



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Cambio en la expresión del gen de insulina en un modelo  
de síndrome metabólico en rata**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**ANDREA GARCIAFARRÉ SEMITIEL**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia**

**2015**

**Ciudad Universitaria, D. F.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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



**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.



## Hoja de datos del jurado

1. Datos del Alumno	
Nombre	Andrea
Apellido paterno	Garciafarré
Apellido materno	Semitiel
Teléfono	56-06-09-43
Universidad	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	307516976
2. Datos del Tutor	
Grado	Doctora
Nombre (s)	Marcia
Apellido paterno	Hiriart
Apellido materno	Urdanivia
3. Datos del Sinodal 1	
Grado	Doctora
Nombre (s)	Tatiana
Apellido paterno	Fiordelisis
Apellido materno	Coll
4. Datos del Sinodal 2	
Grado	Doctora
Nombre (s)	Claudia Andrea
Apellido paterno	Segal
Apellido materno	Kischinevzky
5. Datos del Sinodal 3	
Grado	Doctor
Nombre (s)	René de Jesús
Apellido paterno	Cárdenas
Apellido materno	Vázquez
6. Datos del Sinodal 4	
Grado	Maestro en Ciencias
Nombre (s)	Miguel Angel
Apellido paterno	Palomino
Apellido materno	Garibay
7. Datos del trabajo escrito	
Título	Cambio en la la expresión del gen de insulina en un modelo de síndrome metabólico en rata
Número de páginas	58p.
Año	2015

*A mis padres y hermanas por su apoyo y cariño*

*A mi abuelita querida por escucharme siempre*

*A mis adoradísimos amigos*

*A Juan Cristóbal*

## **Agradecimientos**

Marcia, gracias por tu enorme solidaridad y apoyo, por darme la oportunidad de realizar mi proyecto en este laboratorio e integrarme a tu grupo de investigación.

Myrian, gracias por apoyarme y guiarme con la mejor disposición, por resolver mis dudas, por tu tolerancia y sobre todo gran amistad.

A Tonatiuh Molina Villa y a Carlos Larqué por su tiempo y generosidad.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio BL-102 del Instituto de Fisiología Celular. Sin ustedes no hubiera sido lo mismo. Los quiero mucho.

A Carmen Sánchez Soto por ser siempre tan amable conmigo.

A Félix Sierra por su ayuda técnica.

A Carlos Castellanos de la Unidad de Citofluorometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su apoyo técnico.

A los miembros del jurado, la Dra. Claudia Segal, la Dra. Tatiana Fiordeliso, el Dr. René Cárdenas y el M. en C. Miguel Angel Palomino por la revisión de este trabajo.

Este proyecto de tesis se hizo bajo la dirección de la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia en el laboratorio BL 102 del departamento de Neurodesarrollo en el Fisiología en el Instituto de Fisiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo se realizó con el apoyo de DGAPA- PAPIIT No: IN215611.

# Índice

<b>1. Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b>	
2.1. El páncreas y la función del islote pancreático .....	2
2.2. La insulina.....	4
2.2.1. Biosíntesis de insulina .....	4
2.2.2. La célula $\beta$ y la secreción de insulina .....	6
2.2.3 Señalización de la insulina en sus tejidos blanco y su papel en el metabolismo .....	8
2.3. Síndrome metabólico .....	10
2.3.1. Fisiopatología del síndrome metabólico.....	12
2.3.2 Disfunción de la célula $\beta$ y diabetes mellitus tipo 2.....	20
2.3.3 Modelos animales de síndrome metabólico.....	23
<b>3. Planteamiento del problema.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>27</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>6. Metodología .....</b>	<b>28</b>
6.1 Modelo animal .....	29
6.2 Caracterización del síndrome metabólico.....	29
6.2.1 Cuantificación de glucosa, insulina y triglicéridos .....	29
6.2.2 Parámetros somatométricos.....	30
6.3 Cultivo primario de células insulares.....	30
6.3.1 Digestión con colagenasa P.....	30
6.3.2 Colección de islotes pancreáticos.....	31
6.3.3 Digestión con tripsina.....	31
6.4 Aislamiento de células $\beta$ por citometría de flujo basada en fluorescencia (FACS).....	31
6.5 Análisis de inmunofluorescencia para la detección de insulina y procesamiento de imágenes .....	32
6.6 Extracción de RNA total.....	33
6.7 RT-PCR.....	34
6.8 PCR en tiempo real .....	34
6.9 Análisis estadístico y representaciones gráficas .....	36
<b>7. Resultados.....</b>	<b>37</b>
.....	<b>37</b>
7.1 Caracterización del síndrome metabólico.....	37
7.2. Análisis de inmunofluorescencia para la detección de insulina en células aisladas por FACS .....	40
7.3 Análisis del cambio en la expresión del gen de insulina .....	41

<b>8. Discusión</b> .....	<b>44</b>
8.1 Los animales de los grupos experimentales, que ingirieron una solución de sacarosa al 20% (p/v) durante 24 semanas, desarrollaron síndrome metabólico. ....	45
8.2 Cambio en la expresión del gen de insulina .....	47
<b>9. Conclusiones y perspectivas</b> .....	<b>50</b>
<b>10. Referencias</b> .....	<b>51</b>
<b>11. Anexo</b> .....	<b>58</b>

## Abreviaturas

**$\alpha$ -MSH** Hormona estimuladora de melanocitos

**ADP** Adenosín difosfato

**AGL** Ácidos grasos libres

**AHA/NHLBI**: American Heart Association/ National Heart, Lung and Blood Institute

**AgPRP** Proteína relacionada a agouti

**Apo A** Apolipoproteína A

**ATP** Adenosín trifosfato

**BSA** Albúmina sérica bovina

**Cbl**: Proteína del linfoma de linaje B-casitas

**CEPT** Proteína transportadora de ésteres de colesterol

**CCK** Colecistocinina

**DT2** Diabetes mellitus tipo 2

**eNOS** Óxido nítrico sintasa endotelial

**ET-1** Endotelina 1

**FACS** Citometría de flujo basada en fluorescencia

**FAS** Enzima ácido grasa sintasa

**FITC-A** Intensidad de fluorescencia en área

**FSC-A** Dispersión frontal de luz en área

**FSC-H** Dispersión de luz frontal en altura

**Gab-1**: Ligador asociado a GRB-1

**GABA** Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GADPH** Gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa

**GIP** Péptido inhibitorio gástrico

**GLP-1** Péptido parecido al glucagon tipo 1

**GLUT1** Transportador de glucosa tipo 1

**GLUT2** Transportador de glucosa tipo 2

**GLUT4** Transportador de glucosa tipo 4

**HDL** Lipoproteínas de alta densidad

**HDL-c** Lipoproteínas de alta densidad unidas a colesterol

**HK2** Hexoquinasa II

**IAS** (por sus siglas en inglés) : Sociedad Internacional de Aterosclerosis.

**IASO** (por sus siglas en inglés): Sociedad Internacional para el estudio de la obesidad

**IDF**: International Diabetes Foundation

**IR** Receptor de insulina

**IRS** Sustrato de receptor de insulina

**IL-1 $\beta$**  Interleucina 1 $\beta$   
**IL-6** Interleucina 6  
**IMC** Índice de masa corporal  
**KATP** Canales de potasio sensibles a ATP  
**LDL** Lipoproteínas de baja densidad  
**LIL** Lipoproteínas de densidad intermedia  
**LPL** lipoproteinlipasas  
**MAP** Cinasas activadas por mitógenos  
**MCP-1** Proteína quimioatrayante de monocitos 1  
**NCEP ATP III:** National Cholesterol Education Programe Adult Treatment Panel III  
**NGF** Factor de crecimiento neuronal  
**NPY** Neuropeptido Y  
**pA/pF** Picoamperios/ picofaradios: densidad de corriente  
**PBS** Amortiguador de fosfatos salinos  
**PFH** Paraformaldehído  
**PFKI** Fosfofructoquinasa hepática  
**PI3K** Fosfatidilinositol- 3 cinasa  
**OMS** Organización Mundial de Salud  
**RER** Retículo endoplásmico rugoso  
**RNA** Ácido ribonucleico  
**ROS** Especies reactivas del oxígeno  
**Shc:** Homología src 2  
**SSC-A** Dispersión lateral de luz en área  
**SIR** Receptor soluble de insulina  
**TNF $\alpha$**  Factor de necrosis tumoral  
**VLDL** Lipoproteínas de muy baja densidad

## 1. Resumen

El síndrome metabólico es un conjunto de signos que aumentan el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 (DT2) y algunos tipos de cáncer. Está caracterizado por la presencia de al menos tres de los siguientes indicadores de riesgo: obesidad central, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, dislipidemia (niveles bajos de colesterol HDL y niveles altos de triglicéridos), hipertensión arterial y resistencia a la insulina. El síndrome metabólico es una enfermedad multifactorial en la que interactúan factores genéticos y ambientales, y su prevalencia está asociada a la falta de actividad física y al consumo excesivo de alimentos, dentro de los cuales se encuentran las bebidas con azúcares añadidos.

Existe un gran número de modelos animales para estudiar la DT2 y el síndrome metabólico. En nuestro laboratorio, en el Instituto de Fisiología de la UNAM, se ha caracterizado un modelo de síndrome metabólico en ratas macho de la cepa Wistar. El modelo consiste en suministrar una solución de sacarosa al 20 % (p/v) como agua de bebida de 8 o 24 semanas. Los grupos experimentales desarrollan alteraciones metabólicas típicas del síndrome metabólico y se han analizado los cambios que experimentan varios tipos celulares, entre ellos las células  $\beta$  pancreáticas.

En el presente estudio, se reprodujo el modelo animal de síndrome metabólico por 24 semanas en ratas macho de la cepa Wistar y se llevó a cabo un análisis del cambio en la expresión del gen de insulina en células  $\beta$  pancreáticas.

Los resultados muestran que los animales de los grupos experimentales, que ingirieron una solución de sacarosa al 20 % durante 24 semanas, desarrollaron alteraciones metabólicas como: niveles elevados de glucosa, triglicéridos e insulina en ayuno, aumento de peso, incremento en la circunferencia abdominal y grasa visceral. Asimismo, se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen de insulina en células beta pancreáticas de ratas con síndrome metabólico.

## 2. Introducción

### 2.1 El páncreas y la función del islote pancreático

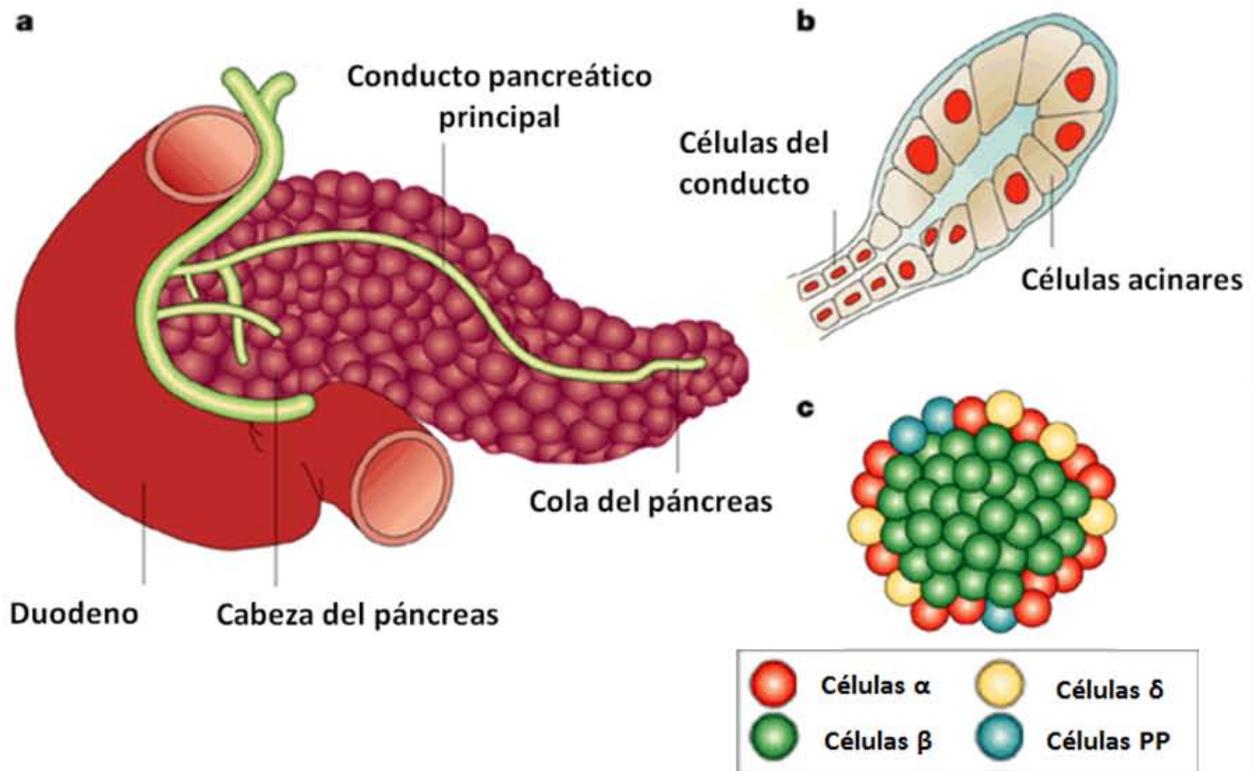
En los mamíferos la glucosa es un sustrato metabólico esencial, pues es la principal fuente de producción de energía y es indispensable para la sobrevivencia de las células. A pesar de las grandes variaciones que tiene en el organismo, dependiendo de las comidas y el ayuno, se mantiene en un intervalo relativamente estrecho, entre 4 y 8 mM/L (70 -150 mg/dL). Esto es posible porque hay un balance entre diferentes mecanismos dentro de los cuales las hormonas del islote pancreático tienen un papel primordial (Hiriart, 2005; Barret et al., 2010).

El páncreas es una glándula de secreción mixta; tiene un componente endocrino y otro exocrino (figura 1.1). La mayor parte del páncreas está formada por el tejido exocrino compuesto de células acinares y conductos, que secretan y transportan enzimas digestivas y bicarbonato hacia el duodeno; estos últimos son necesarios para la digestión de los alimentos y la absorción de nutrientes (Hiriart, 2005; In't Velt P. y Marichal M., 2010).

El componente endocrino está formado por grupos de células, dispersos en el tejido acinar, denominados islotes pancreáticos que constituyen únicamente del 1 al 2% del volumen total del páncreas. El diámetro de los islotes es muy variable, entre 50 y 500  $\mu\text{m}$  y está compuesto de 50 a 300 células (Hiriart, 2005) .

Hay cuatro tipos principales de células dentro del islote pancreático: las células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y PP, que sintetizan hormonas peptídicas y las secretan al torrente sanguíneo. Las células  $\alpha$  secretan glucagon y constituyen del 15 al 20 % del volumen del islote, las células  $\delta$  secretan somatostatina y representan del 5 al 10 % del islote, las células PP secretan polipéptido pancreático y constituyen únicamente el 2% del islote y las células  $\beta$  secretan insulina y son el tipo celular más abundante dentro del islote pancreático; constituyen del 70 al 75% del volumen insular (Hiriart, 2005; Taborsky GJ, 2010). Recientemente se describió un quinto tipo celular dentro del islote pancreático, las células  $\epsilon$ , las cuales secretan ghrelina y representan menos del 1% de las células del islote (Revisado en In't Velt P. y Marichal M., 2010).

En los roedores las células del islote pancreático tienen un arreglo particular; las células  $\beta$  se localizan en el centro y los otros tipos celulares en la periferia. Este arreglo celular es menos evidente en el humano y otras especies (Hiriart, 2005; Cabrera et al., 2006).



**Figura 1.1 Estructura del páncreas endocrino y exocrino.** a) El páncreas maduro está situado en la cavidad abdominal y se encuentra adyacente al duodeno. b) El páncreas exocrino está formado por las células acinares y del conducto, que secretan y transportan enzimas digestivas y bicarbonato hacia el duodeno. c) El páncreas endocrino está formado por cuatro tipos de células productoras de hormonas peptídicas: las células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y PP, que constituyen al islote pancreático (Modificado de Edlund, 2002). Las células  $\epsilon$  no se muestran en el esquema.

Las hormonas del islote pancreático tienen un papel fundamental en el control de la glucemia. El glucagon es secretado principalmente en condiciones de hipoglucemia y tiene efectos predominantemente catabólicos, ya que estimula la ruptura y utilización de proteínas, carbohidratos y lípidos a través de la gluconeogénesis, glucogenólisis, lipólisis y cetogénesis. Tales mecanismos aumentan la disponibilidad de glucosa, ácidos grasos y cetonas en el cerebro y tejidos periféricos. La hiperglucemia y el aumento en la concentración de ácidos grasos y cetonas disminuyen la secreción de glucagon (Barret et al., 2010; Hiriart, 2005).

La insulina es secretada, principalmente, en respuesta al aumento en la concentración plasmática de glucosa. Tiene una función anabólica; incrementa el almacenamiento de nutrientes: glucosa, ácidos grasos y aminoácidos e inhibe su liberación. La somatostatina en el islote pancreático, inhibe la secreción de glucagon, de polipéptido pancreático e insulina; a su vez, esta última, en concentraciones altas, inhibe la secreción de somatostatina; en cambio concentraciones altas de glucagon estimulan la secreción de insulina. El polipéptido pancreático inhibe la secreción exocrina del páncreas así como la secreción de insulina y somatostatina (Barret et al., 2010; Hiriart, 2005; Youos, 2011).

## *2.2 La insulina*

### **2.2.1. Biosíntesis de la insulina**

La insulina es una hormona peptídica con un peso molecular de 5700 a 6100 KDa, compuesta por dos cadenas de residuos de aminoácidos; la cadena A con 21 aminoácidos y la B con 30 aminoácidos. Tales cadenas están unidas por dos puentes disulfuro entre cisteínas y un tercer puente disulfuro se encuentra dentro de la cadena A (revisado en Rhodes, 2004; Hiriart, 2005).

En roedores, la transcripción del gen de insulina está regulada, principalmente por cuatro elementos en su región promotora; estos elementos son: A,C,E y CRE, los cuales determinan la localización de la insulina en la célula  $\beta$  y funcionan como sitios de unión de factores de transcripción que regulan la expresión del gen de insulina (Hay C.W. & Docherty K., 2006). Los elementos A están localizados en la región conservada del gen de insulina y se unen a PDX-1, Cdx2/3 y Is1-1 (revisado en Fu Z et al., 2013). Existen dos elementos C en el promotor de este gen, el elemento C1 forma complejos con MafA y RIPE3b2. MafA es expresado exclusivamente en las células  $\beta$  pancreáticas maduras y media la expresión del gen de insulina regulada por glucosa y ácidos grasos. Asimismo, contribuye a la diferenciación y función de las células  $\beta$  (revisado en Tsuchiya M. et al., 2015). El elemento C2 está conformado por una secuencia “aumentadora” denominada PISCES, la cual es un sitio de unión para PAX6, que es requerido para la transcripción normal del gen de insulina, otras hormonas y el desarrollo del islote pancreático. Los activadores del elemento E incluyen a BETA2/NeuroD1, el cual además de regular la transcripción del gen de insulina, es indispensable en la supervivencia de las células  $\beta$  pancreáticas. Respecto al elemento CRE, puede acoplarse en diferentes tipos de factores de transcripción que regulan la transcripción

del gen de insulina. La regulación de tales secuencias promotoras controlan el procesamiento de la preproinsulina en el retículo endoplásmico y el número de gránulos de insulina (revisado en: Fu Z et al., 2013).

El precursor de la insulina, la preproinsulina, está formado por la secuencia de proinsulina (cadenas A y B, y el péptido C) unida al péptido señal en el extremo terminal amino. El péptido señal dirige a la preproinsulina hacia la luz del retículo endoplásmico rugoso (RER). Dentro del RER, el péptido señal se separa dando lugar a la proinsulina, la cual se pliega y posteriormente se forman los puentes disulfuro. La proinsulina recién sintetizada es transportada hacia el aparato de Golgi en donde se condensa en gránulos secretores inmaduros, cubiertos de clatrina, que poseen las enzimas necesarias para el procesamiento de la proinsulina (Hiriart, 2005).

Durante la maduración de los gránulos secretores, se procesa la proinsulina; hay una acidificación progresiva al interior del gránulo y se pierde la cubierta de clatrina. En este medio, la proinsulina es convertida en insulina por ruptura proteolítica en dos sitios distintos de pares de aminoácidos básicos, en las uniones de la cadena A con el péptido C, y del péptido C con la cadena B (Rhodes, 2004; Hiriart, 2005).

La insulina es almacenada en forma de cristales hexaméricos, que están compuestos por tres dímeros de insulina estabilizados por dos átomos de zinc ( $Zn^{2+}$ ) y enlaces de hidrógeno, y donde el péptido C se encuentra rodeando a la estructura cristalina (Rhodes, 2004; Hiriart, 2005). Las células  $\beta$  tienen alrededor de 11,000 gránulos de secreción maduros y aproximadamente el 75 % de su masa contiene insulina y péptido C (Straub et al., 2009; Hiriart, 2005).

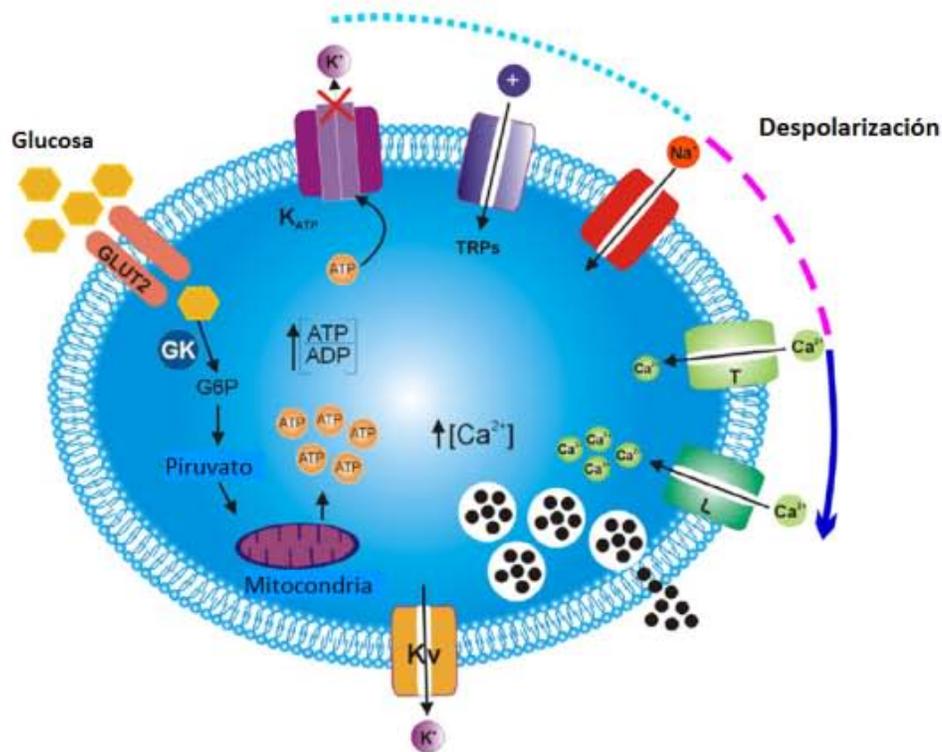
La biosíntesis de la proinsulina está regulada por nutrientes, neurotransmisores, hormonas y la actividad de cinasas de proteínas; sin embargo, la glucosa es el regulador fisiológico más importante para la biosíntesis de la proinsulina e insulina. La concentración extracelular de glucosa necesaria para estimular la síntesis de proinsulina e insulina es de 2 a 4 mM y de 4 a 6 mM, respectivamente (Rhodes, 2004).

### **2.2.2. La célula $\beta$ y la secreción de insulina**

Las células  $\beta$  pancreáticas son únicas en su tipo; funcionan como sensores energéticos y su principal función es producir, almacenar y secretar insulina. Las células  $\beta$  son eléctricamente excitables y tal actividad está relacionada con la secreción hormonal (Barg, 2003; Hiriart et al., 2014; Rhodes, 2004).

La secreción de insulina está regulada por un gran número de secretagogos, nutrientes, neurotransmisores y hormonas; sin embargo, en condiciones fisiológicas, el secretagogo más potente es la  $\alpha$ -D-glucosa (Hiriart, 2005; Hiriart et al., 2014).

Alrededor del 5% de la insulina almacenada por día es liberada en estado basal, es decir, en ausencia de estimulación. Lo anterior ocurre cuando la concentración extracelular de glucosa es inferior a 3 mM. En este estado la membrana de la célula  $\beta$  se encuentra en reposo, en un potencial de aproximadamente de -70 mV a -80 mV. Tal potencial de membrana se mantiene por el flujo constante de iones potasio ( $K^+$ ) a través de los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) y por una pequeña entrada de sodio (Hiriart et al., 2005; Hiriart y Aguilar- Bryan, 2008; Hiriart et al., 2014). Cuando la concentración extracelular de glucosa aumenta a 7 mM o más, ésta entra a la célula  $\beta$  por difusión facilitada a través del transportador GLUT2 (roedores) o GLUT1 (humanos), posteriormente entra en los ciclos metabólicos (glucólisis, el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa), lo cual da como resultado un incremento en la concentración de ATP y un aumento en la relación ATP/ADP (revisado en Hiriart y Aguilar-Bryan, 2008; Hiriart et al., 2014). Lo anterior induce el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ), que provoca una despolarización lenta de la membrana plasmática, simultáneamente entra  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  por los canales TRPs. Cuando ésta alcanza un voltaje cercano a -40 mV se abren, los canales sensibles a voltaje, de sodio y calcio tipo T que dejan pasar  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , respectivamente. Esto despolariza aún más la membrana plasmática, hasta que alrededor de los -20mV se activan los canales de calcio tipo L, los cuales tienen la mayor conductancia y permiten la entrada de iones  $Ca^{2+}$  a la célula, incrementando su concentración citoplasmática, que promueve la exocitosis de gránulos de insulina (Barg, 2003; Hiriart, 2005; Hiriart y Aguilar-Bryan, 2008) (Figura 1.2).



**Figura 1.2. Actividad eléctrica de la célula  $\beta$  pancreática.** Cuando hay un aumento en la concentración extracelular de glucosa (7 mM o más) esta entra a la célula por medio de los transportadores GLUT2. Dentro de la célula, la glucosa es metabolizada dando lugar a un aumento en la relación ATP/ADP; el ATP induce el cierre de los canales  $K_{ATP}$ , entra  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  a través de los canales TRPs, produciendo una despolarización lenta de la membrana. Esta despolarización provoca un aumento en la probabilidad de apertura de los canales de  $Na^+$  sensibles a voltaje y de  $Ca^{2+}$  tipo T. La entrada de iones  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  provoca una mayor despolarización de la membrana plasmática hasta activar a los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L. El influjo de iones  $Ca^{2+}$  incrementa la concentración de calcio intracelular y la exocitosis de los gránulos de insulina (Tomado y modificado de: Hiriart M. et al., 2014).

La secreción de insulina en respuesta a la glucosa es bifásica. La primera fase de secreción está caracterizada por una elevación rápida y transitoria de secreción de insulina, que dura entre 5 y 10 minutos; en esta fase se secreta alrededor del 2 % de la insulina almacenada en la célula  $\beta$ . En la segunda fase, la secreción de insulina es más lenta y sostenida; mientras permanezca alta la concentración extracelular de glucosa. (Barg, 2003; Hiriart, 2005; Hiriart y Aguilar-Bryan, 2008).

La glucosa ingerida es mejor estimulante de la secreción de insulina que aquella inyectada por vía endovenosa. Esto debido a que durante la digestión se liberan hormonas, en el duodeno, que potencian la secreción de insulina, conocidas como incretinas; entre ellas se encuentra el péptido parecido al glucagón 1 (GLP-1), el péptido inhibitorio gástrico (GIP) y la colecistocinina (CCK). Otras hormonas como el glucagón, aminoácidos como la alanina y la leucina, la activación

parasimpática y los ácidos grasos no esterificados pueden potenciar, de igual manera, la secreción de insulina (Hiriart, 2005;Hiriart et al., 2014; Stein et al., 1997).

### **2.2.3. Señalización de la insulina en sus tejidos blanco y su papel en el metabolismo**

La insulina es una hormona anabólica que controla la homeostasis de la glucosa en todo el organismo. Una de sus acciones más importantes es que aumenta la entrada de glucosa, sobre todo, al tejido adiposo y al músculo esquelético en reposo; asimismo, inhibe la producción de glucosa en el hígado. La insulina tiene un papel anabólico en el metabolismo de las proteínas: promueve el transporte de aminoácidos, la replicación del DNA y la síntesis proteica. De igual forma, inhibe la proteólisis y la oxidación de aminoácidos. La insulina actúa sobre el metabolismo de los electrolitos, ya que disminuye la concentración plasmática de potasio al estimular su entrada al hígado y a las células musculares. Además, la insulina regula otros procesos muy importantes como el crecimiento, la proliferación, la sobrevivencia y la diferenciación celular (Hiriart, 2005; Revisado en Meshkani, et al., 2009).

<b>Tejido</b>	<b>Acciones anabólicas (estimula )</b>	<b>Acciones anticatabólicas</b>
<b>Hepático</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntesis y almacenamiento de glucógeno</li> <li>• Lipogénesis (síntesis de triglicéridos)</li> <li>• Síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad</li> <li>• Síntesis de proteínas</li> <li>• Entrada de aminoácidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe la glucogenólisis</li> <li>• Inhibe la gluconeogénesis</li> <li>• Inhibe la producción de catecolaminas</li> <li>• Inhibe la cetogénesis</li> </ul>
<b>Adiposo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transporte y oxidación de glucosa</li> <li>• Lipogénesis</li> <li>• Entrada de lipoproteínas (LPL)</li> <li>• Síntesis de glucógeno</li> <li>• Síntesis de proteínas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe la lipólisis (lipasa sensible a hormona), con ello se reduce la liberación de ácidos grasos hacia la sangre.</li> </ul>
<b>Muscular</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transporte de glucosa y síntesis de glucógeno.</li> <li>• Entrada de aminoácidos</li> <li>• Síntesis de proteínas</li> <li>• Lipogénesis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe la proteólisis y la liberación de proteínas</li> </ul>

**Tabla 1.1 Acciones metabólicas de la insulina** (tomado y modificado de Hiriart, 2005)

La insulina viaja como monómero por el torrente sanguíneo hasta llegar a sus células diana donde interactúa con su receptor (IR), el cual es una proteína heterotetramérica compuesta por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  unidas por puentes disulfuro. Las subunidades  $\alpha$ , que forman el ectodominio también conocido como receptor soluble (SIR), se localizan en el exterior de la membrana plasmática y tienen sitios de unión para la insulina, en cambio las subunidades  $\beta$  tienen una porción extracelular, una transmembranal y una intracelular; en esta última se localiza el dominio con actividad de cinasa de tirosina. Este receptor se expresa en gran cantidad en los hepatocitos, los adipocitos y las células musculares, y se expresa en diversas cantidades en prácticamente todos los tejidos (Hiriart, 2005; revisado en Meshkani, et al., 2009; revisado en Myers y White, 2002).

Cuando no hay estímulo, las subunidades  $\alpha$  desempeñan un papel regulador sobre las subunidades  $\beta$ , de tal manera que inhiben la capacidad del receptor para autofosforilarse. Cuando la insulina se une a su receptor, las subunidades  $\alpha$  sufren cambios conformacionales que permiten que las subunidades  $\beta$  se activen y sean capaces de transfosforilarse en residuos de tirosina y que posteriormente, en cascada, se fosforilen tirosinas en sustratos específicos, como los sustratos del receptor de insulina (IRS del 1 al 6), Shc, Cbl y Gab-1<sup>1</sup>, que subsecuentemente activan moléculas de señalización río abajo (revisado en Meshkani, et al., 2009; Youngren, 2007). Se ha sugerido que los IRS median la mayor parte de la señalización celular por insulina. Estas proteínas pueden acoplarse no solo al IR, sino a otros receptores como al receptor de la hormona de crecimiento (GHR), a integrinas y a algunos receptores de interleucinas (Hiriart et al., 2014).

Tres principales vías de transducción son activadas por la insulina: la vía de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K/Akt), la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) y la vía CAP/Cb1/Tc10. La vía PI3K/Akt, es el principal mecanismo por el cual la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas; media el efecto de la insulina en el transporte de glucosa, síntesis de glucógeno, síntesis de proteínas, lipogénesis y la supresión de la gluconeogénesis hepática. La vía MAP- cinasas controla los efectos mitogénicos, el crecimiento y la diferenciación celular. La vía CAP/Cb1/Tc10 media la translocación del transportador de glucosa (GLUT 4) en el músculo y los adipocitos (Meshkani y Adeli, 2009).

---

<sup>1</sup> **IRS:** Sustrato de receptor de insulina

**Shc:** Homología src 2

**Cbl:** Proteína del linfoma de linaje B-casitas

**Gab-1:** Ligador asociado a GRB-1.

### 2.3. Síndrome metabólico

El síndrome metabólico es un conjunto de signos que aumentan el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 (DT2) y algunos tipos de cáncer (Balkau, 2007; Hunt, 2004). Está caracterizado por los siguientes signos: obesidad central e inflamación, intolerancia a la glucosa o alteración de la glucosa de ayuno, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia (niveles bajos de colesterol HDL y niveles altos de triglicéridos), hipertensión arterial y factores emergentes como la microalbuminuria e hiperuricemia (Eckel, 2005; Larqué, 2011; González, et al., 2011). Sin embargo, para poder diagnosticar síndrome metabólico, existen diversas definiciones que toman en cuenta distintos criterios (tabla 1.2).

<b>Factor de riesgo</b>	<b>NCEP ATP III (≥3 criterios)</b>	<b>AHA/NHLBI 3 criterios</b>	<b>IDF (Obesidad + ≥ 2 criterios)</b>	<b>OMS (Resistencia a la insulina + ≥2 criterios)</b>
Circunferencia abdominal/ índice de masa corporal (IMC)	>102 cm (hombres) > 88 cm (mujeres)	>101.6 cm (hombres) >88.9 cm (mujeres)	Específico para cada raza/etnia*	IMC >30 Kg/m y/o índice de cintura cadera: > 0.9 (hombres) >0.85 (mujeres)
Triglicéridos	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL o tratamiento para hipertrigliceridemia	≥ 150 mg/dL o tratamiento para hipertrigliceridemia	≥ 150 mg/dL
Colesterol HDL	<40 mg/dL(hombres) <50 mg/dL(mujeres)	<40 mg/dL (hombres) <50 mg/dL (mujeres) o tratamiento para colesterol HDL bajos.	<40 mg/dL (hombres) <50 mg/dL (mujeres) o tratamiento para colesterol HDL bajos.	<35 mg/dL ( hombres) <40 mg/dL (mujeres)
Presión arterial	≥ 130/85 mmHg o tratamiento para hipertensión	≥ 135/85 mmHg o tratamiento para hipertensión	≥130/85 mmHg o tratamiento para hipertensión	≥ 140/90 mmHg o tratamiento para hipertensión
Glucosa en ayuno/resistencia a la insulina	> 110 mg/dL o tratamiento para hiperglucemia	≥ 100 mg/dL o tratamiento para hiperglucemia	≥ 100 mg/dL o diagnóstico de diabetes mellitus	Intolerancia a la glucosa. Glucosa de ayuno alterada. Diabetes mellitus tipo 2
Microalbuminuria				>20 mg/mL
Proporción albúmina/creatinina				> 30 mg/g

**Tabla 1.2.** Modificado de Stolar Mark, 2007. <sup>2</sup>

<sup>2</sup> **NCEP ATP III:** National Cholesterol Education Programe Adult Treatment Panel III

En el año 2009, la IDF, AHA, NHLBI, IASO e IAS<sup>3</sup>, armonizaron la definición de síndrome metabólico; se postuló que para diagnosticarlo deben existir por lo menos tres de las siguientes cinco condiciones (Gallagher et al., 2010):

- Obesidad abdominal o central, donde se toma como referencia la circunferencia de cintura. Se toman en cuenta diferentes criterios para cada población o etnia.
- Hipertrigliceridemia:  $\geq 150$  mg/dL
- Concentraciones bajas de colesterol HDL:  $< 40$  mg/dL en hombres y  $< 50$  mg/dL en mujeres
- Valores altos de presión arterial:  $\geq 130/85$  mm Hg
- Alteración de la glucosa de ayuno :  $\geq 100$  mg/dL

El síndrome metabólico es una patología multifactorial en la que interactúan factores genéticos y ambientales. Su prevalencia está asociada a factores étnicos y sociodemográficos, a la falta de actividad física y al consumo excesivo de alimentos (Revisado en Velasco et al., 2012; Ford et al., 2002). Es mayor en mujeres que en hombres y aumenta en proporción directa con la edad. Según la definición de AHA/NHLBI, en México, el síndrome metabólico está presente en el 72.6 % de los pacientes obesos, en el 39.4 % de los pacientes con sobrepeso, en 87.5 % de los pacientes con diabetes, en 71.3 % de los pacientes con hipertrigliceridemia, en 70.5 % de los hipertensos y en 47.6 % de los pacientes con concentraciones bajas de colesterol HDL (Rojas et al., 2010).

Se ha observado que la activación crónica del sistema inmune, desórdenes en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, acciones alteradas de los glucocorticoides, estrés crónico, disfunción mitocondrial y producción de citocinas y otras hormonas secretadas por el tejido adiposo, tienen un rol importante en el desarrollo del síndrome metabólico (revisado en Simmons, 2010).

---

**AHA/NHLBI:** American Heart Association/ National Heart, lung and Blood Institute

**IDF:** International Diabetes Foundation

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**H:** hombres, **M:** mujeres.

\*Europeos:  $H \geq 94$  cm,  $M \geq 80$  cm; asiáticos del sur y chinos:  $H \geq 90$  cm,  $M \geq 80$  cm; japoneses:  $H \geq 85$  cm,  $M \geq 80$  cm; Sudamericanos y Centroamericanos  $H \geq 90$  cm,  $M \geq 80$  cm ; sub-Sahara africanos:  $H \geq 94$  cm,  $M \geq 80$  cm, este del mediterráneo y Arabia  $H \geq 94$  cm,  $M \geq 80$  cm.

<sup>3</sup> **IASO** (por sus siglas en inglés): Sociedad Internacional para el estudio de la obesidad

**IAS** (por sus siglas en inglés) : Sociedad Internacional de Aterosclerosis.

### **2.3.1 Fisiopatología del síndrome metabólico**

#### *Tejido adiposo y obesidad central*

La obesidad se define como una acumulación excesiva o anormal de tejido adiposo. Está condicionada por un desequilibrio entre la ingesta de alimento y el gasto energético que da como resultado un balance positivo de energía (Canizales, 2008).

El índice de masa corporal (IMC) es un elemento de diagnóstico para determinar el grado de obesidad que relaciona el peso con la talla ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ); sin embargo, la circunferencia abdominal es el parámetro más importante para determinar la obesidad central, la cual relaciona la adiposidad visceral y la resistencia a la insulina, que están fuertemente asociadas con el desarrollo DT2 y enfermedades cardiovasculares (Alberti et al., 2009; Yusuf et al., 2005).

En los mamíferos, el tejido adiposo se divide en dos tipos: tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo. En conjunto desempeñan un gran número de funciones metabólicas y endocrinas. Tienen un papel muy importante en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, sistema inmune e inflamación, la producción de esteroides, la hematopoyesis, la reproducción y la termorregulación. El tejido adiposo blanco secreta hormonas llamadas adipocinas que incluyen citocinas, y sintetiza proteínas que participan en la homeostasis vascular y la angiogénesis (Hotamisligil, 2006; Bohler et al., 2009).

El tejido adiposo blanco está distribuido en todo el organismo y es heterogéneo en relación a sus capacidades metabólicas y localización. El tejido adiposo visceral se encuentra rodeando a los órganos en la cavidad abdominal y el subcutáneo se encuentra debajo de la epidermis (Sánchez, et al., 2005). El tejido adiposo visceral tiene más efectos metabólicos adversos que el tejido adiposo localizado en otras regiones; tiene adipocitos hipertróficos, que liberan y secretan una mayor cantidad de ácidos grasos libres y adipocinas pro-inflamatorias. Asimismo, este tejido, está asociado con la acumulación de grasa ectópica, principalmente en hígado, corazón, páncreas, músculo esquelético y vasos. De igual forma, la resistencia a la insulina en este tejido se relaciona con el incremento del flujo de ácidos grasos libres y glicerolés hacia el hígado y al torrente sanguíneo, que provoca la síntesis y acumulación excesiva de triglicéridos y enfermedad de hígado graso no alcohólico (Skurk et al., 2007; Byrne, 2012).

El exceso de ácidos grasos libres en la circulación es redistribuido en otros tejidos que tienen un papel importante en el metabolismo de la glucosa, como el músculo, el hígado y el islote pancreático. Este proceso provoca que se acumulen, en estas células, metabolitos como el diacilglicerol, cadenas largas de acil- Co A y ceramidas, que intervienen en la vía de señalización de la insulina; como consecuencia a esto, surge una disminución en la acción de la insulina en estos tejidos (Yang et al., 2013).

De igual manera, la desproporción de ácidos grasos libres provoca un estado de inflamación crónica en el tejido adiposo, por el incremento en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, que incluyen al factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1). Las citocinas pueden interferir en la señalización de la insulina, además de regular de manera positiva genes proinflamatorios. El TNF $\alpha$  disminuye la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), de tal manera se atenúa la expresión de genes que participan en la fosforilación oxidativa en la mitocondria, lo que desencadena estrés oxidativo y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Boden, 2008; Gallagher et al., 2010; revisado en Rask-Madsen y Kahn, 2012).

El tejido adiposo blanco secreta adipocinas, como la leptina, resistina y adiponectina. La leptina actúa en el sistema nervioso central regulando la ingesta de alimento y el balance energético; también inhibe la acción de la insulina en el tejido adiposo blanco y disminuye la síntesis y liberación de insulina de las células  $\beta$ . En el síndrome metabólico y resistencia a la insulina también hay resistencia a la leptina; bajo esta condición hay aumento de adiposidad y puede haber intolerancia a la glucosa (Denroche et al., 2012; revisado en Gallagher et al., 2010).

Se ha observado que los niveles de resistina están elevados en modelos de obesidad en animales. Esta proteína está relacionada con la intolerancia a la glucosa, defectos en la acción de la insulina en el músculo esquelético y el aumento de la gluconeogénesis hepática. También, se ha propuesto que participa en la disfunción de la célula  $\beta$  pancreática y en el desarrollo de DT2 (Gao et al., 2009; revisado en Gallagher et al., 2010).

La adiponectina regula la ingesta de alimento, participa en el metabolismo de los ácidos grasos, de las proteínas y de la glucosa. Es una hormona antiinflamatoria y antiaterogénica y regula la sensibilidad a la insulina. El incremento del tejido adiposo visceral y la resistencia a la insulina están relacionados con la disminución de los niveles de adiponectina. La deficiencia de esta hormona

está ligada a los niveles altos de LDL y triglicéridos (revisado en Gallagher et al., 2010; Eckel, 2005).

### ***Resistencia a la insulina e hiperinsulinemia***

Inicialmente, la resistencia a la insulina fue propuesta por Reaven en 1988 como el factor patológico común en el síndrome X, y que favorecía el desarrollo de la alteración de la tolerancia a la glucosa, DT2, aumento de triglicéridos, colesterol HDL bajo e hipertensión (Reaven, 1988). Actualmente, el factor más importante y el que describe la fisiopatología del síndrome metabólico es la resistencia a la insulina (Eckel, 2005).

La resistencia a la insulina es un estado, no siempre patológico, en el que hay una disminución de la respuesta biológica a la actividad de la hormona en sus células diana: adipocitos, hepatocitos y células musculares, y da como resultado que la insulina no actúe adecuadamente en los tejidos. Bajo una condición de resistencia a la insulina, las células  $\beta$  son constantemente estimuladas y secretan mayor cantidad de insulina, a este estado se le conoce como hiperinsulinemia. Con el tiempo, la capacidad secretora de estas células puede perderse y aparecer, así, la hiperglucemia ( $> 7\text{mmol/L}$  o  $>126\text{ mg/dL}$ ), que se relaciona con el agotamiento de las células  $\beta$  y el desarrollo de DT2 (Hiriart et al., 2014; Velasco et al, 2012; Meshkani y Adeli, 2009).

En el hígado, los defectos en la señalización de la insulina y el desarrollo de la resistencia a la insulina son los mecanismos que tienen mayores consecuencias en el balance energético y el metabolismo. La resistencia a la insulina, en este tejido, está relacionada con anormalidades que incluyen hiperglucemia, dislipidemia y el incremento de factores de inflamación. Da como resultado una alteración en la síntesis de glucógeno y fallas para suprimir la síntesis de glucosa, que provoca la activación de la gluconeogénesis y la glucogenólisis. Asimismo, hay una sobreproducción de triglicéridos unidos a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés) y una disminución de HDL (Meshkani y Adeli, 2009; Gallagher et al., 2010).

La resistencia a la insulina en el tejido adiposo da como resultado una hidrólisis elevada de triglicéridos, que ocasiona un aumento de ácidos grasos libres en el plasma. La liberación excesiva de ácidos grasos libres, acil-CoA, diacilglicerol, citocinas y otros productos proinflamatorios promueven la resistencia a la insulina en el hígado y músculo esquelético; igualmente, provocan disfunción endotelial y disfunción de la célula  $\beta$  pancreática (Donath y Shoelson, 2011; Rask-

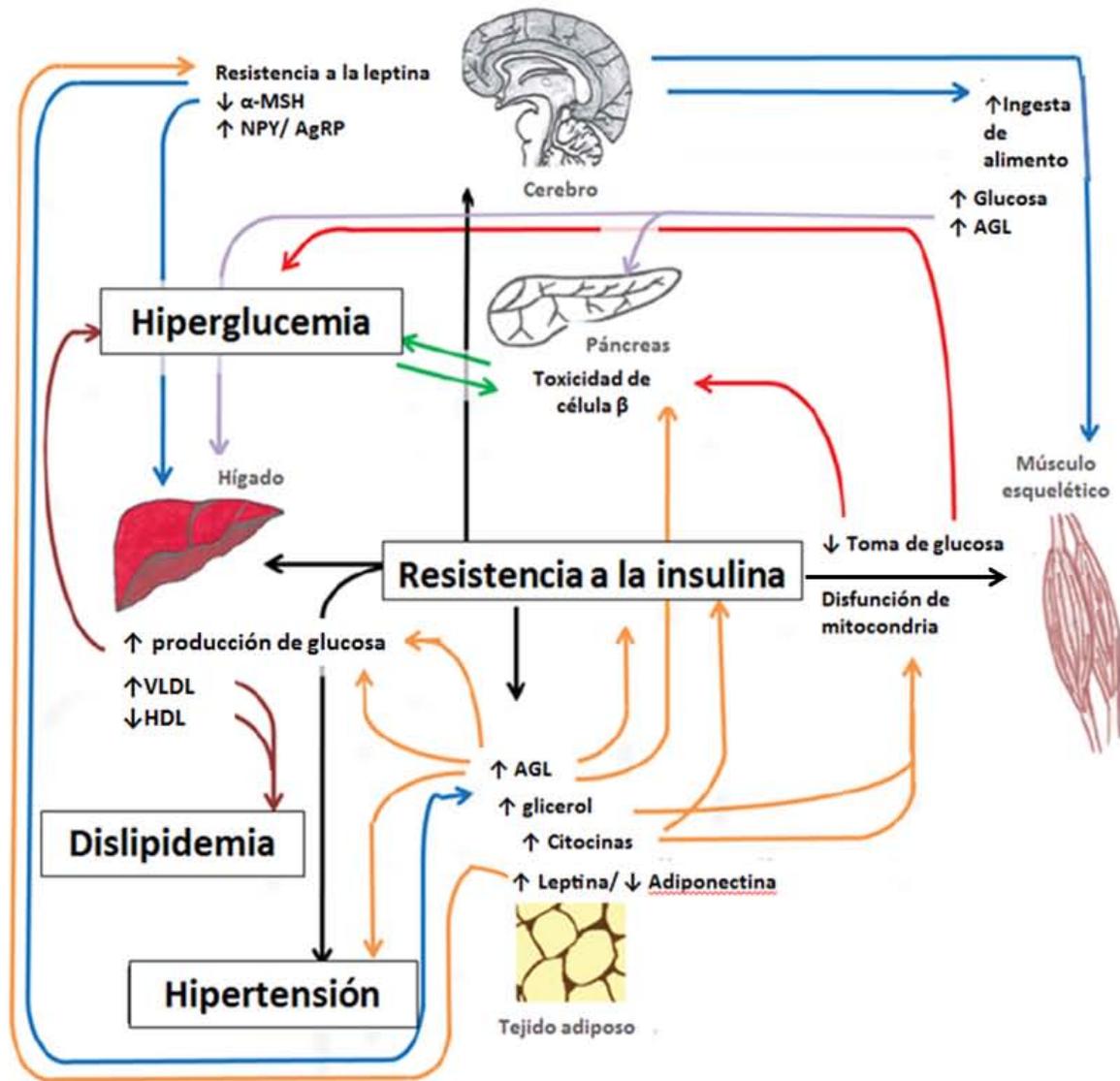
Madsen y Khan, 2012). En el músculo, hay una reducción en la toma de glucosa por la disminución en la translocación del transportador GLUT 4 (Rask-Madsen y Kahn, 2012).

La resistencia a la insulina también está presente en el hipotálamo y otras regiones del sistema nervioso central. Lo anterior da como resultado hiperglucemia de ayuno debido a que hay un fallo en la inhibición de la salida de glucosa hepática, estimulada por el nervio vago. De igual forma, la resistencia a la insulina en el hipotálamo incrementa la ingesta de alimento, ya que permite la síntesis y liberación de orexigénicos como el neuropéptido Y (NPY por sus siglas en inglés) y la proteína relacionada a agouti (AgRP por sus siglas en inglés), y disminuye la síntesis y liberación de anorexigénicos como la hormona estimuladora de melanocitos ( $\alpha$ -MSH) (Gallagher et al., 2010).

Las bases moleculares que describen la resistencia a la insulina no son del todo claras. Se ha propuesto que pueden participar múltiples mecanismos que incluyen: la formación anormal de moléculas de insulina, mutaciones en el receptor de insulina y sus sustratos, la participación de antagonistas de insulina, la disminución de receptores de insulina y de su actividad de cinasa, la disminución de los transportadores de glucosa, la actividad defectuosa en la señalización posterior a la unión de la insulina con su receptor y defectos en la señalización río abajo, que incluyen señales de transducción y fosforilaciones anormales. De todas estas alteraciones, el aumento en la fosforilación en residuos de serina/ treonina (Ser/Thr) a nivel del receptor de insulina o de los IRS se ha considerado como uno de los mecanismos clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina (revisado en Meshkani y Adeli, 2009; Biddinger y Kahn, 2006). El incremento en la fosforilación del receptor de insulina o de los IRS puede alterar su asociación con otras proteínas, bloquear sitios de fosforilación en tirosinas, disminuir su actividad e inducir su degradación (Le Roith et al., 2003; Sesti, 2006).

Modificaciones en la vía IRS-1 -PI3K/Akt dan lugar a la acción alterada de la insulina; sin embargo, la vía de las MAP-cinasas permanece activa y responde de manera normal a la insulina, también en tejidos que no son estrictamente sensibles a la insulina (Schalkwijk y Stehouwer, 2009).

En conjunto, la resistencia a la insulina causada, en gran medida, por la producción de adipocinas secretadas por el tejido adiposo, los niveles elevados de ácidos grasos libres y la disfunción de la mitocondria contribuyen al desarrollo de hipertensión arterial, dislipidemia, hiperglucemia y toxicidad de la célula  $\beta$  (figura 1.3) (Rask-Madsen y Kahn, 2012; Gallagher et al., 2010).



**Figura 1.3. Resistencia a la insulina en el desarrollo del síndrome metabólico.** La resistencia a la insulina provoca hipertensión por una falla en la inhibición de la endotelina-1 por óxido nítrico; también provoca una disminución en la toma de glucosa por sus tejidos blanco y aumento de ácidos grasos libres (AGL); el aumento de la glucosa en el plasma provoca hiperglucemia. Los niveles altos de AGL y glucosa provocan toxicidad de la célula  $\beta$  (líneas verdes y moradas). En el tejido adiposo aumenta la producción de citocinas, diacilglicerol y AGL. Los AGL contribuyen al desarrollo de la resistencia a la insulina en otros tejidos: provocan dislipidemia, producción de glucosa hepática y toxicidad en la célula  $\beta$ . El diacilglicerol promueve la disfunción de las mitocondrias. Las citocinas contribuyen al desarrollo de la resistencia a la insulina y a la disfunción de las mitocondrias. Se presenta hiperleptinemia debido a la resistencia a la leptina en el hipotálamo y hay una disminución de la producción de adiponectina, la cual se relaciona con la obesidad (líneas naranjas). La resistencia a la leptina, en el hipotálamo, aumenta la producción de orexigénicos (NPY/AgRP) y disminuye la producción de anorexigénicos ( $\alpha$ -MSH) lo que ocasiona una mayor ingesta de alimento que, en parte, contribuye al aumento del tejido adiposo y por lo tanto a la síntesis de adipocinas y citocinas, así como la liberación de AGL y diacilglicerol (líneas azules). La resistencia a la insulina hepática aumenta la producción de glucosa, contribuyendo así a la hiperglucemia; esto aumenta la síntesis de VLDL y la disminución de HDL (líneas café) (tomado y modificado de Gallagher et al., 2010).

## *Dislipidemia*

La dislipidemia, en el síndrome metabólico, se caracteriza por niveles elevados de triglicéridos, niveles bajos de colesterol HDL y niveles altos de colesterol LDL. Estos tres factores, contribuyen de manera importante en el desarrollo de la aterosclerosis y aumentan el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares (Mooradian, 2009). Como se mencionó anteriormente, la resistencia a la insulina en el hígado y el tejido adiposo, tiene un papel central en el desarrollo de la dislipidemia. Bajo estas condiciones, el metabolismo de los lípidos y de las lipoproteínas es severamente afectado (Meshkani y Adeli, 2009).

La resistencia a la insulina en el tejido adiposo suprime la acción antilipolítica de la insulina, dando como resultado un incremento en el flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado y la circulación. En el hígado, los ácidos grasos libres promueven la síntesis de triglicéridos, que a su vez estimulan la producción de apolipoproteína B (apo B) y VLDL ricas en triglicéridos (Adiels M et al., 2008; Mooradian, 2009). Igualmente, se reduce la toma de LDL por el hígado, debido a que hay una disminución de sus receptores; esto conduce a la acumulación de LDL y lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) en el torrente circulatorio. La oxidación de LDL consume el óxido nítrico; además, estas lipoproteínas, interactúan con especies reactivas de nitrógeno causando estrés nitrooxidante, que induce disfunción endotelial (Vallance y Chan, 2001). Adicionalmente, hay una reducción en la concentración de lipasas de lipoproteínas (LPL) en el músculo y tejido adiposo. Las LPL son enzimas que hidrolizan a los triglicéridos de las VLDL para dar lugar a ácidos grasos libres y glicerol, que son aprovechados por el tejido adiposo y el músculo. Tal alteración en las lipoproteinlipasas está relacionada con la hipertrigliceridemia (Eckel, 2005).

Esta dislipidemia, también, está caracterizada por la disminución en los niveles de colesterol HDL, debido a que hay cambios en su composición y metabolismo. Cuando hay un incremento de lipoproteínas ricas en triglicéridos, la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CEPT), que aumenta considerablemente en la resistencia a la insulina, restringe el flujo de triglicéridos de VLDL hacia HDL y se transfieren ésteres de colesterol desde HDL hacia VLDL y LDL, de modo que las partículas HDL se hacen más pequeñas, densas y afines a la lipasa hepática y a la LPL. Su degradación favorece que la ApoA-1 se disocie de las HDL pequeñas y sean filtradas y degradadas en el glomérulo y túbulo renal, respectivamente (Eckel et al., 2005; Mooradian, 2009).

Estudios a corto plazo muestran que el consumo excesivo de ciertos tipos de carbohidratos, como la fructosa, produce un incremento de triacilglicérol y VLDL en el plasma sanguíneo. El efecto que tiene la fructosa sobre la producción de triacilglicérol y VLDL es independiente al efecto que tiene la resistencia a la insulina (Fried y Rao, 2003).

La fructosa es catalizada de dos formas diferentes. Aquella capturada por el músculo, tejido adiposo y riñones es fosforilada a fructosa-6-fosfato por la hexocinasa y es incorporada a la vía glucolítica. En cambio, la fructosa capturada por el hígado es fosforilada, por la fructocinasa, a fructosa-1-fosfato y posteriormente es convertida a glicerol-3-fosfato, que sirve como esqueleto para la síntesis de triacilglicérol (Dashty M., 2013; Fried y Rao, 2003).

### *Intolerancia a la glucosa o alteración de la glucosa de ayuno*

La Federación Internacional de Diabetes (2011) define a la alteración de la glucosa de ayuno como un estado metabólico que se caracteriza por niveles de glucosa en sangre mayores a lo normal (70-100 mg/dL) pero no lo suficientemente elevados para diagnosticar diabetes (>126 mg/dL).

En humanos la intolerancia a la glucosa es diagnosticada por medio de una curva de tolerancia a la glucosa. Esta prueba mide la capacidad que tiene el organismo para metabolizar la glucosa. Se lleva a cabo administrando una carga de glucosa oral (75 gramos de glucosa disuelta en 250 mL de agua), posteriormente se toman muestras de sangre a intervalos regulares de tiempo (30- 60 minutos) por dos horas. Si la glucosa plasmática a las dos horas es mayor a 7.8 mmol/L (140 mg/dL) pero inferior a 11.1 mmol/L (200 mg/dL) el paciente presenta intolerancia a la glucosa (Federación Internacional de Diabetes, 2011).

Estudios en humanos, otros primates y roedores muestran que existe una relación estrecha entre la intolerancia a la glucosa o la glucosa alterada de ayuno y la resistencia a la insulina en tejidos sensibles a la insulina (Eckel, 2005).

### *Hipertensión*

La hipertensión, en el síndrome metabólico, se atribuye a mecanismos que están asociados con la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia, como la hiperactividad del sistema nervioso simpático, la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y la disminución o pérdida de la acción vasodilatadora de la insulina (revisado en Rask-Madsen y Kahn, 2012).

En sujetos sanos, la insulina puede estimular la vasodilatación y vasoconstricción por diversos mecanismos:

- Estimula la producción de óxido nítrico, que es un potente vasodilatador, a través de la vía de señalización P13K y la fosforilación de eNOS (Gallagher et al., 2010).
- Estimula la vasoconstricción por medio de la liberación de endotelina-1 por las células endoteliales a través de la vía de las MAP-quinasas (Gallagher et al., 2010).
- Disminuye la vasoconstricción por medio de los adrenérgicos (Eckel et al., 2005)
- Promueve la reabsorción de sodio en los riñones (Eckel et al., 2005; Gallagher et al., 2010).

En la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, el efecto vasodilatador de la insulina puede perderse por una falla en la inhibición de la acción de la endotelina 1 (ET-1), ya que la vía PI3K se altera. Esto favorece la vasoconstricción y mitogénesis del endotelio. Adicionalmente, el aumento en los niveles de citocinas, el decremento de adiponectina y la resistencia a la leptina favorecen la disminución de óxido nítrico y el incremento de endotelina-1 (Gallagher et al., 2010).

El efecto sobre la reabsorción de sodio se preserva, y en algunos casos, se acentúa; como consecuencia hay retención de sodio, alteración en la función renal, aumento del volumen y disfunción endotelial (Eckel et al., 2005).

La hiperinsulinemia induce la acumulación de aldosterona, la cual favorece la inflamación vascular y el aumento de estrés oxidante por la disminución de la disponibilidad de óxido nítrico (Brawn, 2008). Además, la hiperinsulinemia y el aumento de ácidos grasos libres, que provienen del tejido adiposo visceral, provocan hiperactividad del sistema nervioso simpático; esto da como resultado hipertensión a través del efecto vasoconstrictor que es mediado por la inervación simpática en el riñón y en los vasos. Lo anterior, promueve la infiltración glomerular, la reabsorción de sodio y el aumento en la secreción de renina (Eckel et al, 2005; Hanley et al., 2002; revisado en Rask-Madsen y Kahn, 2012).

### *Otras manifestaciones del síndrome metabólico*

La resistencia a la insulina se relaciona con otras alteraciones metabólicas que no han sido incluidas en los cinco criterios que se utilizan para diagnosticar síndrome metabólico. Algunas de estas alteraciones son: el incremento en los niveles de ácido úrico, microalbuminuria, aumento en la viscosidad del suero, incremento de homocisteína y dimetilarginina asimétrica, presencia de

apnea obstructiva del sueño, enfermedad de hígado graso no alcohólico y ovario poliquístico (revisado en Eckel, 2005; González et al., 2011).

### **2.3.2 Disfunción de la célula $\beta$ pancreática y diabetes mellitus tipo 2**

La DT2 es una enfermedad multifactorial compleja caracterizada por la elevación crónica de glucosa en sangre -hiperglucemia-, resistencia a la insulina y la predisposición a desarrollar complicaciones a nivel micro y macrovascular, entre las que se encuentran las neuropatías, retinopatías, nefropatías y enfermedades cardiovasculares (Berma et al., 2011).

En los mamíferos, la disfunción de la célula  $\beta$  es el factor que determina la transición de un estado de resistencia a la insulina y/o obesidad a un estado de DT2 (Ashcroft y Rorsman, 2004; Hiriart et al., 2014; Muoio y Newgard, 2008).

La disfunción de la célula  $\beta$  surge, en gran medida, por la presencia de factores que están relacionados con la resistencia a la insulina, como el incremento de citocinas pro-inflamatorias, la hiperglucemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia (Hiriart et al., 2014). Estos factores, en conjunto, provocan que haya una disminución en el procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico, una disminución en la actividad de chaperonas y translocación de proteínas, estrés oxidante, hipoxia y muerte celular (Vetere et al., 2014 y Poitout et al., 2010). A pesar de que el estrés oxidativo es parte inherente de los procesos de señalización, regulación y secreción de insulina, la desregulación en la producción de ROS provoca la pérdida de masa (60%-75 %) y función de la célula  $\beta$  (Muoio y Newgard, 2008; Kim y Yoon, 2011; Hiriart et al., 2014).

La estimulación por medio de nutrientes tiene un papel central en la supervivencia, masa y función de la célula  $\beta$  pancreática. La respuesta de las células  $\beta$  ante estímulos externos depende de la regulación transcripcional; particularmente, la secreción de insulina estimulada por glucosa depende de niveles adecuados de expresión de genes como: la preproinsulina, el transportador de glucosa GLUT2 y enzimas de la vía glucolítica (Schuit et al., 2002). Tales niveles de expresión son modulados por la ingesta de alimentos, sus niveles disminuyen durante el ayuno e incrementan después de una comida; sin embargo, la exposición crónica a nutrientes como la glucosa y los ácidos grasos libres, como sucede en un el síndrome metabólico, provoca la alteración de diversas vías de transducción de señales y programas de expresión de genes, estrés oxidante y del retículo endoplásmico, que resultan en la pérdida de secreción de insulina estimulada por glucosa,

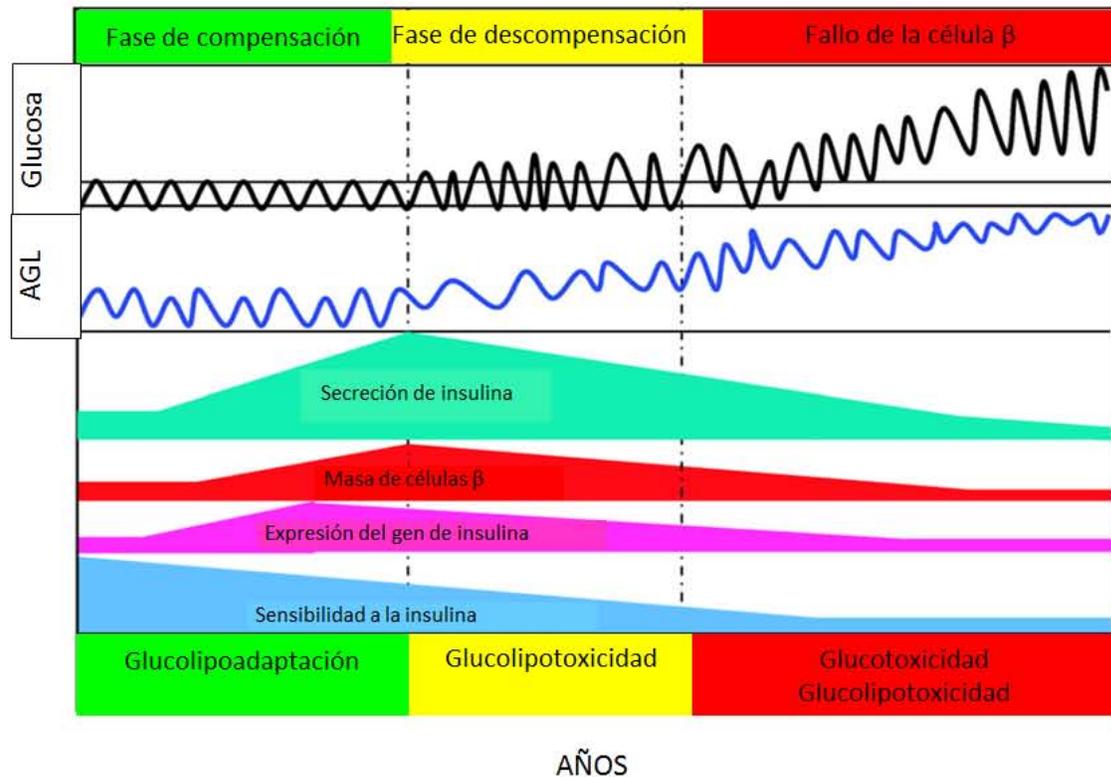
agotamiento de la célula  $\beta$ , desdiferenciación y, finalmente, muerte celular y DT2 (revisado en: Bensellam et al., 2012).

Este fenómeno se ha denominado "glucotoxicidad" para la glucosa y "lipotoxicidad" para los ácidos grasos; sin embargo, estos conceptos se han unificado para formar uno nuevo conocido como "glucolipototoxicidad", debido a que se ha observado que actúan de forma sinérgica (Muoio y Newgard, 2008; Kim y Yoon, 2011; Poitout et al., 2010).

Cuando hay concentraciones bajas de glucosa, los ácidos grasos son transportados a la mitocondria para iniciar la  $\beta$ - oxidación de los ácidos grasos, en donde se forma acetil-CoA, que entra al ciclo del ácido cítrico; de esta forma se lleva a cabo la detoxificación de lípidos. De manera contraria, cuando los niveles de glucosa y ácidos grasos se encuentran elevados, se favorece la formación de señales catapleróticas y con ello la generación y acumulación de malonil-CoA en el citosol. Debido a que en las células  $\beta$  la enzima ácido graso sintasa (FAS) tiene una menor actividad que la acetil-CoA carboxilasa, el efecto predominante del malonil-CoA es inhibir la actividad de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT-1), de tal manera que se bloquea la oxidación de los ácidos grasos y se acumulan, en el citosol, ésteres de acil-CoA de cadena larga y lípidos que actúan como señalizadores intracelulares como las ceramidas, fosfolípidos, ácido fosfatídico, diacilgliceroles y triglicéridos. Esta compleja remodelación metabólica produce cambios fenotípicos y cambios metabólicos adicionales que producen una alteración en el proceso de secreción de insulina y la activación de programas de muerte celular. Asimismo, el metabolismo del colesterol tiene un rol importante en la disfunción de la célula beta; la exposición de células  $\beta$  a moléculas oxidadas LDL provoca una disminución en la expresión del gen de insulina y apoptosis (Kim y Yoon, 2010; Prentki et al., 2002; revisado en: Poitout et al., 2010).

A partir de todo lo anterior, algunos autores han propuesto que, en conjunto, la glucolipototoxicidad y la resistencia a la insulina dan lugar a tres estados: un estado de compensación, seguido de un estado de descompensación y por último el fallo de la célula  $\beta$  (figura 1.4). En el estado de compensación, el decremento en la sensibilidad de la insulina en sus tejidos diana da como resultado un incremento en la secreción y biosíntesis de insulina, así como el aumento en la masa de las células  $\beta$  y el transportador de glucosa GLUT 2. En este estado, la sobreestimulación de las células  $\beta$  da lugar a la hipersecreción de insulina (Larqué et al., 2011; Poitout., 2010). El estado de descompensación aparece cuando las células  $\beta$  son incapaces de secretar la cantidad necesaria de insulina para mantener la homeostasis de la glucosa. Durante esta etapa, la glucolipototoxicidad

juega un papel muy importante, ya que por diversos mecanismos, provoca una disminución en la secreción y biosíntesis de insulina, así como una reducción en la masa de las células  $\beta$ . Finalmente, el fallo de la célula  $\beta$  es evidente cuando los niveles de glucosa en sangre persisten elevados (hiperglucemia). En este estado, la glucolipotoxicidad contribuye en el deterioro y disfunción de la célula  $\beta$ ; la masa de estas células, la biosíntesis y secreción de insulina disminuyen considerablemente (revisado en Poitout et al., 2010).



**Figura 1.4. Representación de una propuesta para la progresión de la disfunción de la célula  $\beta$ .** (tomado y modificado de Poitout et al., 2010).

### 2.3.3 Modelos animales de síndrome metabólico

Existe un gran número de modelos animales para estudiar el síndrome metabólico y la DT2. Entre los modelos de animales genéticamente modificados, los más estudiados son los ratones ob/ob (OM), los cuales carecen de leptina debido a una mutación en el gen ob. Tienen un fenotipo de obesidad severa, muestran intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia e hiperglucagonemia. Las células beta de estos ratones secretan mayor cantidad de insulina en estado basal que ratones

normales y desarrollan resistencia a la insulina. El síndrome metabólico en ratones OM adultos puede revertirse por medio de la administración de leptina o la transfección del gen de leptina. Otros modelos relacionados con la falta de leptina son los ratones db/db y las ratas fa/fa, que tienen una mutación en el gen del receptor de leptina. En estos modelos la administración de leptina no revierte el síndrome metabólico. A pesar de que estos modelos son una herramienta útil para entender algunos cambios metabólicos en la obesidad, la leptina también participa en otras funciones en el organismo (revisado en: Larqué et al., 2011).

La resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa y otros signos del síndrome metabólico, así como el desarrollo de DT2 también se han observado en otros animales genéticamente modificados, como Otsuka Long Evans Tokushima fatty rats, non-obese Goto-Kakazaki (GK), New Zealand obese mouse (NZO), spontaneous hypertensive rats, hypertriglyceridemic rat, ratas Norway-derived congenic strain PD/Cub y los ratones TALLHO/jng (Larqué et al., 2011; Leiter, 2009; Schroeder et al., 2009).

El cambio en la cantidad de grasas o azúcares en la dieta puede conllevar al síndrome metabólico y al desarrollo de DT2 en modelos animales, especialmente en roedores. Los ratones son más susceptibles a desarrollar síndrome metabólico con una dieta alta en grasas y las ratas con una dieta alta en carbohidratos (Larqué et al., 2011). Las dietas altas en grasa en ratones provocan la activación de mecanismos intracelulares de estrés, así como mecanismos de señalización hormonal y de inflamación en diversos órganos. La cantidad de grasa utilizada varía del 30-60% (Larqué et al., 2011).

Los cambios fisiológicos que se observan en este tipo de modelos varían dependiendo del tipo y cantidad de grasa; los más comunes son la ganancia de peso y el incremento en los niveles de ácidos grasos libres, colesterol, triglicéridos, glucosa e insulina. Este tipo de dietas provoca resistencia a la insulina, inflamación del hígado, albuminuria y acumulación de grasa en los riñones. Asimismo, se ha observado que hay hipersecreción de insulina, que se atribuye al aumento en la masa de células  $\beta$  (Chen et al., 2011; Gregor y Hotamisligil, 2007; Ha et al., 2011).

El síndrome metabólico se ha inducido en ratas por medio de dietas altas en azúcares, sacarosa o fructosa. Uno de los modelos consiste en utilizar una dieta alta en fructosa en ratas Wistar, spontaneous hypertensive rats o Sprague Dawley. Esta tipo de dieta está compuesta por 60-80 % de fructosa, 10-20 % de proteínas y 5% de grasas. Otro modelo, y uno de los más empleados

consiste en dar de beber, diariamente, una solución de sacarosa al 30% (p/v) a ratas macho recién destetadas. Se ha reportado que en este modelo hay aumento de peso y masa del tejido adiposo, incremento de triglicéridos, colesterol y glucosa en plasma, intolerancia a la glucosa y presión arterial elevada (revisado en Larqué et al., 2011).

En el laboratorio de la Doctora Marcia Hiriart, en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, se ha caracterizado un modelo de síndrome metabólico en ratas macho de la cepa Wistar. El modelo consiste en suministrar una dieta alta en carbohidratos. A partir de los dos meses de edad, los animales consumen una solución de sacarosa al 20 % (p/v) y una dieta regular (28.5% de proteínas, 13.5% de grasas y 58% de carbohidratos) durante 8 o 24 semanas. Los grupos experimentales, de 8 y 24 semanas, desarrollan alteraciones metabólicas significativas respecto a los grupos controles, como el aumento de peso y de circunferencia abdominal, incremento de grasa abdominal, niveles elevados de insulina, glucosa y triglicéridos, intolerancia a la glucosa y elevación moderada de la presión arterial sistólica (Larqué et al., 2011; Velasco et al., 2012). En este modelo, a las 8 semanas se identificaron y determinaron cambios en la expresión del transportador GLUT 2 en la membrana de la célula  $\beta$ , así como una tendencia a aumentar la masa del islote pancreático y el tamaño de las células  $\beta$ . Lo anterior podría estar relacionado con la sobreestimulación de la célula  $\beta$  y la hipersecreción de insulina (Larqué et al., 2011).

A las 24 semanas de tratamiento se observó que en las células  $\beta$  del grupo experimental, hay un aumento en la sensibilidad del ATP sobre los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ); esto indica que hay canales que están cerrados a concentraciones más bajas de ATP, lo cual podría estar relacionado con la hipersecreción de insulina. Asimismo, se determinó la actividad de los canales de calcio de células  $\beta$  del grupo control y experimental, utilizando al bario como acarreador de carga (el bario pasa a través de los canales de calcio y no los inactiva como lo hace el calcio). En el grupo control, la densidad de corriente a un potencial de +10 mV, que corresponde al pico máximo de la densidad de corriente de bario fue de 13 pA/pF. Dentro de las células  $\beta$  del grupo experimental, se identificaron dos subpoblaciones de células dependiendo de la densidad de corriente de bario a ese mismo potencial: la subpoblación MS1 (50%) y la subpoblación MS2 (35%); se identificó una tercera subpoblación (15%) que no presentó corriente. Las células  $\beta$  de la subpoblación MS1 tuvieron una disminución del 40% en la densidad de la corriente de bario respecto a las células  $\beta$  del grupo control; las células  $\beta$  de la subpoblación MS2 tuvieron un incremento del 90% en la densidad de la corriente de bario respecto a las células  $\beta$  del grupo control. Con estos resultados se propone que después de las 24 semanas de tratamiento, la

subpoblación MS1 podría estar comenzando a agotarse y a secretar menos insulina; en cambio, la subpoblación MS2 continúa secretando insulina, y estas células podrían presentar un mayor número de canales funcionales en la membrana (Velasco et al., 2012).

### 3. Planteamiento del problema

El aumento en el consumo de bebidas que tienen azúcares añadidos, como la sacarosa y el jarabe de fructosa, se ha asociado con el desarrollo de síndrome metabólico tanto en humanos como en modelos animales (Vertanian et al., 2007; Velasco et al., 2012). Estudios recientes en ratas machos de la cepa Wistar muestran que el consumo diario de una solución de sacarosa al 20 % (p/v) durante 8 o 24 semanas, genera alteraciones metabólicas características del síndrome metabólico, además de afectar la estructura y función de la célula  $\beta$  pancreática (Larqué et al., 2011; Velasco et al., 2012).

El agotamiento de la célula  $\beta$ , surge en gran medida, por la presencia de factores que están relacionados con la resistencia a la insulina como: el incremento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias por el tejido adiposo, los niveles elevados de glucosa y ácidos grasos libres y la hiperinsulinemia, que, en conjunto, provocan estrés oxidante, alteración de diversas vías de transducción de señales y cambios en los patrones de expresión genética. Particularmente, la disminución en la expresión del gen de insulina es una de las primeras alteraciones que aparecen en un estado de glucolipotoxicidad y agotamiento de la célula  $\beta$  (Hiriart et al., 2014; Piotout et al., 2010).

A partir de lo anterior resulta interesante determinar si existen cambios en la expresión del gen de insulina en células  $\beta$  de ratas macho de la cepa Wistar, que consumieron una solución de sacarosa al 20% por 24 semanas y que presentan alteraciones características del síndrome metabólico.

## 4. Hipótesis

Los grupos experimentales, que ingirieron una solución de sacarosa al 20 % (p/v) durante 24 semanas, desarrollarán signos como el aumento de peso y de circunferencia abdominal, niveles elevados de glucosa, triglicéridos e insulina en ayuno y mostrarán diferencias significativas respecto a los grupos control.

Se observará un cambio significativo en la expresión del gen de insulina en células  $\beta$  pancreáticas de ratas Wistar macho con síndrome metabólico.

## 5. Objetivos

Objetivo general

Determinar el cambio en la expresión del gen de insulina en células  $\beta$  pancreáticas, aisladas mediante citometría de flujo, de ratas Wistar macho control y con síndrome metabólico.

Objetivos específicos

- Reproducir el modelo de síndrome metabólico de 24 semanas en ratas macho de la cepa Wistar.
- Confirmar el desarrollo de alteraciones metabólicas (niveles elevados de glucosa, insulina y triglicéridos en ayuno, aumento de peso y circunferencia abdominal) en los grupos experimentales.
- Determinar el cambio en la expresión del gen de insulina en células  $\beta$  pancreáticas.

## 6. Metodología

- Ratas Wistar macho de 2 meses (peso de 250-280 g)



- Se dividieron en dos grupos:
  - ratas grupo control (agua simple)
  - ratas grupo experimental (solución de sacarosa al 20 % por 24 semanas.



- Caracterización de Síndrome metabólico

Parámetros somatométricos:

- Peso (g)
- Circunferencia abdominal (cm)
- Grasa abdominal (g)
- Longitud (cm)
- IMC (Kg/m<sup>2</sup>)

Parámetros bioquímicos:

- Glucosa (mg/dl)
- Insulina (µg/l)
- Triglicéridos (mg/dl)



- Cultivo primario de células insulares



- Aislamiento de células  $\beta$  mediante citometría de flujo basada en fluorescencia (FACS)



- Análisis de inmunofluorescencia para la detección de insulina



- Extracción de RNA total de células  $\beta$



- Extracción de cDNA por RT-PCR y PCR en tiempo real

## 6.1 Modelo animal

Grupos de 12 ratas macho de la cepa Wistar de dos meses de edad y con un peso de 250 a 280 gramos se dividieron en dos grupos: control y experimentales (SM). Los animales fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Los métodos utilizados en este estudio fueron aprobados por el Consejo Interno y el Comité de Cuidado Animal del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y basados en el “International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals” del Consejo Internacional de Organizaciones de Ciencias Medicas, 2010.

Ambos grupos de animales llevaron una dieta regular con LabDiet 5001 (28.5% de proteínas, 13.5% de grasas y 58% de carbohidratos). Durante 24 semanas, el grupo control tomó agua simple del grifo y el grupo SM tomó una solución de sacarosa al 20% (p/v).

Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y con alimento y agua *ad libitum*, sin acceso a ningún tipo de actividad física.

La recolección de muestras y experimentos se llevaron a cabo después de 12 horas de ayuno.

## 6.2 Caracterización de síndrome metabólico

### 6.2.1 Cuantificación de glucosa, insulina y triglicéridos

Se tomaron muestras de sangre de la vena caudal para cuantificar glucosa, en mg/dL, por medio de un glucómetro (Accu-Chek).

La insulina en plasma se cuantificó por medio de una prueba de ELISA (Mercodia Ultrasensitive Rat insulin Elisa) que contiene 5 calibradores con las siguientes concentraciones: 0.020  $\mu\text{g/L}$ , 0.050  $\mu\text{g/L}$ , 0.15 $\mu\text{g/L}$ , 0.40  $\mu\text{g/L}$  y 1 $\mu\text{g/L}$ . La solución de Hanks stock fue tomada como blanco y las muestras se diluyeron en esta misma en una relación de 1:20. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro lector de microplacas (modelo 550 de BIO-RAD) a 450 nm. Posteriormente se realizó una curva estándar, con estos mismos calibradores para obtener los valores de concentración de insulina ( $\mu\text{g/L}$ ), de cada muestra a partir de los valores de absorbancia.

La cuantificación de triglicéridos en plasma se llevó a cabo en el Departamento de Patología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Los niveles de triglicéridos se determinaron por medio de una prueba colorimétrica enzimática (GPO-PAP, Randox Laboratories).

### **6.2.2 Parámetros somatométricos**

Antes de iniciar la disección del páncreas (ver apartado 6.3), los animales se pesaron en una balanza. Con una cinta métrica se midió el largo de la punta de la nariz al ano así como la circunferencia abdominal en la región donde terminan las crestas iliacas. Se obtuvo el índice de masa corporal (IMC) y el peso de la grasa peripancreática y epididimal.

### **6.3 Cultivo primario de células insulares**

Grupos de 4 a 6 ratas, con ayuno de 12 horas, fueron anestesiadas vía intraperitoneal con pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg de peso. Una vez dormidas, se les cortó la piel y el músculo hasta los arcos costales. Se identificó el conducto pancreático y se pinzó justo en la desembocadura hacia el duodeno. Se localizó la bifurcación del conducto pancreático a la altura de los conductos biliares y se hizo una pequeña incisión para colocar un catéter por el cual se introdujo solución de Hanks para insuflar el páncreas. Una vez insuflados fueron disecados. A continuación, los páncreas se limpiaron para eliminar grasa, vasos sanguíneos y linfáticos; después se cortaron en trozos pequeños y se colocaron en un vaso de precipitados con colagenasa P a una concentración de 0.3 mg/mL. Finalmente, el tejido se trituró con unas tijeras hasta formar una mezcla homogénea, la cual se aforó a 20 mL con solución Hank's suplementada.

#### **6.3.1 Digestión con colagenasa**

El tejido con la colagenasa P (Sigma) se colocó en un baño a 37° C con agitación constante durante 5 minutos, al finalizar se agitaron con la mano vigorosamente. Posteriormente, la reacción de la colagenasa P se detuvo con 30 mL de solución de Hanks suplementada con BSA al 0.1% y gentamicina. Para lavar la enzima, se centrifugó a 870 rpm durante 5 minutos tres veces. El sobrenadante se aspiró utilizando una bomba de vacío y las pastillas fueron resuspendidos en 50 mL de solución Hank's suplementada.

### **6.3.2 Recolección de islotes pancreáticos**

La resuspensión, libre de colagenasa P, se colocó en cajas Petri esterilizadas y se llevó a cabo la recolección de islotes bajo un microscopio estereoscópico. Una vez recolectados, se hizo una segunda limpieza para eliminar tejido no digerido por la colagenasa P.

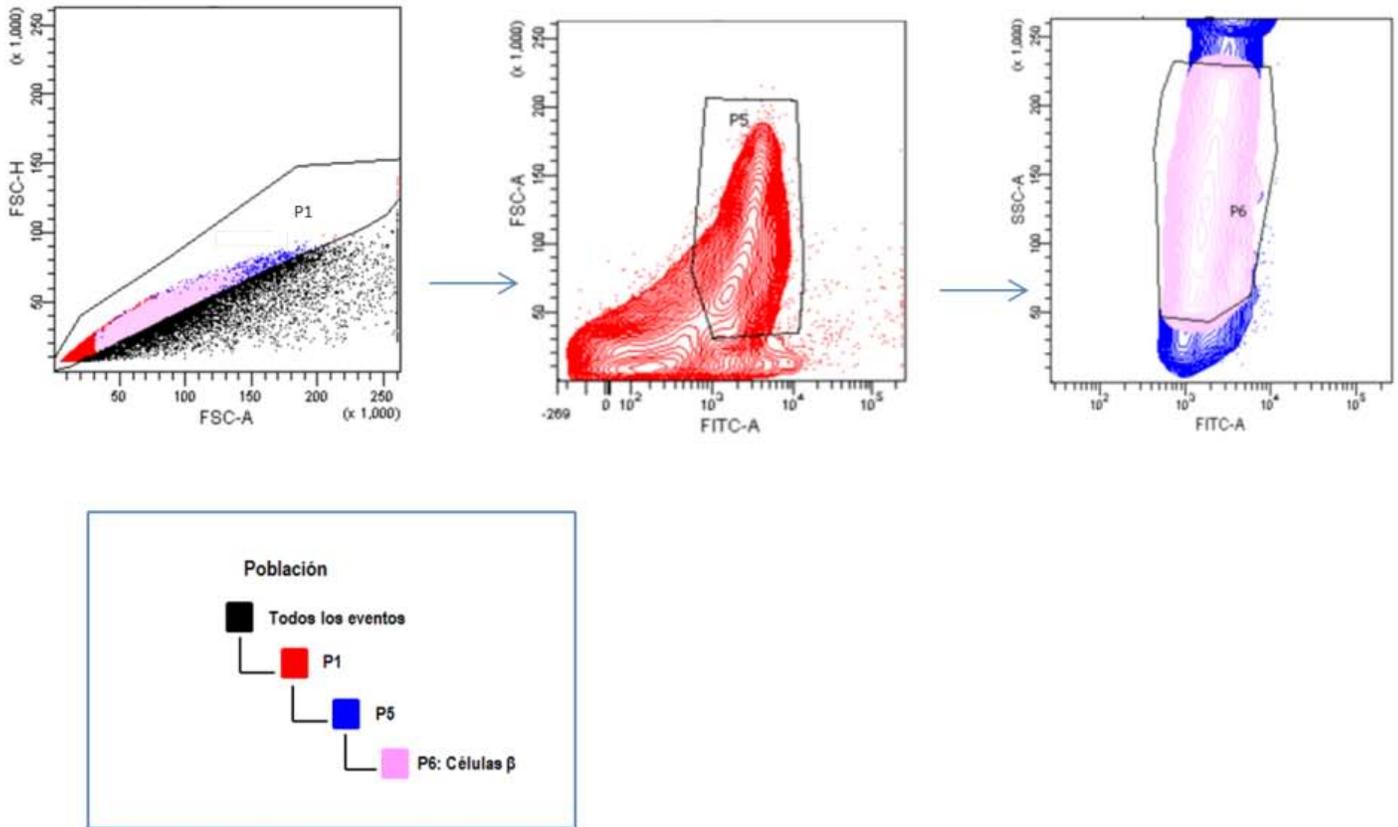
### **6.3.3 Digestión con tripsina**

Se añadieron 2 mL de solución dispersante. Después, los tubos se colocaron en un baño con agitación constante a 37° C durante 3 minutos. Posteriormente, con una pipeta Pasteur siliconizada, se llevó a cabo la dispersión mecánica. Esto se hizo aspirando un volumen en la parte inferior del tubo y soltándolo en la parte superior del mismo varias veces hasta que la solución se tornara homogénea. La reacción enzimática se detuvo aforando a 15 mL con solución de Hanks suplementada y después se centrifugó a 870 rpm durante 5 minutos. La pastilla de células se resuspendió en 5 mL de medio DMEM suplementado con BSA al 0.1% y gentamicina. Más tarde, la solución se filtró con un filtro de 70µm estéril. Se centrifugó, nuevamente, a 870 rpm durante 7 minutos, se aspiró el sobrenadante y a cada tubo se le agregaron 2 mL de solución de transporte suplementada con glucosa al 2.8 mM , para utilizarlas en el citómetro de flujo.

### **6.4 Aislamiento de células $\beta$ mediante citometría de flujo basada en fluorescencia (FACS)**

Se utilizó el citómetro FACS Aria I de Becton Dickinson de la Unidad de Citofluorometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. El citómetro FACS Aria I tiene una nozzle con una boquilla de 70µm de diámetro y está calibrado con perlas "Accudrops". Las muestras se analizaron tomando en cuenta los valores de FSC-H (dispersión de luz frontal en altura), FSC-A (dispersión frontal de luz en área), FITC-A (intensidad de fluorescencia en área) y SSC-A (dispersión lateral de luz en área). Se hicieron gráficas de densidad poblacional con los siguientes parámetros: Contour, Resolución = 64, log density y porcentaje= 85, en las que se compararon FSC-H/FSC-A, FSC-A/FITC-A y SSC-A/FITC.

Para aislar a las células  $\beta$  se seleccionaron aquellas regiones que tuvieran a la población de células de mayor tamaño, mayor fluorescencia y una complejidad interna o granularidad intermedia (figura 2.1). Esta metodología se optimizó para células  $\beta$  de ratas adultas (8 meses de edad), ya que previamente se había utilizado para células de animales adultos jóvenes de 2 meses de edad y de 20 días.



**Figura 1.5. Aislamiento de células  $\beta$  mediante FACS.** El primer gráfico muestra a todos los eventos; estos representan a todas las poblaciones de células presentes en la muestra. Se seleccionó la región P1 debido a que es la que contiene a los eventos individuales y discrimina a células que estén adheridas unas a otras. El segundo gráfico muestra distintas densidades de poblaciones contenidas en la región P1. Se seleccionó la región P5, la cual contiene a la población de células con una auto fluorescencia (medida en FITC-A) intermedia y mayor tamaño (FSC-A). El tercer gráfico muestra densidades de población contenidas en la región P5. Se seleccionó la región P6, que representa a las células  $\beta$ ; tienen una granularidad intermedia (SSC-A) y una auto fluorescencia con los mismos valores que las células contenidas en la región P5.

En el citómetro, las células se recibieron en medio HAM F-10 suplementado con suero fetal bovino, glutamina y PEF (penicilina, estreptomycin, fungizona) a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 870 rpm durante 10 minutos para lavar las soluciones del citómetro. Se aspiró el sobrenadante y se agregó, nuevamente, HAM F-10 suplementado a un volumen tal que quedarán 500 células/  $\mu$ L. Las células se utilizaron para hacer inmunofluorescencias (apartado 6.6) y para extraer RNA total (apartado 6.7).

### **6.5 Análisis de inmunofluorescencia para la detección de insulina y procesamiento de imágenes.**

Se sembraron de 5,000 a 10,000 células en cubreobjetos con poli-L-lisina y se incubaron a 37° C por 30 minutos. Posteriormente se añadieron 2 mL de medio RPMI suplementado con L-glutamina al 1% y gentamicina y se dejaron a 37° C por 12 horas. Para fijar a las células se agregaron 2 mL de paraformaldehído (PFH) al 4% en PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos; al finalizar se hicieron 3 lavados con PBS 1X estéril. Después se agregó la solución de bloqueo: 0.1% de tritón (v/v) y 1% de suero normal de cabra (v/v) y se incubaron a temperatura ambiente por 45 minutos. Nuevamente se hicieron 3 lavados con PBS 1X estéril; a continuación las muestras se incubaron en una cámara húmeda, por 12 horas, a 4° C con suero de cobayo anti insulina (Strategic BioSolutions) a una dilución de 1:5000. Se hicieron 3 lavados con PBS estéril y se agregaron los anticuerpos secundarios y suero normal de cabra al 1%; uno de ellos, el anticuerpo de cabra contra cobayo conjugado con el fluoróforo DyLight 649 (Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1:200. Se incubó en la oscuridad y a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, los anticuerpos se lavaron con PBS 1X y se adicionó Hoechst (Molecular Probes, INC) a una dilución de 1:2000. Se incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad, de 3 a 4 minutos y se enjuagó con PBS 1X. Finalmente los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con DAKO fluorescent mounting medium.

Las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia. Las fotos se tomaron con un objetivo de 20X y zoom de 1.6 y las imágenes se visualizaron en el programa ImagePro 3DS 6.0. El procesamiento de imágenes, conteo de células y obtención de porcentaje de células beta se llevó a cabo en el programa Image J 1.43m de NHI, USA y Microsoft Excel (Windows).

### **6.6 Extracción de RNA total**

Después de haber sembrado de 5,000- 10,000 células sobre cubreobjetos para hacer análisis de inmunofluorescencia, la suspensión (500 células/  $\mu$ l) se colocó en un tubo de polipropileno de 500  $\mu$ L (uno para controles y otro para tratados) y se centrifugó a 1200 rpm por 4 minutos. Posteriormente, se retiró cuidadosamente el medio sin levantar el pellet de células. Al pellet se le adicionó una solución de lisis que contiene buffer de lisis y  $\beta$ -mercaptoetanol en una relación de 10 $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol por cada mL de buffer.

Las muestras de cada experimento se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y posteriormente se formaron “pools” de células de animales control y “pools” de células de animales con síndrome metabólico. En total se obtuvieron alrededor de 200,000 células por cada “pool”. Posteriormente, la extracción de RNA se hizo con el kit de extracción AxyPrep multisource RNA miniPrep Kit (Axygen Biosciences) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Para determinar la pureza y cantidad del RNA, se cuantificó por medio de un Nanodrop.

### **6.7 RT-PCR**

Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) para obtener DNA complementario. Se utilizó el kit RNA PCR Core de Applied Biosystems.

Se hizo a través de dos reacciones. Para la reacción 1 se utilizó el RNA (de cada muestra), *primers* al azar y agua libre de RNAsas. Posteriormente, las muestras se pusieron en vórtex y se colocaron en el termociclador con el protocolo descrito abajo. Para la reacción 2 se utilizó el PCR buffer 2 (10X), los dNTP's (dGTP, dATP, dTTP, dCTP a una concentración de 10 mM, el inhibidor de RNAsas (1U/ $\mu\text{L}$ ), y la enzima MuLV reverse transcriptase (2.5 U/ $\mu\text{L}$ ).

Se siguió el siguiente protocolo en el termociclador:

- 1) T  $70^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos
- 2) T  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos (tiempo fuera para continuar con la reacción 2)
- 3) T  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos
- 4) T  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos

Al finalizar, el DNA complementario se cuantificó en un Nanodrop y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **6.8 PCR en tiempo real con sondas TaqMan y análisis de la expresión del gen de insulina**

Con el fin de conocer la diferencia en los niveles de expresión del transcrito del gen de insulina entre las células  $\beta$  de animales que ingirieron una solución de sacarosa al 20% (p/v) por 24 semanas y los animales control, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real con dos muestras, y por duplicado, de células  $\beta$  de animales control y animales con síndrome metabólico. Se utilizaron sondas TaqMan para el gen de insulina y el gen de GADPH como gen reportero.

Las sondas taqman son oligonucleótidos cuyas secuencias son complementarias a la región central de un determinado amplicón. Por lo general tiene una secuencia de 13 a 18 nucleótidos, que presenta en el extremo 5' una marca fluorescente, conocida como reportero, y en el extremo 3' un apagador o quencher. Cuando estas dos moléculas están unidas a la sonda toda la fluorescencia emitida por el reportero es absorbida por el *quencher*, por lo que la fluorescencia global emitida es cero. Debido a que las sondas taqman tienen una  $T_m$  de alineamiento mayor a la de los *primers*, durante el alineamiento, la sonda se une a su secuencia blanco antes que los *primers*, de esta manera, cuando la DNA polimerasa se une al extremo 3' del *primer* e inicia la elongación, en su camino se encuentra con la sonda y la degrada, debido a su actividad de exonucleasa 5'  $\rightarrow$  3'. Al ser degradada, se libera el reportero del *quencher* y hay emisión de fluorescencia.

Se utilizó el kit TaqMan Gene expression Master Mix y sondas Taqman de Applied Biosystems para hacer los ensayos de PCR en tiempo real. Se prepararon reacciones con los siguientes componentes: Mastermix (AmpliAq Gold DNA polimerasa, mezcla de dNTPs con dTTP/dUTP y UDG y ROX), sondas y primers (20X), 1  $\mu$ L cDNA y agua dietilpirocarbonato estéril. Para los controles negativos se utilizó agua en vez de cDNA.

Los ensayos de PCR en tiempo real se hicieron en el equipo 7000 Sequence Detection System, ABI PRISM de Applied Biosystems, de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y se utilizó el programa ABI Prism 7000 SDS Software. Se utilizaron las siguientes temperaturas: 50° C por dos minutos, 95° C por 12 minutos y 60° C por un minuto, por 40 ciclos y se utilizó ROX como referente pasivo de fluorescencia.

La cuantificación relativa de la expresión de genes se llevó a cabo con el método Ct comparativo (Delta Ct). Para ello, se obtuvieron los valores del ciclo umbral Ct (por sus siglas en inglés). El valor Ct representa el ciclo en el cual la emisión de fluorescencia se eleva por encima del ruido de fondo o cruza el umbral establecido, en la fase exponencial de la reacción de PCR. Con este método, es necesario hacer una validación previa para comprobar que la eficiencia de amplificación del gen endógeno (GAPDH) y el blanco (insulina) es cercana al 100% (pendiente de  $-3.3 \pm 10\%$ ). Posteriormente, se hizo una gráfica que compara las eficiencias de amplificación de cada gen; se obtuvo el  $\Delta Ct$  (Ct blanco – Ct control endógeno) para cada uno de los puntos. El  $\Delta Ct$  se graficó contra el  $\log_{10}$  de concentración [ng], donde la línea obtenida debe tener una pendiente menor o

igual a de -0.1 a 0.1. Una vez que se haya validado el método se aplica directamente la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### ***6.9 Análisis estadístico y representaciones gráficas.***

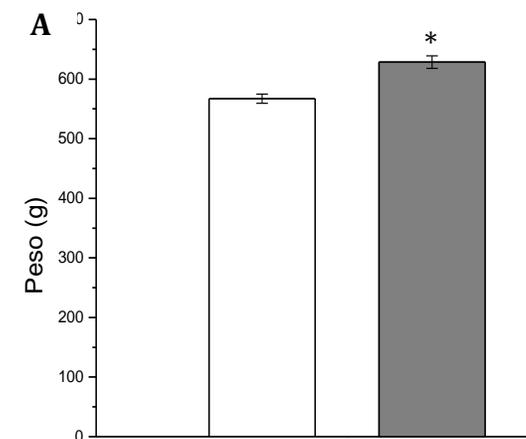
Los datos que muestran los parámetros somatométricos, bioquímicos y el cambio en la expresión genética representan el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (E.S.M.) de los valores obtenidos para cada una de las condiciones. La significancia estadística fue obtenida a través de un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con el programa StatView Versión 4.57, Abacus Concepts, Cary, NC de Windows.

## 7. Resultados

### 7.1 Caracterización del síndrome metabólico

Los animales de los grupos experimentales, que ingirieron una solución de sacarosa al 20% (p/v) durante 24 semanas, desarrollaron alteraciones metabólicas características del síndrome metabólico; entre ellas, el aumento de peso y del índice de masa corporal, el aumento en la circunferencia abdominal, que se ve reflejada por el incremento de grasa en la cavidad abdominal (grasa epididimal y peripancreática), y el aumento en los niveles plasmáticos de glucosa, insulina y triglicéridos. En la figura 3.1 se muestra el cambio en el peso e IMC, en la figura 3.2 se muestra el cambio en la circunferencia abdominal y grasa abdominal y en la figura 3.3 se muestran los parámetros bioquímicos, de los animales de los grupos control y experimentales; estos últimos muestran diferencias estadísticamente significativas respecto a los animales de los grupos control.

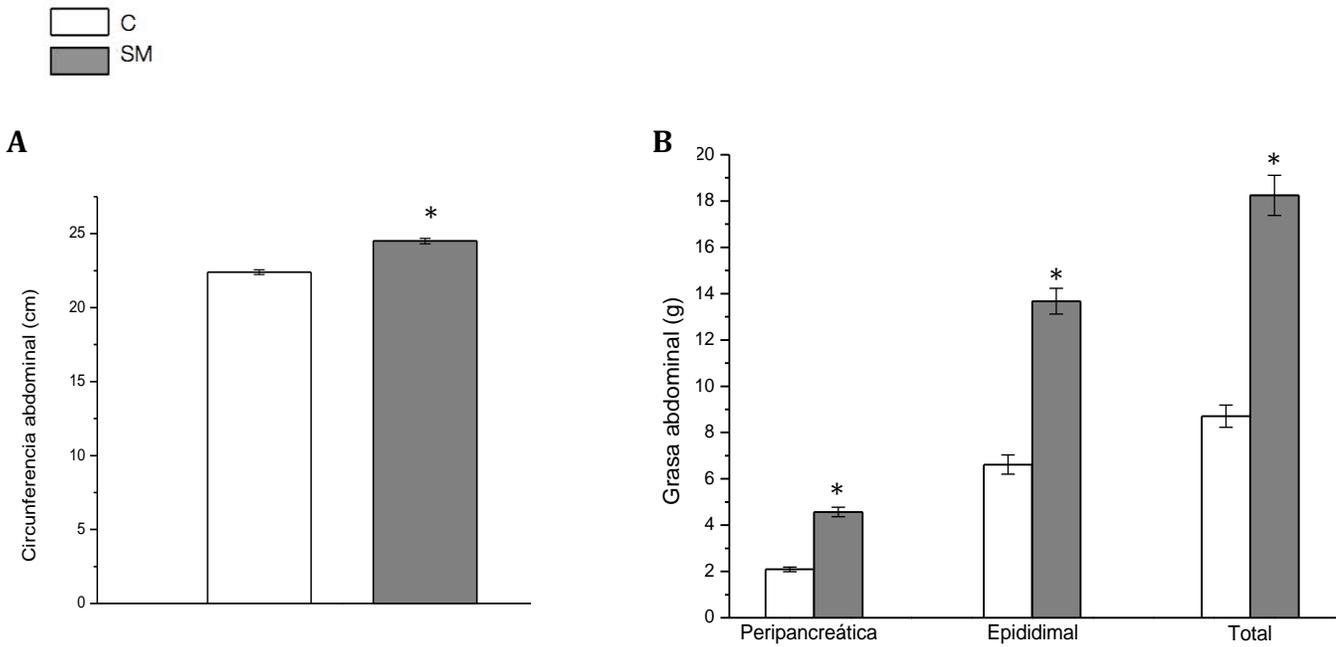
□ C  
■ SM



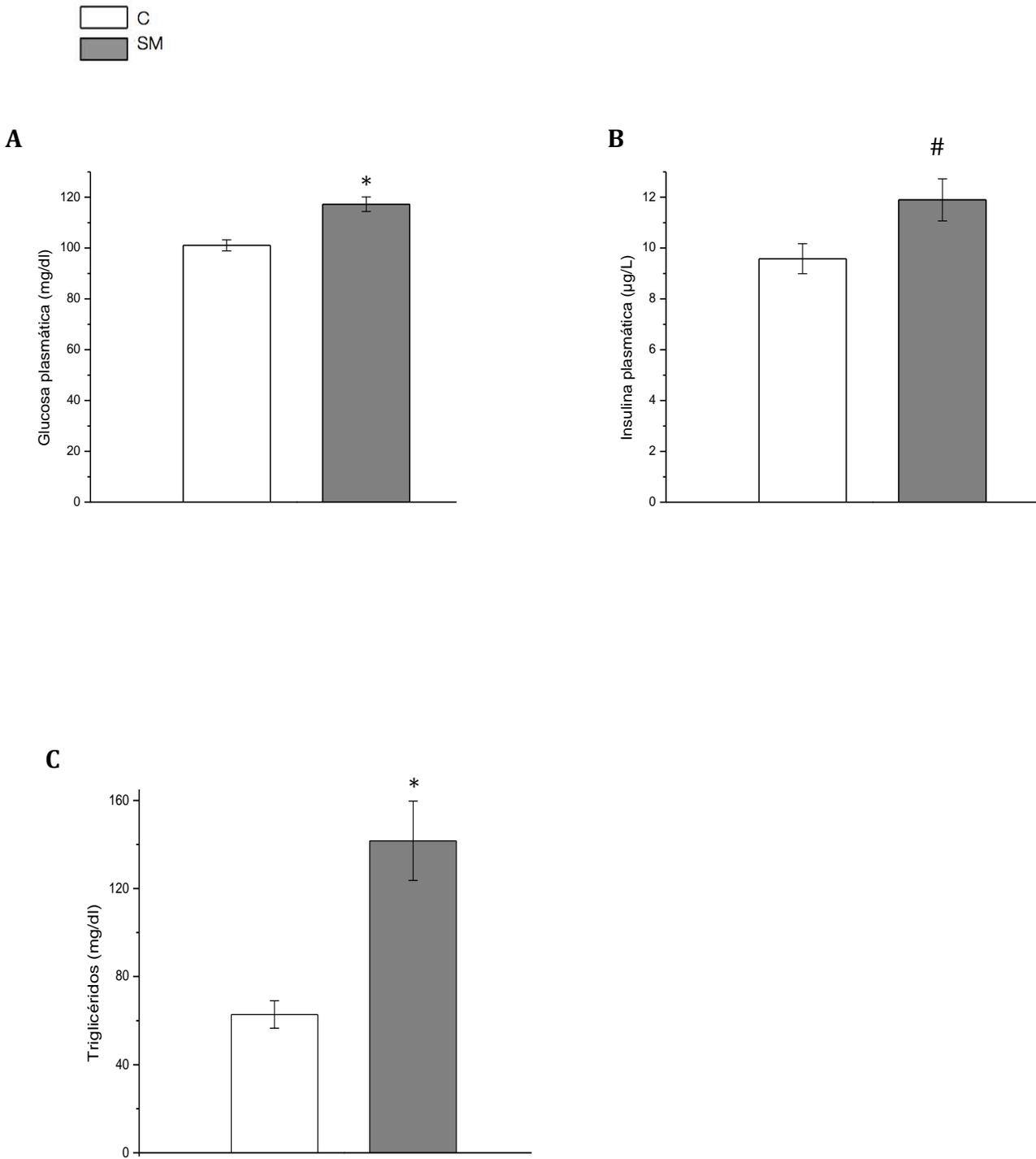
**B**

	C	SM
Longitud (cm)	26.55±0.16	26.51±0.12
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	8.03±0.10	8.87±0.15 *

**Figura 3.1. Cambio en el peso e IMC en los animales control y SM al término de las 24 semanas de tratamiento.** Las barras representan la media ± el error estándar (ESM) n control = 30, n SM = 48. **A)** Peso (g) e imagen que muestra la diferencia del peso entre ambos grupos. \*P < 0.01 respecto al grupo control. **B)** Longitud (cm) e IMC (Kg/m<sup>2</sup>). \*P < 0.01.



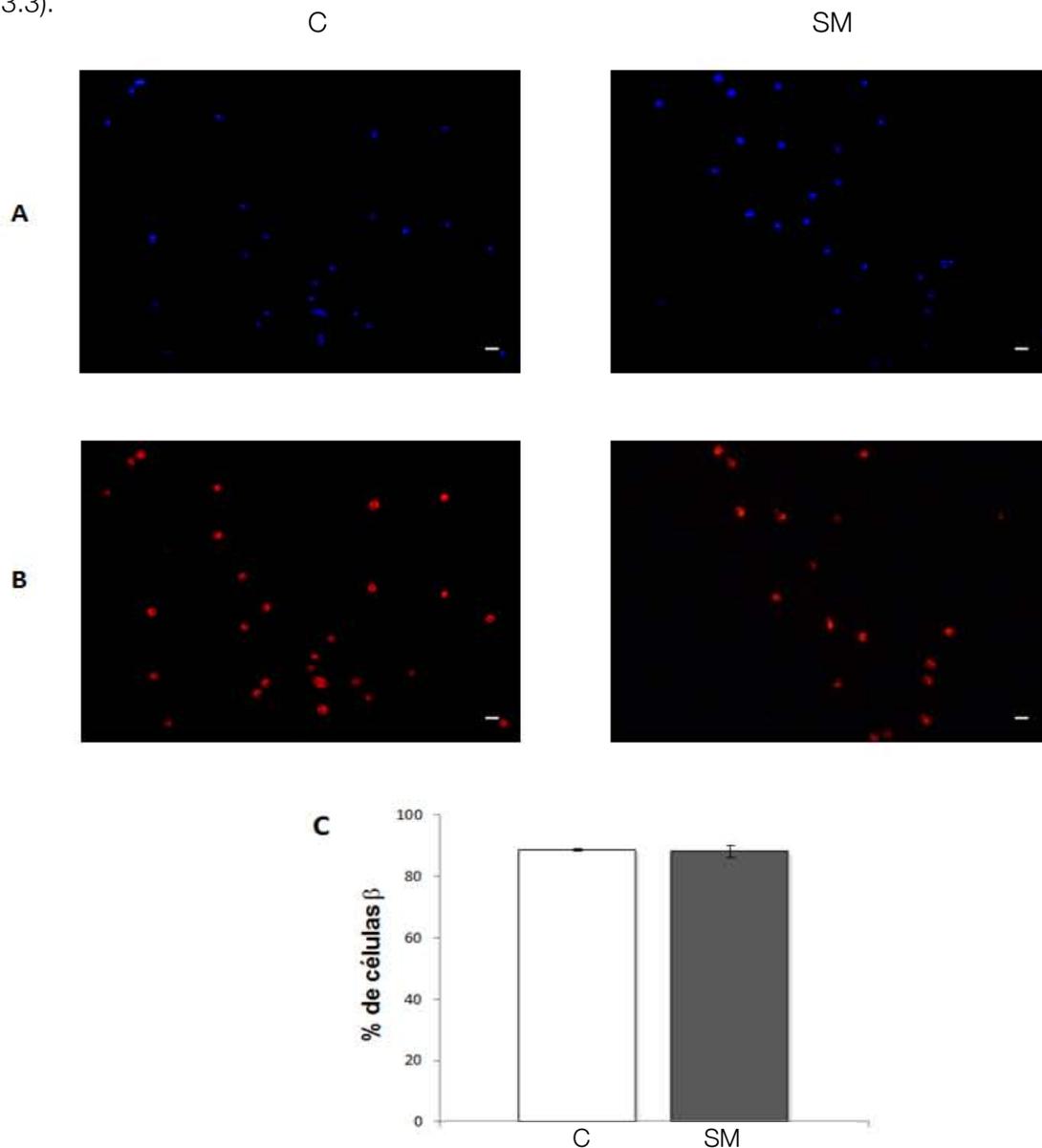
**Figura 3.2. Cambio en la circunferencia abdominal y grasa abdominal de los animales de los grupos control y SM al término de las 24 semanas.** Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar (ESM) n control = 30, n SM = 48. **A)** Circunferencia abdominal. \* $P < 0.01$ . **B)** Grasa abdominal (g) (peripancreática, epididimal y total) . \* $P < 0.01$ .



**Figura 3.3. Parámetros bioquímicos de los animales de los grupos control y SM al término de las 24 semanas.** Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar (ESM). **A)** Glucosa plasmática (mg/dL). n control= 26, n SM= 43 \*P< 0.01. **B)** Insulina plasmática (µg/L). n control= 28, n SM =34. #P< 0.05. **C)** Triglicéridos en plasma (mg/dL). n control= 20, n SM =20. \*P <0.01.

## 7.2. Análisis de inmunofluorescencia para la detección de insulina en células aisladas por FACS

Para determinar la pureza de cada una de las muestras de células  $\beta$  aisladas mediante FACS se llevó a cabo un análisis de inmunofluorescencia para la detección de insulina. La extracción de RNA total se llevó a cabo con las muestras de células que tuvieron, por lo menos, el 80 % de células  $\beta$  (figura 3.3).

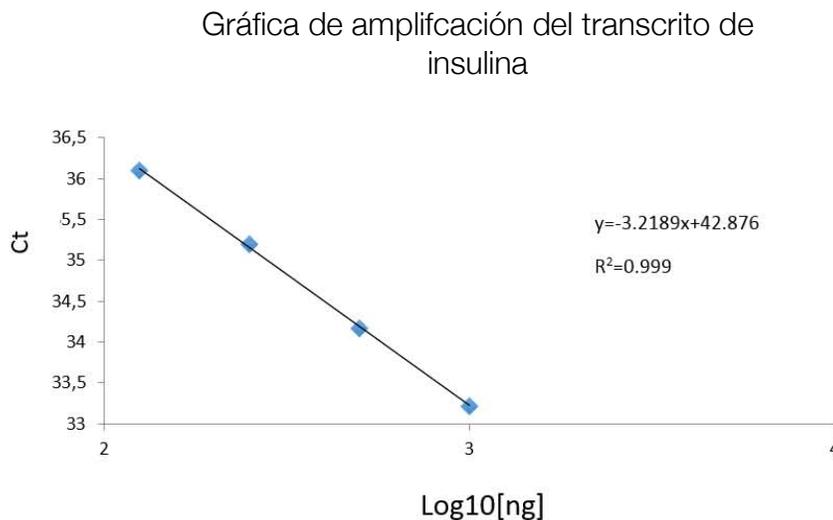


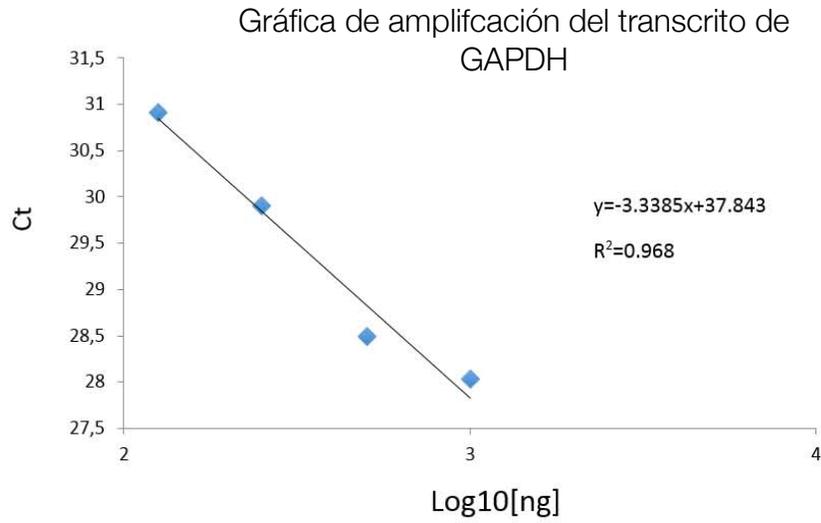
**Figura 3.3. Imágenes obtenidas a partir de microscopía de epifluorescencia y porcentaje de células  $\beta$  aisladas mediante FACS. A)** Núcleos de células aisladas mediante FACS marcadas con colorante Hoechst de los animales de los grupos control y SM. **B)** Células positivas a insulina de los animales de los grupos control y SM. La barra de escala en todas las imágenes equivale a 10  $\mu\text{m}$ . **C)** Gráfica que muestra el porcentaje de células  $\beta$ , de la condición control y SM, aisladas mediante FACS.

### 7.3 Análisis del cambio en la expresión del gen de insulina en células $\beta$ pancreáticas de animales control y con síndrome metabólico

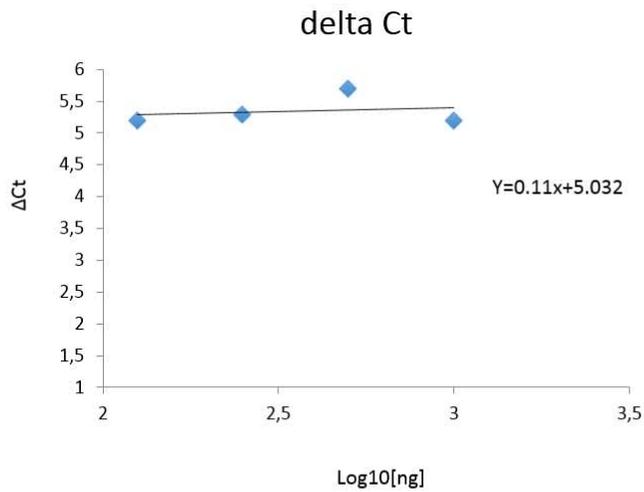
Para determinar el cambio en la expresión del gen de insulina, en células  $\beta$  de ratas control y con síndrome metabólico, se hicieron cultivos de células insulares, se aislaron células  $\beta$  por medio de citometría de flujo y se llevaron a cabo extracciones de RNA total. Posteriormente, se hizo un ensayo de RT-PCR y PCR en tiempo real con sondas TaqMan para el gen de insulina y el gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen reportero. Para determinar la expresión relativa del gen de insulina se utilizó el método de Ct comparativo. Se utilizaron las siguientes concentraciones de DNA complementario: 1000 ng, 500 ng, 250 ng, 125 ng, y se hicieron curvas estándar para determinar la eficiencia que presenta el sistema (juego de *primers* y sonda). El valor de la pendiente para GAPDH fue de -3.21 y para insulina de -3.33 (figura 3.4 A). Posteriormente, se realizó una gráfica que compara las eficiencias de amplificación de cada gen; se obtuvo el  $\Delta$ Ct (Ct blanco – Ct control endógeno) para cada uno de los puntos. El  $\Delta$ Ct se graficó contra el log10 de concentración [ng], donde la línea obtenida tuvo una pendiente de 0.11 (figura 3.4 B).

**A)**



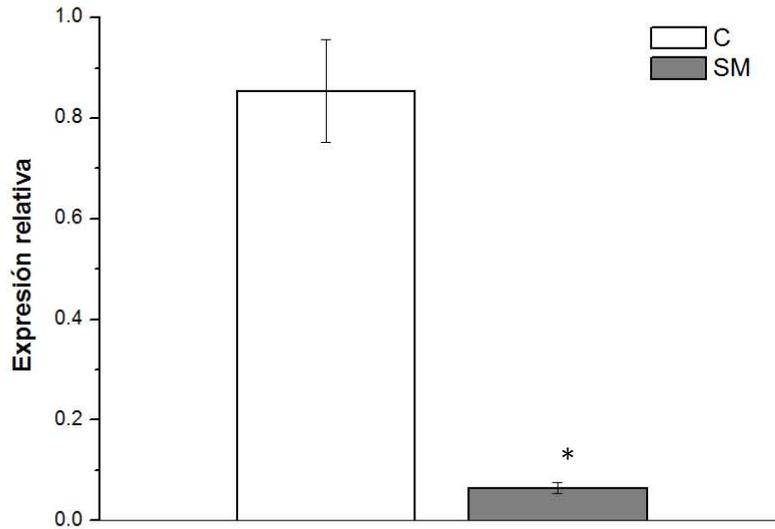


**B)**



**Figura 3.4. A)** Curvas estándar hechas a partir de diluciones de cDNA que muestran la eficiencia de amplificación del gen de GAPDH e insulina. **B)** Gráfico que muestra la comparación de las eficiencias de cada gen, GAPDH e insulina.

Los resultados muestran que la expresión del gen de insulina disminuye en las células  $\beta$  pancreáticas de ratas macho de la cepa Wistar que consumieron una solución de sacarosa al 20 % (p/v) por 24 semanas y que desarrollaron alteraciones metabólicas características del síndrome metabólico (figura 3.5).



**Figura 3.5. Cambio en la expresión relativa del gen de insulina en células  $\beta$  .** Las barras representan la media  $\pm$  el error estándar (EEM). Animales del grupo control n= 2 con muestras de células de 8 animales. Animales del grupo SM n=2 con muestras de células de 8 animales. \* P<0.01.

## 8. Discusión.

El síndrome metabólico y sus complicaciones se han convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. Afecta a individuos en edad productiva, sobre todo, en poblaciones urbanas. La prevalencia de esta enfermedad está asociada a la falta de actividad física y al consumo excesivo de alimentos, dentro de los que se encuentran las bebidas con azúcares añadidos (sacarosa y jarabe de fructosa) (Vertanian et al., 2007; Rojas et al., 2010). Un gran número de estudios muestran que el aumento en el consumo de bebidas azucaradas está asociado con el desarrollo de síndrome metabólico, tanto en humanos como en modelos animales (Vertanian et al., 2007; Velasco et al., 2012). Los modelos experimentales en animales permiten dilucidar los mecanismos moleculares que conducen al síndrome metabólico y a la DT2; también permiten explorar nuevos métodos para su prevención y tratamiento. Como se mencionó anteriormente, en nuestro grupo de investigación se ha caracterizado un modelo de síndrome metabólico en ratas macho de la cepa Wistar que consiste en suministrar una dieta alta en carbohidratos. A partir de los dos meses de edad, los animales consumen una solución de sacarosa al 20 % (p/v) de 8 a 24 semanas. Los grupos experimentales desarrollan alteraciones metabólicas características del síndrome metabólico, y también se ha identificado que afecta a la estructura y función de la célula  $\beta$  pancreática.

Se emplean ratas de la cepa Wistar debido a que presentan grandes ventajas; su ciclo de vida es largo, es una cepa caracterizada bioquímica y somatométricamente, no presenta ningún tipo de alteración genética, y en condiciones estándar, no son susceptibles a desarrollar obesidad, diabetes u otras enfermedades crónicas (Tofovic y Jackson, 2003). En este modelo de síndrome metabólico, la dieta alta en sacarosa es suministrada como una solución líquida por dos razones principales; para asegurar la ingesta de manera constante y para simular a las bebidas con azúcares añadidos que actualmente, el ser humano, consume en grandes cantidades.

En el presente estudio se reprodujo el modelo animal de síndrome metabólico de 24 semanas en ratas macho de la cepa Wistar y se llevó a cabo un análisis del cambio en la expresión del gen de insulina en células  $\beta$  pancreáticas de ratas control y con síndrome metabólico por medio de PCR en tiempo real. Los resultados muestran que hay una disminución significativa en la expresión del gen de insulina en las células  $\beta$  de ratas con síndrome metabólico respecto a células  $\beta$  de ratas control.

### ***8.1 Los grupos experimentales que ingirieron una solución de sacarosa al 20% (p/v) durante 24 semanas desarrollaron síndrome metabólico.***

El síndrome metabólico en los grupos experimentales pudo determinarse por la presencia de alteraciones metabólicas como el incremento en los niveles plasmáticos de glucosa, insulina y triglicéridos; el aumento de peso, del IMC y de la circunferencia abdominal (figura 3.1 y 3.2).

La circunferencia abdominal, más que el peso y el IMC, se relaciona directamente con la acumulación de grasa visceral (Alberti et al., 2009). En este estudio se tomó la grasa epididimal y grasa peripancreática como una muestra de grasa visceral debido a que son fáciles de delimitar, y además, sería difícil recolectar con precisión toda la grasa visceral de la cavidad abdominal. La circunferencia abdominal, la grasa peripancreática y epididimal de los animales experimentales tuvieron una significancia estadística mayor que los animales control (figura 3.1 C y D).

En este modelo de síndrome metabólico, la adiposidad desarrollada que se refleja principalmente por la acumulación de grasa visceral, se atribuye a la ingesta diaria de sacarosa y a la falta de actividad física, que da como resultado un balance positivo de energía y a su vez promueve la lipogénesis de novo en el tejido adiposo (Eckel et al., 2005; Larqué et al., 2011; Mc Devitt et al., 2001). Tal aumento en la lipogénesis provoca que el adipocito incremente su tamaño (hipertrofia) y presente un estado metabólico adverso que comprende la liberación excesiva de ácidos grasos libres y un desequilibrio en la secreción de adipocinas pro- inflamatorias y anti- inflamatorias. En conjunto, estos factores, dan lugar a un estado inflamatorio crónico que juega un papel central en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Gallagher et al., 2010; revisado en Rask-Madsen y Kahn, 2012).

La hipertrigliceridemia que presentan los animales de los grupos SM (figura 3.2 C) podría atribuirse a la resistencia a la insulina en el hígado y al consumo diario de fructosa proveniente de la sacarosa (Meshkani y Adeli, 2009; Fried y Rao, 2003). Bajo un estado de resistencia a la insulina hepática, los ácidos grasos libres promueven la síntesis y sobreproducción de VLDL ricas en triglicéridos, las cuales se acumulan en el torrente sanguíneo. Por otro lado, el consumo de fructosa también participa en la sobreproducción y acumulación de VLDL en el torrente sanguíneo (Adiels M et al., 2008; Eckel et al., 2005; Fried y Rao, 2003).

Es importante mencionar que en este estudio no se midieron los niveles de colesterol en plasma, debido a que en estudios anteriores, donde se utilizó este mismo modelo de síndrome metabólico, los niveles de colesterol de los animales experimentales no fueron estadísticamente significativos respecto a los animales de los grupos control (Larqué et al., 2011; Velasco et al., 2012).

La glucosa alterada de ayuno que presentan los animales de los grupos experimentales (figura 3.2 A) también podría deberse a la resistencia a la insulina en el hígado, por un incremento en la gluconeogénesis y glucogenólisis, y en músculo esquelético por una disminución en la captación de glucosa (Gallagher et al., 2010).

Los animales de los grupos experimentales desarrollaron hiperinsulinemia (figura 3.2 B). Los mecanismos que están involucrados en el desarrollo de la hiperinsulinemia en el síndrome metabólico no son del todo claros, ya que puede presentarse aunque los niveles de glucosa no estén elevados. Un estudio llevado a cabo por Velasco et al., 2012, donde se utiliza el modelo de síndrome metabólico de 24 semanas, muestra que la actividad de los canales  $K_{ATP}$  y las corrientes de calcio de la célula  $\beta$  se modifican en el síndrome metabólico. El cambio en la actividad de estos canales, en diferentes poblaciones de células  $\beta$ , se relaciona con la hipersecreción de insulina y el agotamiento de la célula  $\beta$  (Velasco et al., 2012).

Estudios recientes muestran que los niveles elevados del receptor soluble de insulina (SIR) están relacionados con la hiperinsulinemia y resistencia a la insulina presentes en el síndrome metabólico y la DT2 en modelos animales y en humanos. Los SIR son un importante regulador de la insulina libre que viaja por la circulación, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, ya que compiten con la insulina libre para unirse a los receptores de insulina en la membrana. En un estado de hiperinsulinemia, los niveles de los IRS aumentan, y mayores cantidades de insulina se unen a este receptor soluble, disminuyendo la cantidad de insulina libre, que es la biológicamente activa (Hiriart et al., 2014).

En este estudio no se evaluó la presión arterial para determinar si los animales con síndrome metabólico desarrollaron hipertensión arterial; sin embargo, estudios realizados por Velasco et al., 2012 y Larqué et al., 2011, donde se utilizó el modelo de síndrome metabólico de 8 y 24 semanas, muestran que los animales de los grupos experimentales presentan una ligera hipertensión arterial sistólica sin cambios en la frecuencia cardíaca. La elevación de la presión arterial sistólica en los animales experimentales podría deberse a la resistencia a la insulina y al aumento en los niveles

circulantes de citocinas pro-inflamatorias y ácidos grasos libres, que inhiben la acción de la ET-1 y disponibilidad de óxido nítrico, y a la hiperinsulinemia que promueve la inflamación vascular (Gallagher et al., 2010; Rask-Madsen y Kahn, 2012)

## ***8.2 Cambio en los niveles de expresión del gen de insulina en células $\beta$ pancreáticas de animales control y con síndrome metabólico***

En los estudios realizados por Larqué et al (2011) donde utilizan el modelo de síndrome metabólico de 8 semanas en ratas macho de la cepa Wistar, se observó un incremento en los niveles de la proteína del transportador GLUT 2 en la membrana celular de la célula  $\beta$ , un incremento discreto en las corrientes de calcio y una tendencia a aumentar la masa del islote pancreático y el tamaño de las células  $\beta$ . Estos resultados sugieren que en esta etapa temprana del síndrome metabólico hay una sobreestimulación de la célula  $\beta$ , que se relaciona con la hipersecreción de insulina y un posible aumento en la síntesis de insulina (Hiriart et al. 2014; Poitout et al., 2010).

En contraste, los estudios realizados con el modelo de síndrome metabólico de 24 semanas, muestran que hay diferencias en la densidad de corriente de calcio en diferentes subpoblaciones de células  $\beta$ . El 50% de las células mostraron una disminución del 40% en la densidad de corriente, el 35 % un incremento del 90% y el 15% no mostraron corriente. Estos resultados sugieren que hay una subpoblación de células  $\beta$ , que podría no secretar insulina por la estimulación de glucosa, una subpoblación que comienza a agotarse y a secretar menos insulina y una subpoblación que hipersecreta insulina (Velasco et al. 2012).

A partir de estas observaciones, nos planteamos que sería interesante determinar los niveles de expresión del RNA mensajero de insulina en las células  $\beta$  de animales que siguieron el mismo tratamiento. Se hizo un ensayo de PCR en tiempo real con sondas TaqMan para determinar el cambio en la expresión del gen de insulina en células  $\beta$  de ratas macho de la cepa Wistar control y con síndrome metabólico.

Los resultados muestran que en promedio hay una disminución de 12.9 veces en la expresión del gen de insulina en las células  $\beta$  de animales que presentaron alteraciones típicas del síndrome metabólico respecto a las células  $\beta$  de animales control (figura 3.5).

Este resultado es muy novedoso y complementa los estudios electrofisiológicos que se hicieron con estas mismas células y modelo en nuestro grupo de investigación. Asimismo, demuestra que el estímulo constante y prologando de una dieta alta en sacarosa, en animales que no tienen una predisposición genética a desarrollar enfermedades metabólicas, genera cambios en el funcionamiento de las células  $\beta$  que se ven reflejados en la disminución de la expresión del gen de insulina.

Se ha demostrado, en células  $\beta$  bajo condiciones de cultivo, que la disminución en la expresión del gen de insulina es una de las primeras alteraciones que aparecen en un estado de glucolipotoxicidad, donde el estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico y la inflamación juegan un papel muy importante en el deterioro y agotamiento de la célula  $\beta$  pancreática (Poitout et al., 2010). A partir de este resultado se podría esperar que las células  $\beta$  de ratas que tomaron una dieta alta en sacarosa estén bajo un estado de glucolipotoxicidad.

En células  $\beta$  en cultivo, la exposición prolongada a niveles más elevados de glucosa y ácidos grasos libres da lugar a un decremento en la expresión y acoplamiento de factores de transcripción que se unen al promotor del gen de insulina, como MafA y PDX-1 (Poitout y Robertson, 2008). Se ha observado que la síntesis de ceramidas de novo a partir de palmitato tiene un papel crucial en la inhibición de la transcripción del gen de insulina. Se ha propuesto que la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), blanco de las ceramidas, puede reprimir la transcripción del gen de insulina por medio de la inhibición del elemento E1 en la región promotora, e independientemente, puede disminuir el acoplamiento de PDX-1 (Poitout et al., 2010; Kaneto et al., 2002)

Las células  $\beta$  son vulnerables al estrés oxidante debido a la baja expresión de enzimas antioxidantes (revisado en Bensellam et al., 2012). El aumento en la producción de ROS, generado por la glucolipotoxicidad, también afecta el acoplamiento de PDX-1 y MafA en el promotor del gen de insulina. Asimismo, activa al factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y nuevamente a las JNK; la activación de estas vías de respuesta a estrés contribuyen a la disminución de la expresión del gen de insulina (Alejandro et al., 2015).

El estrés del retículo endoplásmico también tiene un rol muy importante en el agotamiento de la célula  $\beta$ . Estas células son muy susceptibles a este tipo de estrés por su alta tasa de biosíntesis de insulina en respuesta a la estimulación por glucosa. Se ha demostrado que bajo una exposición prolongada de ácidos grasos libres, hay un aumento en marcadores de estrés de retículo

endoplásmico, uno de ellos el factor de transcripción ATF6, el cual es un regulador negativo de la transcripción del gen de insulina (Poitout et al., 2010).

La inflamación también es un mecanismo que contribuye de manera importante en el desarrollo y progresión de la DT2. Las citocinas pro-inflamatorias, bajo condiciones de niveles más elevados de glucosa, contribuyen a los procesos inflamatorios en otros tejidos, incluyendo a la célula  $\beta$ . Las citocinas pro- inflamatorias pueden activar a las JNK y promover, de igual manera, estrés del retículo endoplásmico y disminución en la síntesis de insulina (Hotamisligil, 2006; Alejandro et al., 2015).

## 9. Conclusiones y perspectivas

En ratas macho Wistar el consumo diario de una solución de sacarosa al 20% (p/v) durante 24 semanas da lugar al desarrollo de alteraciones típicas del síndrome metabólico: niveles elevados de glucosa, insulina y triglicéridos en ayuno, y aumento de peso y de la circunferencia abdominal, dado por la acumulación de grasa en la cavidad abdominal.

En las células  $\beta$  de animales que desarrollaron síndrome metabólico hay una disminución en la expresión del gen de insulina.

A partir de estos resultados sería interesante evaluar la expresión, por medio de PCR en tiempo real, de marcadores de estrés oxidante, estrés del retículo endoplásmico y del metabolismo de la glucosa y ácidos grasos en células  $\beta$  de animales que siguieron el mismo tratamiento para confirmar que la disminución en el transcrito de insulina se debe a estos factores. Sin embargo, para determinar la expresión simultánea de varios genes es recomendable fabricar microarreglos de RNA. En nuestro grupo de investigación, se está llevando a cabo este proyecto, igualmente con células  $\beta$  pancreáticas aisladas mediante citometría de flujo de animales con síndrome metabólico y animales control. A partir de los resultados que arroja un microarreglo, se pueden agrupar genes de acuerdo a su función biológica o construir redes de interacción de genes, y de esta manera, determinar qué mecanismos o procesos se ven afectados bajo el estímulo constante de una dieta alta en sacarosa.

## 10. Referencias

Adiels M., Olofsson S.O., Taskinen M.R., Borén J. 2008. Overproduction of very low-density lipoproteins in the hallmark of dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(7): 1225-36.

Alberti K.G., Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z., Cleeman J.L., Caccicedo J.M., Gorkce N., Farb M., Valentine R.J., Ruderman N.B. 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and prevention, National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for Study of Obesity. *Circulation.* 20;120(16):1640-5.

Alejandro E.U., Gregg B., Blandino-Rosano M., Cras-Méneur C., Bernal-Mizrachi E. 2015. Natural history of B-cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Mol Aspects Med.* 42:19-41.

Andrali S.S., Sampley M.L., Vanderford N.L., Ozcan S. 2008. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic B-cells. *Biochem. J.* 415(1): 1-10.

Ashcroft F. y Rorsman P. 2004. Type 2 diabetes mellitus: not quite exciting enough?. *Hum Mol Genet.* 13(1): 21-31.

Balkau B., Valensi P., Eschwège E., Slama G. 2007. A review of the metabolic syndrome. *Diabetes Metab.* 33(6) :405-13.

Barg S. 2003. Mechanism of Exocytosis in Insulin-Secreting B-Cells and Glucagon- Secreting A-Cells. *Pharmacol Toxicol.*92(1): 3-13.

Barret K.E., Barman S.M., Boitano S. & Brooks H.D. (2010). *Ganong: Fisiología médica (23<sup>a</sup>. ed.)*. China: Mc Graw Hill.

Bensellam M., Laybutt D.R., Jonas J.C. 2012. The molecular mechanisms of pancreatic B-cell glucotoxicity: Recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol.* 25;364 (1-2): 1-7.

Berma P.D., Ranabir S., Prasad L., Singh T.P. 2011. Clinical and biochemical profile of lean type 2 diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab.* 15(Suppl 1): S40-3.

Biddinger S.B. y Kahn R.C. 2006. From Mice to Men: Insights into the Insulin Resistance Syndromes. *Annu Rev Physiol.* 68:123–58.

Boden G. 2008. Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 37(3): 635-46.

Bohler H., Mokshagundam S., Winters S.J. 2010. Adipose tissue and reproduction in women. *Fertil Steril.* 94(3): 795- 825.

Braun M., Wendt A., Birnir B., Broman J., Eliasson L., Galavanovskis J., Gromada J., Mulder H., Rorsman P. 2004. Regulated exocytosis of GABA-containing synaptic-like microvesicles in pancreatic beta-cells. *J Gen Physiol.* 123(3):191-204.

Brown N.J. 2008. Aldosterone and vascular inflammation. *Hypertension.*51(2):161-7.

Byrne C.D. 2012. Dorothy Hodgkin Lecture 2012: non- alcoholic fatty liver disease, insulin resistance and ectopic fat: a new problem in diabetes management. *Diabet Med.* 29(9): 1098-107.

Cabrera O., Berman D.M., Kenyon N.S., Ricordi C., Berggren P.O., Caicedo A. 2006. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U SA.* 103(7) :2334-9.

Canizales S. 2008. Aspectos genéticos de la obesidad humana. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 16 (1): 9-15.

Chen G.C., Huang C.Y., Chang M.Y., Chen C.H., Chen S.W., et al. 2011. Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and sucrose-containing beverage intake, alone or in combination, on inducing metabolic syndrome in Wistar rats and C57BL/6J mice. *Metabolism.* 60(2): 144-64.

Dashty M. 2013. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clin. Biochem.* 46(15): 1339-52.

Denroche H.C., Huynh F.K., Kieffer T.J. 2012. The role of leptin in glucose homeostasis. *Journal of Diabetes Investigation.* 3(2):115-29.

Donath M.Y. y Shoelson S.E. 2011. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 11(2):98-107.

Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z. 2005. The metabolic syndrome. *Lancet.* 365(9468):1415-28.

Eldund E. 2002. Pancreatic organogenesis- developmental mechanisms and implications for therapy. *Nature Rev Genet.*3(7): 524-532.

Ford E.S., Giles W.H., Dietz W.H. 2002. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 16;287(3):356–359.

Fried S.k. y Rao S.P. 2003. Sugars, Hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 78(4): 873S- 880S.

Fu Z., Gilbert E.R. Liu D. 2013. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 1;9(1):25-53.

Gallagher E.J., LeRoith D., Karnieli E. 2010. Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Mount Sinai Journal of Medicine.* 77(5):511-23.

Gao C.L., Zhao D.Y., Zhang C.M., Ji C.B., Chen X.H., Liu F., Guo X.R. 2009. Resistin induces rat insulinoma cell RINm5F apoptosis. *Mol Biol Rep.* 36(7):1703-08.

González-Chávez A., Elizondo-Argueta S., Amancio-Chassin O. 2011. Relación entre síndrome metabólico e hiperuricemia en población aparentemente sana. *Rev Med Hosp Gen Mex.* 74 :132-7.

Gregor, M. y Hotamisligil, G.S. 2007. Thematic review series: adipocyte biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res.* 48(9):1905-14.

Ha S.K., Kim J., Chae C. 2011. Role of AMP-activated protein kinase and adiponectin during development of hepatic steatosis in high-fat diet-induced obesity in rats. *J. Comp. Pathol.* 145(1): 88-94.

Hanley A.J., Karter A.J., Festa A., D'Agostino R Jr., Wagenknecht L.E., Savage P., Tracy R.P., Saad M.F., Haffner F. 2002. Factor analysis of metabolic syndrome using directly measured insulin sensitivity. *Diabetes.* 51(8):2642-47.

Hay C.W., Docherty K. 2006. Comparative analysis of insulin gene promoters: implications for diabetes research. *Diabetes.* 55(12):3201-13.

Hiriart U.M. 2005. El páncreas endocrino. *Tratado de fisiología humana.* Editorial: El Manual Moderno. Capítulo 56, 443-459.

Hiriart M., Aguilar-Bryan L. 2008. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(6):E1298-306.

Hiriart M., Sanchez-Soto C., Diaz-Garcia C.M., Castanares D.T., Avitia M., Velasco M., Mas-Oliva J., Macias-Silva M., Gonzalez-Villalpando C., Delgado-Coello B., Sosa-Garrocho M., Vidaltamayo R., Fuentes-Silva D. 2014. Hyperinsulinemia is associated with increased soluble insulin receptors release from hepatocytes. *Front Endocrinol.* 19:5(95):1-11.

Hiriart M., Velasco M., Diaz-Garcia CM., Larqué C., Soto-Sanchez C., Albarado-Ibáñez A., Chávez-Maldonado J., Toledo A., García-delgado N. Pancreatic beta cells in metabolic syndrome. En: *Islets of Langerhans.* Springer. Editor: Islam M.S. Suecia. 2014 Pp. 1-26.

Hiriart M., Velasco M., Larqué C., Diaz-Garcia CM. 2014. Metabolic syndrome and ionic channels in pancreatic beta cells. *Vitam Horm.* 95:87-114.

Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 14; 444(7121):860-67.

Hunt K.J., Resendez R.G., Williams K., Haffner S.M., Stern M.P. 2004. National Cholesterol Education Program versus World Health Organization metabolic syndrome in relation to all-cause and cardiovascular mortality in the San Antonio Heart Study. *Circulation.* 110(10):1251-7.

International Diabetes Federation. Fact sheet: impaired glucose tolerance (IGT). 2011.  
<http://www.idf.org/fact-sheets/impaired-glucose-tolerance>.

In't Velt P. y Marichal M. 2010. Microscopic Anatomy of the Human Islet of Langerhans. En : Islets of Langerhans. Springer. Suecia. Pp. 2-9.

Kaneto H., Xu G., Fujii N., Kim S., Bronner-Weir S., Weir G.C. 2002. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J Biol Chem.* 16;227(33): 30010-8.

Kim J.W. y Yoon K.H. 2011. Glucolipototoxicity in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes Metab J.* 35(5):444-50.

Larqué C., Velasco M., Tableros-Navarro V., Duhne M., Aguirre J., Gutiérrez- Reyes G., Moreno J., Robles-Díaz G., Hong E., Hiriart M. 2011. Early endocrine and molecular changes in metabolic syndrome models. *IUBMB Life.* 63 (10):831-9.

Leiter E.H. 2009. Selecting the "right" mouse model for metabolic syndrome and type 2 diabetes research. *Methods Mol Biol.* 560: 1-17.

Le Roith D., Quon M.J., Zick Y. Molecular and cellular aspects of insulin resistance: Implications for diabetes En: *Signal Transduction and Human Disease*. Editor: Finkel T, Gutkind JS. Hoboken, New Jersey Wiley-Interscience. USA .2003. pp 171-200.

Leturque A., Brot-Laroche E., Le Gall M.2009. GLUT 2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296(5):E985-92.

Lockhart DJ., Winzeler EA. Genomics, gen expression and DNA arrays. 2000. *Nature.* 15;405(6788):827-36.

Mc Devitt R.M., Bott S.J., Harding M., Coward W.A., Bluck L.J., Prentice A.M. 2001. De novo lipogenesis during controlled overfeeding with sucrose or glucose in lean and obese women. *Am. J. Clin. Nutr.* 76(6): 737-46.

Meshkani R. y Adeli K. 2009. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem.* 42(13-14): 1331-1346.

Mooradian A.D. 2009. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Pract.* 5(3): 150- 9.

Muoio D.M y Newgard C.B. 2008. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(3): 193-205.

Myers M.G Jr. y White M.F. 2002. The Molecular Basis of Insulin Action. En: Insulin Signaling: From cultured cells to animal models. Editor: Gruenberg G, Zick Y. Taylor and Francis. New York. Pp 55-87.

Nelson David L. & Cox Michael M. Lehninger: Principios de Bioquímica. Editorial Macmillan Higher Education. USA. 2013. Pp. 544-605.

Prentki M. y Nolan C.J., 2006. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. J. Clin. Invest. 116(7):1802-12.

Prentki M., Joly E., El-Assaad W., Roduit R. 2002. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. Diabetes. 51; suppl. 3: S405-13.

Poitout V., Amyot J., Semache M., Zarrouki B., Hagman D., Fontés G. 2010. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. Biochim Biophys Acta. 1801(3): 289-98.

Reaven G.M. 1988. Role of insuline resistance in human disease. Diabetes; 37(12):1595-607.

Rask-Madsen C. y Kahn C.R. 2012 Tissue-Specific Insulin signaling, Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 32(9):2052-59.

Rhodes C.J. 2004. Processing of the insulin molecule. En: Diabetes Mellitus: A fundamental and clinical text. LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, eds. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. EUA.pp. 27-50.

Rojas R., Aguilar Salinas C.A., Jiménez Corona A., Shamah Levy T., Rauda J., Ávila Burgos L., Villalpando S., Lazcano Ponce E. 2010. Metabolic Syndrome in Mexican adults. Results from the National Health and Nutrition Survey 2006. Salud pública Méx. 52 (supl.1): S11-S18.

Sánchez N., López Z., Pinzón D., Sepúlveda A. 2010. Adipokines and metabolic syndrome: multiple aspects of a complex pathophysiological process. Revista. Colombiana de Cardiología. 17(4):167-76.

Schalkwijk C.G. y Stehouwer C.D. 2005. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endotelial dysfunction. Clin Sci (Lond). 109(2): 143-59.

Schroeder M., Shbiro L., Zagoory-Sharon O., Moran T.H., Weller A. 2009. Toward an animal model of childhood-onset obesity: followup of OLETF rats during pregnancy and lactation. Am J Physiol Endocrinol Metab Regul Integr Comp Physiol.. 296(2):R224-32.

Schuit F., Flamez D., De Vos A., Pipeleers D. 2002. Glucose-regulated gene expression maintaining the glucose-responsive state of  $\beta$  cells. Diabetes. 51 (Suppl. 3): S326-S332.

Sesti G. 2006. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 20(4):665-679.

Simmons R.K., Alberti K.G., Gale E.A., Colagiuri S., Tuomilehto J., Qiao Q., Ramachandran A., Tajinam N., Brajkovich Mirchov I., Ben-Nakhi A., Reaven G., Hama Sambo B., Mendis S., Rogelic G. 2010. The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. *Diabetologia.* 53(4): 600-5.

Skurk T., Alberti-Huber C., Herder C. y Hauner H. 2007. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(3):1023-33.

Stein D.T., Stevenson B.E., Chester M.W., Basit M., Daniels M.B., Turley S.D., McGarry J.D. 1997. The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J Clin Invest.* 15;100(2) :398-403.

Stolar Mark M.D. 2007. Metabolic syndrome: controversial but useful. *Cleveland Clinic Journal of Medicine.* 74(3): 199-208.

Straub S.G., Shanmugam G., Sharp G.W. 2004. Stimulation of insulin release by glucose is associated with an increase in the number of docked granules in the beta-cells of rat pancreatic islets. *Diabetes.* 53(12) :3179-83.

Taborsky Jr G.C. 2010. The physiology of glucagon. *J Diabetes Sci Technol.* 4(6): 1338-44.

Tofovic S.P. y Jackson E.K. 2003. Rat models of the metabolic syndrome. *Methods Mol. Med.* 86:1, 29-46.

Tsuchiya M., Misaka R., Nitta K., Tsuchiya K. 2015. Transcriptional factors, Maf's and their biological roles. *World J Diabetes.* 15;6(1): 175-83.

Vallance P. y Chan N. 2001. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart.* 85(3): 342-50.

Vartanian L.R., Schwartz M.B., Brownell, K.D. 2007. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Public Health.* 97(4): 667-75.

Velasco M., Larqué C., Gutiérrez-Reyes G., Arredondo R., Sánchez-Soto C., Hiriart M. 2012. Metabolic syndrome induces changes in KATP-channels and calcium currents in pancreatic  $\beta$ -cells. *Islets* 4(4): 302-11.

Vetere A., Choudhary A., Burns S.M., Wagner B.K. 2014. Targeting the pancreatic  $\beta$ -cell to treat diabetes. *Nat Rev Drug Discov.* 13(4): 278-89.

Wang H., Brun T., Kataoka K., Sharma A.J., Wollheim C.B. 2007. MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion. *Diabetologia.* 50(2):348-58.

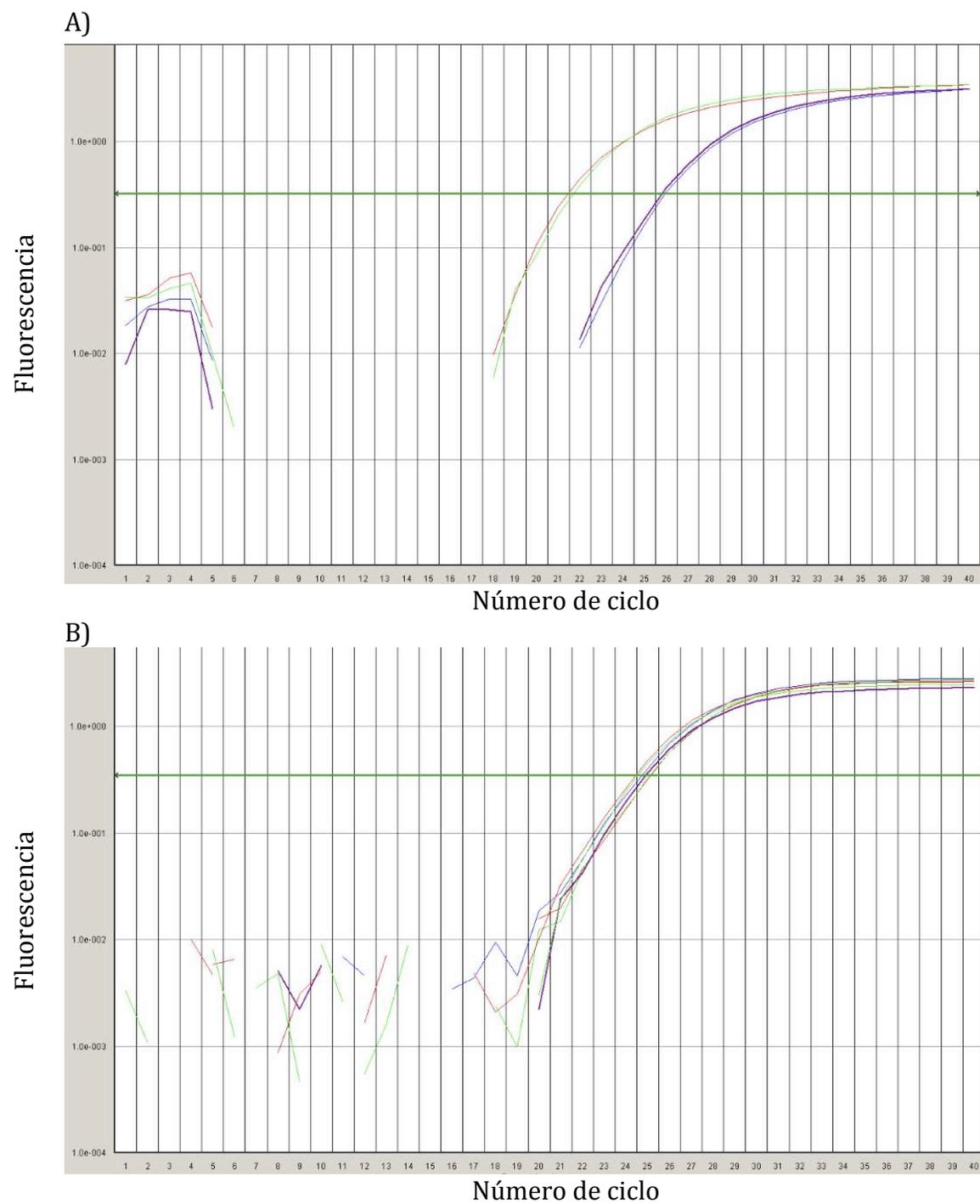
Yang J., Kang J., Guan Y. 2013. The mechanisms linking adiposopathy to type 2 diabetes. *Front Med.* 7(4): 433-44.

Youngren J. 2007. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci.* 64 (7-8):873-91.

Yuos J.G. 2011. The role of alpha-, delta-, and F cells in insulin secretion and action. *Diabetes Res Clin Pract.* 93 Suppl 1:S25-6.

Yusuf S., Hawken S., Ounpuu S., Bautista L., Franzosi M.G., Commerford P., Lang C.C., Rumboldt Z., Onen C.L., Lisheng L., Tanomsup L., Wangai P Jr, Razak F., Sharma A.M., Anand S.S. 2005. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries; a case-control study. *Lancet.* 5;366(9497): 1640-49.

## 12. Anexo



**Figura suplementaria 1. Imágenes representativas de las curvas de amplificación de PCR en tiempo real. A)** Curvas de amplificación del transcrito de insulina de controles (izquierda) y SM (derecha). **B)** Curvas de amplificación del transcrito de GAPDH de controles y SM.