

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



**Tesis para la obtención del grado académico de
Doctor en Ciencias Biológicas**

“Glucolipototoxicidad y disfunción de la célula β en un modelo experimental de dislipemia y resistencia insulínica. Análisis de algunos mecanismos. Acción de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFA) dietarios.”

Tesista: Bioq. María del Rosario Ferreira Cordoneda

Director de Tesis: Dra. Adriana G. Chicco

Co-Director de Tesis: Dra. Yolanda Bolzón de Lombardo

**Laboratorio de Estudios de Enfermedades Metabólicas Relacionadas
con la Nutrición- Departamento de Ciencias Biológicas.**

AÑO 2013

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera especial y sincera a quienes han colaborado en la realización de este trabajo de Tesis:

A la Dra. Adriana G. Chicco y a la Dra. Yolanda Bolzón de Lombardo quienes ejercieron la dirección y co-dirección, respectivamente, con absoluta responsabilidad, compromiso y dedicación, orientándome día a día en el trabajo de laboratorio e interpretación de los resultados obtenidos.

Al Ministerio de Salud de la Nación, por otorgarme la Beca Ramón Carrillo - Arturo Oñativia que me permitiera iniciarme en el trabajo de esta tesis doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme las Becas Internas de Postgrado tipo I y tipo II que me permitieron finalizar los estudios de Postgrado en la carrera del Doctorado en Ciencias Biológicas.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) (PICT 05-38157 BID 1728 OC/AR) y CONICET (PIP #0105/2010) que a través de sus subsidios colaboraron con la realización de este trabajo de Tesis.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por otorgarme la posibilidad de realizar mi formación de Postgrado en este establecimiento.

A todos mis compañeros y amigos de trabajo: tesistas, técnicos, docentes y no docentes del Departamento de Ciencias Biológicas, quienes me han acompañado durante estos años de trabajo brindándome su apoyo y motivación.

A Silvia Rodriguez, por su colaboración en el trabajo de laboratorio, por su amistad, y por brindarme siempre su apoyo y palabras de ánimo.

A mis padres, quienes siempre tuvieron palabras de aliento y me enseñaron a trabajar con responsabilidad y dedicación, y a mis hermanos y amigos por su apoyo incondicional.

Finalmente quiero agradecer a mi esposo Facundo, por su paciencia, su comprensión y constante estímulo; y a mi hija Charo que también ha colaborado a su manera para que pudiera culminar esta etapa tan importante de mi vida.

INDICE GENERAL

	Página
INDICE DE TABLAS	V
INDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN / SUMMARY	1
INTRODUCCION	9
1. Páncreas endócrino: características generales de la biosíntesis y secreción de insulina.....	11
1.1 Islotes pancreáticos	11
1.2 Biosíntesis de insulina	12
1.3 Regulación de la secreción de insulina.....	13
1.3.1 Secreción de insulina estimulada por la glucosa.....	14
1.3.1.2 Patrón de secreción de insulina (Dinámica de la secreción de insulina) ...	17
1.3.2 Acción de factores diferentes a la concentración de glucosa sobre la secreción de insulina	19
2. Factores de transcripción que regulan el metabolismo lipídico y glucídico y su relación con la secreción de insulina.....	23
2.1 Receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPARs)	24
2.2 Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs)	26
3. Adaptación/disfunción de la célula β frente a estados de insulino resistencia	27
3.1 Adaptación de la célula β	27
3.1.1 Expansión de la masa de células β	28
3.1.2 Cambios en la función de las células β	28
a) Aumento del metabolismo de la glucosa	29
b) Señales mediadas por ácidos grasos	29
c) Acción de la hormona GLP-1	29
d) Cambios en la actividad simpática y parasimpática	30
3.2 Disfunción de la célula β	30

	Página
3.2.1 Rol de la glucosa y los ácidos grasos en la etiología de la disfunción de la célula β : mecanismos de glucolipototoxicidad	31
4. Modelo de dieta rica en sacarosa	37
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y METODOS	48
1. Animales de experimentación y dietas.....	48
2. Obtención de muestras de sangre y tejidos.....	54
3. Procedimientos experimentales: Métodos analíticos.....	54
3.1 Determinaciones séricas.....	54
3.1.1 Glucosa	54
3.1.2 Insulina	55
3.1.3 Triglicéridos (TG).....	55
3.1.4 Acidos grasos no esterificados (AGNE)	55
3.2 Determinación de triglicéridos hepáticos.....	55
3.3 Estudios “in vivo”.....	56
3.3.1 Capacidad de utilización de la glucosa por los tejidos “in vivo”. Clamp euglucémica-hiperinsulinémica	56
3.4 Determinaciones en islotes pancreáticos.....	56
3.4.1 Aislamiento de islotes pancreáticos.....	56
3.4.2 Secreción de insulina en perfusión de islotes pancreáticos aislados frente al estímulo de la glucosa.....	57
3.4.3 Determinaciones tisulares	58
I) Triglicéridos (TG)	58
II) Actividades enzimáticas.....	58
a) Glucoquinasa (GQ) y hexoquinasa (HQ)	58
b) Complejo piruvato dehidrogenasa (PDHc).....	60
Aislamiento de la enzima fosfoproteína-fosfatasa	60
Extracción y determinación de la actividad PDHc	60
III) Determinación de la masa proteica por la técnica de Western Blot	61

	Página
a) Extracción de proteínas	61
a.1) Transportador de glucosa GLUT 2 y enzimas glucoquinasa (GQ) y hexoquinasa (HQ)	61
a.2) Receptores activadores de la proliferación peroxisomal: PPAR γ y PPAR α ..	62
a.3) Proteína desacoplante UCP 2	62
b) Análisis por western blot	62
b.1) Transportador de glucosa GLUT 2 y enzimas glucoquinasa (GQ) y hexoquinasa (HQ)	62
b.2) Receptores activadores de la proliferación peroxisomal: PPAR γ y PPAR α ..	63
b.3) Proteína desacoplante UCP 2	64
4. Reactivos utilizados.....	65
5. Análisis estadístico de los datos experimentales.....	65
RESULTADOS.....	66
PARTE 1.....	68
1.1 Incremento de peso corporal, ingesta calórica y adiposidad.....	68
1.2 Metabolitos y niveles de insulina en suero, sensibilidad insulínica periférica global (clamp euglucémica-hiperinsulinémica) y contenido de triglicéridos hepáticos.....	71
1.3 Secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa.....	75
PARTE 2: Análisis de algunos mecanismos involucrados en la adaptación/disfunción de la célula β en islotes pancreáticos de animales alimentados con DRS durante 22 días y 240 días. Efecto de los n-3 PUFA...	79
2.1 Contenido de triglicéridos.....	80
2.2 Niveles de la masa proteica del transportador de glucosa GLUT 2.....	81
2.3 Actividad de las enzimas fosforilantes de la glucosa: glucoquinasa y hexoquinasa.....	83
a) Caracterización cinética de las enzimas GQ y HQ	83
b) Actividades GQ y HQ	85
2.4 Niveles de la masa proteica de las enzimas glucoquinasa y hexoquinasa.....	88
2.5 Actividad del complejo piruvato dehidrogenasa (PDHc).....	91
2.6 Niveles de la masa proteica del PPAR γ y PPAR α	91

	Página
2.7 Niveles de la masa proteica de la proteína desacoplante UCP 2.....	95
DISCUSION.....	97
CONCLUSIONES.....	114
BIBLIOGRAFIA.....	116
PUBLICACIONES, PRESENTACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTIFICAS.....	136

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Modelos experimentales de RI y adaptación/disfunción de la célula β	36
Tabla 2. Principales efectos de los n-3 PUFA sobre diferentes componentes del SM.....	44
Tabla 3. Composición de las dietas experimentales	51
Tabla 4. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de las diferentes fuentes de grasa.....	52
Tabla 5. Composición de ácidos grasos (g/100g de dieta) de las diferentes dietas administradas a los animales durante todo el período experimental.....	53
Tabla 6A. Peso corporal, ganancia de peso, ingesta calórica y peso del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) durante 22 días (Protocolo experimental 1).....	69
Tabla 6B. Peso corporal, ganancia de peso, ingesta calórica y peso del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) durante 240 días (Protocolo experimental 2).....	70
Tabla 7A. Metabolitos y niveles de insulina en suero, relación insulina/glucosa y sensibilidad insulínica periférica global (VIG) en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) durante 22 días (Protocolo Experimental1).....	73
Tabla 7B. Metabolitos y niveles de insulina en suero, relación insulina/glucosa y sensibilidad insulínica periférica global (VIG) en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) durante 240 días (Protocolo Experimental 2).....	74

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación hipotética de la evolución de la célula β desde compensación hacia falla frente a un estado de insensibilidad insulínica.....	10
Figura 2. Tipos celulares que componen los islotes de Langerhans.....	11
Figura 3. Vías de biosíntesis de la insulina.....	13
Figura 4. Mecanismos propuestos de secreción de insulina bajo el estímulo de la glucosa.....	17
Figura 5. Posibles vías de metabolización de los ácidos grasos en la célula β pancreática y su influencia sobre la secreción de insulina.....	21
Figura 6. Efectos sobre la secreción de insulina ejercidos por el sistema nervioso autónomo, las hormonas intestinales y los aminoácidos.....	23
Figura 7. Mecanismo de acción de los PPARs en la regulación de la transcripción génica.....	24
Figura 8. Mecanismos propuestos que mediarían la acción de la glucosa sobre el destino de los ácidos grasos y el efecto deletéreo de estos sobre la secreción de insulina en situaciones de hiperglucemia acompañada de hiperlipidemia (glucolipotoxicidad).....	34
Figura 9. Efectos del consumo de sacarosa sobre diversos tejidos claves en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y los lípidos.....	40
Figura 10. Posibles mecanismos mediante los cuales los n-3 PUFA mejorarían las anormalidades metabólicas inducidas por la ingesta de una DRS	45
Figura 11. Diseño experimental	49
Figura 12. Secreción de insulina bajo el estímulo de la glucosa (16,5 mmol/L) en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) durante (A) 22 días (Protocolo Experimental 1) o (B) 240 días (Protocolo Experimental 2).....	76
Figura 13. Contenido de TG en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del período experimental (240 días).....	80

Figura 14. Niveles de la masa proteica del GLUT 2 en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo Experimental 1 (22 días)..... 82

Figura 15. Análisis cinético de las actividades GQ y HQ en la fracción citosólica de islotes pancreáticos aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC)..... 84

Figura 16. Actividad de la enzima glucoquinasa (GQ) en la fracción citosólica de islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo experimental 1 o 2 (22 días o 240 días)..... 86

Figura 17. Relación HQ/GQ en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo experimental 2 (240 días)..... 87

Figura 18. Niveles de la masa proteica de la enzima GQ en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo Experimental 1 o 2 (22 días o 240 días)..... 89

Figura 19. Niveles de la masa proteica de la enzima HQ en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo Experimental 1 o 2 (22 días o 240 días)..... 90

Figura 20. Niveles de la masa proteica del PPAR γ en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo Experimental 1 o 2 (22 días o 240 días)..... 93

Figura 21. Niveles de la masa proteica del PPAR α en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo Experimental 1 o 2 (22 días o 240 días)..... 94

Figura 22. Niveles de la masa proteica de la proteína desacoplante UCP 2 en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo Experimental 2 (240 días)..... **96**

Figura 23. Posibles mecanismos implicados en la disfunción de la célula β en animales alimentados crónicamente con DRS. Efecto de la administración de n-3 PUFA..... **112**

ABREVIATURAS

AC: adenilato ciclasa

ACC: acetil-CoA carboxilasa

Aco: acetilcolina

ACS: acil-CoA sintasa

ADP: adenosina difosfato

AGNE: ácidos grasos no esterificados

AHB: aceite de hígado de bacalao

AM: aceite de maíz

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

AMPK: quinasa activada por AMP

ATP: adenosina trifosfato

CANALES K_{ATP} : canales de K sensibles al ATP

CL: citrato liasa

CPT-1: carnitina palmitoil transferasa 1

CS: citrato sintasa

DAG: diacilglicerol

DC: dieta control

DHA: ácido docosahexanoico

DMNID: diabetes mellitus no insulino dependiente

DRS: dieta rica en sacarosa

DRS+AHB: dieta rica en sacarosa + aceite de hígado de bacalao

EPA: ácido eicosapentanoico

FT: factores de transcripción

GDH: glutamato dehidrogenasa

Ge: proteína G estimuladora **Gi:** proteína G inhibidora

GIP: polipéptido inhibidor gástrico

GLP 1: péptido similar al glucagon tipo 1

GLUT 2: transportador de glucosa 2

GPR 40: receptor acoplado a proteínas G 40

GQ: glucoquinasa

HDLc: lipoproteína de alta densidad-colesterol

HQ: hexoquinasa
HSL: lipasa sensible a hormonas
IP3: inositol 1,4,5-trifosfato
IRS2: receptor del sustrato de la insulina 2
LDH: lactato dehidrogenasa
LDL: lipoproteína de baja densidad
OAA: oxalacetato
PA: ácido fosfatídico
PC: piruvato carboxilasa
PDHc: complejo piruvato dehidrogenasa
PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA: proteinquinasa A
PKC: proteinquinasa C
PLC: fosfolipasa C
PPAR: receptor activador de la proliferación peroxisomal
PPREs: elementos de respuesta a PPAR
PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados
RI: resistencia insulínica
RXR: receptores retinoides X
SHR: ratas espontáneamente hipertensas
SM: síndrome metabólico
SREBPs: proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides
TG: triglicéridos
TZD: tiazolidinedionas
UCP 2: proteína desacoplante 2
VIG: velocidad de infusión de glucosa
VIP: péptido intestinal vasoactivo
VLDL-TG: lipoproteínas de muy baja densidad
ZDF: ratas Zucker obesas y diabéticas
ZF: ratas Zucker obesas

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

En las últimas décadas, el Síndrome Metabólico (SM) -que incluye entre otras patologías la diabetes tipo 2, dislipidemia, intolerancia a la glucosa, hipertensión y obesidad central- ha alcanzado proporciones epidémicas en el mundo entero. Estas enfermedades son la resultante multifactorial de componentes genéticos, fisiológicos, nutricionales y el estilo de vida. Dentro de los factores nutricionales una elevada ingesta de nutrientes tales como hidratos de carbono simples y/o grasas saturadas han demostrado tener una gran influencia en el desarrollo del SM.

La resistencia insulínica (RI) es una anomalía común a todas las patologías incluídas en el SM. En este contexto, la función de la célula β pancreática cumple un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad insulínica, existiendo una relación hiperbólica entre sensibilidad insulínica y secreción de insulina en los individuos normales. Cuando dicha relación se altera, ya sea por factores genéticos o adquiridos, se desarrolla intolerancia a la glucosa y con el tiempo diabetes.

Los mecanismos bioquímicos-moleculares involucrados en la secreción de insulina que conducen a la disfunción de la célula β en estados de insensibilidad insulínica, no están aún completamente dilucidados.

Experimentalmente se han utilizado diferentes modelos animales genéticos y nutricionales para el estudio fisiopatológico de las alteraciones incluídas en el SM. En la presente Tesis utilizamos un modelo no genético de dislipidemia, RI y anormal homeostasis de la glucosa obtenido mediante la administración de una dieta rica en sacarosa (DRS) a ratas normales. El perfil metabólico y hormonal observado en ratas alimentadas con DRS en el corto período de ingesta (3-5 semanas) difiere de aquel que se observa luego de la administración prolongada de la dieta (15-40 semanas). En el corto período de ingesta se observa normoglucemia con hiperinsulinemia que evoluciona con la cronicidad de la dieta a moderada hiperglucemia acompañada de normoinsulinemia, lo que sugiere que una disfunción de la célula β pancreática acompaña al deterioro de la sensibilidad insulínica y dislipidemia. Dentro de este contexto, el *primer objetivo* de esta Tesis fue estudiar a nivel de la célula β pancreática de animales alimentados crónicamente con DRS algunos mecanismos bioquímicos-moleculares involucrados en el progresivo deterioro de la función de la célula β . Particularmente analizamos en islotes pancreáticos aislados de los animales alimentados

con DRS durante 22 días (corto período de ingesta) y 240 días (ingesta crónica): a) transportador GLUT 2, fosforilación y oxidación de la glucosa, b) los niveles de la masa proteica de receptores activadores de la proliferación peroxisomal –PPAR α y γ - (los cuales regulan el metabolismo de la glucosa y los lípidos en el interior de la célula β), c) los niveles de la masa proteica de la proteína desacoplante UCP 2 (proteína que se relaciona de manera inversa con los niveles de ATP y la secreción de insulina), d) el contenido de Triglicéridos (TG) en el interior de la célula β (marcador de lipotoxicidad).

Por otra parte, diferentes estudios epidemiológicos y experimentales han evaluado la posibilidad de introducir modificaciones en las dietas que puedan prevenir o mejorar las alteraciones incluídas en el SM. En este sentido, desde hace ya varios años se ha puesto especial interés en el consumo de ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFA), especialmente en aquellos de origen marino: ácido eicosapentanoico (*EPA* 20:5, n-3) y ácido docosahexanoico (*DHA* 22:6, n-3), debido a los efectos beneficiosos que estos ejercerían sobre diversos procesos fisiológicos y en particular sobre diferentes componentes del SM. Sin embargo, si bien numerosos estudios han evaluado el posible efecto beneficioso de los n-3 PUFA sobre distintos tejidos que son “blanco” de la acción de la insulina, aún no está completamente dilucidado el efecto que tendrían estos ácidos grasos sobre la función de la célula β y regulación de la secreción de insulina. De lo expuesto, el *segundo objetivo* de la presente Tesis fue estudiar algunos mecanismos implicados en el posible efecto beneficioso de la administración de n-3 PUFA dietario (aceite de hígado de bacalao -*AHB*- rico en *EPA* y *DHA*) sobre la disfunción de la célula β inducida por administración crónica de DRS. En el corto plazo (22 días de ingesta) se substituyó parcialmente el tipo de grasa dietaria (aceite de maíz -*AM*- por *AHB*) desde el inicio de la administración de la DRS, mientras que en el largo plazo (240 días), la substitución del tipo de grasa dietaria se llevó a cabo durante los últimos 60 días de ingesta (una vez que la dislipemia y RI permanecieron estables).

Los resultados obtenidos muestran que el patrón de liberación de insulina frente al estímulo de la glucosa se deteriora con la cronicidad de la dieta en los animales alimentados con DRS. En los primeros estadíos de ingesta (22 días) el patrón de secreción de la hormona frente al estímulo de la glucosa muestra un primer pico hipersecretor acompañado de una segunda fase de secreción normal. Durante este período en islotes pancreáticos aislados sólo se pudo observar un incremento en los

niveles de la masa proteica de la enzima glucoquinasa (GQ) y del factor de transcripción PPAR γ . Cuando el período de administración de las dietas se extiende a 240 días, se observa una clara disfunción de la célula β caracterizada por un patrón de secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa con ausencia del primer pico de secreción y una segunda fase hipersecretora. Durante este período, en los islotes pancreáticos, se observa una disminución significativa en la actividad y niveles de la masa proteica de la enzima GQ acompañada de una menor oxidación de la glucosa (disminuída actividad del complejo PDHc), un incremento en el contenido de TG en el interior de la célula β y un significativo incremento en los niveles de la masa proteica del PPAR γ y de la UCP 2 sin cambios en los niveles de la masa proteica del transportador de glucosa GLUT 2 y PPAR α ni en la actividad y niveles de la masa proteica de la enzima hexoquinasa (HQ).

La sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria (AM por AHB) previene o revierte el anormal patrón de liberación de insulina en ambos períodos estudiados (22 días y 240 días). A su vez, en los primeros estadíos de ingesta la adición de aceite de pescado a la dieta logra prevenir el incremento en los niveles de la masa proteica de la GQ en los islotes pancreáticos aislados, sin embargo no modifica los valores hallados en el PPAR γ el cual presenta valores similares al grupo DRS. En el largo plazo, los principales hallazgos obtenidos en los islotes pancreáticos de los animales alimentados con DRS luego de la sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria durante los últimos 60 días de la experiencia fueron: a) normalización de los reducidos niveles de la masa proteica y actividad de la enzima GQ, b) normalización de los elevados niveles de la masa proteica del PPAR γ y la proteína desacoplante UCP 2, sin cambios en los niveles de la masa proteica del PPAR α , c) la actividad de la enzima HQ y niveles de la masa proteica de la HQ y transportador de glucosa GLUT 2 no se modificaron cuando el AHB reemplaza al AM como fuente de grasa dietaria. Además, en concordancia con resultados previos, la presencia de AHB en la dieta fue capaz de normalizar la reducida oxidación de la glucosa (estimada a partir de la actividad PDHc) y el incrementado contenido de TG en el interior de los islotes de los animales alimentados con DRS.

Estos resultados demuestran que la administración de DRS a animales de experimentación impacta sobre la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa a través de diferentes mecanismos según el tiempo durante el cual la dieta es administrada. En los primeros estadíos (22 días) la mayor respuesta de la célula β frente

al estado de RI que logra mantener la normogluceemia estaría dada en parte por un incremento en los niveles de la masa proteica de una enzima clave en la metabolización de la glucosa como es la GQ sumado al incremento en los niveles de la masa proteica del factor de transcripción activado por ácidos grasos PPAR γ , el cual regularía los niveles de expresión de la GQ. La administración crónica de la dieta conduce a un ambiente metabólico y hormonal diferente en el cual sobreviene la hipergluceemia como consecuencia de una profunda disfunción de la célula β . Entre los mecanismos de glucolipototoxicidad que podrían estar implicados durante este período se encuentran una reducida fosforilación y oxidación de la glucosa, incremento en el acúmulo de TG intracelulares y mayor contenido proteico del factor de transcripción PPAR γ y de la proteína desacoplante UCP 2.

La adición de n-3 PUFA impacta de manera positiva sobre la función de la célula β y secreción de insulina en ambos períodos. El presente trabajo de Tesis sugiere algunos mecanismos implicados en el posible efecto beneficioso del aceite de pescado sobre la prevención y reversión/mejora de la disfunción de la célula β en ratas alimentadas con DRS entre los que se incluyen: la normalización de los niveles de la masa proteica y actividad de la enzima GQ, la reducción de los niveles de la masa proteica del factor de transcripción PPAR γ y de la proteína desacoplante UCP 2. Además el aceite de pescado reduce el contenido de triglicéridos en el interior de los islotes pancreáticos y normaliza la deteriorada oxidación de la glucosa. Estos efectos estarían involucrados, al menos en parte, en la normalización de la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa en el modelo nutricional de dislipemia y RI inducido por administración de una dieta rica en sacarosa.

SUMMARY

Over the last decades, Metabolic Syndrome (MS) – which includes among other pathologies type 2 diabetes, dyslipidemia, glucose intolerance, hypertension and central obesity – has reached epidemic proportions worldwide. These diseases are the multifactorial result of genetics, physiological and nutritional components and lifestyle. Among the nutritional factors, a high intake of nutrients such as simple carbohydrates and/or saturated fat have been shown to have a major influence in the development of the MS.

Insulin resistance (IR) is a common abnormality to the pathologies including in the MS. In this regard, pancreatic β cell function plays a key role in maintaining glucose homeostasis and insulin sensitivity, and there is a hyperbolic relationship between insulin sensitivity and insulin secretion in normal subjects. When this relationship is altered, either by genetic or acquired factors, develops glucose intolerance and eventually diabetes.

Biochemical-molecular mechanisms involved in insulin secretion leading to β cell dysfunction in states of insulin insensitivity are not yet fully elucidated.

Different genetic and nutritional animals models have been used experimentally to study the pathophysiologic abnormalities included in the MS. In this Thesis we used a non genetic model of dyslipidemia, IR and abnormal glucose homeostasis obtained by administering a sucrose rich diet (SRD) to normal rats. The metabolic and hormonal profile observed in rats fed the SRD in the short period of intake (3-5 weeks) differs from that observed after prolonged administration of the diet (15-40 weeks). In the short period of intake we observed normoglycemia with hiperinsulinemia that evolve to moderate hyperglycemia accompanied by normoinsulinemia with the length of time the diet is consumed, suggesting that pancreatic β cell dysfunction accompanying deterioration of insulin sensitivity and dyslipidemia. Within this context, the *first objective* of this Thesis was to study some biochemical-molecular mechanisms involved in the progressive deterioration of β cell function in pancreatic β cells from animals fed chronically with SRD. Particularly we analyze in isolated pancreatic islets of animals that receive SRD for 22 days (short intake) and 240 days (chronic ingestion): a) glucose transport, phosphorylation and oxidation, b) peroxisome proliferator-activated receptors – PPAR γ y α – protein mass levels (which regulate the metabolism of glucose and lipids

within the β cell), c) UCP 2 protein mass levels (a protein that inversely correlates with ATP levels and insulin secretion), d) triglyceride (TG) content within the β cell (lipotoxicity marker).

Moreover, different epidemiological and experimental studies have evaluated the possibility of introducing changes in diets that can prevent or improve the abnormalities included in the MS. In this regard, for the past several years has placed special emphasis on the consumption of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) especially those of marine origin: eicosapentaenoic acid (*EPA* 20:5, n-3) and docosahexaenoic acid (*DHA* 22:6, n-3), due to these exert beneficial effects on various physiological processes and in particular on different components of MS. However, although numerous studies have evaluated the potential beneficial effects of n-3 PUFA on different tissues that are "target" of insulin action, the effect of those fatty acids upon β cell function and regulation of insulin secretion is not yet fully elucidated. From the above, the *second objective* of this Thesis was to study some mechanisms involved in the possible beneficial effect of the administration of dietary n-3 PUFA (cod liver oil -CLO- rich in EPA and DHA) upon the β cell dysfunction induced by chronic administration of a SRD. In the short term (22 days of intake) the type of dietary fat was partially substituted (corn oil-CO-by CLO) from the start of the SRD administration, while in the long term (240 days), the replacement of dietary fat type was carried out during the last 60 days of intake (once dyslipidemia and IR remained stable).

The results show that glucose-stimulated insulin secretion pattern deteriorates in SRD fed animals with the length of time the diet is consumed. In the early stages of intake (22 days) the pattern of hormone secretion under the stimulus of glucose shows a hypersecretory first peak accompanied by a normal secretion in the second phase. During this period we observed an increase in protein mass levels of both glucokinase (GK) enzyme and PPAR γ transcription factor in isolated pancreatic islets. When the period of diets administration extends to 240 days, we observed a markedly β -cell dysfunction characterized by a glucose-stimulated insulin secretion pattern with absence of the first peak and a hypersecretory second phase. At this time, in isolated pancreatic islets, we observed a significant decrease of GK activity and its protein mass levels accompanied by a reduced glucose oxidation (decreased PDHc activity), an increase in TG content within the β cell and a significant increase of both PPAR γ and UCP 2

protein mass levels without changes in glucose transporter GLUT 2 and PPAR α protein mass levels or in the activity and protein mass levels of HK enzyme.

Partial substitution of the source of dietary fat (CO by CLO) prevents or reverses the abnormal pattern of insulin release in both study periods (22 days and 240 days). In the early stages of intake the addition of fish oil to the diet can prevent the increase in GQ protein mass levels in the isolated pancreatic islets, however does not change the values found in the PPAR γ which shows similar values to the SRD group. In the long term, the major findings obtained in pancreatic islets of SRD fed animals after partial substitution of the source of dietary fat in the last 60 days of the experiment were: a) normalizing of both the observed reduced GK activity and the protein mass levels, b) normalizing of elevated protein mass levels of PPAR γ and uncoupling protein UCP 2, without changes in protein mass levels of PPAR α , c) The activity of HK and the protein mass levels of both HK and glucose transporter GLUT 2 were not modified when CLO replaced CO as a source of dietary fat. In addition, and confirming previous results, the presence of CLO in the diet was able to both normalize glucose oxidation (estimated by the activity of PDH complex) and the TG content within the islets of SRD fed animals.

These results demonstrate that SRD administration to experimental animals impact on glucose-stimulated insulin secretion by different mechanisms depending on the time on diet. In the early stage (22 days), the increased β cell response in the setting of IR that can maintain normoglycemia would be in part the result of both an increase in protein mass levels of glucose metabolism key enzyme GK and in protein mass levels of fatty acids activated transcription factor PPAR γ - that could influence the GK mass expression-. Chronic administration of the diet leads to a different metabolic and hormonal environment in which hyperglycemia occurs due to a markedly β -cell dysfunction. Among the glucolipotoxicity mechanisms that might be involved in this period we could mention a reduced glucose phosphorylation and oxidation, an increase in TG content within the cells and an increase in the protein content of the transcription factor PPAR γ and the uncoupling protein UCP 2.

The addition of n-3 PUFA positively impacts on β -cell function and insulin secretion in both periods. This thesis work suggests that some of the possible mechanisms concerning the beneficial effects of fish oil on the prevention and reversal/improvement

of β -cell dysfunction in SRD fed rats involved: a normalization of the protein mass level and enzymatic activity of GK and a down regulation of transcription factor PPAR γ and uncoupling protein UCP 2 protein mass levels. In addition, fish oil was able to reduce triglyceride content within the pancreatic islets and normalizes the impaired glucose oxidation. These effects are at least in part involved in the normalization of glucose-stimulated insulin secretion in this nutritional model of dyslipemia and IR induced by administration of a sucrose-rich diet.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

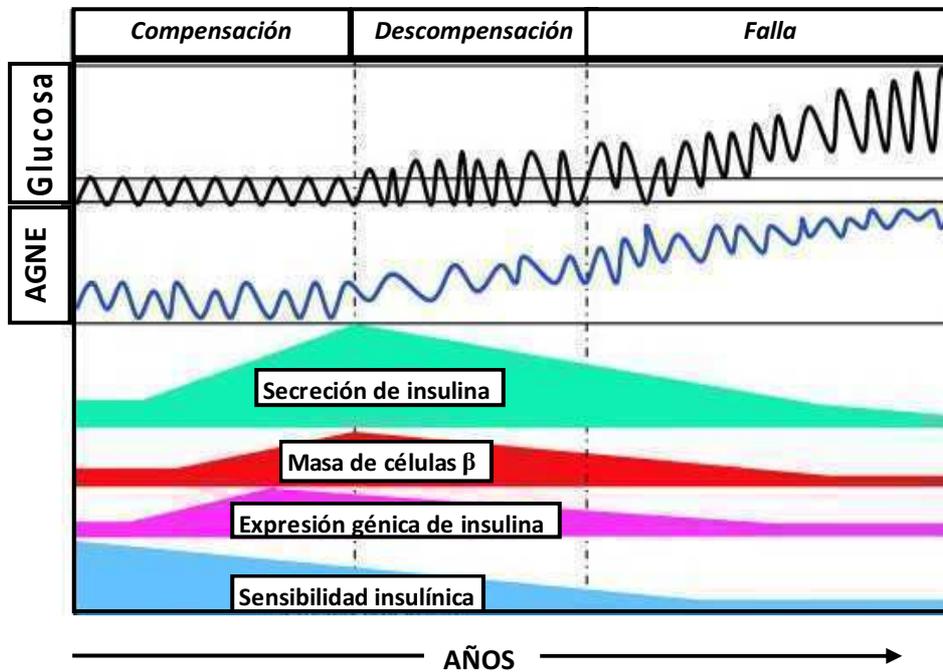
El estilo de vida actual, caracterizado por reducida actividad física y una elevada ingesta de nutrientes (principalmente excesivo consumo de bebidas conteniendo jarabe de fructosa o sacarosa, alimentos ricos en carbohidratos simples como la sacarosa y la fructosa o grasas principalmente saturadas) ha llevado a un alarmante incremento de patologías asociadas al denominado “Síndrome Metabólico” (SM) entre las que se incluyen la diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID) o diabetes tipo 2, las dislipidemias (incremento de triglicéridos y/o colesterol), intolerancia a la glucosa, hipertensión, obesidad central, etc. (Cheal y col., 2004). El conjunto de disturbios metabólicos que constituyen el SM son todos factores de riesgo de enfermedad cardiovascular y presentan una anomalía común a todos ellos: *la resistencia insulínica (RI)*.

La función de la célula β pancreática cumple un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y sensibilidad insulínica. En individuos sanos existe una relación hiperbólica entre sensibilidad insulínica y secreción de insulina, de manera que cambios en la sensibilidad insulínica se acompañan de cambios recíprocos en la secreción de insulina (Kahn y col., 1993).

Por ello frente a un estado de resistencia a la insulina la célula β es capaz de generar una respuesta compensadora caracterizada por una hipersecreción de la hormona a fin de mantener la normogluceemia. Sin embargo, cuando esta respuesta compensadora falla (debido a factores genéticos o adquiridos) se desarrolla intolerancia a la glucosa y más tarde diabetes (**Figura 1**).

Los mecanismos bioquímicos-moleculares involucrados en la secreción de insulina que conducen a la disfunción de la célula β en estados de insensibilidad insulínica, como ocurre en situaciones de anormal homeostasis de la glucosa, dislipidemia, glucolipototoxicidad y diabetes tipo 2 no están aún completamente dilucidados.

Figura 1. Representación hipotética de la evolución de la célula β desde compensación hacia falla frente a un estado de insensibilidad insulínica.¹



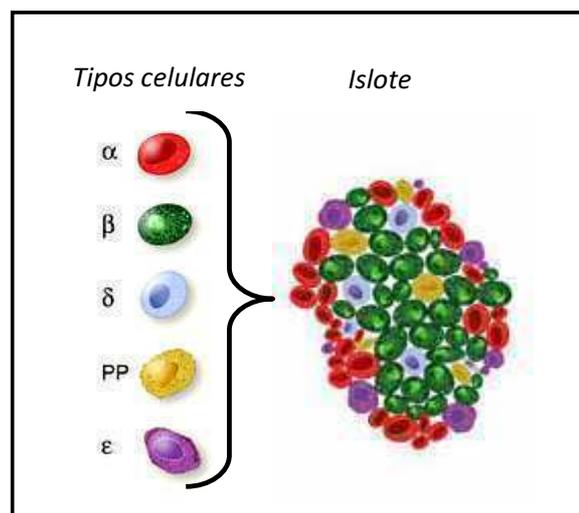
¹La figura muestra las variaciones en los niveles plasmáticos de glucosa y AGNE (ácidos grasos no esterificados) y en la masa y función de la célula β que caracterizan a los estadios de compensación, descompensación y falla de la célula β . Frente a un estado de insensibilidad insulínica se generan una serie de cambios a nivel de la célula β para hacer frente a la mayor demanda de la hormona, entre los que se incluye un incremento en la secreción de insulina, en la masa de células β y en la expresión del gen de la insulina (compensación). Cuando la respuesta compensadora falla, los niveles de glucosa plasmáticos se elevan por encima del rango normal los cuales junto con los elevados niveles de ácidos grasos no esterificados (AGNE) resultan tóxicos para la célula β . Este período se acompaña de una disminución de la secreción de insulina, de la expresión del gen de la insulina y de la masa de células β . Finalmente se produce la falla de la célula β , la hiperglucemia se hace sostenida y se acompaña de un deterioro de los parámetros mencionados. (Modificada de Poitout y col., 2010).

1. PANCREAS ENDOCRINO: CARACTERISTICAS GENERALES DE LA BIOSINTESIS Y SECRECION DE INSULINA.

1.1 Islotes pancreáticos

El páncreas cumple un rol clave en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos. La unidad anátomo funcional del páncreas endócrino son los *islotes de Langerhans* los cuales constituyen el 1-3 % de la masa pancreática total. Se encuentran distribuidos en todo el páncreas pero son más abundantes en la cola que en el cuerpo y la cabeza. En los humanos existen 1 a 2 millones de islotes y cada uno contiene aproximadamente unas 1000 células. Las células de los islotes secretan diferentes hormonas que llegan a la vena porta hepática. Entre las células insulares de los mamíferos los cuatro tipos principales son: las células α (productoras de glucagon), las β (productoras de insulina), las δ (productoras de somatostatina) y las PP (productoras de polipéptido pancreático). Recientemente se ha identificado una pequeña población de células en el islote que se han llamado células ϵ (productoras de ghrelina) (Islam, 2010). Las células β son las más comunes y representan 60-75% de las células en los islotes, se ubican en el centro del islote y están rodeadas por células no β (**Figura 2**).

Figura 2. Tipos celulares que componen los islotes de Langerhans.¹



¹Figura representativa que muestra los diferentes tipos de células que conforman los islotes de Langerhans y su disposición en el interior del islote. (Modificada de Beta Cell Biology Consortium (BCBC)-Ilustración de Cartellier, 2005).

En estudios experimentales se ha evidenciado que la población de estas células dentro del páncreas adulto es dinámica y responde a demandas metabólicas con cambios en su masa y su función. La masa celular β puede modificarse mediante la cantidad o el tamaño de las células. En este sentido, se ha visto que existen 3 mecanismos mediante los cuales se puede modificar la cantidad de células β : neogénesis, replicación y apoptosis (Weir y col., 2009).

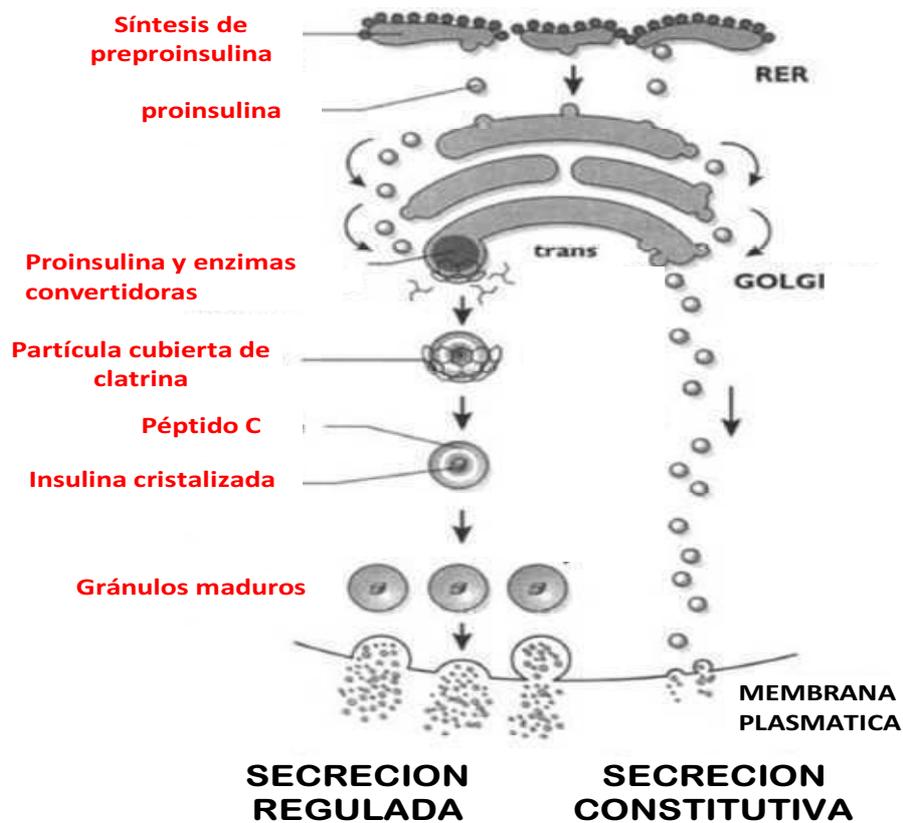
Las células β son las únicas del cuerpo que producen una cantidad significativa de insulina, hormona vital que ejerce un control crítico sobre el metabolismo corporal. Los efectos fisiológicos de la insulina son de largo alcance y complejos. Si bien la acción más conocida de esta hormona es su efecto *hipoglucémico*, existen efectos adicionales sobre los transportes de aminoácidos, electrolitos, actividades enzimáticas y sobre el crecimiento.

1.2 Biosíntesis de insulina.

La producción de insulina por parte de las células β del páncreas es un proceso crucial para el mantenimiento de la normoglucemia y es regulada por los niveles de glucosa sanguíneos tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Andrali y col., 2008).

Al igual que otras hormonas polipeptídicas la insulina se sintetiza como una preprohormona más grande (PREPROINSULINA) a partir de la cual se forma la PROINSULINA que consta de 2 cadenas polipeptídicas A y B unidas por puentes disulfuro y por un segmento peptídico (PEPTIDO C) (Ganong, 2000). La proinsulina es envuelta en gránulos inmaduros de fina cubierta de clatrina y dentro de éstos, por la acción de endopeptidasas, es procesada a insulina y péptido C los cuales se liberan en cantidades equimolares. Además alrededor de 2-4% de la inmunorreactividad de la insulina secretada consiste en proinsulina y péptidos relacionados con ésta (Weir y col., 2009). Los gránulos con insulina cristalizada pueden permanecer en un sitio de almacenamiento, ser degradados por crinofagia o ser secretados. Aunque gran parte de la insulina producida se secreta mediante una vía regulada, una pequeña cantidad puede liberarse en microvesículas por la vía de secreción constitutiva (**Figura 3**).

Figura 3. Vías de biosíntesis de la insulina.¹



¹ Esquema representativo de los eventos involucrados en la biosíntesis de insulina. Más detalles se describen en la página 12 del texto. (Modificada de Steiner y col., 2011).

1.3 Regulación de la secreción de insulina

Bajo condiciones fisiológicas la concentración de glucosa sanguínea fluctúa dentro de un rango muy estrecho gracias a un efectivo sistema hormonal que actúa sobre los órganos encargados del almacenamiento y producción de este metabolito. Si bien varias hormonas contribuyen al mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, la insulina es la única hormona que puede prevenir eficientemente elevaciones exageradas en los niveles de glucosa sanguíneos. Debido a esto, la secreción de la hormona por parte de las células β del páncreas es un proceso altamente regulado.

Los factores que pueden afectar la secreción de insulina son numerosos y han sido objeto de estudio desde hace varias décadas. *Joslin y col. (1994)* dividieron los factores

en 2 categorías: iniciadores y potenciadores. Los *iniciadores o estímulo primario* son aquellos capaces de incrementar la secreción de insulina en ausencia de cualquier otro agente (D-glucosa, D-gliceraldehido, D-manosa, L-leucina, entre otros). Mientras que, los *potenciadores o estímulo secundario*, son aquellos que son inefectivos por sí solos pero en presencia de un iniciador (particularmente glucosa) pueden incrementar la secreción de insulina. Entre ellos se encuentran: los ácidos grasos, ciertos aminoácidos, hormonas intestinales, neurotransmisores del sistema nervioso simpático y parasimpático.

1.3.1 Secreción de insulina estimulada por la glucosa.

Como mencionamos anteriormente, si bien una amplia variedad de factores pueden afectar la secreción de insulina, el control principal está dado por el efecto de retroalimentación de la glucosa plasmática que se ejerce directamente sobre las células β del páncreas. Se dice que la glucosa es el principal regulador de la secreción de la hormona al punto tal que es considerada el único iniciador fisiológico de la secreción de insulina en mamíferos. En este sentido, se ha demostrado en estudios *in vitro* utilizando islotes o páncreas perifundidos que la glucosa tiene un efecto estimulador incluso al estar presente en concentraciones dentro del rango fisiológico. Además, se ha visto que confiere la capacidad de aumentar la secreción de la hormona a aquellos agentes que no son efectivos por sí solos o poseen baja efectividad, tales como los aminoácidos, ácidos grasos, entre otros (Joslin y col., 1994).

Las células β poseen una diferenciación única que les permite vincular los valores fisiológicos de glucosa con señales metabólicas y fisiológicas que controlan la liberación de insulina. Se dice que se comportan como “sensores de glucosa” adaptando la velocidad de secreción de la hormona según los niveles de glucosa plasmáticos existentes.

Todos aquellos eventos que ocurren en el interior de la célula β luego de la exposición a un estímulo (glucosa) y que conducen finalmente a la liberación de la hormona (insulina) hacia el medio extracelular se conocen como acoplamiento estímulo-secreción, y las señales que se generan durante el mismo y que son críticas para una normal liberación de insulina se denominan en conjunto “factores de acoplamiento metabólico”.

Los mecanismos implicados en este fenómeno han sido ampliamente estudiados desde hace 50 años empleando ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*. Actualmente se sabe que la glucosa induce la secreción de insulina a través de 3 vías diferentes que se resumen en **la Figura 4**. Cuando los niveles de glucosa extracelular se elevan, la hexosa es transportada hacia el interior de la célula β a través de un transportador facultativo que permite un rápido equilibrio entre las concentraciones de este metabolito en los medios intra y extracelular. En los roedores el ingreso de glucosa se realiza a través del transportador GLUT 2 mientras que en las células β humanas predomina el transportador de glucosa GLUT 1 (De Vos y col., 1995). Inmediatamente se produce la fosforilación de la glucosa, reacción que es mediada por 2 enzimas: glucoquinasa y hexoquinasa. En extractos de islotes pancreáticos aproximadamente un 75% de la fosforilación de la glucosa se atribuye a la enzima hexoquinasa, sin embargo en células intactas la hexoquinasa es severamente inhibida por la glucosa-6-fosfato, de manera que en estas circunstancias la glucoquinasa juega un rol preponderante (Joslin y col., 1994). La glucoquinasa es estructural y funcionalmente diferente a la hexoquinasa. Esta enzima no es inhibida por los niveles de glucosa-6-fosfato que existen en condiciones fisiológicas y además posee baja afinidad por la glucosa actuando a concentraciones de glucosa cercanas a 10 mmol/L (rango de las variaciones fisiológicas de la glucemia). Por su especificidad y características cinéticas la glucoquinasa se dice que actúa como “sensor” de los niveles de glucosa adaptando la velocidad de secreción de insulina según la demanda (Matschinsky y col., 1993).

La glucosa es metabolizada hasta llegar a la formación de piruvato, el cual sigue un destino principalmente mitocondrial ya que las células β poseen muy baja actividad lactato dehidrogenasa (LDH). Finalmente el complejo enzimático piruvato dehidrogenasa (PDHc) actúa sobre el piruvato promoviendo la formación de acetil-CoA el cual ingresa en el ciclo de Krebs y es oxidado a CO_2 y H_2O (Nolan y Prentki, 2008) **(Figura 4)**.

Como consecuencia del metabolismo de la glucosa se generan 3 respuestas diferentes:

(1) Aumenta la proporción ATP/ADP en la célula β , lo que provoca el cierre de canales de K^+ sensibles al ATP (K_{ATP}) que se encuentran en la membrana de la célula. La disminución de la salida de K^+ despolariza la membrana de la célula β provocando la apertura de canales de Ca^{++} sensibles al voltaje. De ésta manera el Ca^{++} ingresa a la célula y el incremento del calcio intracelular desencadena la liberación de insulina

mediante exocitosis. Esta secuencia de eventos iónicos es conocida como **vía de señalización dependiente de canales K_{ATP} o efectos “iónicos de la glucosa”**.

(2) Cuando los niveles de Ca^{++} están elevados la glucosa puede ejercer un efecto insulínico incrementando la exocitosis desencadenada por el Ca^{++} , independientemente de su acción sobre los canales K_{ATP} . Esta vía de señalización es conocida como vía **independiente de canales K_{ATP} , dependiente del Ca^{++}** .

(3) Cuando la proteinquinasa C (PKC) y la adenilato ciclasa son activadas, la glucosa es capaz de estimular la secreción de insulina a través de una vía conocida como **vía de señalización independiente de canales K_{ATP} y de Ca^{++}** . Esta vía sería particularmente operativa en el estado postprandial cuando los niveles de incretinas se encuentran elevados y activan las proteinquinasas.

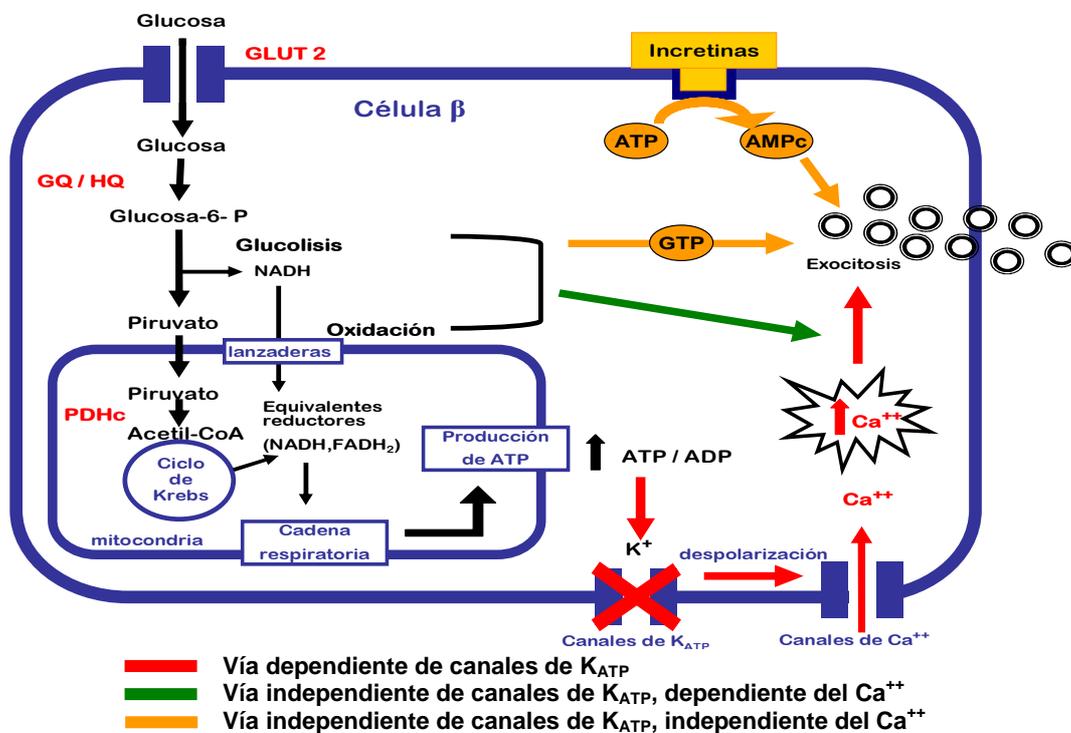
Las últimas dos respuestas se conocen como “*efectos no iónicos de la glucosa*” (Aizawa y col., 1998) y si bien se ha visto que son tan relevantes para una normal secreción de insulina como lo son los eventos “iónicos” aún no están completamente esclarecidos los mecanismos implicados en cada una de ellas.

Diferentes autores han propuesto que la vía anaplerótica jugaría un rol clave en la amplificación de la secreción de insulina estimulada por la glucosa. En este sentido, se ha visto que la enzima anaplerótica piruvato carboxilasa (PC) es inusualmente activa en la célula β al punto tal que un 50% del piruvato es metabolizado por la vía de la PDH y el otro 50% por la vía de la PC (Liu y col., 2002; MacDonald y col., 2005). Siguiendo esta vía, los secretagogos de la insulina, al ser metabolizados en la célula β , proveen no sólo energía (ATP) sino que además aportan intermediarios del ciclo del ácido cítrico (anaplerosis). Si bien el ATP es el único factor mitocondrial que se sabe con certeza acopla el metabolismo con la exocitosis de insulina, diferentes estudios han demostrado en los últimos años la existencia de otros factores mitocondriales que actuarían concomitantemente con el ATP para estimular o acrecentar la secreción de insulina (MacDonald y col., 2005). MacDonald y col. (2005) han propuesto que la mayoría de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico serían exportados al citosol (cataplerosis) donde estarían involucrados en las señales implicadas en las vías de disparo, potenciación o sostén de la secreción de insulina. Además, según estos autores la formación y exportación de los productos de la anaplerosis desde la mitocondria hacia

el citosol es tan importante para la secreción de insulina como lo es la producción de energía.

Si bien los mecanismos de acción de los productos de la anaplerosis no están aún del todo claros, se ha propuesto que la vía anaplerótica puede afectar la secreción de insulina incrementando los niveles de moléculas de señal derivadas del metabolismo tales como el NADPH derivado de la actividad de la lanzadera de malato-piruvato, el citrato, el glutamato y moléculas lipídicas originadas en la vía malonil-CoA/acil-CoA de cadena larga, entre otras (Nolan y col., 2006a).

Figura 4. Mecanismos propuestos de secreción de insulina bajo el estímulo de la glucosa.¹



¹En la figura se muestra de manera resumida las diferentes vías mediante las cuales la glucosa conduciría a la liberación de insulina descritas detalladamente en las páginas 15 a 17 del texto. GQ: glucoquinasa, HQ: hexoquinasa, PDHc: complejo enzimático piruvato dehidrogenasa. (Modificada de Aizawa y col., 1998).

1.3.1.2 Patrón de secreción de insulina (Dinámica de la secreción de insulina)

La secreción de insulina depende no sólo de la concentración de glucosa sino también de la velocidad con que se modifica esa concentración. Cuando los niveles de glucosa se incrementan lentamente, la velocidad de secreción de la hormona aumenta en paralelo.

Sin embargo, cuando la concentración de glucosa aumenta de manera abrupta, la secreción de insulina muestra un *patrón bifásico*. La *primera fase* esta dada por un aumento rápido y marcado pero transitorio en la velocidad de secreción mientras que la *segunda fase* se caracteriza por un aumento gradual en la velocidad de secreción o por una secreción baja y estable dependiendo de la especie en estudio (ratas o ratones respectivamente). La duración de la segunda fase se extiende hasta tanto permanezca el estímulo (Joslin y col., 1994).

Actualmente se sabe que las células β pancreáticas contienen diferentes pools de gránulos secretores de insulina que difieren en cuanto a su capacidad de liberación de la hormona, entre los que se encuentran un pool “de reserva”, un pool “de liberación rápida”, un pool “de liberación inmediata”, entre otros. La activación de la *vía dependiente de canales K_{ATP}* provoca la exocitosis del pool de liberación inmediata el cual es responsable de la primera fase de secreción de insulina estimulada por la glucosa. Por su parte, la segunda fase de secreción se da principalmente como resultado de la acción de la *vía independiente de canales K_{ATP}* e involucra la liberación de la insulina contenida en gránulos de reserva (Straub y Sharp, 2002). Entre los intermediarios que regularían la segunda fase de secreción se pueden mencionar incrementos en los niveles de acil-CoA de cadena larga, ATP, GTP, ciertas proteinquinasas y proteínas involucradas en la maquinaria de exocitosis (Straub y Sharp, 2002).

Otra característica normal de la secreción de insulina es su liberación en forma pulsátil. En seres humanos, los pulsos tienen lugar cada 10 minutos. Después de una ingesta de glucosa se ve un incremento tanto en la amplitud de los mismos como en su frecuencia. Los mecanismos que controlan la secreción pulsátil no están del todo claros, pero se ha sugerido que la oscilación metabólica de la glucólisis u oscilaciones en la concentración de Ca^{++} citosólico podrían jugar un papel clave. Por otra parte, el sistema nervioso autónomo también participaría en la regulación de la modalidad pulsátil de la secreción de la insulina (Weir y col., 2009).

La liberación pulsátil aumenta la eficacia de la acción hipoglucemiante de la hormona, ya que se ha visto que la cantidad de insulina requerida para lograr una determinada hipoglucemia es mayor cuando se la administra en forma continua que en forma pulsátil. Esta mayor efectividad se relaciona con el efecto de retroalimentación negativa

de la insulina sobre sus receptores, que es menor en la modalidad pulsátil (Gagliardino, 2000).

1.3.2 Acción de factores diferentes a la concentración de glucosa sobre la secreción de insulina

Los *ácidos grasos* constituyen una importante fuente de energía para la mayoría de los tejidos, particularmente durante períodos de ayuno. Estos nutrientes, tienen además la capacidad de actuar en vías de señalización involucradas en diferentes procesos celulares entre los que se incluye la secreción de insulina estimulada por la glucosa.

Los ácidos grasos que ingresan a la célula β pueden seguir diferentes vías que conducirían a una modificación de la secreción de insulina (**Figura 5**). El metabolismo de los ácidos grasos está regulado por la disponibilidad de sustrato. En el estado de ayuno, son convertidos en acil-CoA de cadena larga e ingresan a la mitocondria vía carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1), allí son oxidados siguiendo la vía de la β oxidación mitocondrial contribuyendo de esta manera a la producción de energía (ATP). Se ha visto que en el estado de ayuno, los ácidos grasos se convierten en un metabolito indispensable para mantener la secreción de insulina en sus niveles basales (McGarry y Dobbins, 1999).

Luego de la ingesta, la oxidación de los ácidos grasos es inhibida, en un proceso mediado por los niveles regulatorios de “malonil-CoA”. El malonil-CoA es sintetizado a partir de los grupos acetatos derivados del citrato, el cual se encuentra elevado bajo estas circunstancias. Este metabolito inhibe la enzima CPT-1 bloqueando el transporte de acil-CoA de cadena larga hacia el interior de la mitocondria. El acúmulo de acil-CoA de cadena larga en el citosol conduce a un incremento en los niveles de diacilglicerol (DAG) y ácido fosfatídico. Los elevados niveles de acil-CoA y de moléculas lipídicas derivadas conllevan a su vez a un aumento en los niveles de Ca^{++} intracelulares, a la activación de enzimas claves como la proteinquinasa C (PKC) y provocan cambios en el estado de acilación de proteínas involucradas en la regulación de la actividad de canales iónicos y en la exocitosis. Además los acil-CoA pueden actuar directamente sobre el proceso de exocitosis al facilitar la fusión de los gránulos secretores de insulina a la membrana plasmática (Newsholme y Krause, 2012).

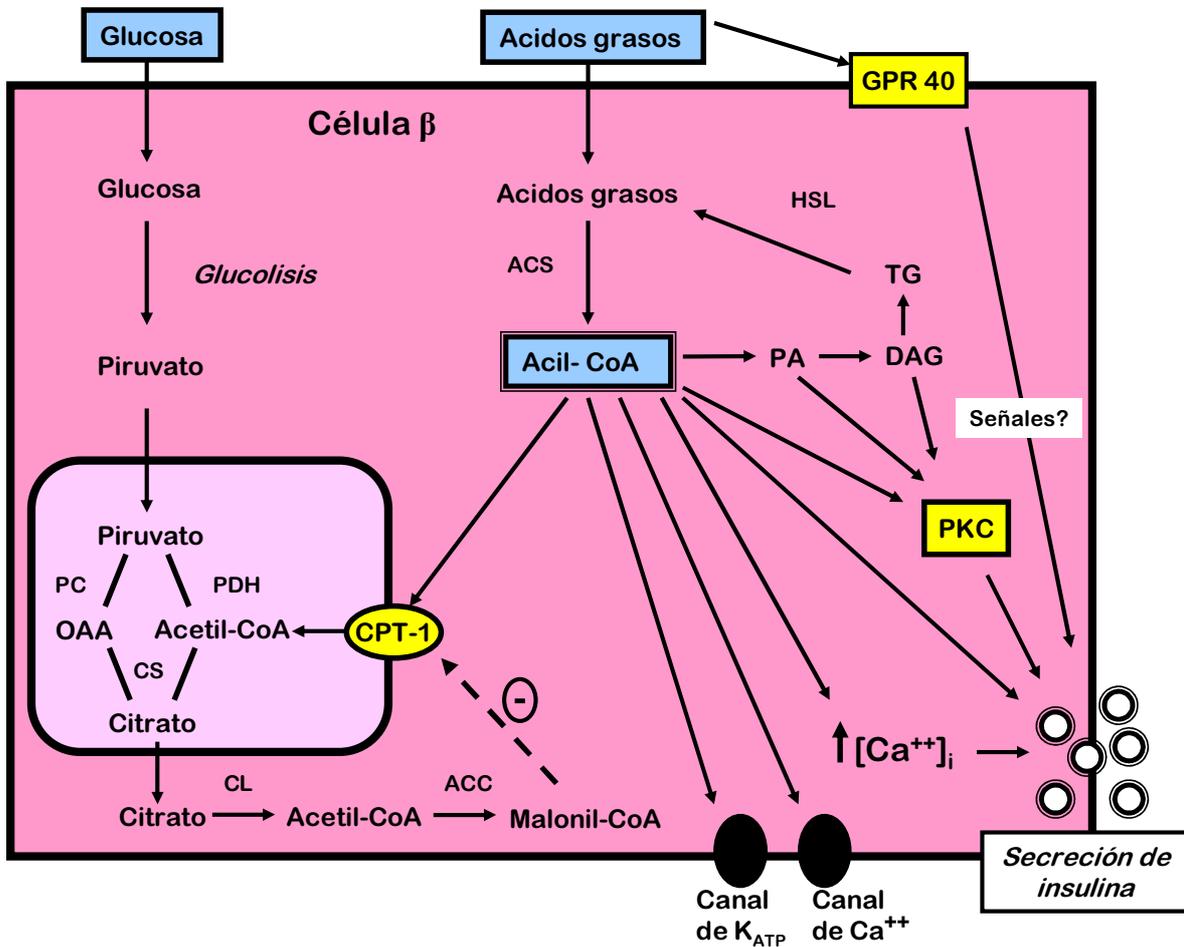
El cambio de sustrato (ácidos grasos-glucosa) para la oxidación permite controlar la producción de ATP y es un evento regulado por la quinasa activada por AMP (AMPK). Se sugiere que esta quinasa actúa como un “sensor” del estado energético celular siendo activada frente a un incremento en la relación AMP/ATP. Al ser activada, estimula los procesos involucrados en la producción celular de energía y a su vez reduce el consumo de energía, contribuyendo de esta manera a restablecer los niveles de ATP (Hardie, 2003). En la célula β la actividad de la AMPK se correlaciona de manera inversa con la concentración de glucosa (Salt y col., 1998), y se ha visto que es estimulada en islotes pancreáticos cultivados en presencia de palmitato (Wang y col., 2007).

Esta enzima regulatoria inhibe la producción de malonil-CoA favoreciendo la oxidación de los ácidos grasos y, a largo plazo, controla la expresión de factores de transcripción implicados en la regulación de enzimas glicolíticas y lipogénicas.

La esterificación de los acil-CoA de cadena larga con producción de triglicéridos (TG) es un proceso que también puede ocurrir en la célula β . En este sentido, Nolan y col. (2006b) han propuesto la existencia de un ciclo TG/ácidos grasos que jugaría un rol clave en la amplificación de la secreción de insulina estimulada por la glucosa. A su vez, Mulder, (2004) observó que una reducción en los niveles de TG endógenos y/o la inhibición de la lipólisis de éstos suprime la secreción de insulina estimulada por la glucosa, lo que sugiere que a partir de la lipólisis se generarían moléculas lipídicas de señal que optimizarían la secreción de insulina.

Finalmente, estudios recientes han demostrado que los ácidos grasos exógenos también pueden regular la secreción de insulina actuando sobre un receptor ubicado en la membrana de la célula β acoplado a proteínas G. El receptor acoplado a proteínas G 40 (GPR 40) es activado por ácidos grasos de cadena media a larga (Briscoe y col., 2003) y su activación causaría un aumento en los niveles de Ca^{++} intracelulares lo que conduciría a un incremento de la secreción de insulina (Schnell y col., 2007).

Figura 5. Posibles vías de metabolización de los ácidos grasos en la célula β pancreática y su influencia sobre la secreción de insulina.¹



¹La figura muestra las diferentes vías mediante las cuales los ácidos grasos podrían regular la secreción de insulina. Más detalles se describen en las páginas 19 y 20 del texto. **PC**: piruvato carboxilasa, **PDH**: piruvato dehidrogenasa, **OAA**: oxalacetato, **CS**: citrato sintasa, **CL**: citrato liasa, **ACC**: acetil-CoA carboxilasa, **CPT-1**: carnitina palmitoil transferasa-1, **ACS**: acil-CoA sintasa, **PA**: ácido fosfatídico, **DAG**: diacilglicerol, **TG**: triglicéridos, **HSL**: lipasa sensible a hormonas, **PKC**: proteinquinasa C, **GPR 40**: receptor de ácidos grasos acoplado a proteínas G 40. (Modificada de Poitout, 2003 y Newsholme y col., 2007).

Diferentes estudios han demostrado que la acción de los ácidos grasos sobre la secreción de insulina depende del grado de saturación de los mismos y del tiempo durante el cual la célula β está expuesta a ellos. Stein y col. (1997) examinaron la influencia de ácidos grasos individuales sobre la secreción de insulina en páncreas de ratas perifundidos. Según estos autores, cuando la exposición de la célula β a altos

niveles de ácidos grasos ocurre durante un corto período de tiempo (exposición aguda) se observa un efecto insulinoatrópico que se potencia al aumentar el largo de la cadena y el grado de saturación. Por el contrario, cuando la exposición es prolongada (exposición crónica) Zhou y Grill, (1994) encontraron en islotes de ratas Sprague-Dawley cultivados durante 48 horas en presencia de diferentes ácidos grasos y elevados niveles de glucosa (27mM), que el efecto neto es una inhibición de la secreción de insulina estimulada por la glucosa.

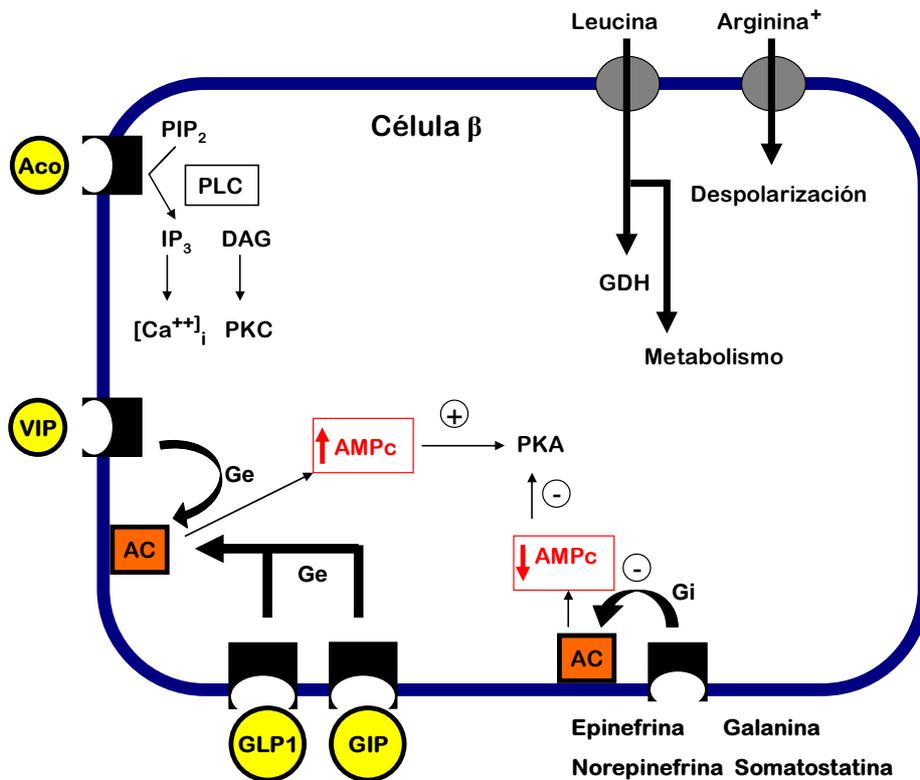
Otros factores que pueden tener efecto sobre la secreción de insulina y función de la célula β son los *aminoácidos*. En este sentido McClenaghan, (2007) ha descrito algunos posibles mecanismos mediante los cuales los aminoácidos ejercerían su efecto insulinoatrópico entre los que se incluyen la generación de intermediarios metabólicos y la despolarización directa o indirecta de la membrana plasmática de la célula β .

Por otra parte, las señales intracelulares como el AMPc, DAG e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) generadas por *hormonas o neurotransmisores* son también importantes para la regulación de la secreción de insulina (vías de amplificación/atenuación neurohormonal).

Estas moléculas pueden amplificar la secreción de insulina que se dispara frente a un estímulo primario como la glucosa, a través de varios mecanismos entre los que se incluyen el aumento del influjo de Ca^{++} a través de la membrana y la sensibilización de la maquinaria secretora frente a los niveles de Ca^{++} existentes (Joslin y col., 1994).

La **Figura 6** muestra de manera resumida los principales mecanismos por los cuales los aminoácidos, las hormonas intestinales y neurotransmisores del sistema nervioso autónomo regulan la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa.

Figura 6. Efectos sobre la secreción de insulina ejercidos por el sistema nervioso autónomo, las hormonas intestinales y los aminoácidos.¹



¹La figura muestra las vías de amplificación/atenuación neurohormonal y el efecto de algunos aminoácidos sobre la secreción de insulina. Más detalles se describen en la página 22 del texto. AC: adenilato ciclasa, Aco: acetilcolina, DAG: diacilglicerol, GIP: polipéptido inhibidor gástrico, GLP 1: péptido similar al glucagon tipo 1, Ge: proteína G estimuladora, Gi: proteína G inhibidora, GDH: glutamato dehidrogenasa, IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato, PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, PLC: fosfolipasa C, PKC: proteinquinasa C, PKA: proteinquinasa A, VIP: péptido intestinal vasoactivo. (Modificado de Weir y col., 2009).

2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN QUE REGULAN EL METABOLISMO LIPÍDICO Y GLUCÍDICO Y SU RELACION CON LA SECRECIÓN DE INSULINA.

La célula beta pancreática contiene una serie de factores de transcripción (FT) implicados en la regulación de la secreción de insulina. Estos FT pueden ejercer su efecto sobre la

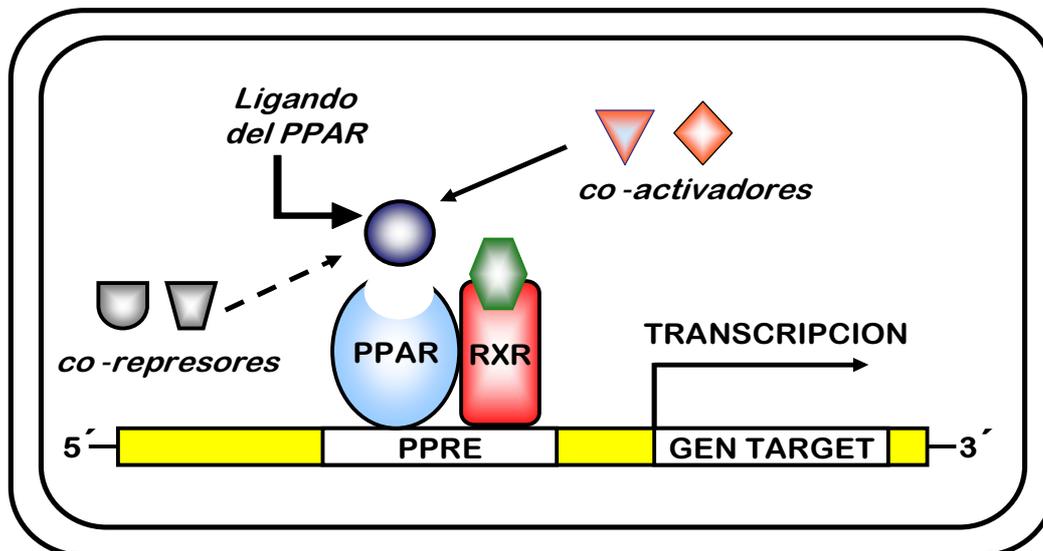
secreción de insulina ya sea actuando sobre la relación sensibilidad insulínica-secreción de insulina o directamente sobre los islotes.

En los últimos años han cobrado gran importancia particularmente aquellos FT que modulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico y glucídico en la célula β . A continuación se mencionan aquellos FT a los cuales se les ha asignado un rol clave en la modulación de la secreción de insulina tanto en situaciones fisiológicas como patológicas.

2.1. *Receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPARs)*

Los PPARs forman parte de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas y regulan la expresión de genes en respuesta a ligandos específicos. Estos FT se unen a regiones del ADN denominadas elementos de respuesta a PPAR (PPREs) y, al igual que otros receptores nucleares, lo hacen formando heterodímeros con los receptores retinoides X (RXR). Además, los PPARs forman complejos proteína-proteína con diversas proteínas nucleares que actúan como co-activadores o co-represores, activando o inhibiendo respectivamente la expresión de determinados genes (**Figura 7**).

Figura 7. Mecanismo de acción de los PPARs en la regulación de la transcripción génica.¹



¹La figura muestra los mecanismos propuestos de activación y represión de los genes target de los PPAR. **PPAR**: receptores activadores de la proliferación peroxisomal, **RXR**: receptores retinoides X, **PPRE**: elemento de respuesta a PPAR. (Modificado de Venkatachalam y col., 2009).

Los PPARs han sido implicados tanto en el control de la homeostasis de la glucosa y los lípidos como así también de los procesos de diferenciación y proliferación celular. Hasta el momento, se han identificado 3 isoformas las cuales han sido designadas PPAR α , PPAR δ (también llamado PPAR β) y PPAR γ (Rosen y Spiegelman, 2001). Las células β pancreáticas expresan las 3 isoformas (Zhou y col., 1998; Ravnskjaer, 2010).

Los PPARs pueden ser activados tanto por ligandos naturales como sintéticos. Los ácidos grasos de cadena larga polinsaturados (ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido eicosapentanoico, etc.) son los ligandos naturales de los PPARs, aunque algunos ácidos grasos saturados y eicosanoides también pueden actuar como ligandos. Por su parte, los miembros de la familia de las tiazolidinedionas (TZD) y los fibratos actúan como ligandos sintéticos del PPAR γ y PPAR α respectivamente (Varga y col., 2011; Wahli y Michalik, 2012).

Estudios llevados a cabo en islotes pancreáticos han demostrado que tanto la glucosa como los ácidos grasos son capaces de regular la expresión del PPAR α . En este sentido, se ha visto en islotes pancreáticos de ratas normales cultivados en presencia de elevados niveles de ácidos grasos, que éstos son capaces de inducir la expresión del PPAR α (Zhou y col., 1998) mientras que una exposición a elevados niveles de glucosa *in vitro* o la hiperglucemia *in vivo* (islotes de ratas parcialmente pancreatectomizadas) suprimen la expresión de este FT (Roduit y col., 2000; Laybutt y col., 2002). La activación del PPAR α en los islotes se acompañaría de un incremento de enzimas involucradas en la lipólisis. De esta manera, se ha sugerido que durante períodos de ayuno donde los niveles de glucosa son bajos, los ácidos grasos estimularían la expresión del PPAR α favoreciendo la β oxidación de los lípidos a fin de mantener los niveles de ATP intracelulares y la normal secreción de insulina. En otras palabras, el PPAR α jugaría un rol importante en el mantenimiento de la capacidad secretora durante los períodos de ayuno. Por el contrario, luego de la ingesta, cuando los niveles de glucosa se elevan, la reducción de la actividad del PPAR α conduciría a la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos permitiendo una eficiente secreción de insulina dependiente del metabolismo de la glucosa (Fatehi- Hassanabad y Chan, 2005).

El PPAR γ sería también un regulador importante del metabolismo en la célula β pancreática. A diferencia de lo expuesto para el PPAR α , no está claro si la glucosa o los

ácidos grasos serían quienes inducirían la expresión de este FT ya que los resultados obtenidos son contradictorios. En este sentido, Laybutt y col., (2002) encontraron un incremento del ARNm del PPAR γ en islotes de ratas pancreatectomizadas hiperglucémicas. Sin embargo, Patanè y col., (2002) observaron una sobreexpresión de los niveles de PPAR γ en islotes cultivados en presencia de altos niveles de ácidos grasos, mientras que no registraron cambios en los niveles del FT en islotes expuestos a elevados niveles de glucosa.

Se ha propuesto que este subtipo de PPAR cumpliría funciones similares a las que desarrolla en el tejido adiposo, estimulando la lipogénesis y el depósito de grasas (Ravnskjaer y col., 2005). Por otra parte, se ha visto que el PPAR γ es capaz de regular la expresión de los componentes del mecanismo sensor de glucosa de la célula β : GLUT 2 y glucoquinasa. En este sentido, estudios llevados a cabo en líneas celulares β han demostrado que la exposición a agonistas del PPAR γ (troglitazona, rosiglitazona), conduce a un incremento de la expresión génica tanto del GLUT 2 como de la glucoquinasa (Kim y col., 2002; Kim y col., 2008).

El PPAR δ actuaría como un sensor de ácidos grasos regulando la oxidación mitocondrial, proceso clave para el normal funcionamiento de la célula β y secreción de insulina. Ravnskjaer y col. (2010) encontraron que la activación del PPAR δ en células productoras de insulina se asocia a un incremento en la capacidad de oxidación de ácidos grasos y un aumento en la secreción de insulina estimulada por la glucosa.

2.2 Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs)

Los SREBPs son factores de transcripción que pertenecen a la familia de proteínas cuya estructura se denomina “dedos de zinc”. Son sintetizados en forma de moléculas precursoras las cuales permanecen ancladas a la membrana del retículo endoplasmático. El dominio amino terminal corresponde a la región transcripcionalmente activa de la molécula la cual debe ser liberada mediante un proceso de clivaje para dirigirse al núcleo donde activará la expresión de sus genes target. Existen 3 isoformas de SREBPs denominadas SREBP-1a, -1c y -2. El SREBP-1 regula fundamentalmente la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos mientras que el SREBP-2 activa preferentemente genes involucrados en la síntesis de colesterol (Shimano, 2001).

El SREBP-1c ha sido detectado en las células β pancreáticas (Kakuma y col., 2000), sin embargo su nivel de expresión es muy bajo en condiciones fisiológicas. Por este motivo, ha resultado dificultoso establecer el rol del SREBP-1c en la función de la célula β pancreática y su posible implicancia en la secreción de insulina. A pesar de ello, diferentes estudios proponen que este FT tendría una función en la regulación de la lipogénesis de las células β , mientras que su posible efecto sobre la expresión de enzimas glucolíticas ha llevado a resultados contradictorios. Por otra parte, se ha demostrado que el SREBP-1c actuaría como regulador de la apoptosis de la célula β pancreática (Wang y col., 2003; Diraison y col., 2004).

3. ADAPTACION / DISFUNCION DE LA CELULA β FRENTE A ESTADOS DE INSULINO RESISTENCIA.

En las últimas décadas numerosos modelos experimentales de resistencia insulínica han sido diseñados en animales con el fin de dilucidar los mecanismos bioquímicos - moleculares involucrados en los procesos de adaptación/disfunción de la célula β asociados a ese estado de RI. Además el cultivo de islotes pancreáticos y líneas celulares secretoras de insulina ha contribuído enormemente a ampliar el conocimiento de los posibles mecanismos que estarían implicados en el deterioro de la secreción de insulina.

3.1 Adaptación de la célula β

La célula β pancreática normalmente posee la capacidad de responder a estados de insulino resistencia incrementando la velocidad de secreción de insulina a través de un proceso denominado “compensación”, el cual le permite mantener la normoglucemia. Los mecanismos involucrados en la compensación no están del todo claros, sin embargo diferentes estudios han demostrado que tanto un aumento en *la masa de células β* como un incremento en su *función* son importantes (Steil y col., 2001; Chen y col., 1994a).

3.1.1 Expansión de la masa de células β

La *expansión de la masa de células β* estaría mediada por factores encargados de promover la neogénesis, proliferación e hiperplasia y/o de prevenir la atrofia y apoptosis (mecanismos implicados en la regulación de la masa de células β).

Al respecto, existen diferentes modelos animales de RI que muestran un aumento en la masa de células β asociado a un incremento en la secreción de insulina como mecanismo de compensación. En este sentido, Sone y Kagawa, (2005) encontraron un aumento en la masa de células β asociado a un aumento en la proliferación celular en un modelo nutricional de RI inducido por administración de una dieta rica en grasas (durante 4 meses) a ratones C56BL/ 6J. Por otra parte, Pick y col., (1998) encontraron en ratas Zucker obesas (ZF), un modelo genético de obesidad y RI, un incremento en la masa de células β acompañado de un aumento en la proliferación, neogénesis e hipertrofia de estas células.

Entre los factores estimulantes de la respuesta compensadora se incluyen un incrementado aporte de nutrientes (particularmente glucosa y ácidos grasos), la insulina y otros factores de crecimiento y un aumento en la sensibilidad y en los niveles de incretinas (Prentki y Nolan, 2006).

Weir y Bonner-Weir (2007) han propuesto que la glucosa tendría un rol dominante en la inducción de la expansión de la masa de células β asociada a estados de RI, sin embargo los mecanismo implicados no están aun completamente esclarecidos. En este sentido, Terauchi y col., (2007) encontraron en ratones alimentados con una dieta rica en grasa que tanto la enzima glucoquinasa como el receptor del sustrato de la insulina 2 (IRS2) serían mediadores claves del efecto de la glucosa sobre la inducción de la hiperplasia de células β asociada a este modelo de RI. La importancia del IRS2 sobre la regulación del crecimiento y supervivencia de las células β ha sido puesta de manifiesto en diferentes estudios experimentales (Rhodes, 2005).

3.1.2 Cambios en la función de las células β

Cambios en la *función de las células β* como mecanismo compensatorio se han observado en diferentes modelos animales de insulino resistencia (Chen y col., 1994a; Liu y col., 2002; Maiztegui y col., 2009). Entre las alteraciones a nivel funcional se pueden mencionar: a) aumento del metabolismo y oxidación de la glucosa (procesos claves en la vía de disparo de la secreción de insulina estimulada por la glucosa), b)

señales mediadas por ácidos grasos, c) acción de la hormona GLP-1 (incretinas), d) cambios en la actividad simpática y parasimpática (Prentki y Nolan, 2006).

a) Aumento del metabolismo de la glucosa

Diferentes autores han encontrado un incremento en el metabolismo y oxidación de la glucosa como mecanismo compensatorio frente a estados de RI. En este sentido, estudios llevados a cabo en islotes pancreáticos de ratas Zucker obesas insulinoresistentes, demostraron un aumento en la utilización y oxidación de la glucosa. Esto se acompañó de un incremento de las enzimas y metabolitos involucrados en la anaplerosis y de la actividad de las lanzaderas malato-piruvato y citrato-piruvato (Liu y col., 2002). Por otra parte, se han evidenciado en diferentes modelos experimentales de RI aumentos significativos tanto en la actividad y/o expresión de la enzima glucoquinasa como en el transportador de glucosa GLUT 2 (componentes del mecanismo sensor de glucosa de la célula β) (Chen y col., 1994a; Chen y col., 1994b; Maiztegui y col., 2009).

b) Señales mediadas por ácidos grasos

Normalmente los estados de RI se acompañan de un incremento en los niveles de ácidos grasos circulantes y de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-TG), de manera que la concentración de ácidos grasos en la vecindad de las células β es elevada. Por otra parte, la célula β también puede nutrirse de ácidos grasos endógenos, a través de la lipólisis de los TG intracelulares. Nolan y col. (2006b) han propuesto que el ciclo TG / ácidos grasos sería particularmente operativo en el mecanismo de compensación. Al respecto, en ratas ZF se observó un aumento en la esterificación, lipólisis y oxidación de ácidos grasos como eventos involucrados en el mecanismo de compensación en respuesta a la insulino resistencia (Nolan y col., 2006b).

c) Acción de la hormona GLP-1

La incretina GLP-1 no sólo está involucrada en promover el crecimiento y desarrollo de las células β sino que además es capaz de afectar la funcionalidad de estas células. En este sentido, Van Citters y col. (2002) encontraron en un modelo canino de RI inducido por administración de una dieta grasa, un incremento tanto de los niveles circulantes de GLP-1 como de su receptor pancreático. Estos autores han propuesto que en este modelo la acción de la incretina jugaría un rol clave en el proceso de compensación. Por

otra parte Nolan y col. (2006b) encontraron que los efectos de los ácidos grasos libres y la incretina GLP-1 se sinergizan para aumentar la secreción de insulina estimulada por la glucosa en situaciones de RI.

d) Cambios en la actividad simpática y parasimpática

Cambios en la actividad del sistema nervioso autónomo se han relacionado con alteraciones de la secreción de insulina estimulada por la glucosa en estados de RI. Cruciani-Guglielmacci y col. (2005) encontraron en ratas insulinoresistentes alimentadas durante 2 días con dieta rica en grasa un incremento en la secreción de insulina estimulada por la glucosa que estaría relacionado, al menos en parte, a una disminución en el tono simpático. Por otra parte, Magnan y col. (1999) estudiaron el rol del sistema nervioso autónomo sobre la secreción de insulina en ratas expuestas a elevados niveles de ácidos grasos libres por infusión durante 48 hs de una emulsión grasa (Intralipid). Estos animales mostraron al término de la infusión un incremento notable en la secreción de insulina estimulada por la glucosa acompañada de una reducción de la actividad nerviosa simpática.

Los cambios funcionales mencionados se acompañan de un aumento concomitante en la *biosíntesis de insulina*, necesario para satisfacer la elevada demanda de la hormona.

Los mecanismos involucrados en la estimulación de la biosíntesis de insulina en esta etapa no han sido completamente dilucidados. En este sentido, se ha visto que tanto la glucosa como la incretina GLP-1 serían los principales estímulos involucrados en la activación de la transcripción génica de la insulina en la etapa compensatoria. Por otra parte, la regulación de la biosíntesis de la hormona estaría dada también a nivel postranslacional (Prentki y Nolan, 2006).

3.2 Disfunción de la célula β

En los primeros estadios de la etapa de descompensación la hiperglucemia posprandial es la primer evidencia de la existencia de un disturbio en la homeostasis de la glucosa.

Si bien los mecanismos que conducirían a la falla de la célula β no han sido completamente dilucidados y son actualmente objeto de numerosos estudios, Prentki y Nolan (2006) han propuesto que existirían mecanismos que tendrían un rol “*iniciador*”

de la disfunción mientras que una vez establecida la hiperglucemia actuarían mecanismos adicionales que conducirían a una severa disfunción de la célula β y finalmente al desarrollo de la diabetes tipo 2.

Poitout y Robertson (2008) han propuesto que pequeños episodios transitorios de hiperglucemia serían suficientes para alterar el metabolismo intracelular en la célula β cuando aumenta el flujo de ácidos grasos hacia ella.

3.2.1 Rol de la glucosa y los ácidos grasos en la etiología de la disfunción de la célula β : mecanismos de glucolipotoxicidad.

Tanto la glucosa como los ácidos grasos pueden ejercer efectos beneficiosos (adaptativos) o perjudiciales (tóxicos) sobre la célula β dependiendo de su concentración y el tiempo durante el cual permanecen elevados.

El término “toxicidad” hace referencia al daño que producen en ciertas circunstancias la glucosa y los lípidos que ingresan o son sintetizados en el interior de los tejidos. En el caso particular de la célula β inicialmente se hablaba de “glucotoxicidad” y “lipotoxicidad” como fenómenos que ocurrían por separado. Se proponía que el efecto tóxico de la glucosa estaba dado por una continua sobreestimulación de la célula β por parte de la hexosa que llevaba a una depleción de las reservas de insulina conduciendo a hiperglucemia y deterioro de la función de la célula β . Por otra parte se proponía que la exposición de la célula β pancreática a elevados niveles de lípidos también era perjudicial para su función (Poitout y Robertson, 2008).

Más adelante, Prentki y col. (2002) introdujeron el término “glucolipotoxicidad”. Actualmente la teoría de “glucolipotoxicidad” es la más aceptada para explicar el efecto deletéreo de la glucosa y los lípidos sobre la función y/o supervivencia de la célula β .

Según estos autores los elevados niveles de glucosa (sin un aumento concomitante en los niveles de lípidos) no son muy tóxicos para la célula β ya que ésta se adapta a través de cambios en la expresión de genes (particularmente los involucrados en la vía glucolítica y anaplerótica) manteniendo una elevada oxidación de la glucosa y anaplerosis/cataplerosis. De igual manera la presencia de elevados niveles de ácidos grasos tampoco resulta tóxico ya que estos son oxidados. En consecuencia, según la teoría de glucolipotoxicidad, la presencia de hiperglucemia es un prerequisite para que ocurra una alterada distribución de lípidos (lipotoxicidad) en el interior de la célula β (Prentki y col., 2002).

El problema surge entonces cuando frente a un estado de RI, existen largos episodios de hiperglucemia posprandial o sostenida junto a elevados niveles de TG y ácidos grasos circulantes. En estas circunstancias, en estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, se han encontrado numerosas alteraciones en la célula β que podrían formar parte de los mecanismos bioquímicos-moleculares de glucolipototoxicidad que conducirían a la falla de la célula β . Entre las alteraciones halladas podemos mencionar: a) cambios en el transporte, fosforilación y oxidación de la glucosa (Thorens y col., 1992; Lee y col., 1994; Zhou y col., 1996; Man y col., 1997), b) incremento en el contenido de TG en el interior de la célula β (Lee y col., 1997; Man y col., 1997), c) cambios en la expresión de factores de transcripción relacionados con el control del metabolismo y/o supervivencia celular (Zhou y col., 1998; Kakuma y col., 2000; Patanè y col., 2002), d) disfunción mitocondrial y stress oxidativo (Zhang y col., 2001; Patanè y col., 2002; Robertson, 2004), e) O-glicosilación de proteínas, (Robertson, 2004), f) activación de vías inflamatorias (Ehse y col., 2007; Donath y col., 2008), g) depósito de amiloides (O'Brien y col., 1993), entre otros.

Estas alteraciones pueden conducir no solo al deterioro en la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa, sino también a la disminución de la expresión del gen de la insulina y finalmente a la muerte celular por apoptosis (Poitout y col., 2010).

El efecto permisivo de la glucosa sobre la acción deletérea de los ácidos grasos radica en la capacidad que tiene la hexosa de regular el metabolismo intracelular de los lípidos. Bajo condiciones de glucolipototoxicidad, la glucosa dirige el exceso de ácidos grasos hacia la lipogénesis y esterificación (Prentki, 2002) lo que resulta en un acúmulo de TG en la célula β . Si bien numerosos estudios han comprobado que el acúmulo de TG en la célula β tiene efectos negativos sobre su función, se ha propuesto que es poco probable que esto constituya por sí mismo un mecanismo de glucolipototoxicidad puesto que representa una forma de almacenamiento de grasa relativamente inocua. De este modo el acúmulo de TG sería más bien un “marcador” o “señal” de lipotoxicidad.

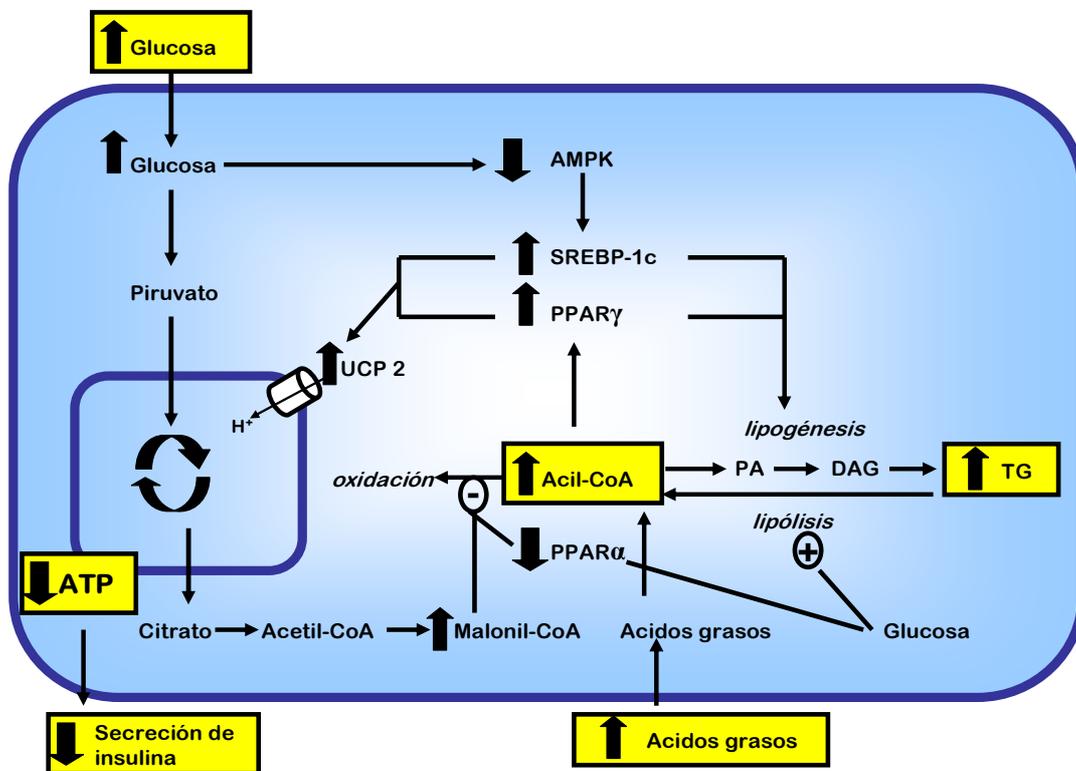
Como mencionamos anteriormente un ciclo TG/ácidos grasos acelerado llevaría a la liberación de moléculas lipídicas derivadas del proceso de esterificación y lipólisis las que serían en realidad las responsables del deterioro. Si bien la naturaleza de los derivados lipídicos son mayoritariamente desconocidas se ha propuesto que intermediarios de la vía de esterificación (ácido fosfatídico, ácido lisofosfatídico, DAG)

y síntesis de ceramidas podrían estar involucrados (Prentki y col., 2002; Boslem y col., 2012).

Por otra parte, algunos autores han propuesto que cambios coordinados en la señalización metabólica y en la expresión génica mediarían la acción de la glucosa sobre el destino de los ácidos grasos y el efecto deletéreo de estos sobre la secreción de insulina. Según esta teoría estarían involucradas la proteína AMPK, los receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPAR γ – PPAR α) y la proteína desacoplante UCP 2, entre otros factores (Poitout, 2004; Prentki et al., 2002) (**Figura 8**).

Diferentes estudios han demostrado que los ácidos grasos son capaces de incrementar la expresión de la proteína desacoplante UCP 2 en la célula β (Chan y col., 2001; Patanè y col., 2002). La UCP 2 es una proteína transportadora ubicada en la membrana mitocondrial que desacopla la síntesis de ATP de la cadena respiratoria. Si bien su función biológica no es bien conocida estudios recientes llevados a cabo en islotes aislados de ratas y líneas celulares β han sugerido que la UCP 2 modularía la secreción de insulina. En este sentido cabe mencionar que si bien el aumento en los niveles de expresión de esta proteína transportadora se ha asociado principalmente a un deterioro en la secreción de insulina (Zhang y col., 2001; Chan y col., 2004), el papel que juega la UCP 2 en la célula β es controvertido. Estudios recientes llevados a cabo en ratones transgénicos que sobreexpresaban la proteína desacoplante UCP 2 de la célula β demostraron que un aumento en su expresión no alteraría la función mitocondrial ni la secreción de insulina sino que estaría asociada con la disminución de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Produit-Zengaffinen y col., 2007).

Figura 8. Mecanismos propuestos que mediarían la acción de la glucosa sobre el destino de los ácidos grasos y el efecto deletéreo de estos sobre la secreción de insulina en situaciones de hiperglucemia acompañada de hiperlipidemia (glucolipototoxicidad).¹



¹La figura muestra algunos mecanismos propuestos de glucolipototoxicidad de la célula β . Cuando los niveles de glucosa y ácidos grasos plasmáticos se elevan simultáneamente y de forma crónica, la glucosa dirige el exceso de ácidos grasos hacia la lipogénesis en un proceso mediado por la AMPK y el SREBP-1c. A su vez, la glucosa estimula la lipólisis de los TG intracelulares lo que incrementa los niveles de acil-CoA. Puesto que la oxidación de los ácidos grasos se encuentra bloqueada (debido a los elevados niveles de malonil-CoA y al descenso del PPAR α), el incremento de acil-CoA estimula la expresión del PPAR γ y SREBP-1c los cuales inducen la expresión de la UCP 2. Esto conduce a una reducción en la producción de ATP y menor secreción de insulina.

AMPK: proteína quinasa activada por AMP, **SREBP-1c:** proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1-c, **PPARs:** receptores activadores de la proliferación peroxisomal, **PA:** ácido fosfatídico, **DAG:** diacilglicerol, **TG:** triglicéridos, **UCP 2:** proteína desacoplante 2. (Figura adaptada de Prentki y col., 2002; Poitout, 2004 y Poitout y col., 2010)

La **Tabla 1** muestra algunos de los modelos experimentales de RI más utilizados para el estudio de los mecanismos de adaptación/disfunción de la célula β y las principales alteraciones halladas en cada uno de ellos a nivel pancreático. Aspectos de algunos de ellos han sido mencionados previamente. Cabe destacar que la mayoría de los estudios han sido llevados a cabo en islotes cultivados en presencia de elevados niveles de glucosa y/o ácidos grasos.

Tabla 1. Modelos experimentales de RI y adaptación/disfunción de la célula β .

A) MODELOS EXPERIMENTALES GENETICOS	Características del modelo	Alteraciones halladas a nivel de célula β	Referencias
1. Ratas Zucker obesas (ZF- ZDF)	Modelo de RI asociado a obesidad Las ratas ZDF desarrollan diabetes	secreción de insulina estimulada por la glucosa incrementada (ZF) masa de células β incrementada (ZF) oxidación y utilización de glucosa incrementadas(ZF) vía anaplerótica incrementada(ZF) lipólisis, esterificación y oxidación de ácidos grasos incrementada (ZF)	<i>Pick y col. (1998)</i> <i>Liu y col. (2002)</i> <i>Nolan y col. (2006b)</i>
		secreción de insulina estimulada por la glucosa inhibida (ZDF) transportador de glucosa GLUT 2 disminuido (ZDF) acúmulo de TG (ZDF) actividad de enzimas lipogénicas incrementada (ZDF) RNAm PPAR γ incrementado, RNAm PPAR α disminuido (ZDF) RNAm SREBP-1c incrementado (ZDF) masa de células β disminuida (ZDF)	<i>Lee y col. (1994)</i> <i>Lee y col. (1997)</i> <i>Zhou y col. (1998)</i> <i>Kakuma y col. (2000)</i>
2. Ratas OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty)	Modelo de diabetes tipo II	deterioro en la secreción de insulina estimulada por la glucosa acúmulo de Tg en islotes actividad de la enzima GQ disminuida	<i>Man y col. (1997)</i>
3. Ratón ob/ob	Modelo de RI y diabetes tipo II	deterioro en la secreción de insulina estimulada por la glucosa UCP2 (ARNm y proteína) incrementados	<i>Saleh y col. (2006)</i> <i>Zhang y col. (2001)</i>
4. Ratón db/db	Modelo de diabetes tipo II	deterioro en la secreción de insulina estimulada por la glucosa expresión del transportador de glucosa GLUT2 disminuida actividad de la enzima PDH disminuida incremento de células inmunes (macrófagos) en islotes	<i>Thorens B y col. (1992)</i> <i>Zhou y col. (1996)</i> <i>Ehses y col. (2007)</i>
5. Ratas espontáneamente hipertensivas (SHR)	Modelo de RI con normoglucemia	secreción de insulina estimulada por la glucosa incrementada actividad catalítica de la enzima GQ aumentada expresión del transportador de glucosa GLUT2 aumentada	<i>Chen y col. (1994b)</i>
B) MODELOS EXPERIMENTALES NUTRICIONALES	Características del modelo	Alteraciones halladas a nivel de célula β	Referencias
1. Modelo de dietas ricas en grasas saturadas (50-60% de la energía total)	Modelo de hiperglucemia, hiperinsulinemia, RI	deterioro en la secreción de insulina estimulada por la glucosa deterioro en la expresión génica de la insulina hiperinervación de islotes pancreáticos incremento del receptor de GLP-1 incremento de células inmunes (macrófagos) en islotes	<i>Winzell y col. (2004)</i> <i>Ahren y col. (1999)</i> <i>Van Citters y col. (2002)</i> <i>Ehses y col. (2007)</i>
2. Modelo de dietas ricas en hidratos de carbono	Modelo de RI	secreción de insulina estimulada por la glucosa incrementada* actividad y expresión de la masa proteica de GQ incrementada* * Fructosa 10% en agua de bebida-3 semanas	<i>Maiztegui y col. (2009)</i>

4. MODELO DE DIETA RICA EN SACAROSA.

La administración de una dieta rica en sacarosa (DRS) (~ 60-65 % de la energía total) a roedores normales representa un modelo experimental no genético de dislipidemia, adiposidad visceral, RI y disfunción de la célula β que se asemeja en muchos aspectos bioquímicos – metabólicos a los descriptos en el “Síndrome Metabólico” en humanos.

En los últimos años estudios de nuestro laboratorio han demostrado que el perfil metabólico y hormonal que se observa al administrar una DRS a roedores normales depende de la cantidad y del tiempo durante el cual la sacarosa es administrada (Gutman y col., 1987; Chicco y col., 1994; Lombardo y col., 1996a; Soria y col., 2001). De esta manera, se ha visto que el modelo evoluciona con la cronicidad de la dieta atravesando 3 períodos secuenciales: (i) *Período de inducción* (3-5 semanas), caracterizado por la presencia de dislipidemia (incremento de AGNE y TG plasmáticos), normoglucemia con hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa y resistencia insulínica periférica global; (ii) *Período de adaptación* (5-8 semanas), donde se constata una normalización de los parámetros antes mencionados; (iii) *Período de recurrencia* (13-15 semanas continuando al menos hasta 40 semanas de ingesta) en el cual la dislipidemia se acompaña de moderada hiperglucemia con normoinsulinemia y un marcado deterioro de la sensibilidad insulínica y tolerancia a la glucosa.

El consumo crónico de la DRS conduce a un moderado incremento del peso corporal de los animales que se asocia a un incremento en el índice de adiposidad visceral.

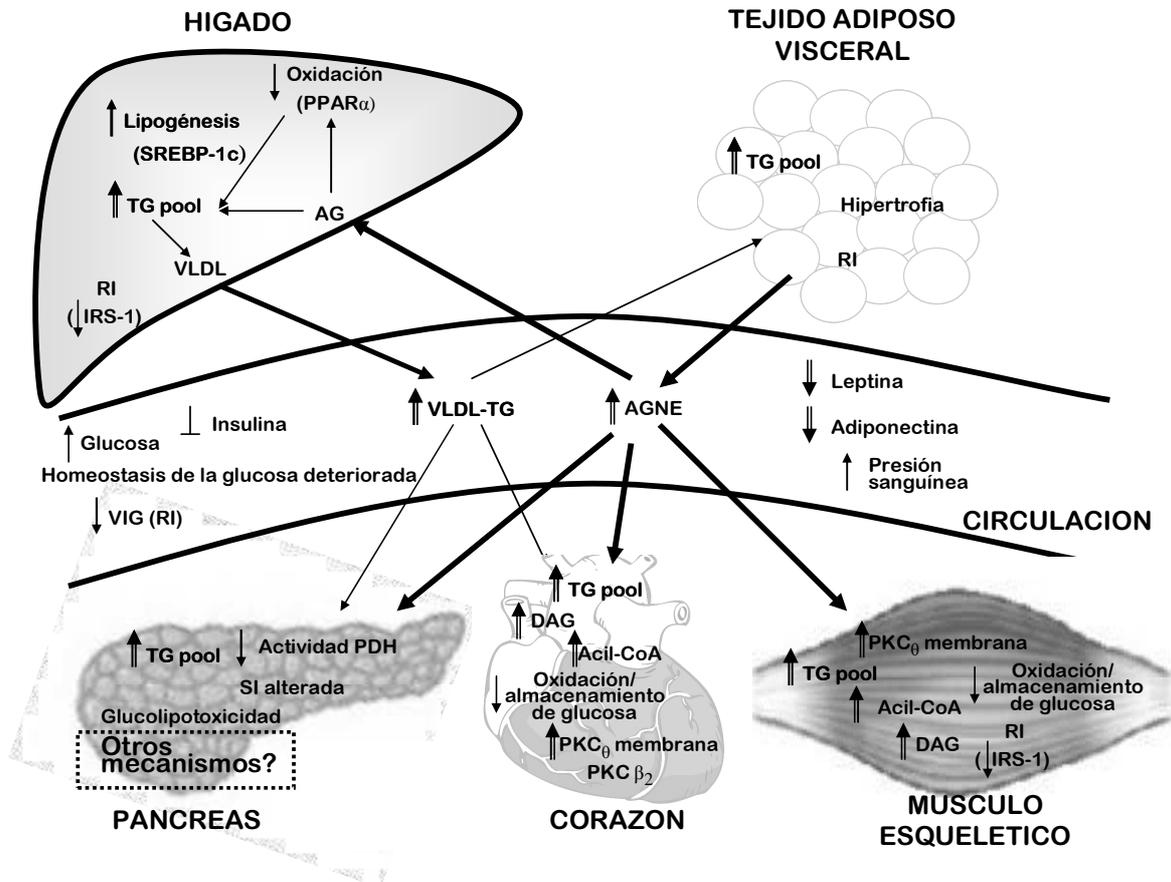
Las alteraciones mencionadas se acompañan de cambios en la funcionalidad de diversos tejidos (hígado, músculo esquelético y cardíaco, tejido adiposo, páncreas) que son claves en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y los lípidos. Al respecto, como observamos en la **Figura 9**, la ingesta de una DRS conduce a una clara disfunción del tejido adiposo caracterizada en los primeros estadios por un moderado incremento de la lipólisis basal y una reducción en la acción antilipolítica de la insulina que posteriormente con la cronicidad de la dieta se acompaña de un incremento del contenido de TG, hipertrofia de los adipocitos y alterada distribución celular (Soria y col., 2001; Rossi y col., 2010). La disfunción del tejido adiposo conduce a un aumento en el flujo de ácidos grasos hacia tejidos no adiposos. A nivel hepático esto provoca un incremento en el contenido de TG (durante el período de inducción que se mantiene

durante el período de recurrencia), debido a que la esterificación de los ácidos grasos se ve relativamente favorecida por sobre la oxidación (Rossi y col., 2012). El mayor contenido de TG hepáticos conduce a una mayor liberación de VLDL-TG por parte del hígado lo que conlleva a un incremento en los niveles plasmáticos de TG. A su vez, el consumo crónico de DRS deteriora el metabolismo hepático de la glucosa y altera la vía de señalización de la insulina en el interior de los hepatocitos (Hein y col., 2012). La elevada disponibilidad de ácidos grasos impacta también sobre el tejido muscular (esquelético y cardíaco), siendo el contenido de acil-CoA de cadena larga en músculo y de acil-CoA y TG en corazón, las manifestaciones más tempranas del disturbio del metabolismo lipídico en estos tejidos. Con la cronicidad de la dieta ambos tejidos presentan un incremento en el contenido de TG, acil-CoA de cadena larga y DAG lo que contribuye a un progresivo deterioro de las vías oxidativas y no oxidativas de la glucosa (Chicco y col., 1994; Chicco y col., 2003).

Anormalidades del metabolismo lipídico pueden también a nivel pancreático modular la secreción de insulina. Hemos constatado que luego de 3-4 semanas de DRS el patrón bifásico de secreción insulina bajo el estímulo de la glucosa en islotes perifundidos mostró un primer pico hipersecretor con una segunda fase normal. La secreción de insulina se deteriora con la cronicidad de la dieta y a las 13-15 semanas de DRS se observa un primer pico de secreción de la hormona significativamente menor y retardado en el tiempo y una segunda fase ligeramente mayor. Más aún, cuando la dieta se prolonga 30-40 semanas se observa una clara disfunción de la célula β con ausencia del primer pico y una segunda fase hipersecretora (Chicco y col., 2003). La pérdida de la primera fase de la respuesta insulínica predice el desarrollo de la diabetes. Al cabo de éste tiempo constatamos en el páncreas endócrino un significativo incremento del número y área de la célula β así como un alterado perfil de distribución celular del islote (Lombardo y col., 1996a), lo que demuestra que cuando la administración de la DRS se realiza durante un corto período de tiempo (período de inducción) la actividad de la célula β compensa eficientemente la incrementada demanda de insulina manteniendo la normoglucemia en ayunas. Sin embargo, la ingesta crónica de DRS falla en mantener la hiperactividad de la célula β . De hecho los niveles de insulina plasmática permanecen dentro del valor normal con moderada hiperglucemia luego de 20-40 semanas de ingesta de DRS, decreciendo significativamente cuando la dieta se prolonga hasta un año (Del Zotto y col., 2004). En estos dos períodos de evolución (30-40 semanas y un año) no se

observa un incremento de la neogénesis. Sin embargo un aumento de las células β apoptóticas pudo constatarse sólo al cabo de un año de ingesta con DRS (Del Zotto y col., 2004). La elevada disponibilidad de AGNE plasmáticos y la moderada hiperglucemia podrían desensibilizar a la célula β pancreática a través de mecanismos de “glucolipototoxicidad”. En este contexto, recientemente hemos demostrado en islotes aislados que el paulatino deterioro de la célula β (30-40 semanas de DRS) se acompaña con un significativo incremento en el contenido de TG y menor actividad del complejo enzimático PDHc (alterada oxidación de la glucosa), lo que podría constituir uno de los posibles mecanismos que, al menos en parte, mediaría la anormal secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa y otros secretagogos (arginina, palmitato+glucosa) (Pighin y col., 2003). Estos resultados nos sugieren que la inhibición de la PDHc limitaría la conversión de piruvato derivado de la glucólisis a acetil-CoA, disminuyendo la vía oxidativa de la glucosa, una señal para la síntesis y secreción de insulina. En otros estudios, hemos observado que la adición de troglitazona a la DRS durante 2 meses normalizó el patrón de secreción de insulina bajo el estímulo de la glucosa y la resistencia insulínica periférica descendiendo los niveles de TG y AGNE plasmáticos (Chicco y col., 2000). Sin embargo debemos tener en cuenta otras posibles vías metabólicas además de las analizadas ya que existen diferentes opiniones sobre el rol de los lípidos en los mecanismos que contribuyen al progresivo deterioro de la célula β . Este importante aspecto del problema forma parte de la presente propuesta.

Figura 9. Efectos del consumo de sacarosa sobre diversos tejidos claves en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y los lípidos.¹



¹En la figura se muestran las principales alteraciones halladas a nivel plasmático y tisular en el modelo de DRS. Más detalles se describen en las páginas 37 a 39 del texto.

PPARα: receptores activadores de la proliferación peroxisomal α, **SREBP-1c:** proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides 1-c, **TG:** triglicéridos, **AG:** ácidos grasos, **VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad, **RI:** resistencia insulínica, **IRS-1:** sustrato del receptor de la insulina 1, **VIG:** velocidad de infusión de glucosa, **AGNE:** ácidos grasos no esterificados, **PDH:** complejo enzimático piruvato dehidrogenasa, **DAG:** diacilglicerol, **PKC:** proteína quinasa C, **SI:** secreción de insulina (Modificado de Lombardo y Chicco, 2008).

Como describimos, este modelo mimetiza en varios aspectos bioquímicos-metabólicos aquellas alteraciones observadas en el SM en humanos.

Puesto que la prevalencia del SM ha alcanzado proporciones pandémicas en el mundo entero (Cameron y col., 2004), numerosos investigadores se han enfocado en evaluar la posibilidad de introducir modificaciones en la dieta que puedan prevenir y/o mejorar

las alteraciones de este síndrome. Al respecto, diferentes estudios han demostrado que dietas con bajo contenido de carbohidratos simples, bajo contenido de grasas saturadas, dietas ricas en fibras, dietas mediterráneas, dietas ricas en fitoquímicos (flavonoides, ácidos fenólicos), dietas con proteínas de origen vegetal, dietas ricas en ácidos grasos polinosaturados n-3 (n-3 PUFA) entre otras, son capaces de reducir algunas de las alteraciones comprendidas en el SM (Kris-Etherton y col., 2002; Minich y Bland, 2008).

En este sentido, desde hace ya varios años se ha puesto especial interés en el consumo de n-3 PUFA, especialmente en aquellos de origen marino: ácido eicosapentanoico (EPA 20:5, n-3) y ácido docosahexanoico (DHA 22:6, n-3), debido a los efectos beneficiosos que estos ejercerían sobre diversos procesos fisiológicos y en particular sobre diferentes componentes del SM. Al respecto, numerosos estudios han sido llevados a cabo tanto en humanos como en animales de experimentación (ratas, ratones) con el objeto de evaluar los efectos de los n-3 PUFA en la prevención, reversión o mejora de las alteraciones incluídas en el SM. Diferentes autores han demostrado que los n-3 PUFA: EPA y DHA administrados de manera individual o conjunta son capaces de prevenir y revertir la RI inducida por manipulación nutricional (dietas ricas en grasa o sacarosa/fructosa) en animales de experimentación (Fedor y Kelley, 2009). Al respecto, Perez-Matute y col. (2007) encontraron en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa a las cuales se les administró EPA (1g/kg peso corporal) durante 5 semanas, una reducción de la RI sin cambios en los niveles de glucemia. Por otra parte, Lombardo y col. (2007) demostraron en animales insulinoresistentes alimentados crónicamente con DRS (8 meses), que la sustitución parcial del tipo de grasa dietaria (aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao -rico en EPA y DHA-) durante las 8 últimas semanas de experimentación fue capaz de revertir la RI.

Los mecanismos mediante los cuales los n-3 PUFA conducirían a la prevención/reversión de la RI son diversos. En este sentido, se ha visto que la ingesta de n-3 PUFA de origen marino puede mejorar defectos en la vía de señalización de la insulina en tejidos sensibles a la hormona y prevenir alteraciones en la homeostasis de la glucosa. Al respecto, Taouis y col. (2002) encontraron en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa con alto contenido de n-3 PUFA que la misma era capaz de mantener la sensibilidad insulínica y de prevenir los defectos en los primeros pasos de la vía de señalización de la insulina y en el transporte de glucosa (contenido de GLUT 4) en el

músculo esquelético de estos animales. Por otra parte, estudios de nuestro grupo han demostrado que la administración de aceite de pescado a ratas insulino resistentes alimentadas crónicamente con DRS, corrige el alterado transporte de glucosa y el efecto inhibitorio de la DRS sobre la abundancia relativa del IRS-1 en el músculo esquelético de estos animales (D'Alessandro y col., 2013). En este modelo Hein y col. (2012) demostraron efectos beneficiosos parciales del aceite de pescado sobre la vía de señalización de la insulina a nivel hepático. En este sentido, se ha demostrado que los n-3 PUFA afectarían la vía de señalización de la insulina de manera diferencial, dependiendo del tejido target de la insulina sobre el cual actúan (Taouis y col., 2002).

Otro efecto beneficioso atribuido a los ácidos grasos n-3 es su capacidad de mejorar el perfil lipoproteico (Carpentier y col., 2006). Estudios llevados a cabo tanto en humanos como en animales de experimentación demostraron que la administración de n-3 PUFA es capaz de reducir los niveles de TG plasmáticos, de la fracción aterogénica LDL pequeña densa y de incrementar moderadamente los niveles de HDL-colesterol (Poudyal y col., 2011) (**Tabla 2**).

Los mecanismos mediante los cuales los n-3 PUFA provocarían estos cambios incluirían la activación y/o represión de factores de transcripción que controlan la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico y glucídico (Jump, 2002). En particular se ha visto que reducen el contenido de TG hepáticos lo que conlleva a una normalización de la secreción de VLDL-TG hepática, y por ende de los niveles de TG plasmáticos, todo esto como consecuencia de la supresión de genes lipogénicos y la inducción de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos (Clarke, 2004; Lombardo y Chicco, 2008). En el tejido adiposo, los n-3 PUFA activarían la expresión del PPAR γ , un factor de transcripción clave involucrado en la adipogénesis y regulación del tamaño de los adipocitos. La activación de este factor de transcripción se traduciría en la aparición de adipocitos de menor tamaño con mayor sensibilidad a la insulina, como consecuencia de esto una menor liberación de ácidos grasos desde los depósitos grasos conllevaría a una menor disponibilidad de éstos en los tejidos no adiposos (Rossi y col., 2010) (**Figura 10**).

Otros efectos importantes de los n-3 PUFA sobre la prevención/reversión de la insulino resistencia incluyen su capacidad de modular los procesos inflamatorios (Calder, 2006)

y de alterar la fluidez de las membranas celulares (lo que repercute en las vías de transducción de señales) (Jump, 2002). Sumado a estos efectos los n-3 PUFA pueden también provocar una reducción (moderada) de la presión sanguínea, disminuir la activación plaquetaria y mejorar la función endotelial (Carpentier y col., 2006).

Como describimos en detalle, numerosos estudios han evaluado el posible efecto beneficioso de los n-3 PUFA sobre distintos tejidos que son “blanco” de la acción de la insulina y a la vez son claves en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa.

Sin embargo, aún no está completamente dilucidado el efecto que tendrían estos ácidos grasos sobre la función de la célula β y regulación de la secreción de insulina, lo que resulta de gran importancia teniendo en cuenta que una normal función de la célula β es también indispensable para mantener la homeostasis de la glucosa.

Hasta la fecha existen algunos pocos estudios que evalúan el posible efecto que tendrían los n-3 PUFA sobre la función de la célula β . Al respecto, Holness y col. (2004) demostraron que la hipersecreción de insulina desarrollada en ratas insulino resistentes alimentadas con una dieta rica en grasa puede ser rápidamente revertida mediante el aporte de pequeñas cantidades (~7%) de n-3 PUFA de origen marino. Por otra parte, en ratones diabéticos KK-Ay la administración de EPA logró mejorar la deteriorada secreción de insulina que presentaban sus islotes (Kato y col., 2008) y estudios de nuestro laboratorio demostraron que la administración de aceite de pescado durante 2 meses a ratas alimentadas crónicamente con DRS (30 semanas) normaliza el deteriorado patrón de secreción de insulina bajo el estímulo de la glucosa (Pighin y col., 2003).

Tabla 2. Principales efectos de los n-3 PUFA sobre diferentes componentes del SM.

RESISTENCIA INSULINICA Y HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

↓ RI en músculo > tejido adiposo > hígado

↓ Posiblemente la secreción de insulina

PERFIL LIPIDICO Y LIPOPROTEICO

↓ TG plasmáticos

↑ HDL colesterol (moderado)

↓ fracción aterogénica LDL pequeña densa

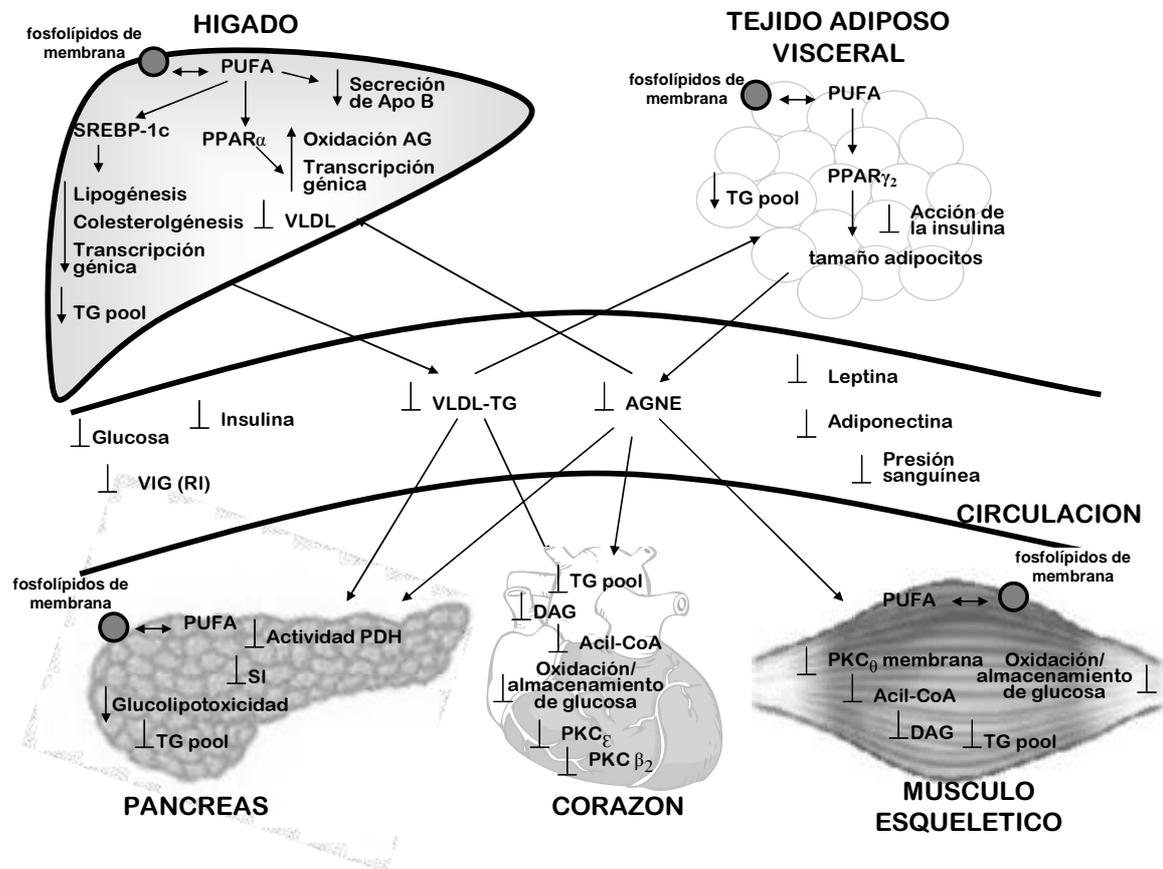
REDUCEN LA PRESION SANGUINEA

MEJORAN LA FUNCION ENDOTELIAL

POSEEN EFECTO ANTIINFLAMATARIO

(Modificada de Carpentier y col., 2006)

Figura 10. Posibles mecanismos mediante los cuales los n-3 PUFA mejorarían las anomalías metabólicas inducidas por la ingesta de una DRS.¹



¹En la figura se muestran los principales efectos de la administración de n-3 PUFA (aceite de pescado) sobre las alteraciones halladas a nivel plasmático y tisular en el modelo de DRS. **PPAR**: receptores activadores de la proliferación peroxisomal, **SREBP-1c**: proteínas de unión a elementos reguladores de esteroles 1-c, **TG**: triglicéridos, **AG**: ácidos grasos, **VLDL**: lipoproteínas de muy baja densidad, **RI**: resistencia insulínica, **IRS-1**: sustrato del receptor de la insulina 1, **VIG**: velocidad de infusión de glucosa, **AGNE**: ácidos grasos no esterificados, **PDH**: complejo enzimático piruvato dehidrogenasa, **DAG**: diacilglicerol, **PKC**: proteína quinasa C, **SI**: secreción de insulina (Modificado de Lombardo y Chicco, 2008).

La característica evolutiva del modelo de DRS previamente descrito, permite adecuadamente analizar en sus etapas de inducción (3 semanas) y de recurrencia (30-40 semanas) si la normalización de los lípidos plasmáticos y tisulares (luego de la administración de n-3 PUFA) logra mejorar o revertir la disfunción de la célula β

previamente descrita. Esto contribuiría en el conocimiento de las vías y/o mecanismos de conexión que relacionan lipotoxicidad, RI y disfunción de la célula β .

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES:

Teniendo en cuenta el rol clave que juega la célula β en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, resulta interesante esclarecer algunos mecanismos que podrían estar involucrados en los procesos de adaptación/disfunción de la célula β observados frente a un estado de insensibilidad insulínica y dislipidemia. En este contexto, utilizamos el modelo no genético de dislipidemia y RI obtenido mediante la administración de DRS a ratas normales para llevar a cabo los siguientes objetivos generales:

I) Analizar a nivel pancreático algunos mecanismos bioquímicos – moleculares involucrados en el progresivo deterioro de la función de la célula β en ratas dislipémicas insulino resistentes alimentadas con DRS durante 22 días y 240 días.

II) Estudiar algunos mecanismos implicados en el posible efecto beneficioso de la administración de n-3 PUFA dietario (*AHB* rico en *EPA* y *DHA*) sobre la disfunción de la célula β inducida por administración de DRS durante 22 días y 240 días.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

I) Evaluar los componentes del mecanismo sensor de glucosa (GLUT-2, glucoquinasa-hexoquinasa) y la actividad del complejo PDHc como una medida de la estimación de la oxidación de glucosa.

II) Analizar los niveles de la masa proteica de los receptores nucleares PPAR α y γ y los niveles de la masa proteica de la proteína desacoplante UCP 2.

III) Además se determinará el contenido de TG en el interior de los islotes (lipotoxicidad) y la secreción de insulina en islotes pancreáticos perifundidos bajo el estímulo de la glucosa.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DIETAS

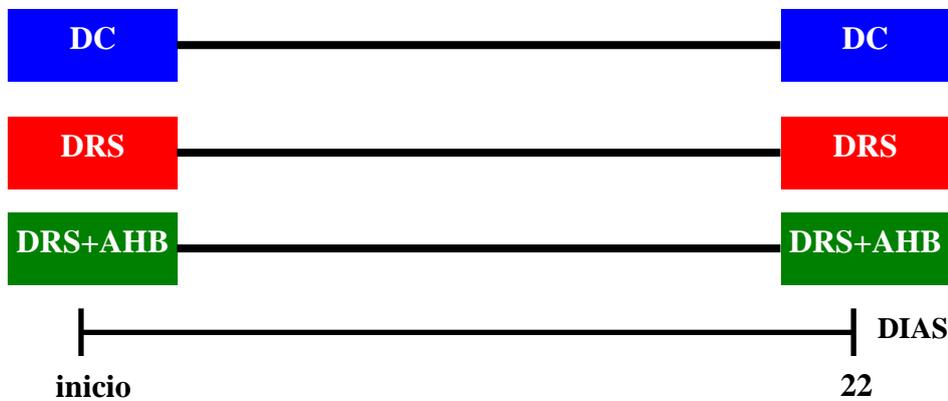
Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar provenientes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Buenos Aires, Argentina; con un peso inicial de 180 – 200 g (adultos jóvenes). Durante todo el período experimental los animales se mantuvieron en bioterio estandarizado bajo condiciones controladas de temperatura (22 ± 1 °C) y humedad, con un ciclo de luz – oscuridad de 12 horas (7:00 – 19:00 hs). Desde su llegada al bioterio, los animales tuvieron libre acceso al agua y a una dieta estándar comercial de laboratorio (Ralston, Purina, St. Louis, MO, USA). Luego de una semana de aclimatación los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los dos protocolos experimentales que se detallan a continuación.

Protocolo Experimental 1. Los animales fueron divididos al azar en 3 grupos: **a) Grupo control:** recibió una dieta semisintética en la cual la fuente de hidratos de carbono fue almidón (62,5% p/p) y la fuente de grasa aceite de maíz - AM - (8% p/p) (**DC**). **b) Grupo dieta rica en sacarosa:** recibió la misma dieta semisintética pero en ésta se modificó la fuente de hidratos de carbono: la sacarosa reemplazó isocalóricamente al almidón (62,5% p/p) (**DRS**). **c) Grupo dieta rica en sacarosa + aceite de hígado de bacalao:** recibió la misma dieta semisintética que el grupo DRS pero en ésta la fuente de grasa se sustituyó parcialmente: 8% AM por 7% aceite de hígado de bacalao (AHB) más 1% aceite de maíz (**DRS + AHB**). Los 3 grupos recibieron sus respectivas dietas durante 22 días como se muestra en el diseño experimental. (**Figura 11A**).

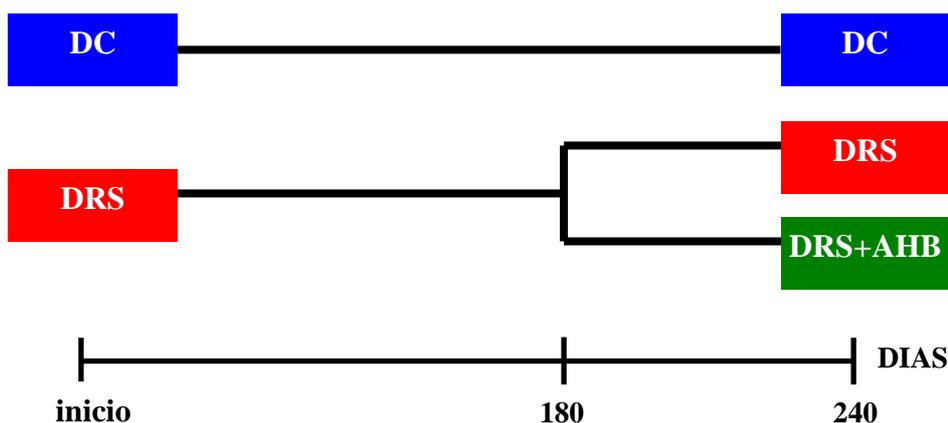
Protocolo Experimental 2. Los animales fueron divididos al azar en 2 grupos: **a) Grupo control (DC):** recibió la misma dieta semisintética que el grupo DC descrita en el protocolo 1 durante 240 días. **b) Grupo dieta rica en sacarosa (DRS):** recibió la misma dieta semisintética que el grupo DRS descrita en el protocolo 1 durante 180 días. Al cabo de este tiempo, el grupo se dividió en 2 subgrupos: uno de ellos continuó con la DRS hasta los 240 días mientras que en el otro subgrupo se sustituyó parcialmente la fuente de grasa de la dieta, 8% AM por 7% aceite de hígado de bacalao (AHB) más 1% aceite de maíz (**DRS + AHB**) durante 60 días. El diseño experimental se observa en la **Figura 11B**.

Figura 11. Diseño experimental.¹

A. Protocolo Experimental 1



B. Protocolo Experimental 2



¹Diseño experimental de la administración de las diferentes dietas a lo largo del período de ingesta correspondiente al protocolo experimental 1 y 2 respectivamente. DC: dieta control, DRS: dieta rica en sacarosa, DRS + AHB: dieta rica en sacarosa + aceite de hígado de bacalao.

Las dietas fueron preparadas semanalmente siguiendo las recomendaciones de la dieta AIN 93-M del Instituto Americano de Nutrición (Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76 A Rodent Diet) y se conservaron a 4 °C hasta el momento del consumo (Reeves y col., 1993).

Las dietas DC y DRS fueron balanceadas en colesterol, vitamina A y D presentes en el AHB de la dieta DRS + AHB durante 22 días en el protocolo experimental 1 y durante los últimos 60 días de ingesta en el protocolo experimental 2.

La composición de las dietas se describe en la **Tabla 3**. Las dietas fueron isocalóricas, aportaron aproximadamente 16,24 kJ/g de comida y fueron administradas *ad libitum* durante todo el período experimental. El AHB fue separado en alícuotas bajo corriente de nitrógeno y almacenado a -20°C. Diariamente se incorporó el mismo a la dieta descongelando las alícuotas necesarias de acuerdo al tamaño del lote de animales de experimentación.

Más detalles sobre la preparación, contenido y manejo de las dietas se han descripto previamente por nuestro grupo (Pighin y col., 2003).

La composición centesimal de los ácidos grasos de los aceites de maíz e hígado de bacalao y la respectiva mezcla utilizada fueron analizados por cromatografía gaseosa con columna D.E.G.S (Dietilen glicol succinato) 15% sobre Chromosorbw AW 80/100 (detector de ionización de llama – Hewlett Packard HP 5890 A). La misma puede observarse en la **Tabla 4**. Las muestras fueron previamente derivatizadas (transesterificadas a ésteres metílicos mediante calentamiento a reflujo durante 8 horas en una solución de 5% de HCl(g) en metanol anhidro). Los ácidos grasos fueron identificados por el tiempo de retención en comparación con estándares conocidos. Estas determinaciones fueron realizadas en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina).

En la **Tabla 5** se muestra la composición de los ácidos grasos (% p/p) de las diferentes dietas que recibieron los animales durante todo el período experimental.

Durante el período experimental se registró el peso de cada animal 2 veces por semana. En un experimento en paralelo, se determinó dos veces por semana la ingesta energética y la ganancia de peso individual en 8 animales de cada lote pertenecientes a los diferentes protocolos experimentales.

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina).

Tabla 3. Composición de las dietas experimentales. ¹

COMPONENTES	DIETAS					
	DC		DRS		DRS + AHB	
	(% en peso)	(% en kJ)	(% en peso)	(% en kJ)	(% en peso)	(% en kJ)
Almidón	62,5	64,1	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	62,5	64,1	62,5	64,1
Aceite de maíz	8	18,5	8	18,5	1	2,3
AHB	-	-	-	-	7	16,2
Caseína libre de vitaminas	17	17,4	17	17,4	17	17,4
Celulosa	7,5	-	7,5	-	7,5	-
Mezcla de sales ²	3,5	-	3,5	-	3,5	-
Mezcla de vitaminas ³	1	-	1	-	1	-
Metionina	0,3	-	0,3	-	0,3	-
Cloruro de colina	0,2	-	0,2	-	0,2	-

¹ Las dietas están basadas en las recomendaciones realizadas por el Comité ad hoc del “American Institute of Nutrition”. DC: dieta control, DRS: dieta rica en sacarosa, DRS + AHB: dieta rica en sacarosa + aceite de hígado de bacalao.

² Mezcla de sales basadas en la mezcla AIN-93M-MX (g/kg de mezcla): Carbonato de calcio, 357,0; fosfato monobásico de potasio, 250,0; cloruro de sodio, 74,0; sulfato de potasio, 46,6; citrato de potasio monohidrato, 28,0; óxido de magnesio, 24,0; citrato férrico, 6,06; carbonato de zinc, 1,65; carbonato de manganeso, 0,63; carbonato cúprico, 0,30; yodato de potasio, 0,01; selenato de sodio, 0,01025; para-molibdato de amonio, 0,00795; cromato de potasio, 0,275.

³ Mezcla de vitaminas basadas en la mezcla AIN-93M-VX (g/kg de mezcla): Niacina, 3,000; pantotenato de calcio, 1,600; piridoxina-HCl, 0,700; tiamina-HCl, 0,600; riboflavina, 0,600; ácido fólico, 0,200; D- biotina, 0,020; vitamina B12, 2,500 (0,1% en manitol); vitamina E (500 UI/g), 15,00; vitamina A (500.000 UI/g), 0,800; vitamina D₃ (400.000 UI/g), 0,250; vitamina K, 0,075.

Tabla 4. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de las diferentes fuentes de grasa.¹

ACIDOS GRASOS²	AM³	AM + AHB⁴
14:0	trazas	4,1
16:0	10,4	12,8
16:1 n-7	-	9,5
18:0	2,6	2,8
18:1 n-9	32,1	26,0
18:2 n-6	51,5	9,0
18:3 n-3	0,4	-
20:0	0,4	0,9
20:1 n-9	1,6	12,0
20:4 n-3	-	3,1
20:5 n-3	-	9,0
22:5 n-3	-	0,5
22:6 n-3	-	8,1
<i>Total</i>		
<i>Saturados</i>	13,4	20,6
<i>Monoinsaturados</i>	33,7	47,5
<i>Poliinsaturados</i>		
<i>n-6</i>	51,5	9,0
<i>n-3</i>	0,4	20,7
<i>Relación Poliinsat. / Saturados</i>	3,87	1,44
<i>Relación n-3/n-6</i>	0,008	2,30

¹ Composición de ácidos grasos del aceite de hígado de bacalao (% total de ácidos grasos): 14:0 4,7; 16:0 12,8; 16:1 n-7 10,8; 18:0 3,0; 18:1 n-9 25,0; 18:2 n-6 2,6; 18:3 n-3 trazas; 20:0 0,9; 20:1 n-9 13,7; 20:4 n-3 3,5; 20:5 n-3 10,3; 22:5 n-3 0,6; 22:6 n-3 9,3. Relación Poliinsaturados/Saturados: 1,23. Relación n-3/n-6: 9,11.

² Otros ácidos grasos menores se han excluído.

³ Aceite de maíz (AM) Mazola (Best Foods, Canadá, Starch, Montreal, Quebec, Canadá).

⁴ Incluye 1% p/p AM y 7% p/p aceite de hígado de bacalao (AHB) (MP Biomedicals, Inc. Ohio, USA)

Tabla 5. Composición de ácidos grasos (g/100g de dieta) de las diferentes dietas administradas a los animales durante todo el período experimental.

ACIDOS GRASOS	DC y DRS	DRS + AHB
14:0	trazas	0,328
16:0	0,832	1,000
16:1 n-7	-	0,760
18:0	0,208	0,236
18:1 n-9	2,568	2,071
18:2 n-6	4,120	0,697
18:3 n-3	0,032	
20:0	0,032	0,067
20:1 n-9	0,128	0,975
20:4 n-3	-	0,245
20:5 n-3	-	0,720
22:5 n-3	-	0,042
22:6 n-3	-	0,651
<i>Total</i>		
<i>Saturados</i>	1,072	1,633
<i>Monoinsaturados</i>	2,696	3,806
<i>Poliinsaturados</i>		
<i>n-6</i>	4,120	0,697
<i>n-3</i>	0,032	1,658
<i>Relación Poliinsat. / Saturados</i>	3,870	1,444
<i>Relación n-3/n-6</i>	0,008	2,378

2. OBTENCION DE MUESTRAS DE SANGRE Y TEJIDOS

Finalizados los distintos períodos experimentales (22 días y 240 días) el alimento fue removido al finalizar el período de oscuridad (7:00 hs) y los diferentes ensayos fueron llevados a cabo entre las 7:00 y las 9:00 hs a excepción de ensayos específicos que se describirán posteriormente.

Los animales de cada grupo dietario fueron pesados y anestesiados en forma intraperitoneal con pentobarbital sódico (60 mg/kg peso).

Las muestras de sangre obtenidas fueron centrifugadas a 3500 x g durante 15 minutos a 4°C y el suero se procesó inmediatamente o fue almacenado a -20°C hasta su utilización dentro de los 3 días posteriores a la toma de muestra. En las mismas se cuantificaron los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos y ácidos grasos no esterificados.

Al momento del sacrificio, el páncreas de cada uno de los animales fue removido rápidamente y los islotes pancreáticos fueron aislados por digestión con colagenasa y colectados bajo microscopio estereoscópico como se describe posteriormente. Muestras de tejido hepático fueron congeladas a la temperatura de nieve carbónica utilizando una pinza de Wollenberger (Wollenberger y col., 1960) previamente enfriada a dicha temperatura. Las muestras fueron pulverizadas a la misma temperatura y conservadas en criotubos a la temperatura del N₂ líquido hasta su procesamiento. Finalmente se pesó el tejido adiposo epididimal.

3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES: METODOS ANALITICOS

3.1 DETERMINACIONES SÉRICAS

3.1.1 Glucosa

La glucosa presente en el suero de ratas fue dosada por el método espectrofotométrico basado en el sistema enzimático glucosa oxidasa-peroxidasa de acuerdo a Bergmeyer (1974). Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol/mL}$.

3.1.2 Insulina

La insulina inmunoreactiva (IRI) fue dosada por el método propuesto por Herbert y col. (1965) utilizando como estándar insulina de rata (Novo Nordisk Dinamarca). La sensibilidad fue de 0,5 μ U/mL, con un coeficiente de variación (CV) intraensayo de 8,7%, 6,2% y 5,1% para los rangos de determinación de 1-5, 5-10 y 10-50 μ U de insulina /mL respectivamente y coeficientes de variación interensayo de 6,6%, 5,0% y 5,2% para dichos rangos. Los resultados se expresaron como **μ U/mL**.

3.1.3 Triglicéridos (TG)

Los TG se cuantificaron espectrofotométricamente utilizando kit enzimático comercial de Wiener SA (Santa Fe, Argentina) basado en un método enzimático colorimétrico. Los resultados se expresaron en **mmol/L**.

3.1.4 Acidos grasos no esterificados (AGNE)

Los AGNE se cuantificaron a través del método enzimático colorimétrico acil-CoA sintetasa / acil-CoA oxidasa utilizando el kit enzimático comercial WACO NEFA-C (Waco Chemicals USA Inc., Richmond, Virginia, USA). Los resultados se expresaron como **μ mol/L**.

3.2 DETERMINACIÓN DE TRIGLICERIDOS HEPATICOS

Alícuotas de tejido hepático diluidas 1/10 con solución fisiológica, fueron homogeneizadas a alta velocidad utilizando un homogeneizador con vástago de teflón previamente enfriado y mantenido entre 0 y 4°C. Volúmenes adecuados de dichos homogeneizados fueron utilizados para la determinación del contenido de TG por método espectrofotométrico de acuerdo a la técnica descrita por Laurell (Laurell, 1966). Brevemente, se extraen los lípidos utilizando como solvente no polar una mezcla de éter isopropílico/etanol (95:5 v/v) al tiempo que se extraen los fosfolípidos con ácido silícico. Los TG contenidos en el sobrenadante se someten a hidrólisis alcalina con una mezcla de KOH/etanol (0,5/9,5 v/v). El glicerol liberado se recoge por adición de una solución acuosa – H₂SO₄ 0,6 N – eliminándose los ácidos grasos liberados por aspiración de la capa orgánica. Finalmente el glicerol liberado se oxida a formaldehído al reaccionar con ácido peryódico. El exceso de este último se elimina con arsenito de sodio. El formaldehído reacciona con el ácido cromotrópico en medio sulfúrico y en caliente para dar un cromóforo violeta cuya intensidad se mide a 570 nm. Se utilizó

como estándar trioleína (SIGMA – 99% pureza). Los resultados se expresaron en **µmol/g de tejido húmedo (µmol/g TH)**.

3.3 ESTUDIOS IN VIVO

3.3.1 Capacidad de utilización de la glucosa por los tejidos “in vivo”. Clamp euglucémica – hiperinsulinémica.

Esta técnica fue realizada con la finalidad de determinar la sensibilidad insulínica periférica global, siguiendo la metodología propuesta por De Fronzo y col. (1979) y utilizada en trabajos previos del grupo (D'Alessandro y col., 2000; Chicco y col., 2003). Brevemente, luego de un período de ayuno de 5 horas las ratas fueron anestesiadas. La vena yugular izquierda se canalizó con cánula de doble entrada, infundiéndole por una de ellas insulina (0,8 U/kg/hora) a velocidad constante durante 2 horas, mientras que por la segunda entrada se realizó la infusión de una solución de glucosa 20% (p/v) a velocidad variable con el fin de mantener la glucemia en su nivel basal (5,6-6,0 mmol/L). La infusión de glucosa comenzó a los 5 minutos posteriores a la iniciación de la infusión de insulina.

Previo a comenzar la infusión se extrajo sangre de la vena yugular derecha (tiempo cero), continuando con extracciones a intervalos de 3-5 minutos durante la primera hora y entre 5-7 minutos en la segunda hora de la experiencia, determinándose la glucemia utilizando el equipo Accu-Chek Sensor Confort (Roche).

La velocidad de infusión de glucosa (VIG) en el estado estacionario (durante la segunda hora de la clamp) fue considerada como la velocidad de utilización periférica global de glucosa y fue expresada como **mg glucosa/(kg.minuto)**. El hematocrito medido al comienzo y final de la experiencia se mantuvo constante.

3.4 DETERMINACIONES EN ISLOTES PANCREATICOS

3.4.1 Aislamiento de islotes pancreáticos

Los islotes pancreáticos se aislaron por digestión con colagenasa y se colectaron bajo microscopio estereoscópico (Lacy y Kostianovsky, 1967) como se describió en trabajos previos (Chicco y col. 2003). Brevemente, el páncreas extraído del animal se sumergió en un pequeño volumen de Buffer Krebs-Ringer Bicarbonato (KRB) pH: 7,4 (gaseado durante 10 minutos con una mezcla 5% CO₂: 95% O₂) conteniendo: NaCl 118 mmol/L,

NaHCO₃ 29,8 mmol/L, KCl 4,7 mmol/L, K₂HPO₄ 0,9 mmol/L, MgSO₄ 1,2 mmol/L, CaCl₂ 3,3 mmol/L, glucosa 3,4 mmol/L; y se procedió al lavado trabajando en frío (0–4°C). Luego de cortar el páncreas en trozos pequeños se agregó una solución fresca de colagenasa (Sigma C-9263 tipo V para aislamiento de islotes pancreáticos) y el tejido fue digerido aproximadamente durante 20 minutos a 37 °C con agitación. El proceso de digestión se siguió bajo lupa. Cuando la digestión se completó, se procedió a detener la misma con el agregado de buffer frío (4°C) y los islotes se separaron por decantación. El sobrenadante fue descartado y el sedimento conteniendo los islotes fue resuspendido en buffer KRB. Esta operación se repitió 3 veces. Durante el procedimiento los flóculos presentes en la suspensión se dispersaron a través del pasaje de la misma por una jeringa de grueso calibre. El sedimento final obtenido se transfirió a una placa de petri y fue examinado bajo microscopio estereoscópico. Aproximadamente 200 – 300 islotes fueron aislados de cada animal.

3.4.2 Secreción de insulina en perfusión de islotes pancreáticos aislados frente al estímulo de la glucosa.

Para llevar a cabo esta prueba los animales fueron ayunados durante un período de 12 horas y luego fueron sacrificados. El páncreas se removi6 rápidamente y los islotes aislados, según se describi6 en el ítem anterior, fueron lavados 2 veces con buffer Krebs-Ringer bicarbonato (KRB). Grupos de 30-40 islotes de cada rata fueron colocados en una cámara de 13 mm conteniendo un filtro de membrana de nylon de 5µm. Los islotes fueron perfundidos de acuerdo a la técnica de Burr y col. (1969) utilizada en trabajos previos (Chicco y col., 2003) con KRB conteniendo: glucosa 3 mmol/L, albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos 250mg/L, dextrán-70 40 mg/L a pH: 7,4 y 37°C (gaseado constantemente con 95% O₂, 5% CO₂) con una velocidad de flujo de 0,9-1,2 mL/min. Luego de un prelavado de 30 minutos se obtuvieron 2 muestras basales. Posteriormente se utiliz6 KRB conteniendo una alta concentración de glucosa (16,5 mmol/L) hasta el final de la perfusión (40 minutos). Alícuotas del efluente fueron recolectadas cada minuto hasta los 15 minutos y luego cada 5 minutos hasta el minuto 40. Las alícuotas basales y postestímulo fueron almacenadas a -20°C hasta ser utilizadas para el dosaje de insulina según la metodología descripta anteriormente (ítem 3.1.2). La secreción total de insulina fue expresada como el área bajo la curva obtenida al integrar los puntos entre los minutos 3-40 de la experiencia y

la insulina liberada durante la primer fase de secreción fue expresada como el área bajo la curva obtenida al integrar los puntos entre los minutos 3-7.

3.4.3 Determinaciones tisulares

I) Triglicéridos (TG)

La extracción de lípidos en islotes aislados de cada grupo experimental fue llevada a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Briaud y col. (2001) como se describió en trabajos previos (Pighin y col., 2003). Brevemente, entre 75-100 islotes fueron lavados con buffer fosfato frío (4°C), el pellet fue resuspendido con una mezcla cloroformo-metanol (2:1 vol/vol) y se dejó reposar durante toda la noche a 4°C bajo corriente de N₂. Luego de un lavado con agua destilada, la fase inferior fue evaporada bajo corriente de N₂. Las muestras fueron resuspendidas en cloroformo y rápidamente se transfirió por duplicado una alícuota de las mismas a un tubo de ensayo donde se dejaron secar completamente. Los lípidos fueron posteriormente resuspendidos en éter laurílico polioxietilenado (Thesit) y se llevaron a sequedad nuevamente bajo corriente de aire. Finalmente se agregaron 50µL de agua destilada a cada tubo, los cuales se incubaron en baño de agua a 37°C con agitación durante 10 minutos (Van Veldhoven y col., 1997). El contenido de triglicéridos en los extractos fue determinado utilizando un kit de triglicéridos enzimático (Sigma, GPO-trinder, Sigma Chemical) y empleando curvas de calibrado con estándar de trioleína (Sigma – 99% pureza; 1 a 50 µg). Los resultados se expresaron en **ng/islote**.

II) Actividades enzimáticas

a) Glucoquinasa (GQ) y Hexoquinasa (HQ)

La fosforilación de la glucosa fue determinada en islotes pancreáticos según el método descrito por Liang y col. (1990). Aproximadamente 300 islotes de cada animal en los distintos grupos en experimentación (aislados como se describió en el ítem **3.4.1**) fueron lavados 2 veces y homogeneizados a 4°C con 300 µL de buffer (pH: 7,4) conteniendo: K₂HPO₄ 20 mmol/L, ditioneitol (DTT) 5 mmol/L, EDTA 1mmol/L y KCl 110 mmol/L. El homogenato fue centrifugado a 12 000 x g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante (fracción citosólica) fue utilizado para la determinación de las actividades glucoquinasa y hexoquinasa de acuerdo al método de Trus y col. (1981). La velocidad

de fosforilación de la glucosa fue determinada midiendo la velocidad de formación de glucosa-6-fosfato en un ensayo fluorométrico utilizando en una reacción acoplada final glucosa-6-fosfato dehidrogenasa como enzima auxiliar y NAD^+ como cofactor.

Brevemente, 1 volumen de sobrenadante fue adicionado a 25 volúmenes de buffer de reacción conteniendo: ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)-1-piperacínil-etanosulfónico] (Hepes) /HCl 50 mmol/L pH: 7,6, KCl 100 mmol/L, MgCl_2 7,4 mmol/L, β -mercaptoetanol 15 mmol/L, NAD^+ 0,5 mmol/L, albúmina sérica bovina 0,05%, glucosa-6-fosfato dehidrogenasa 0,7 U/mL (*Leuconostoc mesenteroides*), ATP 5 mmol/L y glucosa 0,5 o 100 mmol/L. Luego de 90 minutos de incubación a 30°C, la reacción se detuvo mediante el agregado de 250 volúmenes de NaHCO_3 500 mmol/L pH: 9,0 y se midió la fluorescencia (excitación 350 nm / emisión 460 nm). Las muestras para cada concentración de glucosa se procesaron por duplicado en paralelo con un blanco de reactivos (buffer de reacción sin homogenato) y un blanco de muestra (homogenato en buffer de reacción sin glucosa). Tanto el blanco de reactivos como el blanco de muestra fueron sustraídos de la fluorescencia total correspondiente a cada muestra adicionada al buffer de reacción completo. La curva estándar se construyó mediante la adición de glucosa-6-fosfato (0,4-8,3 mmol/L) al buffer de reacción conteniendo glucosa 100 mmol/L. La actividad glucoquinasa se determinó sustrayendo la actividad hexoquinasa cuantificada a una concentración de glucosa 0,5 mmol/L, de la actividad medida a una concentración de glucosa 100 mmol/L. Las actividades enzimáticas se extrapolaron a los valores que corresponderían a 37°C asumiendo un Q_{10} de 2. Los resultados se expresaron como **nmol glucosa-6-fosfato/(μg proteína.hora)**. La cuantificación de proteínas en el sobrenadante se realizó por el método de Lowry y col. (1951).

Dado que ambas enzimas GQ y HQ participan en una misma reacción, se realizó en primer lugar la identificación de la actividad de cada una de ellas por separado mediante la determinación de los parámetros cinéticos V_{max} y K_m aprovechando las diferentes características cinéticas que presentan. Los estudios cinéticos fueron llevados a cabo en pools de islotes de animales alimentados con DC, utilizando el mismo procedimiento descrito pero empleando un rango de concentraciones de glucosa más amplio (0,075 – 100 mmol/L). Para la GQ se tomaron 4 puntos con niveles de Glucosa de 0,075 mmol/L a 0,5 mmol/L y para la HQ 4 puntos con niveles de Glucosa de 15 mmol/L a 100 mmol/L. Luego, los parámetros cinéticos se determinaron con el ploteo de Eadie-Hofstee que relaciona la velocidad de la reacción con la concentración de sustrato

según la siguiente ecuación: $v = \frac{V_{m\acute{a}x} \times [S]}{K_m + [S]}$, donde “v” representa la velocidad de la reacción, “Km” es la constante de Michaelis-Menten, “[S]” la concentración de sustrato y “Vmáx” la máxima velocidad de reacción. Para la determinación de los parámetros cinéticos Km y Vmáx de la GQ se sustrajo en primer lugar la Vmáx de la HQ a cada una de las actividades obtenidas a concentraciones de glucosa entre 15 y 100 mmol/L (rango de determinación de la GQ).

b) Complejo piruvato dehidrogenasa (PDHc)

Aislamiento de la enzima fosfoproteína-fosfatasa

El aislamiento se realizó con el fin de obtener la enzima fosfoproteína – fosfatasa inespecífica para ser posteriormente utilizada en la determinación de la actividad enzimática piruvato dehidrogenasa (PDHc). Esta fosfatasa interviene en la defosforilación y, por ende, activación covalente de la fracción inactiva del complejo enzimático PDHc.

Para la obtención de la enzima se utilizaron hígados de ratas adultas. Los mismos fueron homogeneizados en 3-4 volúmenes de buffer IED: imidazol 50 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, DTT 0,5 mmol/L (pH: 7,45) y centrifugados a 10 000 x g durante 20 minutos, de acuerdo a la técnica descrita por Brandt y col. (1974). Brevemente, el extracto de tejido fue precipitado por adición de (NH₄)₂SO₄ a una concentración final del 70%. El precipitado de sulfato de amonio fue recogido por centrifugación, disuelto en buffer Tris-HCl (Tris-HCl 20 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, pH: 8,0) y tratado con etanol (5 volúmenes). El precipitado obtenido por centrifugación a 5000 x g durante 10 minutos, fue extraído con buffer IED y dializado (16-18 horas) contra el mismo buffer. La actividad fosforilasa-fosfatasa se cuantificó en presencia de p-NO₂-fenil-fosfato, midiendo la velocidad de cambio de absorbancia de dicho sustrato a 405 nm (Bergmeyer, 1974). La actividad fosforilasa fosfatasa es directamente proporcional a la cantidad de p-nitrofenol liberado por unidad de tiempo.

Extracción y determinación de la actividad PDHc

La extracción del complejo piruvato dehidrogenasa se realizó según la metodología descrita por Zhou y col. (1996) utilizada previamente por nuestro grupo (Pighin y col., 2003). Brevemente, 300 islotes de cada animal pertenecientes a cada uno de los lotes experimentales y aislados como se describió previamente, fueron homogeneizados en

300 μ L de un buffer de homogeneización conteniendo: Hepes 50 mmol/L (pH: 7,5), KCl 0,2 mmol/L, N^α- p-tosil- L-lisina clorometil cetona (TLCK) 3 mmol/L, inhibidor de tripsina 0,1 g/L, aprotinin 200 000 KIU/L, suero de rata 2% y Triton X-100 0,25% (vol/vol). Para la extracción del complejo PDHc el homogenato se congeló y descongeló en 3 ciclos sucesivos (nitrógeno líquido/temperatura ambiente) y posteriormente fue pasado a través de una jeringa de insulina de 0,5 mL 10 veces. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 x g durante 10 minutos a 4°C y mantenidas en frío. A una alícuota de la muestra se le adicionó fosfato de potasio y NaF fríos en una concentración final de 25 mmol/L, y fue utilizada para determinar la actividad enzimática de la forma activa (PDHa) del PDHc. La actividad PDH total (PDHt) fue ensayada luego de la conversión de la forma inactiva en activa utilizando una proteína fosfatasa específica como se describió en trabajos previos de nuestro grupo (D'Alessandro y col., 2000). Para este fin las alícuotas (150 μ L) de los extractos obtenidos fueron incubadas con MgCl₂ 25mmol/L, CaCl₂ 1 mmol/L y fosfoproteína fosfatasa durante 20 minutos a 30°C e inmediatamente se ensayó la actividad del complejo piruvato dehidrogenasa. Las actividades PDHa y PDHt fueron determinadas espectrofotométricamente a 30°C midiendo la reducción de NAD⁺ como se describió detalladamente en trabajos previos (D'Alessandro y col., 2000). Las actividades enzimáticas fueron expresadas en **pkat/islote**.

III) Determinación de la masa proteica por la técnica de Western Blot.

a) Extracción de proteínas

a.1) Transportador de glucosa GLUT 2 y enzimas glucoquinasa (GQ) y hexoquinasa (HQ).

La extracción de proteínas a partir de los islotes aislados para la cuantificación del GLUT 2, GQ y HQ se realizó siguiendo la técnica descrita por Shao y col. (2004). Brevemente, aproximadamente 200 islotes de cada animal perteneciente a cada uno de los lotes experimentales (aislados como se describió en el ítem **3.4.1**) fueron lavados 2 veces con buffer fosfato salino (PBS) frío y posteriormente lisados a 4°C en un buffer de lisis conteniendo: Igepal 1%, NaCl 150 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, Na₃VO₄ 1mmol/L, NaF 1 mmol/L, Tris 50 mmol/L pH: 7,4, PMSF 1 mmol/L, aprotinin 1 μ g/mL, leupeptin 1 μ g/mL y pepstatin 1 μ g/mL. El lisado fue centrifugado durante 15 minutos a

4°C a 12 000 x g. El sobrenadante obtenido fue recolectado y almacenado a -80°C hasta su procesamiento. El contenido de proteínas en el sobrenadante fue determinado utilizando un kit para ensayo de proteínas de Bio-Rad.

a.2) Receptores activadores de la proliferación peroxisomal : PPAR γ y PPAR α .

La preparación del extracto proteico se realizó según el método descrito por Welters y col. (2004). Aproximadamente 200 islotes de cada animal perteneciente a cada uno de los lotes experimentales (aislados como se describió en el ítem **3.4.1**) fueron lavados 2 veces con buffer fosfato salino (PBS) frío y posteriormente lisados durante 10 minutos a 4°C en un buffer de lisis conteniendo: Tris 20 mmol/L pH: 7,4, NaCl 150 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, Triton X-100 1% y cocktail inhibidor de proteasas 1 μ L/mL. El lisado fue centrifugado durante 10 minutos a 4°C a 13 000 x g y el sobrenadante obtenido fue recolectado y almacenado a -80°C hasta su procesamiento. El contenido de proteínas en el sobrenadante fue determinado según se describió previamente.

a.3) Proteína desacoplante UCP 2.

La preparación del extracto proteico se realizó según el método descrito por Lameloise y col. (2001). Aproximadamente 200 islotes de cada animal perteneciente a cada uno de los lotes experimentales (aislados como se describió en el ítem **3.4.1**) fueron homogeneizados en un buffer conteniendo: sacarosa 250 mmol/L, EGTA 0,5 mmol/L, Hepes 5 mmol/L y cocktail inhibidor de proteasas 1 μ L/mL. El homogenato fue centrifugado a 800 x g durante 3 minutos a 4 °C y el sobrenadante obtenido fue recolectado y almacenado a -80°C hasta su utilización. El contenido de proteínas en el sobrenadante fue determinado según se describió previamente.

b) Análisis por Western Blot

b.1) Transportador de glucosa GLUT 2 y enzimas glucoquinasa (GQ) y hexoquinasa (HQ).

Las muestras (50 μ g de proteína/calle para GLUT 2 y 80 μ g de proteína/calle para GQ y HQ) se desnaturalizaron durante 3 minutos a ebullición en un buffer de muestra Laemmli y fueron resueltas por electroforesis en un gel de poliacrilamida (al 10% para GLUT 2 y 9% para GQ y HQ) conteniendo dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Las proteínas del gel se electro-transfirieron (50 volts constantes) a una membrana de

fluoruro de polivinilideno (PVDF) durante toda la noche a 4°C empleando un buffer de transferencia (pH: 8,8) que contenía: Tris 20 mmol/L, glicina 150 mmol/L, SDS 0,01% y metanol 20%. Las membranas fueron bloqueadas con Tris buffer conteniendo Tween 20 0,1% y leche descremada 5% durante 6 horas a 4°C con agitación.

Para el inmunobloting las membranas se expusieron al anticuerpo primario específico policlonal: anti-GLUT 2 (dilución: 1/2000) (H-67: sc-9117, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-glucoquinasa (dilución: 1/400)(H-88: sc-7908, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) o anti-hexoquinasa (dilución:1/800)(N-19: sc-6517, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) durante toda la noche a 4°C con agitación. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario (dilución: 1/2000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) conjugado con horseradish-peroxidasa durante 2 horas, con agitación y a temperatura ambiente. Las bandas fueron visualizadas por quimioluminiscencia de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Super Signal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Pierce Biotechnology, Rockford, IL). La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el software para capturar imágenes del National Institute of Health (Bethesda, MD).

La relación entre la cantidad de muestra procesada en el inmunoblotting y la intensidad de señal observada fue lineal bajo las condiciones previamente descritas. Estudios preliminares mostraron una linealidad en el ensayo de Western blot entre 20 y 100 µg de proteína. El coeficiente de correlación entre la cantidad de proteína y la intensidad de la señal observada fue de 0,96 (GLUT 2); 0,95 (GQ) y 0,98 (HQ).

Los niveles de la masa proteica de las proteínas en estudio fueron normalizados con los niveles de la masa proteica del marcador β actina (C4: sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Como control positivo de las proteínas en estudio se empleó un extracto de tejido hepático.

b.2) Receptores activadores de la proliferación peroxisomal : PPAR γ y PPAR α .

Para la cuantificación del PPAR γ 40 µg de proteína/calle fueron resueltas por SDS-PAGE en un gel al 10%, mientras que para la cuantificación del PPAR α 50 µg de proteína/calle fueron resueltas por SDS-PAGE en un gel al 12%.

Las proteínas del gel se electro-transfirieron (60 volts constantes) a una membrana de PVDF durante toda la noche a 4°C siguiendo la metodología descrita en el ítem

III.b.1. Para el inmunobloting las membranas se expusieron al anticuerpo primario específico policlonal: anti-PPAR γ (dilución: 1/300) (H-100: sc-7196, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) o anti-PPAR α (dilución: 1/300) (H-98: sc 9000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) durante toda la noche a 4°C con agitación. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario como se describió en el ítem **III.b.1.**, las bandas fueron visualizadas y cuantificadas según se describió previamente.

La relación entre la cantidad de muestra procesada en el inmunoblotting y la intensidad de señal observada fue lineal bajo las condiciones previamente descritas. Estudios preliminares mostraron una linealidad en el ensayo de Western blot entre 20 y 80 μ g de proteína para las proteína en estudio. El coeficiente de correlación entre la cantidad de proteína y la intensidad de la señal observada fue de 0,93 para PPAR γ y 0,95 para PPAR α .

Los niveles de la masa proteica de las proteínas analizadas fueron normalizados con los niveles de la masa proteica del marcador β actina. Como control positivo de PPAR γ se utilizó un extracto de músculo gastronemio y como control positivo de PPAR α un extracto de tejido hepático.

b.3) Proteína desacoplante UCP 2.

Las muestras (80 μ g de proteína/calle) fueron resueltas por SDS-PAGE en un gel al 14%. Las proteínas del gel se electro-transfirieron (150 mA constantes) a una membrana de nitrocelulosa durante toda la noche a 4°C empleando un buffer de transferencia (pH: 8,8) que contenía: Tris 20 mmol/L, glicina 150 mmol/L, SDS 0,1% y metanol 20%. Las membranas fueron bloqueadas como se describió previamente en el ítem **III.b.1.** Para el inmunobloting las membranas se expusieron al anticuerpo primario específico policlonal: anti-UCP 2 (dilución: 1/300) (N-19: sc-6526, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) durante toda la noche a 4°C con agitación. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario como se describió en el ítem **III.b.1.**, las bandas fueron visualizadas y cuantificadas según se describió previamente.

La relación entre la cantidad de muestra procesada en el inmunoblotting y la intensidad de señal observada fue lineal bajo las condiciones previamente descritas. Estudios preliminares mostraron una linealidad en el ensayo de Western blot entre 20 y 100 μ g

de proteína. El coeficiente de correlación entre la cantidad de proteína y la intensidad de la señal observada fue de 0,92.

Los niveles de la masa proteica de la proteína UCP 2 fueron normalizados con los niveles de la masa proteica del marcador β actina. Como control positivo de la proteína en estudio se empleó un extracto de bazo.

4) REACTIVOS UTILIZADOS

El aceite de hígado de bacalao fue provisto por ICN (Costa Mesa, CA, USA). Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las técnicas de western blot para las determinaciones de las masas proteicas fueron provistos por Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Enzimas, sustratos y coenzimas empleados en las técnicas previamente detalladas fueron provistos por SIGMA (St. Louis, Mo., USA). Los demás reactivos son de grado analítico (máxima pureza disponible comercialmente).

5) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES.

El tamaño de las muestras fue calculado en base a las mediciones realizadas previamente en nuestro laboratorio con ratas alimentadas tanto con dieta control (DC) como con dieta rica en sacarosa (DRS) considerando un poder del 80% (Gutman y col., 1987; Lombardo y col., 1996a; Soria y col., 2002; Rossi y col., 2005).

Los resultados experimentales se expresan como media \pm SEM. Las diferencias estadísticas entre los grupos pertenecientes a un determinado protocolo experimental se determinaron por ANOVA (análisis de la varianza), con un factor (dieta), seguidas de la inspección de las diferencias entre pares de medias mediante test de Newman - Keuls. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. En todos los casos lo coeficientes de correlación intraclase fueron de al menos 0,73. Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS versión 17.0.

RESULTADOS

RESULTADOS

Como mencionáramos en el capítulo “Introducción”, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que el perfil metabólico y hormonal observado en ratas alimentadas con DRS por un corto período de tiempo (3-5 semanas) difiere de aquel que se observa luego de la administración prolongada de la dieta (15-40 semanas). En términos generales luego de 3-5 semanas de ingesta se observaron cambios en la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa con presencia de hiperinsulinemia que logran compensar el estado de RI global manteniendo la normogluceemia (*adaptación de la célula β*). Sin embargo el consumo crónico de DRS (15-40 semanas) deteriora el patrón de secreción de la hormona (*disfunción de la célula β*) con moderada hipergluceemia.

Además, los n-3 PUFA de origen marino (EPA 20:5, n-3 y DHA 22:6, n-3) dietario son capaces de prevenir y/o revertir la RI inducida por administración de dietas ricas en hidratos de carbono simples. En este contexto y en función de los antecedentes del tema previamente mencionados en el capítulo “Introducción”, analizamos:

I) A nivel pancreático algunos mecanismos bioquímicos – moleculares involucrados en la **adaptación/disfunción** de la célula β en ratas dislipémicas insulino resistentes alimentadas con DRS durante 22 o 240 días.

II) Si las alteraciones funcionales de la célula β que se desarrollan con la administración de DRS durante 22 o 240 días pueden ser **prevenidas y/o revertidas** mediante la sustitución parcial del tipo de ácidos grasos dietarios AM (rico en ácidos grasos n-6) por AHB (rico en n-3 PUFA: EPA y DHA).

Para lograr estos objetivos diseñamos 2 protocolos experimentales como se mencionó en la sección “MATERIALES Y METODOS”.

Los animales pertenecientes al *Protocolo Experimental 1* se dividieron en 3 grupos: DC (dieta control), DRS (dieta rica en sacarosa) y DRS + AHB (dieta rica en sacarosa + aceite de hígado de bacalao) y consumieron sus respectivas dietas durante un período de 22 días. Los animales incluidos en el *Protocolo Experimental 2* se dividieron inicialmente en 2 grupos: DC y DRS y consumieron sus respectivas dietas durante un período de 180 días. Al cabo de éste tiempo los animales alimentados con DRS se

dividieron en 2 subgrupos: DRS y DRS + AHB. Los 3 grupos DC, DRS y DRS + AHB continuaron con sus respectivas dietas hasta el final de la experiencia (240 días).

PARTE 1

En primer lugar evaluamos algunos aspectos generales que caracterizan el modelo DRS previamente descrito en los períodos mencionados (22 días y 240 días de ingesta): incremento de peso corporal, eficiencia calórica, metabolitos plasmáticos (glucosa, insulina, triglicéridos y AGNE) y el efecto de la sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria (AM por AHB) sobre estos parámetros.

1.1 INCREMENTO DE PESO CORPORAL, INGESTA CALORICA Y ADIPOSIDAD.

El peso corporal y la ingesta calórica fueron cuidadosamente monitoreados en los animales pertenecientes a los diferentes grupos dietarios de cada protocolo experimental. El peso corporal se expresa en gramos y la ingesta calórica en kJ/día.

Como puede observarse en las **Tablas 6A** (protocolo experimental 1) y **6B** (protocolo experimental 2) las diferentes dietas fueron aceptadas y asimiladas por los animales en forma adecuada.

Los animales de los diferentes grupos dietarios (DC, DRS y DRS + AHB) pertenecientes al protocolo experimental 1 (22 días) presentaron valores similares de peso corporal, ganancia de peso, ingesta calórica y pesos de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal al final del período experimental (**Tabla 6A**).

Sin embargo, como se observa en la **Tabla 6B**, cuando el período de administración de las dietas se extendió a 180 días los animales alimentados con DRS presentaron un incremento significativo ($p < 0,05$) del peso corporal (16 – 18 %), de la ganancia de peso y de la ingesta calórica (~20%) al compararlos con los animales alimentados con DC. Estas diferencias entre ambos grupos se mantuvieron hasta alcanzar el final del período experimental (240 días). La sustitución de la fuente de grasa dietaria AM por AHB en el grupo DRS condujo a una moderada reducción de la ganancia de peso en estos animales (DRS + AHB) aunque la ingesta calórica fue similar en ambos grupos.

Más aún, el incremento de peso e ingesta calórica observado con la ingesta crónica de sacarosa se acompañó de un incremento en el peso del tejido adiposo epididimal y

retroperitoneal expresado como peso total (g) o relativo al peso corporal (g/100g rata) (**Tabla 6B**). El cambio parcial en la fuente de grasa de la dieta durante los últimos 60 días logró disminuir el peso de los tejidos mencionados aunque no se alcanzaron los valores obtenidos en el grupo control. Estos datos concuerdan con hallazgos obtenidos previamente en nuestro grupo (Rossi y col., 2005; Rossi y col., 2010).

Tabla 6A. Peso corporal, ganancia de peso, ingesta calórica y peso del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) durante 22 días (Protocolo experimental 1).¹

<i>PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1</i>			
	DC	DRS	DRS + AHB
	(8)	(8)	(8)
PESO CORPORAL (g)			
<i>Inicial</i>	189,2 ± 2,6	194,9 ± 3,5	197,0 ± 2,6
<i>Final</i>	285,7 ± 4,5	297,4 ± 6,4	299,3 ± 5,5
GANANCIA DE PESO (g)			
	96,5 ± 5,4	102,4 ± 4,1	102,3 ± 5,4
INGESTA CALORICA (kJ/día)			
	295,0 ± 9,0	299,0 ± 13,0	290,0 ± 10,0
TEJIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL			
<i>Peso total (g)</i>	2,78 ± 0,11	3,05 ± 0,13	2,90 ± 0,15
<i>Peso relativo (g/100g peso corporal)</i>	1,19 ± 0,06	1,24 ± 0,03	1,12 ± 0,07
TEJIDO ADIPOSEO RETROPERITONEAL			
<i>Peso total (g)</i>	2,66 ± 0,12	2,98 ± 0,14	2,87 ± 0,13
<i>Peso relativo (g/100g peso corporal)</i>	1,16 ± 0,04	1,12 ± 0,05	1,07 ± 0,05

¹ Los valores se expresan como media ± SEM. Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes (p<0,05) cuando cada variable es comparada por el test de Newman - Keuls. Los números entre paréntesis indican el número de animales utilizados en cada grupo experimental.

Tabla 6B. Peso corporal, ganancia de peso, ingesta calórica y peso del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) durante 240 días (Protocolo experimental 2).¹

<i>PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2</i>			
	DC (8)	DRS (16)	DRS + AHB
PESO CORPORAL (g)			
<i>Inicial</i>	192,5 ± 5,7	196,9 ± 3,6	
<i>180 días</i>	443,7 ± 9,7 ^b	501,7 ± 8,1 ^a	
<i>240 días</i>	473,1 ± 9,0 ^b	535,9 ± 13,4 ^a	514,3 ± 9,7 ^a
GANANCIA DE PESO (g)			
<i>0 - 180 días</i>	251,3 ± 9,6 ^b	317,9 ± 15,1 ^a	
<i>180 - 240 días</i>	29,3 ± 4,1 ^a	31,4 ± 4,1 ^a	16,4 ± 3,0 ^b
INGESTA CALORICA (kJ/día)			
<i>0 - 180 días</i>	283,7 ± 12,0 ^b	351,0 ± 11,9 ^a	
<i>180 - 240 días</i>	281,3 ± 6,2 ^b	347,0 ± 11,8 ^a	333,4 ± 6,5 ^a
TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL			
<i>Peso total (g)</i>	7,65 ± 0,65 ^c	14,10 ± 0,86 ^a	10,76 ± 0,51 ^b
<i>Peso relativo (g/100g rata)</i>	1,59 ± 0,07 ^c	2,80 ± 0,10 ^a	2,14 ± 0,08 ^b
TEJIDO ADIPOSO RETROPERITONEAL			
<i>Peso total (g)</i>	6,20 ± 0,45 ^c	12,75 ± 0,43 ^a	10,10 ± 0,57 ^b
<i>Peso relativo (g/100g rata)</i>	1,30 ± 0,10 ^c	2,60 ± 0,09 ^a	2,01 ± 0,13 ^b

¹ Los valores se expresan como media ± SEM. Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes (p<0,05) cuando cada variable es comparada por el test de Newman - Keuls. Los números entre paréntesis indican el número de animales utilizados en cada grupo experimental. Los animales alimentados con DRS (n=16) consumieron dicha dieta durante 180 días y luego se subdividieron en los grupos DRS (n=8) y DRS + AHB (n=8). (para más detalles del diseño experimental ver **Figura 11** , sección Materiales y Métodos)

1.2 METABOLITOS Y NIVELES DE INSULINA EN SUERO, SENSIBILIDAD INSULINICA PERIFERICA GLOBAL (Clamp Euglucémica-Hiperinsulinémica) Y CONTENIDO DE TRIGLICERIDOS HEPATICOS.

Las **Tablas 7A y 7B** muestran que los animales alimentados con DRS presentaron, al final de cada período experimental (22 días y 240 días), niveles séricos de TG y AGNE significativamente superiores ($p < 0,05$) a los observados en animales de igual sexo y edad alimentados con DC. A su vez, cuando la DRS se administró en forma crónica (240 días), ambos parámetros fueron significativamente ($p < 0,05$) superiores a los observados en el corto plazo (22 días).

Al sustituir parcialmente la fuente de grasa dietaria AM por AHB en el grupo DRS en ambos protocolos experimentales en estudio, los valores hallados en los parámetros mencionados fueron similares a los observados en los animales controles de igual edad, en concordancia con resultados previos (Rossi y col., 2005; Hein y col., 2012).

A los 22 días de ingesta la dislipidemia presente en la DRS se acompañó de normoglucemia, hiperinsulinemia y mayor relación insulina/glucosa. Cuando la ingesta se extendió a 240 días un patrón diferente acompañó la dislipidemia: moderada hiperglucemia con normoinsulinemia y menor relación insulina/glucosa.

Cuando el AHB estuvo presente en la dieta de los animales pertenecientes a ambos protocolos experimentales, los valores séricos de glucosa e insulina y la relación insulina/glucosa fueron similares a los del grupo DC de igual sexo y edad.

El conjunto de estos hallazgos confirma datos obtenidos en trabajos previos de nuestro grupo (Lombardo y col., 1996b; Chicco y col., 2003; Pighin y col., 2003).

Finalmente en las **Tablas 7A y 7B** se muestra la velocidad de infusión de glucosa (VIG), determinada por la clamp euglucémica-hiperinsulinémica, como una medida de la sensibilidad insulínica periférica global. La VIG fue significativamente menor ($p < 0,05$) en ratas alimentadas con DRS al final de cada período experimental (22 días y 240 días) cuando se comparó con los respectivos controles de igual edad. Un deterioro más significativo de la sensibilidad insulínica periférica global se observa cuando la ingesta se prolongó durante 240 días, lo que confirma el progresivo deterioro en la sensibilidad insulínica.

Confirmando hallazgos previos (Rossi y col., 2005, D'Alessandro y col., 2012), una normalización de la VIG se observa al sustituir parcialmente la fuente de grasa dietaria (AM por AHB) en ambos protocolos experimentales. Cabe destacar que no se observaron cambios significativos en el hematocrito de los diferentes grupos experimentales durante el transcurso de la clamp (datos no mostrados).

La dislipidemia observada en ambos períodos experimentales (22 días y 240 días) se acompaña de un incremento en el contenido de TG hepáticos. Por su parte, la administración de AHB normaliza estos parámetros que alcanzan valores similares a los correspondientes controles etarios. Los valores hallados fueron los siguientes: (media \pm SEM, n=6) ($\mu\text{mol/g TH}$) **22 días**, DC: $10,08 \pm 0,47$; DRS: $17,40 \pm 1,00^*$; DRS + AHB: $11,1 \pm 0,65$; * $p < 0,05$ DRS vs DC y DRS + AHB. **240 días**, DC: $12,02 \pm 0,66$; DRS: $21,12 \pm 1,24^*$; DRS + AHB: $13,4 \pm 0,50$; * $p < 0,05$ DRS vs DC y DRS + AHB.

Tabla 7A. Metabolitos y niveles de insulina en suero, relación insulina/glucosa y sensibilidad insulínica periférica global (VIG) en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) durante 22 días (Protocolo Experimental1).¹

	<i>PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1</i>		
	DC	DRS	DRS + AHB
TG (mmol/L)	0,77 ± 0,07^b	1,69 ± 0,06^a	0,82 ± 0,05^b
AGNE (µmol/L)	257,4 ± 6,8^b	486,0 ± 30,4^a	275,0 ± 20,0^b
Glucosa (µmol/mL)	6,75 ± 0,13	6,54 ± 0,14	6,90 ± 0,30
Insulina (µU/mL)	53,70 ± 2,70^b	83,08 ± 1,47^a	43,20 ± 5,47^b
Relación Ins/Glu (µU/µmol)	8,05 ± 0,45^b	12,65 ± 0,90^a	7,40 ± 0,60^b
VIG [mg glucosa/(kg.min)]	11,50 ± 0,70^a	8,95 ± 0,50^b	11,20 ± 0,67^a

¹ Los valores se expresan como media ± SEM (al menos 6 animales fueron utilizados en cada grupo experimental). Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada variable es comparada por el test de Newman – Keuls en cada protocolo experimental.

Tabla 7B. Metabolitos y niveles de insulina en suero, relación insulina/glucosa y sensibilidad insulínica periférica global (VIG) en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) durante 240 días (Protocolo Experimental 2).¹

	<i>PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2</i>		
	DC	DRS	DRS + AHB
TG (mmol/L)	0,90 ± 0,07^b	2,60 ± 0,16^a	1,00 ± 0,07^b
AGNE (µmol/L)	275,6 ± 8,1^b	837,6 ± 32,2^a	289,0 ± 6,30^b
Glucosa (µmol/mL)	6,36 ± 0,18^b	8,28 ± 0,20^a	6,62 ± 0,12^b
Insulina (µU/mL)	53,28 ± 2,38	52,42 ± 3,46	51,55 ± 3,26
Relación Ins/Glu (µU/µmol)	8,57 ± 0,64^a	6,53 ± 0,40^b	8,24 ± 0,30^a
VIG [mg glucosa/(kg.min)]	10,78 ± 0,36^a	4,92 ± 0,40^b	11,81 ± 0,45^a

¹ Los valores se expresan como media ± SEM (al menos 6 animales fueron utilizados en cada grupo experimental). Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada variable es comparada por el test de Newman – Keuls en cada protocolo experimental.

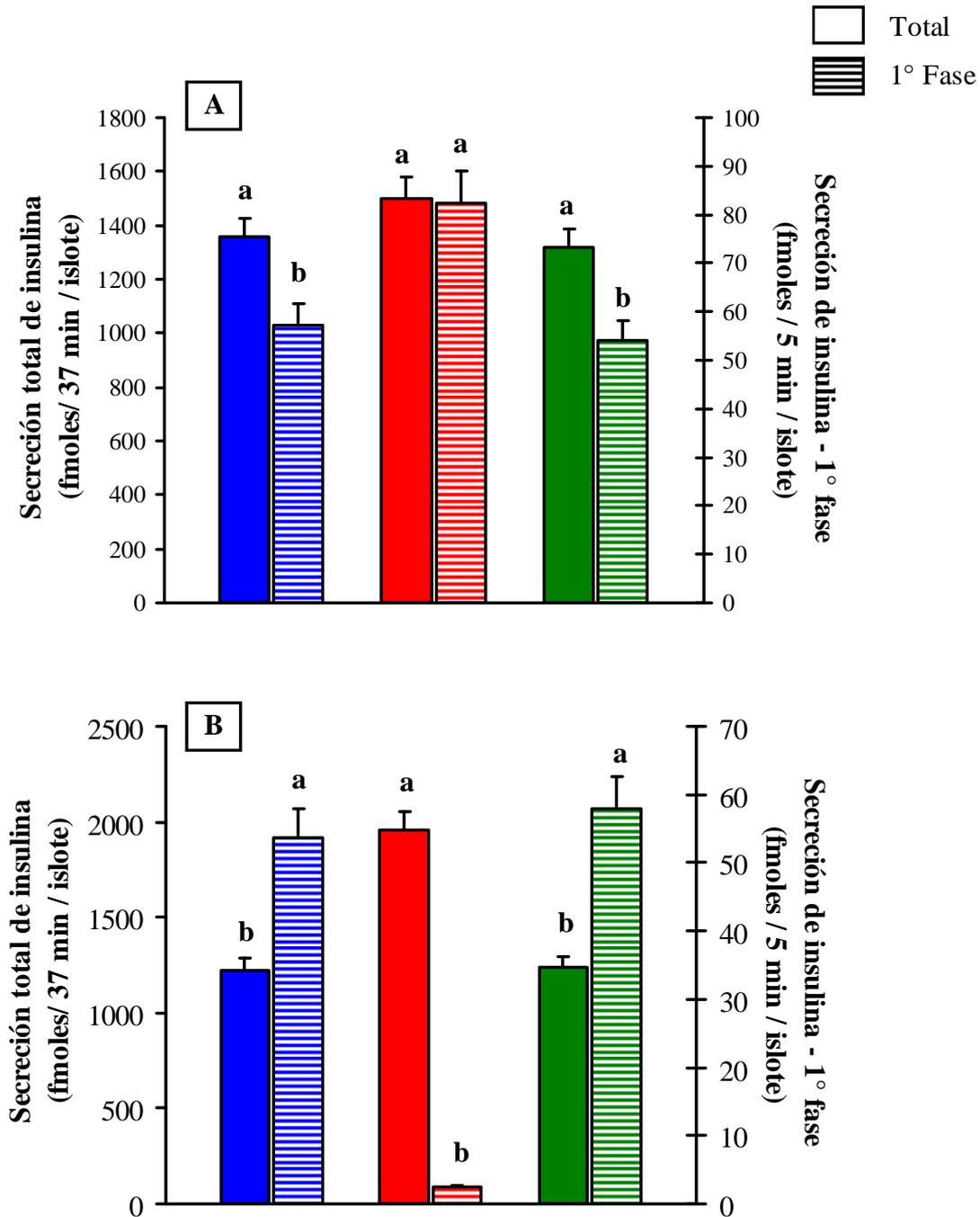
1.3 SECRECIÓN DE INSULINA FRENTE AL ESTIMULO DE LA GLUCOSA

La **Figura 12** muestra la secreción total de insulina (3-40 minutos) y la insulina liberada durante la primer fase de secreción (3-7 minutos) en islotes perifundidos de animales alimentados con DC, DRS y DRS + AHB durante 22 días (protocolo experimental 1) (**Figura 12A**) y 240 días (protocolo experimental 2) (**Figura 12B**).

En la **Figura 12A**, observamos que el total de insulina liberada por los islotes de los animales alimentados con DRS durante 22 días (protocolo experimental 1) fue similar al observado en los islotes de los animales alimentados con DC de igual sexo y edad. Sin embargo, los valores de insulina liberada en la primer fase de secreción fueron superiores ($p < 0,05$) a los valores hallados en el grupo control. Los islotes de los animales alimentados con DRS + AHB presentaron un comportamiento similar al grupo DC.

Cuando el período de administración de las dietas se extendió a 240 días (protocolo experimental 2) la liberación de insulina por parte de los islotes perifundidos de los animales alimentados con DRS fue claramente diferente al patrón observado en el grupo DC de igual sexo y edad. Si bien la secreción de insulina creció sostenidamente durante el transcurso de la perfusión (40 minutos) el primer pico de secreción de la hormona estuvo prácticamente ausente, puesto que los valores hallados en esta fase fueron inferiores alcanzando apenas el 10% de los hallados en los animales alimentados con DC; mientras que el total de insulina liberada fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que sus respectivos controles etarios. El cambio parcial en la fuente de grasa dietaria (AM por AHB) logró normalizar el patrón de secreción insulina siendo los valores hallados similares a los obtenidos en el grupo DC. Los resultados en éste período experimental concuerdan con los obtenidos previamente por Pighin y col. (2003).

Figura 12. Secreción de insulina bajo el estímulo de la glucosa (16,5 mmol/L) en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) durante (A) 22 días (Protocolo Experimental 1) o (B) 240 días (Protocolo Experimental 2).¹



¹ Los valores se expresan como media \pm SEM. (6 animales se utilizaron en cada grupo experimental). Los valores que no comparten la misma letra son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada con el test de Newman-Keuls en cada fase de secreción correspondiente a cada protocolo experimental. ■ DC ■ DRS ■ DRS + AHB.

Los resultados hasta aquí expuestos, sumado a los observados en trabajos previos de nuestro grupo (Chicco y col., 2003; Lombardo y col., 2007) nos permiten corroborar que la administración de DRS a ratas normales induce cambios metabólicos y hormonales que dependen del tiempo durante el cual ésta es administrada. Así, el modelo evoluciona desde normoglucemia con hiperinsulinemia (22 días de ingesta) a moderada hiperglucemia con normoinsulinemia (240 días de ingesta). Con la cronicidad de la dieta el patrón de secreción de insulina y la sensibilidad insulínica periférica global se deterioran, la dislipidemia se hace más pronunciada (aumento de triglicéridos y AGNE) y se acompaña de un aumento en el peso corporal asociado a un incremento en la adiposidad visceral.

La sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria (AM rico en ácidos grasos n-6, por AHB rico en ácidos grasos n-3) fue capaz de prevenir la aparición de las alteraciones mencionadas en los animales alimentados con DRS durante un corto período de tiempo (22 días). Por otra parte, cuando el AHB fue administrado durante los últimos 60 días de ingesta en los animales alimentados crónicamente con DRS (240 días) fue capaz de normalizar el perfil lipídico, la moderada hiperglucemia, la sensibilidad insulínica y la secreción de insulina, sin modificar los niveles plasmáticos de la hormona. Además, logró reducir la ganancia de peso corporal y mejorar la adiposidad visceral.

Los mecanismos bioquímicos-moleculares involucrados en la adaptación/disfunción de la célula β observada en el modelo DRS no han sido completamente dilucidados. Teniendo en cuenta los numerosos eventos mencionados en la “Introducción” que podrían estar involucrados en los procesos de adaptación/disfunción de la célula β frente a estados de insensibilidad insulínica, es posible que entre los mecanismos pudieran estar implicados: a) cambios en el transporte y/o metabolización de la glucosa en la célula β , b) cambios en los niveles de PPARs (los cuales regulan el metabolismo de la glucosa y los lípidos en el interior de la célula β), c) alteraciones en los niveles de la proteína desacoplante UCP2 (proteína que se relaciona de manera inversa con los niveles de ATP y la secreción de insulina), d) cambios en el contenido de TG en el interior de la célula β .

En este contexto, el siguiente propósito del presente trabajo de tesis fue evaluar en ratas macho Wistar el efecto del consumo de una DRS sobre diversas vías metabólicas de la

célula β pancreática que impactan sobre la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa, a fin de dilucidar los posibles mecanismos que conducirían al progresivo deterioro de la liberación de la hormona observado en este modelo de dislipemia y RI. Además analizamos el efecto de la sustitución parcial de la grasa dietaria AM por AHB sobre los mismos parámetros.

PARTE 2: ANALISIS DE ALGUNOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ADAPTACION/DISFUNCION DE LA CELULA β EN ISLOTES PANCREATICOS DE ANIMALES ALIMENTADOS CON DRS DURANTE 22 DIAS y 240 DIAS. EFECTO DE LOS n-3 PUFA.

De lo expuesto, consideramos importante extender los conocimientos previos analizando en islotes pancreáticos de animales alimentados con DRS durante 22 o 240 días:

1. El contenido de TG
2. Los niveles de la masa proteica del transportador de glucosa GLUT 2.
3. La actividad de las enzimas fosforilantes de la glucosa GQ y HQ y del complejo PDHc como estimación de la vía oxidativa de la glucosa.
4. Los niveles de la masa proteica de las enzimas GQ y HQ.
5. Los niveles de la masa proteica del PPAR γ y PPAR α .
6. Los niveles de la masa proteica de la UCP2.

Considerando que la sustitución parcial de la fuente grasa dietaria (AM por AHB) en los animales alimentados con DRS fue capaz de prevenir (protocolo experimental 1) y revertir (protocolo experimental 2) los cambios en el patrón de secreción de insulina evaluamos el efecto de tal sustitución sobre los parámetros antes mencionados.

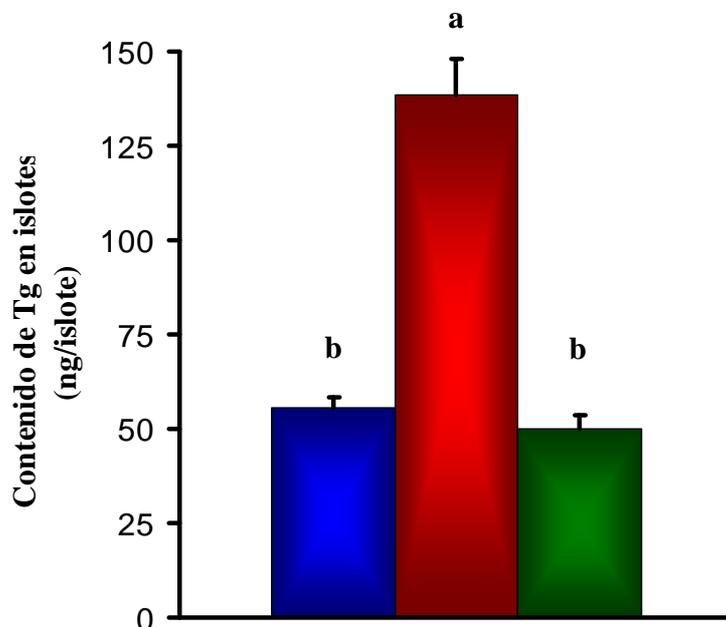
Los resultados alcanzados se exponen a continuación:

2.1 CONTENIDO DE TRIGLICERIDOS

El contenido de TG en islotes pancreáticos aislados de los animales alimentados con DRS durante 22 días (protocolo experimental 1) no mostró diferencias estadísticamente significativas al ser comparado con los valores obtenidos en islotes aislados de animales controles de igual sexo y edad. Por su parte, el lote de animales alimentados con DRS + AHB mostró valores similares a los hallados en el grupo DC. Los valores obtenidos fueron los siguientes: (media \pm SEM, n=6) (ng/islote) DC: $65,2 \pm 6,1$; DRS: $58,2 \pm 5,4$; DRS + AHB: $62,0 \pm 5,7$.

Cuando el período de administración de las dietas se extendió a 240 días (protocolo experimental 2) observamos un incremento ($p < 0,05$) en el contenido de TG en los islotes de los animales alimentados con DRS al compararlos con los controles etarios. El cambio en la fuente de grasa dietaria durante los últimos 60 días de la experiencia (grupo DRS + AHB) logró normalizar este parámetro (**Figura 13**).

Figura 13. Contenido de TG en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) al final del período experimental (240 días).¹



¹ Los valores se expresan como media \pm SEM. (6 animales se utilizaron en cada grupo experimental). Los valores que no comparten la misma letra son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada con el test de Newman-Keuls.

■ DC ■ DRS ■ DRS + AHB.

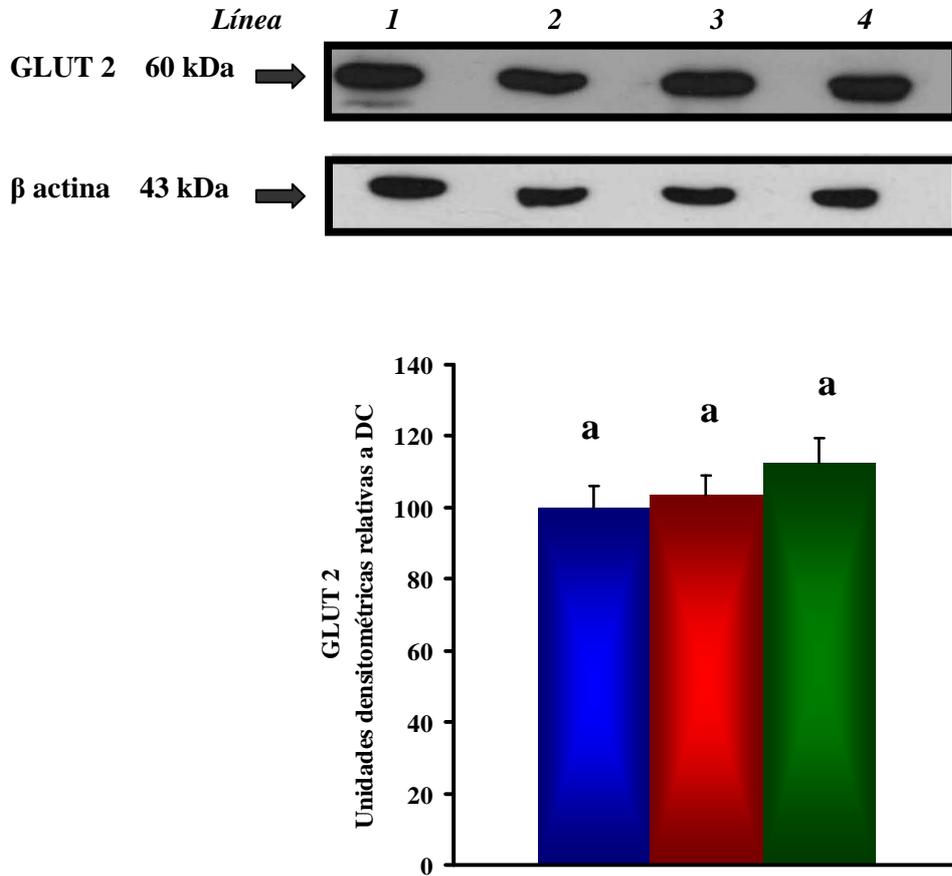
2.2 NIVELES DE LA MASA PROTEICA DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT 2.

El inmunoblot de islotes pancreáticos aislados de los animales pertenecientes a los diferentes grupos dietarios de cada protocolo experimental reveló una única banda de 60 kDa consistente con el transportador de glucosa de la célula β GLUT 2. Luego del análisis densitométrico de los inmunoblots el contenido de GLUT 2 de los grupos DC correspondientes a cada protocolo experimental fue normalizado al 100% y los valores obtenidos en los grupos DRS y DRS + AHB fueron expresados como el porcentaje relativo al grupo DC correspondiente a cada período experimental.

Los niveles de la masa proteica del transportador de glucosa GLUT 2 fueron similares en los 3 grupos dietarios (DC, DRS y DRS + AHB) en cada período experimental (22 y 240 días) analizado. Los valores hallados fueron los siguientes: (media \pm SEM, n=6) (Unidades densitométricas relativas a DC) **22 días**, DC: $100,0 \pm 3,5$; DRS: $103,7 \pm 5,0$; DRS+AHB: $112,4 \pm 6,0$. **240 días**, DC: $100,0 \pm 3,2$; DRS: $96,0 \pm 4,5$; DRS + AHB: $96,1 \pm 6,0$.

La **Figura 14** muestra una representación del inmunoblot (*Panel superior*) y análisis densitométrico (*Panel inferior*) de ambos períodos experimentales.

Figura 14. Niveles de la masa proteica del GLUT 2 en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo Experimental 1 (22 días).¹



¹ *Panel superior:* Inmunoblot del GLUT 2 y β actina de islotes aislados de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS + AHB durante 22 días. El marcador molecular se muestra a la izquierda. *Línea 1:* extracto de tejido hepático, utilizado como control positivo; *Línea 2:* DC; *Línea 3:* DRS; *Línea 4:* DRS + AHB.

² *Panel Inferior:* Análisis densitométrico de la masa proteica del GLUT 2 en islotes pancreáticos aislados. Los valores se expresan como media \pm SEM relativos a DC y corregidos por los niveles de β actina presentes en cada una de las muestras. (6 animales se utilizaron en cada grupo experimental). Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada por el test de Newman-Keuls .

■ DC ■ DRS ■ DRS + AHB.

2.3 ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS FOSFORILANTES DE LA GLUCOSA: GLUQUINASA Y HEXOQUINASA.

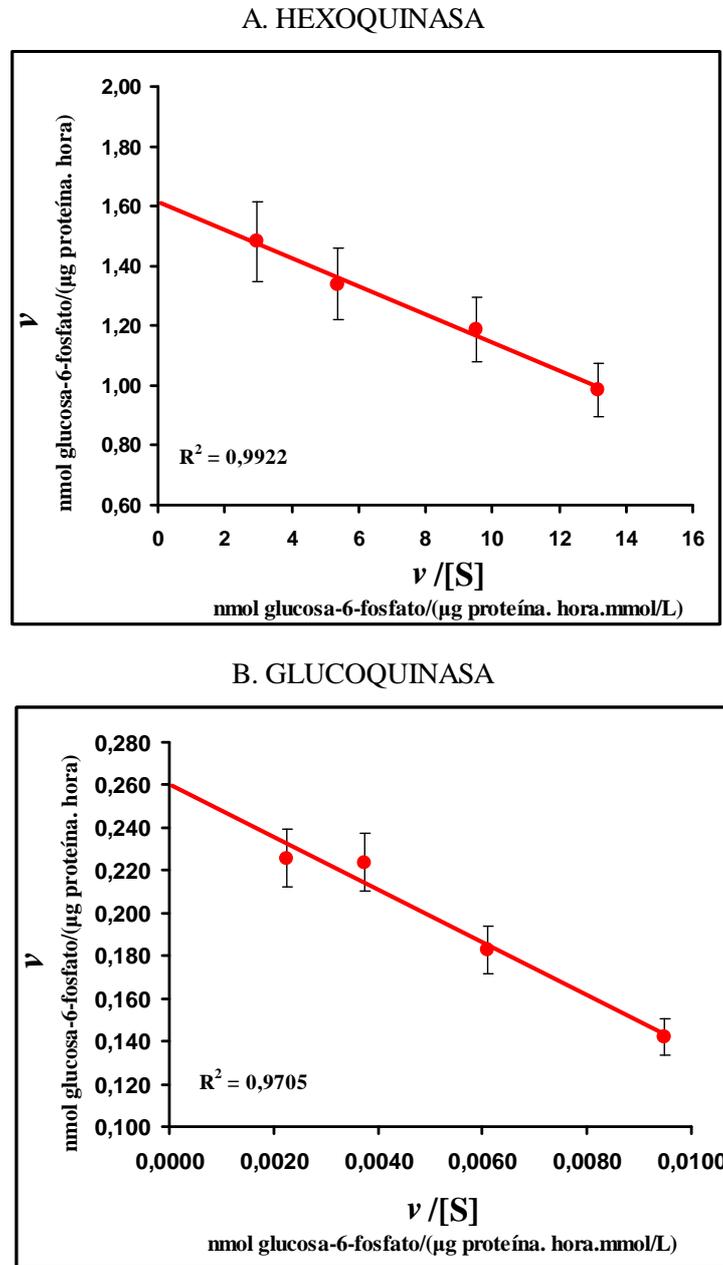
a) Caracterización cinética de las enzimas GQ y HQ.

En las células de mamíferos la fosforilación de la glucosa es catalizada por una familia de enzimas denominadas hexoquinasas, cada una de las cuales posee propiedades cinéticas únicas y un patrón de distribución diferente.

Como mencionamos en el capítulo “Introducción” la célula β posee 2 tipos de hexoquinasas: HQ y GQ. La HQ es una enzima con una alta afinidad por la glucosa y presenta una constante de Michaelis-Menten (K_m) de $\sim 0,02-0,13$ mM, por lo que se denomina también “enzima de bajo K_m ”. La GQ o hexoquinasa IV en cambio, tiene menor afinidad por la glucosa lo que se refleja en su elevado valor de K_m ($\sim 5-12$ mM) y es denominada también “enzima de alto K_m ” (Printz y col., 1993).

En nuestro estudio caracterizamos ambas enzimas fosforilantes de la glucosa según se describió en detalle en la sección “Materiales y Métodos”. Para ello evaluamos la velocidad de fosforilación de la glucosa a concentraciones crecientes de glucosa (0,075-100 mM) en pools de islotes aislados de ratas alimentadas con DC. Los parámetros cinéticos obtenidos mediante el ploteo de Eadie-Hofstee (v vs $v/[S]$) (**Figuras 15 A y B**) fueron (media \pm SEM, $n=6$ pools de islotes) **HQ:** $K_m: 0,047 \pm 0,006$ mmol/L, $V_{m\acute{a}x}: 1,612 \pm 0,137$ nmol glucosa-6-fosfato/ μ g proteína.hora); **GQ:** $K_m: 12,36 \pm 0,97$ mmol/L, $V_{m\acute{a}x}: 0,260 \pm 0,028$ nmol glucosa-6-fosfato/ μ g proteína.hora).

Figura 15. Análisis cinético de las actividades GQ y HQ en la fracción citosólica de islotes pancreáticos aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC).¹



¹ Los valores aproximados de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para las enzimas HQ y GQ fueron determinados por el ploteo de Eadie – Hofstee que relaciona la velocidad de la reacción con la concentración de sustrato según la siguiente ecuación: $v = -K_m \times v/[S] + V_{m\acute{a}x}$, siendo la pendiente de la gráfica el valor de K_m y la ordenada al origen el valor de $V_{m\acute{a}x}$. Los gráficos muestran la curva promedio obtenida para cada una de las enzimas luego de realizar 6 experimentos por separado (6 pools de islotes).

b) Actividades GQ y HQ

Una vez caracterizadas las enzimas en la fracción citosólica de los islotes de los animales controles, evaluamos la actividad de cada una de las enzimas en los islotes aislados de los animales pertenecientes a los diferentes grupos dietarios de los protocolos experimentales en estudio.

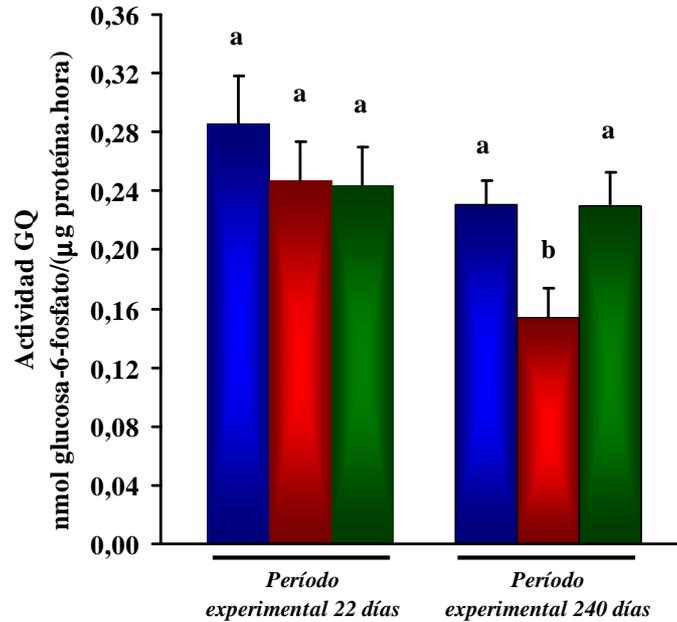
La **Figura 16** muestra la actividad de la enzima GQ de la fracción citosólica de islotes aislados de los animales alimentados con DC, DRS y DRS + AHB al final de los períodos experimentales evaluados (22 días y 240 días).

Los animales alimentados con las diferentes dietas mencionadas pertenecientes al protocolo experimental 1 presentaron valores similares en la actividad glucoquinasa. Sin embargo, cuando el período de administración de las dietas se extendió a 240 días se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la actividad de la GQ en el grupo DRS al ser comparado con el grupo DC. Cuando el AHB reemplazó al AM como fuente de grasa dietaria la actividad de la enzima GQ se normalizó alcanzando valores semejantes al grupo control.

El análisis de la actividad de la enzima HQ no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos dietarios correspondientes a cada protocolo experimental. Los resultados expresados en nmol glucosa-6-fosfato/(μg proteína. hora) fueron: (media \pm SEM, $n=6$) **22 días**, DC: $1,52 \pm 0,06$; DRS: $1,33 \pm 0,07$; DRS + AHB: $1,30 \pm 0,08$. **240 días**, DC: $1,63 \pm 0,07$; DRS: $1,40 \pm 0,09$; DRS + AHB: $1,35 \pm 0,06$.

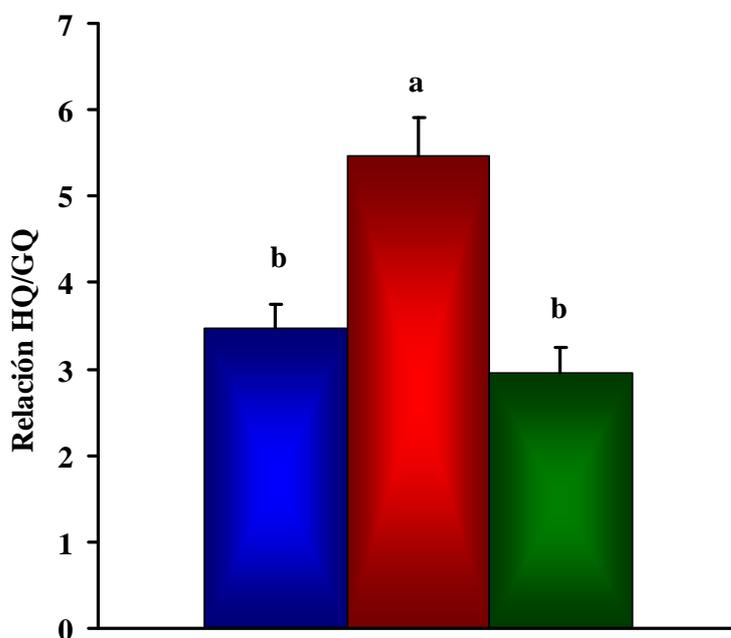
Como consecuencia de los resultados obtenidos mencionados la relación HQ/GQ no se modificó a los 22 días (datos no mostrados) mientras que se encontró significativamente incrementada ($p < 0,05$) en los animales alimentados con DRS durante un período de 240 días al ser comparados con los animales alimentados con dieta control. El grupo DRS + AHB mostró una relación HQ/GQ similar a la hallada en el grupo DC. (**Figura 17**)

Figura 16. Actividad de la enzima glucoquinasa (GQ) en la fracción citosólica de islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo experimental 1 o 2 (22 días o 240 días).¹



¹ Los valores se expresan como media \pm SEM. (6 animales se utilizaron en cada grupo experimental). Los valores que no comparten la misma letra son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada con el test de Newman-Keuls en cada protocolo experimental. ■ DC ■ DRS ■ DRS + AHB.

Figura 17. Relación HQ/GQ en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo experimental 2 (240 días).¹



¹ Los valores se expresan como media \pm SEM. (6 animales se utilizaron en cada grupo experimental). Los valores que no comparten la misma letra son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada con el test de Newman-Keuls.

■ DC ■ DRS ■ DRS + AHB.

2.4 NIVELES DE LA MASA PROTEICA DE LAS ENZIMAS GLUCOQUINASA Y HEXOQUINASA.

A fin de evaluar si podrían existir alteraciones en la cantidad disponible de las enzimas fosforilantes de la glucosa GQ y HQ, cuantificamos por la técnica de Western blot la masa proteica de las enzimas mencionadas en islotes aislados de los animales pertenecientes a los diferentes grupos dietarios (DC, DRS y DRS+AHB) de los protocolos experimentales en estudio.

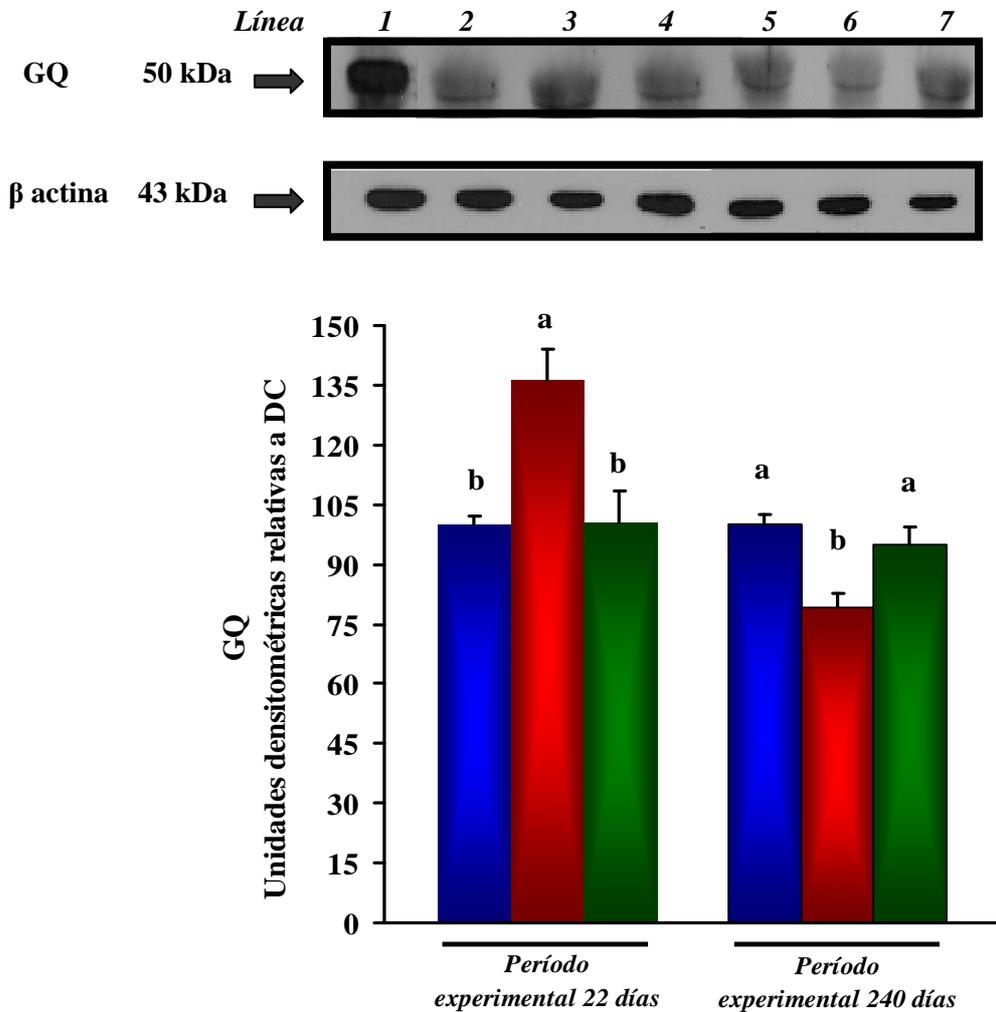
Los inmunoblots de islotes pancreáticos aislados revelaron una banda de 50 kDa y una banda de 109 kDa consistentes con las enzimas GQ y HQ respectivamente. (**Figuras 18 y 19, Panel superior**). Luego del análisis densitométrico de los inmunoblots el contenido de GQ y HQ del grupo DC fue normalizado al 100% y los valores obtenidos en los grupos DRS y DRS + AHB fueron expresados como el porcentaje relativo al grupo DC correspondiente de igual edad y tiempo de ingesta (22 o 240 días). (**Figuras 18 y 19, Panel inferior**)

El análisis cualitativo y cuantitativo de los inmunoblot mostró que la abundancia relativa de la enzima GQ está significativamente aumentada ($p < 0,05$) en la fracción citosólica de los islotes aislados de los animales alimentados con DRS durante 22 días al ser comparados con sus respectivos controles de igual edad. Por otro lado, los animales alimentados con DRS + AHB por el mismo período de tiempo presentaron valores similares al grupo control.

Cuando el período de administración de las dietas se extendió a 240 días, encontramos una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en los niveles de la masa proteica de la enzima GQ en los islotes de los animales alimentados con DRS al compararlos con sus respectivos controles etarios. El cambio en la fuente de grasa AM por AHB logró normalizar el parámetro estudiado, hallándose valores similares al grupo DC (**Figura 18, Panel inferior**).

Al analizar los niveles de la masa proteica de la enzima HQ no observamos cambios en este parámetro entre ninguno de los grupos dietarios pertenecientes a cada uno de los períodos experimentales evaluados (**Figura 19, Panel inferior**)

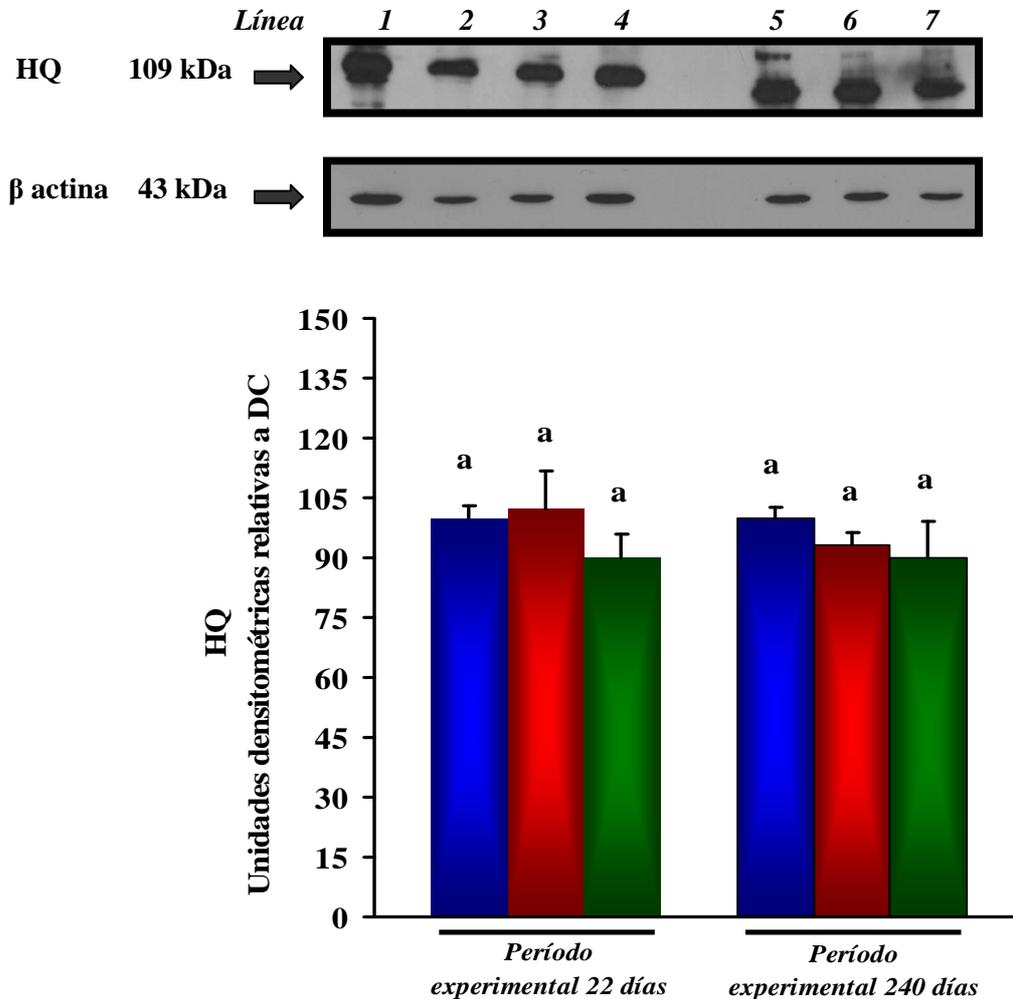
Figura 18. Niveles de la masa proteica de la enzima GQ en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo Experimental 1 o 2 (22 días o 240 días).¹



¹ *Panel superior:* Inmunoblot de la enzima GQ y de β actina de islotes aislados de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS + AHB durante 22 días y 240 días. El marcador molecular se muestra a la izquierda. *Línea 1:* extracto de tejido hepático, utilizado como control positivo; *Línea 2:* DC 22 días; *Línea 3:* DRS 22 días; *Línea 4:* DRS + AHB 22 días; *Línea 5:* DC 240 días; *Línea 6:* DRS 240 días; *Línea 7:* DRS + AHB 240 días.

² *Panel Inferior:* Análisis densitométrico de la masa proteica de la GQ en islotes pancreáticos aislados. Los valores se expresan como media \pm SEM relativos a DC y corregidos por los niveles de β actina presentes en cada una de las muestras. (6 animales se utilizaron en cada grupo experimental). Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada por el test de Newman-Keuls en cada protocolo experimental. ■ DC ■ DRS ■ DRS + AHB.

Figura 19. Niveles de la masa proteica de la enzima HQ en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo Experimental 1 o 2 (22 días o 240 días).¹



¹ *Panel superior:* Inmunoblot de la enzima HQ y de β actina de islotes aislados de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS + AHB durante 22 días y 240 días. El marcador molecular se muestra a la izquierda. *Línea 1:* extracto de tejido hepático, utilizado como control positivo; *Línea 2:* DC 22 días; *Línea 3:* DRS 22 días; *Línea 4:* DRS + AHB 22 días; *Línea 5:* DC 240 días; *Línea 6:* DRS 240 días; *Línea 7:* DRS + AHB 240 días.

² *Panel Inferior:* Análisis densitométrico de la masa proteica de la HQ en islotes pancreáticos aislados. Los valores se expresan como media \pm SEM relativos a DC y corregidos por los niveles de β actina presentes en cada una de las muestras. (6 animales se utilizaron en cada grupo experimental). Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada por el test de Newman-Keuls en cada protocolo experimental. ■ DC ■ DRS ■ DRS + AHB.

2.5 ACTIVIDAD DEL COMPLEJO PIRUVATO DEHIDROGENASA (PDHc).

El complejo enzimático piruvato dehidrogenasa cumple un rol clave en la oxidación de la glucosa y por consiguiente en la secreción de insulina. No se observaron cambios en la actividad PDHa (forma activa del complejo PDH) ni en la actividad total del complejo al finalizar los 22 días de ingesta. Cuando la dieta fue administrada durante 240 días un significativo decrecimiento de la actividad PDHa fue observado en los animales del grupo DRS. La sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria AM por AHB condujo a una normalización de este complejo enzimático. Los valores hallados fueron los siguientes: **PDHa** (media \pm SEM, n=6) (% de PDHt) DC: $70,0 \pm 5,3$; DRS: $38,0 \pm 3,6^*$; DRS + AHB: $72,0 \pm 4,0$. * $p < 0,05$ DRS vs DC y DRS + AHB. **PDHt** (media \pm SEM, n=6) (pkat/islote) DC: $0,142 \pm 0,007$; DRS: $0,165 \pm 0,009$; DRS + AHB: $0,135 \pm 0,012$.

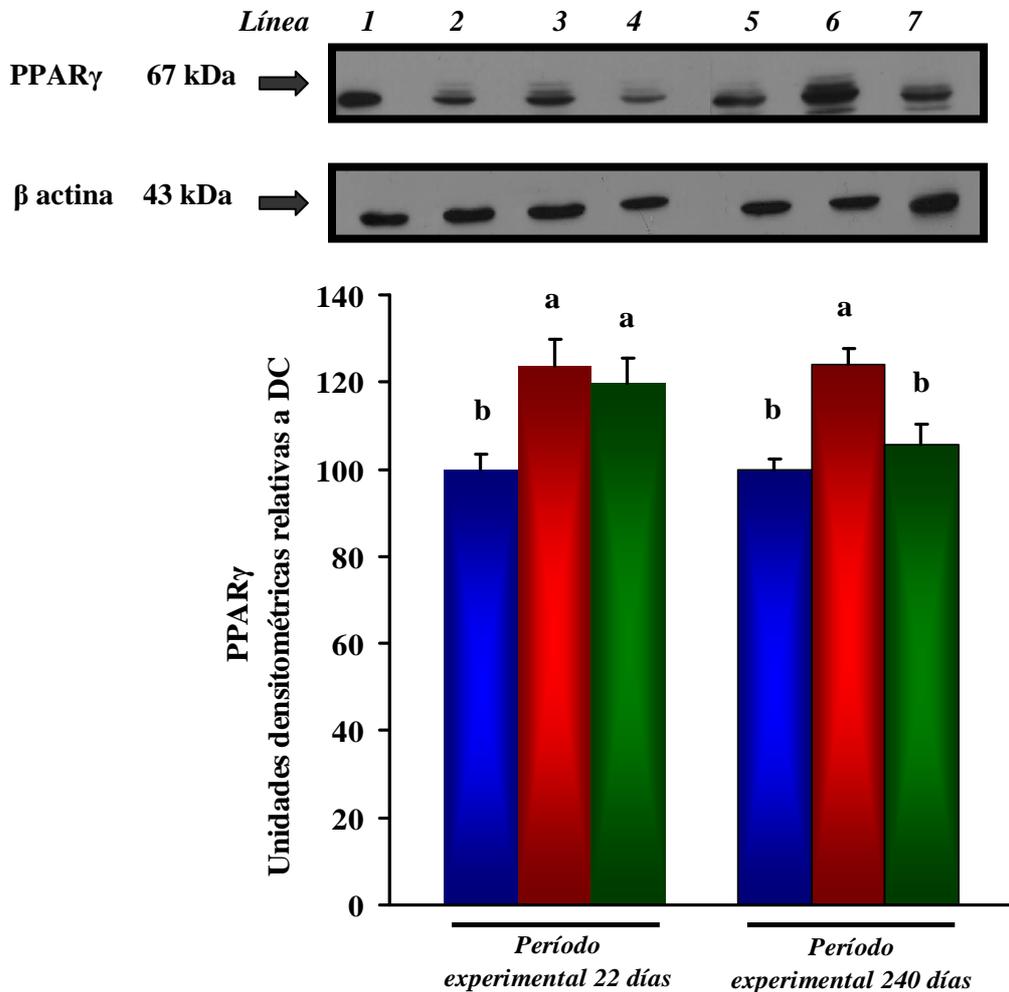
2.6 NIVELES DE LA MASA PROTEICA DEL PPAR γ Y PPAR α .

Los inmunoblots de islotes pancreáticos aislados revelaron una banda de 67 kDa y una banda de 55 kDa consistentes con el PPAR γ y PPAR α respectivamente. (**Figuras 20 y 21, Panel superior**). Luego del análisis densitométrico de los inmunoblots el contenido de PPAR γ de los grupos DC correspondientes a cada protocolo experimental fue normalizado al 100% y los valores obtenidos en los grupos DRS y DRS + AHB fueron expresados como el porcentaje relativo al grupo DC correspondiente de igual sexo en los períodos de 22 o 240 días de ingesta. De la misma manera se procedió para el análisis densitométrico del PPAR α .

El análisis cualitativo y cuantitativo de los inmunoblot mostró que la abundancia relativa del PPAR γ está significativamente aumentada ($p < 0,05$) en los animales alimentados con DRS durante 22 días y 240 días al ser comparados con sus respectivos controles etarios. En los animales que consumieron DRS + AHB por un período de 22 días el parámetro presentó valores similares a los observados en el grupo DRS. Sin embargo, cuando la fuente de grasa dietaria se sustituyó durante los últimos 60 días de ingesta en los animales alimentados crónicamente con DRS durante 240 días, encontramos una normalización de la masa proteica del PPAR γ , siendo los valores hallados similares a los del grupo DC correspondiente (**Figura 20, Panel inferior**).

En la **Figura 21** (*Panel inferior*) se muestran los niveles de la masa proteica del PPAR α en islotes aislados de animales alimentados con las 3 dietas en estudio pertenecientes a ambos protocolos experimentales (22 días y 240 días). En este caso no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos DRS y DC en ninguno de los períodos evaluados. La sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria AM por AHB no modificó los valores del parámetro medido cuando se comparó con los animales controles de igual edad.

Figura 20. Niveles de la masa proteica del PPAR γ en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluidas en el Protocolo Experimental 1 o 2 (22 días o 240 días).¹

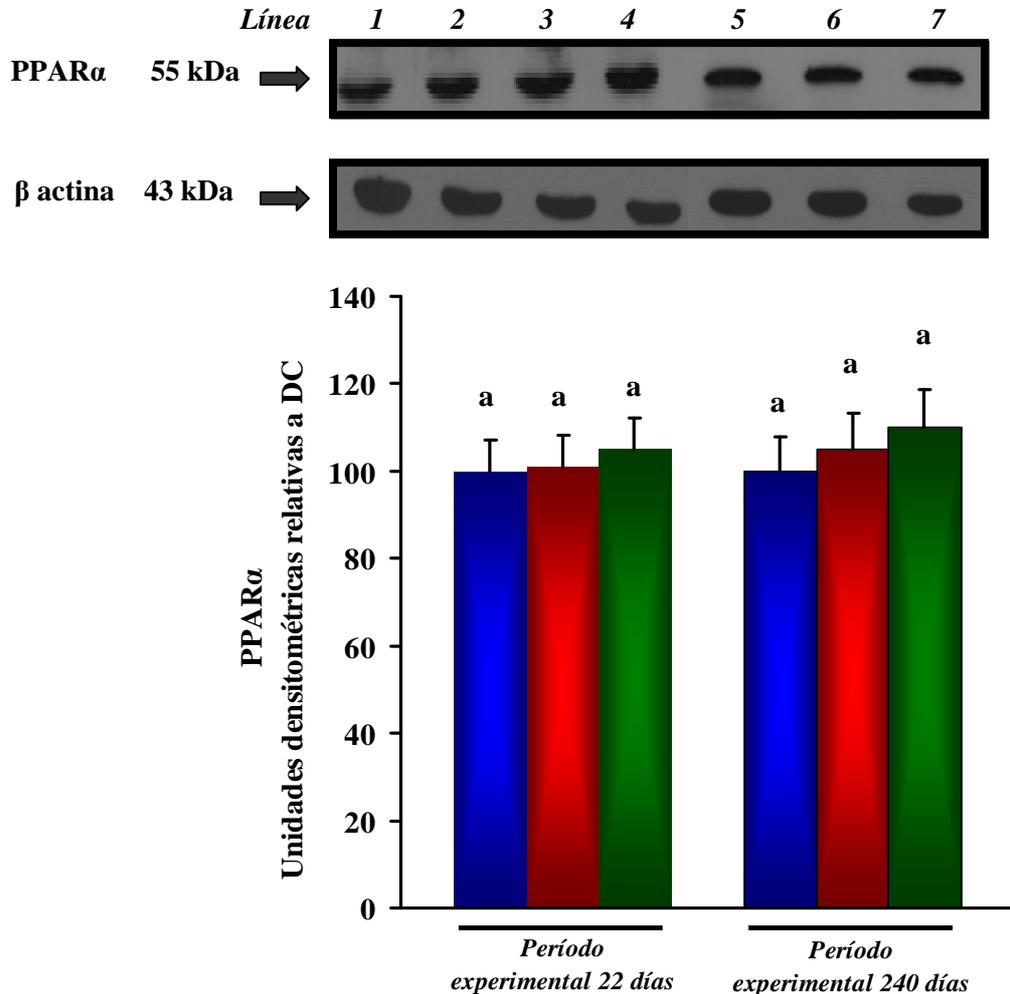


¹ *Panel superior:* Inmunoblot del PPAR γ y de la β actina de islotes aislados de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS + AHB durante 22 días y 240 días. El marcador molecular se muestra a la izquierda. *Línea 1:* extracto de músculo gastronemio, utilizado como control positivo; *Línea 2:* DC 22 días; *Línea 3:* DRS 22 días; *Línea 4:* DRS + AHB 22 días; *Línea 5:* DC 240 días; *Línea 6:* DRS 240 días; *Línea 7:* DRS + AHB 240 días.

² *Panel Inferior:* Análisis densitométrico del PPAR γ en islotes pancreáticos aislados. Los valores se expresan como media \pm SEM relativos a DC y corregidos por los niveles de β actina presentes en cada una de las muestras. (6 animales se utilizaron en cada grupo experimental). Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada por el test de Newman-Keuls en cada protocolo experimental.

■ DC ■ DRS ■ DRS + AHB.

Figura 21. Niveles de la masa proteica del PPAR α en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo Experimental 1 o 2 (22 días o 240 días).¹



¹ *Panel superior:* Inmunoblot del PPAR α y de la β actina de islotes aislados de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS + AHB durante 22 días y 240 días. El marcador molecular se muestra a la izquierda. *Línea 1:* extracto de tejido hepático, utilizado como control positivo; *Línea 2:* DC 22 días; *Línea 3:* DRS 22 días; *Línea 4:* DRS + AHB 22 días; *Línea 5:* DC 240 días; *Línea 6:* DRS 240 días; *Línea 7:* DRS + AHB 240 días.

² *Panel Inferior:* Análisis densitométrico del PPAR α en islotes pancreáticos aislados. Los valores se expresan como media \pm SEM relativos a DC y corregidos por los niveles de β actina presentes en cada una de las muestras. (6 animales se utilizaron en cada grupo experimental). Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada por el test de Newman-Keuls en cada protocolo experimental.

■ DC ■ DRS ■ DRS + AHB.

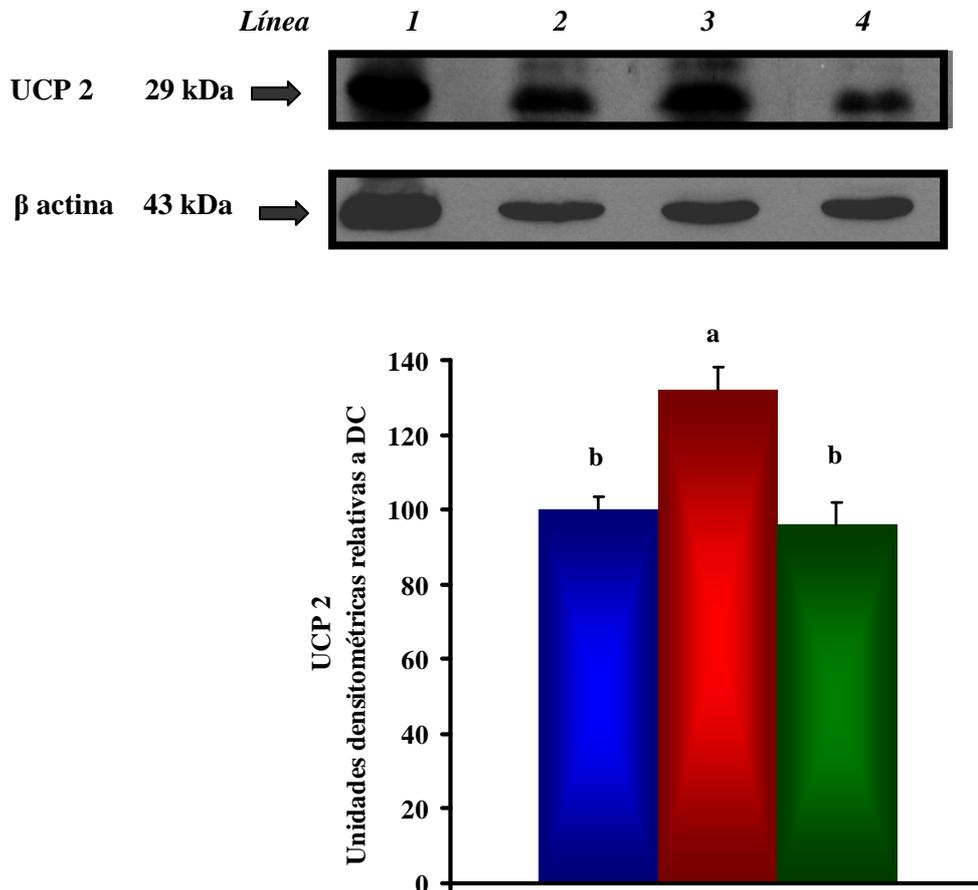
2.7 NIVELES DE LA MASA PROTEICA DE LA PROTEINA DESACOPLANTE UCP 2.

El inmunoblot de islotes pancreáticos aislados reveló una banda de 29 kDa consistente con la proteína desacoplante UCP 2 (**Figura 22, Panel superior**).

Luego del análisis densitométrico de los inmunoblots, realizado según se describió en detalle en el **ítem 2.2**, no observamos cambios en los niveles de la masa proteica de la proteína desacoplante UCP 2 en los islotes aislados de los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales (DRS y DRS + AHB) durante un período de 22 días al ser comparados con los del grupo alimentado con DC durante el mismo período de tiempo. Los valores hallados fueron los siguientes: (media \pm SEM, n=6) (Unidades densitométricas relativas a DC) DC: $100,0 \pm 3,5$; DRS: $98,7 \pm 6,1$; DRS+AHB: $96,0 \pm 5,5$.

Sin embargo, encontramos que la abundancia relativa de la proteína desacoplante UCP 2 estaba significativamente aumentada ($p < 0,05$) en los islotes aislados de los animales alimentados con DRS durante 240 días al ser comparados con sus respectivos controles etarios. Los animales alimentados con DRS durante 240 días en los cuales se sustituyó parcialmente la fuente de grasa dietaria (AM por AHB) durante los últimos 60 días de la experiencia mostraron valores similares en los niveles de la masa proteica de la UCP 2 a los hallados en el grupo DC (**Figura 22, Panel Inferior**).

Figura 22. Niveles de la masa proteica de la proteína desacoplante UCP 2 en islotes aislados de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) y DRS + aceite de hígado de bacalao (AHB) incluídas en el Protocolo Experimental 2 (240 días).¹



¹ *Panel superior:* Inmunoblot de la proteína desacoplante UCP 2 y de la β actina de islotes aislados de ratas alimentadas con DC, DRS y DRS + AHB. El marcador molecular se muestra a la izquierda. *Línea 1:* extracto de bazo, utilizado como control positivo; *Línea 2:* DC; *Línea 3:* DRS; *Línea 4:* DRS + AHB.

² *Panel Inferior:* Análisis densitométrico de la proteína desacoplante UCP 2 en islotes pancreáticos aislados. Los valores se expresan como media \pm SEM relativos a DC y corregidos por los niveles de β actina presentes en cada una de las muestras. (6 animales se utilizaron en cada grupo experimental). Los valores que no comparten la misma letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando la variable es comparada por el test de Newman-Keuls.

■ DC ■ DRS ■ DRS + AHB.

DISCUSSION

DISCUSION

La administración de una dieta rica en sacarosa (DRS) a ratas Wistar normales induce dislipidemia (incremento en los niveles de TG y AGNE) y resistencia insulínica (RI), asociadas a normoglucemia con hiperinsulinemia o moderada hiperglucemia con normoinsulinemia, dependiendo del tiempo durante el cual la dieta es administrada. El presente trabajo de tesis aporta nuevos datos en lo que respecta al progresivo deterioro de la secreción de insulina y función de la célula β en ratas alimentadas con DRS durante 22 o 240 días y el posible efecto beneficioso de la administración de n-3 PUFA dietario de origen marino en la prevención/reversión de estas anormalidades.

La convergencia de los efectos de una hiperglucemia crónica e hiperlipidemia afectarían adversamente la función de la célula β conduciendo a un inexorable deterioro de la secreción de insulina. Los mecanismos que podrían conducir a este progresivo deterioro no han sido completamente dilucidados, por ello nuestro primer objetivo fue analizar a nivel pancreático algunos mecanismos bioquímicos-moleculares (cambios en el transporte, fosforilación y/o oxidación de la glucosa, incremento en el contenido de TG en el interior de la célula β , regulación de factores de transcripción que controlan el metabolismo glucídico y lipídico – PPARs-, disfunción mitocondrial) que podrían estar involucrados en el progresivo deterioro de la función de la célula β en un modelo de dislipemia y RI descrito previamente. Además, considerando que los n-3 PUFA normalizan la dislipidemia y RI, analizamos el efecto de la administración dietaria de los mismos sobre dichos mecanismos bioquímicos-moleculares.

Los principales hallazgos del presente estudio fueron los siguientes:

1. En islotes pancreáticos aislados de ratas alimentadas con DRS durante 22 días sólo se pudo observar un incremento en los niveles de la masa proteica de la enzima glucoquinasa (GQ) y del factor de transcripción PPAR γ . Cuando el período de administración de las dietas se extendió a 240 días se observó una disminución significativa en la actividad y niveles de la masa proteica de la enzima GQ que se acompañó de una menor oxidación de la glucosa (disminuída actividad del complejo PDHc), un incremento en el contenido de TG en el interior de la célula β y un significativo incremento en los niveles de la masa proteica del PPAR γ y de la UCP 2. No se registraron cambios en los niveles de la masa proteica del transportador de

glucosa GLUT 2 y PPAR α ni en la actividad y niveles de la masa proteica de la enzima hexoquinasa (HQ).

2. La adición de aceite de pescado a la dieta desde los primeros estadíos de ingesta de DRS (inicio - 22 días) logró prevenir el incremento en los niveles de la masa proteica de la enzima GQ en los islotes pancreáticos aislados, sin embargo no modificó los valores hallados en el PPAR γ el cual presentó valores similares al grupo DRS. En el largo plazo (240 días), los islotes pancreáticos aislados de los animales alimentados con DRS en los cuales se substituyó parcialmente la fuente de grasa dietaria (aceite de maíz -AM- por aceite de hígado de bacalao -AHB-) durante los últimos 60 días de dieta mostraron: a) normalización de los reducidos niveles de la masa proteica y actividad de la enzima GQ, b) los elevados niveles de la masa proteica del PPAR γ y la proteína desacoplante UCP 2 alcanzan niveles semejantes al control, sin modificaciones en los niveles de la masa proteica del PPAR α , c) la actividad de la enzima HQ y los niveles de la masa proteica de la HQ y del transportador de glucosa GLUT 2 no se modificaron. Además, en concordancia con resultados previos, la presencia de AHB en la dieta fue capaz de normalizar la reducida oxidación de la glucosa (estimada a partir de la actividad PDHc) y el incrementado contenido de TG en los islotes de los animales alimentados con DRS.

Confirmando resultados previos de nuestro grupo (Chicco y col., 2003), en los primeros estadíos de administración de la DRS (22 días - *Período de inducción*) la célula β fue capaz de incrementar su respuesta secretora frente al estímulo de la glucosa para hacer frente a la mayor demanda de insulina debida a la RI presente en este período. La respuesta hipersecretora de la célula β logra mantener los niveles de glucemia basales dentro del rango normal, sin embargo la sensibilidad insulínica periférica global a la hormona está alterada.

La mayor liberación de insulina podría deberse a una mayor capacidad de secreción de la hormona por las células β y/o a un incremento en la masa de células β . Estudios previos de nuestro grupo demostraron que no existen signos morfológicos de reactividad de la célula β cuando la administración de la DRS se realiza por un corto período de tiempo (22 días) (Lombardo y col., 1996a). De esta manera, la mayor respuesta secretora observada en los animales alimentados con DRS durante este período de tiempo podría deberse a cambios funcionales a nivel de la célula β .

Diferentes autores han propuesto que un incremento en la velocidad de metabolización de la glucosa en el interior de la célula β contribuiría a una mayor secreción de insulina. En este sentido, actualmente se conoce que la velocidad de fosforilación de la glucosa sería un factor determinante en la velocidad de secreción de insulina (Burch y col., 1981; Trus y col., 1981). Las enzimas involucradas en este proceso son la GQ y HQ pancreáticas. El principal regulador de la actividad y expresión de la GQ es la glucosa (Matschinsky, 1996) y numerosos autores han demostrado que la GQ tendría un rol clave al actuar como un “glucorreceptor” relacionando los niveles de glucosa externos con la velocidad de secreción de insulina (Burch y col., 1981; Trus y col., 1981; Liang y col., 1990). Al respecto, diferentes investigadores han demostrado que cambios mínimos en la actividad y/o masa proteica de la GQ o en la sensibilidad de la misma a la glucosa, podrían repercutir en la velocidad de secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa. En este sentido, Chen y col. (1994b) encontraron en islotes aislados de ratas espontáneamente hipertensas, las cuales presentan RI e hiperinsulinemia con normoglucemia, una mayor liberación de insulina a concentraciones de glucosa plasmática dentro del rango fisiológico, asociada a un incremento en la actividad de la enzima GQ. En este modelo no se observaron cambios en los niveles de la masa proteica de la GQ ni en la actividad y contenido de la enzima HQ. Por otra parte, un incremento en la actividad y niveles de la masa proteica de la enzima GQ acompañado de una mayor secreción de insulina e hiperinsulinemia fue observado en islotes aislados de ratas que recibieron una infusión de glucosa en elevadas concentraciones (50%) durante 48 hs. En estos animales se observó también un incremento en la actividad de la enzima HQ (Chen y col., 1994a). A su vez, en islotes aislados de ratas obesas hiperinsulinémicas Zucker *fa/fa* si bien no se encontraron cambios en la actividad catalítica de la enzima GQ, se observó un incremento aunque no estadísticamente significativo en la sensibilidad de esta enzima frente a los niveles de glucosa (Chan, 1993). Más recientemente, Maiztegui y col. (2009) demostraron que la administración de fructosa al 10% en el agua de bebida a ratas normales durante 3 semanas indujo un incremento tanto en la actividad como en los niveles de la masa proteica de la enzima GQ. En estos animales se observó además, un incremento en la liberación de insulina tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” y niveles de glucemia dentro del rango normal. En este modelo los animales presentaron intolerancia a la glucosa, por lo que los autores sugieren que si bien los niveles basales de glucemia son normales no se descarta que la glucemia postprandial se encuentre leve pero permanentemente alterada pudiendo

influenciar la secreción de insulina. Por otra parte, Lombardo y col. (1983) encontraron en animales alimentados con DRS durante 22 días una mayor liberación de insulina tanto “in vitro”, trabajando con piezas de páncreas incubadas en presencia de concentraciones de glucosa dentro del rango fisiológico, como “in vivo” (test de tolerancia endovenoso a la glucosa). La mayoría de los estudios mencionados evaluaron la secreción de insulina en islotes incubados durante 60 minutos frente al estímulo de la glucosa. En el presente trabajo de tesis analizamos la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa en islotes perifundidos. Bajo estas condiciones experimentales, corroborando estudios previos (Chicco y col., 2003), observamos una mayor liberación de insulina durante la primer fase de secreción (1er pico) sin un incremento en la liberación total de insulina en los animales alimentados con DRS durante 22 días. Las discrepancias entre nuestros resultados y los obtenidos por otros autores en relación a la secreción total de insulina podría deberse a la diferente metodología utilizada.

La actividad de las enzimas implicadas en la fosforilación de la glucosa en islotes aislados de animales alimentados con DRS durante 22 días no presentaron modificaciones. Sin embargo, hallamos un incremento significativo en los niveles de la masa proteica de la enzima GQ. Puesto que durante este período los animales presentan normoglucemia con hiperinsulinemia acompañadas de intolerancia a la glucosa y RI periférica global, no podemos descartar que bajo estas condiciones los animales presenten un incremento en los niveles de glucemia postprandial suficiente para inducir un incremento en los niveles de la masa proteica de la GQ lo que podría repercutir en el patrón de secreción de insulina observado.

Por otra parte, diferentes estudios han demostrado que la expresión génica de la enzima GQ sería regulada por varios factores de transcripción entre los que se encuentra el PPAR γ (Bae y col., 2010). En el presente estudio demostramos un significativo incremento en los niveles de la masa proteica del PPAR γ en los islotes aislados de animales alimentados con DRS durante este corto período de tiempo. Esto podría contribuir al incremento en los niveles de la masa proteica de la enzima GQ y conducir a una modificación de la liberación de insulina. Por otra parte, Kim y col. (2013) demostraron recientemente en células INS-1 que la activación del PPAR γ conduciría a una mayor liberación de insulina a través de la inducción del receptor de membrana de ácidos grasos GPR 40 y del transportador de glucosa GLUT 2. En nuestro estudio, no se observaron cambios en el contenido proteico de GLUT 2. Además hasta el presente no

conocemos estudios que analicen el comportamiento del receptor de ácidos grasos GPR40 en animales alimentados con dietas ricas en sacarosa y/o fructosa. Por otra parte, se ha postulado que el PPAR α es capaz de regular la expresión del GLUT 2 (Wang y col., 1998). Sin embargo, en este período los islotes pancreáticos de los animales alimentados con DRS no mostraron diferencias en los niveles de la masa proteica del PPAR α y GLUT 2 comparados con sus respectivos controles etarios. Más aún, durante éste período la célula β está expuesta a elevados niveles de AGNE puesto que la dislipidemia es una característica que se manifiesta de manera temprana en estos animales. Nolan y col. (2006b) han propuesto que los AGNE jugarían un rol clave en el mecanismo de compensación que pone en marcha la célula β frente al estado de RI a fines de mantener la normoglucemia. Ellos observaron en islotes de ratas obesas hiperinsulinémicas Zucker *fa/fa* las cuales presentan normoglucemia y dislipidemia, un incremento en los procesos de esterificación, lipólisis (ciclo TG/ ácidos grasos) y oxidación de ácidos grasos bajo estas condiciones asociados a una mayor liberación de insulina.

Nuestros datos señalan que el contenido de TG en el interior de los islotes y la oxidación de la glucosa, estimada a partir de la actividad del complejo enzimático PDHc, no sufrieron modificaciones en los animales alimentados con DRS durante 22 días al ser comparados con el grupo control. Al respecto, Nolan y col. (2006b) sugieren que un ciclo TG/ácidos grasos acelerado sería un mecanismo de protección contra la lipotoxicidad al prevenir la esteatosis, a la vez que contribuiría a incrementar la secreción de insulina en estados de RI. De acuerdo a estos autores, es posible que en el modelo experimental de DRS la mayor disponibilidad de AGNE contribuya a potenciar la secreción de insulina en presencia de normoglucemia a través de mecanismos que incluirían un incremento en los procesos de esterificación, lipólisis (ciclo TG/ ácidos grasos) y oxidación de ácidos grasos.

Cuando la DRS es administrada por un período de tiempo prolongado (240 días) se observa un profundo deterioro en la sensibilidad insulínica periférica global y tolerancia a la glucosa que acompañan a la dislipidemia. El proceso de compensación que operaba en la célula β a los 22 días de ingesta falla y sobreviene una moderada hiperglucemia. Más aún, la célula β muestra una clara disfunción caracterizada por un patrón de secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa que difiere ampliamente del observado a los 22 días de ingesta. En este período constatamos en islotes perifundidos

que si bien la secreción de insulina incrementó sostenidamente durante el transcurso de la perfusión (40 minutos) ya a partir de los primeros minutos el clásico patrón bifásico de liberación de la hormona no pudo ser claramente diferenciado, aunque la liberación total de la hormona fue superior a la observada en los animales controles. La pérdida de la primer fase de secreción de insulina sería un marcador temprano de disfunción de la célula β . Al respecto, numerosos estudios en humanos y animales de experimentación sugieren la importancia de la primer fase de secreción de la hormona en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa (Del Prato, 2003).

La pérdida de la relación hiperbólica entre sensibilidad insulínica y secreción de insulina observada con el consumo crónico de DRS, como consecuencia de la incapacidad de la célula β de responder al estado de insensibilidad insulínica, podría estar dada por cambios en la masa y/o función de la célula β .

En estos animales, la exposición prolongada de la célula β a moderada hiperglucemia y elevados niveles de AGNE y TG afectaría de manera negativa el funcionamiento de la célula β conduciendo al alterado patrón de secreción de insulina observado durante este período (Poitout y Robertson, 2002; Prentki y col., 2002). En este sentido cabe destacar que si bien se observa una mayor liberación total de insulina frente al estímulo de la glucosa “*in vitro*”, los animales presentan normoinsulinemia. Pighin y col. (2003) demostraron en islotes perifundidos de ratas alimentadas crónicamente con DRS una disminución tanto del primer pico como de la segunda fase de secreción de la hormona cuando estos se incubaron en presencia de elevados niveles de glucosa y palmitato.

Los mecanismos de glucolipotoxicidad implicados en la disfunción de la célula β no están aún completamente dilucidados. Algunos autores han propuesto que alteraciones en la captación y fosforilación de la glucosa en la célula β podrían estar implicadas. Al respecto, Gremlich y col. (1997) encontraron en islotes pancreáticos cultivados en presencia de ácido palmítico y elevados niveles de glucosa una disminución en los niveles tanto de ARNm como de la masa proteica del transportador de glucosa GLUT 2 y de la enzima GQ. Por otra parte, Jorns y col. (2002) observaron en ratas *Psammomys obesus* (rata del desierto), un modelo de diabetes tipo 2 inducido nutricionalmente, una reducción en la inmunoreactividad del GLUT 2 y la GQ en las células β asociadas a una pérdida de la capacidad de secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa. A su vez, Kooptiwut y col. (2005) demostraron en islotes de ratones DBA/2 susceptibles a la disfunción de la célula β , una reducción en los niveles de la masa proteica de la GQ

asociado a una disminución en la liberación de insulina cuando fueron cultivados en presencia de elevados niveles de glucosa. En el presente trabajo de tesis no hallamos modificaciones en la masa proteica del transportador de glucosa GLUT 2 en los islotes de los animales dislipémicos con moderada hiperglucemia, sin embargo observamos una disminución tanto en la actividad como en el contenido de la masa proteica de la enzima GQ fosforilante de la glucosa. Esto último podría contribuir al alterado patrón de secreción de insulina observado durante este período.

La oxidación de la glucosa en la célula β juega también un rol clave en la vía de secreción de insulina estimulada por la glucosa, de manera que una reducción de la misma podría constituir también un mecanismo de glucolipototoxicidad. En este sentido, Patanè y col. (2000) observaron en islotes pancreáticos de rata cultivados en presencia de elevados niveles de glucosa o ácidos grasos una reducción en la oxidación de la glucosa asociada a una menor liberación de insulina frente al estímulo de la glucosa. Por otra parte, Zhou y Grill (1995) demostraron en islotes de ratas cultivados durante 48 hs en presencia de palmitato un deterioro en la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa asociado a una disminución en la actividad del complejo enzimático PDHc y un incremento de la actividad PDH quinasa. Al igual que estos autores, en el presente estudio hallamos una reducción en la actividad de la forma activa de la PDH (PDHa) en los islotes aislados luego de la administración crónica de la DRS. De ésta forma, una reducción en la conversión del piruvato hacia acetil-CoA podría contribuir también al deterioro en el patrón de secreción de insulina observado.

La administración crónica de la DRS provocó además un incremento en el contenido de TG en el interior de los islotes pancreáticos. El acúmulo de TG en el interior de la célula β ha sido observado en numerosos modelos de disfunción de la célula β asociándose no solo a un deterioro en la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa sino también a la inhibición de la expresión génica de la insulina y la muerte celular por apoptosis (Man y col., 1997; Poitout y col., 2010). Briaud y col. (2001) han demostrado que la exposición de los islotes a elevados niveles de ácidos grasos resulta en un incremento en el contenido intracelular de TG sólo si la concentración de glucosa también se encuentra elevada. La hiperglucemia presente en los islotes de los animales alimentados con DRS podría entonces dirigir el exceso de ácidos grasos hacia la esterificación promoviendo la lipogénesis por sobre la oxidación según los mecanismos

propuestos por Poitout (2004) que incluyen cambios coordinados en las vías de señalización metabólicas y en la expresión génica. De acuerdo a este autor la hiperglucemia inhibiría la actividad de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), lo que conduciría a un incremento en los niveles de malonil-CoA e inhibición de la enzima carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1) con la consecuente reducción de la oxidación de los ácidos grasos.

En relación a la inducción de la lipogénesis, Poitout (2004) ha propuesto que la activación del SREBP-1c en la célula β estaría involucrada en este proceso. El SREBP-1c es un factor de transcripción lipogénico que controla la síntesis de ácidos grasos y TG en la célula β de la misma manera que lo hace en el hígado. Numerosos autores han demostrado que la activación del SREBP-1c en la célula β promueve el acúmulo de TG y deterioro de la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa (Wang y col., 2003; Takahashi y col., 2005). Por otra parte, estudios de Diraison y col. (2004) demostraron que la activación del SREBP-1c induce la expresión del factor de transcripción PPAR γ . En el presente estudio no evaluamos el SREBP-1c, sin embargo analizamos el comportamiento del PPAR γ en los animales alimentados crónicamente con DRS. En este sentido debemos mencionar que los estudios llevados a cabo en relación a los efectos de la activación del PPAR γ sobre la función de la célula β y secreción de insulina son contradictorios. Algunos autores han propuesto que la activación del PPAR γ se asociaría a una reducción del contenido de TG en el interior de la célula β y una mejora en la secreción de insulina (Shimabukuro y col., 1998; Matsui y col., 2004). Sin embargo, otros estudios han reportado que la inducción del PPAR γ en la célula β estimularía la captación de ácidos grasos y el depósito de TG y afectaría de manera adversa la secreción de insulina (Ito y col., 2004; Ravnskjaer y col., 2005). En el presente trabajo observamos un incremento en los niveles de la masa proteica del PPAR γ en los animales alimentados crónicamente con DRS. En este modelo el PPAR γ podría conducir el exceso de ácidos grasos hacia la lipogénesis y esterificación contribuyendo al deterioro del patrón de secreción de insulina. Más aún, la activación del PPAR γ estaría dada no sólo por el exceso de ácidos grasos de origen exógeno que llegan a la célula β sino también por aquellos de origen endógeno que resultan de la lipólisis intracelular de los TG, proceso que también es estimulado por la hiperglucemia.

Dado que el acúmulo de TG resulta una forma de almacenamiento de lípidos relativamente inerte, numerosos autores se han enfocado en evaluar los mecanismos mediante los cuales el incremento en el contenido de TG en el interior de la célula β conduciría a un deterioro en la secreción de insulina. Al respecto, Poitout (2004) ha propuesto que los ácidos grasos liberados por hidrólisis de estos TG serían quienes ejercerían un efecto negativo sobre la liberación de insulina a través de la inducción de la proteína desacoplante UCP 2 la cual se relaciona de manera inversa con la producción de ATP y por ende con la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa. Numerosos estudios han demostrado que un incremento en los niveles de la UCP 2 en la célula β se asocia a un deterioro en la secreción de insulina (Chan y col., 2001; Lameloise y col., 2001; Zhang y col., 2001; Chan y col., 2004). Más aún, Patané y col. (2002) demostraron en cultivo de islotes de rata en presencia de elevados niveles de ácidos grasos que la activación del PPAR γ mediaría el efecto negativo de los ácidos grasos sobre la secreción de insulina al inducir la expresión de la proteína desacoplante UCP 2, lo cual provoca una reducción en los niveles de ATP de la célula β impactando directamente sobre la secreción de la hormona. En concordancia con estos autores nosotros hallamos en nuestro trabajo un incremento en los niveles de la masa proteica de la UCP 2 que se asocia al mayor contenido de la masa proteica del PPAR γ . Esto se acompaña de un significativo aumento en el contenido de TG en el interior de los islotes y alterada secreción de insulina.

Otro posible modulador de la secreción de insulina es el factor de transcripción PPAR α . Este factor de transcripción se encuentra involucrado en el control de genes relacionados con el metabolismo lipídico, particularmente regulando la captación y oxidación de ácidos grasos (Ravnskjaer y col., 2005). En los islotes pancreáticos los elevados niveles de ácidos grasos inducen la expresión del ARNm del PPAR α , mientras que la hiperglucemia “*in vivo*” y los elevados niveles de glucosa “*in vitro*” suprimen su expresión (Sugden y Holness, 2004). Al respecto, Unger y Zhou (2001) reportaron una menor expresión del ARNm del PPAR α , de la acil-CoA oxidasa y de la CPT-1 en islotes de ratas Zucker diabéticas con hiperlipidemia crónica. Por otra parte, Kim y col. (2003) observaron en ratones diabéticos a los que se les administró W14,1643 dietario, un agonista del PPAR α , una normalización de los lípidos séricos y de la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa asociados a una reducción de la proliferación y masa de células β cuando los compararon con los animales controles. Nuestros

resultados no muestran ningún cambio en los niveles de la masa proteica del PPAR α en los islotes aislados de los animales alimentados crónicamente con DRS al ser comparados con los animales del grupo control. Esto fue un hallazgo no esperado debido a los elevados niveles de ácidos grasos plasmáticos y alterada homeostasis de la glucosa presente en estos animales. Al presente no poseemos datos acerca de la expresión de las enzimas CPT-1 y acil-CoA oxidasa, ambas enzimas target del PPAR α , en los islotes de los animales pertenecientes a este grupo dietario. Por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de que la moderada hiperglucemia y los elevados niveles de ácidos grasos plasmáticos puedan jugar un rol en el comportamiento de las enzimas oxidativas en estos animales.

En conclusión, la administración de una DRS en ratas Wistar normales impacta sobre la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa a través de diferentes mecanismos según el tiempo durante el cual la dieta es administrada. En los primeros estadíos (22 días) la mayor respuesta de la célula β frente al estado de RI que logra mantener la normoglucemia estaría dada en parte por un incremento en los niveles de la masa proteica de la GQ y del factor de transcripción activado por ácidos grasos PPAR γ , el cual regularía los niveles de expresión de la GQ. La administración crónica de la dieta conduce a un ambiente metabólico y hormonal diferente en el cual sobreviene la hiperglucemia como consecuencia de una profunda disfunción de la célula β . Entre los mecanismos de glucolipotoxicidad que podrían estar implicados durante este período se encuentran una reducida fosforilación y oxidación de la glucosa, incremento en el acúmulo de TG intracelulares y mayor contenido de la masa proteica del factor de transcripción PPAR γ y de la proteína desacoplante UCP 2.

Estos resultados fueron publicados en *Islets* 2:367-373, (2010), “ *β cell adaptation/dysfunction in an animal model of dyslipidemia and insulin resistance induced by the chronic administration of a sucrose-rich diet.*” Ferreira, M.R.; Lombardo, Y.B.; Chicco A.

Los resultados hasta aquí expuestos muestran que la composición de macronutrientes de la dieta juega un rol clave en el control de la función de la célula β . Particularmente, hemos demostrado que la ingesta de una DRS repercute de manera negativa sobre la función de la célula β debido, al menos en parte, al impacto negativo que tiene el

consumo de esta dieta sobre la sensibilidad insulínica periférica global y los niveles de lípidos y glucosa plasmáticos los cuales alterarían el normal funcionamiento de la célula β . De ésta manera, considerando que el disturbio del metabolismo lipídico a nivel plasmático y tisular podría ser uno de los factores importantes involucrados en la glucolipototoxicidad, nos propusimos evaluar la posibilidad de utilizar manipulaciones nutricionales que logren prevenir/normalizar la dislipidemia, acumulación ectópica de lípidos y puedan mejorar y/o revertir la RI y disfunción de la célula β . Al respecto, estudios previos de nuestro grupo (Lombardo y col., 1996b) han demostrado que la administración de n-3 PUFA dietario de origen marino (aceite de pescado: rico en EPA y DHA) es capaz de revertir la dislipidemia, RI y alterada homeostasis de la glucosa presentes en animales alimentados crónicamente con DRS. Más aún, Pighin y col., (2003) observaron en estos animales que la sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria (AM por AHB) durante los últimos 60 días de la experiencia logra normalizar el patrón de liberación de insulina frente al estímulo de la glucosa. Sin embargo los mecanismos involucrados han sido solo parcialmente analizados.

De lo expuesto, el segundo objetivo del presente trabajo de tesis fue evaluar el efecto de los n-3 PUFA dietarios de origen marino sobre las alteraciones funcionales de la célula β que se desarrollaron con la administración de DRS en los períodos estudiados.

Con respecto a la célula β pancreática, el efecto de los n-3 PUFA sobre los mecanismos relacionados con la secreción de insulina no están completamente dilucidados. En el presente trabajo hemos constatado que la sustitución parcial de n-6 por n-3 dietario durante 22 días previno el incremento de la masa proteica de la GQ. Sin embargo un resultado inesperado fue constatar que la DRS en presencia de AHB incrementó la masa proteica del PPAR γ de manera similar a lo observado en la DRS en ausencia de AHB. No conocemos al presente los mecanismos bioquímicos-moleculares que puedan explicar este hallazgo.

Por otra parte, en los animales donde el tiempo de administración de DRS condujo a una dislipidemia estable, RI y alterada homeostasis de la glucosa (240 días de ingesta), la sustitución de la fuente de grasa dietaria (AM por AHB) revirtió la dislipidemia y la anormal homeostasis de la glucosa lo cual fue acompañado por un patrón de secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa similar al encontrado en los animales controles de igual edad. Holness y col. (2004) demostraron en ratas alimentadas con una

dieta rica en grasa que el reemplazo de una pequeña proporción de los ácidos grasos totales (7%) por n-3 PUFA de origen marino (aceite de pescado) es capaz de revertir la hipersecreción de insulina, sin embargo estos autores no encontraron una mejora de la sensibilidad insulínica periférica global. A su vez, Mellouk y col. (2012a) observaron en ratas hembras alimentadas durante 8 semanas con una dieta rica en fructosa (64 % p/p) conteniendo 5 % de aceite de girasol, que la sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria (1,6 % del total de grasa) por aceite de salmón (rico en n-3 PUFA: EPA y DHA) logró reducir los valores de glucosa plasmática y del índice HOMA, el cual evalúa indirectamente la función de la célula β y sensibilidad insulínica. Además, en este modelo la administración de n-3 PUFA dietario logró prevenir la alterada secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa (Mellouk y col., 2012b).

Estudios recientes han demostrado en diferentes modelos animales que la administración de n-3 PUFA (EPA y DHA) podría proteger a la célula β de la glucolipototoxicidad (Pighin y col., 2003; Kato y col., 2008; Perez-Martinez y col., 2010). Sin embargo, los mecanismos involucrados han sido sólo parcialmente analizados (Pighin y col., 2003; Kato y col., 2008; Fedor y Kelley, 2009; Wei y col., 2010). Al respecto, algunos estudios han demostrado un efecto beneficioso de los n-3 PUFA sobre la captación y utilización de la glucosa en la célula β , procesos claves en la vía de secreción de insulina frente al estímulo de la hexosa. En este sentido, Mellouk y col. (2012c) demostraron en ratas hembra alimentadas con fructosa, que la alterada respuesta secretora observada en los islotes se asocia a una menor utilización de la glucosa que mejora con la administración de aceite de salmón (rico en EPA y DHA).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que el AHB normalizó la actividad y niveles de la masa proteica de la enzima GQ. De ésta manera, la deteriorada fosforilación de la glucosa que se asocia al consumo crónico de DRS se revirtió al incrementar la relación de ácidos grasos n-3/n-6 dietario de 0,008 en el AM a 2, 300 en el AHB, contribuyendo a restablecer la normal liberación de insulina.

Nascimento y col., (2010) observaron en islotes de ratones C57BL/6 alimentados durante 2 meses con una dieta rica en sacarosa y grasa una reducción en los niveles del transportador de glucosa GLUT 2. En estos animales la adición de aceite de pescado (1,5 g/ kg peso/ día) durante el último mes de la experiencia produjo un incremento en la expresión del GLUT 2 a la vez que redujo los niveles de TG plasmáticos y la hipertrofia del tejido adiposo. A diferencia de estos autores, los datos obtenidos en el

presente trabajo de tesis muestran que la adición de aceite de pescado no modifica los niveles de la masa proteica del GLUT 2, sin embargo es capaz de normalizar los elevados niveles de glucosa, TG y AGNE plasmáticos, los cuales registran valores similares a los del grupo DC. De esta manera, la reducción de la glucolipototoxicidad debida a la menor disponibilidad de lípidos plasmáticos y la normalización de la homeostasis de la glucosa observadas con la administración de AHB dietario podrían contribuir a restablecer la fosforilación de la glucosa en la célula β pancreática.

La normalización de los niveles de lípidos plasmáticos observada en el grupo DRS + AHB impacta además sobre el contenido de TG y la oxidación de la glucosa en el interior de los islotes pancreáticos. Los elevados niveles de TG en el interior de la célula β y la menor actividad PDHc presentes en los animales alimentados crónicamente con DRS retornan a valores normales similares a los hallados en el grupo DC luego de la administración del aceite de pescado, lo que confirma resultados previos obtenidos por Pighin y col. (2003). De esta manera, la adición de n-3 PUFA dietario restablecería la reducida oxidación de la glucosa lo que, sumado a la reducción del contenido de TG en el interior de la célula β , contribuiría en parte a restablecer la secreción de insulina en el modelo de dislipemia y RI utilizado.

Como mencionamos anteriormente, se ha demostrado que el factor de transcripción SREBP-1c regula la actividad de enzimas lipogénicas en las células β pancreáticas y su activación promueve el acúmulo de TG (Takahashi y col., 2005). El presente estudio no aporta datos acerca del efecto del aceite de pescado dietario sobre la expresión y niveles de la masa proteica del SREBP-1c en ratas alimentadas crónicamente con DRS, lo que podría contribuir a la reducción en los niveles de TG en el interior de los islotes observada en el grupo DRS + AHB.

La proteína desacoplante UCP 2 juega también un rol clave en la regulación de la función de la célula β , puesto que bajo condiciones de glucolipototoxicidad incrementa su expresión y esto se asocia a una reducción en los niveles de ATP intracelulares y deterioro de la secreción de insulina (Chan y col., 2001; Chan y col., 2004). Nuestros resultados muestran que la adición de AHB dietario durante los últimos 60 días de la experiencia es capaz de reducir los elevados niveles de la masa proteica de la proteína desacoplante UCP 2 hallados en los animales alimentados crónicamente con DRS. Esto

impactaría sobre la síntesis de ATP y a su turno contribuiría a normalizar la secreción de insulina. Al respecto, Kato y col. (2008) demostraron en islotes de ratones C57BL/6 cultivados en presencia de palmitato que la adición de EPA al medio de cultivo era capaz de restablecer los elevados niveles de ARNm y masa proteica de la UCP 2 y mejorar la liberación de insulina. Más aún, en este mismo estudio los autores inhibieron la expresión de la UCP 2 utilizando un ARN pequeño de interferencia (ARNsi) específico y observaron que esto confería protección contra el deterioro en la secreción de insulina inducido por el palmitato a la vez que cancelaba el efecto protector mediado por la adición de EPA.

Como discutimos previamente, el efecto negativo de los ácidos grasos sobre la expresión de la UCP 2 estaría mediado, al menos en parte, por el factor de transcripción PPAR γ . El PPAR γ constituye además otro factor de transcripción implicado en la distribución de los lípidos en el interior de la célula β . En el presente estudio, cuando el AHB reemplazó parcialmente al AM como fuente de grasa dietaria en los animales alimentados con DRS por un período prolongado de tiempo, los elevados niveles de la masa proteica del PPAR γ retornaron a los valores normales observados en el grupo control. Puesto que el AHB redujo además el contenido de TG en el interior del islote y logró corregir la dislipidemia es posible que una menor liberación de ácidos grasos de origen endógeno sumada a la menor disponibilidad de ácidos grasos de origen exógeno puedan contribuir a restablecer los niveles de la masa proteica del PPAR γ y la proteína desacoplante UCP 2 a sus valores normales y a su turno normalizar la liberación de insulina.

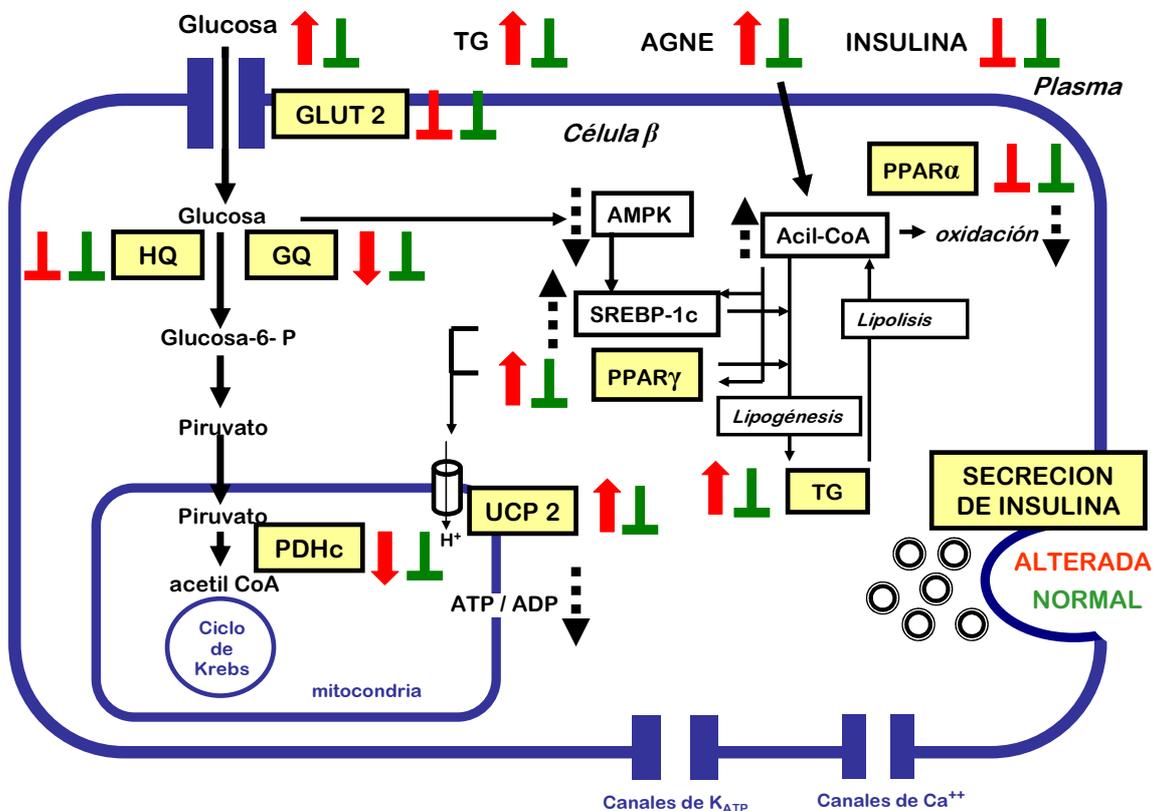
Paradójicamente, la normalización de la dislipidemia y los niveles plasmáticos de glucosa observadas con la administración de AHB dietario, no se acompañaron de cambios en los niveles de la masa proteica del PPAR α el cual se ha postulado que regularía la distribución de lípidos en la célula β y modularía la secreción de insulina. Sin embargo, en el mismo modelo experimental, Hein y col. (2010) demostraron que la administración de AHB dietario incrementa significativamente los niveles de la masa proteica del PPAR α hepático y reduce la esteatosis hepática.

Finalmente, teniendo en cuenta el efecto antiinflamatorio que poseen los n-3 PUFA (Poudyal y col., 2011), no podemos descartar que la administración de AHB a los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados con DRS, pueda inhibir la

generación de precursores proinflamatorios contribuyendo de esa manera a restablecer el normal funcionamiento de la célula β . Por otra parte, existe suficiente evidencia que demuestra que la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas celulares tanto de los tejidos target de la acción de la insulina (músculo esquelético, hígado, tejido adiposo) como de las células β productoras de la hormona, constituyen un factor crítico en la secreción y acción biológica de la hormona. En este sentido, estudios previos de nuestro grupo (D'Alessandro y col., 2013) han demostrado que la administración de AHB dietario a ratas alimentadas crónicamente con DRS incrementa el contenido de n-3 PUFA en los fosfolípidos de la membrana del músculo esquelético. Esto último se asocia a una mejora en la sensibilidad insulínica. De esta manera, es posible que la administración de AHB dietario pueda provocar cambios en la composición de los fosfolípidos de la membrana de la célula β lo que a su turno contribuiría a restablecer la secreción de insulina en los animales alimentados crónicamente con DRS.

En conclusión, los resultados obtenidos en este segundo objetivo demuestran que la sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria AM por AHB impacta de manera positiva sobre la función de la célula β y secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa en animales dislipémicos insulino resistentes. Cuando el AHB se administra como fuente de grasa dietaria durante 22 días previene el incremento en los niveles de la masa proteica de la enzima GQ en los islotes pancreáticos aislados. Cuando la sustitución de la fuente de grasa dietaria (AM por AHB) se realiza una vez alcanzada la dislipidemia y RI (durante los últimos 60 días de la experiencia) en los animales alimentados crónicamente (240 días) con DRS se observa: a) normalización de la actividad y niveles de la masa proteica de la enzima GQ, sin cambios en la masa proteica del GLUT 2. Esto a su turno contribuiría a restablecer la deteriorada fosforilación de la glucosa., b) reducción de los niveles de la masa proteica del PPAR γ y la proteína desacoplante UCP 2. A su vez, la adición de AHB dietario revierte la dislipidemia y el acúmulo de lípidos en el interior de la célula β y normaliza la deteriorada oxidación de la glucosa. Estos efectos beneficiosos del aceite de pescado sobre la función de la célula β estarían implicados al menos en parte en la prevención/reversión del alterado patrón de secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa observado en el modelo nutricional de dislipemia y resistencia insulínica obtenido mediante la administración de una DRS a ratas normales (**Figura 23**).

Figura 23. Posibles mecanismos implicados en la disfunción de la célula β en animales alimentados crónicamente con DRS. Efecto de la administración de n-3 PUFA.¹



¹La figura muestra los resultados obtenidos acerca de los posibles mecanismos mediante los cuales la hiperglucemia y los elevados niveles de ácidos grasos libres pueden contribuir a la disfunción de la célula β en un modelo de dislipemia y resistencia insulínica inducido en ratas normales por ingesta crónica de una dieta rica en sacarosa (DRS)(en rojo). En líneas verdes se observan los efectos beneficiosos inducidos por el reemplazo isocalórico de aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao (AHB) como fuente grasa dietaria que conllevan a la normalización de la secreción de insulina “in vitro”.

Mecanismos adicionales que podrían contribuir al deterioro se muestran en línea de puntos.

GQ: glucoquinasa, **HQ:** hexoquinasa, **PDHc:** complejo enzimático piruvato dehidrogenasa, **AMPK:** proteína quinasa activada por AMP, **SREBP-1c:** proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1-c, **PPARs:** receptores activadores de la proliferación peroxisomal, **TG:** triglicéridos, **UCP 2:** proteína desacoplante 2.

(Figura adaptada de Prentki y col., 2002; Poitout, 2004 y Poitout y col., 2010)

Estos resultados fueron publicados en Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 89:31-38, (2013), “Dietary fish oil normalized glucose-stimulated insulin

secretion in isolated pancreatic islets of dyslipemic rats through mechanisms involving glucose phosphorylation, peroxisome proliferator – activated receptor γ and uncoupling protein 2.” Ferreira, M.R.; Chicco A.; Lombardo, Y.B.

Por lo expuesto, si bien la extrapolación de los resultados obtenidos en modelos animales hacia el humano debe ser muy cuidadosa este trabajo pretende contribuir al conocimiento de algunos mecanismos que podrían estar involucrados en los procesos de adaptación y disfunción de la célula β pancreática frente a estados de resistencia insulínica y la posibilidad de prevenir y/o revertir/mejorar las alteraciones halladas mediante la administración de ácidos grasos n-3 PUFA de origen marino a fin de mejorar la función de la célula β y secreción de insulina.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Dada la elevada incidencia de las patologías asociadas al Síndrome Metabólico, tanto en nuestra población como a nivel mundial, la prevención y el tratamiento de las mismas resultan de gran interés para la Salud Pública. Al respecto, diferentes estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que cambios en la composición de los macronutrientes de las dietas constituyen importantes determinantes medioambientales tanto en el desarrollo como en la prevención y/o mejoramiento de los numerosos desórdenes metabólicos incluidos en el Síndrome Metabólico.

Teniendo en cuenta el rol clave que juega la célula β en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, resulta interesante esclarecer algunos mecanismos que podrían estar involucrados en la disfunción de la célula β observada frente a un estado de insensibilidad insulínica.

El presente trabajo de tesis aporta nuevos datos en lo que respecta al progresivo deterioro de la función de la célula β en un modelo animal de dislipemia y resistencia insulínica obtenido por administración de una dieta rica en sacarosa, que se asemeja en muchos aspectos bioquímicos-metabólicos al Síndrome Metabólico del humano.

Los resultados obtenidos demuestran que la administración de una DRS a animales de experimentación impacta sobre la secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa a través de diferentes mecanismos según el tiempo durante el cual la dieta es administrada. En los primeros estadios (22 días) la mayor respuesta de la célula β frente al estado de RI que logra mantener la normoglicemia estaría dada en parte por un incremento tanto en los niveles de la masa proteica de una enzima clave en la metabolización de la glucosa como es la glucoquinasa como en los niveles de la masa proteica del factor de transcripción activado por ácidos grasos PPAR γ , el cual regularía los niveles de expresión de la glucoquinasa. La administración crónica de la dieta conduce a un ambiente metabólico y hormonal diferente en el cual sobreviene la hiperglicemia como consecuencia de una profunda disfunción de la célula β . Entre los mecanismos de glucolipototoxicidad que podrían estar implicados durante este período se encuentran una reducida fosforilación y oxidación de la glucosa, incremento en el acúmulo de triglicéridos intracelulares y mayor contenido proteico del factor de transcripción PPAR γ y de la proteína desacoplante UCP 2.

La sustitución parcial de la fuente de grasa dietaria AM por AHB (rico en n-3 PUFA EPA y DHA) impacta de manera positiva sobre la función de la célula β y secreción de insulina frente al estímulo de la glucosa en ambos períodos. En el corto plazo (22 días de ingesta) la administración de AHB dietario previene el incremento en los niveles de la masa proteica de la enzima glucoquinasa lo que contribuye a restablecer la normal liberación de insulina. Cuando la sustitución de la fuente de grasa se realiza en los animales que han alcanzado una dislipidemia y RI estable (240 días de ingesta) se observa un patrón de secreción de insulina normal que se asocia a la normalización de la fosforilación y oxidación de la glucosa, reducción del contenido de triglicéridos en el interior de los islotes y reducción de los niveles de la masa proteica del PPAR γ y la proteína desacoplante UCP 2.

Si bien la extrapolación de los resultados obtenidos en modelos animales hacia el humano debe ser muy cuidadosa este trabajo pretende contribuir al conocimiento de algunos mecanismos que podrían estar involucrados en los procesos de adaptación y disfunción de la célula β pancreática frente a estados de resistencia insulínica y la posibilidad de prevenir y/o revertir/mejorar las alteraciones halladas mediante la administración de ácidos grasos n-3 PUFA de origen marino a fin de mejorar la función de la célula β y secreción de insulina.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

- Ahrén, B.; Gudbjartsson, T.; Al-Amin, A.N.; Mårtensson, H.; Myrsén-Axcrona, U.; Karlsson, S.; Mulder, H. y Sundler, F. (1999) *Islet perturbations in rats fed a high-fat diet*. *Pancreas* 18:75-83.

- Aizawa, T.; Komatsu, M.; Asanuma, N.; Sato, Y. y Sharp, G.W. (1998) *Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic β cell*. *Trends Pharmacol. Sci.* 19:496-499.

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

- Bae, J.S.; Kim, T.H.; Kim, M.Y.; Park, J.M. y Ahn, Y.H. (2010) *Transcriptional regulation of glucose sensors in pancreatic β -cells and liver: an update*. *Sensors* 10:5031-5053.

- Bergmeyer, H.U. (1974) *Methods for determination of metabolites*. *En: Methods of enzymatic analysis*. 2º English edition, (Ed.: Bergmeyer, H.U.) Academic Press, New York, p.1100-2110.

- Boslem, E.; Meikle, P.J. y Biden, T.J. (2012) *Roles of ceramide and sphingolipids in pancreatic β -cell function and dysfunction*. *Islets* 4:177-187.

- Brandt, H.; Killilea, S.D. y Lee, E.Y. (1974) *Activation of phosphorylase phosphatase by a novel procedure: evidence for a regulatory mechanism involving the release of a catalytic subunit from enzyme-inhibitor complex(es) of higher molecular weight*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61:598-604.

- Briaud, I.; Harmon, J.S.; Kelpe, C.L.; Segu, V.B. y Poitout, V. (2001) *Lipotoxicity of the pancreatic β -cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids*. *Diabetes* 50:315-321.

- Briscoe, C.P.; Tadayyon, M.; Andrews, J.L.; Benson, W.G.; Chambers, J.K.; Eilert, M.M.; Ellis, C.; Elshourbagy, N.A.; Goetz, A.S.; Minnick, D.T.; Murdock, P.R.; Sauls, H.R. Jr.; Shabon, U.; Spinage, L.D.; Strum, J.C.; Szekeres, P.G.; Tan, K.B.; Way, J.M.; Ignar, D.M.; Wilson, S. y Muir, A.I. (2003) *The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids*. J. Biol. Chem. 278:11303-11311.

- Burch, P.T.; Trus, M.D.; Berner, D.K.; Leontire, A.; Zawalich, K.C. y Matschinsky, F.M. (1981) *Adaptation of glycolytic enzymes: glucose use and insulin release in rat pancreatic islets during fasting and refeeding*. Diabetes 30:923-928.

- Burr, I.M.; Renold, A.E.; Stauffacher, W.; Grodsky, G.M. y Balant, L. (1969) *Regulation of insulin release in perfused pancreatic tissue*. Acta. Diabetol. Lat. 6 Suppl 1:580-596.

- Calder, P.C. (2006) *n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases*. Am. J. Clin. Nutr. 83:1505S-1519S.

- Cameron, A.J.; Shaw, J.E. y Zimmet, P.Z. (2004) *The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations*. Endocrinol. Metab. Clin. North. Am. 33:351-375.

- Carpentier, Y.A.; Portois, L. y Malaisse, W.J. (2006) *n-3 Fatty acids and the metabolic syndrome*. Am. J. Clin. Nutr. 83:1499S-1504S.

- Cartailier, J.P. (2005) *Wild Type Pancreatic islet of Langerhans*. Beta Cell Biology Consortium.http://www.betacell.org/content/articlepanelview/article_id/13/panel_id/1.

- Chan, C.B. (1993) *Glucokinase activity in isolated islets from obese fa/fa Zucker rats*. Biochem. J. 295:673-677.

- Chan, C.B.; De Leo, D.; Joseph, J.W.; McQuaid, T.S.; Ha, X.F.; Xu, F.; Tsushima, R.G.; Pennefather, P.S.; Salapatek, A.M. y Wheeler, M.B. (2001) *Increased*

uncoupling protein-2 levels in β -cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion. Mechanism of action. Diabetes 50:1302-1310.

- Chan, C.B.; Saleh, M.C.; Koshkin, V. y Wheeler, M.B. (2004) *Uncoupling protein 2 and islet function. Diabetes 53 Suppl 1:S136-S142.*

- Cheal, K.L.; Abbasi, F.; Lamendola, C.; McLaughlin, T.; Reaven, G.M. y Ford, E.S. (2004) *Relationship to insulin resistance of the adult treatment panel III diagnostic criteria for identification of the metabolic syndrome. Diabetes 53:1195-1200.*

- Chen, C.; Bumbalo, L. y Leahy, J.L. (1994a) *Increased catalytic activity of glucokinase in isolated islets from hyperinsulinemic rats. Diabetes 43:684-689.*

- Chen, C.; Hosokawa, H.; Bumbalo, L.M. y Leahy J.L. (1994b) *Mechanism of compensatory hyperinsulinemia in normoglycemic insulin-resistant spontaneously hypertensive rats. Augmented enzymatic activity of glucokinase in β -cells. J. Clin. Invest. 94:399-404.*

- Chicco, A.; Soria, A.; Fainstein-Day, P.; Gutman, R. y Lombardo, Y.B. (1994) *Multiphasic metabolic changes in the heart of rats fed a sucrose-rich diet. Horm. Metab. Res. 26:397-403.*

- Chicco, A.; Basabe, J.C.; Karabatas, L.; Ferraris, N.; Fortino, A. y Lombardo, Y.B. (2000) *Troglitazone (CS-045) normalizes hypertriglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipidemic rats. Metabolism 49:1346-1351.*

- Chicco, A.; D'Alessandro, M.E.; Karabatas, L.; Pastorale, C.; Basabe, J.C. y Lombardo, Y.B. (2003) *Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. J. Nutr. 133:127-133.*

- Clarke, S.D. (2004) *The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. Curr. Opin. Lipidol. 15:13-18.*

- Cruciani-Guglielmacci, C.; Vincent-Lamon, M.; Rouch, C.; Orosco, M.; Ktorza, A. y Magnan, C. (2005) *Early changes in insulin secretion and action induced by high-fat diet are related to a decreased sympathetic tone.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 288:E148-E154.

- D'Alessandro, M.E.; Chicco, A.; Karabatas, L. y Lombardo, Y.B. (2000) *Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil.* J. Nutr. Biochem. 11:273-280.

- D'Alessandro, M.E.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. (2013) *Fish oil reverses the altered glucose transporter, phosphorylation, insulin receptor substrate-1 protein level and lipid contents in the skeletal muscle of sucrose-rich diet fed rats.* Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 88:171-177.

- De Fronzo, R.A.; Tobin, J.D. y Andres, R. (1979) *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance.* Am. J. Physiol. 237:E214-E223.

- Del Prato, S. (2003) *Loss of early insulin secretion leads to postprandial hyperglycaemia.* Diabetologia 46 Suppl 1:M2-M8.

- Del Zotto, H.; Borelli, M.I.; Flores, L.; Garcia, M.E.; Gomez Dumm, C.L.; Chicco, A.; Lombardo, Y.B. y Gagliardino, J.J. (2004) *Islet neogenesis: an apparent key component of long-term pancreas adaptation to increased insulin demand.* J.Endocrinol. 183:321-330.

- De Vos, A.; Heimberg, H.; Quartier, E.; Huypens, P.; Bouwens, L.; Pipeleers, D. y Schuit, F. (1995) *Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression.* J. Clin. Invest. 96:2489-2495.

- Diraison, F.; Parton, L.; Ferré, P.; Fougelle, F.; Briscoe, C.P.; Leclerc, I. y Rutter, G.A. (2004) *Over-expression of sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP1c) in rat pancreatic islets induces lipogenesis and decreases glucose-*

stimulated insulin release: modulation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR). Biochem. J. 378:769-778.

- Donath, M.Y.; Schumann, D.M.; Faulenbach, M.; Ellingsgaard, H.; Perren, A. y Eheses, J.A. (2008) *Islet inflammation in type 2 diabetes. From metabolic stress to therapy.* Diabetes Care 31 Suppl 2:S161-S164.
- Eheses, J.A.; Perren, A.; Eppler, E.; Ribaux, P.; Pospisilik, J.A.; Maor-Cahn, R.; Gueripel, X.; Ellingsgaard, H.; Schneider, M.K.; Biollaz, G.; Fontana, A.; Reinecke, M.; Homo-Delarche, F. y Donath, M.Y. (2007) *Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes.* Diabetes 56:2356-2370.
- Fatehi-Hassanabad, Z. y Chan, C.B. (2005) *Transcriptional regulation of lipid metabolism by fatty acids: a key determinant of pancreatic β -cell function.* Nutr. Metab. 2:1.
- Fedor, D. y Kelley, D.S. (2009) *Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids.* Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 12:138-146.
- Gagliardino, J.J. (2000) *Regulación y características de la secreción de insulina: su implicancia en la terapia de la diabetes tipo 2.* Rev. Soc. Arg. de Diabetes 34:10-22.
- Ganong, W.F. (2000). *Funciones endócrinas del páncreas y regulación del metabolismo de los carbohidratos.* En: *Fisiología médica.* 17ª Edición. (Ed.: Juaréz Cedillo, J.A.) El Manual Moderno, México, p. 367-392.
- Gremlich, S.; Bonny, C.; Waeber, G. y Thorens, B. (1997) *Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels.* J. Biol. Chem. 272:30261-30269.
- Gutman, R.A.; Basilico, M.Z.; Bernal, C.A.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. (1987) *Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose-rich diet.* Metabolism 36:1013-1020.

- Hardie, D.G. (2003) *Minireview: The AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status*. *Endocrinology* 144:5179-5183.

- Hein, G.J.; Bernasconi, A.M.; Montanaro, M.A.; Pellon-Maison, M.; Finarelli, G.; Chicco, A.; Lombardo, Y.B. y Brenner, R.R. (2010) *Nuclear receptors and hepatic lipidogenic enzyme response to a dyslipidemic sucrose-rich diet and its reversal by fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298:E429-E439.

- Hein, G.J.; Chicco, A. y Lombardo Y.B. (2012) *Fish oil normalizes plasma glucose levels and improves liver carbohydrate metabolism in rats fed a sucrose-rich diet*. *Lipids* 47:141-150.

- Herbert, V.; Lau, K.S.; Gottlieb, C.W. y Bleicher, S.J. (1965) *Coated charcoal immunoassay of insulin*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 25:1375-1384.

- Holness, M.J.; Smith, N.D.; Greenwood, G.K. y Sugden, M.C. (2004) *Acute ω -3 fatty acid enrichment selectively reverses high-saturated fat feeding-induced insulin hypersecretion but does not improve peripheral insulin resistance*. *Diabetes* 53 Suppl 1:S166-S171.

- Islam, S. (2010) *The Islets of Langerhans. Advances in experimental medicine and biology*. (Ed.: Islam, S.) Springer Dordrecht Heilderberg, Londres.

- Ito, E.; Ozawa, S.; Takahashi, K.; Tanaka, T.; Katsuta, H.; Yamaguchi, S.; Maruyama, M.; Takizawa, M.; Katahira, H.; Yoshimoto, K.; Nagamatsu, S. y Ishida, H. (2004) *PPAR- γ overexpression selectively suppresses insulin secretory capacity in isolated pancreatic islets through induction of UCP-2 protein*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324:810-814.

- Jorns, A.; Tiedge, M.; Ziv. E.; Shafrir, E. y Lenzen, S. (2002) *Gradual loss of pancreatic β -cell insulin, glucokinase and GLUT2 glucose transporter immunoreactivities during the time course of nutritionally induced type-2 diabetes in *Psammomys obesus* (sand rat)*. *Virchows Arch.* 440:63-69.

- ▣ Joslin, E.P.; Kahn, C.R. y Weir, G.C. (1994) *Joslin's diabetes mellitus*. 13th English edition, (Eds: Khan, C.R. y Weir, G.C.) Lea & Febiger, Philadelphia, p. 57-80.

- ▣ Jump, D.B. (2002) *The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids*. J. Biol. Chem. 277:8755-8758.

- ▣ Kahn, S.E.; Prigeon, R.L.; McCulloch, D.K.; Boyko, E.J.; Bergman, R.N.; Schwartz, M.W.; Neifing, J.L.; Ward, W.K.; Beard, J.C. y Palmer, J.P. (1993) *Quantification of the relationship between insulin sensitivity and β -cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function*. Diabetes 42:1663-1672.

- ▣ Kakuma, T.; Lee, Y.; Higa, M.; Wang, Z.; Pan, W.; Shimomura, I. y Unger, R.H. (2000) *Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97:8536-8541.

- ▣ Kato, T.; Shimano, H.; Yamamoto, T.; Ishikawa, M.; Kumadaki, S.; Matsuzaka, T.; Nakagawa, Y.; Yahagi, N.; Nakakuki, M.; Hasty, A.H.; Takeuchi, Y.; Kobayashi, K.; Takahashi, A.; Yatoh, S.; Suzuki, H.; Sone, H. y Yamada, N. (2008) *Palmitate impairs and eicosapentaenoate restores insulin secretion through regulation of SREBP-1c in pancreatic islets*. Diabetes 57:2382-2392.

- ▣ Kim, H.; Haluzik, M.; Asghar, Z.; Yau, D.; Joseph, J.W.; Fernandez, A.M.; Reitman, M.L.; Yakar, S.; Stannard, B.; Heron-Milhavet, L.; Wheeler, M.B. y LeRoith, D. (2003) *Peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist treatment in a transgenic model of type 2 diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis*. Diabetes 52:1770-1778.

- ▣ Kim, H.I.; Cha, J.Y.; Kim, S.Y.; Kim, J.W.; Roh, K.J.; Seong, J.K.; Lee, N.T.; Choi, K.Y.; Kim, K.S. y Ahn, Y.H. (2002) *Peroxisomal proliferator-activated receptor- γ upregulates glucokinase gene expression in β -cells*. Diabetes 51:676-685.

- ▣ Kim, H.S.; Noh, J.H.; Hong, S.H.; Hwang, Y.C.; Yang, T.Y.; Lee, M.S.; Kim, K.W. y Lee, M.K. (2008) *Rosiglitazone stimulates the release and synthesis of insulin by*

- enhancing GLUT-2, glucokinase and BETA2/NeuroD expression. Biochem. Biophys. Res. Commun. 367:623-629.*
- Kim, H.S.; Hwang, Y.C.; Koo, S.H.; Park, K.S.; Lee, M.S.; Kim, K.W. y Lee, M.K. (2013) *PPAR- γ activation increases insulin secretion through the up-regulation of the free fatty acid receptor GPR40 in pancreatic β -cells.* PLoS One 8:e50128.
- Kooptiwut, S.; Kebede, M.; Zraika, S.; Visinoni, S.; Aston-Mourney, K.; Favaloro, J.; Tikellis, C.; Thomas, M.C.; Forbes, J.M.; Cooper, M.E.; Dunlop, M.; Proietto, J. y Andrikopoulos, S. (2005) *High glucose-induced impairment in insulin secretion is associated with reduction in islet glucokinase in a mouse model of susceptibility to islet dysfunction.* J. Mol. Endocrinol. 35:39-48.
- Kris-Etherton, P.M.; Harris, W.S. y Appel, L.J. (2002) *Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease.* Circulation 106:2747-2757.
- Lacy, P.E. y Kostianovsky, M. (1967) *Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.* Diabetes 16:35-39.
- Lameloise, N.; Muzzin, P.; Prentki, M. y Assimakopoulos-Jeannet, F. (2001) *Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion?* Diabetes 50:803-809.
- Laurell, S. (1966) *A method for routine determination of plasma triglycerides.* Scand. J. Clin. Lab. Invest. 18:668-672.
- Laybutt, D.R.; Sharma, A.; Sgroi, D.C.; Gaudet, J.; Bonner-Weir, S. y Weir, G.C. (2002) *Genetic regulation of metabolic pathways in β -cells disrupted by hyperglycemia.* J. Biol. Chem. 277:10912-10921.
- Lee, Y.; Hirose, H.; Ohneda, M.; Johnson, J.H.; McGarry, J.D. y Unger, R.H. (1994) *Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 91:10878-10882.

- Lee, Y.; Hirose, H.; Zhou, Y.T.; Esser, V.; McGarry, J.D. y Unger, R.H. (1997) *Increased lipogenic capacity of the islets of obese rats. A role in the pathogenesis of NIDDM.* Diabetes 46:408-413.

- Liang, Y.; Najafi, H. y Matschinsky, F.M. (1990) *Glucose regulates glucokinase activity in cultured islets from rat pancreas.* J. Biol. Chem. 265:16863-16866.

- Liu, Y.Q.; Jetton, T.L. y Leahy, J.L. (2002) *β -Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats.* J. Biol. Chem 277:39163-39168.

- Lombardo, Y.B.; Chicco, A.; Mocchiutti, N.; de Rodi M.A.; Nusimovich, B. y Gutman, R. (1983) *Effect of sucrose diet on insulin secretion in vivo and in vitro and on triglyceride storage and mobilisation of the heart of rats.* Horm. Metab. Res. 15:69-76.

- Lombardo, Y.B.; Drago, S.; Chicco, A.; Fainstein-Day, P.; Gutman, R.; Gagliardino, J.J. y Gomez Dumm, C.L. (1996a) *Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas.* Metabolism 45:1527-1532.

- Lombardo, Y.B.; Chicco, A.; D'Alessandro, M.E.; Martinelli, M.; Soria, A. y Gutman, R. (1996b) *Dietary fish oil normalize dyslipidemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet.* Biochim.Biophys.Acta 1299:175-182

- Lombardo, Y.B.; Hein, G. y Chicco, A. (2007) *Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity.* Lipids 42:427-437.

- Lombardo, Y.B. y Chicco, A. (2008) *Biochemical and molecular mechanisms of n-3 polyunsaturated fatty acids. Effects in obesity, insulin resistance and cardiovascular*

- dysfunction*. En: *Advances in Lipids Metabolism* (Ed.: Gímenez, M.S.) Research Signpost, India, p. 43-68.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- MacDonald, M.J.; Fahien, L.A.; Brown, L.J.; Hasan, N.M.; Buss, J.D. y Kendrick, M.A. (2005) *Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 288:E1-15.
- Magnan, C.; Collins, S.; Berthault, M.F.; Kassis, N.; Vincent, M.; Gilbert, M.; Pénicaud, L.; Ktorza, A. y Assimacopoulos-Jeannet, F. (1999) *Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased β -cell responsiveness to glucose*. J. Clin. Invest. 103:413-419.
- Maiztegui, B.; Borelli, M.I.; Raschia, M.A.; Del Zotto, H. y Gagliardino, J.J. (2009) *Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: β -cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion*. J. Endocrinol. 200:139-149.
- Man, Z.W.; Zhu, M.; Noma, Y.; Toide, K.; Sato, T.; Asahi, Y.; Hirashima, T.; Mori, S.; Kawano, K.; Mizuno, A.; Sano, T. y Shima, K. (1997) *Impaired β -cell function and deposition of fat droplets in the pancreas as a consequence of hypertriglyceridemia in OLETF rat, a model of spontaneous NIDDM*. Diabetes 46:1718-1724.
- Matschinsky, F.; Liang, Y.; Kesavan, P.; Wang, L.; Froguel, P., Velho, G.; Cohen, D.; Permutt, M.A.; Tanizawa, Y., Jetton, T.L.; Niswender, K. y Magnuson, M.A. (1993) *Glucokinase as pancreatic β cell glucose sensor and diabetes gene*. J. Clin. Invest. 92:2092-2098.
- Matschinsky, F.M. (1996) *Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm*. Diabetes 45:223-241

- Matsui, J.; Terauchi, Y.; Kubota, N.; Takamoto, I.; Eto, K.; Yamashita, T.; Komeda, K.; Yamauchi, T.; Kamon, J.; Kita, S.; Noda, M. y Kadowaki, T. (2004) *Pioglitazone reduces islet triglyceride content and restores impaired glucose-stimulated insulin secretion in heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor- γ -deficient mice on a high-fat diet*. Diabetes 53:2844-2854.

- McClenaghan, N.H. (2007) *Physiological regulation of the pancreatic β -cell: functional insights for understanding and therapy of diabetes*. Exp. Physiol. 92:481-496.

- McGarry, J.D. y Dobbins, R.L. (1999) *Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion*. Diabetologia 42:128-138.

- Mellouk, Z.; Hachimi, I.T.; Louchami, K.; Hupkens, E.; Sener, A.; Ait, Y.D. y Malaisse, W.J. (2012a) *The metabolic syndrome of fructose-fed rats: Effects of long-chain polyunsaturated ω 3 and ω 6 fatty acids. II. Time course of changes in food intake, body weight, plasma glucose and insulin concentrations and insulin resistance*. Int. J. Mol. Med. 29:113-118.

- Mellouk, Z.; Zhang, Y.; Bulur, N.; Louchami, K.; Malaisse, W.J.; Ait, Y.D. y Sener, A. (2012b) *The metabolic syndrome of fructose-fed rats: Effects of long-chain polyunsaturated ω 3 and ω 6 fatty acids. III. Secretory behaviour of isolated pancreatic islets*. Int. J. Mol. Med. 29:285-290.

- Mellouk, Z.; Zhang, Y.; Bulur, N.; Louchami, K.; Sener, A.; Ait, Y.D. y Malaisse, W.J. (2012c) *The metabolic syndrome of fructose-fed rats: Effects of long-chain polyunsaturated ω 3 and ω 6 fatty acids. IV. D-glucose metabolism by isolated pancreatic islets*. Int. J. Mol. Med. 29:291-293.

- Minich, D.M. y Bland, J.S. (2008) *Dietary management of the metabolic syndrome beyond macronutrients*. Nutr. Rev. 66:429-444.

- Mulder, H.; Yang, S.; Winzell, M.S.; Holm, C. y Ahrén, B. (2004) *Inhibition of lipase activity and lipolysis in rat islets reduces insulin secretion*. Diabetes 53:122-128.

- Nascimento, F.A.; Barbosa-Da-Silva, S.; Fernandes-Santos, C.; Mandarin-de-Lacerda, C.A. y Aguilá, M.B. (2010) *Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil (n-3 fatty acid rich oil)*. Exp. Toxicol. Pathol. 62:17-25.

- Newsholme, P.; Keane, D. ; Welters, H.J. y Morgan, N.G. (2007) *Life and death decisions of the pancreatic β -cell: the role of fatty acids*. Clinical Science 112:27–42

- Newsholme, P. y Krause, M. (2012) *Nutritional regulation of insulin secretion: implications for diabetes*. Clin. Biochem. Rev. 33:35-47.

- Nolan, C.J.; Madiraju, M.S.; Delghingaro-Augusto, V.; Peyot, M.L. y Prentki, M. (2006a) *Fatty acid signaling in the β -cell and insulin secretion*. Diabetes 55 Suppl 2:S16-S23.

- Nolan, C.J.; Leahy, J.L.; Delghingaro-Augusto, V.; Moibi, J.; Soni, K.; Peyot, M.L.; Fortier, M.; Guay, C.; Lamontagne, J.; Barbeau, A.; Przybytkowski, E., Joly, E., Masiello, P.; Wang, S., Mitchell, G.A. y Prentki, M. (2006b) *Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling*. Diabetologia 49:2120-2130.

- Nolan, C.J. y Prentki, M. (2008) *The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable*. Trends Endocrinol. Metab. 19:285-291.

- O'Brien, T.D.; Butler, P.C.; Westermark, P. y Johnson, K.H. (1993) *Islet amyloid polypeptide: a review of its biology and potential roles in the pathogenesis of diabetes mellitus*. Vet. Pathol. 30:317-332.

- Patanè, G.; Piro, S.; Rabuazzo, A.M.; Anello, M.; Vigneri, R. y Purrello, F. (2000) *Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids*

- or high glucose. A direct metformin effect on pancreatic β -cells. Diabetes 49:735-740.*
- ▣ Patanè, G.; Anello, M.; Piro, S.; Vigneri, R.; Purrello, F. y Rabuazzo, A.M. (2002) *Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor- γ inhibition. Diabetes 51:2749-2756.*
 - ▣ Perez-Martinez, P.; Perez-Gimenez, F. y Lopez-Miranda, J. (2010) *n-3 PUFA and lipotoxicity. Biochim. Biophys. Acta 1801:362-366.*
 - ▣ Perez-Matute, P.; Perez-Echarri, N.; Martinez, J.A.; Marti, A. y Moreno-Aliaga, M.J. (2007) *Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor- α . Br. J. Nutr. 97:389-398.*
 - ▣ Pick, A.; Clark, J.; Kubstrup, C.; Levisetti, M.; Pugh, W.; Bonner-Weir, S. y Polonsky, K.S. (1998) *Role of apoptosis in failure of β -cell mass compensation for insulin resistance and β -cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. Diabetes 47:358-364.*
 - ▣ Pighin, D.; Karabatas, L.; Rossi, A.; Chicco, A.; Basabe, J.C. y Lombardo, Y.B. (2003) *Fish oil affects pancreatic fat storage, pyruvate dehydrogenase complex activity and insulin secretion in rats fed a sucrose-rich diet. J. Nutr. 133:4095-4101.*
 - ▣ Poitout, V. y Robertson, R.P. (2002) *Minireview: Secondary β -cell failure in type 2 diabetes-A convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. Endocrinology 143:339-342.*
 - ▣ Poitout, V. (2003) *The ins and outs of fatty acids on the pancreatic β cell. Trends Endocrinol. Metab. 14:201-203.*
 - ▣ Poitout, V. (2004) *β -cell lipotoxicity: burning fat into heat?. Endocrinology 145:3563-3565.*

- Poitout, V. y Robertson, R.P. (2008) *Glucolipotoxicity: fuel excess and β -cell dysfunction*. *Endocr. Rev.* 29:351-366.

- Poitout, V.; Amyot, J.; Semache, M.; Zarrouki, B.; Hagman, D. y Fontés, G. (2010) *Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell*. *Biochim. Biophys. Acta* 1801:289-298.

- Poudyal, H.; Panchal, S.K.; Diwan, V. y Brown, L. (2011) *Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action*. *Prog. Lipid. Res.* 50:372-387.

- Prentki, M.; Joly, E.; El-Assaad, W. y Roduit, R. (2002) *Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity. Role in β -cell adaptation and failure in the etiology of diabetes*. *Diabetes* 51 Suppl 3:S405-S413.

- Prentki, M. y Nolan, C.J. (2006) *Islet β cell failure in type 2 diabetes*. *J. Clin. Invest.* 116:1802-1812.

- Printz, R.L. ; Magnuson, M.A. y Granner, D.K. (1993) *Mammalian glucokinase*. *Annu. Rev. Nutr.* 13:463-496.

- Produit-Zengaffinen, N.; Davis-Lameloise, N.; Perreten, H.; Bécard, D.; Gjinovci, A.; Keller, P.A.; Wollheim, C.B.; Herrera, P.; Muzzin, P. y Assimacopoulos-Jeannet, F. (2007) *Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species*. *Diabetologia* 50:84-93.

- Ravnskjaer, K.; Boergesen, M.; Rubi, B.; Larsen, J.K.; Nielsen, T.; Fridriksson, J.; Maechler, P. y Mandrup, S. (2005) *Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) potentiates, whereas PPAR γ attenuates, glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells*. *Endocrinology* 146:3266-3276.

- Ravnskjaer, K.; Frigerio, F.; Boergesen, M.; Nielsen, T.; Maechler, P. y Mandrup, S. (2010) *PPAR δ is a fatty acid sensor that enhances mitochondrial oxidation in*

- insulin-secreting cells and protects against fatty acid-induced dysfunction.* J. Lipid. Res. 51:1370-1379.
- Reeves, P.G.; Nielsen, F.H. y Fahey, G.C. Jr. (1993) *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet.* J. Nutr. 123:1939-1951.
- Rhodes, C.J. (2005) *Type 2 diabetes-a matter of β -cell life and death?* Science 307:380-384.
- Robertson, R.P. (2004) *Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes.* J. Biol. Chem. 279:42351-42354.
- Roudit, R.; Morin, J., Massé, F.; Segall, L.; Roche, E.; Newgard, C.B.; Assimacopoulos-Jeannet, F. y Prentki, M. (2000) *Glucose down-regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor- α gene in the pancreatic β -cell.* J. Biol. Chem. 275:35799-35806.
- Rosen, E.D. y Spiegelman, B.M. (2001) *PPAR γ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth.* J. Biol. Chem. 276:37731-37734.
- Rossi, A.S.; Lombardo, Y.B.; Lacorte, J.M.; Chicco, A.G.; Rouault, C.; Slama, G. y Rizkalla, S.W. (2005) *Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats.* Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 289:R486-R494.
- Rossi, A.S.; Lombardo, Y.B. y Chicco, A.G. (2010) *Lipogenic enzyme activities and glucose uptake in fat tissue of dyslipemic, insulin-resistant rats: Effects of fish oil.* Nutrition 26:209-217.
- Rossi, A.S.; Oliva, M.E.; Ferreira, M.R.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. (2012) *Dietary chia seed induced changes in hepatic transcription factors and their target lipogenic and oxidative enzyme activities in dyslipidaemic insulin-resistant rats.* Br. J. Nutr. 109:1617-1627.

- Saleh, M.C.; Wheeler, M.B. y Chan, C.B. (2006) *Endogenous islet uncoupling protein-2 expression and loss of glucose homeostasis in ob/ob mice*. J Endocrinol. 190:659-667.

- Salt, I.P.; Johnson, G.; Ashcroft, S.J. y Hardie, D.G. (1998) *AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic β cells, and may regulate insulin release*. Biochem. J. 335:533-539.

- Schnell, S.; Schaefer, M. y Schöfl, C. (2007) *Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from β -cells through activation of GPR40*. Molecular and Cellular Endocrinology 263:173-180.

- Shao, J.; Qiao, L. y Friedman, J.E. (2004) *Prolactin, progesterone, and dexamethasone coordinately and adversely regulate glucokinase and cAMP/PDE cascades in MIN6 beta-cells*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 286:E304-E310.

- Shimabukuro, M.; Zhou, Y.T.; Lee, Y. y Unger, R.H. (1998) *Troglitazone lowers islet fat and restores β cell function of Zucker diabetic fatty rats*. J. Biol. Chem. 273:3547-3550.

- Shimano, H. (2001) *Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes*. Progress in Lipid Research 40:439-452.

- Sone, H. y Kagawa, Y. (2005) *Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice*. Diabetologia 48:58-67.

- Soria, A.; D'Alessandro, M.E. y Lombardo, Y.B. (2001) *Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes*. J. Appl. Physiol. 91:2109-2116.

- Soria, A.; Chicco, A.; Eugenia, D.M.; Rossi, A. y Lombardo, Y.B. (2002) *Dietary fish oil reverse epididymal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model*. J. Nutr. Biochem. 13:209-218.

- Steil, G.M.; Trivedi, N.; Jonas, J.C.; Hasenkamp, W.M.; Sharma, A.; Bonner-Weir, S. y Weir, G.C. (2001) *Adaptation of β -cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 280:E788-E796.

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

- Steiner, D.F.; Chan, S.J. y Rubenstein, A.H. (2011) *Biosynthesis of Insulin*. Compr. Physiol. Supplement 21: 49-78.

- Straub, S.G. y Sharp, G.W. (2002) *Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion*. Diabetes Metab. Res. Rev. 18:451-463.

- Sugden, M.C. y Holness, M.J. (2004) *Potential role of peroxisome proliferator-activated receptor- α in the modulation of glucose-stimulated insulin secretion*. Diabetes 53 Suppl 1:S71-S81.

- Takahashi, A.; Motomura, K.; Kato, T.; Yoshikawa, T.; Nakagawa, Y.; Yahagi, N.; Sone, H.; Suzuki, H.; Toyoshima, H.; Yamada, N. y Shimano, H. (2005) *Transgenic mice overexpressing nuclear SREBP-1c in pancreatic β -cells*. Diabetes 54:492-499.

- Taouis, M.; Dagou, C.; Ster, C.; Durand, G.; Pinault, M. y Delarue, J. (2002) *n-3 Polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282:E664-E671.

- Terauchi, Y.; Takamoto, I.; Kubota, N.; Matsui, J.; Suzuki, R.; Komeda, K.; Hara, A.; Toyoda, Y.; Miwa, I.; Aizawa, S.; Tsutsumi, S.; Tsubamoto, Y.; Hashimoto, S.;

- Eto, K.; Nakamura, A.; Noda, M.; Tobe, K.; Aburatani, H.; Nagai, R. y Kadowaki, T. (2007) *Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory β cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance*. J. Clin. Invest. 117:246-257.
- Thorens, B.; Wu, Y.J.; Leahy, J.L. y Weir, G.C. (1992) *The loss of GLUT2 expression by glucose-unresponsive β cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment*. J. Clin. Invest. 90:77-85.
- Trus, M.D.; Zawulich, W.S.; Burch, P.T.; Berner, D.K.; Weill, V.A. y Matschinsky, F.M. (1981) *Regulation of glucose metabolism in pancreatic islets*. Diabetes 30:911-922.
- Unger, R.H. y Zhou, Y.T. (2001) *Lipotoxicity of β -cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover*. Diabetes 50 Suppl 1:S118-S121.
- Van Citters, G.W.; Kabir, M.; Kim, S.P.; Mittelman, S.D.; Dea, M.K.; Brubaker, P.L. y Bergman, R.N. (2002) *Elevated glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide, but not glucose, associated with hyperinsulinemic compensation for fat feeding*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 87:5191-5198.
- Van Veldhoven, P.P.; Swinnen, J.V.; Esquenet, M. y Verhoeven, G. (1997) *Lipase-based quantitation of triacylglycerols in cellular lipid extracts: requirement for presence of detergent and prior separation by thin-layer chromatography*. Lipids 32:1297-1300.
- Varga, T.; Czimmerer, Z. y Nagy, L. (2011) *PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation*. Biochim. Biophys. Acta 1812:1007-1022.
- Venkatachalam, G.; Sakharkar, M.K.; Kumar, A.P. y Clement, M.V. (2009). *PPRESearch: Peroxisome Proliferator Activator Element Search Database*. Int. J. Integ. Biol. 8:37-42.

- Wahli, W. y Michalik, L. (2012) *PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation*. Trends Endocrinol. Metab. 23:351-363.

- Wang, H.; Maechler, P.; Antinozzi, P.A.; Herrero, L.; Hagenfeldt-Johansson, K.A.; Björklund, A. y Wollheim, C.B. (2003) *The transcription factor SREBP-1c is instrumental in the development of β -cell dysfunction*. J. Biol. Chem. 278:16622-16629.

- Wang, M.Y.; Koyama, K.; Shimabukuro, M.; Mangelsdorf, D.; Newgard, C.B. y Unger, R.H. (1998) *Overexpression of leptin receptors in pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats restores GLUT-2, glucokinase, and glucose-stimulated insulin secretion*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95:11921-11926.

- Wang, X.; Zhou, L.; Li, G.; Luo, T.; Gu, Y.; Qian, L.; Fu, X.; Li, F.; Li, J. y Luo, M. (2007) *Palmitate activates AMP-activated protein kinase and regulates insulin secretion from β cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 352:463-468.

- Wei, D.; Li, J.; Shen, M.; Jia, W.; Chen, N.; Chen, T.; Su, D.; Tian, H.; Zheng, S.; Dai, Y. y Zhao, A. (2010) *Cellular production of n-3 PUFAs and reduction of n-6-to-n-3 ratios in the pancreatic β -cells and islets enhance insulin secretion and confer protection against cytokine-induced cell death*. Diabetes 59:471-478.

- Weir, G.C. y Bonner-Weir, S. (2007) *A dominant role for glucose in β cell compensation of insulin resistance*. J. Clin. Invest. 117:81-83.

- Weir, G.C.; Bonner-Weir, S. y Sharma, A. (2009) *Regulación de la secreción de insulina y función de las células de los islotes*. En: *Atlas de diabetes*. 3ra edición. (Ed.: Skyler, J.S.) Intermédica, Buenos Aires, Argentina, p. 1-12.

- Welters, H.J.; McBain, S.C.; Tadayon, M.; Scarpello, J.H.; Smith, S.A. y Morgan, N.G. (2004) *Expression and functional activity of PPAR γ in pancreatic β cells*. Br. J. Pharmacol. 142:1162-1170.

- Winzell, M.S. y Ahrén, B. (2004) *The high-fat diet-fed mouse. A model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes.* Diabetes 53 Suppl 3:S215-S219.

- Wollenberger, A.; Ristau, O. y Schoffa, G. (1960). *Eine einfache technik der extrem schnellen abkühlung grober gewebsstücke.* Pflugers Arch. Ges. Physiol. 270: 339-412.

- Zhang, C.Y.; Baffy, G.; Perret, P.; Krauss, S.; Peroni, O.; Grujic, D.; Hagen, T.; Vidal-Puig, A.J.; Boss, O.; Kim, Y.B.; Zheng, X.X.; Wheeler, M.B.; Shulman, G.I.; Chan, C.B. y Lowell, B.B. (2001) *Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, β cell dysfunction, and type 2 diabetes.* Cell 105:745-755.

- Zhou, Y.P. y Grill, V.E. (1994) *Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle.* J. Clin. Invest. 93:870-876

- Zhou, Y.P. y Grill, V.E. (1995) *Palmitate-induced β -cell insensitivity to glucose is coupled to decreased pyruvate dehydrogenase activity and enhanced kinase activity in rat pancreatic islets.* Diabetes 44:394-399.

- Zhou, Y.P.; Berggren, P.O. y Grill, V. (1996) *A fatty acid-induced decrease in pyruvate dehydrogenase activity is an important determinant of β -cell dysfunction in the obese diabetic db/db mouse.* Diabetes 45:580-586.

- Zhou, Y.T.; Shimabukuro, M.; Wang, M.Y.; Lee, Y.; Higa, M.; Milburn, J.L.; Newgard, C.B. y Unger, R.H. (1998) *Role of peroxisome proliferator-activated receptor α in disease of pancreatic β cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95:8898-8903.

**PUBLICACIONES,
PRESENTACIONES A
CONGRESOS
Y REUNIONES CIENTIFICAS**

PUBLICACIONES

- Ferreira, M.R.; Lombardo, Y.B. y Chicco, A.G. (2010). “ *β cell adaptation/dysfunction in animal model of dyslipidemia and insulin resistance induced by the chronic administration of a sucrose-rich diet.*” *Islets*, 2 (6):367 – 373.
- Ferreira, M.R.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (2010). “*Adaptación de la célula β en dislipemia e insulinoresistencia inducida por dieta rica en sacarosa. Rol de la glucoquinasa*”. *FABICIB*, 14: 138-147.
- Ferreira, M.R.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. (2013). “*Dietary fish oil normalized glucose-stimulated insulin secretion in isolated pancreatic islets of dyslipemic rats through mechanisms involving glucose phosphorylation, peroxisome proliferator – activated receptor γ and uncoupling protein 2.*” *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 89: 31-38.

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTIFICAS

CONGRESOS INTERNACIONALES

- **XV Congreso Latinoamericano de Nutrición – SLAN 2009. XVI Jornadas de la Sociedad Chilena de Nutrición.** Santiago de Chile, Chile. 15 al 19 de noviembre de 2009. *Revista Chilena de Nutrición* vol: 36 p: 340. 2009. “*Efectos de los ácidos grasos polinosaturados n-3 de origen marino sobre la dislipemia y disfunción de la célula beta en ratas insulino resistentes*”. Lombardo, Y.B.; Ferreira, M.R.; Chicco A.G.
- **70th Scientific Sessions – American Diabetes Association.** Orlando, Florida, EEUU. 25 al 29 de junio de 2010. *Diabetes* Vol: 59 supl: I .p: A456 - 457. 2010. “*Role of Uncoupling Protein 2 (UCP-2) and Peroxisome Proliferation Activated- Receptor γ (PPAR γ) in the β cell dysfunction of dyslipemic insulin resistant rats. Effect of fish oil*”. Lombardo, Y.B.; Ferreira, M.R.; Chicco A.G.

- **29th International Symposium on Diabetes and Nutrition of the Nutrition Study Group (DNSG) of the EASD.** Roma, Italia. 30 de junio al 2 de Julio de 2011. *“Mechanisms involved in the β cell dysfunction of dyslipemic, insulin resistant rats. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil (FO)”*. Lombardo, Y.B.; Ferreira, M.R.; Chicco A.G.

CONGRESOS NACIONALES

- **Undécimo Encuentro Jóvenes Investigadores Universidad Nacional del Litoral. Segundo Encuentro Jóvenes Investigadores Universidades de Santa Fe.** Santa Fe, Argentina. 10 y 11 de octubre de 2007. *“Mecanismos de glucolipotoxicidad de la célula β pancreática: rol de las enzimas fosforilantes de la glucosa.”* Ferreira, M.R.; Lombardo, Y.B.
- **LII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. LV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología y Sociedad Argentina de Fisiología.** Mar del Plata, Argentina. 21 al 24 de noviembre de 2007. Medicina, Vol 67 supl: 3 p: 121. 2007. *“Actividades glucoquinasa y hexoquinasa en islotes de Langerhans de ratas alimentadas crónicamente con dieta rica en sacarosa.”* Ferreira, M.R.; Chicco, A.G.; Lombardo, Y.B.
- **LIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Reunión de la Sociedad Argentina de Fisiología.** Mar del Plata, Argentina. 19 al 22 de noviembre de 2008. Medicina, Vol 68 supl: 2 p: 122. 2008. *“Rol de la glucoquinasa y PPAR γ en la disfunción de la célula β pancreática de ratas dislipémicas insulino resistentes. Efectos de los ácidos grasos poliinsaturados n-3.”* Ferreira, M.R.; Chicco, A.G.; Lombardo, Y.B.
- **XVII Congreso Argentino de Diabetes – Diálogo entre lo básico y lo clínico.** Mar del Plata, Argentina. 21 al 23 de octubre de 2010. Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes. Vol 44 N°4 p: 311.2010. *“Posibles mecanismos involucrados en la evolución de la disfunción de la célula β en un modelo de dislipemia y resistencia insulínica.”* Ferreira, M.R.; Lombardo, Y.B.; Chicco, A.G.

Adicionalmente dentro del área temática:

Publicaciones

- Rossi, A.; Oliva, M.E.; Ferreira, M.R.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. (2011). “*La semilla de Salba (Salvia hispánica L) dietaria previene la esteatosis hepática y dislipidemia inducida en ratas normales por una dieta rica en sacarosa*”. FABICIB, 15: 47-59.
- D’Alessandro, M.E.; Oliva, M.E.; Ferreira, M.R.; Selenscig, D.; Lombardo, Y.B. y Chicco, A. (2012). “*Sucrose-rich feeding during rat pregnancy-lactation and/or after weaning alters glucose and lipid metabolism in adult offspring*”. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. (CEPP), 39: 623-629.
- Rossi, A.; Oliva, M.E.; Ferreira, M.R.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. (2013). “*Dietary Chia Seed induced changes in hepatic transcription factors and their target lipogenic and oxidative enzyme activities in dyslipidaemic insulin-resistant rats*”. British J. of Nutr., 109: 1617-1627.
- Ferreira, M.R.; Camberos, M. del C.; Selenscig, D.; Martucci, L.C.; Chicco, A.; Lombardo, Y.B. y Cresto, J.C. (2013). “*Changes in hepatic lipogenic and oxidative enzymes and glucose homeostasis induced by an acetyl-L-carnitine and nicotinamide treatment in dyslipidaemic insulin resistant rats*”. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. (CEPP), 40: 205-211.
- Oliva, M.E.; Ferreira, M.R.; Chicco, A. y Lombardo, Y.B. “*Dietary Salba (Salvia hispánica L) seed rich in α -linolenic acid improves adipose tissue dysfunction and the altered skeletal muscle glucose and lipid metabolism in dyslipidemic insulin-resistant rats.*” Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. (en evaluación).

Presentaciones a Congresos y Reuniones Científicas

Congresos Internacionales

- **31st International Symposium on Diabetes and Nutrition of the Diabetes and Nutrition Study Group (DNSG) of the EASD.** Dubrovnik, Croacia. 27 al 30 de Junio de 2013. “*Dietary Salba seed (Salvia hispanica L) ameliorate the metabolic abnormalities of dysfunctional adipose tissue of dyslipemic insulin-resistant rats*”. Lombardo, Y.B.; Ferreira, M.R.; Chicco, A.

Congresos Nacionales

- **V Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas.** Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. 10 y 11 de Julio de 2012. “*Enzimas lipogénicas – oxidativas hepáticas y masa proteica de PPARα y SREBP-1 en ratas dislipémicas insulino resistentes. Efecto de la semilla de Salvia hispanica L (chia)*”. Oliva, M.E.; Ferreira, M.R.; Chicco, A.; Lombardo, Y.B.
- **V Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas.** Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. 10 y 11 de Julio de 2012. “*Importancia de la dieta durante la preñez, lactancia y post-lactancia sobre aspectos del metabolismo lipídico e hidrocarbonado en la vida adulta*”. D’Alessandro, M.E.; Oliva, M.E.; Ferreira, M.R.; Selensci, D.; Chicco, A.
- **XVIII Congreso Argentino de Diabetes – De las evidencias al tratamiento personalizado.** Buenos Aires, Argentina. 8 al 10 de noviembre de 2012. Revista de la Sociedad Argentina de diabetes. Vol 46 N° 4 p: 216-217. 2012. “*Influencia de la composición de la dieta durante los primeros estadios de vida sobre el metabolismo lipídico y glucídico en la adultez*”. Ferreira, M.R.; D’Alessandro, M.E.; Fortino, M.A.; Chicco, A.