



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA



**Tesis para obtener el Título de
Lic. Químico Farmacéutico Biológico**

PRESENTA

Enrique León Flores
Karina Aguilar Ramírez

No. Cta.

410050420

306011791

Título

**Localización mitocondrial de p53 y apoptosis de células β pancreáticas de ratas
suplementadas con sacarosa y fructosa en el agua de bebida**

Director de Tesis

Dra. Clara Ortega Camarillo

Asesor

Dra. Raquel Retana Ugalde

Lugar de desarrollo del trabajo

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades
Centro Médico Nacional Siglo XXI
Instituto Mexicano del Seguro Social

Junio, 2017

Ciudad de México



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme un espacio lleno de conocimientos, amistad, buenos momentos, y sobre todo la oportunidad de crecer como persona y como profesionista. Especialmente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por dejarnos encontrar entre sus pasillos buenos amigos, entre sus aulas el conocimiento que necesitábamos, y entre los profesores que laboran en esta institución lo mejor de nosotros, tanto como personas y como profesionales de la salud.

Por todo el apoyo y paciencia que nos dio, a la Dra. Clara Ortega Camarillo, por abrirnos las puertas al mundo de la investigación, gracias por recorrer con nosotros el último escalón de la licenciatura, y gracias por toda la enseñanza y confianza que en nosotros depositó diariamente.

Por abrirnos las puertas de su laboratorio y transmitirnos conocimientos para el futuro a la Dra. Alejandra Contreras.

A la Dra. Raquel Retana Ugalde, por su tiempo y apoyo para la revisión de la presente tesis, gracias por sus aportaciones que nos brindó siempre con una sonrisa.

A los maestros Rosa Elba Galván Duarte, María del Pilar Santos Romo y Arturo Valle Mendiola, gracias por tomarse un tiempo para expresarnos sus opiniones, los diferentes puntos de vista que nos dieron nos ayudaron en gran medida a mejorar la presente tesis, nos sentimos orgullosos de contar con el apoyo de los profesores que nos ayudaron a crecer profesionalmente en la facultad.

Al Laboratorio de Bioquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI por brindarnos el compañerismo que necesitábamos para el desarrollo de nuestro trabajo, sigan siendo parte importante de la investigación que aportan los científicos mexicanos.

Al Laboratorio de Biología del desarrollo y teratogénesis experimental del Hospital Infantil Federico Gómez, por brindarnos el apoyo para la realización de este trabajo, sigan demostrando que en México también hay buenos científicos dedicados al servicio de la humanidad.

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra. Clara Ortega Camarillo. Con apoyo financiero del Fondo de Investigación en Salud (FIS/IMSS/PROT/G15/1427).

Dedicatoria

Kary:

Este es el último paso de una formación de casi 21 años, en los cuales dos personas estuvieron ahí para mí cuando lo necesité, mi madre la Sra. Guillermina Ramírez Delgadillo y mi hermana (Q.P.D) Rosa María Aguilar Ramírez, ellas forjaron en mí lo que soy y definitivamente quedará para lo que seré, a ellas dedico el presente trabajo, sin ellas esto no sería posible.

A mi hermanito Sam, gracias por ser un gran ejemplo, apoyarme y alentarme a seguir.

A mis sobrinos Marifer, Mariana y Maximiliano, espero ser un ejemplo y servir de motivación para que logren sus metas, verán que vale la pena cada desvelada, y todo el tiempo que inviertan en aprender.

Kike:

Solo me queda agradecer a mis padres Enrique y Guadalupe por su amor demostrado de todas las formas posibles durante todos estos años, sin ustedes seguramente no podría ser la persona en que me he convertido.

También a mis hermanos Erick y Elsy, por todas las alegrías, peleas y cariño que forman el lazo irrompible que compartimos para siempre.

A mi abuelita Victoria, quien siempre ha estado ahí para escucharnos y brindarnos todo lo que tuviese a su alcance, aunque significara un sacrificio.

A mis viejos y nuevos amigos, así como a las nuevas generaciones, por la amistad y paciencia que significa el haberme conocido, esencialmente por la paciencia.

¡Gracias!

Índice

Introducción.....	11
Marco Teórico.....	13
1. Consumo de carbohidratos.....	13
1.1. Bebidas.....	13
1.2. Cereales.....	13
1.3. Productos ácidos y salados.....	14
2. Inconvenientes generales del consumo de azúcar.....	14
3. Equilibrio dietético e ingesta de azúcares simples.....	15
4. Consumo de fructosa.....	15
5. Metabolismo de la glucosa y fructosa.....	16
5.1. Digestión y absorción de los carbohidratos.....	16
5.2. Metabolismo de los carbohidratos.....	18
5.3. Metabolismo de los carbohidratos en el hígado.....	19
5.4. Estado post-prandial.....	19
5.5. Estado post-absortivo o ayunas.....	23
6. Fisiología pancreática.....	25
6.1. Páncreas.....	25
6.2. Célula β pancreática.....	26
7. Insulina.....	27
7.1. Química.....	27
7.2. Biosíntesis.....	27
7.3. Transporte, receptor y degradación.....	29
8. Sobrepeso y actividad física.....	31

9. Obesidad.....	32
9.1. Definición.....	32
9.2. Epidemiología de obesidad y sobrepeso.....	33
10. Teoría del balance energético.....	34
11. Diabetes Mellitus.....	35
11.1. Definición.....	35
11.2. Epidemiología de Diabetes Mellitus.....	36
11.3. Clasificación.....	37
12. Diabetes mellitus tipo 2.....	38
13. Síndrome Metabólico.....	40
13.1. Definición y Epidemiología del Síndrome Metabólico.....	40
14. Comportamiento de la célula β pancreática en hiperglucemia.....	41
14.1. Glucotoxicidad.....	42
14.2. Mecanismo general de la glucolipototoxicidad.....	43
15. Apoptosis.....	47
15.1. Mecanismos de activación de la muerte celular programada.....	48
15.2. Familia de proteínas Bcl-2.....	49
15.3. Caspasas.....	52
15.3.1. Activación de las caspasas iniciadoras.....	54
15.3.2. Complejo de señales inductoras de muerte (DISC).....	54
15.3.3. Ensamble y estructura del apoptosoma.....	55
15.4. Función de la mitocondria.....	56
16. Debilitamiento de estructuras claves.....	57
16.1. Componentes del citoesqueleto.....	57

16.2.	Apagado de los sistemas que soportan la vida.....	57
16.3.	Limpieza del detritus celular: eliminación de la célula apoptótica.....	57
17.	Proteína p53.....	58
17.1.	El gen de p53.....	59
17.2.	Regulación de p53.....	60
17.3.	Funciones de p53.....	60
18.	Mecanismos de apoptosis dependientes de p53.....	61
	Planteamiento del Problema.....	64
	Hipótesis.....	66
	Objetivo General.....	67
	Objetivos Particulares.....	67
	Material y Métodos.....	68
	Tipo de Estudio.....	68
	Características del Estudio.....	68
	Universo de Estudio.....	68
	Animales de experimentación.....	68
	Variables de Estudio.....	69
	Cuantificación de Insulina.....	70
	Análisis de co-localización de p53 en mitocondrias y análisis de permeabilidad mitocondrial en células β del páncreas por microscopia confocal.....	70
	Análisis de TUNEL para medir apoptosis en células beta del páncreas.....	71
	Análisis de Western Blot.....	71
	Análisis Estadístico.....	72

Resultados.....	73
Consumo de Agua.....	73
Consumo de Alimento.....	73
Peso inicial vs peso final.....	74
Ganancia de Peso.....	74
Curva de Tolerancia a la Glucosa.....	75
Química Sanguínea.....	75
Cuantificación de Insulina.....	76
HOMA-IR.....	76
% Funcionalidad de células beta.....	77
Inmunohistoquímica.....	79
Western Blot.....	82
Discusión de Resultados.....	84
Fase pre sacrificio.....	84
Fase post sacrificio.....	87
Conclusiones.....	91
Perspectivas.....	92
Referencias Bibliográficas.....	93

Índice de contenido gráfico

Ilustraciones

<i>Ilustración 1.</i> Localización del páncreas.....	25
<i>Ilustración 2.</i> Anatomía del páncreas.....	25
<i>Ilustración 3.</i> Representación de la anatomía e histología del páncreas.....	26
<i>Ilustración 4.</i> Microscopia de un islote pancreático.....	26
<i>Ilustración 5.</i> Estructura de la Insulina.....	28
<i>Ilustración 6.</i> Actividad de la insulina tras el consumo de glucosa.....	28
<i>Ilustración 7.</i> Acciones de la insulina.....	30
<i>Ilustración 8.</i> Glucotoxicidad en células beta pancreáticas.....	43
<i>Ilustración 9.</i> Factores que convergen en el desarrollo de la lipotoxicidad en células beta pancreáticas.....	45
<i>Ilustración 10.</i> Publicaciones sobre p53	61
<i>Ilustración 11.</i> Vías citosólica y mitocondrial de apoptosis mediadas por p53.....	62

Tablas

<i>Tabla 1.</i> Factores que regulan la secreción de insulina.....	29
<i>Tabla 2.</i> Clasificación de los miembros de la familia Bcl.....	50
<i>Tabla 3.</i> Análisis estadístico inmunohistoquímicos.....	77

Gráficas

<i>Gráfica 1.</i> Consumo de agua y tratamiento semanal de ratas.....	73
<i>Gráfica 2.</i> Consumo de Alimento semanal de ratas.....	73
<i>Gráfica 3.</i> Diferencia entre peso inicial y final de ratas.....	74
<i>Gráfica 4.</i> Descripción gráfica del peso obtenido y tejido adiposo de ratas.....	74
<i>Gráfica 5.</i> Curva de tolerancia a la glucosa de ratas.....	75
<i>Gráfica 6.</i> Química Sanguínea de ratas.....	75
<i>Gráfica 7.</i> Valores séricos de insulina de ratas.....	76
<i>Gráfica 7.1.</i> Resultados de índices HOMA-IR de ratas.....	76
<i>Gráfica 7.2</i> Funcionalidad de células beta.....	77
<i>Gráfica 8.</i> Índice de apoptosis en células beta pancreáticas de rata.....	78
<i>Gráfica 9.</i> Análisis Western Blot 1.....	84
<i>Gráfica 10.</i> Análisis Western Blot 2.....	84

Figuras

<i>Figura 1.</i> Tinción de TUNEL en islotes pancreáticos en ratas control.....	79
<i>Figura 2.</i> Tinción de TUNEL en islotes pancreáticos en ratas tratadas con fructosa.....	80
<i>Figura 3.</i> Tinción de TUNEL en islotes pancreáticos en ratas tratadas con Sacarosa.....	80
<i>Figura 4.</i> Tinción de mitocondrias en islotes pancreáticos de ratas control.....	81
<i>Figura 5.</i> Tinción de mitocondrias en islotes pancreáticos de ratas tratadas con fructosa.....	81
<i>Figura 6.</i> Tinción de mitocondrias en islotes pancreáticos de ratas tratadas con sacarosa.....	82

Introducción

La alimentación es un elemento clave del estilo de vida y medio ambiente que influye en la salud y que puede ser controlada. Hoy en día, la obesidad y la diabetes mellitus se han convertido en un problema de salud pública, con una prevalencia que incrementa de forma alarmante. Varias explicaciones se han planteado para entender este fenómeno, una de ellas es la asociación con el consumo de fructosa, cabe entonces reflexionar: ¿Cuáles son los factores que han intervenido para que el consumo sea nocivo? Al revisar la evidencia podemos concluir que las alteraciones metabólicas que produce la fructosa no son exclusivas de este azúcar y los efectos que tiene sobre la salud o enfermedad dependen directamente del uso que el ser humano le pueda dar. En general, un alto consumo en forma de hidratos de carbono refinados correlaciona positivamente con un incremento en el riesgo en obesidad y de resistencia a la insulina. Se sugiere que la dieta específicamente alta en fructosa contribuye a la presencia de alteraciones metabólicas que resultan en ganancia de peso, hiperlipidemia, resistencia a la insulina, hiperuricemia y diabetes tipo 2 ⁽¹⁾.

La diabetes es una serie de enfermedades metabólicas, caracterizadas por hiperglucemia debida a anormalidades en la secreción y/o acción de la insulina. Es una de las enfermedades crónico-degenerativas que más comúnmente afectaba a las personas de edad mayor y la forma clínica de mayor frecuencia en este grupo es el tipo 2. La diabetes no solo disminuye la expectativa de vida, sino que es de las principales causas del deterioro funcional y la dependencia. A corto plazo la hiperglucemia se ha considerado como la causa de un deterioro funcional insidioso en el paciente, con presencia de fatiga, debilidad muscular, deficiencias funcionales e inducción a apoptosis ⁽²⁾.

El gen supresor de tumores p53, comúnmente conocido como “el guardián del genoma”, está directamente implicado en detener la formación y desarrollo de tumores, siendo capaz de introducir senescencia celular o apoptosis ^(3,4). Se activa cuando la célula sufre daños en su DNA o cuando es sometida a estrés celular. En condiciones normales p53 está presente en niveles bajos en todas las células. Cuando la célula es agredida por agentes externos, p53 activa sus funciones que conllevan a la detención del ciclo celular, la reparación del DNA o la inducción de apoptosis. Estos procesos son en gran medida dependientes de la capacidad de p53 para activar la transcripción de determinados genes ⁽³⁾. La proliferación de células oncogénicas, así como el estrés genotóxico, entre otros, induce la estabilización y activación de p53. Estudios previos proponen que p53 interactúa con proteínas anti y/o pro-apoptóticas que regulan la permeabilidad y el potencial de membrana mitocondrial, permitiendo la liberación de factores pro-apoptóticos adicionales como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis, que participan en la formación del apoptosoma y la subsecuente activación de caspasas ⁽⁴⁾. Conocidas las características anteriores de p53 es posible utilizarle como marcador de apoptosis en célula beta pancreática, esto se toma como punto de partida para la comparación de células de modelos tratados contra las células de los controles, lo cual representa el objetivo del presente trabajo.

Marco Teórico

1. Consumo de carbohidratos

Los carbohidratos están presentes en gran variedad de alimentos y su ingesta es imprescindible para el correcto funcionamiento del organismo; sin embargo, la dieta actual tiende al abuso de productos procesados con alto contenido de azúcar oculto.

A pesar de la legislación actual de etiquetado de alimentos, no es obligatorio indicar en el etiquetado de los alimentos la cantidad de azúcar añadido, por lo que resulta difícil conocer su aporte. Además, cuando se incluye esta información en la etiqueta no se suele distinguir entre azúcares naturales, propios del alimento, y azúcares añadidos.

En un estudio realizado por la Organización de Consumidores y Usuarios (OCU) se valoraron 110 alimentos procesados de consumo habitual.

Descripción de grupos de alimentos con alto contenido de azúcar:

- **Bebidas.** Los productos más edulcorados son los refrescos, que incluyen una media de 21 gramos de azúcar añadido por vaso. Los néctares y ciertas bebidas alcohólicas (licores, cremas o cócteles) son otras bebidas con contenido en azúcares añadidos notable. Incluso los jugos de fruta incorporan algo de azúcar añadido, a menos que adviertan explícitamente de su ausencia en el etiquetado.
- **Cereales.** Los helados, chocolates, mermeladas y panadería en general son los productos de desayuno y merienda más edulcorados. El contenido en azúcar añadido de los cereales para niños (12.2g/ración) es casi el doble del que puede encontrarse en los cereales normales o de adultos (6.5g/ración). Otros alimentos irónicamente azucarados son algunos postres para bebés y ciertas mermeladas tipo light; en ambos productos el azúcar añadido debería ser excluido.

- **Productos ácidos y salados.** El azúcar disminuye la acidez, motivo por el que se añade con frecuencia alimentos ácidos, como los elaborados a base de tomate (como el ketchup o la salsa de tomate). Además, existen otros alimentos salados a los que también se añade azúcar como ocurre con el maíz envasado: una pequeña lata incorpora azúcar añadido equivalente a 4 g.

2. Inconvenientes generales del consumo de azúcar

El azúcar de mesa es inofensivo por sí misma, pero su aporte no nos proporciona nutrientes imprescindibles para el organismo que no puedan ser aportados por otros alimentos. La sacarosa es transformada en energía gracias a la participación de vitaminas y minerales, en especial del calcio. Dado que no son aportadas por el azúcar refinado, el organismo se ve forzado a usar sus propias reservas pudiendo llegar a provocar carencias de vitaminas o descalcificación. El problema es que, si la cantidad de azúcar ingerida a lo largo del día es excesiva, nos proporciona un exceso de calorías y puede favorecer patologías, como la obesidad, la caries y la diabetes tipo 2.

Si no tenemos en cuenta el azúcar oculto en multitud de alimentos procesados, la cantidad final ingerida será muy alta. En consecuencia, el azúcar no se quema y se almacena en forma de grasa, además el consumo de azúcar suele ir asociado a grasas (en panes, pasteles, chocolates), así el aporte de grasa también es muy alto.

3. Equilibrio dietético e ingesta de azúcares simples

Se recomienda que el aporte de azúcar añadido en la dieta no represente más del 10% del aporte energético diario. Sin embargo, en una alimentación equilibrada de azúcar natural proveniente de frutas y hortalizas es suficiente para satisfacer las demandas de glucosa en nuestro cuerpo. Asimismo, el azúcar de frutas o productos naturales o integrales, al asimilarse de forma más lenta no estimula la lipogénesis de forma tan intensa. En general se aconseja reducir el consumo de alimentos procesados y aumentar el de alimentos naturales como frutas, verduras y lácteos no azucarados ⁽³²⁾.

4. Consumo de fructosa

Todos los días ingerimos alimentos que incluyen en su formulación algún endulzante. En México, el jarabe alto en fructosa es empleado principalmente por la industria del refresco, especialmente de las de origen norteamericano. A través de las empresas también norteamericanas que lo comercializan, se ha ido extendiendo su uso a otros diversos productos alimenticios a precios menores que los de la sacarosa o azúcar de caña, un compuesto formado por la unión de una molécula de glucosa y una de fructosa, por lo que se está desplazando del mercado a este edulcorante mexicano. Resultado del deterioro de las relaciones entre los Estados Unidos de América y Cuba, se planteó la producción de sustitutos del azúcar como la miel de maíz, ahora llamada miel fructosada.

Las mieles fructosadas son concentrados de fructosa hasta con un 90 por ciento de este carbohidrato. Son elaborados mediante la hidrólisis de almidón procedente del maíz. La fructosa libre se encuentra en la miel de abeja (entre 20 y 40 % de los azúcares que contiene), en frutas y jugos de fruta (entre 20 y 40 % de sus azúcares), así como en algunos vegetales (entre el 1 y 2 % de sus azúcares).

También se emplean en bebidas para deportistas, ya que se transporta directamente al hígado para producir energía, la cual es liberada en forma de ATP o almacenada como glucógeno en el hígado sin causar elevación de la insulina en el plasma, posibilitando así la movilización de grasas. Sin embargo, dos efectos importantes en el organismo por la presencia de fructosa en exceso: el intestino no tolera grandes concentraciones de fructosa sin que produzcan alteraciones importantes, como diarreas, y en caso de no ocurrir esto, se metaboliza rápidamente para transformarse en triacilgliceroles ⁽³³⁾.

5. Metabolismo de la glucosa y fructosa

5.1 Digestión y absorción de los carbohidratos

Los carbohidratos que se ingieren en la dieta son mayoritariamente polisacáridos; y en menor proporción monosacáridos o disacáridos. Los primeros se encuentran presentes en diferentes alimentos como en los cereales, las legumbres y los tubérculos; mientras que los segundos se encuentran en la leche, las frutas y el azúcar. Excepto los monosacáridos (y algunos disacáridos que serán hidrolizados por una disacaridasa del interior del enterocito), que no precisan ser digeridos previamente, el resto de polímeros glucídicos debe ser hidrolizado por las respectivas enzimas del tracto gastrointestinal para poder ser absorbidos. La degradación de los disacáridos ingeridos con el alimento, pueden ser directamente hidrolizados en la superficie en de la mucosa intestinal por la acción de un conjunto de enzimas: la maltasa, la lactasa o la sacarasa. Finalizado el proceso de digestión, la mayor parte de monosacáridos por absorber son glucosa, y en menor cuantía fructosa y galactosa.

La glucosa formada por la digestión de los carbohidratos de la dieta, se absorbe por el intestino. El transporte a través de la membrana de la mucosa del enterocito depende del tipo de monosacárido que debe atravesar la membrana:

- El transporte de D-glucosa y D-galactosa se lleva a cabo mediante co-transporte sódico.
- El transporte de D-fructosa se lleva a cabo mediante difusión facilitada.
- El transporte de las pentosas se lleva a cabo mediante difusión simple.

La absorción intestinal aporta mayoritariamente glucosa a la sangre, además de fructosa y galactosa, a favor de un gradiente de concentración. El paso de la glucosa (así como de la fructosa y la galactosa) desde el enterocito a la sangre se realiza por medio de transportadores de glucosa, GLUTs (glucose transporters). Los GLUTs son proteínas transmembranales encargadas del ingreso de los monosacáridos a todas las células del organismo. Se han identificado trece isoformas diferentes (GLUT-1 a GLUT-13), cuya ubicación y cinética está adaptada a las necesidades metabólicas de los distintos tejidos del organismo, siendo la isoforma GLUT-2 la que se expresa en el enterocito.

Aquellos oligosacáridos y polisacáridos que no pueden ser hidrolizados por las enzimas mencionadas y, por lo tanto, no pueden formar monosacáridos asimilables para el ser humano (celulosa, hemicelulosa, α -glucano, inulina, pectina, etc.) forman la fibra alimentaria. Ésta a su vez, se clasifica como soluble e insoluble, puede ser fermentada en el colon, dando lugar a ácidos orgánicos de cadena corta que pueden absorberse y metabolizarse liberando energía.

5.2 Metabolismo de los carbohidratos

Los carbohidratos, y en especial la glucosa, son una fuente importante de energía. Los niveles de glucemia se deben mantener para permitir el metabolismo de aquellos tejidos que utilizan glucosa como sustrato primario (cerebro, hematíes, médula renal, cristalino y córnea del ojo, testículos). Esto se consigue mediante una regulación entre la captación periférica y la producción hepática de glucosa, manteniéndose en ayunas unos niveles de glucosa en sangre de 60-110 mg/dL.

La regulación de la glucemia se encuentra principalmente bajo el control hormonal, siendo la insulina y el glucagón las principales hormonas responsables; aunque la adrenalina, los glucocorticoides, la hormona del crecimiento y las hormonas tiroideas, afectan también al metabolismo de los glúcidos. La hiperglucemia tras el aporte de alimentos causa, de inmediato, un aumento de la secreción pancreática de insulina e inhibición de la secreción de glucagón. La insulina, aunque es multifactorial y afecta a numerosos órganos y tejidos, regula la homeostasis de la glucosa ejerciendo su función en hígado, músculo y tejido adiposo, principalmente. Se trata de una hormona favorecedora del almacenamiento de la energía que actúa estimulando la captación y el metabolismo de la glucosa, e inhibiendo la producción de la misma en el hígado.

La hipoglucemia, en cambio, desencadena una serie de mecanismos pancreáticos opuestos que conllevan la inhibición significativa de la secreción de insulina y aumento de la secreción de glucagón. El glucagón, cuya acción es opuesta a la de la insulina, actúa movilizando las reservas endógenas en estado de ayuno o cuando la dieta es hiperprotéica.

5.3 Metabolismo de los carbohidratos en el hígado

El hígado es el órgano esencial en el mantenimiento de la glucemia en el organismo (homeostasis de la glucemia) mediante un proceso que implica reducir la disponibilidad de glucosa en la sangre, almacenándola en formas de reserva, cuando los niveles son superiores a la demanda (estado post-prandial); y degradar estas formas de reserva cuando los niveles de glucosa en sangre disminuyen (estado post-absortivo o ayuno).

El ajuste y la producción hepática de la glucosa están sujetos al efecto que ejercen las hormonas insulina y glucagón, principalmente; haciendo del páncreas un instrumento de ajuste fino que evita variaciones peligrosas de la glucosa sanguínea. Así, cuando el nivel de glucosa en sangre aumenta, el páncreas libera insulina (relación insulina/glucagón alta) promoviendo la utilización y almacenamiento de la glucosa en el hígado y otros tejidos, ya sea con la producción de un segundo mensajero de la acción de la insulina o bien induciendo una cascada de proteína quinasa que promueve la utilización de glucosa por estos tejidos. En cambio, cuando el nivel de glucosa sanguíneo disminuye, el páncreas responde liberando menos insulina y más glucagón (relación insulina/glucagón baja), lo cual promueve la producción de glucosa hepática a través de una serie de eventos intracelulares que se activan con el aumento de la concentración intracelular de AMPc.

5.4 Estado post-prandial

Cuando los niveles de glucosa en sangre aumentan, la entrada de glucosa en el hepatocito tiene lugar por medio de los transportadores de glucosa GLUT-2. Estos transportadores, independientes de insulina, se caracterizan por tener una baja afinidad por la glucosa a pesar de su alta capacidad de transporte. Esto quiere decir que los GLUT-2 son muy sensibles a los cambios de glucemia, y aseguran de esta forma que la entrada de la glucosa en el hígado tenga lugar en condiciones de hiperglucemia.

Una vez dentro del hepatocito, el destino principal de la glucosa es su utilización para la síntesis de su forma de almacenamiento, el glucógeno. El glucógeno es un polisacárido altamente ramificado formado por la unión de glucosas mediante enlace glucosídico tipo α -(1,4) y α -(1,6) en los puntos de ramificación. La principal función del glucógeno hepático es conservar la concentración sanguínea de glucosa, en particular durante las etapas iniciales del ayuno. La síntesis de glucógeno ocurre a partir del precursor activo UDP-glucosa. En la síntesis del precursor activo UDP-glucosa. En la síntesis de este polisacárido intervienen dos enzimas: la enzima glucógeno sintasa y la enzima “ramificante”; la primera de estas enzimas cataliza la formación de los enlaces glucosídicos α -(1,4) de las cadenas lineales, mientras que la enzima “ramificante” forma los enlaces glucosídicos α -(1,6) de los puntos de ramificación, dando lugar a una estructura arboriforme. La glucógeno sintasa es la principal enzima reguladora de la vía, y se caracteriza por tener dos formas cambiables entre sí por fosforilación-desfosforilación: una forma activa (a), y una forma inactiva (b); siendo la forma desfosforilada la forma activa.

Las ramificaciones incrementan el número de terminaciones no reductoras a las que se pueden añadir otras moléculas de glucosa, lo que acelera el ritmo de la síntesis (y también de la degradación) del glucógeno e incrementa la manera considerable del tamaño de la molécula. El incremento de glucógeno ejerce un retrocontrol sobre la propia síntesis del glucógeno, disminuyendo la forma activa de la glucógeno sintasa a medida que ésta se acumula en el hígado. Debido a que la estructura polimérica del glucógeno es muy voluminosa (por el elevado nivel de hidratación de la cadena polisacárida), sus posibilidades de síntesis, y sobre todo de almacenamiento, están físicamente limitadas.

No obstante, la capacidad de almacenamiento de glucógeno del hígado es alta, pudiendo llegar a constituir el 10% del peso húmedo de este órgano en una persona bien nutrida. Se estima que la cantidad máxima de glucógeno que puede almacenarse en el hígado (del orden de 100g en un individuo adulto).

Una vez recuperados los depósitos de glucógeno, el exceso de glucosa restante es utilizado para la biosíntesis de ácidos grasos y triacilgliceroles. Para ello, la glucosa es convertida en piruvato por el proceso de glucólisis y este es transformado en acetil-CoA por acción de la piruvato deshidrogenasa. De éste modo, aunque la glucólisis es una vía universal de degradación de la glucosa cuya función principal es el rendimiento energético en forma de ATP, en el hígado el acetil-CoA obtenido a partir del piruvato es a su vez utilizado primordialmente para la biosíntesis de ácidos grasos. Los triacilgliceroles formados en el hígado son liberados al torrente circulatorio en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y del plasma pasan al tejido adiposo para su almacenamiento.

La glucólisis está promovida por la insulina mediante la estimulación de la actividad de las enzimas reguladoras de la vía: la glucoquinasa, la fructoquinasa y la piruvatoquinasa. Estas enzimas se denominan enzimas reguladoras al catalizar reacciones irreversibles y estar sujetos a su vez a control alostérico (concentración de determinados metabolitos) y/o modificación covalente. De entre ellas destacar la glucoquinasa, una isoenzima hepática de la hexoquinasa con propiedades cinéticas muy diferentes de las hexoquinasas presentes en otros tejidos. La glucoquinasa tiene una K_m (17mM) mucho más elevada que el resto de hexoquinasas (y por ello, baja afinidad por la glucosa), y considerablemente mayor que las concentraciones normales de la glucosa en sangre (-5mM). Ello permite que la fosforilación de la glucosa en el hígado tenga lugar tan sólo cuando la concentración de glucosa dentro del hepatocito sea elevada sin que se produzca inhibición de la actividad de la enzima por

el producto de la reacción (glucosa-6-fosfato). Además, esta isoenzima tiene una velocidad elevada, lo cual junto con la capacidad de transporte de la glucosa de los transportadores GLUT-2 a través de la membrana del hepatocito, garantiza que la concentración de glucosa en la sangre se equilibre rápidamente, reduciendo al mínimo la hiperglucemia durante el periodo de absorción de los carbohidratos. El resultado final es que el hígado sólo utiliza la glucosa a una velocidad significativa cuando los niveles de glucosa sanguíneos son muy elevados. Los individuos que consumen grandes cantidades de comida rica en glúcidos contienen mayores cantidades de las enzimas reguladoras de la vía glucolítica en el hígado (glucoquinasa, 6-fructo-1-quinasa y piruvato quinasa); contribuyendo en mayor proporción a disminuir los niveles elevados de glucosa sanguínea en ellos, cuando la proporción glucagón/insulina en la sangre es baja, lo cual ocurre en el estado post-prandial, la insulina induce la transcripción de estas enzimas glucolíticas clave, incrementándose así la capacidad enzimática de la glucólisis en el hígado. En cambio, la ausencia de insulina hace que el hígado del paciente diabético presente un déficit de estas enzimas, a pesar de los elevados niveles de glucosa en sangre, siendo ésta una de las razones por las que el hígado de los diabéticos tiene una menor capacidad para utilizar carbohidratos.

La glucosa también es utilizada en el hígado por la vía de las pentosas fosfato para la producción de NDAPH, el cual es necesario en reacciones anabólicas (como la biosíntesis de ácidos grasos y de esteroides), en el mantenimiento del glutatión en estado reducido y en numerosas reacciones catalizadas por los sistemas enzimáticos microsomales.

Además, a partir de la utilización de la glucosa por la vía de las pentosas fosfato se obtienen ribosas fosfato, requeridas para la síntesis de nucleótidos tales como ATP y los que se encuentran en el DNA y el RNA.

5.5 Estado post-absortivo o ayunas

La disminución de la glucemia desencadena un aumento de la secreción pancreática de glucagón a la sangre e inhibición de la secreción de insulina. La principal acción del glucagón es estimular la degradación del glucógeno hepático (glucogenólisis). Una vez el glucagón se ha unido a sus receptores específicos de membrana se activa la glucógeno fosforilasa. La glucógeno fosforilasa es la enzima que contribuye a la movilización del glucógeno escindiendo los enlaces α -(1,4) de las cadenas lineales del glucógeno; mientras que la enzima “desramificante” es la responsable de hidrolizar los enlaces glucosídicos α -(1,6) de los puntos de ramificación del polisacárido. La glucógeno fosforilasa, al igual que la glucógeno sintasa, se caracteriza por tener dos formas intercambiables entre sí: forma activa y forma inactiva. Mientras que el glucagón promueve la forma activa de la glucógeno fosforilasa; al mismo tiempo reduce la actividad de la enzima glucógeno sintasa, dando lugar a un sistema de regulación que impide que ambas enzimas estén totalmente activas al mismo tiempo.

El glucógeno puede satisfacer las necesidades de glucosa sólo 10 a 18 horas en ausencia de ingesta dietética de carbohidratos. Durante el ayuno prolongado se agotan las reservas hepáticas de glucógeno y se forma glucosa a partir de precursores como lactato, piruvato, glicerol (derivado de la reserva de triacilgliceroles) y cetoácidos alfa (ácido pirúvico y α -cetoglutarato, derivados del catabolismo de los aminoácidos glucogénicos).

La vía de síntesis de glucosa a partir de estos compuestos se denomina gluconeogénesis, y tiene lugar únicamente en el hígado. Aunque pueda parecer que la formación de glucosa se produce mediante simple inversión de la glucólisis, no es así, pues en los puntos de regulación de ambas rutas participan enzimas diferentes.

La gluconeogénesis está promovida por el glucagón mediante la estimulación de la actividad de las enzimas reguladoras de la vía: glucosa-6-fosfatasa, fructosa-1,6-bifosfatasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa y piruvato carboxilasa.

En el estado de ayuno, la actividad de las enzimas reguladoras gluconeogénicas no sólo está relacionada con los niveles de glucosa sanguínea, sino también con el suministro de ácidos grasos por el hígado, lo que conlleva a su vez un incremento de la concentración de acetil-CoA y ATP en el hepatocito. Ambos metabolitos promueven la gluconeogénesis (e inhiben la glucólisis) ejerciendo un control alostérico sobre los reguladores de dicha vía. Así, por ejemplo, el acetil-CoA estimula a la piruvato carboxilasa, que a su vez inhibe de forma indirecta a la fosfofructoquinasa de la vía glucolítica al incrementar la síntesis de citrato (efector alostérico negativo de la fosfofructoquinasa). Por tanto, la oxidación de los ácidos grasos no sólo proporciona ATP para la síntesis de glucosa, sino que promueve dicho proceso. Además, la capacidad enzimática de la gluconeogénesis en el hígado está incrementada en el estado de ayuno, pues una proporción elevada glucagón/insulina en la sangre induce la síntesis de los enzimas involucrados en los puntos de regularización de la vía. El glucagón señala la inducción de la síntesis de mayores cantidades de enzimas clave de la gluconeogénesis actuando a nivel transcripcional, al mismo tiempo que causa la represión de la transcripción génica de las enzimas reguladoras de la glucólisis ⁽³⁴⁾.

6. Fisiología pancreática

6.1 El páncreas

El páncreas es una glándula mixta, contiene tejido exocrino conformado por las glándulas acinares productoras de enzimas digestivas; y también presenta un tejido endocrino compuesto por las células de los islotes de Langerhans, que producen hormonas que mantienen la homeostasis de la glucosa (Fig. 1). En conjunto, los islotes de Langerhans representan alrededor de 1% del peso de la glándula. El páncreas está cubierto por una capa de tejido conectivo, rico en células mesoteliales, con finos tabiques que dividen a la glándula en lóbulos ⁽³⁵⁾.



Ilustración 1. Localización del páncreas

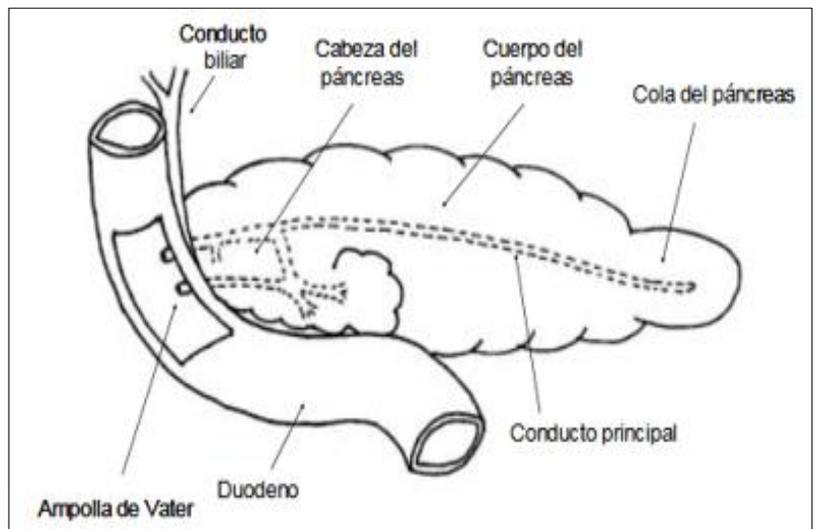


Ilustración 2. Anatomía del páncreas

6.2 La célula β pancreática

Las células de los islotes están delimitadas en forma incompleta por una capa delgada de tejido conectivo reticular que se continúa en el interior de los islotes en escasa cantidad. El tejido endocrino adulto contiene cuatro tipos celulares diferentes, con mayor densidad en la zona de la cola. Estas células son: células productoras de insulina o β , que representan 70%; células productoras de glucagón o α , que representan 20%; las células productoras de somatostatina o δ , que representan entre 5 y 10%, y las células productoras del polipéptido pancreático o PP, que abarcan alrededor de 2%. Existen algunos tipos celulares secundarios, las células productoras del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP o células DI) y las células secretoras mixtas (EC o enterocromafines). Estos grupos están contenidos en una estructura altamente organizada, donde las células β están en el interior del islote y el resto de los grupos celulares se encuentra en la periferia. La organización del aporte vascular permite transportar sangre del núcleo a la periferia y se le conoce como BAD (β - α - δ) por su forma centrífuga de aporte vascular. Un cuarto tipo celular se encuentra en la periferia del islote pancreático, es similar a las células neuronales de Schwann, ocupan menos de 1%, se estudia su importancia en la regeneración pancreática ⁽³⁶⁾.

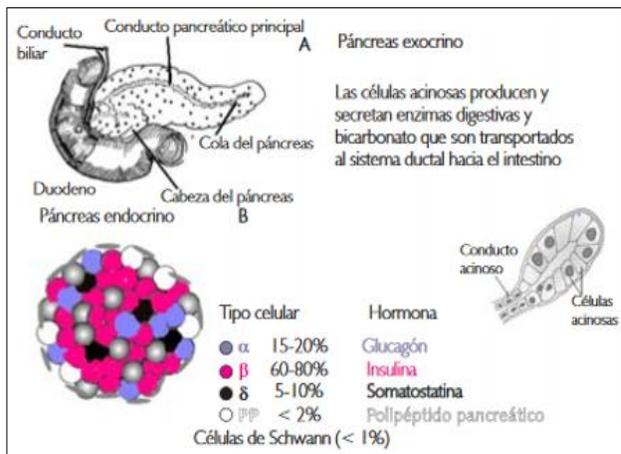


Ilustración 3. Representación de la anatomía e histología pancreática

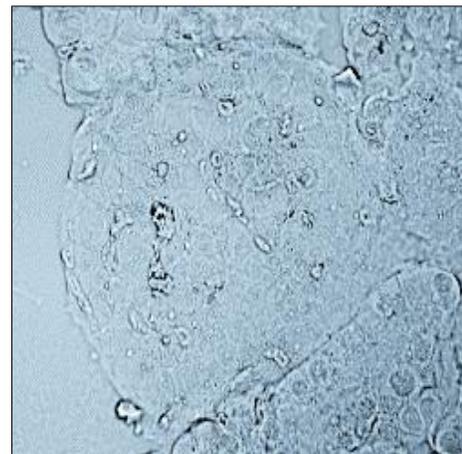


Ilustración 4. Observación en microscopio de un islote pancreático, en campo claro a 40x, CMN SXXI, 2016

7. Insulina

7.1 Química

La insulina es un polipéptido de peso molecular 5800, compuesto por dos cadenas de aminoácidos, que en total tienen 51 aminoácidos. La cadena A tiene 21 aminoácidos, y la cadena B 30 aminoácidos. Ambas cadenas se encuentran unidas por 2 puentes disulfuro ubicados entre los aminoácidos A-7/B-7, y A-20/B-19. Además, la cadena A, tiene también un puente interno de disulfuro entre los aminoácidos A6/A11. La integridad de la molécula es indispensable para ejercer las acciones farmacológicas. Las cadenas A o B, separadas luego de la destrucción enzimática de los puentes disulfuro, carecen completamente de acciones farmacológicas. Los aminoácidos de las posiciones B-22 y B-30, son indispensables para el mantenimiento de las acciones de crecimiento, se relacionan con los aminoácidos A-4, A-20, A-21, B-10, B-13, y B-26.

7.2 Biosíntesis

La síntesis de la insulina, se lleva a cabo en los islotes de Langerhans, del páncreas. En el islote, se han distinguido por lo menos cuatro tipos celulares: células alfa: secretoras del glucagón pancreático (también es producido por las células argentafines de la mucosa gastrointestinal); células beta: productoras de insulina; células delta: secretoras de la somatostatina pancreática, que inhibe a la hormona del crecimiento, la secreción de insulina, glucagón, renina, gastrina, secretina, pepsina, y colecistoquinina. La somatostatina, también se produce en hipotálamo, cerebro, médula, ganglios, y mucosa gastrointestinal. Células PP: secretoras del polipéptido pancreático.

7.3 Transporte, receptor y degradación

La insulina circula como un polímero compuesto por tres monómeros de 600 Dalton de peso cada uno. La vida media es corta (entre 10 minutos y 3 horas); liberada del páncreas, a través de la vena porta llega al hígado donde un 50% se retiene y en su mayoría es degradada allí. El receptor insulínico se encuentra en la membrana citoplasmática y está compuesto por cuatro subunidades (dos alfa y dos beta) unidas por puentes disulfídicos. Las subunidades alfa alojan los dominios fijadores de insulina y son extracelulares mientras que las beta penetran en la célula. Este receptor es una tirosinkinasa, pues transporta fosfato del ATP a residuos tirosínicos en las proteínas intracelulares blanco. Por acción de la insulina hay autofosforilación de las subunidades alfa, se activa el receptor y se producen más fosforilaciones intracelulares. Una serie de sustratos fosforilantes intracelulares como el IRS-1 como centro de reclutamiento y activación de enzimas que median varios de los efectos insulínicos, procesos conocidos como señales de transducción insulínica ⁽³⁹⁾.

ESTIMULAN		INHIBEN	
<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa • Fructosa, otros monosacáridos • Aminoácidos (arginina, leucina) • Ácidos grasos • Estimulantes adrenérgicos beta 2: Salbutamol • Sulfonilureas 	<ul style="list-style-type: none"> • Agonistas colinérgicos • Estimulación vagal • Xantinas (teofilina) • Gastrina • Secretina • Glucagón • Prostaglandinas • Hormonas contrareguladoras de la insulina (indirectamente) 	<ul style="list-style-type: none"> • Diuréticos tiazidicos • Diazóxido • Beta.bloqueadores • Difenil-hidantoinato sódico • Puromicina • Estimulantes adrenérgicos alfa: Norepinefrina • Somatostatina 	<ul style="list-style-type: none"> • Colchicina • Insulina • Vagotomía • 2-desoxiglucosa • Manoheptulosa • L-asparaginasa • Ayuno • Biguanidas

Tabla 1. Factores que regulan la secreción de insulina ⁽⁴⁷⁾

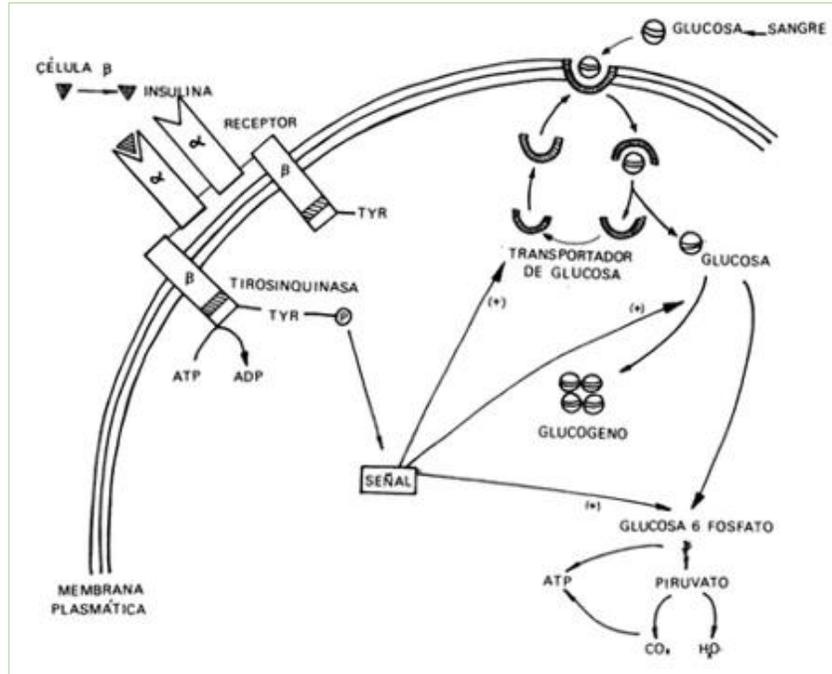


Ilustración 7. Acciones de la insulina.

Incrementa el transporte de la glucosa desde el exterior de la célula al interior de la misma. Aumenta la síntesis de glucógeno y estimula la degradación de la glucosa hasta CO_2 y H_2O . En la membrana plasmática podemos observar el receptor de la insulina con las subunidades α extracelulares y las subunidades β que penetran en la célula y tienen actividad tirosinquinasa. ⁽⁴⁷⁾

Como el péptido C es excretado en la orina, la medida de sus niveles en orina de 24 horas refleja la cantidad de insulina secretada durante ese tiempo. Así que el medir los niveles de péptido C en orina de 24 horas puede ser utilizado para comprobar la capacidad secretora de insulina que tiene un paciente.

Gran parte de la insulina circulante está unida a una β -globulina, pero la vida media de la insulina en el plasma es muy breve, unos 5 minutos, porque enseguida es captada por los tejidos, en especial el hígado, los riñones, el músculo y el tejido adiposo. Una cantidad insignificante de la insulina circulante se elimina por la orina.

Efectos generales de la insulina en biomoléculas: sobre proteínas, causa transporte activo de aminoácidos al interior de las células, así como incremento de la síntesis de proteínas y disminución del catabolismo proteico, favoreciendo el almacenamiento de proteínas en las

células. La insulina y la hormona del crecimiento actúan de modo sinérgico para promover el crecimiento; sobre los lípidos, aumenta la lipogénesis con conversión de glucosa o de otros nutrientes en ácidos grasos y aumento de los depósitos de triacilgliceroles en el tejido adiposo. Asimismo, disminuye la lipólisis; sobre los carbohidratos, se secreta en respuesta a un nivel elevado de glicemia y produce un efecto hipoglicemiante (disminuye los niveles de glucosa en plasma) lo que se debe a que facilita la entrada de glucosa en las células que poseen receptores para la insulina. Además, acelera la conversión de glucosa en glucógeno (glucogénesis) con aumento de los depósitos de glucógeno en las células y disminuye la glucógenolisis y la gluconeogénesis ⁽³⁹⁾.

8. Sobrepeso y Actividad Física

ENSANUT 2016 indica que 48 millones de adultos se encuentran en sobrepeso. El 42.6% de los hombres mayores de 20 años de edad presentan sobrepeso y 26.8% obesidad. En el caso de las mujeres con estas enfermedades representan el 35.5 y 37.5%, respectivamente. En la población escolar (5-11 años) la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 19.8 y 14.6%, respectivamente. Las gráficas que contiene el documento son todavía más reveladoras, ya que retoman datos desde 1988, cuando sólo el 9.5% de la población padecía de obesidad, el 25% de sobrepeso y el 65.5% se encontraba en el rango “adecuado”.

En 2016 los registros observados cambiaron significativamente; 29 años después, la obesidad enferma al 35.2% de los mexicanos. El 35.4% se encuentra en rangos de sobrepeso y el 29.4%, se clasifica en un peso “adecuado”. Se señala a la diabetes mellitus, como la segunda causa de muerte en el país, apoyado en las cifras de la

ENSANUT 2016, que “señala que 6.4 millones de adultos padecen diabetes (9.2% de los adultos). El 47% de estas personas han sido diagnosticadas también con hipertensión arterial, significando que del total de población con 20 años o más 4.3% (aproximadamente 3 millones) viven con diabetes e hipertensión” ⁽⁴⁰⁾.

La obesidad es una enfermedad sistémica que supone un factor de riesgo para un cuadro múltiple de otras patologías, además de reducir la esperanza y calidad de vida de las personas que la padecen. El tratamiento idóneo de la obesidad implica un enfoque multifactorial que debería ser efectuado por un equipo multidisciplinario, uno de los pilares fundamentales, tanto del tratamiento como de la prevención de esta enfermedad, es la actividad física.

La preocupación por la salud y la estética en relación al sobrepeso y la obesidad en nuestra sociedad es una realidad ampliamente extendida. Sin embargo, hoy en día parece que el diseño de intervenciones que se basan en la actividad física plantea diferentes dudas, fundamentalmente en cuanto al tipo de ejercicio (cardiovascular, entrenamiento con cargas o combinaciones) y a las intensidades de ejecución ⁽⁴¹⁾.

9. Obesidad

9.1 Definición

Tradicionalmente el umbral del sobrepeso y la obesidad se marca en función del índice de masa corporal, siendo de 25-29,9kg/m². La obesidad se define como un exceso de grasa corporal, que en el caso de varones está por encima del 25% del peso corporal, y en mujeres por encima del 32%. El gran problema derivado de la obesidad es el mayor riesgo de mortalidad y de padecer diversos trastornos como el síndrome metabólico, diabetes tipo 2,

enfermedades cardiovasculares, hipertensión, algunos tipos de cáncer o dificultades del aparato locomotor. Todo ello provoca que la obesidad suponga la segunda causa de muerte prevenible en países desarrollados.

Parece ser que el exceso de tejido adiposo no es el principal responsable de la comorbilidad asociada a la obesidad, siendo más relevante la distribución antropométrica de la misma y la realización de actividad física. La distribución localizada de grasa en la zona visceral y abdominal es la distribución adiposa que más incrementa el riesgo de padecer resistencia a la insulina, una enfermedad cardiovascular o de sufrir síndrome metabólico. Respecto al nivel de actividad física, se ha comprobado que una buena condición física en los adolescentes, incluso entre los que presentan un porcentaje mayor de grasa corporal, da lugar a iguales o incluso mejores indicadores de salud que en los delgados pero sedentarios.

9.2 Epidemiología de obesidad y sobrepeso

- Desde 1980, la obesidad se ha más que doblado en todo el mundo.
- En 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos.
- En 2014, el 39% de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso, y el 13% eran obesas.
- La mayoría de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas de personas que la insuficiencia ponderal.
- En 2014, 41 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso o eran obesos.
- La obesidad puede prevenirse en la mayoría de los casos. ⁽⁴²⁾

10. Teoría del balance energético

El cuerpo humano tiende a acumular en forma de tejido adiposo toda la energía que se le facilita y que no utiliza en ese momento. Aunque existen excepciones en las cuales la obesidad está producida por problemas metabólicos o genéticos severos, en la gran mayoría de los casos esta situación es debida a un desequilibrio entre el aporte energético de la dieta y el gasto energético debido a las actividades físicas diarias. Tradicionalmente, en relación al aporte energético, se han considerado tres situaciones: a) que sea igual al gasto, en cuyo caso el peso corporal en principio se mantendrá estable; b) que sea mayor que el gasto, el peso corporal y el porcentaje de grasa aumentarán; c) que sea menor que el gasto, este es el caso que nos interesa, puesto que es así como podemos inducir una reducción en grasa y peso.

Las razones de que hoy en día exista un desequilibrio energético son de sobra conocidas, y entre ellas podemos destacar las siguientes:

- El cambio en los hábitos nutricionales, con dietas de mayor densidad energética, pobres en frutas y verduras, así como ciertos comportamientos erróneos contribuyen a la ganancia progresiva de masa grasa.
- La falta de práctica de ejercicio físico regulado, el aumento del tiempo dedicado a las actividades sedentarias, el número de horas que se está viendo la televisión o el empleo del transporte motorizado en los desplazamientos, son factores independientes de riesgo para sufrir obesidad y sobrepeso. Actualmente encontramos bastantes usuarios que han vivido una situación muy prolongada de sedentarismo, en muchas ocasiones décadas, lo que conlleva un cambio en el comportamiento fisiológico de su organismo. Esta situación ha provocado que diversos investigadores comiencen a hablar de una “fisiología del sedentarismo”.

El cuerpo humano está “diseñado genéticamente”, en la mayoría de los casos, para acumular energía debido a las épocas de hambruna existentes en el pasado. Hoy en día, este diseño hace que entre el 30 y el 80% de la variación en el peso corporal se relacione con factores genéticos, y que más de 430 regiones cromosómicas se relacionen con la regulación del peso corporal. Por tanto, son diversos los factores que determinan el depósito de grasa corporal del organismo y éstos condicionan también que no todas las personas respondan igual cuando se trata de perder grasa corporal. Sin embargo, la teoría general sobre la que descansan los principios fisiológicos para perder peso o grasa, se basa en el desequilibrio energético negativo que nos obligue al uso de grasa de reserva ^(39, 42).

11. Diabetes Mellitus

11.1 Definición

La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. Es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia causada por defectos en la secreción de insulina, acción de la insulina, o ambos. La hiperglucemia crónica de la diabetes está asociada con daño crónico y disfunción de órganos, principalmente los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. Graves procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de diabetes. Tal es el caso de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas con la consecuente deficiencia de insulina a anomalías que resultan en la resistencia a la acción de la insulina. Las bases de las anomalías residen en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas en la diabetes es la deficiente acción de la insulina en los tejidos diana. La acción deficiente de la insulina resulta de la inadecuada secreción y/o respuesta disminuida del tejido a la insulina a uno o más puntos en la compleja

vía de la acción de la hormona. La discapacidad de la secreción y defectos en la acción de la insulina frecuentemente coexisten en el mismo paciente, y regularmente no es clara de cual anomalía se trata, si bien, es la primera causa de la hiperglucemia.

Síntomas de una marcada hiperglucemia incluye poliuria, polidipsia, pérdida de peso, en ocasiones polifagia, y visión borrosa, además de la discapacidad de crecimiento y susceptibilidad a infecciones.

Las complicaciones a largo plazo de la diabetes incluyen la retinopatía con potencial pérdida de la visión; la nefropatía siguiendo a la falla renal; la neuropatía periférica con riesgo de úlceras en pie, amputaciones, articulaciones de Charcot, y neuropatía autónoma causando síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares, así como disfunción sexual. Los pacientes con diabetes tienen un incremento en incidencia de aterosclerosis cardiovascular, en arterias periféricas y enfermedad cerebrovascular. La hipertensión y anomalías del metabolismo de lipoproteínas son también asimiladas a la diabetes ⁽⁴³⁾.

11.2 Epidemiología de diabetes mellitus

- El número de personas con diabetes ha aumentado de 108 millones en 1980 a 422 millones en 2014.
- La prevalencia mundial de la diabetes* en adultos ha aumentado del 4,7% en 1980 al 8,5% en 2014.
- La prevalencia de la diabetes ha aumentado con mayor rapidez en los países de ingresos medianos y bajos.
- La diabetes es una importante causa de ceguera, insuficiencia renal, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y amputación de los miembros inferiores.
- Se estima que en 2012 la diabetes fue la causa directa de 1,5 millones de muertes, y que otros 2,2 millones de muertes eran atribuibles a la hiperglucemia.

- Aproximadamente la mitad de las muertes atribuibles a la hiperglucemia tienen lugar antes de los 70 años de edad. 1 Según proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030.
- La dieta saludable, la actividad física regular, el mantenimiento de un peso corporal normal y la evitación del consumo de tabaco previenen la diabetes de tipo 2 o retrasan su aparición. ⁽⁴⁴⁾

11.2 Clasificación

La diabetes se puede clasificar en las siguientes categorías generales:

1. Diabetes tipo 1. Debido a la destrucción de las células β , usualmente llevando a la absoluta deficiencia de insulina.
2. Diabetes tipo 2. Debido al progresivo defecto en la secreción de insulina previo a la resistencia a la insulina.
3. Diabetes mellitus gestacional (DMG). Diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre de embarazo, la cual no es claramente una diabetes evidente.
4. Tipos específicos de diabetes debidos a otras causas, por ejemplo: los síndromes de diabetes monogénica (como la diabetes neonatal y la diabetes de la edad madura presente en el joven (MODY, por sus siglas en inglés), enfermedades del páncreas exocrino (como la fibrosis quística), y la diabetes inducida por fármacos o químicos (como en el tratamiento de VIH/SIDA o después de la trasplatación de órganos) ⁽⁴⁵⁾.

12. Diabetes mellitus tipo 2

Este tipo de diabetes predomina en el 90-95% de pacientes con diabetes, referida como diabetes no insulino dependiente, engloba individuos que presentan resistencia a la insulina y usualmente tienen relativa, casi en absoluto, insulina deficiente. En el inicio, y regularmente durante el resto de su vida, estos pacientes no necesitan insulina como tratamiento para sobrevivir. Hay probablemente muchas causas diferentes de este tipo de diabetes. A pesar de que las etiologías específicas no son conocidas, la destrucción autoinmune de las células β no se produce.

La mayoría de los pacientes con este tipo de diabetes son obesos, y la obesidad por sí misma causa cierto grado de resistencia a la insulina. Pacientes que no son obesos por el criterio tradicional de peso pueden tener un incremento de porcentaje de grasa corporal distribuido predominantemente en la región abdominal. Cuando aparece la cetoacidosis en este tipo de diabetes, surge en asociación con otras enfermedades, como alguna infección. Este tipo de diabetes frecuentemente se encuentra sin ser diagnosticada por varios años porque la hiperglucemia se revela gradualmente y en estados tempranos frecuentemente no es lo suficientemente severa para el paciente y tampoco detectar ninguno de los síntomas clásicos de la diabetes.

Sin embargo, tales pacientes se encuentran en un riesgo mayor de desarrollar complicaciones tanto macro como microvasculares. Mientras que los pacientes con esta forma de diabetes pueden tener niveles de insulina que parezcan normales o elevados, los niveles de glucosa en sangre en estos pacientes se esperan resulten aún más altos, los niveles de insulina altos y la función de sus células β normal. Así, la secreción de insulina en estos pacientes es insuficiente para compensar la resistencia a la insulina. La resistencia

a la insulina puede mejorar con la reducción de peso y/o tratamiento farmacéutico de hiperglucemia, pero es raramente restaurado a la normalidad.

El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes incrementa con la edad, obesidad y la ausencia de actividad física. Ocurre con más frecuencia en mujeres con previa DMG (Diabetes Mellitus Gestacional) y en individuos con hipertensión y dislipidemia, y su frecuencia varía entre diferentes razas o subgrupos étnicos.

Está asociada con una fuerte predisposición genética, más que en la autoinmune forma del tipo 1 de diabetes. Sin embargo, la genética de esta forma de diabetes es compleja y no está completamente definida.

Entre 1997 y 2003, el Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus reconoció un grupo intermedio de individuos cuyos niveles de glucosa no cumplen los niveles de diabetes, sin embargo, son más altas que los considerados normales. Estas personas son definidos por tener alteración de la glucosa en ayuno (IFG, por sus siglas en inglés) [glucosa plasmática en ayuno (FPG) de 100 mg/dL (5.6 mmol/L) a 125 mg/dL (6.9 mmol/L)], o intolerancia a la glucosa (IGT) [valores en el examen oral de tolerancia a la glucosa de 2 horas (OGTT) de 140 mg/dL (7.8 mmol/L) a 199 mg/dL (11.0 mmol/L)].

Los individuos con IFG y/o IGT han sido referidos como prediabéticos, indicando alto riesgo para el futuro desarrollo de diabetes. IFG e IGT no deberían ser vistos como entidades clínicas por sí mismas sino como factores de riesgo para presentar diabetes, así como para enfermedad cardiovascular. Una intervención estructurada en el estilo de vida, dirigido a incrementar la actividad física y produciendo una pérdida de peso del 5-10%, y ciertos agentes farmacológicos han demostrado la prevención o retraso del desarrollo de diabetes en pacientes con IGT ⁽⁴⁶⁾.

13. Síndrome Metabólico

13.1 Definición y Epidemiología del Síndrome Metabólico

- Se define como la coexistencia simultanea de tres de los siguientes trastornos: obesidad, resistencia a la insulina, hipertensión arterial y dislipidemia.
- Según datos de OMS, el síndrome metabólico o enfermedad cardiovascular es la primera causa de mortalidad, la cual causa un impacto de 17 millones de muertes al año.
- La Enfermedad cardiovascular es responsable de cerca de 32 millones de eventos coronarios y de accidentes cerebro vasculares siendo un 40-70% fatales en países desarrollados.
- En un estudio realizado en poblaciones suecas, finlandesas, caucásicas y México-americanas encontrando que la prevalencia del síndrome metabólico ajustado por edad fue de 23.7%
- En Estados Unidos, en el estudio comprendido entre 1999-2002 existe una prevalencia de 34.5% en la población con síndrome, según con los criterios del ATP III (Guia Para El Tratamiento En Adultos III),
- Un año después se hace un seguimiento en el periodo comprendido del 2003-2006 estableciendo que un 34% lo presentan en edades que oscilan los 40-59 años y guardando relación con el IMC, raza, etnia y sexo. Por lo que se puede señalar, que las prevalencias en todos los estudios realizados se mantienen constantes. ⁽⁴⁷⁾

14. Comportamiento de la célula β pancreática en hiperglucemia

La célula β pancreática secreta insulina en función de la concentración extracelular de glucosa y de otros nutrientes circulantes, como son los ácidos grasos. Esta podría definirse como una adaptación fisiológica normal de la secreción de la hormona en función de la demanda, este patrón secretor se pierde en condiciones de hiperglucemia e hiperlipidemia crónicas típicas de la patología diabética. La evidencia experimental correlaciona la presencia en exceso de dichos nutrientes con el desarrollo de la enfermedad. Este fenómeno, denominado glucotoxicidad para la glucosa o lipotoxicidad para los ácidos grasos, contempla la propiedad por parte de dichos nutrientes de controlar diversos programas génicos que desembocarían en profundas alteraciones fenotípicas en la célula β . En primera instancia, la célula β tiene mecanismos de adaptación y detoxificación para esta situación desfavorable y mantener una correcta respuesta secretora. Sin embargo, cuando la situación de hiperglucemia e hiperlipidemia crónica se da sobre todo de forma conjunta, se activan programas de suicidio celular que culminan en la desaparición de estas células productoras de insulina y la aparición de la diabetes.

La célula β no sólo funciona como una bomba de insulina, sino que posee un sofisticado sistema sensor que adapta la cantidad de hormona secretada a la demanda glucídica de una forma dependiente de la dosis del azúcar.

Aunque la glucosa es el nutriente esencial desencadenante de dicha respuesta, otros nutrientes, como los ácidos grasos y ciertos aminoácidos también son capaces de regular respuestas secretoras dependientes de glucosa. La glucosa puede tener, en este sentido, una doble cara ejerciendo un efecto beneficioso o deletéreo sobre la célula β .

Todo depende del tiempo en el que la célula β está expuesta a las altas concentraciones del azúcar, así, si la célula está sometida a una hiperglucemia aguda (situación fisiológica) o crónica (situación patológica). Esta última situación es típica de la diabetes tipo 2 y de patologías relacionadas con la obesidad.

14.1 Glucotoxicidad

En los casos de hiperglucemia crónica la glucosa es capaz de modificar directa e indirectamente diversos programas génicos que desembocarían en la producción de profundos cambios fenotípicos. Así se ha observado en diversos modelos experimentales animales y de células cultivadas, que la alta concentración de glucosa modifica los niveles de expresión del gen codificador del transportador de glucosa GLUT2, activa la primera enzima de la vía glucolítica (glucoquinasa o GK), y causa una inducción coordinada de genes que codifican enzimas de la glucólisis, anaplerosis y lipogénesis. Todos estos efectos vienen acompañados con una activación temprana de genes implicados en la regulación del ciclo celular como *cmyc*, *c-fos*, *c-jun*, *zif-268* o *nur-77*. En estos casos se observa una desdiferenciación de la propia célula β , que comienza a expresar proteínas típicas de estadios primitivos en el desarrollo, como son la hexokinasa I o lactato deshidrogenasa-A, enzimas que raramente aparecen en la célula β madura. Todos estos cambios vienen acompañados de otros cambios metabólicos y funcionales, como es una curva de secreción de insulina alterada, deposición de glucógeno, flujo glucolítico aumentado, al igual que los procesos anapleróticos y lipogénicos, con una marcada producción de triacilgliceroles y lípidos complejos (Ilustración 8). En su conjunto, estas profundas alteraciones han dado pie a la hipótesis de la glucotoxicidad, postulando efectos nocivos a nivel de la célula β pancreática a altas concentraciones de glucosa.

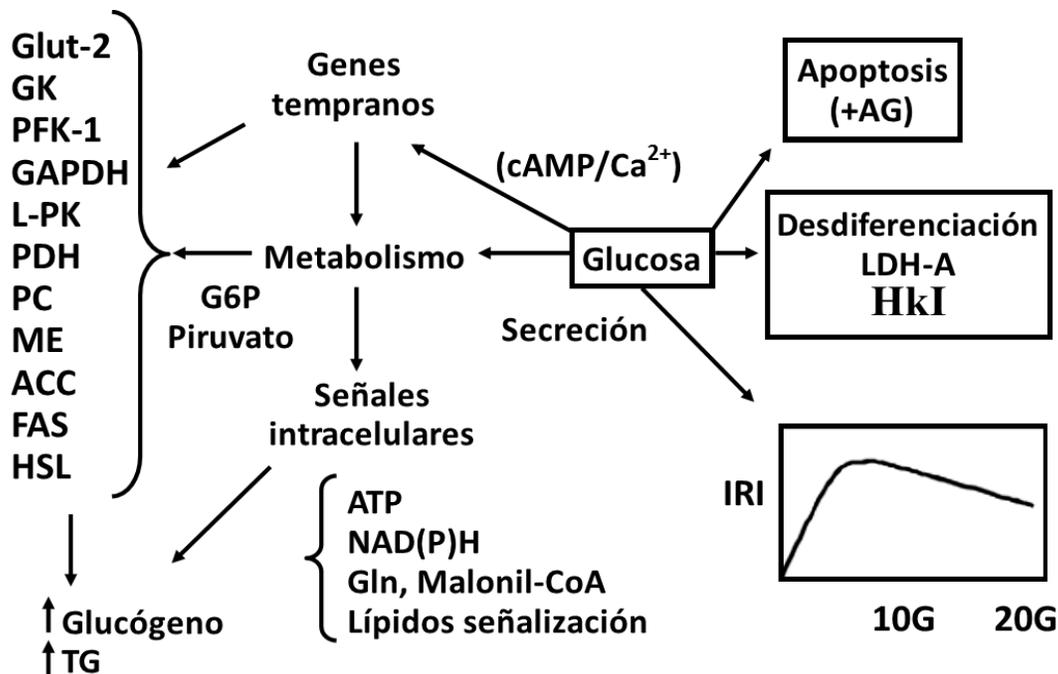


Ilustración 8. Esquema representativo de la glucotoxicidad en la célula β pancreática.

En una primera instancia podría observarse una respuesta adaptativa a través de la inducción de determinados genes tempranos o del propio metabolismo, participando el cAMP o el Ca²⁺. Tanto los genes tempranos, como algunos factores metabólicos (Glucosa-6-fosfato (G6P), piruvato, etc.) modularían la expresión y la actividad de diversos genes y enzimas, como: el transportador de glucosa Glut-2, glucocinasa (GL), fosfofructocinasa-1 (PFK-1), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), L-piruvato kinasa (L-PK), piruvato deshidrogenasa (PDH), piruvato carboxilasa (PC), enzima málico (ME), acetil-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintetasa (FAS), lipasa sensible a hormonas (HSL). Esta activación metabólica va a producir por un lado un incremento en los depósitos energéticos de la célula, como son glucógeno y triacilglicérols (TG), y, por otro lado, un aumento en intermediarios metabólicos como ATP, equivalentes reducidos (NADPH), glutamina (Gln), malonil-CoA y lípidos de señalización. El patrón de secreción detectado por radioinmunoensayo (IRI) presenta una alta secreción de insulina por debajo de 10 mM glucosa (10G) y una falta de inducción de la secreción entre 10 y 20 mM (20G), resultando en una pérdida de la sensibilidad a la glucosa. Si la hiperglucemia persiste, pueden aparecer procesos de desdiferenciación con la aparición de nuevas proteínas metabólicas: lactato deshidrogenasa-A (LDH-A) y hexocinasa-I (HK-I). También pueden darse procesos apoptóticos, incrementados si hay ácidos grasos (AG).

14.2 Mecanismo general de la glucolipotoxicidad

Aunque se han apuntado varias hipótesis para explicar el modo de acción de la gluco- y la lipotoxicidad, los acontecimientos moleculares que ocurren durante ambos procesos no han sido caracterizados todavía en su totalidad. En principio, parece ser que la glucemia elevada no sería muy tóxica para la célula β , ya que este tipo celular es capaz de adaptarse mediante cambios en los niveles de expresión de genes clave en el metabolismo intermediario. Esto permitiría una elevada oxidación del azúcar y el flujo de intermediarios a través del ciclo de Krebs mediante reacciones de anaplerosis y cataplerosis. El resultado sería la producción de factores de acoplamiento que favorecerían la detoxificación de la glucosa y el

desplazamiento de la curva de secreción hacia la izquierda, consiguiendo un aumento en la sensibilidad a la glucosa y modificando el umbral de secreción.

Por otro lado, elevadas concentraciones de ácidos grasos y en ausencia de hiperglucemia tampoco resultarían muy tóxicas, ya que la baja concentración extracelular de glucosa no permitiría un aumento en los niveles intracelulares de malonil-CoA, permitiendo la β -oxidación y resultando en una lipodetoxicación a través de CPT-I, ACO y UCP-2 posiblemente. Esta situación es la que se da en situación de ayuno prolongado, en la que la glucemia es baja, pero la concentración de lípidos circulantes es alta, lo que además es beneficioso para mantener un nivel basal de secreción de insulina. Por lo tanto, el mayor problema ocurrirá en una situación de pre-diabetes, en la que la resistencia a la insulina va acompañada de hiperglucemia y de elevadas concentraciones circulantes de ácidos grasos. Esta situación favorece los procesos de esterificación y aumento de los depósitos lipídicos en la célula β , una célula cuya misión no es almacenar grasa. En este proceso participa la ruta glucolítica proporcionando glicerol-3-fosfato que será utilizado para la síntesis de triacilgliceroles. En una primera instancia, se produciría una hiperinsulinemia causada por un aumento en la secreción de la hormona debido a un exceso de lípidos de señalización intracelular (diacilgliceroles, fosfolípidos, etc.) que podrían modular la actividad determinadas formas de la PKC. Sin embargo, esta etapa de compensación no puede ser mantenida debido a un exceso intracelular de intermediarios lipídicos (ácido fosfatídico y lisofosfatídico, esfingolípidos, ceramidas, ciclo- y lipo-oxigenasas, acil-CoAs y acil-carnitina), muchos de ellos ya reconocidos como tóxicos. Como resultado de todo ello se produciría una secreción de insulina defectuosa y la activación de los programas de apoptosis o suicidio intracelulares.

En estas condiciones, la única ruta disponible para los ácidos grasos sería la esterificación, acumulándose en el citosol. La célula β no es una célula especializada en almacenar lípidos, como en el caso de los adipocitos. Esta acumulación progresiva de lípidos desembocaría en una disfunción celular, que se reflejaría en un proceso defectuoso de síntesis y secreción de insulina. Además, estos lípidos provendrían de una parte de los elevados ácidos grasos circulantes y de otra de las altas concentraciones extracelulares de glucosa, situación ésta muy típica de los estados diabéticos. Una normalización progresiva de los niveles extracelulares de ácidos grasos podría tener un cierto efecto beneficioso, aunque en este sentido hay que apuntar a que la degradación de los triacilgliceroles acumulados es lenta. Si esta normalización no se lleva a cabo, el proceso puede degenerar en apoptosis o inducción del suicidio celular, ausencia por tanto de insulina y establecimiento de diabetes. Los estudios realizados en sistemas celulares apuntan a que la glucotoxicidad y la lipotoxicidad son una misma entidad en la diabetes tipo 2, siendo una de las causas principales de la disfunción a nivel de las células β . Estos estudios sientan las bases moleculares para verificar esta hipótesis en modelos de diabetes en animales e intentar trasladar estos conocimientos a los seres humanos. Esta hipótesis podría explicar además cómo una dieta inadecuada podría afectar a un tipo celular determinado, como es la célula β y contribuir al desarrollo de esta enfermedad.

Es necesaria más investigación para comprender los mecanismos que desembocan en esta enfermedad y poder diseñar estrategias terapéuticas más precisas y avanzadas en el tratamiento de la diabetes. En este sentido, los PPARs, tal y como se ha visto para el PPAR α , y posiblemente el PPAR γ , se han mostrado recientemente como dianas interesantes en desarrollo de nuevos fármacos para tratamiento de esta patología ⁽⁴⁸⁾.

15. Apoptosis

La apoptosis es una forma de muerte celular, caracterizada por distintos cambios morfológicos, que incluyen condensación de la cromatina y fragmentación nuclear (pyknosis), pliegues en la membrana plasmática, desensamble del citoesqueleto y contracción celular. Eventualmente la célula se rompe en pequeños fragmentos rodeados de membrana (conocidos como cuerpos apoptóticos), los cuales son eliminados por fagocitosis sin iniciar una respuesta inflamatoria. La liberación de los cuerpos apoptóticos inspiró el término de “apoptosis”, palabra griega que significa “caerse o desprenderse”, que evoca la caída de las hojas de los árboles en otoño.

Bajo condiciones patológicas la muerte celular puede ser modulada. En ocasiones carece de la constelación de cambios morfológicos asociados con la apoptosis fisiológica, o retiene solamente porciones del programa, así que estrictamente no califica para ser llamada apoptosis, ejemplo de ello son los cambios generados durante la isquemia. Las evidencias indican que la apoptosis insuficiente se puede manifestar como cáncer o autoinmunidad, mientras que la muerte acelerada se aprecia en enfermedades degenerativas agudas y crónicas, inmunodeficiencias e infertilidad.

La apoptosis también es un mecanismo de defensa importante contra patógenos. Así, el suicidio celular puede constituir un mecanismo para privar a los virus del hospedador celular para su replicación, limitando así su dispersión. También algunas de las familias de las proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis participan en la respuesta inflamatoria hacia patógenos microbianos, por ejemplo, las caspasas que son una proteasas efectoras críticas del programa de apoptosis, pueden degradar y activar citosinas proinflamatorias, tales como pro-interleucina-1 β (pro-IL-1 β) y pro-IL-18; de manera similar, proteínas involucradas en la activación de caspasas participan en la

activación del factor nuclear (NF)- κ B, el cual regula la expresión de numerosos genes importantes para la respuesta inflamatoria e inmunidad innata y adquirida.

15.1 Mecanismos de activación de la muerte celular programada

La muerte celular puede activarse a través de la vía intrínseca o de la vía extrínseca, dependiendo del origen del estímulo de muerte. La vía extrínseca es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes o daño del ADN.

Esta vía es mediada en la mitocondria, y en respuesta a estímulos apoptóticos diversas proteínas son liberadas del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma. Algunas de las proteínas bien caracterizadas incluyen: el citocromo c, SMAC/DIABLO, AIF (factor inductor de apoptosis), EndoG (endonucleasa G) y Omi/HTRA2 (proteína A2 requerida para las altas temperaturas).

Quizá la más importante de estas proteínas proapoptóticas sea el citocromo c, el cual se une y activa a la proteína factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) en el citoplasma, lo que promueve que esta última se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma, que media la activación autocatalítica de caspasa 9, y esta a su vez activa a la principal caspasa efectora, caspasa 3.

La vía extrínseca es mediada por la activación de receptores, como la unión de un ligando de muerte (FasL) a su receptor específico (Fas) en la superficie celular. Los ligandos de muerte son constitutivamente homotriméricos; la unión a sus receptores conduce a la formación de un complejo homotrimérico mínimo ligando-receptor, que seguidamente recluta factores citosólicos, tales como FADD y caspasa 8, formando el complejo DISC. La formación de DISC conduce a la activación de caspasas iniciadoras tales como caspasa 8, la cual posteriormente rompe y activa la caspasa efectora, caspasa 3. La función de DISC

en la activación de caspasa 8 se piensa es análoga a la activación de caspasa 9 por el apoptosoma, aunque se desconocen los detalles del mecanismo molecular. Ambas vías pueden entrecruzarse a través de la degradación de Bid mediada por caspasa 8, el cual conduce entonces a la activación de la vía mitocondrial.

La apoptosis inducida por Fas puede seguir dos vías. En las células tipo I, como los timocitos in vitro, la apoptosis inducida por Fas es refractaria a Bcl-2, debido a una degradación suficiente de caspasa 8 y activación de caspasa 3 y 7. En las células tipo II, como hepatocitos, Bcl-2 bloquea la muerte celular mediada por Fas y es requerida una amplificación mitocondrial en donde la caspasa 8 media la degradación de Bid (miembro de la familia Bcl-2) resultando en su traslado hacia la mitocondria y la liberación de citocromo c, para generar suficiente actividad caspasa efectora y provocar la muerte de tales células. Otro grupo de receptores de muerte se ha caracterizado y muestran diferentes ligandos de muerte conocidos como Apo2L, y los TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF). Las células cancerígenas, pueden mostrar una sensibilidad relativa hacia la apoptosis mediada por TRAIL.

15.2 Familia de proteínas Bcl-2

La familia de proteínas Bcl-2 son reguladores críticos de la apoptosis, dentro de sus funciones se incluyen los pasos de muerte celular dependientes de la mitocondria. Las proteínas de la familia Bcl-2 derivan su nombre del linfoma de células B2. Los miembros de esta familia usualmente son divididos en grupos diferentes basados en la presencia o ausencia de las secuencias o dominios de homología Bcl-2. En la tabla 2 se resumen los miembros de la familia de proteínas Bcl-2.

Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bak y otros miembros diversos de la familia Bcl-2 tienen un tramo de aminoácidos hidrofóbicos cerca de su C-terminal que las ancla en membranas internas

celulares, predominantemente en la membrana externa de la mitocondria y en el retículo endoplásmico. Por el contrario, otros miembros de la familia de proteínas Bcl-2 tales como Bid, Bim y Bad carecen de estos dominios de anclaje a la membrana, pero son trasladadas a la mitocondria en respuesta a estímulos específicos.

Estas proteínas de la familia Bcl-2 se piensa que regulan directamente la permeabilidad de la membrana mitocondrial, permitiendo o inhibiendo el eflujo de proteínas apoptogénicas de estos organelos. Estas proteínas apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bfl-W y posiblemente Bcl-B) y proteínas apoptóticas (Bax, Bak, Bok y Bid).

GRUPO	DOMINIOS	MIEMBROS
(I)	Familia con multi-dominios, los cuales contienen BHI, BH2, BH3 y BH4	Bcl-2, BclX, Mcl-1, Bcl-W, Bfl-1, Bcl-B, Diva; Bax, Bak, Bok y Bcl-Rambo
(II)	Proteínas con dominios BH2 y BH3	Bcl-G _L y Bfk
(III)	Proteínas que contienen el dominio BH3- <i>only</i>	Bad, Bid, Bim, Spike, Bmf, Bik, Noxa, Puma, Hrk y Spike.
(IV)	Proteínas con dominios tipo BH3	Nip3; Nix; Map1 y p193
(VI)	Proteína que contiene un dominio BH2 putativo	Bcl2L12

Tabla 2. Clasificación de los miembros de la familia Bcl

Bax y Bak cuando se activan, oligomerizan en la membrana mitocondrial, dando como resultado la liberación de citocromo c y otras proteínas de estos organelos, que contribuyen a la activación de caspasas y otros mecanismos de muerte celular. Por el contrario, las proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-XL, bloquean la oligomerización de Bax y Bak, preservando la viabilidad celular.

Las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 no se insertan solamente en la membrana mitocondrial, también lo hacen en la membrana del retículo endoplásmico (RE). La

sobreexpresión de Bcl-2 parece causar una perturbación del Ca^{2+} liberado del retículo en respuesta a algún tipo de estímulo de muerte celular y drogas.

El dominio BH3 media la dimerización entre las proteínas de la familia Bcl-2 y se inserta sobre una grieta hidrofóbica de la superficie de proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-XL. En mamíferos, los miembros de la familia que presentan BH3-only son uniformemente proapoptóticos. La actividad inductora de muerte celular de la mayoría de las proteínas con dominio BH3 depende de su habilidad para dimerizar con miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 y así funcionan como inhibidores transdominantes de proteínas inhibidoras tales como Bcl-2 y Bcl-XL.

Alternativamente, ciertas proteínas BH3-only, en particular Bid y Bim, pueden unirse a proteínas multidominio proapoptóticas (tales como Bax y Bak) y funcionar como agonista de la apoptosis. La unión de Bid a Bax o Bak promueve su inserción en la membrana y su oligomerización, resultando en un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y liberación de proteínas apoptogénicas en el citosol.

Las isoformas de Bim que contienen BH3-only se asocian con los microtúbulos a través de la unión directa a la cadena ligera de dineina (CLC). La interrupción de estas interacciones proteínicas libera las isoformas de Bim asociadas con los microtúbulos, permitiendo su dimerización a través de sus dominios BH3 con proteínas de la familia Bcl-2 antiapoptóticas en la superficie de la mitocondria. Las proteínas Bad con un BH3-only se traslada entre el citosol y la mitocondria, dependiendo de si esta fosforilada. Diferentes proteínas quinasas, incluyendo Akt (también llamada quinasa dependiente de AMP cíclico), Raf1, Rsk1 y Pak1 (quinasa I activada por p21), se han reportado como fosforiladoras de Bad, inactivando así a las proteínas, de modo que no puedan dimerizarse con Bcl-2 y Bcl-XL. La expresión de algunas proteínas de la familia Bcl-2 proapoptóticas es controlada a nivel del empalme

(splicing) del ARN mensajero. Señales específicas cambian el patrón de las proteínas con actividad proapoptótica. Las perturbaciones en la expresión y las modificaciones postransduccionales de las proteínas de la familia Bcl-2 han sido asociadas con muchas patologías.

15.3 Caspasas

Estas proteasas están presentes como zimógenos inactivos en todas las células animales. Pero pueden ser disparadas para asumir un estado activo, lo cual generalmente involucra su procesamiento proteolítico, en un residuo conservado de ácido aspártico (Asp). Después de la activación, los miembros de esta familia de cisteína proteasas intracelulares, degradan sus sustratos en residuos de ácido aspártico, lo que le da su pseudónimo de “caspasas” (cisteinil-aspartato proteasas). Basados en la observación que (i) las caspasas rompen sus sustratos en el residuo Asp y que (ii) las caspasas son activadas por el procesamiento proteolítico en el residuo Asp, es claro que las proteasas colaboran en una cascada proteolítica que conlleva a su activación.

Hasta ahora se ha determinado que el genoma humano codifica para 12 caspasas. Las caspasas pueden ser agrupadas de acuerdo a su especificidad o a su similitud en la secuencia de aminoácidos; sin embargo, desde un punto de vista funcional las caspasas pueden ser vistas como caspasas “iniciadoras” que degradan proformas inactivas de las caspasas efectoras, activándolas a su vez, o bien como caspasas “efectoras” que degradan otros sustratos proteicos dentro de las células para disparar los procesos apoptóticos. La activación de las caspasas no resulta en una degradación masiva de las proteínas celulares, más bien ellas rompen selectivamente un grupo estricto de proteínas diana, usualmente en una o pocas posiciones de la secuencia primaria (siempre después de un residuo aspartato).

La degradación proteolítica por las caspasas puede conducir a diferentes resultados dependiendo de la naturaleza del sustrato y la posición exacta del sitio de ruptura en la secuencia primaria. La forma más sencilla y probablemente la más frecuente, resulta en la pérdida o ganancia de actividad biológica. Los principales sustratos de las caspasas efectoras incluyen: proteínas quinasas (en las cuales las caspasas separan el dominio regulador autorepresivo, del dominio catalítico) y otras proteínas transductoras de señales, tales como proteínas de la matriz nuclear y del citoesqueleto, enzimas modificadoras de la cromatina (por ejemplo, la polimerasa poli ADP ribosa, PARr), proteínas reparadoras del ADN y subunidades inhibitoras de ciertas endonucleasas, que son en parte responsables de la digestión del genoma. Estos eventos de degradación proteolítica son irreversibles y conducen a la muerte de la célula.

Las caspasas son requeridas para inducir la apoptosis, así como para el procesamiento proteolítico de ciertas citocinas proinflamatorias. El pliegue de esta cisteína proteasa que constituye el dominio caspasa, esta típicamente compuesto de subunidades catalíticas largas y pequeñas de aproximadamente 20 y 10 kDa cada una.

Las subunidades son generadas luego de una degradación catalítica de la proproteína precursora, y su ensamble posterior en un heterotetrámero, con dos sitios activos formados por la unión de las subunidades largas y pequeñas. Dos caspasas cuyo dominio precursor (pre-dominio) contiene un par de DEDs (dominios efectores de muerte) en tándem se encuentran en humanos: caspasa 8 y 10. Ambas son activadas típicamente en el contexto de la traducción de señales desencadenadas por la familia de citocinas TNF.

Cinco caspasas humanas contienen pre-dominios N-terminal con un CARD (dominio de reclutamiento de caspasa). Dos de estas, caspasas 2 y 9, están implicadas en la regulación de la apoptosis. La caspasa 2 esta putativamente involucrada en el estrés en el aparato de Golgi y la activación de caspasas 2 y 9 poseen funciones en la vinculación de la mitocondria con la red de proteasas caspasas. Sin embargo, tres de estas caspasas que tienen dominios CARD son mejor conocidas por sus roles en la degradación y activación de citocinas proinflamatorias (pro-IL-1 y pro-IL-18), que por su papel en la apoptosis. En humanos pertenecen a este grupo las caspasas 1, 4 y 5 ⁽⁴⁹⁾.

15.3.1 Activación de las caspasas iniciadoras

El entendimiento de como las caspasas iniciadoras son activadas está lejos de ser completado. Las caspasas iniciadoras no existen constitutivamente como homodímeros del zimógeno o la enzima activada. La caspasa 9 antes y después del procesamiento proteolítico, está presente predominantemente como un monómero. Por otro lado, se ha reportado que la caspasa 8 se encuentra en un equilibrio entre monómeros y dímeros. Estas diferencias físicas determinan su variación funcional. La activación de dos de la principales caspasas iniciadoras, tales como caspasa 8 y 9, es llevada a cabo a través de la formación de complejos multiproteicos denominado DISC para caspasa 8, y apoptosoma para la caspasa 9.

15.3.2 Complejo de señales inductoras de muerte (DISC)

La vía extrínseca de muerte celular esta mediada por los receptores transmembranales tipo I de la superfamilia de receptores del TNF. El subgrupo de receptores TNF que contienen dominios de muerte entre la región intracelular, han sido llamados “receptores de muerte” (DRs). Los DRs acoplan ligandos triméricos, los cuales organizan los receptores en trímeros y estimulan el ensamble de un complejo intracelular conteniendo la proteína DD asociada a

FAS, FADD y la procaspasa 8 iniciadora. El ensamblaje del receptor activado, FADD, y la procaspasa 8 es comúnmente conocido como DISC. FADD es el núcleo de este ensamblaje y es responsable de detectar los estímulos de muerte hacia el receptor y reclutar la procaspasa 8 en el DISC naciente. El C-terminal de DED y DD adopta una estructura de seis α -hélices, que caracteriza a la familia de “motivos de muerte”. El DD de FADD es responsable de su unión al receptor, mientras que DED contiene el sitio responsable de la unión de procaspasa 8 y/o 10.

15.3.3 Ensamblaje y estructura del apoptosoma

La palabra apoptosoma fue inicialmente usada para describir la maquinaria celular que es responsable de la activación de procaspasa 9, una caspasa iniciadora de la vía intrínseca de la apoptosis. El apoptosoma comprende siete moléculas de Apaf-1 y la proteasa caspasa 9. Las Apaf-1 se encuentran arregladas simétricamente en una estructura parecida a una rueda. El ensamblaje del apoptosoma requiere citocromo c y nucleótido. La procaspasa 9 es reclutada y activada por el apoptosoma, la cual permanece asociada con el apoptosoma y exhibe una actividad catalítica que es tres órdenes de magnitud más alta que la actividad de la caspasa 9 aislada, sugiriendo el concepto de holoenzima. Apaf-1 contiene un CARD en la región N-terminal, la cual es responsable del reclutamiento de la procaspasa 9, un dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD) y 13 WD40 repetidas, las cuales se piensa que interactúan con citocromo c. La estructura de Apaf-1 conforma así una típica ATPasa de la familia AAA+, la cual pudiera no poseer una homología de secuencia significativa, pero exhibe el mismo plegamiento y contiene las mismas secuencias consenso.

15.4 Función de la mitocondria

La mitocondria juega un papel importante en la muerte celular; además de proporcionar la energía de las células, contiene un arsenal de proteínas con funciones muy relevantes, desde la fosforilación de la ADP hasta la regulación del metabolismo celular. La mitocondria secuestra un coctel potencial de proteínas proapoptóticas, entre las que destaca el citocromo c, el más humilde conductor de electrones. Diferentes estudios en el pasado han demostrado que el citocromo c está lejos de ser inocuo; además de la fosforilación oxidativa mitocondrial, la proteína es un componente requerido para la activación de caspasa 8 vía el apoptosoma, tal y como se expuso previamente.

El citocromo c es solamente uno de los habitantes promueve de la mitocondria, también están presentes en la mitocondria y se libera luego de la inducción de la apoptosis: AIF (una flavoproteína muy potente, pero con una actividad apoptótica misteriosa y relativa), SMAC/DIABLO y diferentes procaspasas, incluyendo procaspasa 2, 3 y 9. Mientras las proteínas descritas forman o promueven la elaboración del apoptosoma, la mitocondria luego de la inducción de la apoptosis libera algunas proteínas que actúan directamente en el núcleo para inducir la degradación del ADN y el corte del ADN nucleosomal. Estas proteínas incluyen el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G. La liberación de AIF del espacio intermembranal mitocondrial es iniciado por la degradación de la región N-terminal de AIF, que contiene la secuencia de localización en la mitocondria. El traslado de AIF al núcleo parece ser mediada por la región C-terminal de la proteína, que contiene dos elementos de localización nuclear putativos. AIF induce la fragmentación del ADN de alto peso molecular y la condensación de la cromatina. Sin embargo, el AIF citosólico también desencadena la despolarización de la membrana mitocondrial o cambios en la membrana celular, como por ejemplo el traslado de fosfatidilserina.

16. Debilitamiento de las estructuras claves

Una de las consecuencias de la activación del proceso de muerte celular consiste en la fragmentación y debilitamiento de las principales estructuras celulares, las cuales se presentan a continuación:

16.1 Componentes del citoesqueleto

- Envoltura nuclear y fragmentación nuclear
- Separación de la matriz extracelular

16.2 Apagado de los sistemas que soportan la vida

- Condensación y degradación del ADN
- Fragmentación del Golgi y del RE
- Fragmentación mitocondrial

16.3 Limpieza del detritus celular: eliminación de la célula apoptótica

El evento terminal de la fase de demolición, es decir, el consumo de la célula muerta por los fagocitos, es quizá el aspecto más importante de todo el proceso. Esto permite la eliminación de las células con su membrana plasmática intacta y evita el daño potencial de la liberación de los constituyentes celulares sobre el medio que los rodea. La generación de sitios de unión para los fagocitos y la liberación de moléculas quimioatrayentes representa el acto final de la célula agonizante. Se han propuesto diversas moléculas que actúan como receptores que específicamente detectan señales de engullimiento de las células apoptóticas por macrófagos, células dendríticas y otras células con capacidad fagocítica. En células sanas, la fosfatidil serina (PS) se encuentra confinada en el interior de la célula plasmática; sin embargo, es traslocada a la parte externa como consecuencia de un estímulo proapoptótico, donde induce fagocitosis ⁽⁵⁰⁾.

17. Proteína p53

En el año 1979, se describió la existencia de una proteína de un peso comprendido entre 53 y 55 kDa, que se dio a conocer como p53, resultado de dos aproximaciones distintas, una virológica y otra serológica. La aproximación virológica ponía de manifiesto la presencia de una proteína de 55 kDa que coprecipitaba justo al antígeno T del virus SV40 en células transformadas con dicho virus y que se sobreexpresaba no sólo en una gran variedad de células murinas transformadas con el SV40, sino también en células de carcinoma embrionarias, con la característica de que su mapa peptídico parcial era idéntico en las distintas líneas celulares. Se postuló, entonces que la infección o transformación de las células con el virus SV40 estimulaba la síntesis o estabilizaba una proteína celular. Por otro lado, la aproximación serológica se realizó mediante estudios sobre la respuesta humoral de ratones frente a líneas celulares transformadas (MethA y SVMK). Los animales que se exponían a diferentes tipos de tumores desarrollaban una respuesta inmune específica para p53. Estudios posteriores revelaron la presencia de anticuerpos contra esta proteína en el 9% de sueros de pacientes con cáncer de mama y en el suero de niños que padecían una gran variedad de cánceres.

El gen p53 es considerado por muchos autores como “el guardián del genoma”. A partir de este gen se sintetiza una proteína, que lleva el mismo nombre y se activa cuando la célula se dispone a dividirse para vigilar la secuencia normal de acontecimientos genéticos que permiten la proliferación celular. Si el material genético de la célula resulta dañado o si algún sistema de control se desajusta, esta lo detecta e intenta restaurarlo. Si la lesión no es grave, p53 detiene la división celular y activa los genes reparadores del ADN. Si p53 estima que el daño es irreparable entonces ordena que se pongan en marcha los mecanismos genéticos para que la célula entre en apoptosis o muerte celular programada. Si este gen sufre alguna

mutación, no permite que la célula sea eliminada mediante muerte programada, tampoco se ocupa de reparar los daños al ADN y da lugar al inicio del proceso tumoral. Este gen es el más frecuentemente mutado en los cánceres humanos, más del 50% de los tumores tienen genes p53 anormales, produciendo una proteína alterada. Pero la pérdida de la función de esta proteína no solo puede deberse a una mutación en el gen que la origina, sino existen otros mecanismos que pueden provocar que la célula carezca de un control tan importante como éste. Un ejemplo es la infección por ciertos virus como el papilomavirus humano, el cual presenta una proteína temprana denominada E6, la cual se une a la proteína p53 y potencia su degradación mediada por ubiquitina ⁽⁵¹⁾.

17.1 El gen de p53

El locus del gen p53 está en el brazo corto del cromosoma 17 (17p1.3) y de sus 11 exones, la secuencia del exón 1 no es codificante, mientras que el exón 2 presenta dos sitios putativos de inicio de transcripción, y el exón 11 contiene el codón de terminación y una secuencia no codificante. La traducción del ARNm de este gen da lugar a una proteína de 393 aminoácidos (aa) con tres dominios funcionales: el aminoterminal, el central y el carboxilterminal. El dominio aminoterminal (aa 1-70) se implica en la activación de la transcripción de los genes diana, donde se localiza una subregión (aa 20-97) rica en prolinas. El dominio central (aa 100-300) contiene la región de unión a secuencia específica de ADN, y es la región más conservada de la proteína; este dominio presenta una estructura de dos hojas β , estabilizando la estructura un átomo de zinc.

El dominio carboxilterminal (aa 300-325) está constituido por una región flexible con una zona de tetramerización (aa 325-356) y un extremo básico (aa 363-393). En latencia, la región carboxilterminal de p53 se pliega en el dominio central de la proteína y evita su unión al ADN ⁽⁵²⁾.

17.2 Regulación de p53

La regulación de la función de p53 tradicionalmente ha sido descrita al nivel de transcripción, traducción y alteraciones estructurales. Sin embargo, hay un convenio general de que el mecanismo por el cual p53 es regulado es a través del control por estabilidad de la proteína, un mecanismo primario mediado por Mdm-2. Curiosamente, Mdm-2 es por sí mismo un blanco transcripcional de p53, por lo tanto, se genera un bucle de retroalimentación negativa autorreguladora en el cual p53 activa la expresión de su propio inhibidor. A la fecha, ha sido demostrado que la proteína Mdm-2 puede inhibir la expresión de p53 por regular su estabilidad, su localización celular, y su transactivación. La función de Mdm-2 es como una ligasa E3 con p53 como blanco. La actividad de Mdm-2 como ubiquitina ligasa incluso contribuye a la eficiente exportación nuclear de p53. Finalmente, la unión de Mdm-2 a la transactivación del dominio N-terminal de p53 puede incluso excluir la interacción de p53 con activadores transcripcionales, específicamente con p300, así inhabilitando la habilidad de p53 para activar la transcripción de genes blanco ⁽⁵³⁾.

17.3 Funciones de p53

La función oncogénica debido a su capacidad de unión al antígeno T del virus SV40 en células transformadas. No fue hasta el año 1989, cuando el grupo de Levine et al le otorgó su verdadera función fisiológica: proteína supresora de tumores. Este hito constituye el punto de inflexión en la corta vida de esta proteína, como lo indica la evolución del número de trabajos publicados y le confiere una relevancia sin igual tanto en el campo de la Oncología como en el de la apoptosis. Hasta 1991 la proteína p53 era motivo de estudio sólo dentro del campo de la Oncología; sin embargo, es a partir de esta fecha cuando se relaciona a p53 dentro de los procesos de apoptosis y en forma exponencial aparecen publicaciones en el campo (Ilustración 10).

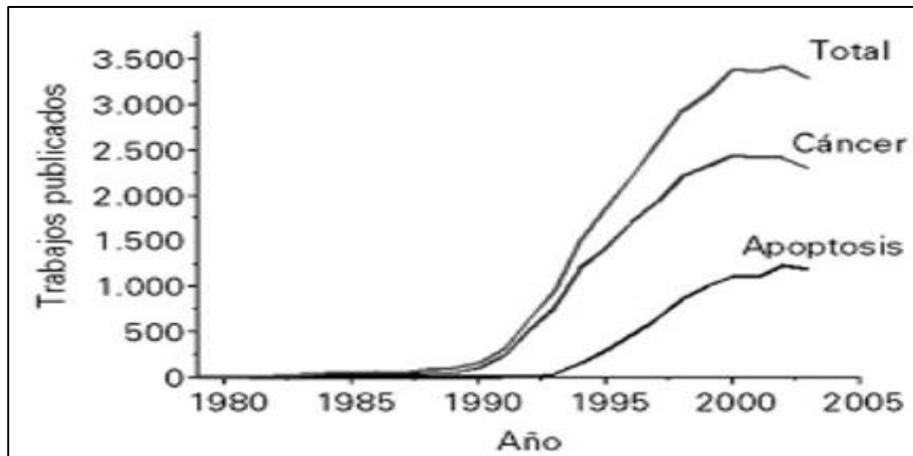


Ilustración 10. Número de publicaciones sobre p53 durante sus primeros 25 años de investigación.

Hoy sabemos que p53 desempeña una función fundamental en los mecanismos de respuesta celular frente al daño o mutación en el genoma, por ello, deleciones o mutaciones en el gen p53 se correlacionan con el desarrollo de algunos tipos de cáncer, y aumentos en su forma nativa se han descrito en patologías donde los procesos apoptóticos se encuentran elevados. A lo largo de esta revisión nos vamos a centrar en el papel de la proteína p53 en los procesos neurodegenerativos, si bien realizaremos una breve introducción de los diferentes miembros que constituyen la familia de p53, y profundizaremos en los mecanismos de regulación de los niveles y actividad de la proteína p53 ^(50, 53).

18. Mecanismos de apoptosis dependientes de p53

Una de las respuestas más dramáticas de la activación de p53 es la inducción de apoptosis. En hepatocitos, así como en otros tipos de células, la apoptosis ocurre ya sea a través de una o las dos vías descritas como mitocondrial intrínseca o la vía extrínseca del receptor de muerte. En la vía mitocondrial, los estímulos de muerte objetivizan la mitocondria ya sea directamente o a través de transducción por miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax y Bak. La mitocondria entonces libera proteínas apoptóticas, últimamente llevando a la activación de caspasas y apoptosis. En la vía del receptor de muerte, y

siguientes interacciones con su ligando cognado, el receptor localizado en la membrana celular recluta proteínas adaptadoras como la iniciadora caspasa 8, desencadenando la activación de caspasas para orquestar la apoptosis. El cruce entre ambas vías es mediado por Bid, y probablemente otros factores que median la muerte celular por modulación de ambos, y tal vez otras vías no reconocidas. Las células comprometidas para morir vía apoptosis p53 dependiente típicamente sigue la vía mitocondrial, a pesar de que p53 puede incluso modular la muerte celular a través de receptores de muerte. Además, la mayoría de evidencia sugiere que la clave de la contribución de p53 en la apoptosis principalmente depende en su actividad transcripcional. p53 tiene la habilidad para activar la transcripción de varios genes proapoptóticos, incluidos aquellos que codifican miembros de la familia de Bcl-2, tales como el BH-3 solo las proteínas Bax, Noxa, y Puma (mediadores de apoptosis regulados por p53). La importancia de Puma y Noxa a la apoptosis mediada por p53 se vuelve obvia cuando se reportó que algunos tipos de células de ratones puma knockout mostraron casi completa discapacidad a la apoptosis vía p53.

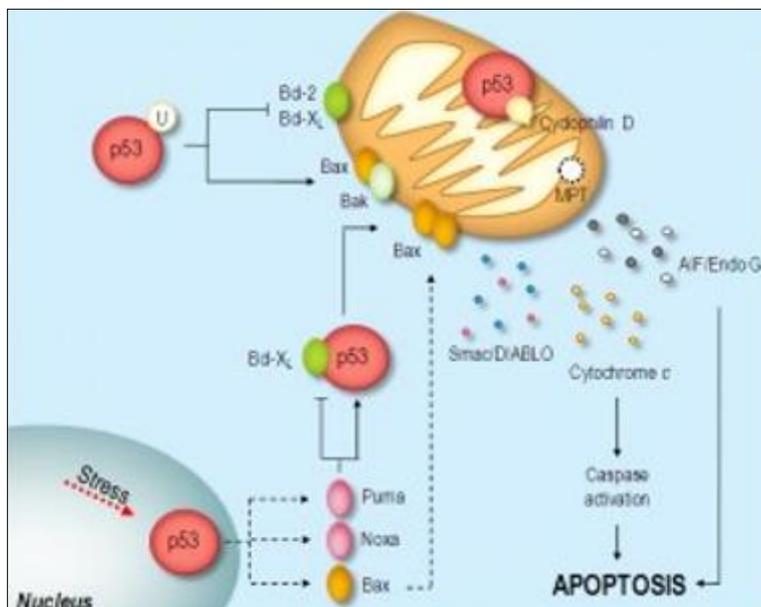


Ilustración 11. Vías citosólica y mitocondrial de apoptosis mediadas por p53. En la vía citosólica, el p53 nuclear induce expresión de Puma, la que en actividad liberada p53 citosólico retenido inactivo en el citoplasma mediante su unión a Bcl-XL. Entonces, el p53 citosólico induce oligomerización y translocación mitocondrial de Bax. La acumulación de p53 en el citosol como una consecuencia del transporte normal o su monoubiquitinación estable es la mayor fuente para p53 mitocondrial. En la mitocondria, p53 induce la oligomerización de Bax y Bak, antagoniza el efecto antiapoptótico de Bcl-2 y Bcl-XL, y forma un complejo con la ciclofilina D en la membrana mitocondrial interior. Estos cambios resultan en una marcada ruptura de las membranas mitocondriales y la subsecuente liberación de factores apoptogénicos solubles e insolubles. MPT (transición mitocondrial permeable); U (ubiquitina)

En otras células, la apoptosis solo fue parcialmente afectada, y Noxa pareció contribuir con este efecto. Alternativamente, p53 puede incluso desencadenar apoptosis por represión de los genes antiapoptóticos, como el survivin (inhibidor de apoptosis), además de promover la activación de caspasas.

Actuando en la vía de apoptosis por receptor de muerte, y en adición a la estimulación de transcripción de fas en bazo, timo, riñón y pulmón, la sobreexpresión de p53 mejora los niveles de Fas en la superficie celular por promoción de su tráfico desde el complejo Golgi. En adición, p53 activa DR5; el dominio contenedor de muerte, receptor para TRAIL; DR5 es inducido en respuesta al daño del ADN, y, en turno, promueve la muerte celular a través de caspasa 8. Los genes para proteínas proapoptóticas que deberían vincularse a las vías de apoptosis como bid y las proteínas inducidas por p53 con dominio de muerte (PIDD), son incluso descritas como blancos de p53. Importantemente, p53 está incluso involucrado en la activación del apoptosoma vía inducción de expresión de Apaf-1 ⁽⁵³⁾.

Planteamiento del Problema

El consumo excesivo de azúcar, en especial de fructosa, presente en muchos de los alimentos y bebidas procesadas como los refrescos, está estrechamente relacionado con la epidemia mundial de obesidad, síndrome metabólico y diabetes, además de dañar directamente al hígado. A nivel mundial, el consumo de azúcar se ha triplicado en los últimos 50 años, lo que representa una amenaza para la salud ⁽⁵⁶⁾. Entre las alteraciones causadas por el incremento en el consumo de azúcares (fructosa, glucosa), se encuentra la hiperinsulinemia e hiperglucemia. La hiperglucemia crónica, constituye el factor de mayor riesgo para la supervivencia de las células β pancreáticas y para el desarrollo de las complicaciones tardías relacionadas con esta enfermedad. Una de las consecuencias metabólicas de la hiperglucemia, es el incremento de especies reactivas de oxígeno y de estrés oxidativo. El estrés oxidativo induce la activación de cascadas de fosforilación ⁽³²⁾, que además de regular el daño ⁽⁵⁵⁾, determinan el destino celular (proliferación, diferenciación, adaptación al estrés y apoptosis) ⁽⁵⁶⁾.

El estrés oxidativo afecta sobremanera la fisiología de las células β e induce apoptosis ⁽²²⁾. En nuestro laboratorio demostramos la localización y fosforilación mitocondrial de la proteína p53 y su relación con el incremento de apoptosis y ERO, alteraciones en la permeabilidad mitocondrial y liberación de citocromo c en células RINm5F (línea celular de origen pancreático), cultivadas en presencia de concentraciones elevadas de glucosa ^(16, 33). Es importante estudiar la participación de la proteína p53 en la apoptosis de células β pancreáticas *in vivo*, que nos permitan incursionar sobre los mecanismos que desencadenan la muerte de estas células, cuando se exponen a concentraciones elevadas de glucosa en forma crónica.

La hiperglucemia condiciona un estímulo constante sobre las células β pancreáticas, para incrementar la secreción de insulina y mantener los niveles de glucosa normales, sin embargo, esta situación puede conducir al agotamiento y muerte de las células β pancreáticas, por lo que nos hemos planteado las siguientes preguntas: ¿La proteína p53 se moviliza a la mitocondria de células β pancreáticas de ratas suplementadas con sacarosa o fructosa?; ¿La proteína p53 modifica la permeabilidad mitocondrial e induce apoptosis en las células β pancreáticas de ratas suplementadas con sacarosa o fructosa?

Hipótesis

El incremento en la ingesta de sacarosa o fructosa causa alteraciones en la célula β , que se reflejan en el aumento de secreción de insulina e hiperglucemia crónica. La cual inducirá la movilización de la proteína p53 a la mitocondria y activará la vía intrínseca de la apoptosis.

Objetivo General

Determinar si la administración de sacarosa o fructosa al 40% en el agua de bebida, afecta la distribución intracelular de p53 en células β pancreáticas de rata, así como su participación en la inducción de apoptosis de estas células.

Objetivos Particulares

- Analizar el perfil bioquímico de los animales en estudio
- Determinar el índice de apoptosis en células β pancreáticas
- Identificar la distribución intracelular de p53 en células β pancreáticas

Material y Métodos

Tipo de Estudio: Experimental / Casos – Control

Características del Estudio: Objetivo analítico, Orientación longitudinal, Tiempo retrospectivo, Intervención experimental, Asignación de intervención por el investigador, Grupo control sano

Universo de Estudio: 20 ratas Sprague-Dawley, descritas a continuación:

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas machos Sprague-Dawley (4 semanas de edad, 220-270 g de peso; del Bioterio del Centro Médico Nacional SXXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (21-25 °C) e iluminación controlada de 12 horas luz y 12 de oscuridad.

Los animales se asignaron de forma aleatoria a los siguientes grupos: grupo control (4 animales), que recibió alimento comercial (Marca purina) y agua potable *ad libitum*; el grupo tratado (8 animales), con la misma alimentación pero que recibieron en el agua de bebida sacarosa (glucosa/fructuosa 1:1) al 40% (azúcar comercial, Marca SORIANA) y un tercer grupo tratado (8 animales), con la misma alimentación pero que recibieron en el agua de bebida fructosa al 40% (Crystalline Fructose, Krystar, Alquimia Mexicana, S. de R.L.). El primer día del tratamiento se determinó la concentración de glucosa sérica con un glucómetro (Accutrend Glucose alfa, Roche), en una muestra de sangre tomada de la cola. Durante todo el tiempo del experimento se registró el consumo diario de alimento y de agua, y la ganancia de peso cada semana.

Obtención de las muestras

Después de 4 meses de iniciado el experimento, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (SEDALPHARMA REG. S.A.G.A.R.P.A Q-7972-004) solución inyectable de 35-43 mg/kg PV por vía intraperitoneal. Las muestras de sangre se colectaron por punción cardíaca, se separó el suero y se tomó una alícuota para las determinaciones bioquímicas (Glucosa, colesterol, HDL-colesterol, triacilgliceroles, urea, ácido úrico) y otra se guardó a -20 °C para la cuantificación de insulina. El páncreas se extrajo y se fijó en paraformaldehído al 4% en PBS para su inclusión en parafina (4 del grupo experimental y 4 del grupo control), del resto de los animales el páncreas se congeló inmediatamente y se almaceno a -70 °C hasta su uso.

Variables de Estudio:

Variable Dependiente	Variables Independientes
Glucemia	Concentración de Fructosa/Sacarosa Volumen Consumido Tiempo de Tratamiento Peso corporal
Apoptosis	Glucemia Concentración de Insulina presencia de p53 en mitocondria

Metodología:

Cuantificación de Insulina

Se realizó con un estuche comercial (Insulin Rat ELISA, Marca ALPCO Immunoassays, No. Cat. 80-INSRT-E01), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Análisis de co-localización de p53 en mitocondrias y análisis de permeabilidad mitocondrial en células β del páncreas por microscopía confocal

Las laminillas se desparafinaron y rehidrataron. Primero se calentaron a 60 °C y lavaron con xileno y se re hidrataron con etanol a diferentes grados (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 35%, 30%), finalmente se lavaron con agua bidestilada. Las mitocondrias se marcaron con la sonda MitoFluor Red 589, (200 nM) y se incubaron 20 min a temperatura ambiente, al finalizar se lavaron con PBS. Posteriormente se adicionó una solución de permeabilización (Tritón X-100 0.1%, Citrato de sodio 0.1%) y se incubaron durante 30 min a 37 °C, al finalizar se lavaron con PBS dos veces. Se adicionó el anticuerpo primario anti p53 o anti-citocromo c (dilución 1:25 en 1% BSA-PBS) y se incubó toda la noche a 4 °C con agitación suave. Posteriormente, se lavaron las laminillas con PBS y se adicionó el anticuerpo secundario conjugado con isotiosanato de fluoresceína (FITC, dilución 1:100), se incubaron a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante 3 h. Los núcleos se contrastaron con Draq7 (byosystems), y se montaron con VECTASHIELD Mounting Medium. Posteriormente se analizaron en un microscopio confocal Zeiss Axiovert 100 M con un láser de argón/helio-neón.

La excitación/emisión se midió a 488/510 nm para FITC, y 588/622 nm para MitoFluor 589 ⁽³⁵⁾. Se tomaron 15 micrografías en cortes seriados por grupo.

Análisis de TUNEL para medir apoptosis en células β del páncreas

Una de las características de la muerte por apoptosis es la ruptura del DNA genómico en fragmentos de tamaño oligonucleosomal (200 – 400 pb). Estos fragmentos se pueden identificar marcando el extremo *OH 3'* utilizando nucleótidos modificados en una reacción enzimática. Se utiliza la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal, que cataliza la polimerización de nucleótidos (dUTP marcados con fluorescencia, que pueden ser detectados con un microscopio de fluorescencia) ⁽⁵⁵⁾. Se utilizó un estuche comercial (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Marca Roche, No. Cat. 1684795), siguiendo las instrucciones del proveedor. Los núcleos se contrastaron con Draq7 (byosistem), y se montaron con VECTASHIELD (marca) y se analizaron con un microscopio confocal Axiovision (Zeiss, Alemania), empleando el programa Zen 2009. Se tomaron 15 micrografías en cortes seriados para 4 animales por grupo.

Análisis por Western Blot

El páncreas se homogeneizó en buffer de lisis: tris (hidroximetil) aminometano ácido clorhídrico (Tris-HCl) 50 mM pH 7.5; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, tritón X-100 0.1 %, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.1mM, leupeptina 10 μ g/ml, pepstatina 5 μ g/ml, aprotinina 2 μ g/ml, fluoruro de sodio (FNa) 1 M, p-nitrofenil fosfato (PNP) 25 mM, pirofosfato de sodio 100 mM y ortovanadato de sodio 100 mM) con un polytron PT 1200. Posteriormente se centrifugaron a 3000 g a 4°C durante 10 min.

Se cuantificaron las proteínas en el sobrenadante. Las proteínas (40 μ g), se mezclaron con amortiguador de Laemli, y se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS

al 10%). Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de polivinilidenofluoruro (PVDF) (0.8 mA/cm², 2 h) en amortiguador Tris 25 mM, glicina 192 mM y 20% de metanol.

Después de bloquear los sitios de unión inespecíficos con 3% de albúmina sérica bovina (BSA) en TBS-T (Regulador- Salino-Tris con Tween 0.1%), se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario específico para p53.

Como control de corrimiento se utilizó un anticuerpo dirigido contra β -actina en TBS-T-BSA 1%. La unión de los anticuerpos se detectó con un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano y un estuche comercial de quimioluminiscencia (Luminol, Santa Cruz Biotechnology), siguiendo las instrucciones del proveedor ⁽¹⁶⁾. Se realizó densitometría con el programa Image Studio Lite Ver 5.2 ⁽⁵⁷⁾.

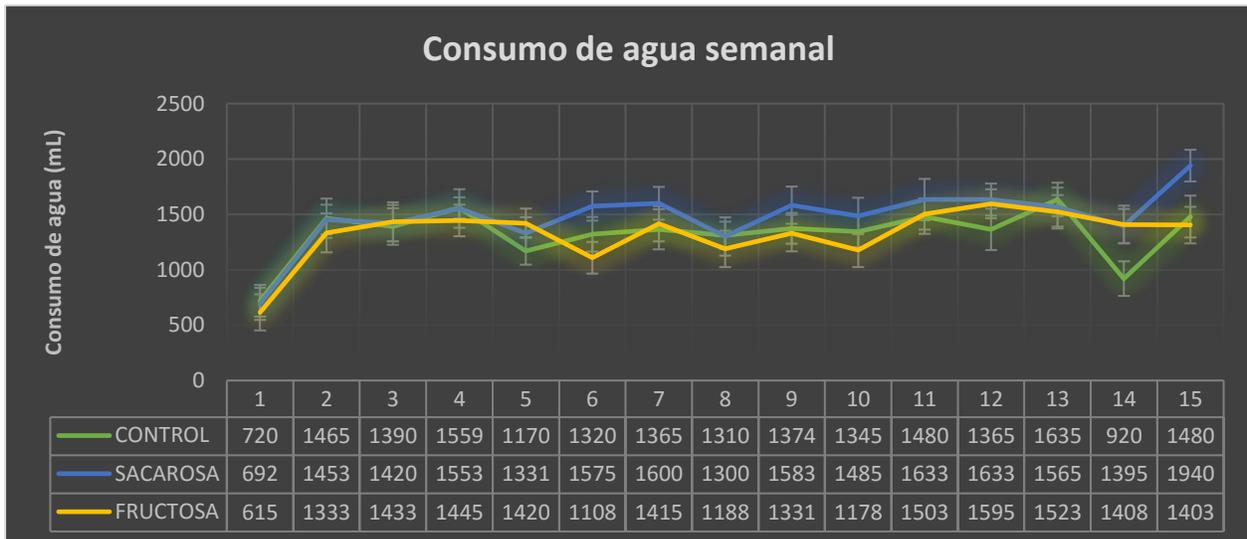
Análisis estadístico

El índice de apoptosis se determinó por la cuantificación del promedio de núcleos positivos a TUNEL multiplicado por 100 y dividido entre el promedio de núcleos totales en las 15 micrografías. Los resultados se expresan como porcentaje.

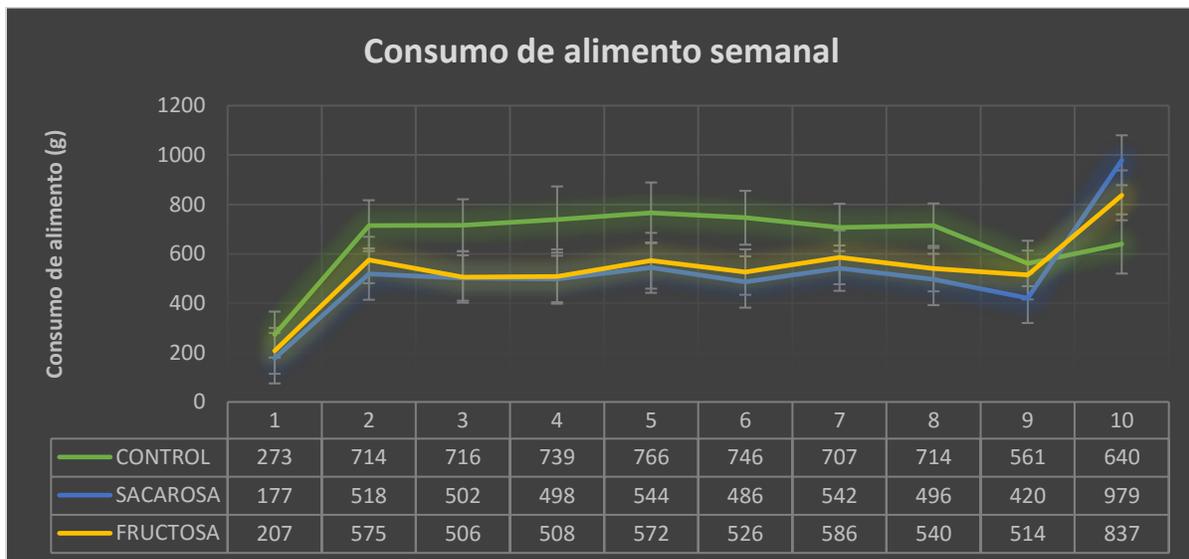
Resultados

Consumo de Alimento y Agua en los grupos de estudio

En las gráficas 1 y 2 se muestra el consumo semanal de agua así como de alimento por cada grupo en cada semana. En ambas gráficas se presentan los promedios para agilizar la visualización de resultados.

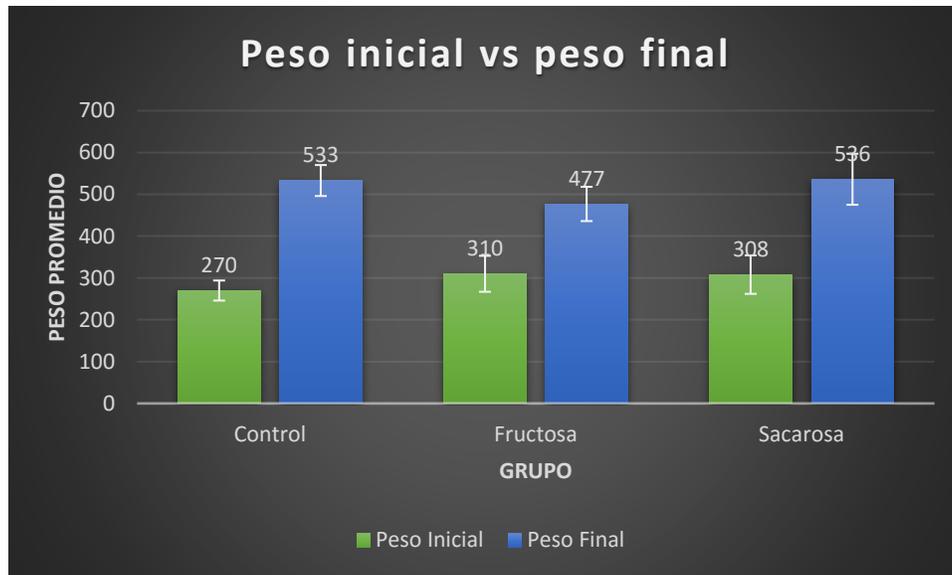


Gráfica 1. Agua consumida por los animales en cada grupo de estudio (el número superior de la tabla indica la semana de tratamiento)

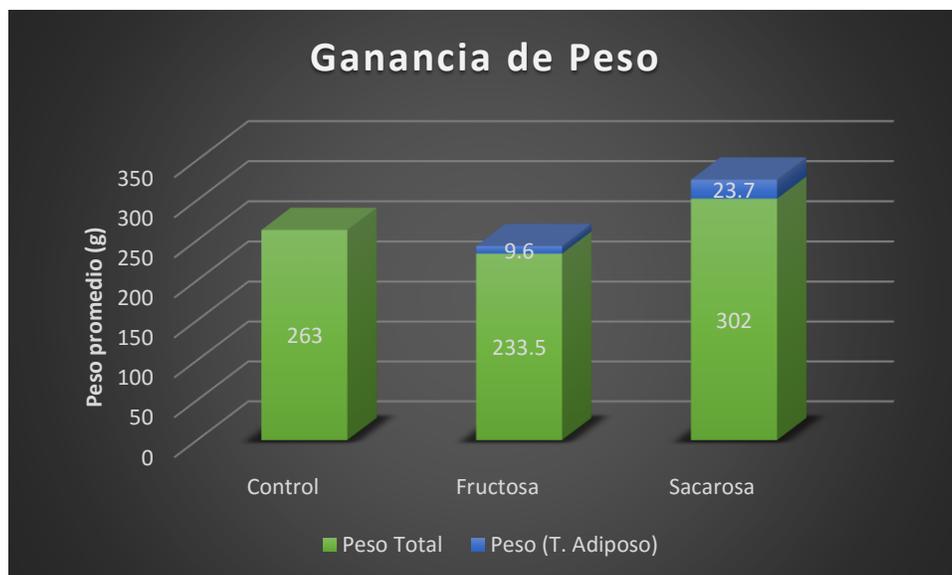


Gráfica 2. Alimento consumido por los animales en cada grupo de estudio (el número superior de la tabla indica la semana)

Peso: En las gráficas 3 y 4 se muestra la diferencia que existió entre el peso inicial de los animales al comenzar el experimento contra el peso al final del tratamiento. En la gráfica 3 se podría concluir que no hay diferencia entre el control y los problemas, la gráfica 4 nos demuestra que el incremento en peso fue más marcado en el grupo sacarosa que el control y éste similar al grupo fructosa. También se muestra el peso de tejido adiposo.

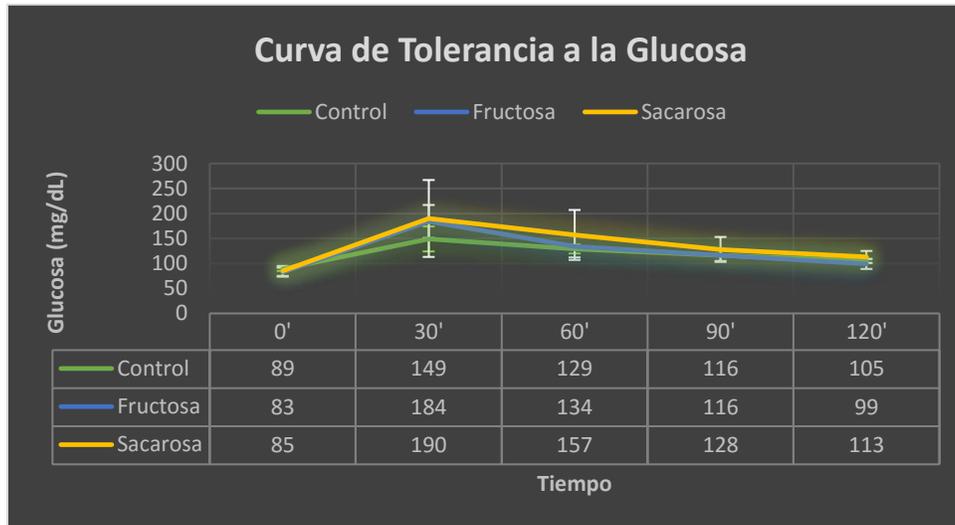


Gráfica 3. Diferencia entre el peso inicial y final de los animales de estudio en gramos



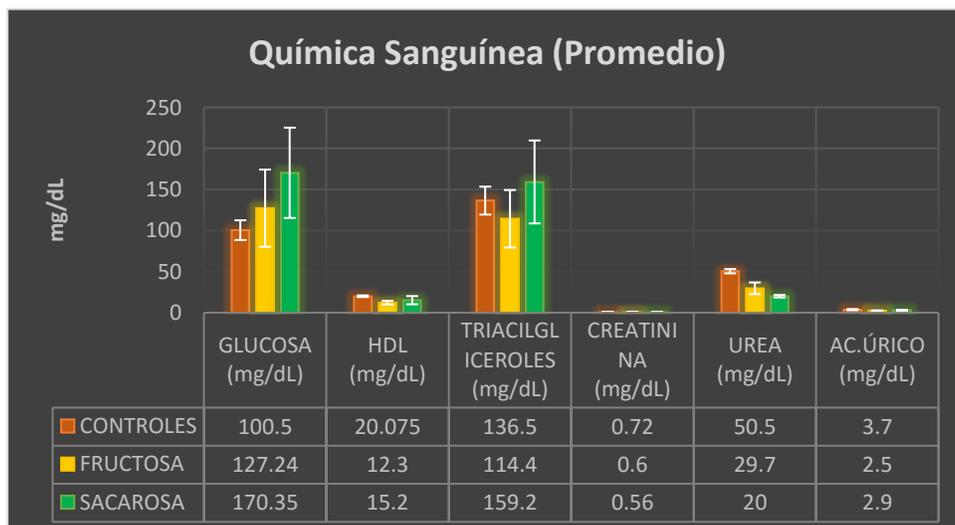
Gráfica 4. Descripción gráfica del peso obtenido por grupo y porción de tejido adiposo

Curva de tolerancia a la glucosa: En la gráfica 5 se puede ver el resultado tras realizarse la curva de tolerancia a la glucosa, es claro que los niveles en el control y en el grupo de sacarosa son iguales, el grupo de fructosa está muy por encima de los valores control.



Gráfica 5. Curva de tolerancia a la glucosa, realizada en la semana 14 de tratamiento

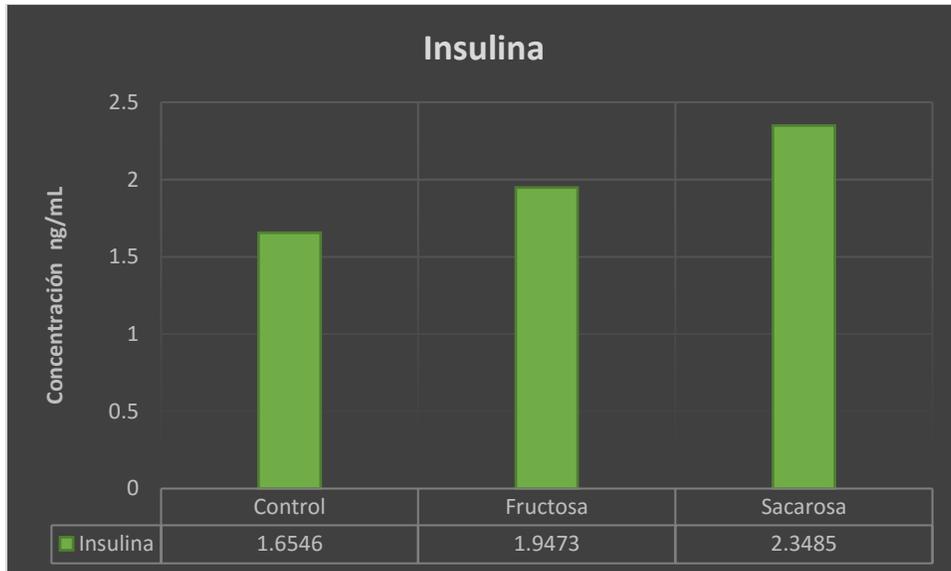
Química sanguínea: En la gráfica 6 se muestran los niveles de químicas analizadas en equipo automatizado después del sacrificio, los datos elevados son glucosa y triacilglicéridos. La glucemia se modifica por el estrés generado en el sacrificio, por ello se refiere a valores más evidentes a los obtenidos en la curva de tolerancia a tiempo cero.



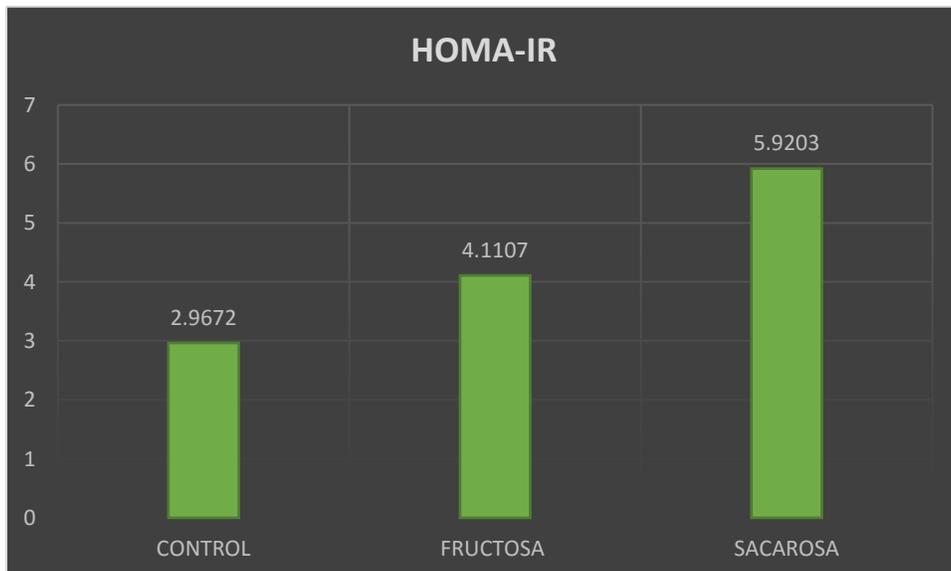
Gráfica 6. Datos de química sanguínea, obtenidos tras el sacrificio de los modelos de estudio

Valores de Insulina, índice HOMA y funcionalidad de la célula B:

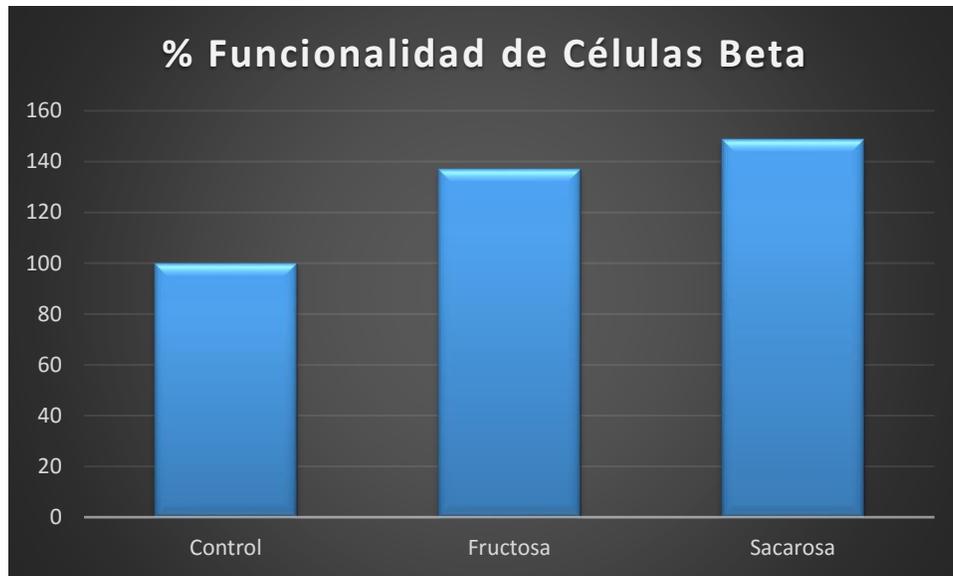
En la gráfica 7 se muestran que los animales que consumieron sacarosa tienen niveles más altos de insulina con respecto a los que tomaron fructosa y a los controles. En la gráfica 7.1 y 7.2, se observa que los animales que consumieron sacarosa y/o fructosa presentan resistencia a la insulina y un porcentaje mayor de funcionalidad de las células β .



Gráfica 7. Valores séricos de insulina.



Gráfica 8.1 Resultados de HOMA-IR (Modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina)



Gráfica 7.2. Funcionalidad de la célula β .

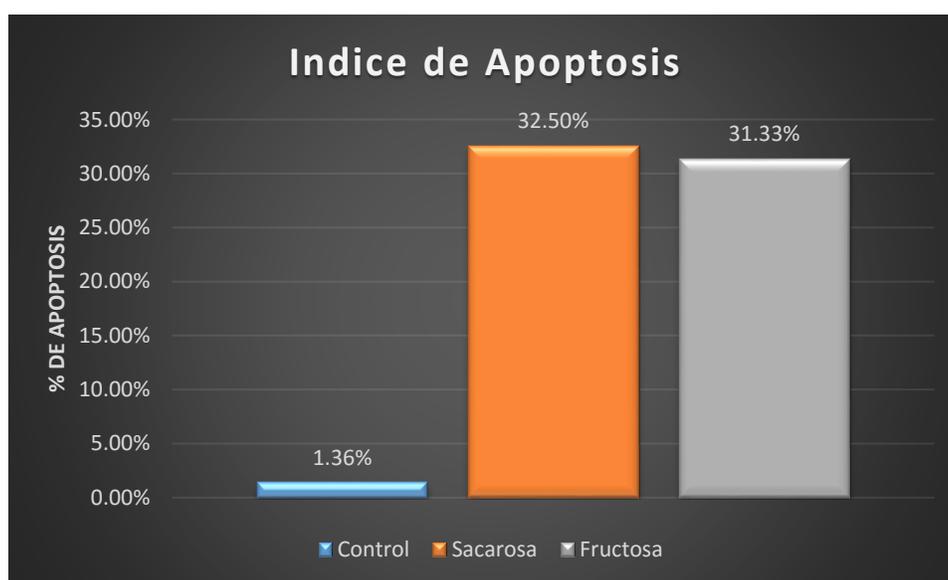
Índice de apoptosis en células β pancreáticas de animales de los grupos de estudio.

En figura siguiente se observa que el consumo de fructosa y sacarosa al 40% en el agua de bebida incrementa el porcentaje de células β positivas a TUNEL (apoptóticas) a diferencia de los animales control. Se muestra una imagen representativa.

El análisis estadístico se realizó dividiendo el número de núcleos positivos entre el número de núcleos totales multiplicado por cien, obteniéndose así el porcentaje de apoptosis por islote. Los datos que se muestran son el promedio del análisis de 15 micrografías.

Núcleos en muestras TUNEL/p53 (Promedios)				
	Positivos	Negativos	Totales	% Apoptosis
Control	2	145	147	1.36
Sacarosa	39	81	120	32.50
Fructosa	26	57	83	31.33

Tabla 3. Análisis estadístico y resumen de resultados de Inmunohistoquímicas



Gráfica 8. Índice de Apoptosis, representado en porcentaje de células en apoptosis (marcadas con TUNEL)

Localización de p53 y mitocondrias en células Beta (Análisis por microscopía confocal)

Las siguientes imágenes se presenta lo obtenido en microscopio confocal Zeiss Axiovert 100 M, tras realizarse el tratamiento a las muestras histológicas de páncreas, según lo indicado en metodología, con marcadores de núcleo, mitocondria, TUNEL y anticuerpos cuyos blancos de acción fueron p53 e insulina. Las imágenes obtenidas describen islotes de Langerhans, mismos que se marginaron para su mejor interpretación, como es posible observarse a continuación:

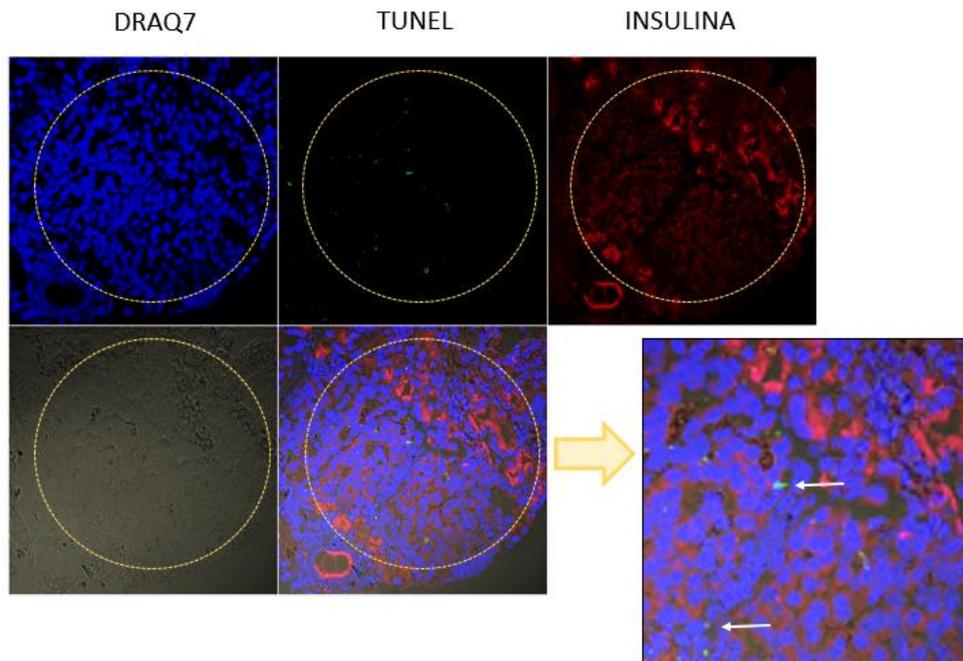


Figura 1. Tinción de TUNEL en islotes pancreáticos de ratas control.
Las flechas señalan los núcleos positivos a TUNEL. n= 2 Microscopio confocal: Zeiss Axiovert 100 M, Láser: de Argón/Helio-Neón; Objetivo: 40x

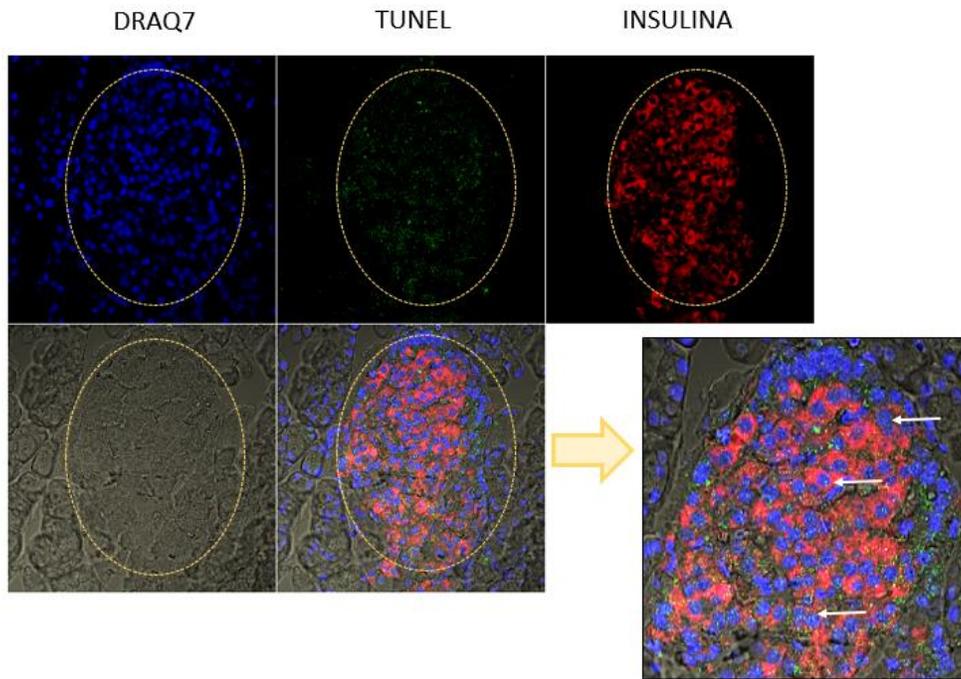


Figura 2. Tinción de TUNEL en islotes pancreáticos de ratas tratadas con fructosa al 40% en el agua de bebida. Las flechas señalan núcleos positivos a TUNEL. n= 35. Microscopio confocal: Zeiss Axiovert 100 M, Láser: de Argón/Helio-Neón; Objetivo: 40x

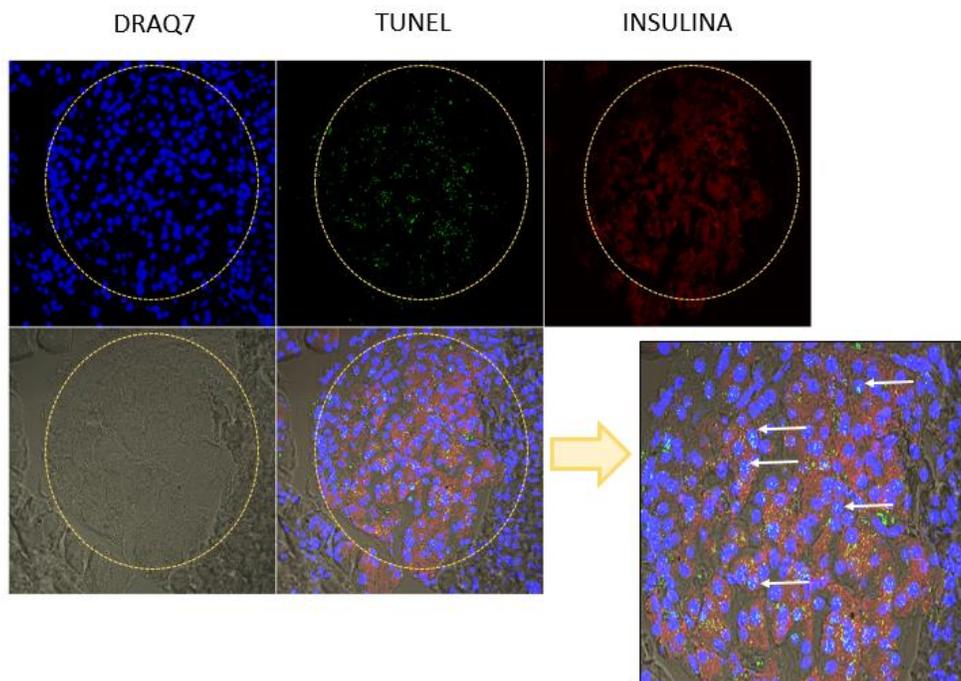


Figura 3. Tinción de TUNEL en islotes pancreáticos de ratas tratadas con sacarosa al 40% en el agua de bebida. Las flechas señalan núcleos positivos a TUNEL. n= 39. Microscopio confocal: Zeiss Axiovert 100 M, Láser: de Argón/Helio-Neón; Objetivo: 40x

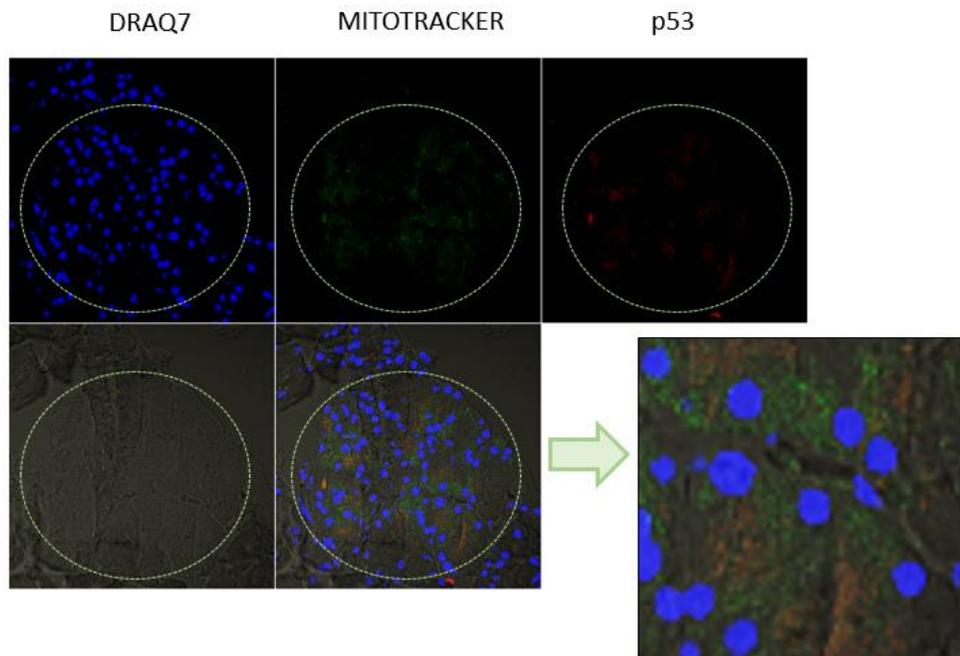


Figura 4. Tinción de mitocondria en islotes pancreáticos de ratas control, sin tratamiento en el agua de bebida. En verde las mitocondrias y su relación con p53. Microscopio confocal: Zeiss Axiovert 100 M, Láser: de Argón/Helio-Neón; Objetivo: 40x

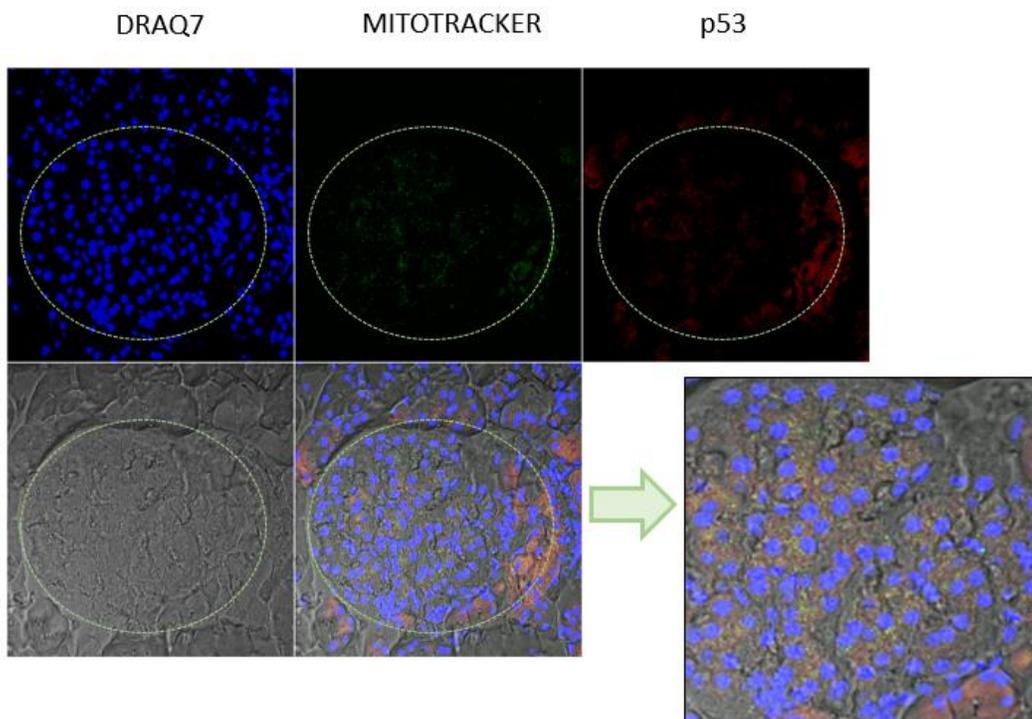


Figura 5. Tinción de mitocondrias y p53 en islotes pancreáticos de ratas tratadas con fructosa al 40% en el agua de bebida. En verde las mitocondrias y su relación con p53. Microscopio confocal: Zeiss Axiovert 100 M, Láser: de Argón/Helio-Neón; Objetivo: 40x

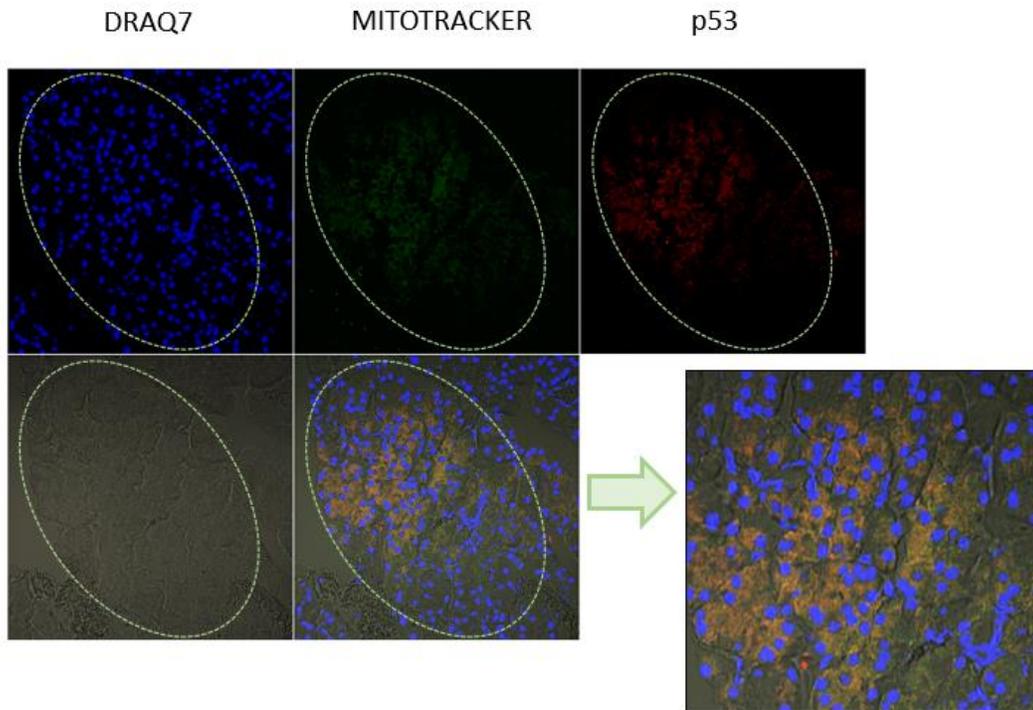
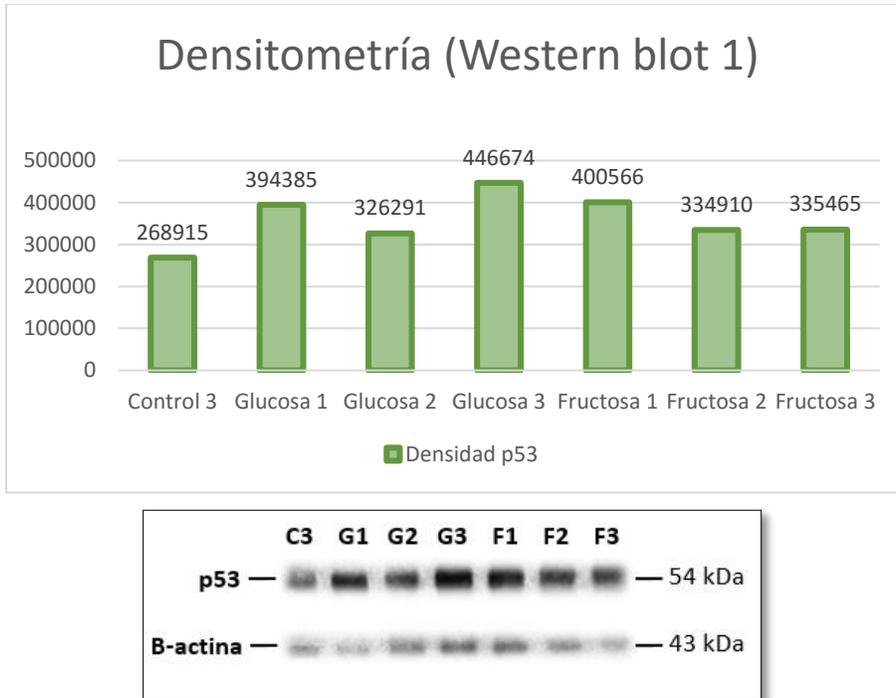


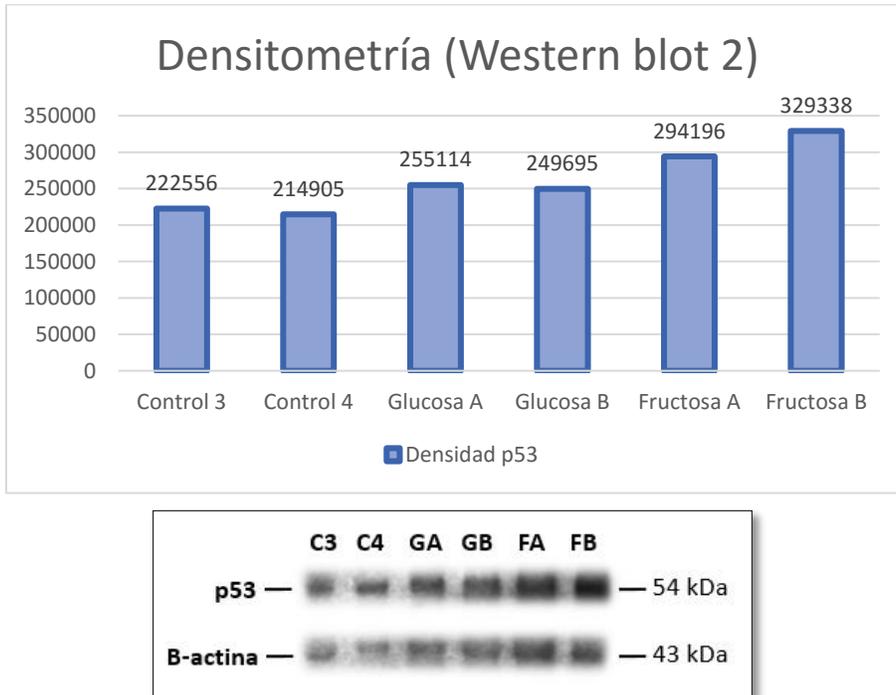
Figura 6. Tinción de mitocondrias TUNEL y p53 en islotes pancreáticos de ratas tratadas con sacarosa al 40% en el agua de bebida.
 En verde las mitocondrias y su relación con p53.
 Microscopio confocal: Zeiss Axiovert 100 M, Láser: de Argón/Helio-Neón; Objetivo: 40x

Análisis por Western Blot

El análisis densitométrico semi cuantitativo de las imágenes de western muestra un incremento estadísticamente significativo en la concentración de p53 en lisado total de páncreas de los animales que recibieron sacarosa o fructosa en el agua de bebida con respecto al control. (Gráficas 9 y 10).



Gráfica 9. Análisis de Western Blot 1, realizado en el programa Image Studio Lite Ver. 5.5



Gráfica 10. Análisis de Western Blot 2, realizado en el programa Image Studio Lite Ver. 5.5

Discusión de resultados

La obtención de resultados se realizó en 2 etapas, para facilitar la discusión de resultados se dividirán en pre y post sacrificio, de esta forma se visualiza cronológicamente el desarrollo del proyecto.

Fase pre sacrificio

Esta fase corresponde a las observaciones de los animales en cuanto a comportamiento y mediciones (peso, consumo de alimento/tratamiento, curva de tolerancia a la glucosa).

Comportamiento: Las primeras semanas de tratamiento todos los animales del lote mostraron comportamiento similar, es decir se encontraban activas y el consumo de alimento como del tratamiento fue constante.

El comportamiento fue similar hasta los dos meses, tiempo en el que ya habían obtenido un peso considerable, se observó gran descenso en la actividad de las ratas tratadas con sacarosa, tal pasividad solo se vio reflejada en el aumento de peso. En el caso del grupo fructosa además de la pasividad mostrada, también se observó un comportamiento agresivo entre los animales, presentaban evidencia de lesiones.

Este comportamiento se mantuvo hasta el término del tiempo establecido.

Consumo de alimento/tratamiento en agua de bebida:

El consumo de alimento en los tres grupos es casi constante, cuando se comparan entre sí se puede decir que en el tiempo de tratamiento el grupo control mantiene una ingesta mayor que los grupos con tratamiento, esto se debió a que los carbohidratos consumidos mediante

el tratamiento cubren las necesidades energéticas del organismo y estos disminuyen el apetito, y por lo tanto la ingesta de alimento es menor. Por otra parte cuando comparamos los datos en la ingesta de agua, los tres grupos se mantienen constantes las primeras 4 semanas, a partir de la quinta semana el grupo control conserva constante el volumen, mientras que el grupo que tomaba el tratamiento con sacarosa aumenta el volumen consumido respecto al grupo control y se mantiene así hasta el final del tratamiento, en general las bebidas azucaradas tienden a generar adicción, aumentando así el consumo de estas, sin embargo no ocurre así con el grupo cuya bebida contiene fructosa, no hace el sabor tan agradable como en el caso de la sacarosa, aun así hay un consumo constante y bastante parecido al grupo control.

Peso

Independientemente al consumo de alimento y del agua con tratamiento, no se observaron diferencias en la ganancia de peso con respecto a los controles. Sin embargo, la ingesta de fructosa y sacarosa sí estimuló la acumulación de tejido adiposo visceral (2 y 4.4%, respectivamente). Se sabe que la fructosa tiene mayor efecto lipogénico que la glucosa, lo que incrementa la obesidad y resistencia a la insulina ⁽⁶⁾. En este estudio los animales que recibieron sacarosa mostraron mayor cantidad de tejido adiposo visceral que la fructosa.

Curva de tolerancia a la glucosa

Esta prueba está diseñada para evaluar una alteración en el metabolismo de los carbohidratos y en la capacidad que tiene el individuo para manejar niveles de glucemia altos durante la ingesta de estos y así identificar resistencia a la insulina ⁽⁶⁷⁾, en la gráfica correspondiente se puede observar que los niveles basales se encuentran dentro de los

rangos normales (en la mayoría de las fuentes es <100 mg/dL) por lo tanto no denotan una alteración en el metabolismo de carbohidratos, pero cuando se administra una cantidad de carbohidratos elevada, se observa en general que el grupo control y sacarosa tiene un comportamiento igual y que no existe intolerancia a la glucosa, sin embargo la curva *per se* no es suficiente elemento para descartar una resistencia a la insulina y se analizará más adelante, por el contrario el grupo de fructosa se denota que las concentraciones están muy por encima respecto al grupo control en las mediciones hechas posteriormente de la dosificación alta en carbohidratos, en la medición realizada a los 120 minutos el valor de glucosa está encima de los valores de referencia manejados en la literatura (>110 mg/dL), se puede especular acerca de la resistencia a la insulina.

Niveles de Insulina e Índice HOMA

Como se mencionaba la curva de tolerancia a la glucosa es una herramienta útil para ver de una forma gráfica la resistencia a la insulina sin embargo existen casos en los que no es tan fácil evidenciar la resistencia, por lo que la concentración de insulina y el índice HOMA resultan útiles, en el caso del grupo control y el grupo sacarosa aparentemente no hay una diferencia, sin embargo cuando se analiza las concentraciones de insulina (gráfica 7) se puede observar que está mucho más elevado en el grupo de Sacarosa que en el grupo control, esto sucede en individuos que presentan severas afectaciones al metabolizar carbohidratos, ya que el páncreas se ve obligado a producir más insulina de la normal para que pueda llegar la glucosa a niveles plasmáticos normales, y esto se confirma con la gráfica 7.2 donde los grupos con tratamiento presentan mayor funcionalidad de las células β , aunque el consumo de sacarosa tiene más efectos deletéreos sobre la células β que la fructosa.

El índice HOMA (gráfica 7.1) indica resistencia a la insulina cuando sus valores son mayores a 3, en el caso de ambos grupos con tratamiento presentan resistencia.

Fase post sacrificio

Esta fase corresponde al análisis de las muestras obtenidas durante y después del sacrificio de los animales de todos los grupos.

Químicas sanguíneas

Se analizó el suero en equipo automatizado y los resultados obtenidos se pueden observar con detenimiento en la gráfica anteriormente presentada. Resulta muy útil realizar estas pruebas pues arrojan seis resultados en el mismo análisis, los cuales son glucosa, HDL, triacilgliceroles, creatinina, urea y ácido úrico. Las muestras se obtuvieron de vena porta mientras los animales se encontraban anestesiados para evitar la coagulación.

Se observaron niveles de glucosa más elevados que en la curva de tolerancia para todos los grupos aunque ambas mediciones se realizaron en muestras en ayuno, esto se justifica con el argumento del estrés generado en los animales en sacrificio, a pesar de que se llevaron a cabo los procedimientos correctos para el manejo de animales.

El resultados más relevantes es el de triacilgliceroles, los grupos fructosa y sacarosa presentaron claramente mayores niveles (<140mg/dL), lo cual es debido al alto consumo en carbohidratos y la reducción en la actividad de los animales, por lo que el consumo calórico comenzó a ser menor que la cantidad de calorías ingeridas, este desequilibrio se traduce en almacenamiento de energía en lípidos. El ácido úrico resultó similar entre los tres grupos y dentro de los rangos establecidos en la literatura (2.5-7 mg/dL), y se tomó como normal en los grupos tratados.

Los niveles de creatinina y urea sanguínea en los controles han resultado ser más elevados en comparación con los grupos en tratamiento, lo que no se esperaría, pues son marcadores de daño renal, hipovolemias o en dieta alta en proteínas, al realizarse el sacrificio pudieron presentar una ligera deshidratación ya que se tuvieron en ayuno total durante 12 horas, sin embargo los niveles de estos no son tan elevados para poder afirmar que hay daño renal. Regresando a los altos niveles de lípidos en el grupo fructosa, cabe mencionar que se ha reportado que el consumo de fructosa es causa de hígado graso, además se detectaron zonas necrosadas en hígado al realizarse la extracción de órganos, sólo en animales tratados con fructosa.

Apoptosis las células β

Las fotografías presentadas en la sección correspondiente son representativas de alrededor de 200 imágenes de cada grupo de estudio (control, sacarosa y fructosa). Observamos que la administración de fructosa o sacarosa en el agua de bebida induce aproximadamente 30% de apoptosis de las células β pancreáticas (Tabla 3). Estudios previos demostraron en personas con alteraciones de la glucosa en ayuno, una disminución de las células β hasta del 40%, lo que supone que la masa y función de células β , está afectada mucho antes de las manifestaciones clínicas de DT2 ⁽⁵⁸⁾. La administración de sacarosa o fructosa induce daños a nivel de islotes pancreáticos, como hialinización e infiltración de macrófagos, similar a lo que se observa en DT2 ⁽⁵⁹⁾. También se ha observado, un incremento en la concentración y localización membranal de GLUT2 en islotes pancreáticos de ratas suplementadas con sacarosa ⁽⁶⁰⁾, posiblemente como un intento de las células β para cubrir las demandas de insulina y mantener la normoglucemia ⁽⁵⁹⁾.

Las alteraciones metabólicas (obesidad visceral, hiperglucemia e intolerancia a la glucosa), derivadas de la administración de sacarosa o fructosa al 40% en el agua de bebida, imponen un estrés oxidativo crónico sobre la célula β ^(16, 32), que después de incrementar la secreción de insulina, entra en disfunción y apoptosis ^(17, 18). Otros autores también han reportado que la ingesta de sacarosa induce pérdida de células β en ratas Goto-Kakizaki ⁽⁶¹⁾, así como un aumento del 44% de apoptosis de células β en ratas Wistar ⁽⁶²⁾. Estos resultados apoyan la propuesta de que la pérdida de células β es un evento temprano y progresivo que antecede a la DT2. En este estudio los animales que tomaron fructosa o sacarosa mostraron un incremento en la tasa de apoptosis de las células β , pero mayor secreción de insulina y resistencia a insulina. Estos resultados indican que las células remanentes están sobre estimuladas e incrementan la síntesis y secreción de insulina para contrarrestar la hiperglucemia, como se observa en la prueba de tolerancia a la glucosa. La apoptosis de las células β en estas condiciones, se debe principalmente a cambios en la permeabilidad mitocondrial y activación de la vía intrínseca de la apoptosis ⁽⁶³⁾.

P53 participa en la inducción de apoptosis en células β pancreáticas de rata

El análisis por western blot demuestra que en la administración de sacarosa o fructosa en el agua de bebida incrementa la concentración de la proteína p53 en lisado total de páncreas. Lo que correlacionó con el incremento en el porcentaje de apoptosis (células β positivas a TUNEL). Estos resultados sugieren la participación de p53 en la inducción de apoptosis de las células β . Estudios previos han demostrado la movilización de p53 a la mitocondria y su fosforilación, así como el aumento en la tasa de apoptosis de células RINm5F (células β pancreáticas), cultivadas con concentraciones altas de glucosa ⁽²⁶⁾.

El análisis de co-localización por microscopía confocal corroboró la presencia de p53 en las mitocondrias de las células β pancreáticas de los animales que tomaron sacarosa o fructosa. Estos datos demuestran que el incremento en el consumo de carbohidratos simples (sacarosa o fructosa), promueve la movilización de la proteína p53 a la mitocondria y la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Tanto la diabetes como el síndrome metabólico son entidades que cursan con estrés oxidativo. Es sabido que las células β son altamente susceptibles al estrés oxidativo, debido principalmente a que presentan concentraciones bajas de antioxidantes y a su metabolismo glucolítico oxidativo ⁽⁶⁴⁾. Los resultados de este estudio muestran que los animales que tomaron sacarosa o fructosa en el agua de bebida, presentaron hiperglucemia.

La hiperglucemia se sabe tiene efectos deletéreos sobre la funcionalidad y supervivencia de las células β , además de contribuir a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) ^(15,20), promueve la migración de la proteína p53 a la mitocondria y su fosforilación promueve la apoptosis de las células β pancreáticas ^(20,26) y disminuye la masa celular β por apoptosis.

Conclusiones

Se observaron conductas distintas en los animales de estudio respecto al consumo de carbohidratos en agua de bebida dependiendo la edad a la que se inició el tratamiento, siendo los más jóvenes los que presentaron mayor afinidad por el sabor dulce, lo cual puede asociarse al efecto adictivo de la sacarosa en el humano.

Cabe señalar el daño hepático observado al realizarse la obtención de muestras durante el sacrificio en algunas ratas que consumieron fructosa, así como la alta acumulación de tejido adiposo en las mismas, si se comparan con los otros grupos en estudio, cumpliéndose la teoría de estudios previos acerca del efecto deletéreo producido al hígado por el consumo de éste carbohidrato.

No se obtuvieron niveles de glucemia lo suficientemente altos para clasificar a los animales como diabéticos, sin embargo, al completarse las pruebas realizadas se observaron diferencias claramente distintivas entre los grupos en tratamiento contra el grupo control, demostrándose un considerable mayor daño en célula β de los grupos tratados.

El incremento en la ingesta de sacarosa o fructosa causa alteraciones en la célula β , que se reflejan en el aumento de secreción de insulina e hiperglucemia crónica. La cual inducirá la movilización de la proteína p53 a la mitocondria y activará la vía intrínseca de la apoptosis.

Perspectivas

Se recomienda realizar el análisis en los cambios de expresión de la proteína proapoptótica (Bax) y la proteína antiapoptótica (Bcl-2) con la intención de comparar los resultados obtenidos a distintas escalas de estudio, de ésta forma confirmar las diferencias entre modelos sanos contra los modelos en tratamiento.

Con el trabajo realizado se ha comprobado el daño subcrónico y a tiempo final de la célula beta producido por el consumo de altas cantidades de glucosa y fructosa.

Se propone continuar con el trabajo con la determinación del daño a distintas edades por el consumo de carbohidratos, controlando las pruebas realizadas bajo las mismas condiciones para obtener resultados en cantidad y tiempo de la apoptosis.

De ser necesario realizar experimentos similares con otros carbohidratos de consumo habitual en el humano, para conocer sus efectos positivos y/o negativos en célula β .

Referencias Bibliográficas

1. Pérez E, Serralde A, Meléndez G. Efectos benéficos y deletéreos del consumo de fructosa. México, DF. Servicio de Nutriología Clínica INCMNSZ: 2007
2. Lee J, Gu W. The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell Death and Differentiation* 17: 86-92, 2010
3. Silva A, Gutiérrez A, Arias C, Lazaro I. Estructura, regulación y funciones del gen supresor de tumores p53. Madrid, España. CIB. CSIC: 144, 28006, 2002
4. Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang D-H, Gersch MS, Benner S and Sánchez-Lozada LG: Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease *The American Journal of Clinical Nutrition* 86: 899-906, 2007.
5. Palmer JR, Boggs DA, Krishnan S, Hu FB, Singer M and Rosenberg L: Sugar-sweetened beverages and incidence of type 2 diabetes mellitus in African American women. *Arch Intern Med* 168: 1487-1492, 2008.
6. Porikos KP and Itallie TBV: Diet-induced changes in serum transaminase and triglyceride levels in healthy adult men. Role of sucrose and excess calories. *Am J Med* 75: 624-630, 1983
7. Basu S, Yoffe P, Hills N and Lustig RH: the relationship of sugar to population level diabetes prevalence: an econometric analysis of repeated cross-sectional data. *PLoS ONE* 8: 2013.
8. Thompson RG, Hayford JT and Hendrix JA: Triglyceride concentrations: the disaccharide effect. *Science* 206: 838-839, 1979.
9. Teff KL, Elliott SS, Tschöp M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, Townsend RR, Keim NL, D'alessio D and Havel APJ: Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89: 2963-2972, 2004.
10. Roncal-Jimenez CA, Lanaspa MA, Rivard CJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Jalal D, Andres-Hernando A, Tanabe K, Madero M, Li N, Cicerchi C, Fann KM, Sautin YY and Johnson RJ: Sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male rats independent of excess energy intake. *Metabolism* 60: 1259-1270, 2011.
11. Larqué C, Velasco M, Navarro-Tableros V, Duhne M, Aguirre J, Gutiérrez-Reyes G, Moreno J, Robles-Diaz G, Hong E and Hiriart M: Early endocrine and molecular changes in metabolic syndrome models. *IUBMB Life* 63: 2011.
12. Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM and Guyton JR: Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology, and mechanisms. *American Heart Journal* 149: 33-45, 2005.
13. Maiz-G A: El síndrome metabólico y riesgo cardiovascular. *Boletín de la Escuela de Medicina* 30: 24-30, 2005.
14. Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada G, Shafiu M, Sundaram S, Le M, Ishimoto T, Sautin YY and Lanaspa MA: Sugar, Uric Acid, and the Etiology of Diabetes and Obesity. *Diabetes* 62: 3307-3315, 2013.
15. Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820, 2001.
16. Ortega-Camarillo C, Guzmán-Grenfell AM, García-Macedo R, Rosales-Torres AM, Ávalos-Rodríguez A, Duran-Reyes G, Medina-Navarro R, Cruz M, Díaz-Flores M and Kumate J: Hyperglycemia induces apoptosis and p53 mobilization to mitochondria in RINm5F cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 281: 163-170, 2006.
17. Poitout V: Glucolipototoxicity of the pancreatic beta-cell: myth or reality? *Biochemical Society Transactions* 36: 901-904, 2008.
18. Poitout V and Robertson RP: Glucolipototoxicity: Fuel excess and b-cell dysfunction. *Endocrine Reviews* 29: 351-366, 2008.
19. Grankvist K, Marklund SL and Täljedal I-B: CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse *Biochemistry Journal* 199: 393-398, 1981.
20. Nishikawa T, Edelstein D, Du JX, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek AM, Beebe D, Oates JP, Hemmes PH, Giardino I and Brownlee M: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787-790, 2000.
21. Ferrer J, Merino J, Herrera A and Piñón F: Efecto de la hiperglucemia sobre la célula beta *Avances en Diabetología*. *Avances en Diabetología* 20: 137-144, 2004.
22. Lebovitz HE: Type 2 diabetes: An overview. *Clin Chem* 45: 1339-1345, 1999.
23. Rhodes CJ: Type 2 Diabetes- a matter of b-cell life and death? *Science* 307: 380-383, 2005.
24. Schwartzman RA and Cidlowski JA: Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews* 14: 133-151, 1993.

25. Roche E: Diabetes tipo 2: gluco-lipo-toxicidad y disfunción de la célula b pancreática. *Ars Pharmaceutica* 44: 313-332, 2003.
26. Flores-López LA, Díaz-Flores M, García-Macedo R, Ávalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Cruz M, Contreras-Ramos A, Konigsberg M and Ortega-Camarillo C: High glucose induces mitochondrial p53 phosphorylation by p38 MAPK in pancreatic RINm5F cells. *Mol Biol Rep* 40: 4947-4958, 2013.
27. Prives C and Hall PA: The p53 pathway. *The Journal of Pathology* 187: 112-126, 1999.
28. Burns FT and EL-Deiry SW: The p53 pathway and apoptosis. *J Cell Physiol* 181: 231-239, 1999.
29. Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein CJ, Fitzgerald P and Green RD: p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Journal of Biological Chemistry* 275: 7337-7342, 2000.
30. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P and Moll UM: p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell* 11: 577-590, 2003.
31. Butler AE, Janson J and Bonner-Weir S: b-Cell deficit and increased b-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 102-110, 2003.
32. Vilaplana M. Hidratos de carbono simples y complejos. España: OFFARM, Vol. 27 Núm 2 Feb 2008, pp. 54-57
33. Castillo P, García R, Durán C. El consumo de fructosa: riesgos para la salud y la economía. México: Academia Mexicana de Ciencias, Ciencia, abril-junio 2003, pp 77-84
34. Metabolismo de los carbohidratos. *Gan BCN [Internet]* 2012 [consultado 25 de septiembre de 2016] [aprox 11 p.]
35. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Estados Unidos: *Diabetes Care*, 2015; Volume 38, Supplement 1, January 2015, pp. S8-S16
36. Olvera C, Leo G, Hernández H. Pancreas β cells: Differentiation mechanisms, morphogenesis and endocrine cellular specification. Regeneration? Querétaro, México: Mediagraphic, Vol. 65, julio-agosto 2008
37. Valsecia M. Farmacología de la diabetes. Colombia: UNAD, Sección IV, Capítulo 24
38. Reiriz J. Sistema endócrino páncreas endócrino. Barcelona, España: Universidad de Barcelona, 2010, pp 11-13
39. Ortíz G. La insulina de la biología a la patología molecular. Sevilla, España: Europa Artes Gráficas, 2000.
40. Rivera J, Hernández M, Aguilar C, Mayurama C. Obesidad en México: recomendaciones para una política de estado. México, D. F.: UNAM, 2013
41. Arboleda V, Arango E, Patiño F. Algunas consideraciones sobre actividad física en personas con sobrepeso y obesidad. Medellín, Colombia: Funámbulos editores, 2011, pp 10-14.
42. OMS. Obesidad y Sobrepeso. [Internet] Junio de 2016 [consultado 29 de Julio de 2016]
Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
43. González A. Diabetes mellitus como factor de riesgo cardiometabólico. México: SMEHA, 2012
44. OMS. Diabetes. [Internet] Noviembre de 2016 [consultado 29 de Julio de 2016]
Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
45. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Estados Unidos: *Diabetes Care*, Volume 37, Supplement 1, January 2014
46. Quiroz C. Prevalencia de síndrome metabólico en trabajadores de la salud del hospital regional Xalapa. Veracruz, México: Universidad Veracruzana, 2014
47. Markou T, Dowling AA, Kelly T and Lazou A: Regulation of Bcl-2 phosphorylation in response to oxidative stress in cardiac myocytes. *Free Radical Research* 43: 809-816, 2009.
48. Rojas M, Salmen S, Berrueta L. Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. Mérida, Venezuela: Instituto de Inmunología Clínica, 2009
49. Gómez M, Fernández F, Jordán J. La proteína p53 en procesos neurodegenerativos en sus 25 años de historia. La Mancha, España: *REV NEUROL* 2004; 39: 243-50
50. Ríos M, Hernández M. Los genes supresores de tumores y el cáncer. Cuba: *Rev Cubana Oncol*, 2001: 17(1):65-71
51. Gómez M, Fernández F, Jordán J. La proteína p53 en procesos neurodegenerativos en sus 25 años de historia. La Mancha, España: *REV NEUROL* 2004; 39: 243-50
52. Amaral J, Xavier J, Steer C, Rodrigues C. The role of p53 in apoptosis. USA: *Discov Med*. 2010 Feb;9(45):145-52
53. Departamento de Nutrición Aplicada, Universidad Miguel Hernández. Type 2 diabetes: gluco-lipo-toxicity and pancreatic β -cell dysfunction. Madrid, España: *Ars Pharmaceutica*, 44:4; 313-332, 2003
54. Chen K, Albano A, Ho A and Jr JFK: Activation of p53 by oxidative stress involves platelet-derived growth factor-b receptor-mediated ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 39527-39533, 2003.

55. Chen Y, Lewis W, Diwan A, Cheng E, Matkovich S and Dorn G: Dual autonomous mitochondrial cell death pathways are activated by Nix/BNip3L and induce cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 9035-9042, 2010.
56. Analyzing western blots with Image Studio Lite [actualizado 01 Febrero 2013; citado 22 jul 2016]. Disponible en: <http://lukemiller.org/index.php/2013/02/analyzing-western-blots-with-image-studio-lite/>
57. Meier J, Butler A, Saisho Y: Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes*. 2008; 57: 1584–1594.
58. Johnson R, Nakagawa T, Sanchez-Lozada L. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes*. 2013 Oct; 62 (10):3307-15.
59. Hiriart M, Velasco M, Larqué C. Metabolic syndrome and ionic channels in pancreatic beta cells. *Vitam Horm*. 2014; 95: 87-114.
60. Mizukami H, Wada R, Koyama M. Augmented beta cell loss and mitochondrial abnormalities in sucrose-fed GK rats. *Virchows Arch*. 2008 Apr; 452(4):383-92.
61. Maiztegui B, Borelli M, Raschia M. Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: beta-cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion. *J Endocrinol*. 2009 Feb;200(2):139-49
62. Lablanche S, Cottet-Rousselle C, Lamarche F. Protection of pancreatic INS-1 β -cells from glucose- and fructose-induced cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition with cyclosporin A or metformin. *Cell Death Dis*. 2011 Mar 24; 2:e134.
63. Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J*. 1981;199:393–398.
64. OMS. Hiperglucemia diabetes mellitus. Washington, DC. Organización Panamericana de la salud, Oficina regional de la OMS: 296-308, 2008
65. Ning S-B, Guo H-L, Wang L and Song Y-C: Salt stress induces programmed cell death in prokaryotic organism *Anaebaena*. *Journal of Applied Microbiology* 93: 2002.
66. Li P-F, Dietz R and Harsdorf Rv: p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *The EMBO Journal* 18: 6027-6036, 1999.
67. Ye J, Wang S, Leonard SS, Sun Y, Butterworth L, Antonini J, Ding M, Rojanasakul Y, Vallyathan V, Castranova V and Shi X: Role of Reactive Oxygen Species and p53 in Chromium(VI)-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 34974-34980, 1999.
68. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275, 1951.
69. González Y, Castillo A, Llerena T. Síndrome metabólico en ratas Wistar inducido por dieta rica en sacarosa *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, Argentina, vol. 49, núm. 3, 2015, pp. 301-309
70. Nanne C, Rojas E, Granados J. Efecto del consumo de fructosa sobre los niveles plasmáticos de ácido úrico, colesterol y triacilglicéridos. *Farmacología*, Costa Rica. Vol. 3, Núm. 2, Art. 5; 2009
71. Dongfeng C, Hailin L, Terry L. Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem*. 2007, 282;36275-36282
72. Maiztegui B, Borelli M, Raschia M. Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: b-cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion. *Jurnal of Endocrinology* (2009) 200, 139-149
73. Lustig R, Schmidt L, Brindis C. The toxic truth about sugar. *Nature*. (2012) 482. 27.
74. Kaneto H, Fijii J, Myint T. Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic b-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem. J*. (1996) 320, 855-863
75. Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose K, Brownlee M and Araki E: Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic b-cells. *Biochemical and Biophysical Communications* 300: 216-222, 2003.