente exocrino comprende a las células acinares secretoras de zimógenos de enzimas digestivas y los conductos que las transportan hacia el duodeno, estas enzimas intervienen en la degradación de nutrientes provenientes de la dieta (Figura 1B). Por otra parte, el compartimento endocrino consta de grupos pequeños de células llamados islotes de Langerhans que miden entre 50 a 200 μm , y que contienen cinco tipos celulares; α , β , δ , PP y ϵ que sintetizan las hormonas glucagón, insulina, somatostatina, polipéptido pancreático y grelina, respectivamente. Dentro de los islotes se encuentra una densa red capilar a través de la cual se transportan al torrente sanguíneo estas hormonas, cuya función principal es regular la homeostasis de la glucosa (Figura 1C) (2,19).

En los roedores, dentro de los islotes la proporción de células β es del 80%, siendo el tipo celular más abundante dentro del mismo islote. Las células β están localizadas principalmente en el centro del islote y se encuentran rodeadas por células α y δ en proporción de 14% y 6% respectivamente. Por otro lado, las células pp y ϵ representan un porcentaje mínimo de la masa celular dentro del islote. En contraste, la organización de los islotes humanos es más heterogénea, se ha observado que la localización de las células β depende de la edad del individuo y el tamaño de islote. Asimismo, las proporciones celulares varían entre el 28–75% para las células β , 10–65% para las células α , 1.2–20% para las células δ , y, en porcentaje mínimo las células pp y ϵ (4).



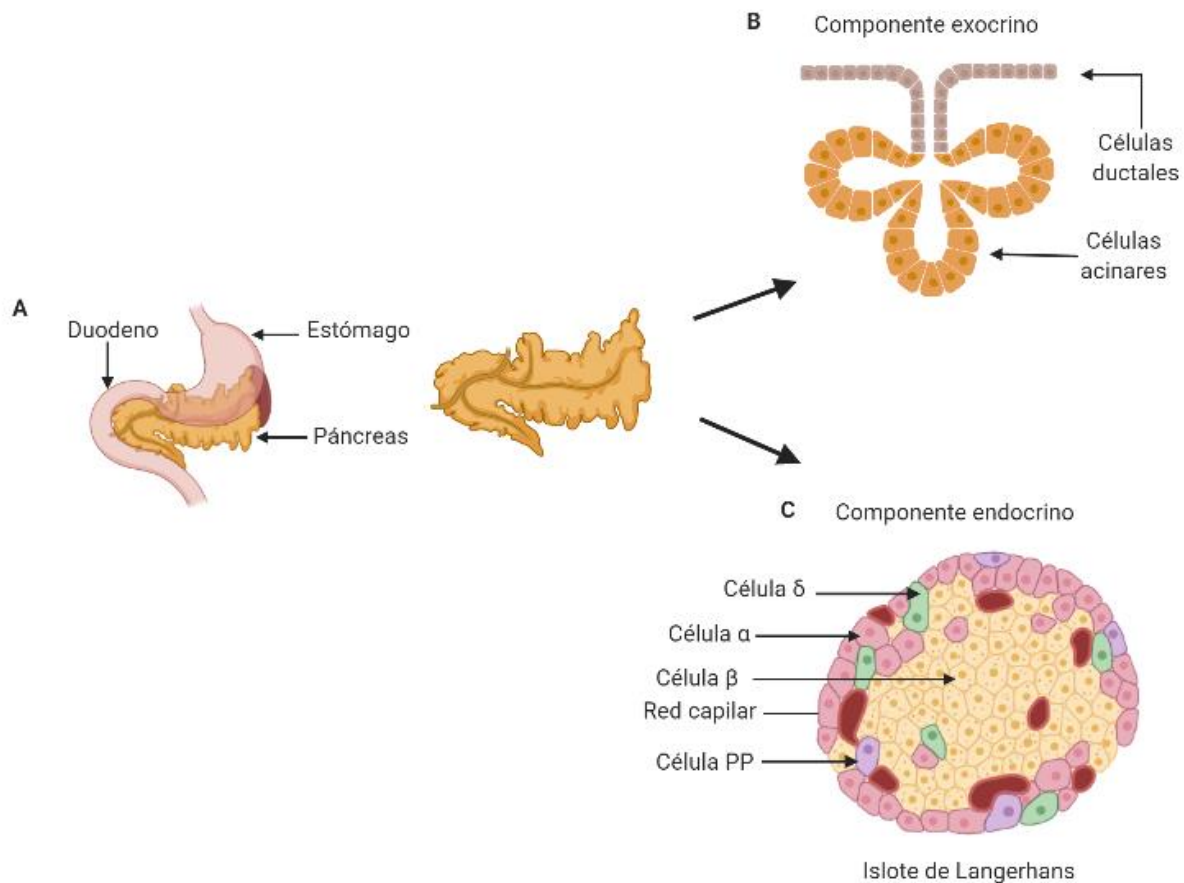


Figura 1. Morfología del páncreas. A) Localización anatómica. B) Compartimento exocrino compuesto por acinos y células ductales .C) Compartimento endocrino; Islote de Langerhans en roedor y arquitectura celular dentro del islote.

Células β y la secreción de insulina estimulada por glucosa

Debido a su importancia en la homeostasis nutricional en el organismo, la célula β es la célula endocrina del páncreas más estudiada. De manera general, se caracteriza por ser la única capaz de monitorear constantemente los nutrientes circulantes, principalmente glucosa, y responder a cambios en sus concentraciones a través de la biosíntesis y secreción de insulina hacia el torrente sanguíneo (1,20).



La insulina es una hormona que estimula la síntesis y translocación hacia la membrana plasmática del transportador de glucosa GLUT4 en adipocitos y células del músculo estriado principalmente, lo que permite internalizar a la glucosa y utilizarla como fuente de energía o convertirla en diversos productos a través de múltiples rutas metabólicas. Dentro de sus actividades anabólicas, promueve el almacenaje de nutrientes como los ácidos grasos en tejido adiposo y glucógeno en hígado, induce la síntesis de proteínas, y, estimula el crecimiento y la diferenciación celular. Por otro lado, inhibe la producción hepática de glucosa, inhibe la lipólisis y evita la degradación de proteínas, después de la ingesta de alimentos (1,20).

La secreción de insulina es estimulada por distintos secretagogos que incluyen algunos nutrientes, neurotransmisores, drogas y algunas hormonas producidas dentro del mismo islote y otras hormonas como las incretinas. Sin embargo, el mecanismo de secreción de insulina estimulado por glucosa (GSIS) es el más importante. En este proceso intervienen interacciones entre diferentes eventos metabólicos y la actividad de canales iónicos (1,21).

La GSIS depende en gran parte de la actividad eléctrica de la célula β . La célula β aislada mantiene un potencial eléctrico en reposo de aproximadamente -70 mV a concentraciones experimentales de glucosa extracelular por debajo de 3 mM. El aumento de la concentración de glucosa plasmática por arriba de 7 mM provocado por la ingesta de alimento favorece su internalización a través de los transportadores transmembranales GLUT2 (SLC2A2) en roedores o GLUT1 (SLC2A1) en humanos. Inmediatamente después, dentro de la célula la glucosa es fosforilada por la hexocinasa IV, conocida como glucocinasa (GK), la cual, presenta una baja afinidad por este nutriente. Debido a esto, se considera que la GK es el componente limitante principal que regula el uso de glucosa en la célula β y por lo tanto también el flujo glucolítico (1,21).

La glucosa fosforilada ingresa a la vía glucolítica en el citoplasma en donde se forma piruvato. Este último, se transforma en acetil-coA, que, a su vez puede ingresar al ciclo de Krebs en la matriz mitocondrial para formar NADH y FADH. Estos últimos, ingresan a



la cadena transportadora de electrones, su aumento promueve el incremento de la fuerza protón-motriz, necesaria para el proceso de fosforilación oxidativa del adenosín difosfato (ADP), formando el producto final adenosín trifosfato (ATP). Como resultado de este proceso, se incrementa la relación intracelular de ATP/ADP cuya consecuencia es el cierre de canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}) que en conjunto con la actividad de canales TRP no selectivos permiten la despolarización lenta de la membrana. Cuando el potencial de membrana alcanza los -40 mV se da la activación de canales de sodio dependientes de voltaje (VGNS, por sus siglas en inglés) y canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC, por sus siglas en inglés) de bajo umbral que despolarizan aún más la membrana. Una vez que el potencial de membrana alcanza -20 mV (aproximadamente), se activan los VDCC de alto umbral (principalmente de tipo L), lo cual aumenta aún más la concentración de Ca^{2+} intracelular y provoca ráfagas de potenciales de acción superpuestos, que resultan en la exocitosis de gránulos de insulina. Después de la exocitosis de los gránulos de insulina, los canales de K^+ dependientes del voltaje (K_v) y los canales de K^+ dependientes de calcio (KCa) de alta conductancia repolarizan la membrana, restableciendo el potencial de reposo y actuando como un freno de la GSIS (Figura 2A) (1,21).

Es conocido que la secreción de insulina es bifásica. La primera fase, ocurre poco después de la estimulación con glucosa y dura entre 5 a 10 minutos. En esta fase se secretan de forma rápida y transitoria los gránulos de insulina de la reserva de gránulos previamente acoplados a la membrana. Se ha sugerido que la insulina que se libera durante esta etapa desencadena la síntesis de glucógeno en el hígado y juega un papel importante en el control de la glucosa en sangre. Por otro lado, la segunda fase se caracteriza por ser sostenida y más larga. Esta fase comienza al término de la primera fase y se mantiene hasta finalizar el estímulo con glucosa. La segunda fase de secreción de insulina implica la liberación de gránulos de la reserva de almacenamiento que no están previamente acoplados a la membrana, por lo que los gránulos de insulina deben ser procesados y movilizados hasta la membrana antes de ser secretados. Se ha sugerido que la insulina secretada en esta fase está implicada en la utilización de glucosa por otros tejidos (Figura 2B) (21,22).



El mecanismo molecular de la exocitosis permite el transporte y acoplamiento de gránulos de insulina a la membrana celular. Este proceso está mediado por proteínas intercambiadoras de GTP/GDP, las cuales, reclutan los gránulos a la membrana. A continuación, la interacción entre las proteínas sinaptobrevina (VAMP) de los gránulos y receptores de proteína de unión a factor sensible a N-etilmaleimida soluble (SNARE), como syntaxina1-A y SNAP 23/25 presentes en la membrana, permite la fusión de los gránulos con la membrana celular y la liberación de insulina (Figura 2C) (1,21,22).

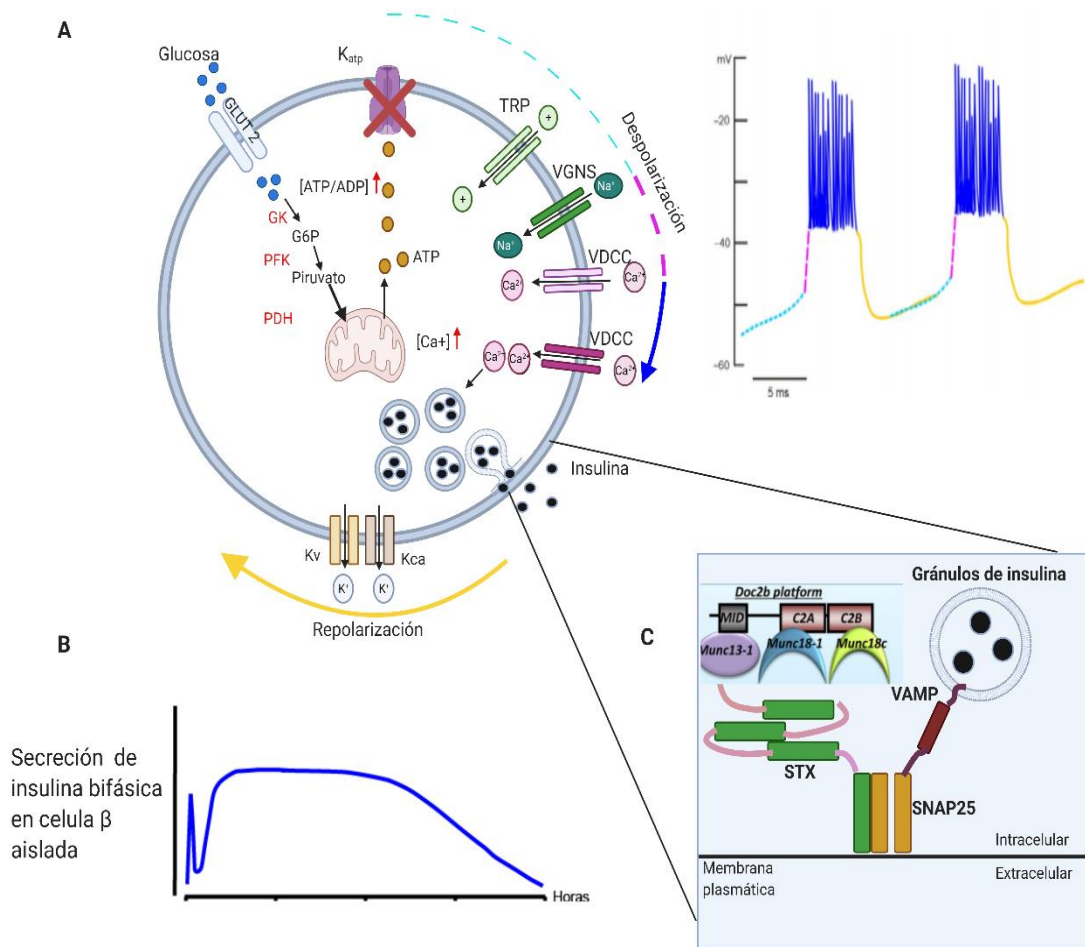


Figura 2. Secreción de insulina estimulada por glucosa A) Mecanismo general de GSIS dependiente de la activación de diferentes canales iónicos en la membrana que regulan la actividad eléctrica de la célula β y la secreción de gránulos de insulina. B) Diagrama de secreción



bifásica de insulina. C) Mecanismo de ensamblaje del complejo SNARE durante la exocitosis de la insulina. Modificada de Hiriart et al. (1).

Organogénesis del páncreas; diferenciación y maduración de las células β

La mayoría de las investigaciones sobre el desarrollo del páncreas se ha realizado en ratones transgénicos, esto ha permitido definir los eventos moleculares necesarios para la diferenciación y el funcionamiento normal de las células β . Este proceso comprende una serie de cambios morfológicos durante el desarrollo embrionario en donde intervienen señales extrínsecas como interacciones epitelio mesénquima o bien intrínsecas que generan diferentes tipos celulares a partir de la expresión de diversos factores de transcripción (FTs) (2).

En el ratón, el desarrollo del páncreas comienza con la transición primaria en el día embrionario 8.5 (E8.5), mediante la expresión del FT “Pancreatic and duodenal homeobox 1” (Pdx1) y “Pancreas Associated Transcription Factor 1a” (Ptf1a) en las células progenitoras multipotentes (MPC, por sus siglas en inglés) de la región caudal del intestino primitivo anterior. La expresión de estos FTs provoca aumento de la proliferación celular y la formación de la yema dorsal del páncreas en el E9 y de la yema ventral 12 horas después (Figura 3A) (23).

Posteriormente, entre los E9 y E11.5, la yema dorsal recibe señales de la aorta dorsal, mientras la yema ventral de la yema hepática, mesodermo de la placa lateral, mesénquima circundante y mesodermo cardíaco. Estas señales, provocan la proliferación masiva de las células en ambas yemas, permitiendo la formación de un epitelio multilaminar que consta de dos dominios. El primer dominio está localizado en la porción externa de las yemas llamada “capucha” y se compone de células con polaridad basal. El segundo dominio, también llamado “cuerpo” se subdivide en dos capas, una capa que se localiza en la parte media de las yemas y se compone de células polarizadas y no polarizadas y, una capa interna que contiene células con polaridad apical. Las



células polarizadas desarrollan una estructura llamada microlumen entre los días ~E10.5 y 11.5 (Figura 3B) (2,19,24).

La transición secundaria se da entre E12.5 y E15.5, y, comienza con la fusión de los microlúmenes y la formación de un plexo luminal central que se remodela hasta formar un ducto en forma de tronco que se expande hacia el mesénquima circundante (Figura 5C). Al mismo tiempo, la parte apical del tronco se ramifica hasta formar una red tubular con un patrón arborescente. A medida que el desarrollo continúa, las puntas de las ramificaciones forman las células exocrinas acinares. Paralelamente, en el E12.5 da comienzo la rotación del duodeno y del estómago, provocando la fusión de las yemas pancreáticas ventral y dorsal para formar un solo órgano (Figura 3D) (2,19).

Asimismo, durante la transición secundaria, en la región del tronco del páncreas embrionario se encuentran células relacionadas con dos estirpes distintas. Un grupo de estas células comienza a expresar el FT neurogenina 3 (Ngn3), el cual, las define como células pre-endocrinas. El grupo de células que no expresa Ngn3, dará lugar al desarrollo de células ductales, expresando factores como Sox9 y Hnf1b. La expresión de Ngn3 juega un papel importante en el futuro de las células endocrinas, ya que frena temporalmente el ciclo celular permitiendo la expresión de otros FTs específicos en la diferenciación de cada uno de los 5 tipos celulares endocrinos (2).

A continuación, entre E12-16.5 las células con determinación endocrina se delaminan del epitelio del tronco, se diferencian, migran dentro del mesénquima y forman protoislotes (Figura 3E). Es importante mencionar que las señales que permiten la agregación de las células endocrinas aún no se conocen por completo. Se ha sugerido que es posible que el mesénquima envíe señales a las primeras células diferenciadas para que estas se agrupen, y estas a su vez, envían señales a las demás células endocrinas, potenciando la migración. Simultáneamente, con la migración e integración entre el E15.5-16.5, se inicia el proceso de conexión con las proyecciones neuronales y el crecimiento de capilares hacia el interior del islote, aunque su inervación continua hasta la etapa posnatal (Figura 3F) (2,19).



La expresión de Ngn3 conduce a la expresión de Arx y Pax4, los cuales se inhiben mutuamente. Debido a esto, el desbalance a favor de alguno induce la diferenciación a células α o β y δ respectivamente. Después, la expresión Pdx1 y MafA, favorece la diferenciación de las células β , ya que promueven la expresión del gen de insulina (*ins*). También Pdx1 y Nkx 2.2 juegan un papel importante al inducir la transcripción de *GK* y *GLUT2* involucrados en GSIS (19) (2). Por otro lado, la expresión de Nkx-6.1 es crucial para el desarrollo, ya que aumenta la actividad proliferativa y permite que las células β mantengan sus características fenotípicas funcionales. La interrupción de Nkx-6.1 en organismos adultos da como resultado la desdiferenciación de células β a δ y la reducción de la MCB durante la edad adulta (2).



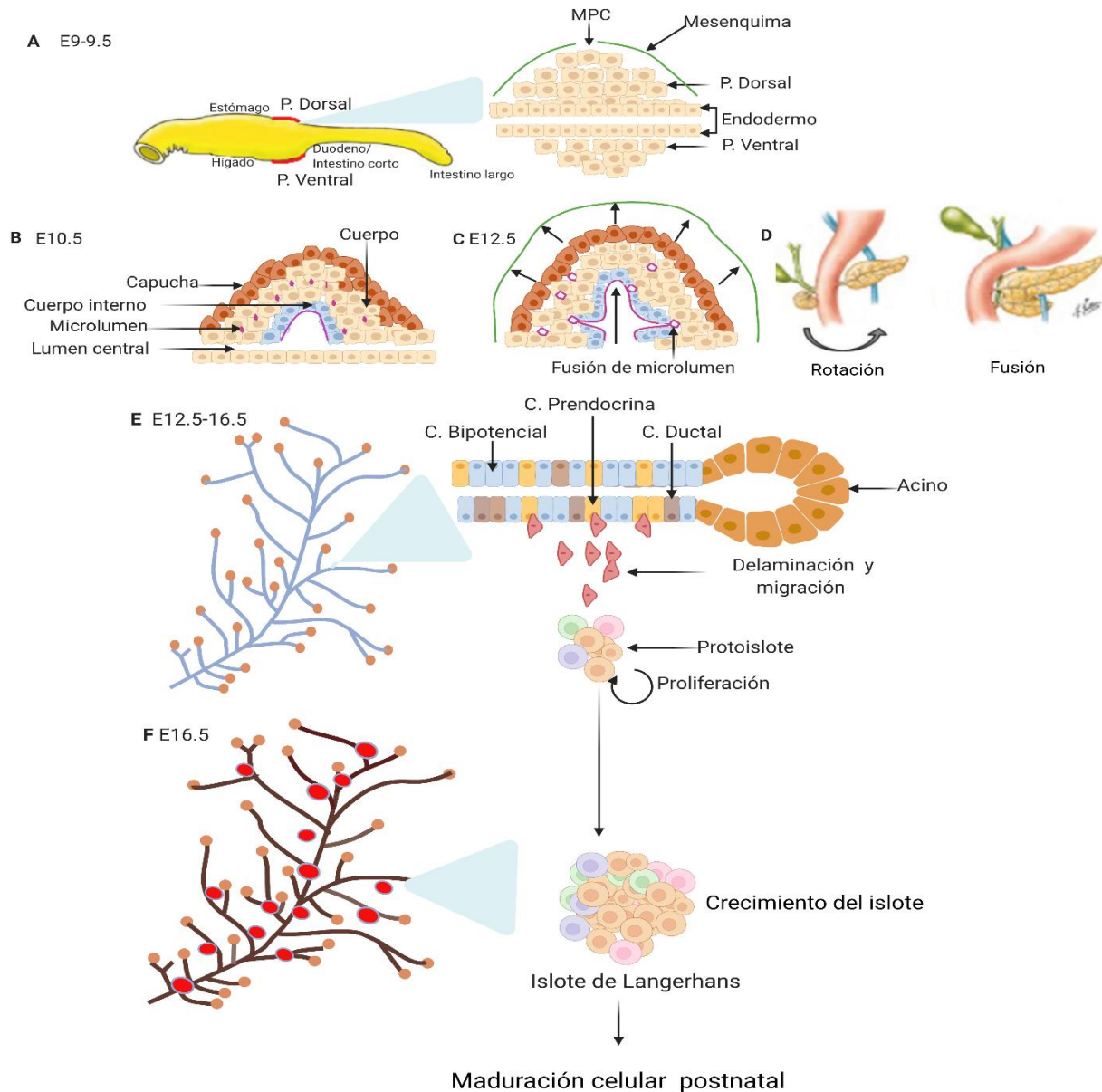


Figura 3. Etapas del desarrollo del páncreas. Transición primaria: A) Evaginación del endodermo para la formación de la yema dorsal y la yema ventral. B) Expansión de las yemas debido a la proliferación de MPC y formación de la yema dorsal. **Transición secundaria:** C) fusión del microlumen y expansión celular hacia el mesénquima. D) Rotación y fusión de la yema ventral con la dorsal. E) Diferenciación de células acinares en la punta de la ramificación y despolarización y de células preendocrinas del tronco para formar el proto islote. F) Desarrollo de los Islotes de Langerhans (puntos rojos). Modificada de Netter images (25).



En roedores, al momento del nacimiento, todas las células β muestran un fenotipo inmaduro, caracterizado por una secreción deficiente de insulina y una alta capacidad proliferativa. Las células β inmaduras siguen un patrón bifásico de maduración durante las primeras semanas posnatales, posiblemente en respuesta a la dieta neonatal compuesta por leche materna alta en lípidos y, posteriormente, en la transición hacia una dieta basada en carbohidratos (26).

La MCB presente en la vida adulta, está determinada por el número total de células β y es importante, ya que de esta depende la capacidad del organismo para responder a la demanda de insulina en diferentes condiciones metabólicas. Se ha observado que la MCB de la vida adulta, se establece durante las dos primeras semanas de vida a través de la proliferación de las células β inmaduras y de la neogénesis de pequeños islotes. Durante estas dos semanas, la capacidad proliferativa disminuye paulatinamente y de manera concomitante, se observa el incremento en la concentración de los FT MafA y Nkx-6.1. Estos FT promueven la expresión de *GLUT2* y *GK*, proteínas necesarias para la internalización y metabolismo de la glucosa, respectivamente (5,26).

La segunda ola de maduración coincide con el inicio de la tercera semana de vida y el destete. En este periodo, las células β inmaduras son pocas y, por lo tanto, el aumento de la MCB es relativamente mínimo. Durante este lapso, la mayoría de las células β adquieren las características moleculares y fenotípicas clásicas de una célula β funcional para la vida adulta (26).

En general, las células β maduras expresan niveles elevados del FT MafA y Pdx1, mayor concentración de proteínas involucradas en GSIS; como *GLUT2* y un aumento en la actividad de la *GK*. Por su parte, los FT MafA y Pdx1, promueven la transcripción del gen de insulina (*ins*). Por último, la *GK* es una hexocinasa con una baja afinidad por la glucosa, de modo que, sólo tiene actividad significativa cuando hay concentraciones elevadas de glucosa, como las presentes durante la etapa postprandial. Se ha propuesto que la presencia de la *GK* en las células β maduras es muy importante, ya que evita que estas secreten insulina en concentraciones basales de glucosa (27).



Todas estas características mencionadas, están estrechamente conectadas entre sí, y le confieren a la célula β la capacidad de secretar cantidades robustas de insulina de acuerdo con las concentraciones de glucosa en circulación (5).

Heterogeneidad de las células β

Estudios recientes han demostrado que, después del proceso de maduración posnatal, una pequeña proporción de células β sigue siendo inmadura. Por lo tanto, la MCB en la edad adulta, está compuesta por subpoblaciones de células β maduras e inmaduras, ambas heterogéneas a nivel molecular y funcional (26). Diversos estudios han mostrado, que, la diferencia entre la proporción de las subpoblaciones de células β maduras e inmaduras varía dentro del mismo islote y entre islotes. Además, se ha propuesto que estas subpoblaciones podrían surgir durante el desarrollo, por un lado, debido a la participación de diferentes estructuras embrionarias que dan origen a este órgano (yemas pancreáticas ventral y dorsal) y por el otro, a las diferentes señales que reciben las células β dentro del islote durante su formación y maduración (2,4,28).

La primera evidencia de heterogeneidad fue encontrada en el tamaño del núcleo celular, el cual dependía de la localización de la célula β dentro del islote (29). De manera similar, se han identificado variaciones en la secreción de insulina, respecto a su localización (30). Por su parte, Bonner et al. (31) proponen que en los islotes de rata, la mayoría de las células β se encuentran cercanas a los vasos capilares. Subsecuentemente, a través de la reconstrucción en 3D de imágenes en cortes histológicos del páncreas, Geron et al. (3) observaron, que las células β tienen polaridad y que estas, se encuentran organizadas en forma de roseta alrededor de los vasos capilares, con los transportadores GLUT2 localizados hacia las caras adyacentes a otras células β y con gránulos de insulina almacenados en sitios cercanos al polo apical que está en contacto directo con el capilar. Por su parte, Bader et al. (5), encontraron que la activación de la vía Wnt/ PCP en la célula β , está relacionada con la adquisición de características relacionadas con la madurez. También, durante este trabajo se mostró que la adquisición de la polaridad está acompañada de la expresión de la expresión del gen *Flattop (FLTP)*, por lo tanto, este se ha utilizado como un marcador que distingue a la subpoblación de células β maduras de las inmaduras.



El análisis molecular y funcional de las células β maduras (FLTP +) e inmaduras (FLTP-), ha permitido conocer las características de cada subpoblación, así como su posible función en el contexto metabólico (5). Por un lado, la población de células β maduras (FLTP+) y su posterior maduración (FLTP+), constituye entre el 60 y 80% del total de células β de cada islote. Dentro de sus características moleculares y funcionales, estas células exhiben niveles elevados de la proteína p27, un inhibidor de ciclo celular que se relaciona con la baja capacidad proliferativa de este grupo celular. Por otro lado, muestran incremento de genes relacionados con la producción de insulina como *MafA*, *GLUT2*, *GK* y *ATP5F1B*. Este último, codifica para una subunidad de la ATP sintasa mitocondrial que cataliza la síntesis de ATP, molécula necesaria para el iniciar el evento de la despolarización de la membrana celular. La presencia de estos genes concuerda con su gran capacidad de la célula β para secretar insulina en respuesta a estímulos de glucosa (5). Por otro lado, la población de células β inmaduras (FLTP-), se caracterizan por tener un incremento en la expresión de genes relacionados con la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Lo anterior, concuerda con su mayor capacidad para proliferar. De manera opuesta a las células β maduras, la expresión de los genes *MafA*, *GLUT2*, *GK* y *ATP5F1B*, se encuentran disminuidos. Esto último, se relaciona con su menor capacidad para secretar insulina al ser estimulada por glucosa (5).

Pocos estudios han mostrado la dinámica de las subpoblaciones en diferentes escenarios metabólicos. En ratones, la administración de una HFD condujo al aumento compensatorio en el tamaño de los islotes por la proliferación de células β inmaduras (FLTP -). Por otro lado, se ha observado que durante la administración de HFD, las células β maduras (FLTP +), incrementan su tamaño por hipertrofia (5). Sin embargo, la hipertrofia en células β , se asocia con mayor sensibilidad al estrés citotóxico y la apoptosis (12).

Aún no se sabe con certeza el papel de las diferentes subpoblaciones en el contexto metabólico, pero se ha sugerido que la proporción adecuada entre células β maduras e inmaduras, otorga flexibilidad en la plasticidad y el recambio de dichas células ante diferentes escenarios de estrés metabólico. De forma que durante la obesidad, la población de células β maduras responde a la demanda de insulina y la población de



células β inmaduras podría funcionar como un reservorio potencial de las células β proliferativas, que, por un lado, intervienen en el aumento compensatorio de la MCB y por el otro lado, sustituyen a las células β maduras que muestran daño irreversible por la obesidad o la DM2 (4,32).

Islote pancreático de roedor

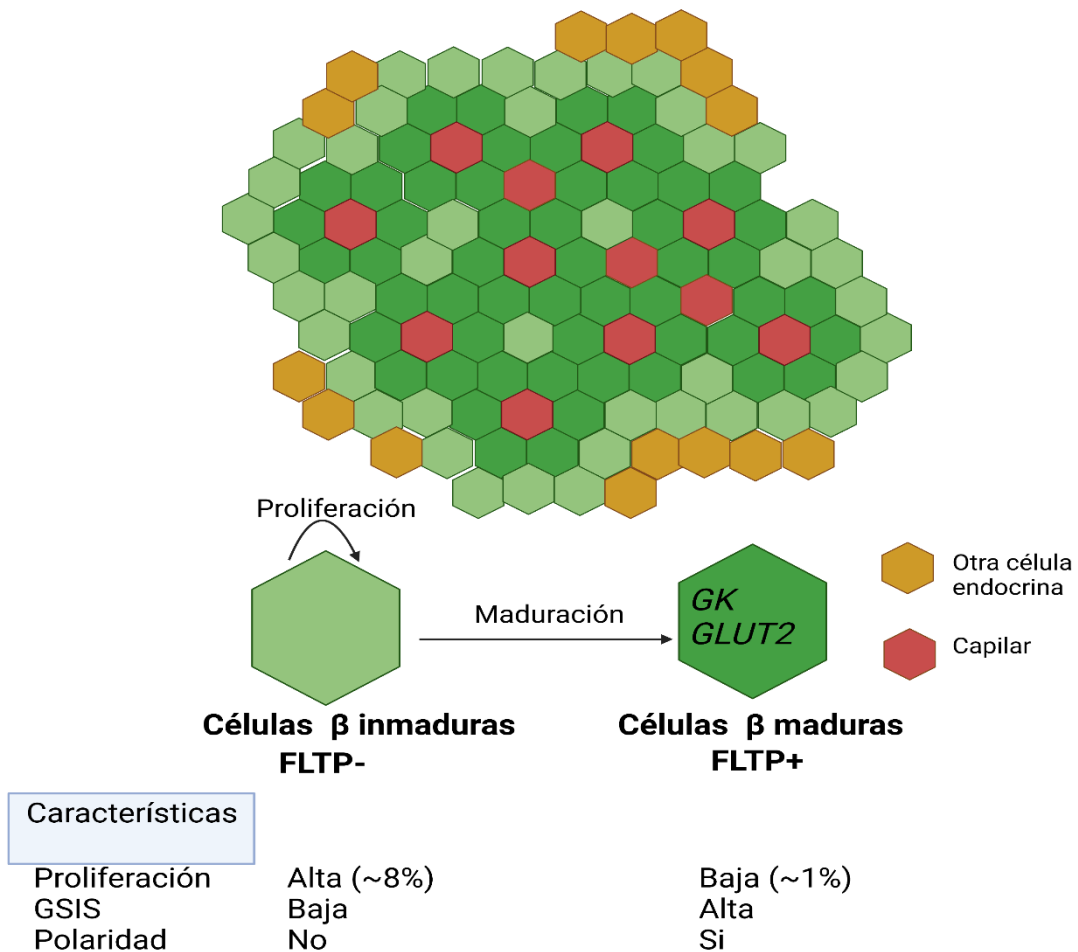


Figura 4. Heterogeneidad de las células β . Subpoblaciones madura (FLTP+) e inmadura (FLTP-) de las células β , características y posible localización dentro del islote de roedor.



Epidemia de la obesidad

La obesidad y sobrepeso se caracterizan por la acumulación anormal de grasa corporal provocada principalmente por el consumo en exceso de alimentos con alto contenido calórico aunado a un bajo gasto energético corporal. La obesidad es considerada como factor de riesgo para la aparición del SM, DM2, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. En México, alrededor del 42% de la población adulta padece sobrepeso y el 30% obesidad. Por lo anterior, ha sido declarada una emergencia sanitaria nacional por el alto costo que este conlleva al sistema de salud (6).

El diagnóstico de sobrepeso y obesidad, además de su clasificación, se establece mediante el índice de masa corporal (IMC), un indicador simple y comúnmente utilizado con base en la relación entre el peso y la talla. Éste, se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos entre el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). Se considera que una persona tiene sobrepeso cuando el IMC ≥ 25 y obesidad cuando el IMC ≥ 30 (Tabla I) (7).

Tabla I. Clasificación del sobrepeso y la obesidad a través del IMC propuesta por la OMS.
Obtenida de la OMS (7).

Clasificación del IMC	
Insuficiencia ponderal	< 18.5
Intervalo normal	18.5 - 24.9
Sobrepeso	≥ 25.0
Preobesidad	25.0 - 29.9
Obesidad	≥ 30.0
Obesidad de clase I	30.0 - 34.9
Obesidad de clase II	35.0 - 39.9
Obesidad de clase III	≥ 40.0

Tejido adiposo durante la obesidad

En individuos sanos, el tejido adiposo representa entre 20% y 28% de la masa corporal mientras que constituye hasta el 80% de la masa corporal en individuos con obesidad mórbida u obesidad de clase III (IMC = 40 ó más). Existen 3 tipos de tejido adiposo según



su localización, función, coloración, vascularización y estructura: blanco, pardo y beige. Particularmente, el WAT localizado en la zona intratorácica, subcutánea y visceral, está constituido por células endoteliales, macrófagos, preadipocitos y mayormente adipocitos con una sola vacuola lipídica (1,8).

El WAT es un importante órgano endocrino involucrado en la regulación del metabolismo energético, en el cual, los adipocitos cumplen diferentes funciones. Por un lado, liberan adipocinas como adiponectina y leptina que participan en la homeostasis metabólica, y, por otro lado, es un importante reservorio energético en la forma de TAG sintetizados a partir AGL y glucosa (1,8).

El metabolismo del tejido adiposo está regulado por la insulina, entre otras hormonas, citocinas y factores de crecimiento. La insulina regula la lipogénesis al aumentar la síntesis y translocación de la enzima lipoproteína lipasa hacia la membrana de las células del endotelio capilar. Dicha enzima hidroliza los lípidos de las lipoproteínas a ácidos grasos, que son reesterificados en el interior del adipocito en donde forman una vacuola lipídica (9,33). Además, la insulina tiene efecto antilipolítico ya que inhibe la actividad de la lipasa sensible a hormonas (LSH) dentro del adipocito, lo que evita la hidrólisis de triglicéridos contenidos en la vacuola lipídica. Por otro lado, durante periodos de privación de energía, como el ayuno, los niveles de insulina disminuyen, lo cual permite la activación de la LSH. Esto produce la secreción de diversas moléculas derivadas de los TAG, que son utilizados como sustratos energéticos (33).

Se ha establecido que, durante la obesidad, el aumento del WAT se produce mediante dos mecanismos. El primero, mediante el incremento en el número de adipocitos (hiperplasia) y el segundo por el aumento en el tamaño de los adipocitos (hipertrofia). Se ha descrito que el aumento del tejido adiposo subcutáneo (TASC) que se observa durante la obesidad, se debe a hiperplasia. En contraste, el aumento observado en la cantidad de TAV se produce por hipertrofia (8,9).



Diversos trabajos han descrito que, durante la obesidad, los adipocitos hiperplásicos del TASC mantienen una función normal, mientras que los adipocitos hipertróficos del TAV tienen mayor tasa de lipólisis, es decir liberan grandes concentraciones de AGL, glicerol y adipocinas. Paradójicamente, tanto en humanos como roedores, se ha encontrado que a pesar de que la tasa de lipólisis basal se ve aumentada, al mismo tiempo se observa una elevada tasa de lipogénesis por parte del WAT. Esto se debe en parte, al diferente grado de sensibilidad hormonal de los diferentes depósitos grasos que lo componen y, por otra parte, a la resistencia a la insulina que se puede presentar durante la obesidad. Por consiguiente, el efecto antilipolítico de la insulina es más prominente en los adipocitos subcutáneos hiperplásicos en comparación con adipocitos viscerales hipertróficos (9,34).

Asimismo, durante la obesidad, el aumento de AGL promueve la síntesis y liberación hepática de VLDL (que contienen principalmente colesterol y TAG), lo cual eleva sus concentraciones en sangre aumentando potencialmente el riesgo de sufrir hipertensión, cardiopatías e infartos. Además, se ha demostrado que las concentraciones elevadas de lípidos en plasma favorecen su acumulación ectópica en otros órganos, lo que genera lipotoxicidad y altera su funcionamiento. Adicionalmente, existen trabajos en los que se ha probado que el glicerol derivado del metabolismo de TAG puede ser utilizado como sustrato para la gluconeogénesis, lo que puede conllevar a un aumento de la glucemia en ayuno y glucotoxicidad en diversos órganos. Por lo tanto, se puede definir a la glucolipotoxicidad (glucotoxicidad y lipotoxicidad), como a las alteraciones estructurales y funcionales de los órganos a causa de las concentraciones elevadas de lípidos y glucosa durante largos periodos de tiempo (1,8,10,11).

Por otro lado, entre las adipocinas liberadas algunas son proinflamatorias como el TNF α , la resistina, IL-6, entre otras. Estas generan un estado de inflamación crónica general en el organismo, que contribuye a potenciar el daño de los órganos periféricos (1,9).

Es aceptado que durante la obesidad, se desarrolla intolerancia a la glucosa, la cual, se caracteriza por la baja movilización/internalización de la glucosa en los órganos. Se ha propuesto que la intolerancia a la glucosa es consecuencia de la resistencia a la insulina



y/o alteraciones en la secreción de insulina por parte de la célula β (35). Siguiendo esta línea, trabajos en roedores han demostrado que la resistencia a la insulina puede ser consecuencia del exceso de metabolitos, producto de la lipólisis. Estas moléculas pueden interaccionar con proteínas reguladoras de la vía de señalización de la insulina y como resultado pueden disminuir la síntesis y translocación de proteínas encargadas de la internalización de la glucosa, como GLUT4 (36,37).

La masa de células β durante la obesidad y DM2

En individuos sanos, una MCB adecuada se correlaciona con concentraciones normales de insulina y con niveles normales de glucosa en plasma. Adicionalmente, se ha demostrado la enorme plasticidad de las células β para adaptarse a diferentes entornos metabólicos durante el transcurso de su vida (38,39). En humanos y roedores con obesidad, la MCB aumenta en respuesta a concentraciones plasmáticas de glucosa elevadas. Esto a través de una variedad de medios, como hipertrofia, proliferación, disminución de la apoptosis y neogénesis, lo cual, conduce a una mayor capacidad de secreción. Por otro lado, se ha mostrado, que durante la obesidad los altos niveles de glucosa provocan la sobreestimulación crónica de las células β , de forma que éstas secretan cantidades mayores y constantes de insulina. En conjunto, el aumento de la MCB y la sobreestimulación de la célula β , provocan el aumento de las concentraciones de insulina en plasma, trastorno conocido como hiperinsulinemia (38,40).

Paralelamente, durante la obesidad existe una serie de factores estresantes para la célula β , que incluyen la glucolipototoxicidad y la inflamación. Por otro lado, derivado de la hiperinsulinemia se da un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por el aumento del metabolismo mitocondrial y del retículo endoplasmático. Como consecuencia, la célula β pierde progresivamente la capacidad para secretar insulina, de modo que se observa un incremento de la glucosa basal mayor a 126 mg/dL, desencadenando la enfermedad conocida como DM2 (41).

Durante el transcurso de la DM2, los factores estresantes inducen el aumento de la tasa de apoptosis en la célula β por lo que la tasa de proliferación se ve superada y, por lo



tanto, la MCB disminuye. En humanos con DM2, las bajas concentraciones de insulina en plasma están relacionadas con la reducción en la MCB de hasta el 60% (38,39).

Papel de la obesidad materna sobre la descendencia

En la actualidad, el 76.8% de las mujeres en edad reproductiva tiene obesidad y sobrepeso (6). Múltiples evidencias epidemiológicas han mostrado que la descendencia de madres obesas puede heredar el fenotipo de la madre aún sin que sus descendientes hayan sido expuestos a un entorno nutricional obesogénico (13). Esto compromete la calidad de vida del individuo y genera gran preocupación para el sector salud debido al posible aumento de enfermedades metabólicas en futuras generaciones (6,42)

Múltiples estudios han observado que las alteraciones en el fenotipo de los padres (F0) con obesidad, pueden transmitirse a la descendencia (F1). Este fenómeno es conocido como herencia intergeneracional. Sin embargo, si los cambios se perpetúan después de la generación F2 o más, es denominado como herencia transgeneracional. Se ha propuesto que este último, se transmite con más frecuencia a través de la línea germinal (13).

La incorporación de modelos de obesidad materna inducida en roedores a través de HFD, ha contribuido enormemente al entendimiento de la herencia intergeneracional materna sobre la progenie (43). Múltiples trabajos han demostrado que las madres alimentadas con HFD muestran mayor peso, acumulación de grasa corporal, glucosa de ayuno elevada, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y lípidos elevados en sangre, lo que indica la efectividad de la dieta para inducir obesidad y alteraciones metabólicas (44). De manera similar, en diversos trabajos se ha observado que la descendencia de madres obesas se caracteriza por tener mayor peso corporal, glucosa elevada en ayuno, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, entre otras alteraciones metabólicas (14,15,17,18). Además, algunos trabajos han observado que en la descendencia de madres obesas se presenta un aumento en la proliferación de las células β y alteraciones en la secreción de insulina estimulada por



glucosa (14,16,17). Finalmente, algunos estudios han demostrado que dichas alteraciones persisten hasta la segunda generación (45,46).

Los mecanismos que subyacen el efecto de la obesidad materna sobre la descendencia son poco claros. Se ha propuesto que el aumento de la insulina y de nutrientes como los ácidos grasos, glucosa, así como adipocinas inflamatorias provenientes de la madre pueden afectar el desarrollo de células y órganos. Además, se ha sugerido, que estas moléculas pueden modificar la expresión de proteínas involucradas en el desarrollo y, por lo tanto, alterar su función durante la vida adulta (Figura 5) (13,47).

A pesar de la evidencia, ningún estudio se ha enfocado en los efectos de la obesidad materna sobre las subpoblaciones de células β maduras e inmaduras o en el papel que juegan dichas subpoblaciones en la predisposición de la descendencia para desarrollar obesidad u otro tipo de alteración metabólica como la DM2.



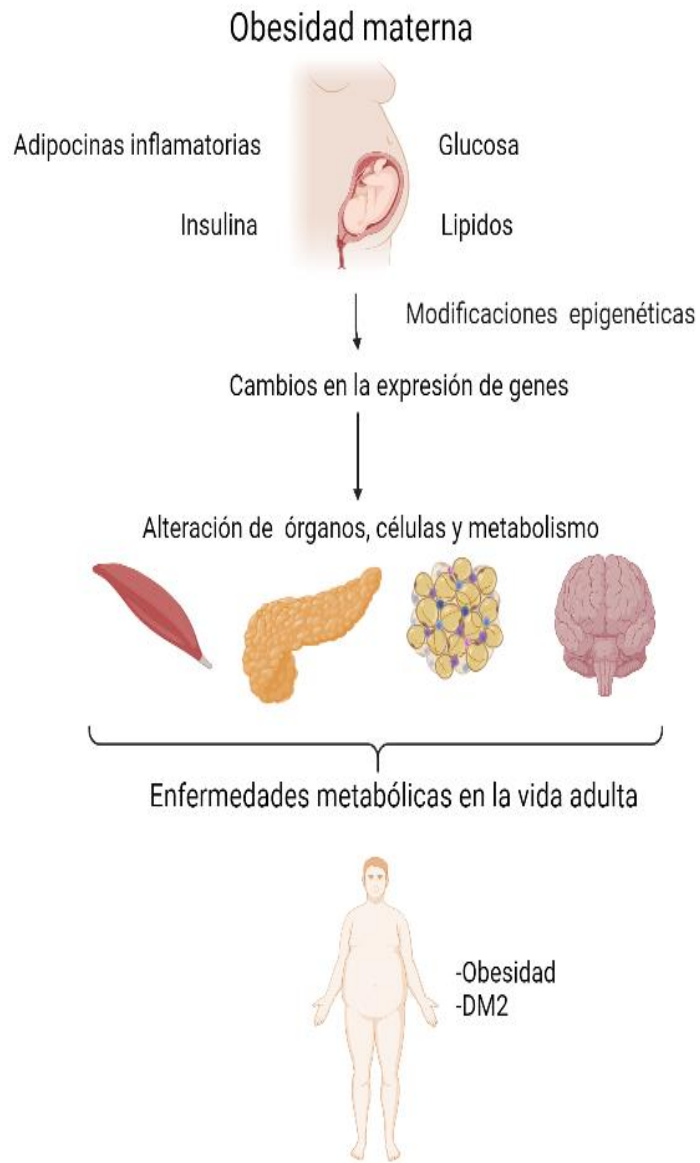


Figura 5. Mecanismos mediadores de los efectos de la obesidad materna sobre la descendencia.



III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evidencia sugiere que la proporción de las subpoblaciones de células β otorga flexibilidad en la plasticidad y en el recambio de dichas células ante diferentes escenarios de estrés metabólico como la obesidad. También se ha propuesto que las proporciones de las subpoblaciones se determinan durante el desarrollo embrionario, debido a la participación de diferentes estructuras embrionarias que dan origen a este órgano y, a las diferentes señales que reciben las células precursoras de células β dentro del islote durante su diferenciación y maduración. Aunado a lo anterior, se ha observado que la obesidad materna aumenta el riesgo en la descendencia para padecer obesidad y DM2. Parte de la susceptibilidad para padecer obesidad y DM2, se ha relacionado con alteraciones en las células β de la descendencia. Sin embargo, ningún estudio se ha enfocado en mostrar los cambios en la proporción de las subpoblaciones de células β maduras/inmaduras dentro del islote. El estudio de estos cambios podría proporcionar información relevante acerca del papel de la obesidad materna como factor de riesgo asociado al aumento de la susceptibilidad para desarrollar obesidad y DM2 en los hijos y, por otro lado, permitiría ampliar el conocimiento sobre el funcionamiento y relevancia que tiene la heterogeneidad de las células β en el organismo. Por consiguiente, se establece la siguiente pregunta:

¿Cuáles son los efectos de la obesidad materna inducida por una dieta alta en grasas sobre la proporción de las subpoblaciones de células β maduras e inmaduras de la descendencia y cuál es su papel funcional en la susceptibilidad para padecer obesidad y DM2?

IV. HIPÓTESIS

La obesidad materna inducida por dieta alta en grasas provocará disminución en la proporción de células β maduras y aumento en la proporción de células β inmaduras de la descendencia, así como alteraciones en su perfil metabólico.



V. OBJETIVO GENERAL

Describir los cambios en la proporción de las subpoblaciones de células β maduras/inmaduras, su papel funcional y su relación con la susceptibilidad de desarrollar obesidad u otra alteración metabólica en un modelo de obesidad intergeneracional.

Objetivos particulares

- Establecer un modelo intergeneracional de obesidad materna en rata inducida por una dieta alta grasa
- Caracterizar el perfil metabólico de las madres después del consumo de dieta alta en grasas y sus efectos sobre el perfil metabólico de la descendencia
- Analizar los cambios en los niveles de insulina en plasma y determinar su relación con la proporción de subpoblaciones de células β en madres obesas y su descendencia
- Cuantificar la proporción de las subpoblaciones de células β dentro del islote en madres y su descendencia



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Durante el desarrollo de los experimentos se siguió lo establecido por la Norma Oficial Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio). Como animal de experimentación, se utilizó la rata albina Wistar, los ejemplares fueron alojados en el vivarium del Departamento de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina, UNAM. Se alojaron dos ratas por caja, bajo ciclos de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad, con acceso al agua y comida HFD o alimento estándar *ad libitum*, según sea el caso.

Se utilizó alimento estándar comercial en forma de croqueta (Rodent Lab Diet 5001, chow) con un aporte calórico de 4.1 kcal/g. Del total de kcal/g de la dieta estándar, el 13% de kcal/g fue aportado por grasas, 29% por proteínas y 58% por carbohidratos. Por su parte, el alimento HFD con un aporte calórico de 5.8 kcal/g fue preparado en el laboratorio. Del total de kcal/g de la HFD, el 60% de las kcal/g fueron aportadas por grasa (proporción 1:1 de grasas animales proveniente de manteca de cerdo y grasas vegetales provenientes de aceite de olivo), 20% por proteína (albúmina) y 20% de carbohidratos provenientes del alimento estándar (Tabla II y II).

Tabla II. Aporte nutrimental en Kcal de cada dieta y % de aporte calórico por nutrimento

Tipo de dieta	Dieta control (Rodent Lab Diet 5001)*	Dieta alta en grasa (HFD 60%)
Contenido energético total	4.1 Kcal/g	5.82 Kcal/g
Nutrimento	% de aporte calórico respecto al total de Kcal/g por nutrimento	
Carbohidratos	58%	20%
Proteínas	29%	20%
Grasas	13%	60%

*Croqueta



Tabla III. Composición de la dieta alta en grasa elaborada en el laboratorio

	Nutrimento	Producto	100 g
HFD 60%	Carbohidratos	Croqueta*	49.5 g
	Proteínas	Albumina de huevo	15 g
	Grasas	Manteca de cerdo**	17.75 g
		Aceite de oliva***	19.48 g

*De los 49.5 g que son de croqueta, 28.7 g son de carbohidratos, 14.1 g de proteínas y 6.6 g de grasas. ** Grasa saturada. ***Grasa insaturada.

En el estudio se dio seguimiento a la generación de madres (F0) y su descendencia (F1) compuesta por machos (Figura 6). La generación F0 estuvo conformada de ratas hembra que a partir de la tercera semana posnatal (SPN), fueron ablactadas y alimentadas durante dos semanas con alimento estándar para su aclimatación. A la SPN 5, se dividieron aleatoriamente en dos grupos; F0 obesas (OBS) alimentada con HFD ($n=12$) y el grupo F0 control (CTRL) alimentado con dieta estándar ($n=8$). A continuación, desde la SPN 5 hasta la SPN 23 (18 semanas) solo se les alimentó con su respectiva dieta asignada.

Para la obtención de la generación F1, a la SPN 23, una cohorte de hembras de ambos grupos se apareó con machos F0* no consanguíneos, de la misma edad y alimentados con dieta estándar. Durante el apareamiento, el grupo F0 OBS fue alimentado con dieta estándar. En la gestación, la dieta HFD se reanudó durante la segunda y tercera semana de gestación. A partir del parto, las ratas de ambos grupos fueron alimentadas con dieta estándar.

Al nacimiento, se midió la distancia anogenital para determinar el sexo y se redujo la camada a 6 crías por madre (3 hembras y 3 machos, cuando fue posible) para asegurar el acceso homogéneo a lactancia materna. A partir de la SPN 3, la descendencia se destetó y alimentó con dieta estándar hasta la SPN 18. Las ratas de sexo masculino, descendientes de F0 OBS y F0 CTRL, se denominaron F1 obesas (OBS) ($n=8$) y F1 control (CTRL) ($n=9$) respectivamente.



Para la caracterización del fenotipo obeso materno (F0), se dio seguimiento una vez por semana al peso a partir de la SPN 3 hasta su eutanasia. En la SPN 22, se realizaron la medición de *glucosa en ayuno*, *prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT, por sus siglas en inglés)*, *concentración de insulina en sangre* y *prueba de sensibilidad a la insulina (ITT, por sus siglas en inglés)*. Al finalizar la SPN 23, la cohorte de ratas F0 que no fue apareada, se sometió a eutanasia para la obtención de plasma, extracción del TASC, TAV y páncreas. Durante la gestación, no se realizó ninguna medición para evitar estresar a las madres. La caracterización del fenotipo obeso se realizó para la generación F1, con la diferencia de que estas fueron sometidas a eutanasia a la SPN 18 para la obtención de muestras.

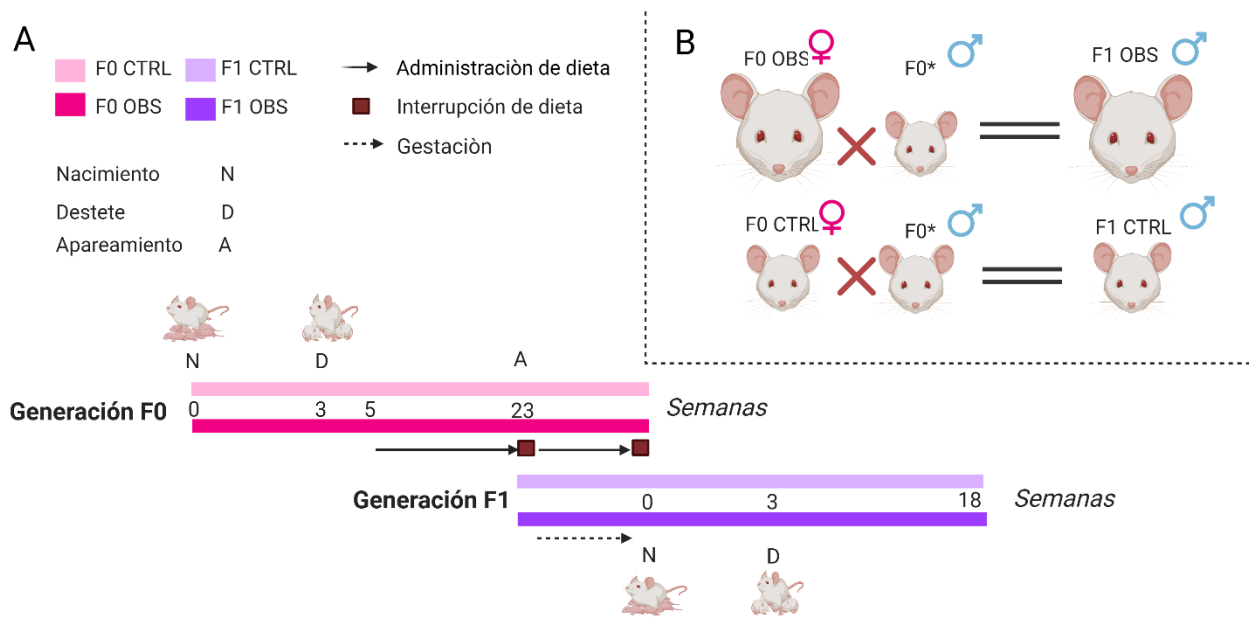


Figura 6. Diseño experimental. A) Línea de tiempo de hembras F0 y de machos F1, se muestran los momentos de consumo de dieta y apareamiento de las madres. B) Cruza de hembras F0 para la obtención de la generación F1 compuesta por machos.



Procedimientos

Cinética de peso corporal: Una vez por semana hasta la disección, los animales se pesaron con una balanza electrónica (10^{-2}). Los datos se expresaron en g de peso.

Glucosa en ayuno e IPGTT: Para la realización de la prueba, se utilizaron ratas de los grupos F0 de SPN 22 y F1 de SPN 18. Previo a la prueba, los animales se sometieron a ayuno por 12 horas. Después, por medio de punción en la vena dorsal de la cola se obtuvo sangre y se midió la concentración de glucosa (mg/dL) con un glucómetro (Accu-Chek). A continuación, se inyectó vía intraperitoneal solución líquida de glucosa (40%) con una dosis de 2 g/Kg por peso del animal. Posterior a la inyección, se midieron las concentraciones de glucosa a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. La medición previa a la administración de glucosa fue considerada como la de glucosa en ayuno. Los datos de la curva se normalizaron respecto a la glucosa en ayuno, considerando esta como el 100%. A continuación, se realizó la curva de tolerancia a la glucosa con datos normalizados (%) y se estimó su área bajo la curva (AUC, area under the curve) cuyos valores se expresaron en unidades arbitrarias.

ITT: En diferente día a la IPGTT, los animales fueron sometidos a ayuno por 12 horas. Después, se midió la glucosa en sangre (mg/dL) y se inyectó una dosis de 0.2 UI/Kg de insulina (Humulin, insulina humana recombinante de acción rápida, ELI LILLY). De igual manera, se realizaron mediciones de la concentración de glucosa en los mismos tiempos que para la IPGTT. Para el análisis, los datos fueron normalizados (%) y se estimó su AUC, cuyos valores se expresaron en unidades arbitrarias.

Disección: Los grupos F0 y F1 se anestesiaron vía intraperitoneal con 40 mg/Kg de pentobarbital sódico (adquirido en México). Después, se realizó un corte longitudinal desde la altura de la pelvis hasta la altura del esternón, esto con el fin de realizar los siguientes procedimientos:

Obtención y cuantificación de insulina en plasma: Por medio de punción en la vena cava, se recolectaron 3 mL de sangre en microtubos con anticoagulante EDTA (ácido



etilendiaminotetraacético) a 4 °C. A continuación, se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos para obtener el plasma el cual, fue almacenado a -70 °C hasta su uso.

Para la cuantificación de insulina en plasma se usó la técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) mediante el kit de ELISA para insulina de Rata (Mercodia, EUA). En la placa para 96 pozos recubiertos con anti-insulina monoclonal de rata, se agregaron 25 µL de calibradores con concentraciones conocidas de insulina recombinante de rata, por duplicado; calibrador 1 (0.019 µg/L), calibrador 2 (0.048 µg/L), calibrador 3 (0.152 µg/L), calibrador 4 (0.402 µg/L) y calibrador 5 (0.963 µg/L), y 25 µL de plasma de cada animal.

A continuación, se agregaron 100 µL de solución de conjugado enzimático 1X (Anti-insulina monoclonal de ratón conjugada con peroxidasa) a cada pozo. Posteriormente, se incubó la placa durante 2 horas, a temperatura ambiente y en un agitador orbital. A continuación, se realizaron 5 lavados más con 350 µL de solución de lavado 1X y se retiró el exceso invirtiendo la placa sobre papel absorbente. Luego, se agregaron 200 µL de sustrato TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina) por pozo, y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, se agregaron 50 µL de solución de paro (0.5 M H₂SO₄) y se colocó la placa en un agitador para placas por 5 minutos. Inmediatamente, se leyó la placa a 450 nm dentro de un lector de placas (Biotek, EUA). Con la absorbancia obtenida de los calibradores, se obtuvo la ecuación de la curva a través de "ajuste polinomial" en Origin (Pro) (Versión 2019b. OriginLab Corporation, EUA). Por último, se interpolaron las absorbancias de las muestras con los datos obtenidos de la curva, para obtener la concentración de insulina de cada animal.

Fijación de tejidos mediante perfusión de solución de paraformaldehído: Posterior a la incisión, se introdujo un catéter (previamente conectado a una bomba peristáltica) en el ventrículo izquierdo. Después, se realizó una incisión en el ventrículo derecho y al mismo tiempo se perfundieron 250 mL de una solución de cloruro de sodio al 0.9%. Posteriormente, se perfundieron con 250 mL de solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS y se disecaron los siguientes tejidos.



Obtención de TASC y TAV: Se disecó el tejido adiposo visceral distribuido en los depósitos abdominal, gonadal, intraperitoneal y peripancreático, así como el tejido adiposo subcutáneo del dorso del animal. Todos los depósitos grasos se pesaron individualmente sobre una balanza electrónica. Se obtuvo el porcentaje de TASC y TAV, respecto al peso total del animal.

Obtención y procesamiento del páncreas: Para la obtención del páncreas, se realizaron cortes al límite del tejido en donde este se adhiere al duodeno y conducto biliar. Una vez extraído, se pesó sobre una balanza electrónica. Las muestras se guardaron en frascos con PFA al 4% a 4 °C, durante 24 horas. A continuación, los tejidos se colocaron en cassettes para inclusión, se les retiró el exceso de PFA con agua corriente y se deshidrataron con incubaciones seriadas de etanol (del 50 al 100%) y xileno (como agente clarificante). Por último, se incubaron en parafina histológica líquida durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después, se obtuvieron 3 secciones seriadas de cada muestra, asimismo, las 3 secciones pertenecientes a cada muestra se incluyeron en bloques de parafina histológica líquida en centro de inclusión (Tissue-Tek II).

Con un microtomo (Reichert-Jung 1130/Biocut), se obtuvieron dos cortes de cada páncreas con 5 µm de grosor cada uno. Cada corte se colocó en baño maría a 45 °C y se montó en dos tipos de laminillas. El primer corte se montó en una laminilla sin ningún tratamiento especial, este se utilizó para la tinción de hematoxilina y eosina. Y el segundo corte, se montó sobre laminillas impregnadas con grenetina (0.2 g de $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, 2 g de grenetina, en 400 mL de agua destilada) y horneadas a 30 °C. Estas últimas, se utilizaron para evitar el desprendimiento del tejido durante la técnica de inmunofluorescencia.

Tinción con hematoxilina/ eosina y obtención de la masa de los islotes: Los cortes, se desparafinaron en un horno de secado durante 10 minutos a 60°C y se hidrataron mediante incubaciones con xileno (como agente clarificante) y etanol (del 100 al 50%) respectivamente. Para la tinción de los núcleos, las laminillas se incubaron con hematoxilina de Gill durante 5 minutos, se lavaron con agua corriente, y posteriormente se agregó solución de carbonato de litio (1%) durante 30 segundos. Después, se realizó la tinción de citoplasma incubando las laminillas con eosina A (amarillenta) durante 1



minuto. A continuación, se deshidrató el tejido mediante incubaciones de etanol (del 96 al 100%) y se hizo una incubación con xileno. Para finalizar, se montaron las laminillas en medio de resina sintética.

A través de un microscopio óptico, se tomaron fotografías con un objetivo a 5x de todo el tejido. Se eligieron 8 fotografías al azar de cortes histológicos a 3 niveles del órgano (tuviesen islotes o no). A continuación, se cuantificó la masa de los islotes utilizando la técnica estereológica “point counting” (48). Para ello, a cada foto seleccionada se le superpuso un sistema de 400 puntos mediante el programa STEPanalyzer (software stereology, EUA) y se contabilizaron los puntos que coincidieron con algún islote (pp). Se aplicó la siguiente fórmula pp/PT para estimar la relación que ocupan los pp respecto al total de puntos (PT) que se superpusieron en el tejido pancreático. Los PT se obtuvieron multiplicando 400 puntos por 24 (número de fotografías). Por último, para obtener la masa del islote (g) se multiplicó la relación obtenida de los pp/PT por la masa (g) del páncreas del animal correspondiente. Se finalizó con la obtención del porcentaje de la masa de los islotes respecto a la masa del páncreas de cada animal.

Doble inmunofluorescencia para detección de FLTP e insulina: Las laminillas se desparafinaron en una parrilla de laboratorio a 60 °C y se rehidrataron mediante incubaciones con xileno y diluciones seriadas de etanol (100-50%). Después, se realizó la recuperación de antígenos incubando las laminillas en buffer de citrato (10 mM de citrato de sodio y 0.05% de Tween 20, a pH 6 en agua desionizada), en una olla de presión para patología médica durante 15 min a 90°C. Posteriormente, se lavaron en solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS, Phosphate Buffered Saline) 1X y se procedió a la permeabilización de la membrana, por lo que se agregaron 100 μ L PBS-T (0.05% de tritón, en PBS 1X) durante 10 minutos. Enseguida, se agregaron 100 μ L de solución de bloqueo (0.5% de tritón, 2% de albúmina de suero bovino, 2% de suero de cabra y 9% de glicina, en PBS 1X) y se dejó incubando durante una hora, a temperatura ambiente y dentro de una cámara húmeda.

Transcurrido el tiempo, se retiró la solución de bloqueo y se procedió a incubar las laminillas con 100 μ L de solución con anticuerpo anti-FLTP de conejo conjugado con



Alexa-555 (Biossusa, USA) y anti-insulina de ratón (Santa Cruz Biotechnology, EUA) (dilución 1:50 de anti-FLTP y 1:2000 de anti-insulina, 0.5% tritón, 2% albúmina de suero bovino, 10 % de suero de cabra 10, en PBS 1X). Las laminillas se incubaron durante 12 horas a temperatura ambiente, cubiertas de la luz y dentro de la cámara húmeda. Concluido el tiempo, se realizó una serie de 3 lavados con PBS-T y se les agregaron 100 μ L de anticuerpo secundario Alexa-647 de cabra contra ratón (Jackson Immunoresearch Laboratories, EUA) (dilución 1:400, 0.5% tritón, 2% albúmina de suero bovino, suero de cabra 2%, en PBS 1X). Las laminillas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y cubiertas de la luz dentro de una cámara húmeda. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-T y se hizo la contratinción de núcleos agregando 100 μ L de solución con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (1 μ g/mL, en PBS) a cada laminilla. Finalmente, se realizó un último lavado con PBS 1X y se montaron las laminillas con medio de montaje Mowiol para inmunofluorescencia. Las laminillas fueron fotografiadas con un microscopio confocal (LSM 880, Zeiss); se tomaron microfotografías de al menos 15 islotes de tres diferentes porciones del páncreas de cada animal.

Procesamiento y análisis de imagen para estimar la proporción de células β maduras e inmaduras

El análisis de las fotografías se realizó mediante el software para procesamiento de imágenes FIJI (Wisconsin, EUA). Primeramente, se establecieron macros para el análisis de cada inmunotinción, los cuales, convertían la imagen a 8 bits y ajustaban las imágenes bajo las mismas condiciones de contraste y brillo para eliminar el ruido de fondo y evitar sesgo en el procesamiento de las imágenes. Como control negativo se utilizó una laminilla solo con el anticuerpo secundario Alexa-647.

Después, se realizó una mezcla de canales con la asignación de los siguientes colores, FLTP canal verde, insulina rojo y DAPI azul. Posteriormente, se identificaron dos grupos de células con las siguientes características, 1) insulina y FLTP positivas y 2) sólo insulina positivas. Con los datos obtenidos, se realizaron las siguientes interpretaciones:



Porcentaje de células β maduras, es igual al número de células dentro del islote con marca positiva para insulina y FLTP, divididas entre el número total de núcleos con marca positiva para insulina, multiplicado por cien.

Porcentaje de células β inmaduras, es igual al número de células dentro del islote con marca positiva para insulina (sin marca de FLTP) entre el número total de núcleos de las células con marca positiva para insulina dentro del islote, multiplicado por cien.

Los datos obtenidos fueron analizados primero como, el porcentaje de células β maduras y porcentaje de células β inmaduras en todos los islotes y también como, el porcentaje de células β maduras e inmaduras en función del diámetro del islote (<100 μm , 101-200 μm y >200 μm).

Análisis estadístico

Se determinó la distribución de los datos con la prueba Kolmogorov-Smirnov y se realizó una comparación de medias para dos poblaciones con la prueba t-Student (datos paramétricos) o U de Mann-Whitney (datos no paramétricos). Se consideró significativamente diferente cuando $p < 0.05$. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con Origin (Pro) (Versión 2019b. OriginLab Corporation, EUA).



VII. RESULTADOS

Generación F0

Efecto de la dieta alta en grasa sobre el fenotipo de ratas hembra F0

Para inducir obesidad en hembras F0 OBS se administró HFD 60% desde la SPN 5 hasta la gestación (después de la SPN 23, datos de la gestación no mostrados). A partir de la SPN 12, el grupo F0 OBS se caracterizó por tener el mayor peso hasta la SPN 23, antes de la gestación (Figura 7A). A continuación, se quiso observar si el incremento del peso corporal estuvo acompañado del incremento del WAT. En la SPN 23, las ratas F0 OBS mostraron un aumento del TASC ($1.1 \pm 0.1\%$ vs $0.6 \pm 0.09\%$) y TAV ($4.2 \pm 0.5\%$ vs $2.0 \pm 0.3\%$), respecto a las ratas F0 CTRL (Figura 7B—7C).



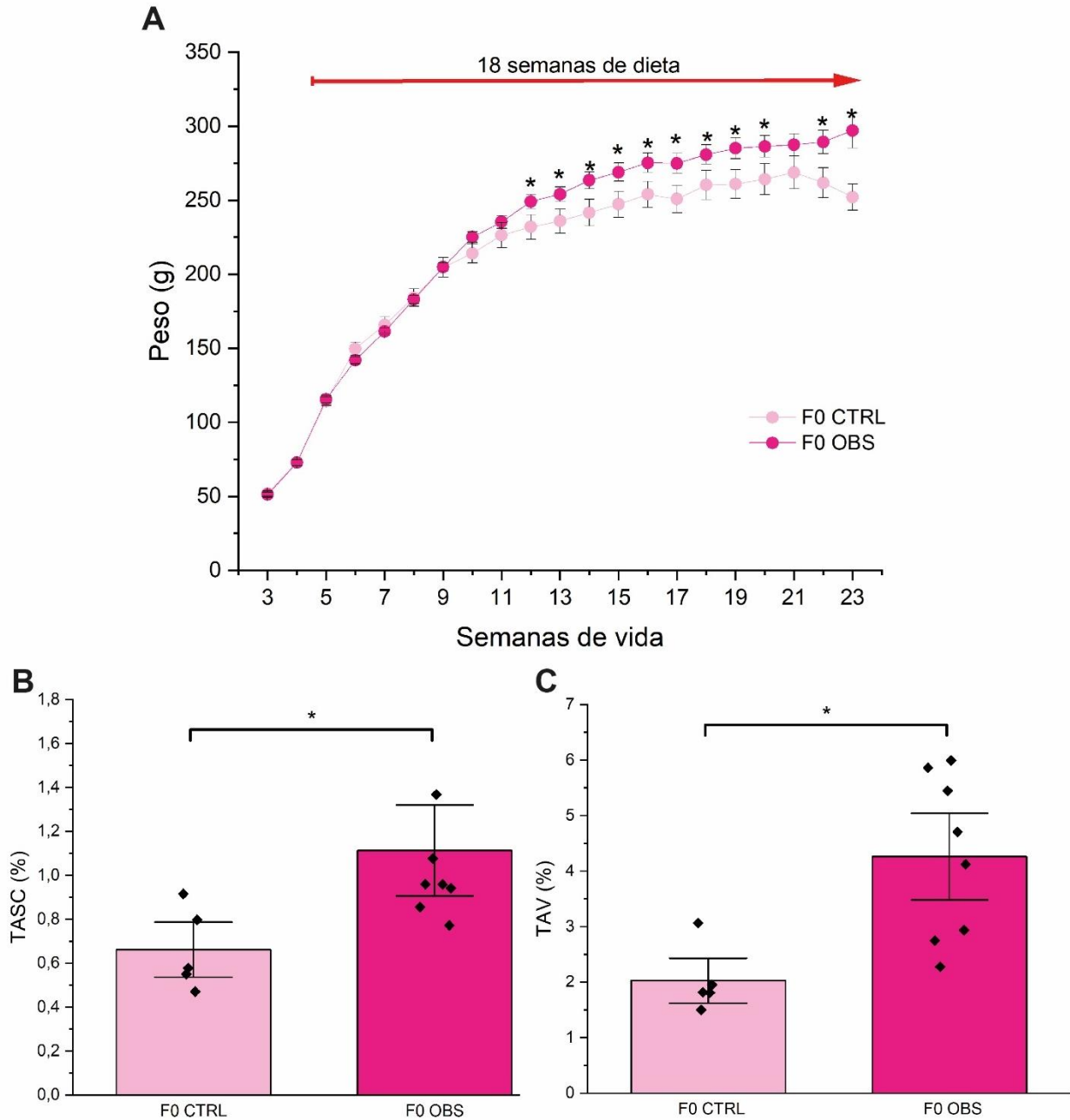


Figura 7. Caracterización del fenotipo obeso materno después de la administración de HFD 60%. A) Curva de ganancia de peso corporal (g), la flecha roja indica la SPN en la que se inició la administración de HFD y su duración. B) Porcentaje de peso corporal del TASC en la SPN 23 C) Porcentaje del peso corporal del TAV en la SPN 23. Los valores en las gráficas representan el promedio \pm SEM y los puntos en cada barra representan la *n*, * $p < 0.05$ vs F0 CTRL (*t* de Student). Hembras A) F0 CTRL $n=8$ y F0 OBS $n=12$, B) y C) F0 CTRL $n=5$ y F0 OBS $n=9$.



Efecto de la dieta alta en grasa sobre el metabolismo de la glucosa en ratas hembra F0

Para determinar si la dieta alta en grasas alteró el metabolismo de la glucosa en las madres, se determinó la glucemia en ayuno y se realizó una IPGTT. El grupo F0 OBS mostró incremento en la glucemia en ayuno respecto a F0 CTRL (101 ± 1.8 vs 83 ± 1.5) (Figura 8A). Después, se realizaron pruebas de IPGTT para buscar alteraciones en el proceso de internalización de la glucosa en tejidos blanco de la insulina. La IPGTT mostró que las ratas F0 OBS presentaron niveles elevados de glucosa en el minuto 15 ($292 \pm 19\%$ vs $214 \pm 14\%$), 60 ($283 \pm 17\%$ vs $213 \pm 5\%$) y 90 ($191 \pm 11\%$ vs $157 \pm 3\%$) con respecto a las ratas F0 CTRL. Asimismo, el AUC de los animales del grupo F0 OBS fue mayor que la de los animales del grupo F0 CTRL (28524 ± 1423 vs 24086 ± 1027) (Figura 8B—8C).



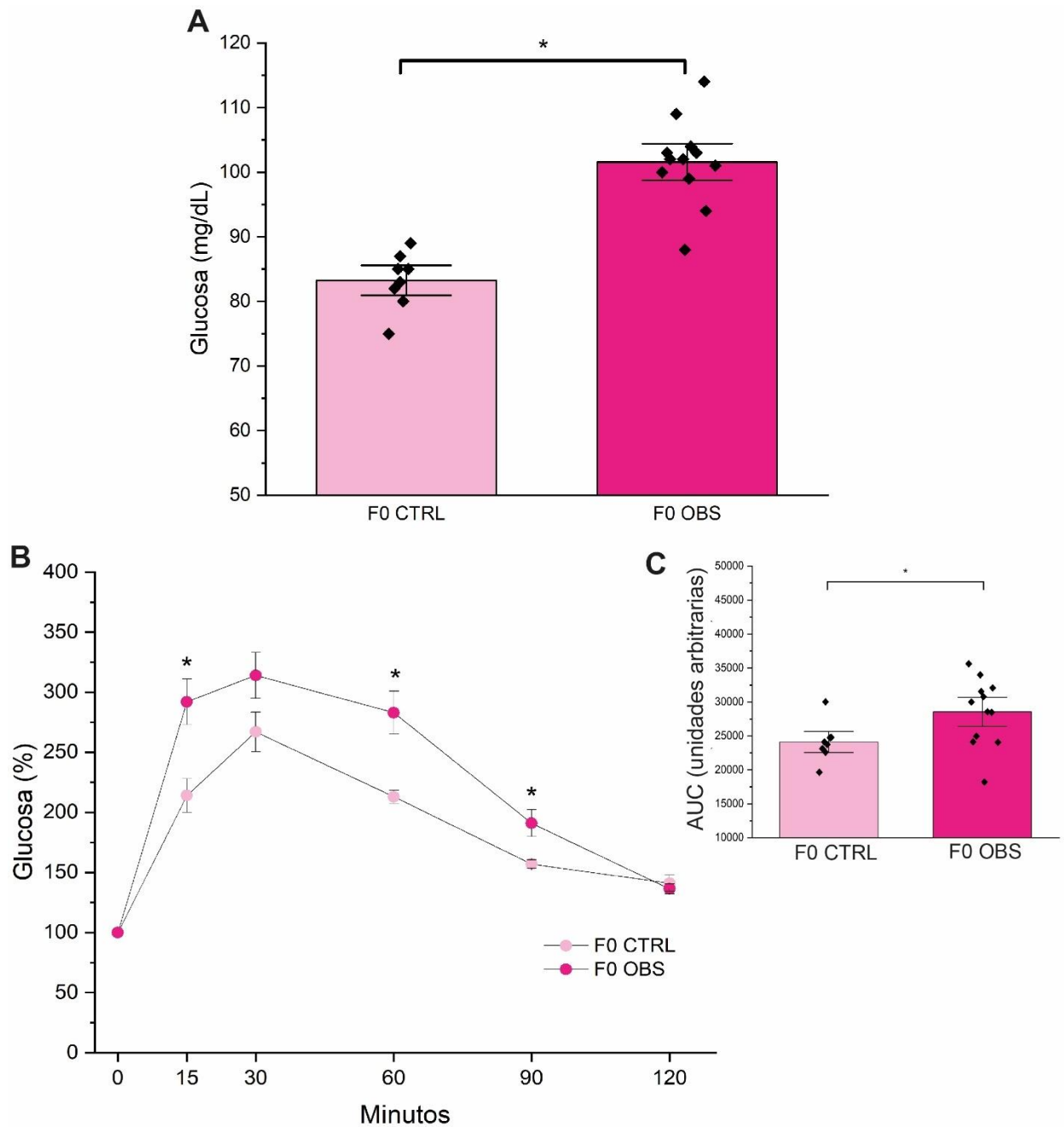


Figura 8. Caracterización del perfil metabólico de la glucosa de ratas hembra (F0) en la SPN 22. A) Concentración plasmática de glucosa en ayuno (mg/dL). B) Curva de tolerancia a la glucosa normalizada respecto a la glucosa basal en ayuno y su C) área bajo la curva. Los valores en las gráficas representan el promedio \pm SEM y los puntos en cada barra representan la n , $*p < 0.05$ vs F0 CTRL (t de Student). Hembras A) F0 CTRL $n=8$ y F0 OBS $n=12$. B) y C) F0 CTRL $n=7$ y F0 OBS $n=12$.



Efecto de la insulina en el metabolismo de la glucosa en ratas hembra

Para comprobar si la intolerancia a la glucosa se debe en parte a niveles deficientes de insulina, derivado de alteraciones en la secreción de insulina de la célula β , se cuantificaron los niveles plasmáticos de insulina en el ayuno. El grupo F0 OBS mostró un incremento en los niveles de insulina en plasma con respecto al grupo F0 CTRL (1.34 ± 0.25 vs 0.57 ± 0.21) (Figura 9A).

Para determinar si el aumento en la concentración plasmática de insulina en ayuno se debe a la disminución en sensibilidad de los tejidos blanco de la insulina, se realizó una ITT. Después de la administración de la dosis de insulina, se observaron niveles mayores de glucosa al minuto 60 ($72 \pm 3\%$ vs $61 \pm 3\%$), 90 ($77 \pm 2\%$ vs $64 \pm 3\%$) y 120 ($81 \pm 2\%$ vs $68 \pm 4\%$) en el grupo F0 OBS con respecto a F0 CTRL. Sin embargo, el AUC no mostró diferencia significativa (Figura 9B—9C).



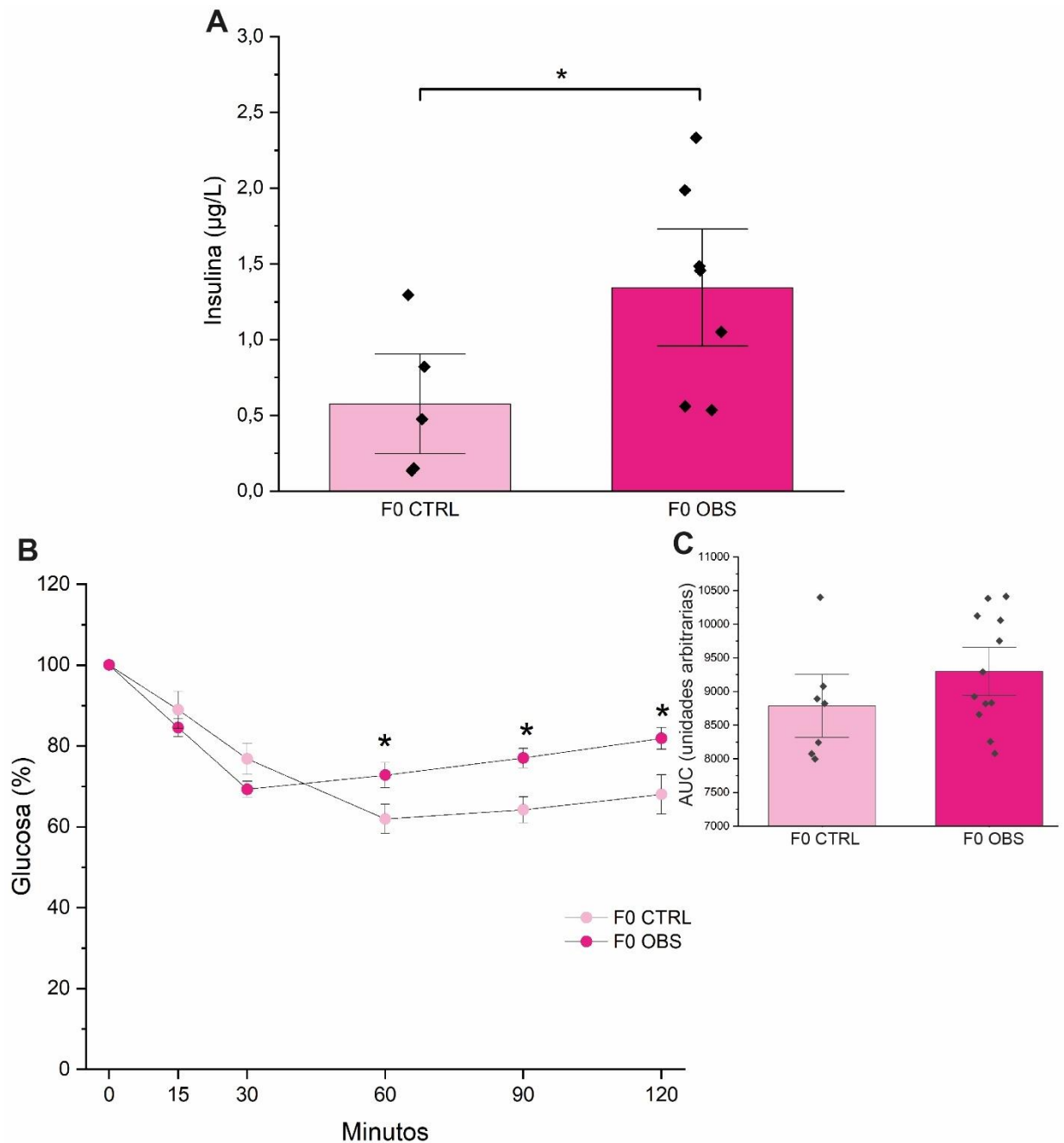


Figura 9. Concentración de insulina plasmática y sensibilidad a la insulina de ratas hembra F0 en la SPN 22. A) Concentración de insulina plasmática en ayuno ($\mu\text{g/L}$) B) Curva de sensibilidad a la insulina normalizada respecto a la glucosa basal en ayuno y su C) área bajo la curva. Los valores en las gráficas representan el promedio \pm SEM y los puntos en cada barra representan la n , $*p < 0.05$ vs F0 CTRL (t de Student). Hembras A) F0 CTRL $n=4$ y F0 OBS $n=6$. B) y C) F0 CTRL $n=9$ y F0 OBS $n=12$.



Efecto de la dieta alta en grasa sobre la masa de los islotes de ratas hembra F0

Para determinar los mecanismos relacionados con el desarrollo de la hiperinsulinemia durante la obesidad se cuantificó la masa de los islotes. El grupo F0 OBS no mostró cambios respecto a F0 CTRL (Figura 10A—10B).

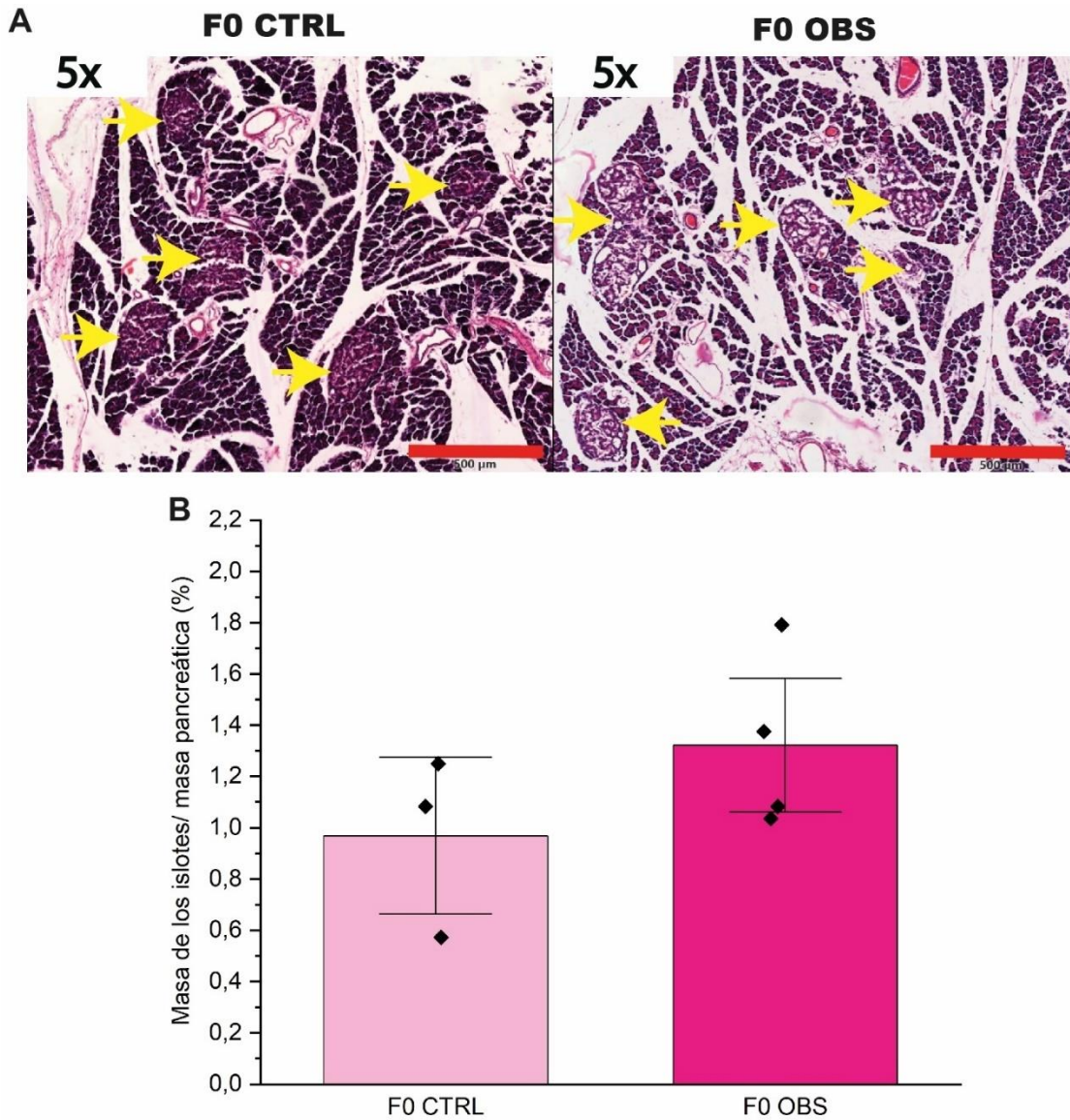


Figura 10A—10B



Figura 10. Efecto de la obesidad sobre la masa de islotes de ratas hembra F0. A) Imagen representativas de los islotes de ratas hembra F0 CTRL y F0 OBS, las flechas amarillas señalan los islotes. B) Cuantificación de la masa de los islotes respecto a la masa pancreática. La barra roja en la imagen representa 500 μm . Los valores en la gráfica representan el promedio \pm SEM y los puntos en cada barra representan la *n*. Hembras F0 CTRL *n*=3 y F0 OBS *n*=4.

Efecto de la dieta alta en grasa sobre la proporción de célula β maduras e inmaduras de los islotes de ratas hembra F0

Debido a que no se observaron cambios en la masa de los islotes entre los grupos F0, se cuantificó la proporción de células β maduras e inmaduras en los islotes para determinar el posible papel que juegan ambas poblaciones en la hiperinsulinemia observada en las ratas F0 OBS. Para ello se realizó inmunofluorescencia para la detección del marcador de madurez FLTP en cortes histológicos de tejido pancreático. El análisis no mostró cambios en la proporción total de células β maduras/inmaduras del grupo F0 OBS con respecto al grupo F0 CTRL (Tabla IV) (Figura 11A—11B).

Por otro lado, se quiso observar si la obesidad en el contexto de la arquitectura del islote influye en la proporción de células β maduras e inmaduras, por lo que se categorizó a los islotes en 3 clases respecto a su diámetro. El análisis por diámetro del islote no mostró cambios en proporción de células β maduras e inmaduras de F0 OBS respecto a F0 CTRL (Tabla IV) (Figura 11C).

Tabla IV. Datos de la proporción de células β maduras e inmaduras en función del tamaño del islote de ratas hembra F0

Células β	Total		< 100 μm		101 -200 μm		> 201 μm	
	F0 CTRL	F0 OBS	F0 CTRL	F0 OBS	F0 CTRL	F0 OBS	F0 CTRL	F0 OBS
Maduras (%)	93.6 \pm 1.1	94.4 \pm 1	93.5 \pm 1.1	94.6 \pm 1.1	94.4 \pm 0.6	92.7 \pm 0.7	98.6	99.2 \pm 0.5
Inmaduras (%)	6.4 \pm 1.1	5.4 \pm 1	6.5 \pm 1.1	5.4 \pm 1.1	5.4 \pm 0.6	7.3 \pm 0.7	1.4	0.7 \pm 0.5



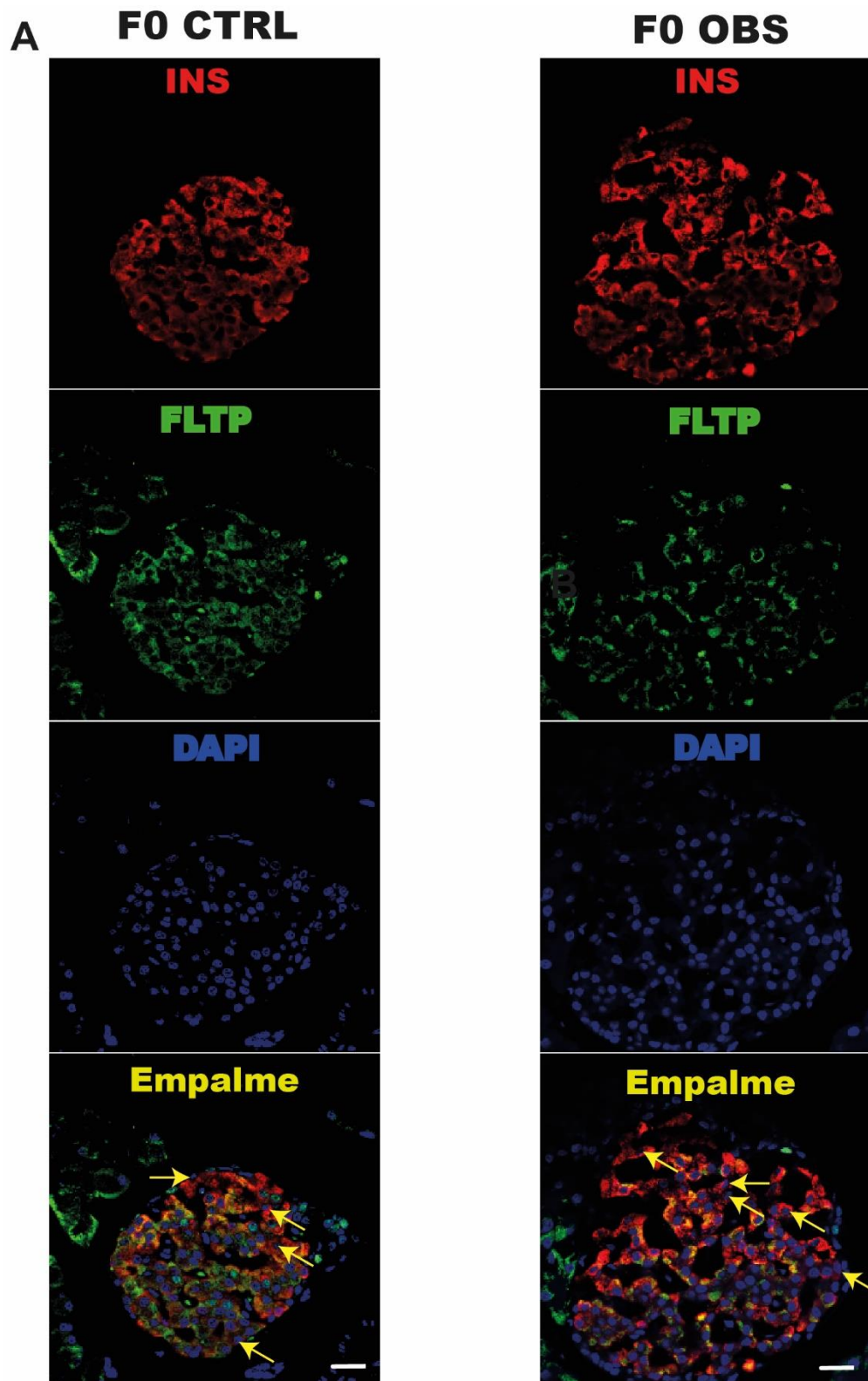


Figura 11A



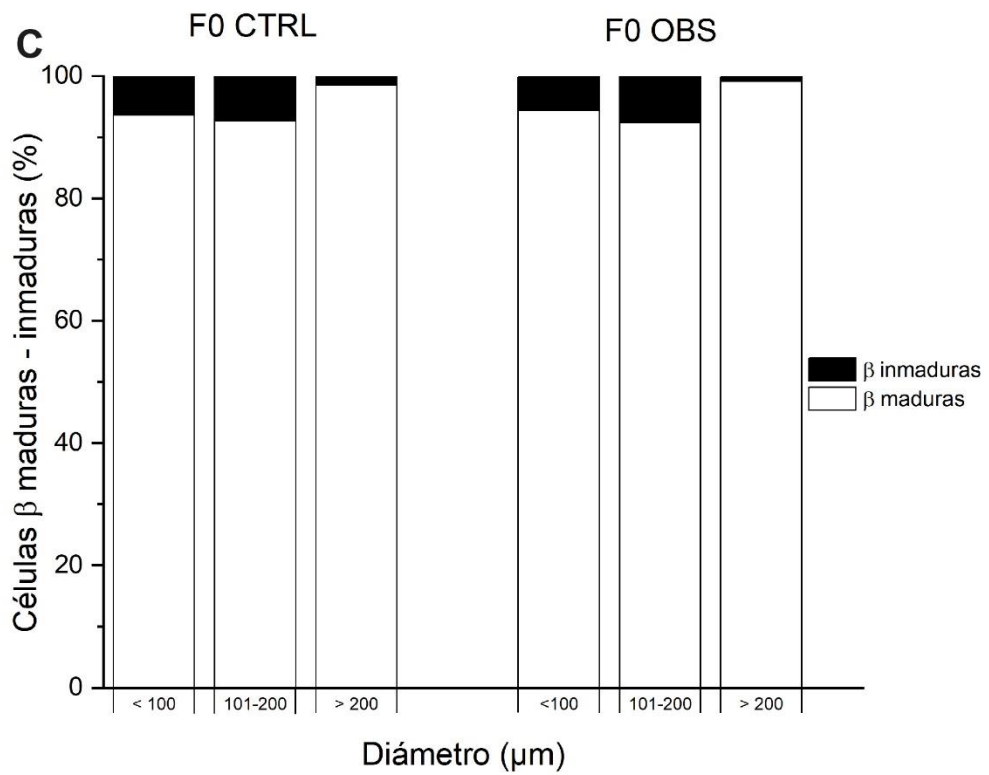
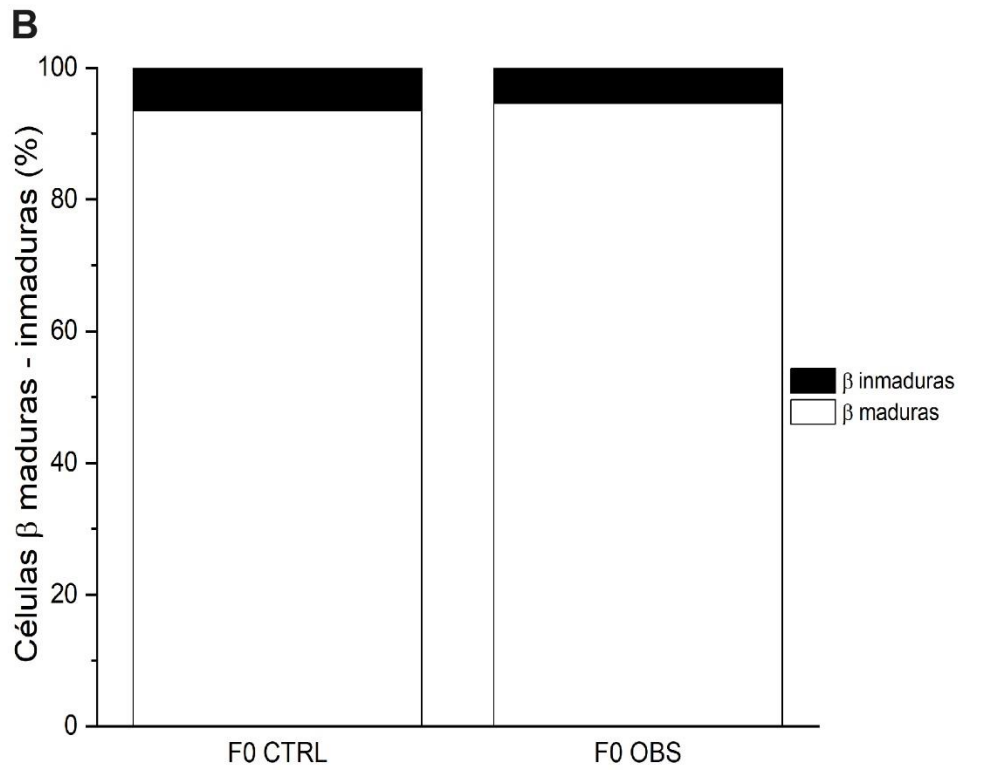


Figura 11B—C



Figura 11. Proporción de células β maduras e inmaduras en islotes pancreáticos de ratas hembra F0. A) Imagen representativa de las inmunofluorescencias para la detección de FLTP e insulina, la flecha amarilla indica células β inmaduras (Ins(+)/Fltp(-)). B) Proporción de células β maduras e inmaduras respecto al total de células β dentro de los islotes de ratas hembra F0. C) Proporción de células β maduras e inmaduras en función del tamaño del islote. La barra blanca representa 20 μ m. $n=3$ por grupo.

Generación F1

Efecto de la obesidad materna sobre el fenotipo de la descendencia

Una vez establecido el modelo de obesidad materna, se analizaron los efectos de la obesidad sobre el fenotipo de la descendencia de sexo masculino (F1). El grupo de ratas macho descendientes de madres obesas (F1 OBS) no mostró diferencias en la ganancia de peso a lo largo de 18 semanas con respecto al grupo de ratas macho descendientes de madres control (F1 CTRL) (Figura 12A). En la SPN 18, el TASC y TAV de las ratas F1 OBS no mostraron un aumento respecto a las ratas F1 CTRL (Figura 12B—12C).



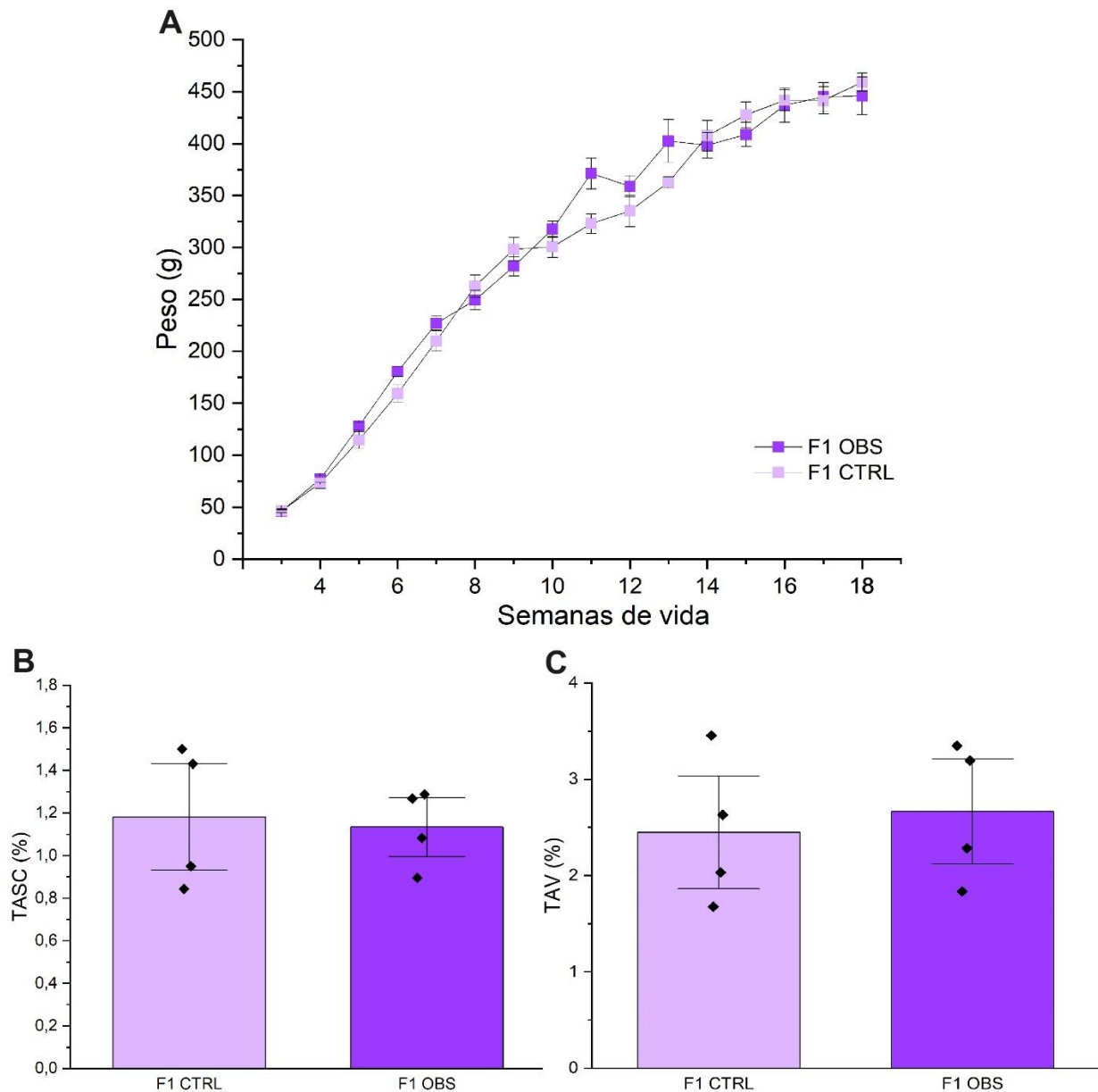


Figura 12. Ganancia de peso y adiposidad de las ratas macho F1 A) Curva de ganancia de peso corporal (g). B) Peso del tejido adiposo subcutáneo con respecto al peso del animal en la SPN 18. C) Peso del tejido adiposo visceral con respecto al peso del animal a la SPN 18. Los valores en las gráficas representan el promedio \pm SEM y los puntos en cada barra representan la *n*. Machos A) F1 CTRL *n*= 9 F1 OBS *n*=8. B) y C) F1 CTRL *n*= 4 y F1 OBS *n*=4.



Efecto de la obesidad materna sobre el metabolismo de la glucosa en la descendencia

A continuación, se analizó el efecto de la obesidad materna sobre el metabolismo de la glucosa en la descendencia de sexo masculino. El grupo F1 OBS no mostró diferencias significativas en la glucemia basal respecto al grupo F1 CTRL (Figura 13A). En la SPN 18, la IPGTT mostró un incremento en los niveles de glucosa de F1 OBS al minuto 15 ($377 \pm 25\%$ vs $198 \pm 36\%$), 90 ($137 \pm 8\%$ vs $113 \pm 7\%$) y 120 ($123 \pm 5\%$ vs $94 \pm 2\%$), así como un aumento del AUC del grupo F1 OBS con respecto al grupo F1 CTRL (23360 ± 1421 vs 17155 ± 1703) (13B—13C).



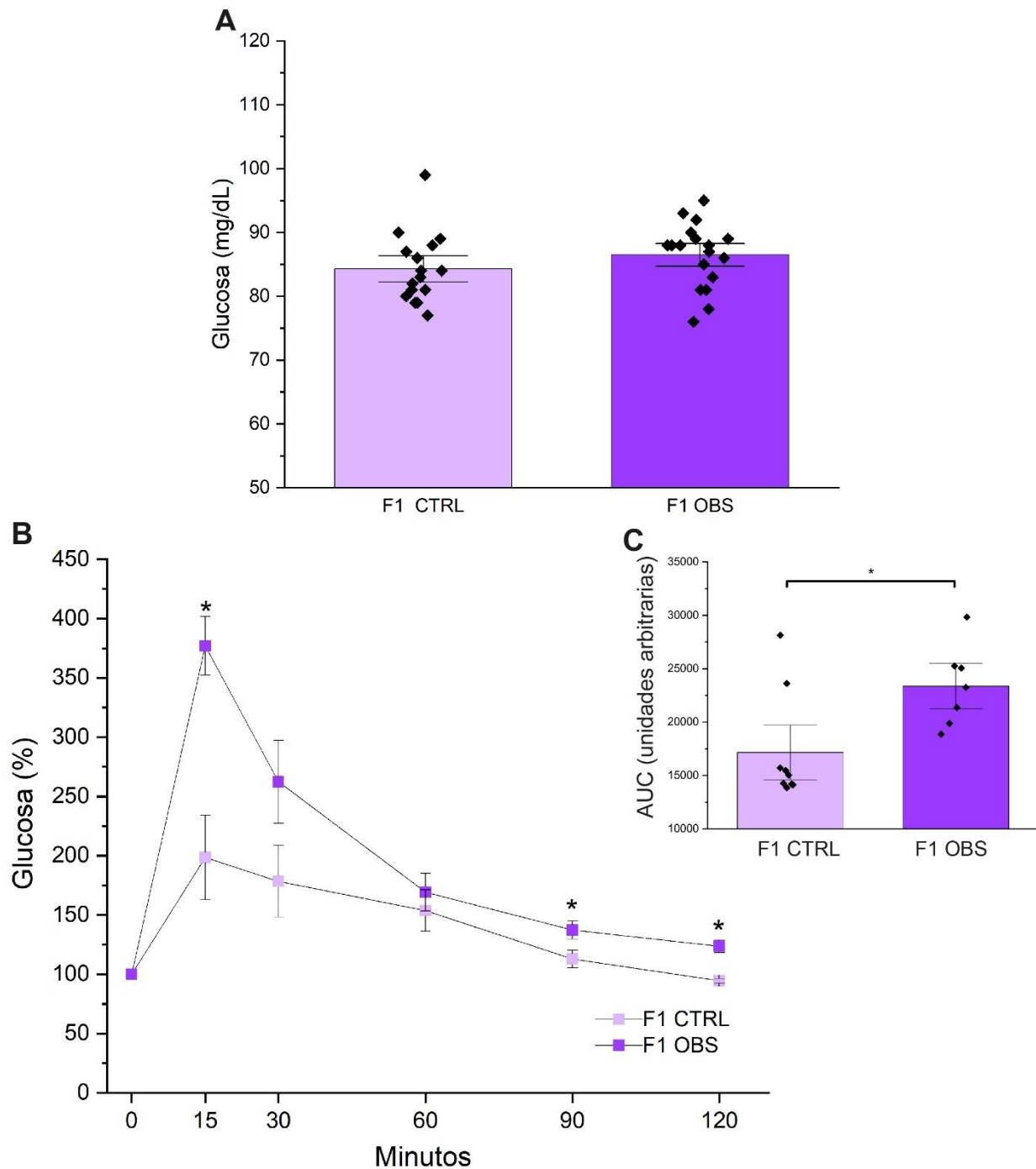


Figura 13. Caracterización del metabolismo de la glucosa en la descendencia de sexo masculino de ratas hembra a las SPN 18. A) Concentración plasmática de glucosa de ayuno (mg/dL). B) Curva de tolerancia a la glucosa normalizada con respecto a la glucosa basal en ayuno y su C) área bajo la curva de la IPGTT. Los valores en las gráficas representan el promedio \pm SEM y los puntos en cada barra representan la n , * $p < 0.05$ vs F1 CTRL (t de Student). Machos A) F1 CTRL $n = 16$ y F1 OBS $n = 18$. Machos B) y C) F1 CTRL $n = 9$ y F1 OBS $n = 7$.



Efecto de la insulina en el metabolismo de la glucosa en la descendencia de madres obesas

Para determinar los mecanismos de la intolerancia a la glucosa se cuantificaron los niveles plasmáticos de insulina en ayuno y se realizó una ITT. Por su parte, los niveles plasmáticos de insulina de las ratas F1 OBS no mostraron diferencia significativa en comparación con los de las ratas F1 CTRL (Figura 14A). Además, sólo se observó una diferencia en los niveles de glucosa en el minuto 60 ($86 \pm 2\%$ vs $75 \pm 3\%$) en la ITT de ratas F1 OBS con respecto a las ratas F1 CTRL. Asimismo, las AUC no mostraron diferencias significativas (Figura 14B—14C).



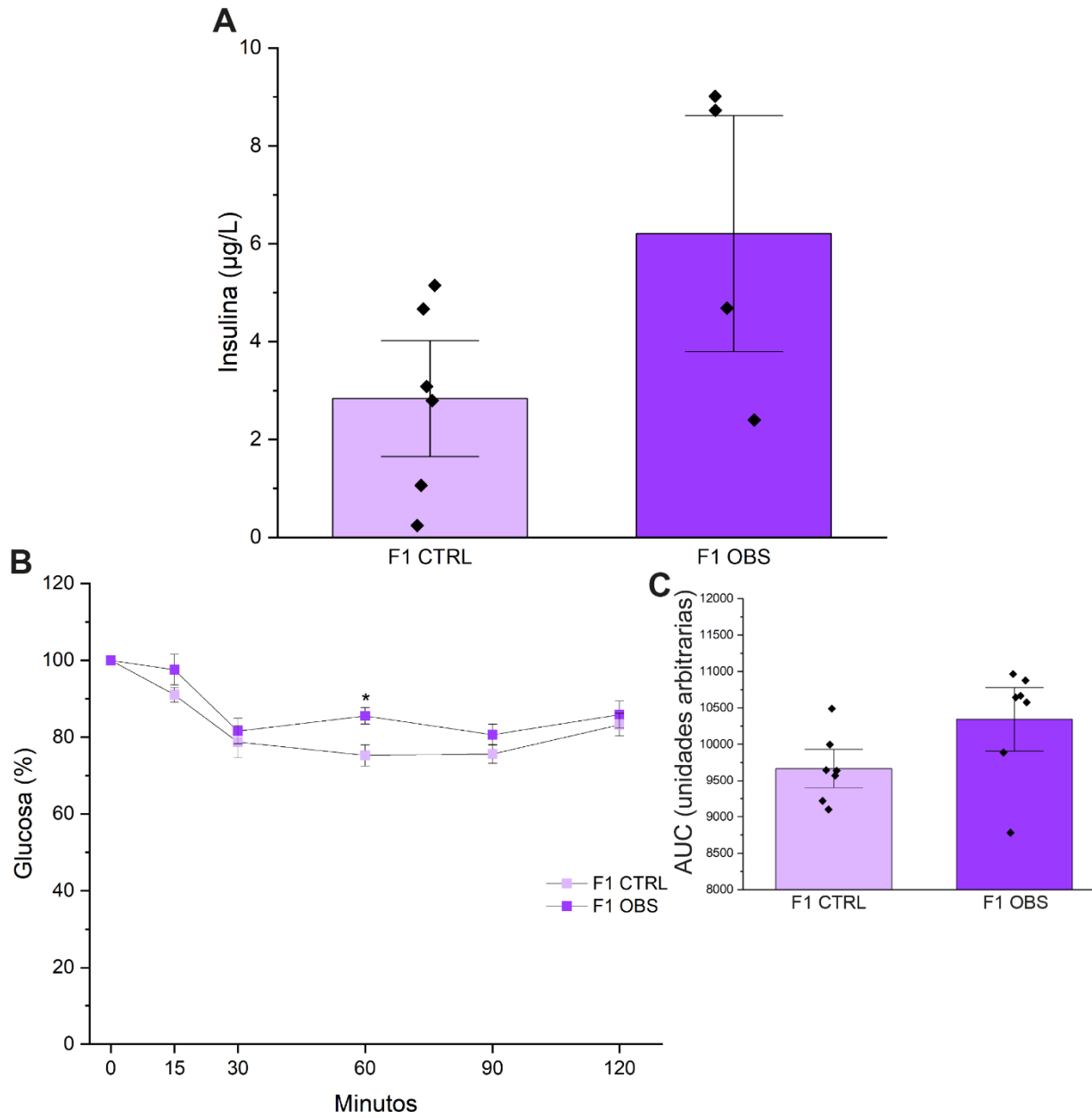


Figura 14. Concentración de insulina y curva de sensibilidad a la insulina de ratas macho F1 en la SPN 18. A) Concentración de insulina plasmática en ayuno ($\mu\text{g/L}$) B) Curva de sensibilidad a la insulina normalizada con respecto a la glucosa basal en ayuno y su C) área bajo la curva de la ITT. Los valores en las gráficas representan el promedio \pm SEM y los puntos en cada barra representan la n , $*p < 0.05$ vs F1 CTRL (t de Student). Machos A) F1 CTRL $n=6$ y F1 OBS $n=4$, B) y C) F1 CTRL $n=9$ y F1 OBS $n=7$.



Efecto de la obesidad materna sobre masa de los islotes de la descendencia

Para estudiar el efecto de la obesidad materna sobre la masa de los islotes de su descendencia de sexo masculino, se cuantificó la masa de los islotes. Dicho análisis no mostró diferencias entre la masa de los islotes de ratas F1 OBS en comparación con ratas macho F1 CTRL (Figura 15A—15B).

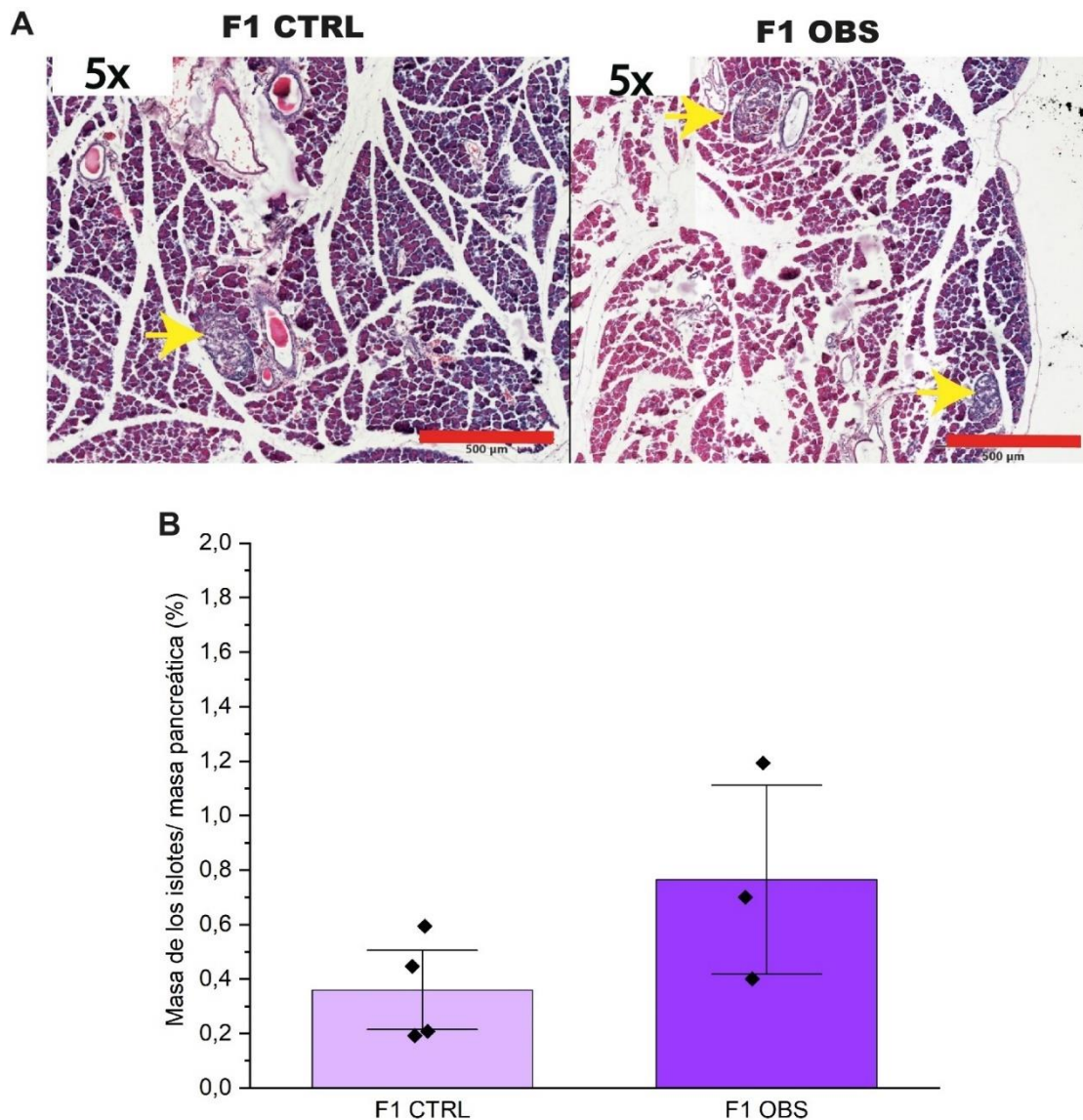


Figura 15A—15B



Figura 15. Efecto de la obesidad materna sobre la masa de los islotes de ratas macho de la descendencia. A) Imagen representativa de la masa de los islotes, las flechas amarillas señalan los islotes. B) Masa de islotes con respecto a la masa del páncreas. La barra roja en la imagen representa 500 μm y los valores en la gráfica, el promedio \pm SEM y los puntos en cada barra representan la *n*. Machos, F1 CTRL *n*=4 y F1 OBS *n*=3.

Efecto de la obesidad materna sobre la proporción de células β maduras e inmaduras en los islotes de ratas macho de la descendencia

En nuestro proyecto el objetivo principal fue analizar el efecto de la obesidad materna sobre las subpoblaciones de células β maduras e inmaduras de la descendencia. Para analizar si el aumento en la insulina en plasma (no significativo) observado en ratas F1 OBS se relaciona con cambios en las cantidades de células β maduras e inmaduras de los islotes, se cuantificó la proporción de dichas subpoblaciones. Para ello se realizaron inmunofluorescencias para la detección del marcador de madurez FLTP en cortes histológicos del páncreas. En nuestro estudio se encontró una disminución en la proporción de células β maduras y un aumento en la proporción de células β inmaduras en los islotes pancreáticos de la descendencia (Tabla V) (Figura 16A—16B). A continuación, se analizó si dicho cambio depende del tamaño de los islotes, lo cual mostró un aumento en la proporción de células β inmaduras en los islotes pequeños (\leq a 100 μm) de ratas F1 OBS en comparación con los de ratas F1 CTRL (16C).

Tabla V. Datos de la proporción de células β maduras e inmaduras en función del tamaño del islote de ratas macho F1

Células β	Total		< 100 μm		101 -200 μm		> 201 μm	
	F1 CTRL	F1 OBS	F1 CTRL	F1 OBS	F1 CTRL	F1 OBS	F1 CTRL	F1 OBS
Maduras (%)	95.9 \pm 1.6	91.3 \pm 1.7*	94.8 \pm 1.1	90.3 \pm 1.1*	96.8 \pm 2.0	93.9 \pm 1.0	99.6 \pm 0.2	100
Inmaduras (%)	4.2 \pm 1.6	8.6* \pm 1.7*	5.2 \pm 1.1	9.7 \pm 1.1*	3.2 \pm 2.0	6.0 \pm 1.0	0.4 \pm 0.2	-



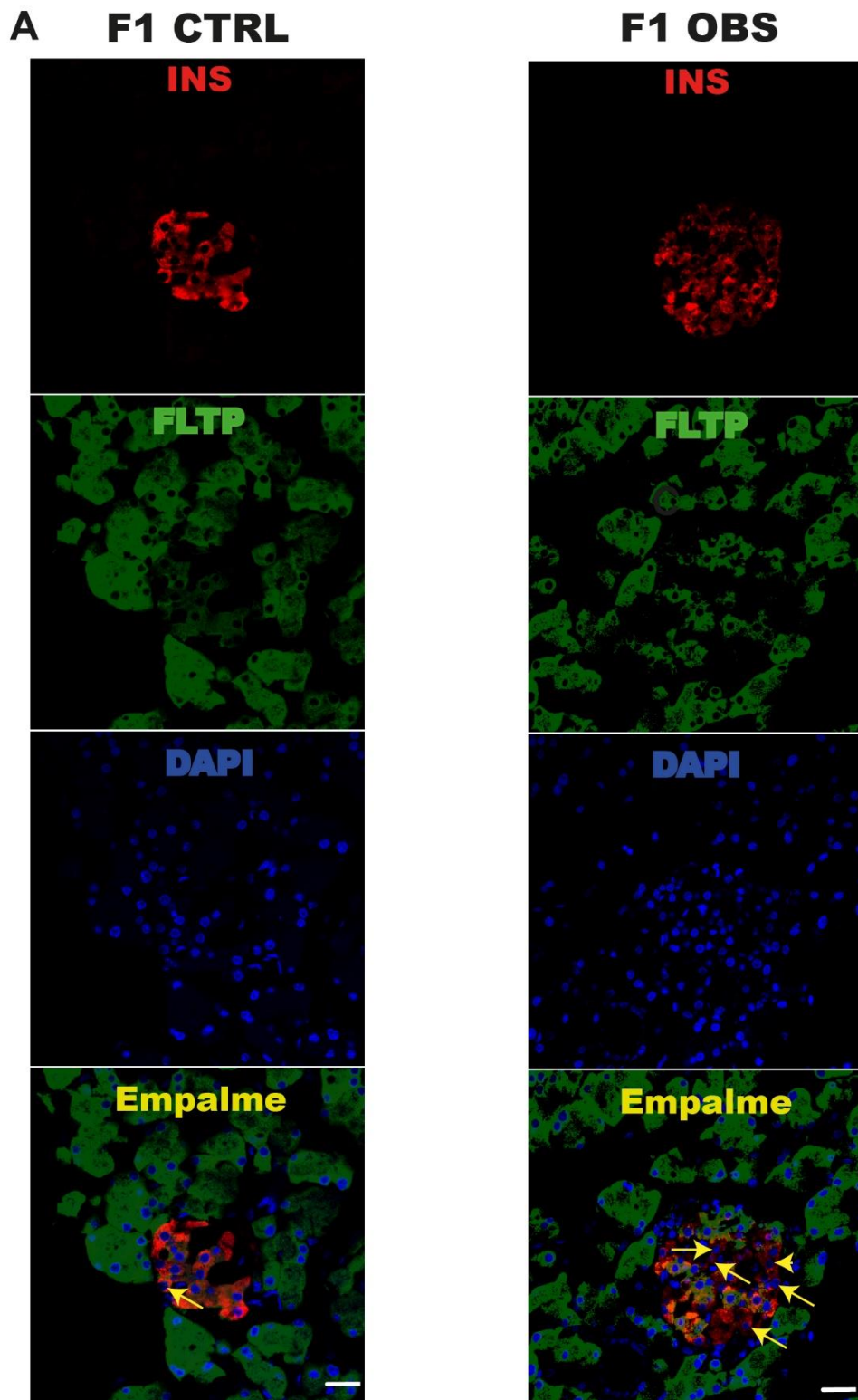


Figura 16A



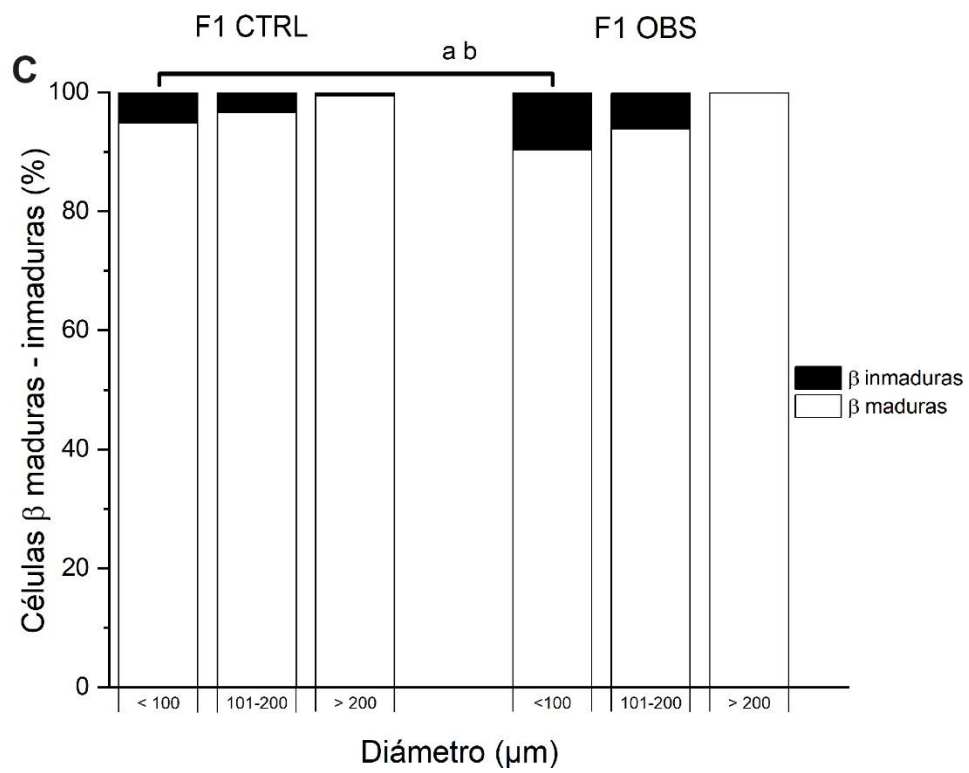
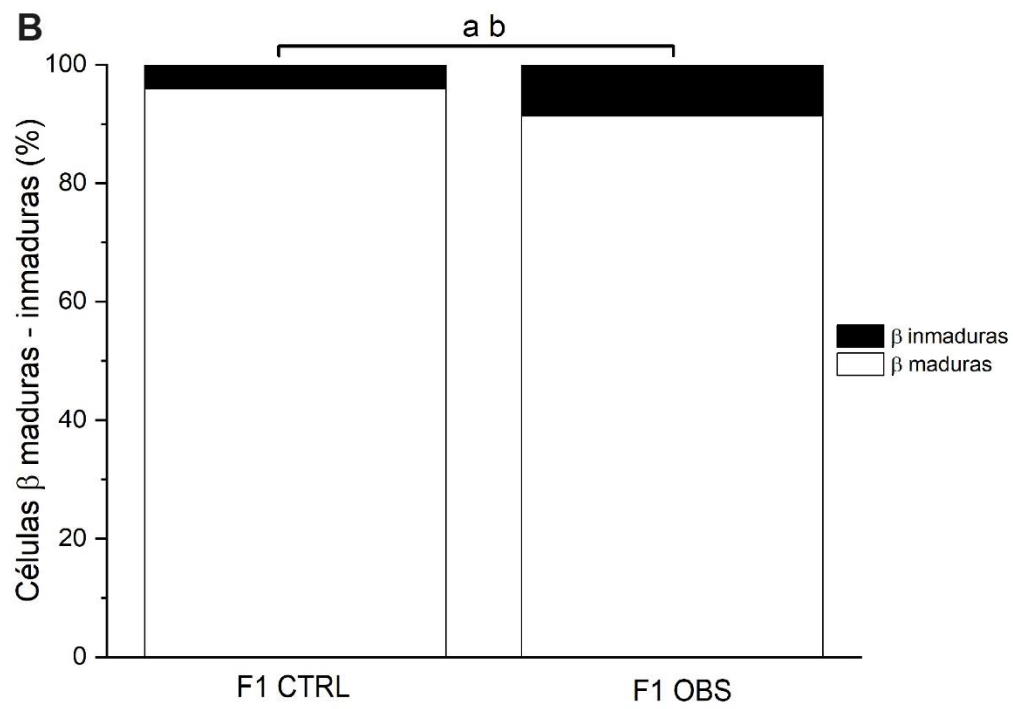


Figura 16B—16C



Figura 16. Proporción de células β maduras e inmaduras en los islotes de la descendencia.

A) Imagen representativa de la inmunofluorescencia para detección de FLTP e insulina, las flechas amarillas indican células β inmaduras (Ins(+)/FLTP(-)). B) Proporción de células β maduras e inmaduras en los islotes. C) Proporción de células β maduras e inmaduras en función del diámetro del islote. La barra blanca representa 20 μ m. La letra a indica $p < 0.05$ en la comparación de las células β maduras del grupo F1 OBS vs F1 CTRL. La letra b indica $p < 0.05$ en la comparación de las células β inmaduras de F1 OBS vs F1 CTRL, $n=3$ para cada grupo.

VIII. DISCUSIÓN

Con base en evidencia epidemiológica y en modelos animales, se ha observado que la obesidad materna predispone a la descendencia a padecer enfermedades metabólicas durante el transcurso de su vida. De manera importante, este es el primer trabajo experimental que estudió el efecto de la obesidad materna sobre la proporción de las subpoblaciones de células β maduras e inmaduras de la descendencia además de que se presenta evidencia del efecto que tiene dicha alteración en su metabolismo.

El grupo F0 OBS, se caracterizó por desarrollar obesidad con incremento del peso corporal, del TASC y TAV, glucosa de ayuno elevada, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. Sin embargo, no se observaron cambios en la masa de los islotes y en la proporción de células β maduras e inmaduras. Por su parte, los machos descendientes (F1 OBS), se caracterizaron por tener intolerancia a la glucosa y disminución en la proporción de células β maduras y aumento en la proporción de células β inmaduras, en la SPN 18, aun cuando fueron alimentados con dieta estándar a partir del destete.

El consumo de HFD induce la aparición del fenotipo obeso en madres

En nuestro trabajo, el grupo de ratas hembra F0 OBS mostraron el fenotipo distintivo de la obesidad, el cual, se caracterizó por el incrementó del peso corporal, derivado del aumento de WAT (TASC y TAV), estos resultados concuerdan con gran variedad modelos de obesidad materna (15,44,49). Diversos estudios en modelos murinos han



mostrado que el consumo de dietas altas en grasa genera una mayor disponibilidad de energía. Por lo tanto, los ácidos grasos empaquetados en lipoproteínas que no son utilizados como sustrato energético a través de la vía de la β oxidación en los órganos periféricos, son utilizados en un proceso llamado lipogénesis. En este proceso, los adipocitos (principalmente del WAT), capturan a los ácidos grasos provenientes de la hidrólisis de las lipoproteínas en circulación, y son re-esterificados en forma de TAG que posteriormente son incorporados a la vacuola lipídica (50).

Por otro lado, se ha observado que, en adipocitos de rata, la lipogénesis es promovida por la acción de la insulina, esto mediante un aumento en la síntesis y translocación de la lipoproteína lipasa al endotelio capilar, en donde cataliza la hidrólisis de los TAG a ácidos grasos contenidos en las lipoproteínas circulantes (51). Otros trabajos con ratones han mostrado que la insulina aumenta la síntesis de la proteína transportadora de ácidos grasos 1 (FATP1) en el WAT de manera dependiente al eje IRS1-PI3K-AKT siendo similar a lo que sucede con el transportador de glucosa GLUT4. El aumento de FATP1 se refleja como una mayor capacidad para internalizar ácidos grasos de cadena larga al interior del adipocito (52).

No obstante, Stevens et al. (53) indicó que la tasa de lipólisis basal es mayor en ratas obesas, esto como consecuencia de la disminución de la acción antilipolítica de la insulina (resistencia a la insulina) y de la reducción en la capacidad para almacenar TAG. Por otro lado, trabajos en roedores y humanos, han mostrado que el efecto antilipolítico de la insulina es más prominente en los adipocitos subcutáneos hiperplásicos en comparación con adipocitos viscerales hipertróficos. Esto conlleva a que el TAV, libere concentraciones elevadas de adipocinas proinflamatorias, diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol y AGL, los cuales, causan un daño sistémico en los órganos (9,34). Esta evidencia sugiere que en los adipocitos de ratas F0 OBS el exceso de ácidos grasos provenientes de la dieta fue metabolizado a través de la lipogénesis, consecuencia de niveles elevados de insulina. Como resultado, observamos un incremento tanto en el TASC como en el TAV. Por otro lado, el aumento del WAT, principalmente en el compartimento visceral



(TAV) de ratas F0 OBS, podría estar relacionado con un aumento en la tasa de lipólisis que resulta de la resistencia a la insulina en los adipocitos de dicho compartimento.

La alteración en el metabolismo de la glucosa en F0 OBS es resultado de la resistencia a la insulina

Estudios en roedores han mostrado que el glicerol, derivado de la lipólisis, puede promover la gluconeogénesis en hígado y la subsecuente liberación de glucosa hepática a circulación (54). Esto concuerda con nuestros resultados, en donde las ratas F0 OBS, presentaron niveles elevados de glucosa en ayuno a la SPN 22. Lo cual sugiere que los niveles elevados de glucosa en ayuno son resultado de la utilización del glicerol (proveniente de la hidrólisis de TAG) como sustrato de la gluconeogénesis en el hígado.

Estudios en roedores (44) y humanos (55) obesos, han mostrado que la intolerancia a la glucosa puede ser una característica de la obesidad, en el que se observa la disminución en la movilización de glucosa al interior de células de los órganos blancos de la insulina. En nuestro estudio las ratas F0 OBS mostraron una capacidad disminuida para movilizar glucosa, lo que se reflejó en niveles elevados de glucosa durante la IPGTT por lo tanto, podemos confirmar que este grupo desarrolló intolerancia a la glucosa. Por otro lado, estudios en roedores han demostrado que la intolerancia a la glucosa se puede deber por un lado a la secreción alterada de insulina estimulada por glucosa y/o por el otro, a la disminución en la sensibilidad a la insulina principalmente (35).

El análisis de la sensibilidad a la insulina a través de la ITT, demostró que el grupo de ratas F0 OBS, manifestó una baja respuesta a insulina exógena (una capacidad disminuida para reducir la glucosa en circulación) en comparación con las ratas F0 CTRL, lo cual indica que los animales presentaron resistencia a la insulina. Resultados similares se han encontrado en roedores obesos, en donde el exceso de moléculas de origen lipídico en circulación puede interactuar con proteínas de la vía de la señalización de insulina (IRS1-PI3K-AKT) en el músculo esquelético. En estos estudios se observó, que después de la administración exógena de insulina hubo disminución de las proteínas



fosforiladas IRS1-PI3K-AKT. Al mismo tiempo, se observó una menor translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana celular del músculo esquelético (36,37). Por lo tanto, es probable que la resistencia a la insulina, observada en F0 OBS, se puede explicar en parte por la posible interacción entre moléculas de origen lipídico liberadas por el TAV con proteínas pertenecientes a la cascada de señalización de la insulina.

Por otro lado, como lo hemos descrito, la intolerancia a la glucosa también puede ser producto de la alteración en la secreción de insulina. Se ha informado que la incubación *in vitro* de células β con AGL, durante periodos de tiempo prolongados, puede alterar la secreción de insulina e inducir apoptosis (56). Para profundizar el análisis de la intolerancia a la glucosa observada, proponemos realizar ensayos de secreción de insulina en islotes aislados de individuos obesos.

La HFD no provocó cambios en la proporción de células β maduras e inmaduras de ratas hembra obesas

Diversos trabajos *in vitro* e *in vivo* han mostrado que un exceso de nutrientes, pueden sobre estimular a la célula β para secretar insulina. Además, la secreción de insulina se ve aumentada, por los niveles elevados de glucosa hepática durante el ayuno en condiciones de resistencia a la insulina en la obesidad (56). Por último, estudios realizados en humanos (57) y roedores (58) con obesidad, han mostrado que los niveles elevados de insulina, se deben no solo a la sobre estimulación de la célula β , sino también, al aumento en la MCB, producto de la proliferación de las células β (hiperplasia) y en menor medida, al aumento en su tamaño (hipertrofia).

Por el contrario, nuestro grupo de ratas hembra F0 OBS, no mostró cambios significativos en la masa de islotes ($p= 0.24$) en comparación con las ratas F0 CTRL. Probablemente, la capacidad de detectar cambios en la MCB a través de la masa de los islotes no es lo suficientemente sensible. Además, es posible que el tamaño de la muestra ($n=4$) influyera en la sensibilidad del análisis. Por la anterior, se propone complementar el estudio con la



cuantificación directa de la MCB a través inmunohistoquímica para la detección de insulina, así como incrementar el tamaño de la muestra.

Al no encontrar cambios en la masa de los islotes entre los grupos experimentales, decidimos observar si existían cambios en la proporción de células β maduras e inmaduras que se pudieran relacionar con la hiperinsulinemia de las ratas F0 OBS. En relación con las subpoblaciones, los trabajos que estudian cambios en la proporción de las subpoblaciones son escasos. Sin embargo, en los últimos años el marcador FLTP, relacionado con la adquisición de la polaridad en la célula β ha servido para diferenciar entre células β maduras (FLTP+) e inmaduras (FLTP-) y describir muchas de las características entre cada subpoblación como lo es la secreción de insulina entre otras. Sin embargo, la cuantificación de la proporción de las subpoblaciones a través del marcador FLTP, no mostró diferencias en el grupo de ratas F0 OBS respecto a sus controles. Por lo que no podemos mencionar que la hiperinsulinemia mostrada en F0 OBS se debe principalmente a las subpoblaciones.

Por otro lado, trabajos previos han mostrado que las células β de ratas con síndrome metabólico pueden presentar alteraciones en los niveles de GLUT2 en la membrana, su actividad eléctrica y niveles de GK, que conducen a la hipersecreción de insulina en estado basal (59). Así mismo, durante la obesidad existe una serie de moléculas que pueden sobre estimular la secreción de la célula β , como ácidos grasos libres, glucosa, entre muchas otras. La suma de todos estos factores durante la obesidad, pueden ser la causa de la hiperinsulinemia mostrada en el grupo F0 OBS.

Cabe destacar que, a diferencia de nuestro trabajo en el cual se utilizaron ratas como modelo experimental y anticuerpos contra la proteína FLTP, en el trabajo realizado por Bader et al. (5) se utilizaron ratones como modelo y se analizó la expresión del gen FLTP por medio de un gen reportero. Ambos factores, podrían estar relacionados con la diferencia en la proporción de células β maduras e inmaduras en nuestro grupo F0 (~94 y 6%, respectivamente) y las proporciones mostradas por Bader et al. (5) (~65 y 35%, respectivamente). Esto sugiere que la expresión de FLTP utilizado como marcador de madurez de las células β , podría estar sujeta a regulación postranscripcional. Lo anterior



refleja que los resultados obtenidos, pueden variar dependiendo del marcador de madurez/inmadurez que se utilizó, además de que demuestra la gran heterogeneidad de subpoblaciones de células β respecto a sus características moleculares. Por último, a pesar de que existan cambios en la proporción de células β maduras e inmaduras en función del marcador que se utilizó, la subpoblación de células β maduras en individuos adultos siempre se encuentra en mayor proporción que la de células β inmaduras (5,60).

La obesidad materna tiene efecto sobre la proporción de células β maduras e inmaduras de la descendencia masculina

Como se describió con anterioridad, el grupo F0 OBS desarrolló obesidad previa a su apareamiento. En la actualidad, diversos estudios han mostrado el efecto de la obesidad materna sobre las células β de la descendencia. Sin embargo, este es el primer estudio que muestra el efecto de la obesidad materna sobre las subpoblaciones de células β maduras e inmaduras. En nuestro estudio, a las 18 SPN, los machos F1 OBS, descendientes de hembras obesas, se caracterizaron por presentar un incremento en la proporción de células β inmaduras y la disminución en la proporción de células β maduras en los islotes.

Se ha sugerido que las subpoblaciones de células β , podrían originarse durante el desarrollo embrionario, tanto por la participación de las diferentes estructuras embrionarias que dan origen al páncreas (yemas pancreáticas ventral y dorsal) como por los cambios en las moléculas de señalización que regulan los procesos de diferenciación y maduración de las células β (4). Diversos trabajos, sugieren que la señales que dan origen a la composición celular dentro de los islotes aparecen en el desarrollo embrionario durante la migración y compactación de las células endocrinas, aunque la arquitectura celular final del islote se defina durante la maduración posnatal (2). A su vez, un estudio realizado por Cortijo et al. (61) mostró que el bloqueo de los receptores *Celsr2* y *Celsr3* de la vía PCP, durante el E14.5, provoca la disminución de células endocrinas positivas para el gen de insulina. Así mismo, Bader et al. (5) indicaron que las células β inmaduras recién compactadas en protoislotes durante el E18.5, tienen una expresión elevada de *Nkx-6.1*, mientras que las células β inmaduras aún no compactadas, muestran baja



expresión de este FT. Se ha observado que Nkx-6.1 regula la proliferación de las células β inmaduras y regula positivamente la expresión de marcadores como *Glut2*, el cual está involucrado en la secreción de insulina. Por lo tanto, sugerimos que esta etapa es importante para diversos eventos moleculares que probablemente promuevan el proceso de maduración durante la etapa posnatal.

Por su parte, un trabajo realizado por Nicholas et al. (14), mostró que las células β de machos gestados por madres obesas, muestran características relacionadas con la inmadurez. Estos cambios incluyen: disminución en los niveles de GK, niveles bajos de *Cacna1c* y *Cacna1d* (genes relacionados con canales de calcio), y una menor cantidad de gránulos de insulina acoplados a membrana. De manera similar Cerf et al. (62), observaron que las células β de la descendencia masculina de ratas obesas, mostraron una disminución en los niveles de mRNA de GK, así como una disminución en la actividad de esta enzima. Por último, Tuohetimulati et al. (17) reportaron un incremento en la proliferación de células β de ratones macho descendientes de madres obesas. Estas observaciones en modelos de obesidad materna podrían relacionarse con las características de las células β inmaduras (5). Por lo tanto, es probable que el aumento en la proporción de células β inmaduras, así como la disminución en la proporción de células β maduras en la descendencia masculina, podría ser consecuencia de la obesidad materna durante el desarrollo embrionario de la rata.

No se conocen bien los mecanismos por los cuales la obesidad materna podría afectar el desarrollo embrionario. Sin embargo, diversos estudios han mostrado que la obesidad materna provoca un aumento en las concentraciones intrauterinas de lípidos, glucosa e insulina. Se ha mostrado que gran variedad de moléculas derivadas de lípidos como el diacilglicerol o bien los ácidos grasos libres, pueden actuar como activadores de la transcripción o como moléculas de señalización. Por otro lado, se ha demostrado que durante la obesidad los niveles de factor de crecimiento transformante β (TGF β) aumentan. Además, se ha demostrado que el TGF β materno es capaz de atravesar la placenta (63,64). En este sentido, las alteraciones en las concentraciones de las moléculas mencionadas provenientes de las madres obesas durante la gestación podrían provocar alteraciones en el desarrollo de la célula β durante la embriogénesis.



El cambio en la proporción células β maduras/inmaduras podría provocar intolerancia a la glucosa en ratas macho descendientes de madres obesas

En nuestro modelo animal, la obesidad materna indujo intolerancia a la glucosa en la descendencia de ratas macho F1 OBS, sin cambios en la sensibilidad a la insulina y con cambios en la proporción de las subpoblaciones de células β ; menos proporción de células β maduras y más proporción de células β inmaduras. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la intolerancia a la glucosa mostrada por F1 OBS podría ser consecuencia de la disminución de la secreción de insulina estimulada por glucosa, debida en parte, a la disminución de células β maduras que pudieran responder al estímulo de glucosa durante la IPGTT. Por otro lado, alteraciones como la intolerancia a la glucosa, progresivamente pueden conducir al desarrollo de enfermedades como la DM2 (65). Esto proporciona evidencia de que cambios en la proporción de las subpoblaciones podría alterar la concentración hormonal neta del páncreas y por lo tanto, inducir alteraciones metabólicas en la descendencia durante el transcurso de su vida.

Consideramos importante la integración de la descendencia compuesta por hembras de madres obesas en futuras investigaciones, puesto que en humanos existe mayor prevalencia de obesidad en este sexo (6). Por otro lado, el comparar a la descendencia de ambos sexos podría ayudar a entender el efecto de la obesidad materna y el papel del dimorfismo sexual en el desarrollo de las subpoblaciones de células β . Así mismo, en los últimos años la investigación sobre las subpoblaciones ha ido en aumento. Muchos investigadores han propuesto terapias para inducir la proliferación de células β , por lo que una alternativa sería dirigir las terapias a células β inmaduras para así aprovechar su mayor potencial proliferativo con la intención de restaurar la MCB disminuida durante la DM2 (4,27,66). Sin embargo, para que esto se lleve a cabo, primero es importante comprender las señales que regulan el proceso de maduración de las células β a lo largo de la vida de un individuo. Por último, la obesidad materna es considerada como un factor de riesgo para la aparición de enfermedades metabólicas en la descendencia. A pesar de ello, aún no se le ha dado la suficiente importancia, por lo tanto, es fundamental seguir



realizando estudios que demuestren el efecto de la obesidad materna sobre la progenie, y así, proporcionar información preventiva a las mujeres en edad reproductiva.

IX. CONCLUSIONES

- El consumo de dieta alta en grasa indujo en hembras obesidad y alteraciones metabólicas como glucosa en ayuno elevada, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina
- Las hembras alimentadas con dieta alta en grasa no mostraron cambios en la masa de los islotes ni en la proporción de células β maduras e inmaduras
- La obesidad materna provocó en la progenie intolerancia a la glucosa y cambios en la proporción de células β maduras e inmaduras.
- En la progenie de madres obesas hubo un incremento de la proporción de células β inmaduras y una disminución de la proporción de células β maduras.
- Los cambios observados en los hijos de madres obesas indican que se estableció un modelo murino de obesidad materna



X. REFERENCIAS

1. Hiriart M, Velasco M, Diaz-Garcia CM, Larqué C, Sánchez-Soto C, Albarado-Ibañez A, et al. Pancreatic β cells in metabolic syndrome. En: Islam MdS, editor. Islets of Langerhans. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015. p. 817–44.
2. Bastidas-Ponce A, Scheibner K, Lickert H, Bakhti M. Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development. *Development*. 2017 Ago 15;144(16):2873–88.
3. Geron E, Boura-Halfon S, Schejter ED, Shilo B-Z. The edges of pancreatic islet β cells constitute adhesive and signaling microdomains. *Cell Rep*. 2015 Ene 20;10(3):317–25.
4. Roscioni SS, Migliorini A, Gegg M, Lickert H. Impact of islet architecture on β -cell heterogeneity, plasticity and function. *Nat Rev Endocrinol*. 2016 Dic;12(12):695–709.
5. Bader E, Migliorini A, Gegg M, Moruzzi N, Gerdes J, Roscioni SS, et al. Identification of proliferative and mature β -cells in the islets of Langerhans. *Nature*. 2016 Jul 21;535(7612):430–4.
6. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición [Internet]. [último acceso 2022 Feb 6]. Disponible en: <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/index.php>
7. Obesidad y sobrepeso [Internet]. [último acceso 2020 Oct 23]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
8. Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. Los colores del tejido adiposo. *GMM*. 2020 Feb 19;156(2).
9. Tchkonja T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab*. 2013 May 7;17(5):644–56.
10. Yazıcı D, Sezer H. Insulin resistance, obesity and lipotoxicity. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:277–304.
11. Wauman J, Zabeau L, Tavernier J. The leptin receptor complex: heavier than expected? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 Feb 21;8:30.
12. Eizirik DL, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nat Rev Endocrinol*. 2020 Jul;16(7):349–62.



13. Portha B, Grandjean V, Movassat J. Mother or Father: Who Is in the Front Line? Mechanisms Underlying the Non-Genomic Transmission of Obesity/Diabetes via the Maternal or the Paternal Line. *Nutrients*. 2019 Ene 22;11(2).
14. Nicholas LM, Nagao M, Kusinski LC, Fernandez-Twinn DS, Eliasson L, Ozanne SE. Exposure to maternal obesity programs sex differences in pancreatic islets of the offspring in mice. *Diabetologia*. 2020;63(2):324–37.
15. Bringhenti I, Moraes-Teixeira JA, Cunha MR, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal obesity during the preconception and early life periods alters pancreatic development in early and adult life in male mouse offspring. *PLoS ONE*. 2013 Ene 31;8(1):e55711.
16. Bringhenti I, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. The insulin-signaling pathway of the pancreatic islet is impaired in adult mice offspring of mothers fed a high-fat diet. *Nutrition*. 2016 Oct;32(10):1138–43.
17. Tuohetimulati G, Uchida T, Toyofuku Y, Abe H, Fujitani Y, Hirose T, et al. Effect of maternal high-fat diet on pancreatic beta cells of the offspring. *Diabetol Int*. 2012 Dic;3(4):217–23.
18. Tamashiro KLK, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI, Moran TH. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes*. 2009 May;58(5):1116–25.
19. Shih HP, Wang A, Sander M. Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2013 Jul 31;29:81–105.
20. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 Dic 13;414(6865):799–806.
21. Velasco M, Díaz-García CM, Larqué C, Hiriart M. Modulation of ionic channels and insulin secretion by drugs and hormones in pancreatic beta cells. *Mol Pharmacol*. 2016 Sep;90(3):341–57.
22. Kasai H, Hatakeyama H, Ohno M, Takahashi N. Exocytosis in Islet β -Cells. En: Islam MdS, editor. *Islets of langerhans*, 2 ed. Dordrecht: Springer Netherlands; 2013. p. 1–32.
23. Burlison JS, Long Q, Fujitani Y, Wright CVE, Magnuson MA. Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells. *Dev Biol*. 2008 Abr 1;316(1):74–86.
24. Villasenor A, Chong DC, Henkemeyer M, Cleaver O. Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis. *Development*. 2010 Dic;137(24):4295–305.



25. Welcome To Netter Images [Internet]. [último acceso 2022 Feb 6]. Disponible en: <https://www.netterimages.com/>
26. Salinno C, Cota P, Bastidas-Ponce A, Tarquis-Medina M, Lickert H, Bakhti M. β -Cell Maturation and Identity in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 30;20(21).
27. Liu JSE, Hebrok M. All mixed up: defining roles for β -cell subtypes in mature islets. *Genes Dev*. 2017 Feb 1;31(3):228–40.
28. O'Dowd JF, Stocker CJ. Endocrine pancreatic development: impact of obesity and diet. *Front Physiol*. 2013 Jul 18;4:170.
29. Ehrie MG, Swartz FJ. Diploid, tetraploid and octaploid beta cells in the islets of Langerhans of the normal human pancreas. *Diabetes*. 1974 Jul;23(7):583–8.
30. Kitahara A, Adelman RC. Altered regulation of insulin secretion in isolated islets of different sizes in aging rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979 Abr 27;87(4):1207–13.
31. Bonner-Weir S. Morphological evidence for pancreatic polarity of beta-cell within islets of Langerhans. *Diabetes*. 1988 May;37(5):616–21.
32. Avrahami D, Klochendler A, Dor Y, Glaser B. Beta cell heterogeneity: an evolving concept. *Diabetologia*. 2017 Ago;60(8):1363–9.
33. Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab*. 2004 Sep;30(4):294–309.
34. Frühbeck G, Méndez-Giménez L, Fernández-Formoso J-A, Fernández S, Rodríguez A. Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev*. 2014 Jun;27(1):63–93.
35. Pedro PF, Tsakmaki A, Bewick GA. The glucose tolerance test in mice. *Methods Mol Biol*. 2020;2128:207–16.
36. Lee JS, Bruce CR, Tunstall RJ, Cameron-Smith D, Hugel H, Hawley JA. Interaction of exercise and diet on GLUT-4 protein and gene expression in Type I and Type II rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2002 May;175(1):37–44.
37. Brozinick JT, Etgen GJ, Yaspelkis BB, Ivy JL. Glucose uptake and GLUT-4 protein distribution in skeletal muscle of the obese Zucker rat. *Am J Physiol*. 1994 Jul;267(1 Pt 2):R236-43.
38. Boland BB, Rhodes CJ, Grimsby JS. The dynamic plasticity of insulin production in β -cells. *Mol Metab*. 2017 May 4;6(9):958–73.



39. Weir GC, Bonner-Weir S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 Abr;1281:92–105.
40. Karaca M, Magnan C, Kargar C. Functional pancreatic beta-cell mass: involvement in type 2 diabetes and therapeutic intervention. *Diabetes Metab.* 2009 Abr;35(2):77–84.
41. Diagnóstico | ADA [Internet]. [último acceso 2022 Ene 18]. Disponible en: <https://www.diabetes.org/diagnostico>
42. Chavey A, Ah Kioon MD, Bailbé D, Movassat J, Portha B. Maternal diabetes, programming of beta-cell disorders and intergenerational risk of type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2014 Nov;40(5):323–30.
43. Cerf ME. High fat programming of beta-cell failure. *Adv Exp Med Biol.* 2010;654:77–89.
44. Huang Y-H, Ye T-T, Liu C-X, Wang L, Chen Y-W, Dong Y. Maternal high-fat diet impairs glucose metabolism, β -cell function and proliferation in the second generation of offspring rats. *Nutr Metab (Lond).* 2017 Nov 2;14:67.
45. Zambrano E, Sosa-Larios T, Calzada L, Ibáñez CA, Mendoza-Rodríguez CA, Morales A, et al. Decreased basal insulin secretion from pancreatic islets of pups in a rat model of maternal obesity. *J Endocrinol.* 2016 Ago 5;231(1):49–57.
46. Graus-Nunes F, Dalla Corte Frantz E, Lannes WR, da Silva Menezes MC, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Pregestational maternal obesity impairs endocrine pancreas in male F1 and F2 progeny. *Nutrition.* 2015 Feb;31(2):380–7.
47. Fernandez-Twinn DS, Hjort L, Novakovic B, Ozanne SE, Saffery R. Intrauterine programming of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2019 Ago 27;62(10):1789–801.
48. Marinho T de S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Pancreatic islet stereology: estimation of beta cells mass. *Int J Morphol.* 2019 Dic;37(4):1331–4.
49. Srinivasan M, Aalinkeel R, Song F, Mitrani P, Pandya JD, Strutt B, et al. Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Ene;290(1):E129–34.
50. Miranda J, Eseberri I, Lasa A, Portillo MP. Lipid metabolism in adipose tissue and liver from diet-induced obese rats: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley strains. *J Physiol Biochem.* 2018 Nov 9;74(4):655–66.



51. Anthonen MW, Rönstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem.* 1998 Ene 2;273(1):215–21.
52. Wu Q, Ortegon AM, Tsang B, Doege H, Feingold KR, Stahl A. FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol.* 2006 May;26(9):3455–67.
53. Stevens J, Green MH, Kaiser DL, Pohl SL. Insulin resistance in adipocytes from fed and fasted obese rats: dissociation of two insulin actions. *Mol Cell Biochem.* 1981 Jul;37(3):177–83.
54. Bazotte RB, Silva LG, Schiavon FP. Insulin resistance in the liver: deficiency or excess of insulin? *Cell Cycle.* 2014;13(16):2494–500.
55. Kim JY, Bacha F, Tfayli H, Michaliszyn SF, Yousuf S, Arslanian S. Adipose tissue insulin resistance in youth on the spectrum from normal weight to obese and from normal glucose tolerance to impaired glucose tolerance to type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2019 Feb;42(2):265–72.
56. Cnop M. Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans.* 2008 Jun;36(Pt 3):348–52.
57. Saisho Y, Butler AE, Manesso E, Elashoff D, Rizza RA, Butler PC. β -cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. *Diabetes Care.* 2013 Ene;36(1):111–7.
58. Tschen S-I, Dhawan S, Gurlo T, Bhushan A. Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. *Diabetes.* 2009 Jun;58(6):1312–20.
59. Velasco M, Larqué C, Gutiérrez-Reyes G, Arredondo R, Sanchez-Soto C, Hiriart M. Metabolic syndrome induces changes in KATP-channels and calcium currents in pancreatic β -cells. *Islets.* 2012 Ago;4(4):302–11.
60. Wen J, Xue T, Huang Y, Chen X, Xue Y, Lin W, et al. Is β -cell aging involved in the pathogenesis of diabetes? *J Diabetes.* 2017 Jul;9(7):707–16.
61. Cortijo C, Gouzi M, Tissir F, Grapin-Botton A. Planar cell polarity controls pancreatic beta cell differentiation and glucose homeostasis. *Cell Rep.* 2012 Dic 27;2(6):1593–606.
62. Cerf ME, Williams K, Chapman CS, Louw J. Compromised beta-cell development and beta-cell dysfunction in weanling offspring from dams maintained on a high-fat diet during gestation. *Pancreas.* 2007 Abr;34(3):347–53.



63. Jiang Y, Fischbach S, Xiao X. The role of the $\text{tgfb}\beta$ receptor signaling pathway in adult beta cell proliferation. *Int J Mol Sci*. 2018 Oct 12;19(10).
64. Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, Roche NS, Sporn MB, Roberts AB. Maternal recusé of transforming growth factor-beta 1 null mice. *Science*. 1994 Jun 24;264(5167):1936–8.
65. Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA, Heine RJ, Henry RR, Pratley R, et al. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes Care*. 2007 Mar;30(3):753–9.
66. Gutierrez GD, Gromada J, Sussel L. Heterogeneity of the pancreatic beta cell. *Front Genet*. 2017 Mar 6;8:22.

