



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Búsqueda de marcadores predictivos de diabetes y prediabetes a través de la identificación de genes diferencialmente metilados en islotes y leucocitos de ratas sometidas a una dieta rica en fructosa.

Tesista: Lucía Ahrtz

Director: Luis Emilio Flores

Codirector: Ezequiel Lacunza

Año: 2024

*Dedicado a mi mamá Adriana, la persona que más amo y
admiro en este mundo.*

Agradecimientos

“Si he logrado ver más lejos ha sido porque he subido a hombros de gigantes”

Isaac Newton.

Gracias a mi mamá Adriana D’Abramo por ser mi inspiración en lo humano y en lo profesional. Gracias por enseñarme que lo importante en esta vida es ser buena persona y mantener la humildad. Sos ejemplo de lucha y perseverancia, sos el esfuerzo y la valentía, sos el amor y la calidez, sos la entrega total hacia el otro.

Gracias a mis abuelos Nicolás D’Abramo e Irma Rodriguez por criarme con todo el amor del mundo y por dejar su huella en mí.

Gracias a Rodolfo Pirone por elegirme y acompañarme en esta vida, por el tiempo, los consejos y los cafés compartidos.

Gracias a mi novio Matías Tissieres por el aguante todos estos años, por contagiarme tu positividad, por creer en mí y recordarme que yo puedo.

Gracias a mi gatita Roma por darme amor, tranquilidad y compañía en las largas horas de escritura.

Gracias a mis amigos, los que están muy cerquita y los que tengo lejos, porque fueron un pilar fundamental en esta etapa. Gracias por estar siempre a mi lado para escucharme y alentarme. Gracias por festejar cada uno de mis triunfos y por impulsarme para adelante en tiempos de dificultad.

Gracias a todas las personas que contribuyeron a la realización de esta tesis en cada una de sus etapas: planeamiento, experimentación, análisis de resultados y escritura. Gracias a mis compañeros que me dieron una mano o una palabra de aliento cuando lo necesité. En especial quiero destacar a dos compañeras que hoy son mis amigas: Rocio Torrieri y Victoria Mencucci. Ro, ha sido un placer para mí compartir esta aventura con vos, gracias por haberme hecho sentir que siempre estaba acompañada, gracias por escucharme, por tener siempre la palabra justa y por todo el afecto que me

diste. Viqui, gracias por haber sido incondicional y omnipresente frente a mis necesidades y mis dudas académicas, como así también frente a mis emociones, vulnerabilidades, alegrías y tristezas. Gracias por enseñarme de manera desinteresada con compromiso, respeto, paciencia y sobre todo cariño.

Gracias a mi psicóloga Yanina Fadon por brindarme las herramientas necesarias para poder levantarme cada una de las miles de veces que he caído.

Gracias a los valientes que mantienen el sitio web Sci-Hub por darnos a todos la posibilidad de acceder a la ciencia. Admiración y respeto por quienes ponen en práctica que el conocimiento es un derecho humano.

Finalmente, gracias a la Argentina, mi hermoso país, por haberme dado tantas posibilidades. Me siento privilegiada y agradecida por haber pertenecido a la educación pública y en especial a la Universidad Nacional de La Plata desde los dos años hasta la actualidad. Por esto quiero agradecer a la Escuela Graduada Joaquín V. González, al Colegio Nacional Rafael Hernández, a la Facultad de Ciencias Exactas y a la Facultad de Ciencias Médicas. También a todas las instituciones en donde realicé cursos de posgrado y al CONICET por haberme otorgado la beca que me permitió realizar esta tesis.

Índice

ABREVIATURAS.....	10
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	12
I.1. El páncreas endocrino y su ambiente celular.	15
I.1.1. Desarrollo embrionario del páncreas.	15
I.1.2. Los islotes de Langerhans.	17
I.1.3. Irrigación.....	20
I.1.4. Inervación.	21
I.1.5. Contactos célula-célula.....	21
I.2. La célula β y su función secretora de insulina.....	22
I.2.1. La molécula de insulina: estructura y biosíntesis.	22
I.2.2. Estímulos de la secreción de insulina.	24
I.2.3. Características de la SIEG.....	27
I.2.4. El receptor de insulina y su vía de señalización intracelular.....	28
I.2.5. Tejidos diana de la insulina y sus efectos.	30
I.3. Fisiopatología de la DT2 y de la PD.....	32
I.3.1. Diabetes.....	32
I.3.2. Bases moleculares de generación de complicaciones de la diabetes.....	35
I.3.2.A. Acúmulo de triosas fosfato y aumento de la formación de productos finales de glicación avanzados (AGEs).....	36
I.3.2.B. Acúmulo de DHAP y activación de la proteína quinasa C (PKC).....	37
I.3.2.C. Acúmulo de fructosa-6-fosfato y aumento del flujo en la vía de las hexosaminas.....	38
I.3.2.D. Aumento de flujo en la vía de los polioles.....	38
I.3.3. Prevalencia de diabetes y perspectivas a futuro.	39
I.3.4. Prediabetes.....	41
I.3.4.A. Diagnóstico de PD.....	41
I.3.4.B. La PD no es una pre-enfermedad.	42
I.3.5. Importancia del diagnóstico temprano.	43
I.4. La fructosa y su relación con el desarrollo del estado de PD.	44
I.4.1. Bebidas endulzadas con fructosa.	44
I.4.2. Metabolismo de la fructosa.	45
I.4.3. Modelos de dietas ricas en fructosa y sacarosa en ratas.	47
I.5. Epigenética.	49
I.5.1. Modificaciones postraduccionales de histonas.	51
I.5.2. ARNs no codificantes: miRNAs y lncRNAs.....	52
I.5.3. Metilación del ADN.....	53
I.5.3.A. Mecanismos de metilación del ADN.....	54
I.5.3.B. Partes del gen que pueden metilarse en el ADN genómico.	55
I.5.3.C. La metilación en el ADN mitocondrial.	57
I.5.4. Hitos en la relación entre DT2 y epigenética.	59
I.5.4.A. Primeros estudios.	59
I.5.4.B. Nuevas tecnologías.	60
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	62
II.1. Hipótesis.....	63

II.2. Objetivo	63
II.2.1. Objetivo general.	63
II.2.2. Objetivos específicos.	63
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	65
Diseño experimental	66
III.1. Animales	67
III.1.1. Características de los animales.	67
III.1.2. Mantenimiento de los animales.	67
III.1.3. Grupos experimentales.....	67
III.1.4. Medidas y cálculos relacionados con el alimento y la bebida.	68
III.1.5. Sacrificio y obtención de las muestras.....	69
III.2. Determinaciones del metabolismo glucémico	70
III.2.1. Determinación de glucemia y obtención de plasma.....	70
III.2.2. Prueba de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (PTGip).	70
III.3. Determinaciones del metabolismo lipídico	71
III.3.1. Determinación de TG.	71
III.3.2. Determinación de colesterol y cálculo del índice de IR.	71
III.3.2.A. Determinación de colesterol total.	71
III.3.2.B. Determinación de fracción de colesterol HDL.	72
III.3.2.C. Determinación de fracción de colesterol NO-HDL.	72
III.3.2.D. Cálculo del índice de insulinoresistencia (Índice IR).....	72
III.4. Determinación de sustancias reductoras del ácido tiobarbitúrico (TBARS)	73
III.5. Experimentos con islotes de Langerhans aislados	74
III.5.1. Aislamiento de islotes de Langerhans.	74
III.5.2. SIEG y determinación de insulina por ELISA.	74
III.5.2.A. SIEG.	74
III.5.2.B. ELISA.	74
III.5.3. Aislamiento de ARN y evaluación de su integridad.	75
III.5.4. Obtención de ADN complementario (ADNc) por retrotranscripción y evaluación de su eficacia.	76
III.5.5. PCR en tiempo real (qPCR).....	77
III.5.5.A. Obtención de <i>primers</i>	77
III.5.5.B. qPCR.	78
III.5.6. Obtención de proteínas insulares y posterior identificación y cuantificación de proteínas específicas por Wb.....	79
III.5.7. Aislamiento del ADN.	80
III.6. Análisis estadístico	82
III.7. Secuenciamiento masivo del metiloma y análisis bioinformático	83
III.7.1. Muestras enviadas a secuenciar	83
III.7.2. Secuenciación NovaSeq PE 150.	84
III.7.2.A. Características de la secuenciación.	84
III.7.2.B. Controles de calidad.	86
III.7.2.C. Análisis de los datos de la secuenciación.....	86
CAPÍTULOS IV A IX: RESULTADOS Y DISCUSIONES	89

Capítulo IV: Validación del modelo basado en DRF por 21 días para generar alteraciones plurimetabólicas semejantes a la PD humana.....	90
IV.1. Resultados	91
IV.1.A. Parámetros dietarios.....	91
IV.1.B. Parámetros de crecimiento.....	93
IV.1.C. Metabolismo glucémico.....	93
IV.1.D. SIEG en islotes aislados.....	94
IV.1.E. Metabolismo lipídico.....	95
VI.1.F. TBARS.....	96
VI.1.G. Apoptosis.....	97
IV.2. Discusión y conclusiones.....	98
IV.2.1. Discusión.....	98
IV.2.2. Conclusiones.....	101
Capítulo V: Elección del modelo de reversión	102
V.1. Resultados.....	103
V.1.A. Primer intento: reversión por cambios en el hábito alimenticio utilizando un período total de seguimiento de 42 días.....	103
V.1.B. Segundo intento: reversión por cambio de hábitos alimenticios utilizando un período de 70 días.....	104
V.1.C. Tercer intento: reversión por incorporación de un agente antioxidante.....	106
V.2. Discusión y conclusiones.....	108
V.2.1. Discusión.....	108
V.2.2. Conclusiones.....	111
Capítulo VI: Administración por 70 días de una DRF y la posible reversión de sus efectos por adopción de hábito alimenticio saludable.....	112
VI.1. Resultados.....	113
VI.1.A. Parámetros dietarios.....	113
VI.1.B. Parámetros de crecimiento.....	115
VI.1.C. Metabolismo glucémico.....	116
IV.1.D. SIEG en islotes aislados.....	117
VI.1.E. Metabolismo lipídico.....	118
VI.1.F. TBARS.....	120
VI.2. Discusión y conclusiones.....	121
VI.2.1. Discusión.....	121
VI.2.2. Conclusiones.....	124
Capítulo VII: Efecto de las dietas utilizadas en nuestro modelo de 70 días sobre la expresión génica de factores que participan en procesos y vías claves para la función insular.....	125
VII.1. Resultados.....	126
VII.1.A. Efecto sobre la expresión del gen de insulina.....	126
VII.1.B Efecto sobre intermediarios de la cascada de señalización de insulina.....	126
VII.1.C. Efecto sobre la expresión génica de factores involucrados en procesos que regulan la masa.....	129
VII.1.C1. Neogénesis.....	129
VII.1.C2. Apoptosis.....	130
VII.1.D. Efecto sobre la expresión de moduladores del EO de origen mitocondrial.....	133
VII.1.E. Efecto sobre la expresión génica de intermediarios de la cascada de señalización de leptina.....	135
VII.1.F. Efecto sobre la expresión de genes que codifican factores que modulan el proceso de angiogénesis.....	136
VII.2. Discusión y conclusiones.....	138
VII.2.1. Discusión.....	138
VII.2.1.A y B. Impacto en la expresión del gen de Insulina y de intermediarios de su vía de señalización.....	138
VII.2.1.C. Mantenimiento de la masa de células β	139

VII.2.1.C1. Neogénesis.....	139
VII.2.1. C2. Apoptosis.....	140
VII.2.1.D. EO y defensa contra ROS.....	140
VII.2.1.D1. UCP2.....	140
VII.2.1.D2. Defensa antioxidante, enzimas SOD2 y catalasa.....	141
VII.2.1.E. Cascada de señalización de leptina.....	141
VII.2.1.F. Angiogénesis.....	142
VII.2. Conclusiones.....	142

Capítulo VIII: Análisis general de metilación diferencial en el ADN de islotes y posible repercusión a nivel transcripcional. 144

VIII.1. Resultados.....	145
VIII.1.1. Identificación de sitios CpGs DM entre los grupos experimentales.....	145
VIII.1.2 Distribución en el genoma de los sitios CpGs DM.....	146
VIII.1.2.A. Distribución cromosómica.....	146
VIII.1.2.B. Distribución en las diferentes regiones de los cromosomas.....	147
VIII.1.2.C. Distribución en Islas CpGs, <i>Shores</i> y <i>Open Sea</i>	148
VIII.1.3. Análisis de los genes asociados a las CpGs DM.....	150
VIII.1.3.A. Número de genes asociados a CpGs DM por comparación.....	150
VIII.1.3.B. Identificación de los 104 genes asociados a CpGs DM y localización en las diferentes regiones génicas.....	151
VIII.1.3.C. Vías celulares en las que participan los genes.....	154
VIII.1.4. Análisis de la posible reversión de los cambios epigenéticos registrados en el grupo F.....	155
VIII.1.4.A. Análisis con bajas restricciones.....	155
VIII.1.4.B. Análisis con restricciones altas.....	157
VIII.1.5. Otros análisis complementarios.....	159
VIII.1.6. Efecto de los cambios de metilación del ADN sobre la expresión génica.....	161
VIII.1.6.A. Efecto de la metilación en la expresión génica mitocondrial (Nd1, Nd2 y Atp6).....	162
VIII.1.6.B. Efecto de la metilación en la expresión génica de Uxs1.....	163
VIII.2. Discusión y conclusiones.....	164
VIII.2.1. Discusión.....	164
VIII.2.1.1. Modificaciones en la metilación del ADN nuclear.....	164
VIII.2.1.1.A. Localización.....	164
VIII.2.1.1.B. Genes asociados a CpGs DM en la comparación C vs F.....	165
VIII.2.1.1.C. Reversión de las modificaciones epigenéticas.....	167
VIII.2.1.2. Modificaciones en la metilación del ADN mitocondrial.....	169
VIII.2.1.2.A. Localización.....	169
VIII.2.1.2.B. Consecuencias transcripcionales de las metilaciones en el ADNmt.....	170
VIII.2.1.2.C. Estudio de enriquecimiento funcional.....	172
VIII.2.1.2.D. Modificaciones epigenéticas que no revierten.....	175
VIII.2.2. Conclusiones.....	175

Capítulo IX: Análisis general de metilación diferencial en el ADN de leucocitos y su comparación con ADN insular..... 177

IX.1. Resultados.....	178
IX.1.1. Identificación de sitios CpGs DM entre los grupos experimentales.....	178
IX.1.2 Distribución en el genoma de los sitios CpGs DM.....	179
IX.1.2.A. Distribución cromosómica.....	179
IX.1.2.B. Distribución en las diferentes regiones de los cromosomas.....	179
IX.1.2.C. Distribución en Islas CpGs, <i>Shores</i> y <i>Open Sea</i>	180
IX.1.3. Análisis de los genes asociados a las CpGs DM.....	181
IX.1.3.A. Número de genes asociados a CpGs DM por comparación.....	181
IX.1.3.B. Identificación de los 30 genes asociados a CpGs DM y localización en las diferentes regiones génicas.....	181
IX.1.3.C. Vías celulares en las que participan los genes.....	183
IX.4. Análisis de la posible reversión de los cambios epigenéticos registrados en el grupo F.....	183

IX.1.4. A. Análisis con bajas restricciones.....	184
IX.1.4.B. Análisis con restricciones altas.....	185
IX.1.5. Otros análisis complementarios:	185
IX.1.6. Genes afectados simultáneamente en islotes y leucocitos.	186
IX.2. Discusión y conclusiones.	189
IX.2.1. Discusión.	189
IX.2.1.1. Generalidades del análisis.....	189
IX.2.1.2. Localización de las CpGs DM y enriquecimiento funcional.....	189
IX.2.1.3. Genes asociados a CpGs DM en la comparación C vs F.....	190
IX.2.1.4. Análisis de la reversión.....	191
IX.2.1.5. MEPD.....	193
IX.2.2. Conclusiones.	194
CAPÍTULO X: CONCLUSIONES GLOBALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO.....	195
ANEXOS	200
Anexo 1.....	201
Anexo 2.....	202
BIBLIOGRAFÍA	203

Abreviaturas

5mC: 5-metilcitosina	GABA: ácido gama-aminobutírico
ADA: American Diabetes Association	GAPDH: gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
ADNmt: ADN mitocondrial	Gas8: proteína específica de arresto del crecimiento 8
AG: ácidos grasos	GLP-1: péptido glucagón-simil-1
AGEs: productos finales de glicación avanzada	GLUT: transportador de glucosa
ARNt: ARNs de transferencia	HbA1c: hemoglobina glicosilada
Atg7: proteína relacionada con la autofagia 7	HDL: lipoproteínas de muy alta densidad
Atp6/8: subunidad 6/8 de la ATP sintasa	Hifaα: subunidad α del factor 1 inducible por hipoxia
Bim: mediador interactivo de Bcl-2 en muerte celular	HiperM: hipermetiladas/os
Brca2: proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 2	HipoM: hipometiladas/os
BSA: albúmina sérica bovina	IAPP: polipéptido amiloide de islotes
Casp: caspasa	ICA512: autoantígeno de la célula del islote 512
Cdh8: cadherina 8	IMC: índice de masa corporal
CGI: isla CpG	Índice IR: índice de insulinoresistencia
Ck19: citoqueratina 19	Irs: sustrato del receptor de insulina
col: colesterol	Jak2: janus quinasa 2
Cox: citocromo c oxidasa	Kac: acetilación de lisina
CTE: cadena transportadora de electrones	Kdm4c: lisina-desmetilasa 4C
DAG: diacilglicerol	KO: knock-out
DEPC: dietilpirocarbonato.	KRB: buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato
DHAP: dihidroxiacetona fosfato	LDL: lipoproteínas de baja densidad
DM: diferencialmente metilados	lncRNAs: ARNs largos no codificantes
DNMTs: ADN-metiltransferasas	LR: leptinoresistencia
DRF: dieta rica en fructosa	Lzts1: supresor tumoral putativo con cremallera de leucina 1
DRS: dieta rica en sacarosa	MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos
DT2: diabetes tipo 2	MEPD: marcadores epigenéticos de prediabetes
Emb: embigina	miRNAs: micro ARN
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial	MPTH: modificaciones postraduccionales de histonas
EO: estrés oxidativo	Nd1-6: subunidad 1-6 de la NADH-ubiquinona deshidrogenasa
Esrp1: proteína epitelial 1 reguladora del splicing	Ndufaf4: factor de ensamblaje 4 del complejo NADH:ubiquinona oxidorreductasa
ET-1: endotelina-1	Ngn-3: neurogenina-3
FO: fosforilación oxidativa	
FRCV: factores de riesgo cardiovascular	
GA3P: gliceraldehído 3 fosfato	
GAA: glucemia en ayunas alterada	

NHANES: Encuesta de Salud Nacional y el Examen de Nutrición
ObRb: isoforma b del receptor de leptina
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno 1
pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PD: prediabetes
Pdia4: proteína disulfuro isomerasa miembro de la familia A
Pdx-1: factor homeodominio pancreático duodenal 1
Pi3k: fosfoinositol 3 quinasa
Pkb/Akt: protein-quinasa B
PKC: proteína quinasa C
PP: polipéptido pancreático
Ppar γ : receptor y activado por proliferadores de peroxisomas
PTGip: prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal
PTOG: prueba de tolerancia oral a la glucosa
RECs: células endoteliales de retina
RER: retículo endoplasmático rugoso
RI: receptor de insulina
ROS: especies reactivas del oxígeno
RT: retrotranscripción
SAM: S-adenosilmetionina
SD: Sprague Dawley
SIEG: secreción de insulina estimulada por glucosa
Sirt1: sirtuina 1
Socs: supresor de a señalización por citoquinas

Sod2: superóxido dismutasa 2
Stat: proteína transductoras de señal y activadora de la transcripción
TBARS: sustancias reductoras del ácido tiobarbitúrico
Tdrd3: proteína 3 con dominio Tudor
TFAM: factor de transcripción A
TG: triglicéridos
TGA: tolerancia a la glucosa alterada
TGF- β : factor de crecimiento transformante β
Tlr4: receptor de tipo Toll 4
TSS: sitio de inicio de transcripción
UA: unidades arbitrarias
Ucp2: proteína desacoplante 2
Uxs1: UDP-ácido glucurónico descarboxilasa 1
Vegf: factor de crecimiento endotelial vascular
Vegfr2: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad
Vom2r7: receptor 7 vomeronasal tipo 2
Vom2r57: receptor 57 vomeronasal tipo 2
Wb: Western Blot (Wb)
Zfp385b: proteína dedo de zinc 385B

**Capítulo I
Introducción.**

Capítulo I: Introducción

La diabetes representa un grupo de patologías metabólicas crónicas cuyo factor común es la presencia de hiperglucemias como resultado tanto de defectos en la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas como en la acción de esta hormona a nivel periférico o a una combinación de ambas situaciones (1,2). Su prevalencia crece de forma alarmante a nivel mundial, generando un serio problema de salud pública debido al desarrollo y progresión de sus complicaciones discapacitantes y el elevado costo de su atención (3,4). Es muy frecuente que el diagnóstico de diabetes esté precedido por un estado patológico denominado “Prediabetes” (PD) que, si fuese detectado a tiempo y tratado adecuadamente, podría retrasar o prevenir la instalación de un cuadro de Diabetes Tipo 2 (DT2) (5-7).

Es importante remarcar que la PD no es tan sólo una “pre-enfermedad”, sino que, tal como ya lo han reportado diferentes autores, se trata de una enfermedad en sí misma (8). Como veremos más adelante, esta aseveración se sustenta en que la probabilidad de desarrollar eventos cardiovasculares es aproximadamente 2 veces mayor que en las personas con tolerancia a la glucosa normal (9,10). La detección temprana de la PD permite que se lleven a cabo intervenciones que insten a lograr cambios de estilo de vida que puedan reducir el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, prevenir o enlentecer su progresión a diabetes y disminuir su morbi-mortalidad. Por tal motivo, es imprescindible que los médicos clínicos puedan detectarla y soliciten pruebas para su confirmación en personas con alto riesgo (hipertensión arterial, sobrepeso u obesidad, entre otras) para poder realizar una intervención adecuada, a través de la implementación de cambios en estilo de vida, la posible introducción de alguna droga insulino-sensibilizante, y/o del tratamiento de los factores de riesgo cardiovascular (FRCV) que pudiese presentar el paciente.

Esta tesis doctoral propone la identificación de posibles marcadores epigenéticos de prediabetes (MEPD) presentes en leucocitos como herramienta para la detección temprana de la PD y la posible adopción de estrategias que permitan ralentizar o detener su progresión a DT2. En tal sentido, y para darle fundamento a nuestra hipótesis de trabajo y objetivos planteados, estructuramos este capítulo introductorio en 5 grandes secciones:

Capítulo I: Introducción

- En la primera sección presentamos al páncreas y a los islotes de Langerhans, como microórganos compuestos por diferentes células con diversas funciones endocrinas y paracrinas que dan cuenta de su complejidad.
- En la segunda, profundizamos en el conocimiento de la célula β , la estructura y función de la insulina y su rol central en la regulación de la homeostasis glucémica.
- En la tercera, revisamos los mecanismos fisiopatológicos que determinan el establecimiento de los estados de PD y diabetes.
- En la cuarta, aportamos una profunda revisión sobre las características de la metabolización de la fructosa y la relación de su alto consumo con el desarrollo del estado prediabético.
- En la última sección, describimos las modificaciones epigenéticas que puede sufrir el material genético expuesto a diferentes “condiciones ambientales” y el impacto que ocasionan en la funcionalidad de las células afectadas.

I.1. El páncreas endocrino y su ambiente celular.

El páncreas es una glándula mixta, compuesta por el tejido exocrino, constituido por los acinos que sintetizan y secretan enzimas digestivas al duodeno, y el endocrino, representado por los islotes de Langerhans, que secretan hormonas a la sangre (Figura I.1) (11).

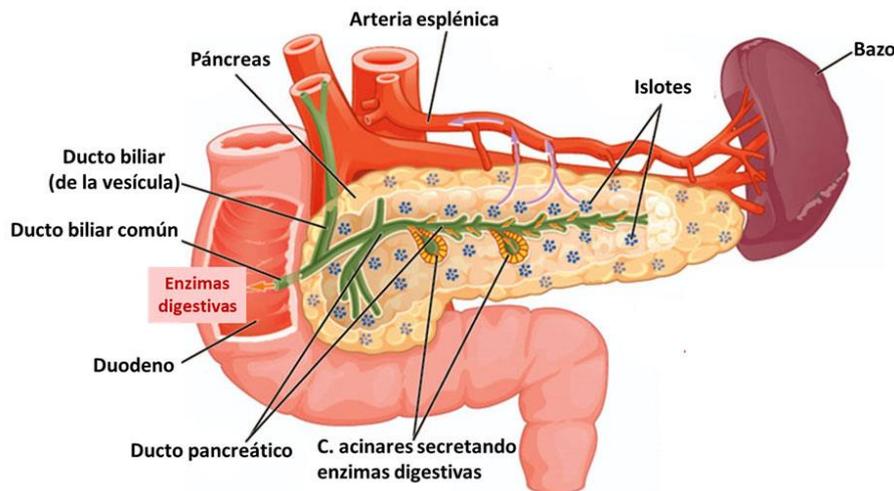


Figura I.1. Esquema de la ubicación y estructura anatómica del páncreas en humanos. Adaptado de (12).

I.1.1. Desarrollo embrionario del páncreas.

En el desarrollo embrionario, el páncreas surge a partir de la fusión de dos brotes (uno dorsal y otro ventral) del endodermo. En ratones, cuya gestación dura unos 21 días, el brote pancreático dorsal se hace evidente el día 9,5 de gestación a partir del intestino primitivo en el endodermo y, poco después, desde el ducto biliar primitivo, surge el brote pancreático ventral. Para el día 11,5, ambos brotes ya han crecido rápidamente, generando estructuras altamente ramificadas que rodean al mesénquima. Las células endocrinas se forman de manera continua desde el día 9,5 de gestación, y su mayor explosión de crecimiento se da entre los días 13,5 y 16,5. Mientras que las células acinares y ductales se hacen evidentes como estructuras histológicamente distintas en el día 15,5, los islotes de Langerhans no se forman hasta alrededor del día 18,5. Después de este tiempo, el número de células endocrinas aumenta rápidamente como resultado de neogénesis a partir del epitelio ductal (13). Es por ello que la presencia de una citoqueratina exclusiva del epitelio ductal, CK19, en células endocrinas se toma

Capítulo I: Introducción

como marcador de que esa célula ha surgido como consecuencia de la diferenciación de células ductales o neogénesis (14).

Cada etapa del desarrollo embriológico del páncreas endocrino está estrictamente controlada por factores de transcripción, los cuales regulan genes relacionados directamente con la diferenciación y el destino celular. Mientras algunos factores de transcripción se requieren en etapas específicas de la formación de cada tipo celular dentro del islote, otros se requieren en múltiples etapas del desarrollo. Pdx-1 y Ngn-3 son dos factores fundamentales en el desarrollo del páncreas endocrino (Figura 1.2):

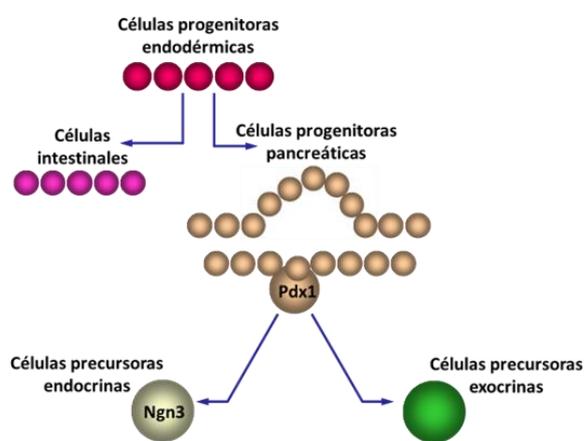


Figura 1.2. Esquema simplificado de los primeros estadios del desarrollo de células endocrinas pancreáticas. Se esquematizó cómo, a partir del endodermo (células rojas), surge la región del tubo digestivo en donde se desarrollará el intestino (púrpura) y el páncreas (marrones), caracterizado por la expresión del gen de Pdx-1. A partir de estos progenitores pancreáticos Pdx-1⁺, surgen los precursores exocrinos (verdes) y endocrinos (grises), caracterizados por la expresión del gen de Ngn-3.

Pdx-1 (Factor homeodominio pancreático duodenal 1): es un factor crucial en la formación pancreática embrionaria temprana, la especificación de diferentes linajes endocrinos y posterior maduración de la función de las células β (15). En ratones, se expresa el día 8,5 en del desarrollo embrionario en ambos brotes (dorsal y ventral) por lo que se lo señala como un marcador temprano de precursores pancreáticos. Posteriormente, su expresión se silencia en células exocrinas, permaneciendo activo durante la vida embrionaria en las células de estirpe endocrino (día 10,5). Finalmente, Pdx-1 se silencia en la mayoría de las células y sólo permanecer activo en células β maduras, donde actúa como uno de los factores de transcripción necesarios para activar la expresión del gen de insulina.

Ngn-3 (Neurogenina-3): se expresa tempranamente en el desarrollo embrionario en todos los tipos celulares endocrinos pancreáticos derivados de las células Pdx-1 positivas, pero se silencia en las células endocrinas maduras. Los animales knock-out

Capítulo I: Introducción

(KO) para Ngn-3 nacen sin islotes y sin ningún tipo de células endocrinas, desarrollan diabetes tipo 1 y mueren a los pocos días de haber nacido (15).

I.1.2. Los islotes de Langerhans.

Los islotes pancreáticos son microórganos constituidos por una población mixta de células endocrinas que, como describió Paul Langerhans en 1869 en su tesis doctoral o “Zellhaufen”, en el Laboratorio de Virchow, se encuentran dispersos e incrustados en el parénquima del páncreas. Los islotes de Langerhans recibieron esta denominación en honor a su descubridor recién en el año 1893, cuando G.E. Laguesse los bautizó de ese modo y los describió como estructuras capaces de producir una secreción interna.

Desde entonces han sido blanco de innumerables estudios en el contexto de la diabetes, debido a que las hormonas producidas y secretadas por las células que forman estos microórganos están implicadas en la regulación de la homeostasis de la glucosa. En 1921, Frederick Banting y Charles Best descubrieron la hormona insulina y demostraron que ésta puede reducir los niveles de glucosa en sangre en perros (16). Este descubrimiento y su posterior desarrollo para uso clínico, en colaboración con John Macleod y James Collip, llevó a la obtención del Premio Nobel de Fisiología o Medicina a Banting y Macleod en 1923. La insulina es producida y secretada por las células β insulares, las cuales desempeñan un rol central en el control de la homeostasis glucémica, ya que su falla funcional o la pérdida de su masa serán responsables del desarrollo de diabetes (17).

El tejido endocrino sólo constituye una porción minoritaria de la glándula, representando sólo entre el 1 y el 4% del volumen total del páncreas. Los islotes pueden tener formas más bien esféricas u ovoides y un diámetro aproximado de 0,3 mm, en ellos encontramos al menos 5 tipos de células endocrinas secretoras de hormonas polipeptídicas (18):

Células β : son las más numerosas (en roedores constituyen el 65-80 % de las células insulares). Producen y secretan insulina en respuesta a diferentes estímulos, principalmente a la glucosa. La insulina se encuentra empaquetada en gránulos de secreción, formando complejos hexaméricos cristalinos con 2 iones de cinc y 1 de

Capítulo I: Introducción

calcio. En el gránulo, la insulina madura convive con el péptido C, con el ácido gamma-aminobutírico (GABA), una variedad de iones y algunas proteínas solubles como cromogranina A y B y polipéptido amiloide de islotes (IAPP, que en condiciones patológicas puede formar agregados amiloides). Cada gránulo puede almacenar unas 200.000 moléculas de insulina y, cada célula β puede contener 2 billones de moléculas de insulina. Al microscopio electrónico se pueden observar los gránulos de secreción rodeados de un amplio halo claro (17,19).

Células α : representan del 10 al 20% de la masa endocrina en roedores y se encargan de producir y secretar glucagón. Esta hormona genera efectos antagónicos a los de la insulina, es decir que su efecto final consiste en elevar los niveles de glucosa en sangre. Es una hormona típica del ayuno y su acción previene la hipoglucemia. Son más abundantes en los islotes ubicados en la cola del páncreas. Al microscopio electrónico estas células presentan gránulos de secreción con un centro de elevada densidad electrónica y un estrecho halo periférico claro (20,21).

Células δ : tanto en roedores como en humanos representan aproximadamente el 5%. Estas células producen y secretan la hormona somatostatina. Esta hormona proteica es un regulador negativo de otras hormonas como insulina, glucagón y polipéptido pancreático (PP), producidas por las células β , α y PP respectivamente. En la mayoría de los mamíferos exhiben una morfología similar a una neurona, con proyecciones citoplasmáticas que se extienden por todo el islote y permiten regular de manera eficiente la función secretora de células α y β . Al microscopio electrónico se pueden observar los gránulos de secreción moderadamente opacos y con un tamaño menor a los de las células α y β (17,20).

Células PP: ocupan entre el 1 y el 2% de la población celular del islote. Como ya hemos dicho, secretan polipéptido pancreático. En el páncreas humano presentan una distribución asimétrica, así, los islotes presentes en la cabeza del páncreas poseen un porcentaje de células PP mucho mayor que los que pueblan la cola de la glándula. La liberación del polipéptido pancreático luego de la ingesta no está regulada por glucosa, sino más bien por el aminoácido arginina y por la actividad de los nervios vago y entérico. Este polipéptido regula negativamente la secreción de glucagón y de somatostatina cuando las concentraciones de glucosa son bajas; reduce el vaciamiento

Capítulo I: Introducción

gástrico y la actividad motora intestinal. Al microscopio electrónico se pueden ver que sus gránulos son densos y de tamaño muy heterogéneo (21).

Células ϵ : son células muy minoritarias (menos del 1%) que secretan grelina, una hormona gastrointestinal producida mayoritariamente en el estómago. Son muy abundantes en el período fetal y al nacimiento, pero su número cae drásticamente en el adulto (22). En modelos de ratón deficientes en células β la población de células ϵ aumenta considerablemente y, utilizando bloqueos farmacológicos, inmunológicos o genéticos de grelina, se observa un aumento de la liberación de insulina estimulada por glucosa. Se localizan en áreas marginales de los islotes (23,24).

Otras células no endócrinas: los islotes a su vez, albergan otros tipos celulares no endócrinos que forman parte de su microambiente, tales como células endoteliales, (que forman capilares intra-islotes fenestrados) y macrófagos M1 (fenotipo que adoptan bajo señales inflamatorias como INF γ y LPS) y M2 (asociado a señales anti-inflamatorias) con roles en la patogenia y en la regulación de la masa de las células β respectivamente (25). En preparaciones de islotes aislados con colagenasa es habitual encontrar otros tipos celulares que tienen contacto estructural con los islotes como células acinares y ductales pancreáticas, células estrelladas y de Schwann, mastocitos y linfocitos (26) (Figura I.3).

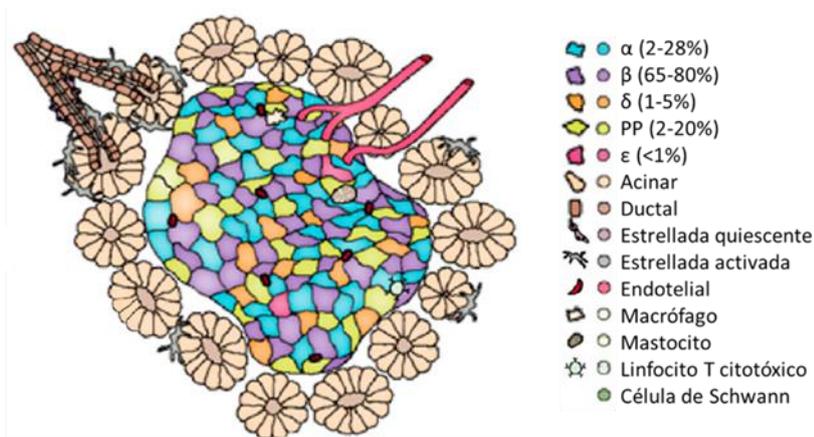


Figura I.3. Diferentes tipos celulares que pueden encontrarse en preparaciones de islotes aislados. El tratamiento del páncreas con colagenasa permite aislar islotes de Langerhans que, debido a su estrecha interacción con diversos tipos celulares del páncreas, puede contener una gran variedad de fenotipos celulares no endocrinas tal como se resumen en el esquema. Adaptada de (26).

Capítulo I: Introducción

Si bien no existen diferencias de tamaño entre los islotes de humanos y de roedores, estos últimos presentan una distribución celular muy ordenada, con las células β ocupando el centro del islote, rodeadas por un manto de células no β , mientras que en los humanos las diferentes células endocrinas se distribuyen más azarosamente (Figura I.4), aunque ya se han descrito más de 50 patrones diferentes de distribución (18,27).

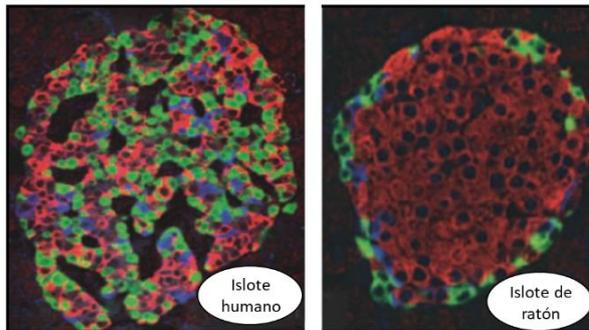


Figura I.4. Imagen de inmunofluorescencia de un islote humano (izquierda) y uno de ratón (derecha). Se muestra la arquitectura de islotes humanos y de ratón con inmunofluorescencia roja para la insulina, verde para el glucagón y azul para somatostatina. Las áreas negras que se observan dentro del islote humano están ocupadas por vasos sanguíneos. Adaptada de (28).

Los islotes humanos contienen un porcentaje más alto de células α y un porcentaje ligeramente menor de células β (20) que los murinos, tal como se observa en la Tabla I.1.

Tabla I.1. Comparación de la composición celular de islotes de roedores y humanos.

	Células α	Células β	Células δ	Células PP	Células ϵ
Roedores	10-20%	65-80%	~ 5%	<1%	<1%
Humanos	30-50%	50-60%	~5%	<1%	<1%

I.1.3. Irrigación.

Los vasos sanguíneos que rodean a los islotes son del tipo capilar sinusoide, presentan interrupciones (o fenestraciones) y la membrana basal está muy poco desarrollada o ausente, lo que facilita el intercambio de sustancias con los tejidos aun cuando la cantidad de sangre circulante sea pequeña y su velocidad baja (29). La sangre fluye desde el centro del islote hacia la periferia, permitiendo que la insulina producida por las células β module de manera paracrina la función secretora de las células α , δ , PP y ϵ . Adicionalmente, existen vasos sanguíneos que irrigan la periferia del islote, en estrecho contacto con las células α , δ , PP y ϵ que contribuye a que los distintos tipos celulares del islote se regulen mutuamente a través de mecanismos paracrinós, como la inhibición de la secreción de insulina y glucagón por parte de la somatostatina y la

Capítulo I: Introducción

inhibición de la secreción de células α y γ por parte de la insulina y del polipéptido pancreático (27). Adicionalmente, existe una circulación arterial exclusiva para la irrigación del páncreas exocrino (30).

I.1.4. Inervación.

Las fibras simpáticas, parasimpáticas y nervios sensoriales inervan los islotes, siendo el sistema parasimpático el responsable de la regulación nerviosa de la secreción de sus hormonas a través de neurotransmisores no colinérgicos. Las fibras de este sistema se originan en las neuronas de los ganglios intrapancreáticos, las cuales reciben señales directas del tronco encefálico a través del nervio vago (31,32). La inervación simpática de los islotes es promovida por el factor de crecimiento nervioso (NGF) el cual regula recíprocamente la liberación de hormonas en respuesta a la hipoglucemia mediante la inhibición de la liberación de insulina (activando los receptores adrenérgicos α_2 en las células β) (33) y la estimulación de la secreción de glucagón (activando los receptores adrenérgicos β_2 en las células α). Los mediadores químicos que se han encontrado en el páncreas son noradrenalina, acetilcolina, péptido intestinal vasoactivo, GABA y la galanina (30).

I.1.5. Contactos célula-célula.

Las células del islote se relacionan entre sí principalmente por 2 tipos de unión célula-célula, las uniones estrechas (u oclusivas) y las comunicantes o de tipo GAP. Las uniones estrechas, que generan puntos de contactos mediados por ocludinas y claudinas, fusionan las membranas plasmáticas de dos células vecinas y funcionan como sistema de barrera para el pasaje de sustancias. Las de tipo GAP posibilitan el intercambio citoplasmático célula-célula de electrolitos y nucleótidos a través de pequeños canales de 20 Å de diámetro constituidos por proteínas en forma de hexámero, permitiendo un acoplamiento funcional que influye en el comportamiento secretor de las células (34).

I.2. La célula β y su función secretora de insulina.

La insulina es una hormona peptídica que se une a receptores ubicados en la membrana de células diana que tienen la capacidad de orquestar una respuesta anabólica integrada frente a la disponibilidad de nutrientes. El incremento en la concentración sanguínea de glucosa, aminoácidos y algunos ácidos grasos (AG) estimulan la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas, la cual induce el transporte de dichos sustratos desde el medio extracelular al intracelular para ser metabolizados y/o almacenados. Esto permite que los niveles en sangre de estas moléculas vuelvan a ser normales y, de esta manera, la secreción de insulina deja de ser estimulada y se completa el ciclo de retroalimentación negativa.

I.2.1. La molécula de insulina: estructura y biosíntesis.

La insulina se ha aislado en diversas especies de vertebrados, e incluso en no vertebrados como gusanos e insectos (35). En los vertebrados se compone de dos cadenas polipeptídicas (A y B) unidas por dos puentes disulfuro (36). La insulina humana posee 51 aminoácidos, de los cuales 21 se ubican en el péptido A y 30 en el péptido B. El péptido A posee a su vez un puente disulfuro intercatenario extra.

Aunque en la mayoría de las especies existe sólo un gen que codifica a la insulina, también existen casos tales como el de la rata, el ratón y algunos peces que poseen sistemas de dos genes. En la región regulatoria del gen de insulina existen elementos formados por secuencias nucleotídicas discretas (cajas A, C, E, Z y elementos CRE) que sirven de sitios de unión para factores de transcripción como el Pdx-1, NeuroD, MafA y otros que regulan su expresión (37).

El gen de insulina humano está localizado en el brazo corto del cromosoma 11, posee una longitud de 1355 pares de bases (38) y cuenta con 3 regiones codificantes (exones) y 2 regiones no codificantes (intrones). El primer exón codifica el péptido señal (extremo NH_2 terminal), el exón 2 codifica la cadena B y una porción del péptido C y el tercero codifica la cadena A y el otro fragmento del péptido C.

Capítulo I: Introducción

El procesamiento del transcrito primario (en el que se eliminan las secuencias intrónicas) da como resultado un ARNm que sale del núcleo y comienza su traducción en ribosomas libres del citosol. El primer fragmento traducido corresponde al péptido señal, el cual es reconocido por la ribonucleoproteína SRP (partícula de reconocimiento de señal) la cual se une a este péptido y permite la traslocación de la maquinaria de traducción hacia el retículo endoplasmático rugoso (RER) donde culminan la síntesis de la preproinsulina, un precursor de 110 aminoácidos. La preproinsulina es procesada a proinsulina (péptido de 9.000 Da y 86 aminoácidos) en el lumen del RER por eliminación del péptido señal y la formación de tres enlaces disulfuro (Figura I.5A). La proinsulina recién formada es exportada en vesículas del RER al Aparato de Golgi donde se culmina el procesamiento y se obtiene, finalmente, la insulina y el péptido C (31 aminoácidos) en cantidades equimolares gracias a la acción de las enzimas endoproteasas PC1/3, PC2 y la carboxipeptidasa E (CPE) que generan dos cortes en la proinsulina y la eliminación de 4 aminoácidos. Luego, la insulina y el péptido C se almacenan juntos en los gránulos de secreción (39) los que finalmente se desplazan a través del citoplasma desde la cara trans del Golgi hasta la membrana celular y se liberan por exocitosis (Figura I.5B).

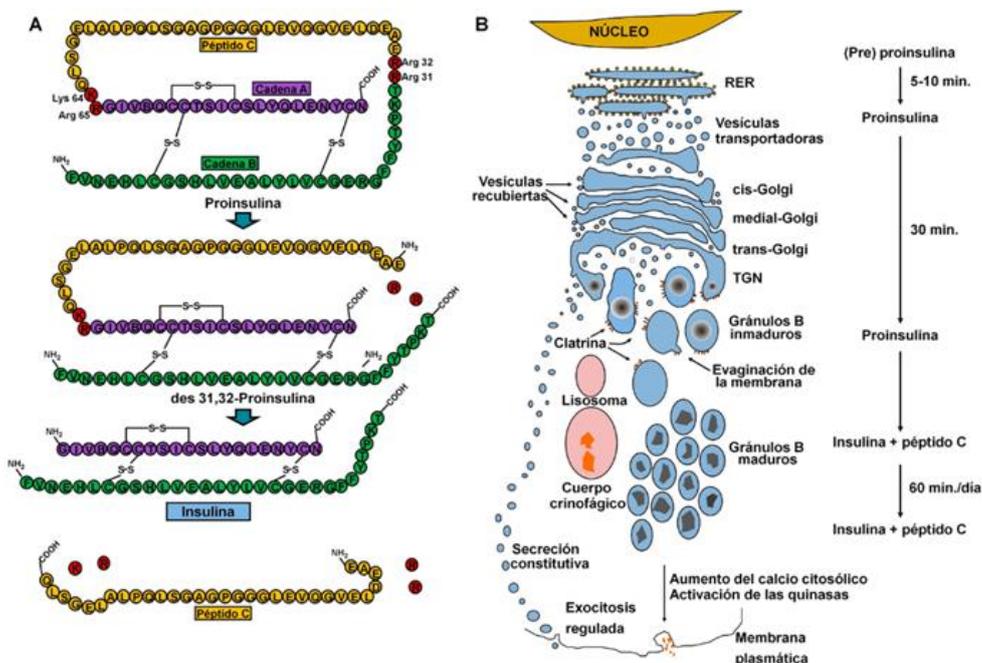


Figura I.5. Procesamiento de la insulina. A) Representación gráfica de la estructura primaria de la insulina humana y procesamiento de la proinsulina. En verde se grafican los aminoácidos que forman parte de la cadena B, en rojo los aminoácidos

Capítulo I: Introducción

que se pierden en el procesamiento, en amarillo los aminoácidos que forman el péptido C y en violeta los que conforman la cadena A. **B)** Esquema del pasaje y procesamiento de la proinsulina desde su generación en el RER hasta su empaquetamiento en el gránulo de secreción (30).

En la membrana del gránulo existe una proteína llamada ICA512 (autoantígeno de la célula del islote 512) que interviene en el anclado del gránulo al cortex celular de actina para la posterior liberación de su contenido al torrente sanguíneo. Esta proteína resulta clave en el control de la expresión del gen de la insulina, ya que una vez que el gránulo libera la insulina de la célula, un fragmento de ICA512 se dirige al núcleo para ejercer un mecanismo de retroalimentación positiva que impide que la célula se quede sin insulina cuando ésta es liberada. Como contra regulación, existe un mecanismo denominado crinofagia que sirve para regular negativamente la cantidad de insulina almacenada. En este proceso, los gránulos se fusionan con lisosomas y se lleva a cabo la degradación proteolítica de la insulina y del péptido C (40).

I.2.2. Estímulos de la secreción de insulina.

La secreción de insulina, que se da por exocitosis de los gránulos de secreción, es un proceso muy regulado. Su principal regulador positivo es la glucosa, aunque también existen otras moléculas e iones capaces de estimular su liberación:

Glucosa: La glucosa ingresa a las células β a través del transportador 2 de glucosa (GLUT2), un transportador cuyo gen se expresa de manera constitutiva en estas células, y posee baja afinidad por la glucosa, lo que permite que no se sature y que este azúcar ingrese a favor de gradiente por difusión facilitada, de manera independiente de insulina. Una vez dentro de la célula, la glucosa es fosforilada a glucosa 6 fosfato por la enzima hexoquinasa o glucoquinasa. La hexoquinasa sólo es activa en un rango bajo de concentraciones de glucosa ya que posee un bajo K_m (gran afinidad por este azúcar), por lo que se satura rápidamente y es inhibida por el producto de reacción. En cambio, la glucoquinasa permanece activa a altas concentraciones de glucosa y no se inhibe por la glucosa 6 fosfato. La glucoquinasa está presente en las células β , y debido a su gran capacidad catalítica y alto K_m , funciona como un verdadero censor de glucemia. La glucosa 6 fosfato sigue la vía glucolítica y, la posterior entrada del piruvato a las mitocondrias, completa la oxidación aeróbica con la consecuente producción de

Capítulo I: Introducción

ATP. El aumento de la relación ATP/ADP que se registra en estas células es el responsable del cierre de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) y de la despolarización de la membrana que promueve la apertura de los canales de calcio regulados por voltaje (Ca_v). El aumento de la concentración intracelular de calcio induce la fusión de los gránulos de secreción con la membrana plasmática y la consecuente liberación de la insulina al torrente sanguíneo por exocitosis (Figura 1.6) (41).

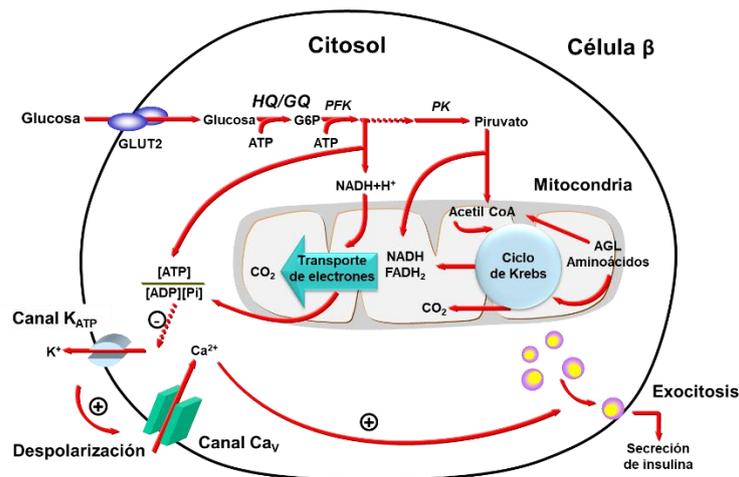


Figura 1.6. Secreción de insulina estimulada por glucosa. Para una descripción detallada, referirse al texto precedente.

Aminoácidos: Algunos aminoácidos como arginina, lisina y leucina son capaces de estimular la secreción de insulina, aunque por mecanismos diferentes. La arginina, por ejemplo, no necesita metabolizarse para ejercer su acción estimulante de la secreción de insulina; mientras que la leucina se debe metabolizar para aumentar la producción de ATP, lo que termina despolarizando la membrana plasmática. Otros aminoácidos, como la glutamina en combinación con leucina, si bien no estimulan la secreción de insulina, son capaces de potenciar la secreción de insulina estimulada por glucosa (SIEG) (42). Por el contrario, en períodos de ayuno, cuando existe un cierto grado de proteólisis, algunos aminoácidos se metabolizan para generar energía en la célula y otros, como la alanina y la glutamina, se liberan a la sangre y estimulan la secreción de glucagón que estimula la liberación hepática de glucosa con la consecuente elevación de la glucemia que, en definitiva, culmina desencadenando la secreción de insulina (43,44).

AG y cuerpos cetónicos: El aumento de la concentración tanto de los AG como de los cuerpos cetónicos provocan el aumento de la secreción de insulina actuando como un

Capítulo I: Introducción

mecanismo de retroalimentación negativa (ya que ésta inhibe la cetogénesis y la movilización de AG). El metabolismo intracelular de los AG origina moléculas de señal lipídica tales como acil-CoA de cadena larga y diacilglicerol (DAG). La acil-CoA de cadena larga podría acilar proteínas esenciales en la fusión de gránulos de insulina y el DAG activa la proteína-quinasa C, que está implicada en el aumento de la secreción de insulina (45,46).

Electrolitos: El potasio en altas concentraciones (20 Mm) en el medio extracelular provoca el cierre de los canales de K^+ por lo que estimula la secreción de insulina a través de la vía anteriormente descrita. Por otro lado, el calcio interviene en la secreción de insulina ya que se une a la proteína reguladora CM y termina activando a una quinasa encargada de fosforilar diferentes componentes del citoesqueleto. El aumento de calcio citosólico también puede darse a través de su liberación desde los depósitos intracelulares (mitocondria y REL), la cual se da por apertura de canales regulados por inositol 3 fosfato (IP3), metabolito que se produce a partir de fosfolípidos de membrana por acción de la fosfolipasa C (47,48).

Drogas hipoglucemiantes: Las sulfonilureas son un tipo de droga que aumenta la liberación de la insulina preformada (primera fase de la secreción de insulina) y no estimulan su biosíntesis. Para que puedan actuar se precisa de la existencia de cierta integridad de la función pancreática. Su acción hipoglucemiante viene dada por su unión a una de las subunidades del canal de potasio dependiente de ATP, lo cual provoca su cierre (49).

Hormonas: Ya mencionamos los efectos paracrinicos de las hormonas insulares, por lo que faltaría agregar el efecto de:

Péptido glucagón-simil-1 (GLP-1): es una incretina secretada por las células L del intestino en respuesta a una recarga de nutrientes. La activación del receptor de GLP-1 en las células β activa a la enzima adenilato ciclasa, llevando al aumento de los niveles de AMPc y la consecuente potenciación de la SIEG (50). Además de este efecto, GLP-1 desempeña múltiples acciones que favorecen el control de la homeostasis glucémica.

Capítulo I: Introducción

Leptina: La leptina es una adipoquina que posee un efecto anorexigénico e inhibidor de la secreción de insulina y participa activamente en la regulación del balance energético, el metabolismo y el peso corporal (51). Estimula la hidrólisis de TG y la oxidación de AG, disminuyendo así tanto sus niveles circulantes como su depósito tisular (52). Niveles circulantes de leptina dentro del rango normal, protegerían contra el daño tisular inducido por el depósito de lípidos (53) y, en consecuencia, las alteraciones del metabolismo de los lípidos descritas en el síndrome metabólico podrían ser secundarias a una leptinorresistencia (LR). Existen diferentes isoformas del receptor de leptina (denominado ObR), entre las que la isoforma ObRb sería la más activa (54), actuando a través de una vía intracelular que involucra proteínas de las familias JAKs y STATs. Tanto en modelos que utilizan islotes animales como humanos se ha demostrado que la leptina también disminuye los niveles de proinsulina a través de la activación del SOCS3 (“supresor de la señalización por citoquinas 3”) que también autolimita la señal de la propia leptina, regulando negativamente la cascada de fosforilaciones de las JAKs/STAT (55).

I.2.3. Características de la SIEG.

La curva de secreción de insulina en respuesta al aumento de la glucemia es de tipo sigmoide; la glucosa comienza a estimular la secreción de insulina a una concentración umbral aproximada de 3,3 mM y el incremento mayor se produce en el rango de 4 a 16 mM (56).

La liberación de insulina se produce de manera bifásica y pulsátil (5-15 pulsos por minuto). La primera es rápida y de breve duración e involucra la liberación de los gránulos de insulina preformados (57), la segunda fase, de crecimiento lento y sostenido, en cambio, está relacionada con la biosíntesis de insulina y sería consecuencia de la metabolización de la glucosa en las células β . Se ha demostrado que la insulina liberada durante la primera fase produce un rápido ascenso de los niveles de insulina a nivel intersticial y una impregnación de los tejidos blanco, especialmente el hígado, que permite una regulación más efectiva del metabolismo de la glucosa (Figura I.7) (58).

Capítulo I: Introducción



Figura 1.7: Gráfica de la liberación bifásica de insulina en respuesta al estímulo con glucosa. Adaptado de (59).

La secreción pulsátil promueve oscilaciones en la concentración periférica de la hormona que son sincrónicas con el ciclo de endocitosis y retorno a la membrana celular del receptor de insulina (60) que le permite llegar a los mismos efectos hipoglucemiantes con un 25% menos de hormona que si la liberación hubiese sido continua (61), produciendo un ahorro de energía que optimiza la secreción/acción de la insulina liberada y la función de las células β .

Tanto la primera fase de secreción de insulina como su modalidad pulsátil se alteran precozmente en la DT2, por lo que su medida es útil para evaluar la declinación progresiva de la función secretora de las células β .

1.2.4. El receptor de insulina y su vía de señalización intracelular.

La insulina logra generar su efecto biológico a través de la unión a su receptor, que se denomina receptor de insulina (RI) y está situado en las membranas de las células diana, y de una cascada de reacciones intracelulares que amplifican la señal y conducen a que se lleve a cabo la respuesta celular.

El receptor es una proteína tetramérica que consiste en dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembrana unidas por puentes disulfuro (62). Cuando la insulina se une a la subunidad α del receptor sufre un cambio conformacional que induce la activación de la actividad tirosina quinasa de las subunidades β que se autofosforila, recluta al sustrato del receptor de insulina (IRS) (63,64) y lo fosforila en múltiples residuos de tirosina, lo que permite su asociación con proteínas que contienen dominios de homología Src 2 (SH2) (65,66).

Capítulo I: Introducción

Los acontecimientos intracelulares que se desarrollan en la célula diana luego de la unión de la insulina a su receptor se muestran en la [Figura I.8](#) y se resumen en tres niveles:

- Las mencionadas fosforilaciones iniciales a nivel de Tyr mediadas por la subunidad β del receptor que se autofosforila y posteriormente fosforila a la proteína IRS.
- Fosforilaciones y desfosforilaciones en residuos serina de diversos sustratos mediadas por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).
- Movilización y activación de transportadores de glucosa junto a la activación de enzimas que participan en la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas involucradas en el control de la expresión génica y crecimiento.

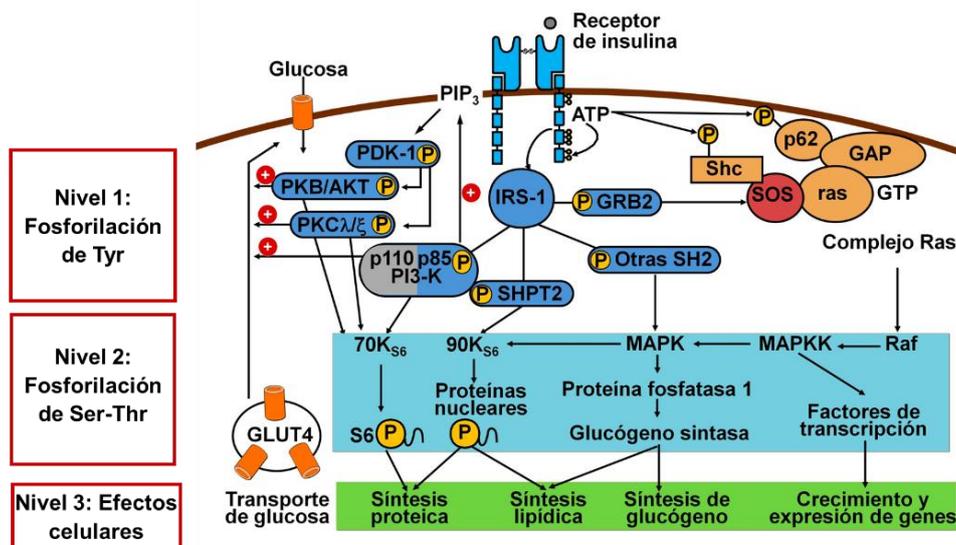


Figura I.8. Cascada intracelular de señalización de la insulina. Para una descripción detallada, referirse al texto en esta sección. Adaptado de (67).

Estudios con ratones KO desenmascararon las diversas funciones de los IRS y su importancia en la vía de señalización de la insulina (68,69). La vía crítica que los vincula con la acción metabólica de la insulina es la vía de PI3K/Akt. La fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) es una proteína heterodimérica que contienen una subunidad regulatoria y una catalítica (70). El reclutamiento y la activación de esta enzima depende de la unión de la subunidad regulatoria con proteínas IRS fosforiladas en tirosina (63). Esto resulta en la activación de la subunidad catalítica que fosforila al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

Capítulo I: Introducción

(PIP₂) de la membrana plasmática para generar fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃) que es un lípido que funciona de segundo mensajero y recluta a otra enzima quinasa, llamada protein-quinasa B (Pkb, que también es denominada Akt). Esta enzima es importante porque amplifica la cascada de fosforilación de quinasas y así logra jugar un rol central en mediar otras acciones de la insulina como regular la expresión y actividad de un amplio rango de proteínas que incluye enzimas, factores de transcripción, proteínas que regulan el ciclo celular, apoptosis y proteínas de supervivencia.

Otra de las ramas esenciales de la vía de señalización de insulina es la de Grb2-SOS-Ras-MAPK. Los IRS fosforilados se unen a Grb2 y Shc que por medio de fosforilación activan al complejo Ras-GDP, convirtiéndolo en Ras-GTP. Esta vía termina activando a las MAP quinasas ERK1 y 2 que tienen un efecto directo en la proliferación y diferenciación, en la regulación de la expresión génica y en eventos extra-nucleares (reorganización del citoesqueleto y activación de targets en el citosol y núcleo).

La mayoría de los reguladores negativos de la acción de la insulina (como por ejemplo PTP1B, LAR, PP2B y PTEN) tienen como mecanismo de acción desfosforilar a proteínas claves de esta vía de señalización. En el caso particular de SOCS2 y SOCS3, ambas compiten con IRS por la unión al receptor de insulina y también los marcan para que sean degradadas.

I.2.5. Tejidos diana de la insulina y sus efectos.

La insulina ejerce efectos directos en células del músculo esquelético, hígado y tejido adiposo blanco, tal como se resume en la [Figura I.9](#) y la [Tabla I.2](#). Las células de estos tejidos poseen en sus membranas tanto el receptor de insulina como los GLUT4 (transportadores de glucosa dependientes de insulina pertenecientes a la familia GLUT) (71) que permiten la internalización de este monosacárido para mantener la homeostasis glucémica.

En el músculo esquelético, la insulina aumenta el transporte de glucosa promoviendo su fosforilación y su almacenamiento en forma de glucógeno y también acrecienta la captación de aminoácidos. Utilizando un lapso de tiempo mayor, la insulina aumenta la síntesis de proteínas lo que lleva a un aumento de los niveles de hexoquinasa activa.

Capítulo I: Introducción

La insulina activa en el hígado la síntesis de glucógeno a partir de estimular a una fosfatasa que desfosforila a la enzima glucógeno-sintasa (activándola) y a la glucógeno fosforilasa (inactivándola). Además, disminuye la expresión del gen de glucosa 6 fosfatasa (enzima que desfosforila la glucosa y permite la liberación hepática de glucosa) y de algunos genes gluconeogénicos a la vez que estimula la síntesis de glucoquinasa. Favorece la lipogénesis, a través del aumento de la síntesis de AG, que son exportados desde el hígado como TG cargados en las lipoproteínas plasmáticas (VLDL).

En el tejido adiposo blanco, la insulina suprime la lipólisis y aumenta el transporte de glucosa y la lipogénesis. El depósito de grasas en el tejido adiposo aumenta debido tanto al incremento de la síntesis de AG (aumentando la actividad de acetil CoA carboxilasa) y TG, como al de la captación de grasas provenientes de las lipoproteínas.

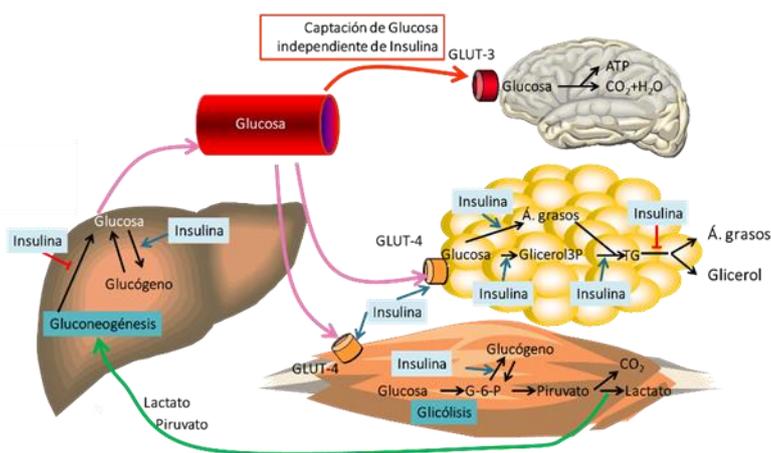


Figura 1.9. Principales efectos de la insulina en el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo blanco. Para una descripción detallada, referirse al texto precedente. Adaptado de (72).

Tabla 1.2. Procesos modulados por la insulina en músculo, hígado y tejido adiposo (73).

Órgano	Efecto	Diana
Músculo y tejido adiposo	↑ Captación de glucosa	GLUT4
Hígado	↑ Activación de glucosa	Glucoquinasa
Hígado y músculo	↑ Síntesis de glucógeno	Glucógeno sintasa
	↓ Glucogenólisis	Glucógeno fosforilasa
	↑ Glucólisis	Fosfofructoquinasa 1
Hígado y tejido adiposo	↑ Síntesis de AG	AcetilCoA carboxilasa
Tejido adiposo	↑ Síntesis de TG	Lipoproteín lipasa

I.3. Fisiopatología de la DT2 y de la PD.

I.3.1. Diabetes.

La epidemia de DT2 se relaciona con la obesidad y la inactividad física y con diversos FRCV. Cuando estos factores se combinan con una base hereditaria determinada comienza un deterioro de la masa y de la función de las células β , el cual es precedido por una menor respuesta de los tejidos periféricos a la insulina (insulinorresistencia) (74), por lo que podemos afirmar que la diabetes no es solamente hiperglucemia, sino que se trata de un desbalance metabólico en que muchos órganos y sistemas están involucrados.

Fue así como Ralph DeFronzo explicó a principios del presente siglo la implicancia multiorgánica en la fisiopatología de la DT2 y la instalación de la hiperglucemia, comenzando en sus primeras descripciones como un “triunvirato” integrado por las células β , el hígado y el músculo esquelético, para luego hacerlo crecer a un “octeto” en el que incorporó al tejido adiposo, intestino, las células α del páncreas, el riñón y al cerebro (75). En la actualidad se considera que su clásico “octeto ominoso” se ha convertido en los “once malvados” (76) que enumeramos a continuación y se resumen en la [Figura I.10](#):

- disminución de la masa y función de las células β pancreáticas,
- secreción anormal de glucagón,
- disfunción hepática con acúmulo anormal de grasa (esteatosis hepática),
- disfunción de transmisores a nivel central,
- aumento y disfunción de la masa de tejido adiposo visceral,
- disminución de la efectividad de las incretinas intestinales,
- disminución de la captación/utilización de glucosa muscular,
- aumento del aporte renal de glucosa al torrente sanguíneo,
- procesos inflamatorios,
- procesos estomacales e intestinales que aumentan la absorción de glucosa y
- desarreglos en el bioma intestinal.

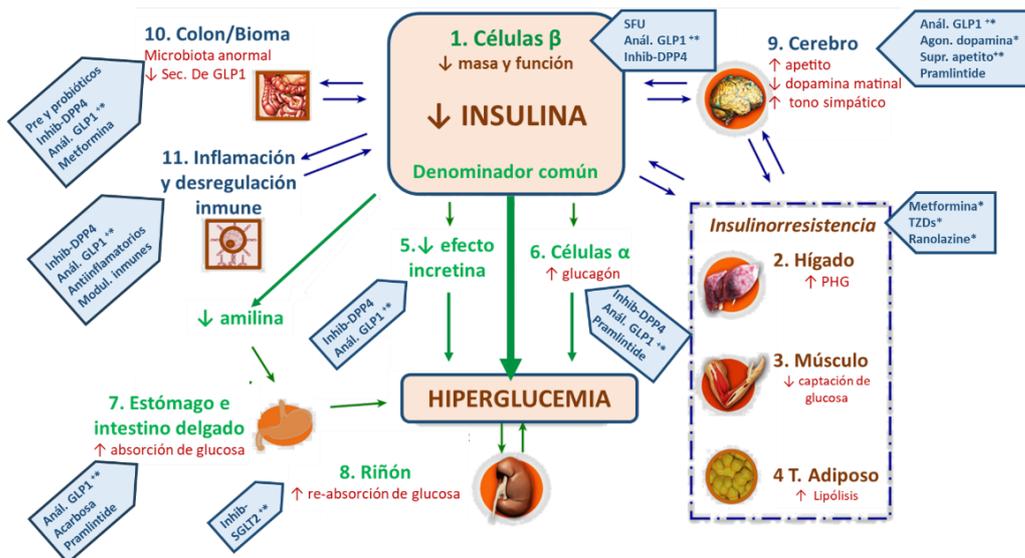


Figura I.10. Los once malvados. Esquema adaptado de (76) en la que propone la contribución de 11 actores a la elevación de la glucemia sumándole 3 a los ya clásicos incluidos en el “octeto ominoso” de DeFronzo. En los carteles celestes enumeramos las alternativas terapéuticas propuestas para detener o atenuar el efecto de cada uno de dichos actores, se identifican con un + aquellos que contribuyen a la disminución del peso y con * a los que ejercen su efecto sobre los FRCV.

Como acabamos de ver, resulta fundamental para mantener la homeostasis glucémica que las células β insulares mantengan una adecuada función secretora y conserven su masa celular. La falla funcional de las células β tiene correlación con la edad, la resistencia a la insulina y la existencia de ciertos polimorfismos, como el del alelo T del gen TCF7L2, que se asocian con el deterioro de la secreción de insulina *in vivo* y la reducción de la capacidad de respuesta al GLP-1. Otros elementos que conspiran contra la integridad funcional de la célula β son la lipotoxicidad (depósito de AG), la glucotoxicidad (niveles de glucosa en plasma crónicamente elevados), depósitos amiloides de IAPP y anomalías en el eje de incretinas. Por otro lado, para mantener una masa adecuada de células β, es primordial llegar a un equilibrio entre los mecanismos que la aumentan, como son la generación de nuevas células (neogénesis a partir de precursores, diferenciación de otras células maduras o proliferación de células β preexistentes) y, en menor medida, el aumento del tamaño celular (hipertrofia); con aquellos procesos que la disminuyen, entre los que podemos mencionar a la muerte celular por apoptosis y a la disminución del tamaño celular β (atrofia) (77).

En cuanto a la apoptosis existen dos vías posibles: la extrínseca o de receptor de muerte y la intrínseca o vía mitocondrial. Ambas vías convergen en la activación de

Capítulo I: Introducción

caspasa 3, la cual activa a la endonucleasa responsable de la degradación del ADN nuclear y proteasas que generan una reorganización del citoesqueleto. La vía extrínseca involucra interacciones mediadas por receptores transmembrana de muerte y los ligandos externos como FasL y el factor de necrosis tumoral (TNF), la formación de un complejo intracelular de muerte (DISC) en el que participa la procaspasa 8 (caspasa iniciadora de la vía extrínseca) que tras su activación autocatalítica estimula su propio clivaje y la activación posterior de la caspasa 3 efectora. En la vía intrínseca, por el contrario, el estímulo surge como consecuencia del daño irreparable en el ADN, presencia de radicales libres, ausencia de señales de supervivencia y otros capaces de generar cambios en la permeabilidad mitocondrial que facilitan la liberación del citocromo C y proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembrana al citosol. La unión del citocromo C a Apaf-1 y a procaspasa 9 forman una estructura conocida como apoptosoma que permite la activación secuencial de la propia caspasa 9 y la caspasa efectora (caspasa 3). El control y la regulación de los eventos mitocondriales están a cargo de miembros de la familia de las proteínas Bcl-2, dentro de las cuales están las anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL y Bcl-XS) y las pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bid, Bim y Bik) (78).

Otro de los elementos disruptivos de la homeostasis glucémica es la insulinoresistencia (IR). En el hígado, la resistencia a la insulina se manifiesta por una sobreproducción de glucosa durante el estado basal, mientras que, en el músculo, por una alteración en la captación de glucosa después de la ingesta de una comida rica en carbohidratos, produciendo una hiperglucemia posprandial. Otros defectos en la acción de la insulina en los miocitos incluyen el deterioro de la fosforilación de glucosa, la reducción de la síntesis de glucógeno y la disminución de la oxidación de glucosa.

Las células del tejido adiposo se convierten en resistentes a la insulina y cambian su topología convirtiéndose en células alargadas, con capacidad reducida para almacenar grasas. Por esta razón, los AG aumentan su concentración en plasma generando lipotoxicidad y aumento de gluconeogénesis. Los lípidos también pueden desbordarse hacia las células lisas vasculares arteriales, lo que conduce a la aceleración de aterosclerosis. Las células grasas también experimentan cambios en su perfil secretor, aumentando la secreción de adipoquinas inflamatorias y ateroscleróticas.

Capítulo I: Introducción

El riñón, por su parte, aumenta la capacidad de reabsorción tubular de glucosa por aumento del cotransportador Na-glucosa (SGLT2).

La secreción de GLP-1 es deficiente por lo que el glucagón aumenta en plasma, impidiendo la supresión de la producción hepática de glucosa.

I.3.2. Bases moleculares de generación de complicaciones de la diabetes.

Todas las formas de la diabetes están caracterizadas por hiperglucemia crónica y, si no se controlan adecuadamente, los pacientes desarrollan patologías microvasculares específicas de la diabetes en retina, glomérulos renales y nervios periféricos. Como consecuencia de las patologías microvasculares, la diabetes puede llevar a ceguera, enfermedad renal terminal y una variedad de neuropatías. La diabetes también se asocia con enfermedades macrovasculares ateroscleróticas aceleradas que afectan arterias que suministran sangre al corazón, el cerebro y extremidades bajas. Como consecuencia de esto, los pacientes diabéticos tienen mayor riesgo de desarrollar infarto de miocardio, accidente cerebro vascular (ACV) y amputación de los miembros (79).

Brownlee esgrimió un modelo que responsabiliza a la hiperglucemia y al estrés oxidativo (EO) que esta genera como el centro a partir del cual se exacerban 4 vías metabólicas responsables de la aparición de las complicaciones diabéticas (80). En su modelo unificado de bases bioquímicas de las complicaciones (79) propone que los radicales libres conducen al daño en el ADN y a la activación de la maquinaria de reparación. Una de las enzimas de esta maquinaria es la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) que para ejercer su acción consume grandes cantidades de NAD^+ , deteniendo la ruta glicolítica a nivel de la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que cataliza la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato (GA3P) a 1,3 bisfosfoglicerato. La detención de la vía en este paso genera el acúmulo de los metabolitos intermedios “río arriba”, y su consecuente desvío hacia otras vías metabólicas que actuarían como disparadores de ciertas complicaciones de la diabetes (Figura I.11).

Capítulo I: Introducción

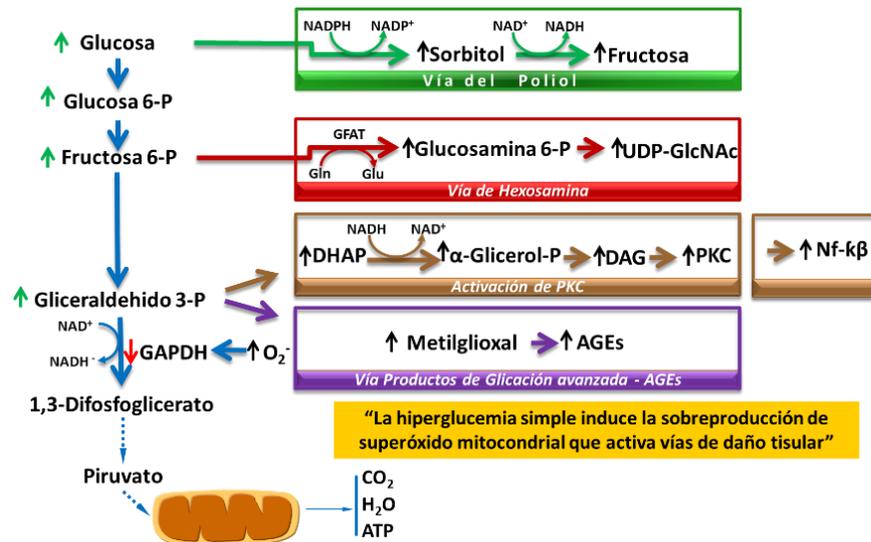


Figura I.11. Complicaciones de la diabetes. Teoría unificada de Brownlee. La hiperglucemia genera una sobreproducción de ión superóxido y la consecuente depleción de NAD⁺ que provoca la inhibición de GAPDH y la acumulación corriente arriba de GA3P, Fructosa-6P y glucosa, que llevan a la activación de las vías de producción de AGEs, de activación de PKC, de las hexosaminas y de los polioles, responsables bioquímicos de las complicaciones de la diabetes. Adaptado de (79).

I.3.2.A. Acúmulo de triosas fosfato y aumento de la formación de productos finales de glicación avanzados (AGEs).

El gliceraldehído 3 fosfato (GA3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), las dos triosas intermediarias en la ruta glicolítica, cuando se encuentran en exceso pueden convertirse en metilglioxal, que es el principal precursor de la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) intracelulares (Figura I.12).

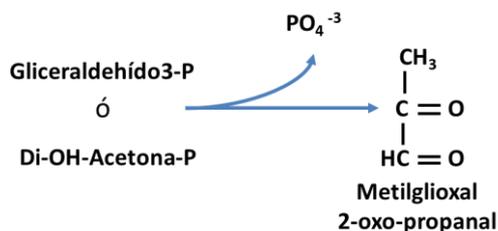


Figura I.12. Formación de metilglioxal en condiciones de exceso de triosas-fosfato (Gliceraldehído-3-fosfato ó Dihidroxiacetona fosfato).

Los AGEs son proteínas que pierden su funcionalidad por la unión no enzimática de sus grupos NH₂ a derivados de azúcares simples como glioxal (surgido de la auto-oxidación intracelular de glucosa), 3-deoxiglucosona (generado por descomposición de productos de Amadori) y el ya mencionado, metilglioxal. Esta modificación estructural

Capítulo I: Introducción

genera interacciones anormales entre ellas, como es el caso de las proteínas de la matriz extracelular y de proteínas plasmáticas. Su unión a receptores de AGE en células endoteliales, mesangiales y macrófagos generan un aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS). En los vasos sanguíneos, los AGEs disminuyen su elasticidad y aumentan la filtración de fluidos a través de la arteria carótida (81-84).

I.3.2.B. Acúmulo de DHAP y activación de la proteína quinasa C (PKC).

La hiperglucemia activa indirectamente a la enzima PKC debido a que el acúmulo de triosas-P deriva en la formación de glicerol 3 fosfato y su posterior acilación para formar DAG *de novo*, que junto al ión Ca^{+2} , es necesario para activar a la PKC (Figura I.13) (85,86). La activación de ciertas isoformas de esta enzima conduce a anomalías en el flujo sanguíneo en retina y riñón por la disminución de la producción de óxido nítrico en los glomérulos y en células del músculo liso (87,88). Las principales consecuencias son la inhibición de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), aumento de la secreción de endotelina-1 (ET-1) en células mesangiales, inducción de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y consecuente aumento en la permeabilidad de células endoteliales del músculo liso, aumento de la acumulación de proteínas de la matriz microvascular, activación de las vías de NF- κ B y oxidasas dependientes de NADPH y aumento de la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) (Figura I.13) (79).

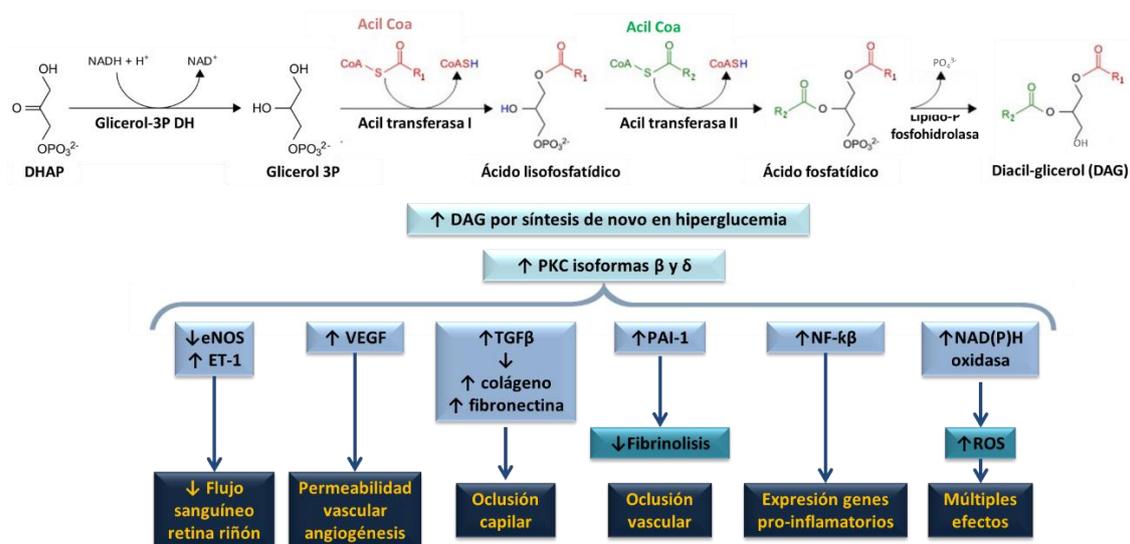


Figura I.13. Activación de isoformas β y δ de PKC por aumento de DAG en condiciones de hiperglucemia. Reacciones de conversión de DHAP en DAG, el principal activador de PKC y sus distintos efectos fisiopatológicos que se desencadenan en condiciones de hiperglucemia. eNOS: óxido nítrico (NO) sintasa endotelial (NO es un vasodilatador);

Capítulo I: Introducción

ET-1, endotelina 1 (vasoconstrictor); PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno 1; TGF- β : Factor de crecimiento transformante β ; VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular. Adaptado de (79).

I.3.2.C. Acúmulo de fructosa-6-fosfato y aumento del flujo en la vía de las hexosaminas.

La fructosa-6-fosfato se desvía de la glucólisis para proporcionar sustratos para reacciones que requieren UDP-N-acetilglucosamina, tales como la síntesis de proteoglicanos y la formación de proteínas o-glicosiladas. El aumento de flujo en la vía de las hexosaminas tiene que ver con las consecuencias que tiene la hiperglucemia en la transcripción génica por la o-acetil-glucosaminación de factores de transcripción claves para la expresión del gen PAI-1 y del TGF- β (Figura I.14). La O-acetil-glucosaminación en la proteína eNOS la inhibe y, las isoformas de PKC se activan por la glucosamina (89,90).

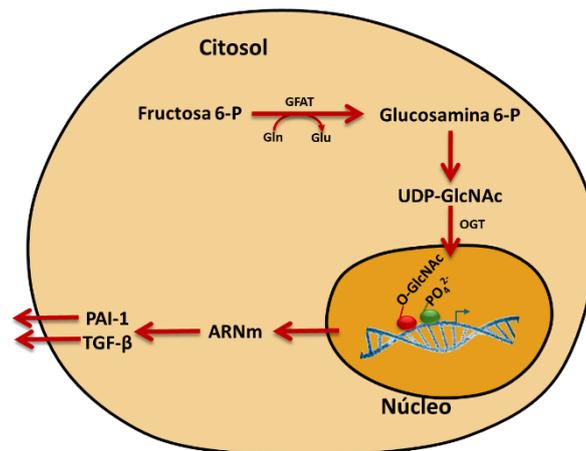


Figura I.14. Vía de las hexosaminas. La enzima GFAT (Gln-F6P amido-transferasa) cataliza la formación de glucosamina-6-P a partir de Fructosa-6-P y del aminoácido glutamina (Gln). La glucosamina-6-P se une a UDP (UDP-GlcNAc), que puede O-glicosilar proteínas en Ser o Thr por acción de OGT (N-acetilglucosamina-O-transferasa). Factores de transcripción glicosilados (como el SP1) activan la expresión del gen de PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno 1) y del TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante β 1). Adaptado (79).

I.3.2.D. Aumento de flujo en la vía de los polioles.

En un ambiente hiperglucémico, el aumento de glucosa intracelular en ciertos tipos celulares cuya captación de glucosa es independiente de insulina, la activación de la enzima aldosa reductasa cataliza la conversión enzimática de glucosa a sorbitol,

Capítulo I: Introducción

compitiendo con las enzimas glutatión reductasa y óxido nítrico sintasa por la utilización de NADPH, por lo que disminuye la capacidad de regenerar glutatión reducido en la defensa antioxidante y los niveles de óxido nítrico, provocando vasoconstricción. Debido a que el sorbitol no atraviesa las membranas, la acumulación de sorbitol genera daño osmótico, que en el caso del cristalino es el causante de cataratas. A su vez, el sorbitol se metaboliza por acción de la enzima sorbitol deshidrogenasa, generando el aumento de NADH en el citosol y el consecuente aumento del ion superóxido a través de la actividad NADH-oxidasa. La fructosa generada en esta reacción puede tanto derivar en la formación de metilglioxal como de DAG (Figura I.15) (91,92).

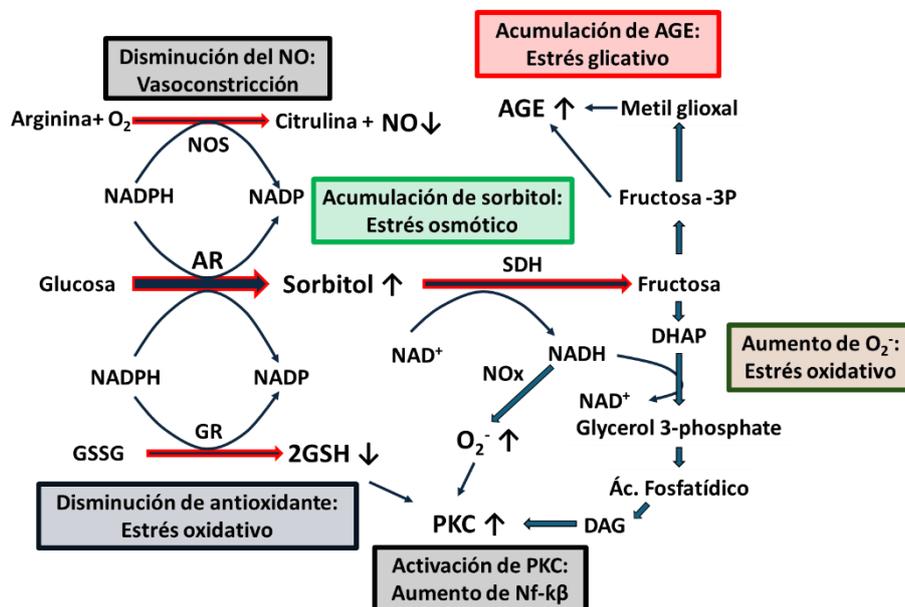


Figura I.15. Mecanismos patogénicos propuestos de la vía de los polioles. AR: Aldosa reductasa, SDH: sorbitol deshidrogenasa, NOS: Óxido nítrico sintasa, GR: glutatión reductasa, GSSG: glutatión oxidado, GSH: glutatión reducido, NOx: NADH oxidasa, PKC: Protein-quinasa C, DAG: Diacil-glicerol, DHAP: dihidroxiacetona fosfato. Para más detalles, referirse al texto precedente. Adaptado de (92).

I.3.3. Prevalencia de diabetes y perspectivas a futuro.

Ningún modelo de predicción de diabetes ha sido universalmente aceptado dado que el origen étnico está fuertemente relacionado con riesgo de diabetes, por lo que, al aplicarlos a diferentes poblaciones, es necesario su recalibración. Algunos parámetros tales como la edad, el sexo, el índice de masa corporal (IMC), presión sanguínea, antecedentes familiares de diabetes e información sobre el estilo de vida permiten una primera evaluación del riesgo de desarrollar diabetes con poco esfuerzo y costo (93).

Capítulo I: Introducción

Luego de la incorporación de medidas de laboratorio como glucosa plasmática en ayuno y la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) mejoraron la predicción de esta enfermedad. Otras mediciones tales como ácido úrico y lípidos son importantes para establecer un futuro riesgo de DT2.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que el número de personas con diabetes aumentó de 108 millones en 1980 a 422 millones en 2014 y que la prevalencia ha aumentado más rápidamente en los países de ingresos bajos y medianos que en los países de ingresos altos. Entre 2000 y 2019, hubo un aumento del 3% en las tasas de mortalidad por diabetes estandarizadas por edad, representando 1,5 millones de muertes (48% de todas las muertes por diabetes ocurrieron antes de los 70 años). En los países de ingresos medios, la tasa de mortalidad por diabetes aumentó un 13%. Resulta llamativo el incremento de la mortalidad por diabetes en adultos, a pesar de que, en conjunto, las cuatro principales enfermedades no transmisibles (enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes) disminuyeron un 22% a nivel mundial entre los años 2000 y 2019 (94).

Más del 95% de las personas con diabetes tienen DT2. Esta enfermedad antiguamente se denominaba no insulino dependiente o de aparición en la edad adulta, aunque ahora se presenta cada vez más frecuentemente en niños (94).

Según todos estos datos y el estilo de vida, cada vez más sedentario, las perspectivas a futuro no son buenas y según la Federación Internacional de Diabetes se prevé que el número de personas con DT2 para 2030 sea de 643 millones (95).

En Argentina, según la Encuesta Nacional de Factores de riesgo realizada en 2018 (96), la prevalencia de diabetes llegó a ser 12,7%, habiendo aumentado en un 51,2% respecto de esta misma medición en 2005 (Tabla I.3). Este aumento vino acompañado del aumento en la prevalencia de obesidad. Esto se relaciona fuertemente con la adopción de estilos de vida no saludables, tales como el sedentarismo y planes de alimentación inadecuados. La Organización Panamericana de Salud documentó que, en el año 2019, en Argentina se registraron 10066 muertes debidas a la diabetes (97).

Capítulo I: Introducción

Tabla I.3. Datos obtenidos en las 4 ediciones de la Encuesta Nacional de factores de riesgo publicadas al día de hoy en Argentina.

	2005	2009	2013	2018
Prevalencia de glucemia elevada o diabetes	8,4%	9,6%	9,8%	12,7%
Sobrepeso (IMC \geq 25 y <30)	34,4%	35,4%	37,1%	36,2%
Obesidad (IMC \geq 30)	14,6%	18,9%	20,8%	25,4%

I.3.4. Prediabetes.

I.3.4.A. Diagnóstico de PD.

El nombre de Prediabetes ha generado diversos inconvenientes ya que ha sido tomada como una pre-enfermedad y no como una enfermedad en sí misma. Por esta razón, a lo largo de los años, la *American Diabetes Association (ADA)* ha preferido nombrarla como “estado de alto riesgo de desarrollar diabetes” y la OMS como “hiperglucemia intermedia”. Subestimar esta enfermedad y diagnosticarla tardíamente conlleva riesgos, ya que las personas con PD pueden presentar complicaciones renales, neuropatías, retinopatía diabética y enfermedades macrovasculares (1,98).

Según la *ADA*, la PD se diagnostica en pacientes que presenten la glucemia en ayunas alterada (GAA, con valores entre 100 y 125 mg/dl) y/o tolerancia a la glucosa alterada (TGA, con valores entre 140 y 199 mg/dl a las dos horas en la PTOG). En países como los Estados Unidos, también puede ser diagnosticada con valores de hemoglobina glicosilada (HbA1c) que se encuentren entre 5,7 y 6,4 %. El criterio diagnóstico para la PD ha variado a lo largo del tiempo y difiere según la institución que lo define. La OMS especifica un valor de corte de GAA más alto (110 a 125 mg/dl) que la *ADA* y no toma en cuenta valores de HbA1c (6,99).

Con estos criterios diagnósticos, la Encuesta de Salud Nacional y el Examen de Nutrición (NHANES) sugiere que el 35% de los adultos estadounidenses mayores de 20 años y el 50% de los mayores de 65 años tenían PD entre el 2005 y el 2008 (100). Alrededor del 5 al 10% de las personas con PD se convierten en diabéticos cada año y esto varía según las características de la población y de cómo se define la enfermedad (101,102). La tasa de incidencia de progresión a diabetes en pacientes que sólo presentan TGA está entre el 4 y 6%, los que sólo presentan GAA entre el 6 y 9% y aquellos con ambos parámetros alterados, entre el 15 y 19% (7).

Capítulo I: Introducción

I.3.4.B. La PD no es una pre-enfermedad.

Para reforzar este concepto, sólo basta revisar lo que nos enseñaron muchos de los estudios realizados recientemente:

PD y función celular β : El concepto de pre-enfermedad se desvanece si tenemos en cuenta estudios efectuados en autopsias en los que se demostró que los individuos con una TGA ya perdieron el 80% de la función celular β (75) y aquellos con GAA mostraban una disminución del 50% del volumen celular β (103,104). El estudio *British Whitehall II* demostró la resistencia a la insulina y la disminución de la función de las células β ya se encuentra presente en la etapa de PD, y que unos 13 años previos al diagnóstico de diabetes, las personas presentan valores de glucemia altos y una menor sensibilidad a la insulina (105,106).

PD y dislipemia: La dislipemia es otra alteración que se manifiesta tempranamente en el estadio de PD, con valores de TG, colesterol total, colesterol LDL y AG aumentados y los de HDL disminuidos (107). Tomando en cuenta estas alteraciones y su estrecha relación con la IR, Reaven creó el índice de insulinoresistencia (índice IR) que se calcula como TG/colesterol HDL (108). Posteriormente, utilizando este índice, Salazar estableció los valores de corte de IR para hombres y mujeres (109). La dislipemia, a su vez, está muy relacionada con la aterosclerosis y con el posterior desarrollo de enfermedades cardiológicas.

PD y enfermedad coronaria: El estudio *DECODE (Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe)* mostró que en población europea existe una asociación entre TGA y el riesgo de muerte coronaria y muerte cardiovascular que es independiente del valor de GA (110). Además, diversos estudios han relacionado a la PD con una disminución de la variabilidad de la frecuencia cardíaca (marcador de función parasimpática), disminución de cambios posturales en la frecuencia cardíaca, aumento de la prevalencia de disfunción eréctil en los hombres y un peor perfil en pruebas de función simpática y parasimpática (111,112).

PD y aterosclerosis: El *Diabetes Prevention Program* demostró la asociación entre la duración de la PD y la presencia de calcificaciones de la arteria coronaria y disfunción ventricular sistólica y diastólica izquierda, a la vez que determinó que los individuos con TGA sostenida por 3 años presentaron una incidencia de 7,9% de retinopatía diabética (8,113).

Capítulo I: Introducción

PD y enfermedad renal: El *NHANES* demostró una correlación entre la micro y macroalbuminuria y el aumento de la glucemia. Personas con GAA presentaron un aumento del 10% de la microalbuminuria y un 1,1% de aumento de macroalbuminuria. También se encontró aumento en la filtración glomerular (114).

I.3.5. Importancia del diagnóstico temprano.

Encontrar métodos predictivos, preferentemente no invasivos, para el diagnóstico temprano de la enfermedad permitirá iniciar tratamientos para evitar la transición a DT2. Esto no solamente mejorará la calidad de vida de las personas, disminuyendo la incidencia de eventos cardiovasculares y demás comorbilidades, sino que disminuirá los costos destinados a la atención de pacientes diabéticos graves. En la Argentina, las personas con DT2 generan el doble de gastos al Sistema de Seguridad Social que aquellas personas que no tienen la enfermedad y, a su vez, cuando la DT2 viene acompañada con complicaciones el costo es 3,6 veces mayor (115). Actualmente en la Argentina la PD no es investigada sistemáticamente a nivel asistencial, por lo que aún no se implementan tratamientos preventivos. El diagnóstico precoz debe estar acompañado de una estrategia que retrase o evite la progresión a DT2. En este sentido es importante que grupos multidisciplinarios conformados por médicos, nutricionistas, profesores de educación física y hasta psicólogos, puedan brindarle al paciente un seguimiento integral en donde se aborden alternativas de dietas saludables, diferentes planes de actividad física y soporte psicológico.

I.4. La fructosa y su relación con el desarrollo del estado de PD.

La fructosa y la glucosa son dos monosacáridos que poseen la misma fórmula química, $C_6H_{12}O_6$, la diferencia entre ambas hexosas es que la glucosa es una aldosa y la fructosa tiene un grupo cetona en el C_2 (Figura I.16). La fructosa se encuentra en frutas (incluidas manzanas, uvas, naranjas y sandías), verduras y miel. En la industria alimenticia se utiliza como endulzante, principalmente de bebidas edulcoradas con jarabe de maíz de alta fructosa. El uso de fructosa como edulcorante ha desplazado a la sacarosa (disacárido de glucosa y fructosa) por su mayor solubilidad en agua y su bajo costo (116). Adicionalmente, la fructosa presenta otras propiedades útiles para la industria alimenticia como mejor dulzor y sabor, depresión del punto de congelación y mayor vida útil a través de un mejor control de la humedad comparado con la sacarosa (117).

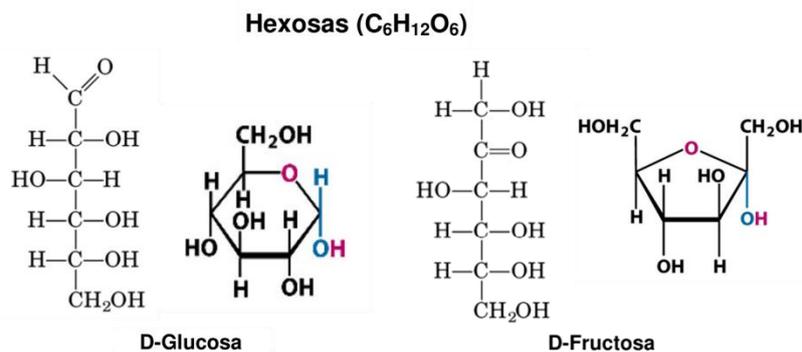


Figura I.16. Estructura de la glucosa y de la fructosa. La figura representa las estructuras lineales y cíclicas de ambas hexosas, D-Glucosa (aldosa) y D-Fructosa (cetosa).

I.4.1. Bebidas endulzadas con fructosa.

La mayoría de las bebidas carbonatadas producidas en Estados Unidos son edulcoradas con jarabe de maíz de alta fructosa. Estas bebidas fueron introducidas en 1967 y se producen a partir de la isomerización de jarabes de glucosa extraídos del maíz, como almidones y dextrinas, que luego son hidrolizados (116). La fructosa en las bebidas carbonatadas representa el 4-6% del peso y el 50% de las calorías. Según el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, la ingesta calórica diaria total en forma de edulcorantes ha aumentado de un estimado de 402 calorías per cápita en 1970 a un pico de 510 calorías en 1999. También el consumo per cápita de fructosa

Capítulo I: Introducción

aumentó un 26% en 27 años, pasando de 64 g/día en 1970 a 81 g/día en 1997 (118). Más del 10% de las calorías diarias que consumen los americanos derivan de la fructosa y el 74% de esa fructosa proviene de comidas y bebidas azucaradas, mientras el resto deriva de vegetales y frutas.

I.4.2. Metabolismo de la fructosa.

La fructosa se absorbe en el intestino delgado a través de un transportador específico denominado GLUT5, presente en las membranas apicales de los enterocitos (119). Luego de su ingreso, la fructosa es transportada a través del transportador transmembrana GLUT2 hacia la circulación portal y así accede al hígado, donde se podrá metabolizar. Existen otros transportadores de la familia GLUT que son específicos para otros azúcares, pero que también son capaces de internalizar la fructosa de manera inespecífica, como GLUT7, GLUT8, GLUT9 y GLUT11 (71).

Aunque la fructosa tiene transportadores en varios órganos (tales como riñón, intestino y páncreas), la enzima responsable del primer paso de su metabolización, la fructoquinasa, se encuentra principalmente en el hígado (120,121). El hígado capta entre el 50 y 70% de la fructosa sanguínea, es decir que tanto la absorción como el metabolismo de la fructosa son excepcionalmente altos en comparación con la glucosa, y esto es debido al gran nivel de fructoquinasa que expresa. Esta enzima convierte la fructosa en fructosa 1 fosfato, que luego, y gracias a la acción de las enzimas aldolasa y triosa-P-isomerasa, se obtienen las triosas fosfato DHAP y GA3P de manera independiente del control de la fosfofructoquinasa (122) (Figura I.17). Por lo tanto, la presencia de fructosa en el hepatocito lleva a su rápida metabolización, escapando del control regulatorio negativo y aumentando la formación de sustratos lipogénicos. En la formación de fructosa 1 fosfato, se consume ATP, con aumento relativo de AMP, lo que activa la vía de degradación de este nucleótido y el consecuente aumento de la formación de ácido úrico (123) y del EO mitocondrial que estimula la acumulación de grasa independientemente de la ingesta calórica excesiva (119,124). Ya se ha demostrado que ratas alimentadas con fructosa presentan un aumento de los niveles de ácido úrico y que la utilización de drogas como el febuxostat que reducen los niveles de ácido úrico previenen el desarrollo de hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, IR e hipertensión (119).

Capítulo I: Introducción

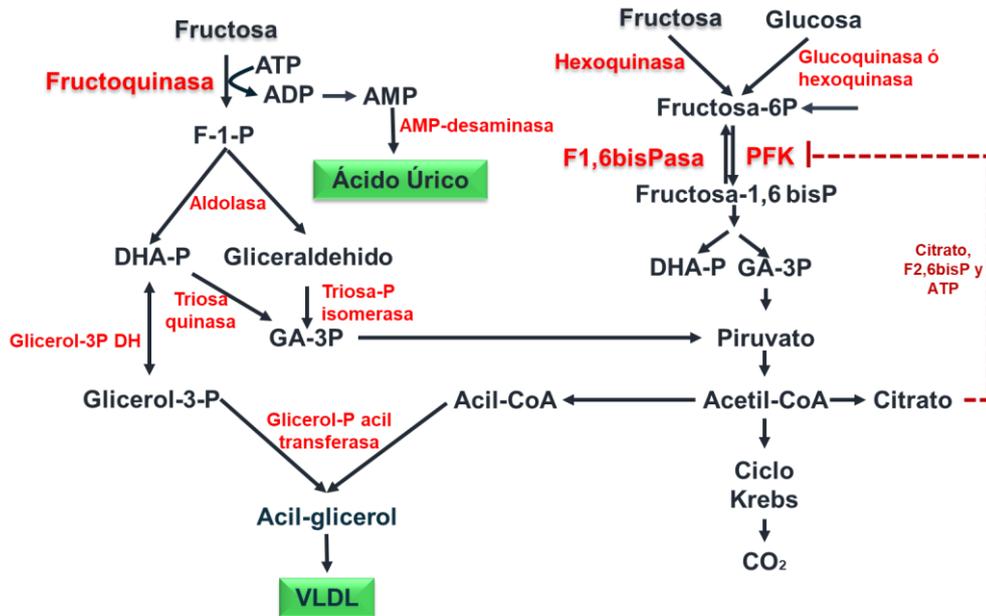


Figura I.17. La fructosa promueve lipogénesis de novo en hígado y el aumento del ácido úrico. En el hígado, aunque la fructosa puede ser fosforilada a fructosa-6P por la enzima hexoquinasa (parte derecha del esquema), es mayoritariamente sustrato de la fructoquinasa para ser transformada en Fructosa-1P. Esta enzima consume ATP y provoca el aumento del ácido úrico al catabolizar al AMP. La Fructosa-1P, por su parte, es convertida en las triosas fosfato a través de transformaciones que ignoran la regulación por F2,6bisP, citrato y ATP, por lo que se generan sin restricciones, contribuyendo a la lipogénesis de novo por ser el sustrato para la síntesis de glicerol 3P, necesario para la formación de los acilglicéridos que se empaquetan en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Adaptado de (119).

Otra de las evidencias de que la fructosa es un sustrato más lipogénico que la glucosa provino de cultivos de células humanas en medios con fructosa o glucosa, en donde se evidenció un mayor porcentaje de formación de TG a partir de la fructosa (125). También se realizaron estudios *in vivo* con ratas alimentadas por una semana con dietas en donde el 66% de las calorías totales provenían de fructosa o dextrosa y encontraron que aquellas que consumían fructosa sufrían un incremento mayor en sus TG (126).

Por último, podemos destacar que la fructosa 1 fosfato ejerce una regulación positiva sobre la capacidad para activar a la glucosa que es captada por el hepatocito. Esto se debe a que la fructosa 1 fosfato permite la translocación de la glucoquinasa desde el núcleo (donde permanece unida su proteína reguladora) al citosol, donde ejerce su actividad fosforilante de glucosa (126). Por lo tanto, debemos destacar que dosis bajas "catalíticas" de fructosa son necesarias para optimizar la activación de la glucosa que

Capítulo I: Introducción

ingresa al hepatocito al favorecer el aumento de la disponibilidad citosólica de glucoquinasa.

I.4.3. Modelos de dietas ricas en fructosa y sacarosa en ratas.

La dieta rica en fructosa (DRF) en humanos pudo haber sido una ventaja evolutiva en tiempos remotos, pero en la actualidad es un factor de riesgo que predispone a IR, obesidad e hipertensión. Varios autores han advertido que las epidemias de obesidad, DT2 y síndrome metabólico están relacionadas con el aumento per cápita del consumo de fructosa (127,128). Por otro lado, un estudio realizado con humanos demostró que la administración de fructosa a hombres con sobrepeso por 2 semanas generó aumento en la presión arterial y en los TG, y una disminución de la fracción del colesterol HDL. Además, el 25% de los hombres desarrollaron síndrome metabólico (129).

Se han desarrollado diferentes modelos en ratas con el objetivo de estudiar los cambios fisiológicos ocurridos durante la ingesta de fructosa y poder generar estrategias terapéuticas que permitan prevenir y tratar las enfermedades desencadenadas por el consumo excesivo de este azúcar. Para su diseño se debieron tener en cuenta factores como la concentración de fructosa utilizada, la forma de administración (en el alimento o en el agua de bebida) y el período de tiempo del tratamiento, como los factores que dependen del animal tales como la edad y el peso al momento de iniciar el tratamiento y la cepa de rata (130,131).

Lo que está ampliamente descrito es que el consumo de fructosa o sacarosa en ratas genera consecuencias metabólicas similares a las que se producen en humanos, como por ejemplo la hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia e IR (132,133).

Gutman (134) describió los diferentes estados metabólicos por los que pasan ratas Wistar de aproximadamente 200 gramos (g) de peso corporal que son sometidas a una dieta rica en sacarosa (DRS) al 63% p/p. El período de inducción es la primera etapa y ocurre aproximadamente a las 3 semanas (de 20 a 25 días), donde se produce un aumento de los niveles de TG en plasma, hígado y corazón. Esto va acompañado de intolerancia a la glucosa y de una hiperinsulinemia compensatoria (estado de IR).

Capítulo I: Introducción

Adicionalmente, en este período se ve alterado el patrón de secreción bifásica de la SIEG (135).

El segundo período descrito por Gutman (134) se denomina período de adaptación y tiene lugar durante la semana 8 (40 a 55 días). En esta instancia se produce una normalización espontánea de los parámetros que habían sido modificados anteriormente. El tercer período se denomina período de recurrencia y se establece a partir de las 15 semanas (90 a 120 días), donde se regeneran niveles anormales de TG, y reaparece la intolerancia a la glucosa a pesar de que hay una respuesta de insulina normal *in vivo* y un aumento moderado en la liberación de insulina *in vitro* (hiperglucemia con normoinsulinemia). A partir de las 30 semanas, se generan niveles elevados permanentes de glucosa (hiperglucemia), TG (hipertrigliceridemia) y AG. También se evidencia un deterioro más pronunciado de la tolerancia a la glucosa seguido por un estado de IR con un déficit relativo de secreción de insulina que lleva a un síndrome de diabetes moderada que se asemeja a la DT2. Otra característica de este período es que las ratas presentan sobrepeso y un aumento de la adiposidad visceral.

En nuestro plan de trabajo planteamos la hipótesis de que la utilización de una dieta inductora del estado de PD como es la DRF, además de provocar los cambios metabólicos y fisiológicos debe dejar su impronta epigenética en el ADN y que ella puede ser una herramienta interesante para poder desarrollar métodos diagnósticos. Por ello es bueno que antes de adentrarnos en el desarrollo de nuestro trabajo podamos descifrar los aspectos moleculares de la epigenética y sus consecuencias.

I.5. Epigenética.

Las modificaciones epigenéticas involucran una variedad de cambios que puede sufrir el material genético sin que estos impliquen una mutación del ADN, pero que tienen un impacto a nivel de la función génica. Estos cambios pueden ser heredados tanto en divisiones mitóticas como meióticas, pero, como decíamos recién, no implican cambios en la estructura primaria del ADN. Actúan en la interfase del genoma y de los factores ambientales, por lo tanto, al contrario de lo que ocurre con los cambios genéticos, son eventos plásticos y reversibles.

Los mecanismos que operan este tipo de modificaciones en el ADN son (Figura I.18):

- modificaciones postraduccionales de histonas (MPTH) capaces de alterar la conformación de la cromatina,
- metilación de las citosinas en el contexto de secuencias dinucleotídicas CpG y
- silenciamiento genético postranscripcional mediado por ARNs no codificantes (136).

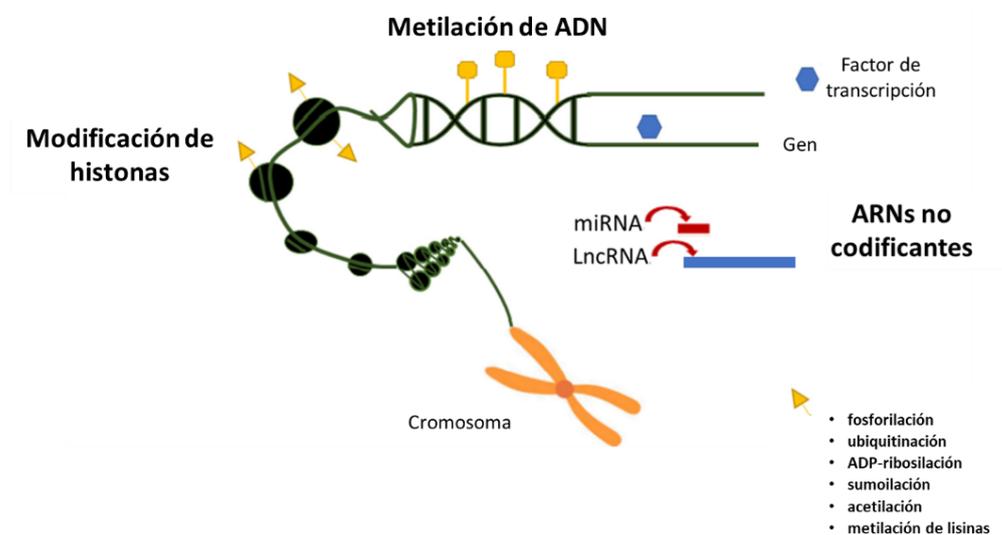


Figura I.18. Esquema resumido de las principales modificaciones epigenéticas. lncRNA: ARNs largos no codificantes, miRNA: micro ARNs. Adaptado de (137).

Los tres tipos de modificaciones epigenéticas regulan tanto la estructura y función del material genético, así como los patrones de expresión génica específicos de cada tipo

Capítulo I: Introducción

celular. Todas estas modificaciones epigenéticas y sus implicancias forman lo que se denomina epigenoma (138,139).

En células de mamíferos, el ADN cromosomal está empaquetado con proteínas histónicas y no histónicas, formando la cromatina. Cuatro tipos de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) se agrupan de a pares para formar un octámero conocido como “partícula núcleo”, alrededor del cual 147 pb del ADN se enrollan, dando dos vueltas. Estos complejos de histonas y ADN llevan el nombre de “nucleosomas”. Dependiendo del grado de condensación de la cromatina, se divide en eucromatina (laxa y transcripcionalmente activa) y heterocromatina (muy condensada y sin posibilidades de ser transcripta). La heterocromatina se caracteriza por poseer MPTs represivas y un porcentaje mayor de metilación en islas CpG de promotores de los genes que puedan estar presentes en este tipo de cromatina. La eucromatina, en cambio, posee MPTs permisivos y un menor porcentaje de metilaciones en las islas CpG de los promotores génicos. Tanto los *enhancers* como los cuerpos de los genes también pueden poseer marcas epigenéticas activadoras y represivas. En el caso de los *enhancers*, una marca activadora es la acetilación en el residuo 27 de la histona H3, que corresponde a una lisina (H3K27ac) y los cuerpos de genes transcripcionalmente activos están enriquecidos con tri-metilaciones en los residuos lisina 36 y lisina 79 de la histona H3 (H3K36me3/H3K79me3), mientras que la tri-metilación de la lisina 27 de H3 (H3K27me3) se asocia con una reducción de la transcripción. Tanto los ARNs largos no codificantes (lncRNAs) como los micro ARN (miRNAs) también participan de la regulación de la expresión génica por varios mecanismos postranscripcionales y epigenéticos (140).

En condiciones normales el rol regulatorio de la epigenética tiene importancia en diferentes procesos celulares como son el desarrollo, la identidad celular, la herencia estable de patrones de expresión génica en células diferenciadas, impronta génica, inactivación del cromosoma X, plasticidad de células madre, susceptibilidad diferencial a enfermedades entre gemelos y respuestas celulares a señales ambientales. Esta red multifactorial de control es influenciada por diferentes factores externos, como puede ser la nutrición y la actividad física. Un desbalance o alteración de los estados epigenéticos puede generar distintos desórdenes o patologías (141).

I.5.1. Modificaciones postraduccionales de histonas.

Las MPTHs modifican la estructura de la cromatina y, de esta manera, regulan la accesibilidad de la enzima ARN-polimerasa II y de los factores generales de transcripción que actúan en conjunto con ella. Existen diferentes tipos de modificaciones como son:

- Fosforilación,
- ADP-ribosilación,
- Acetilación,
- Metilación de lisinas.
- Ubiquitinación y
- Sumoilación*

*adición de una pequeña proteína relacionada a la ubiquitina llamada *small ubiquitin-related modifier* o SUMO.

La acetilación de lisinas (Kac) se lleva a cabo por parte de las enzimas acetiltransferasas de histonas (HAT) y la remoción de esta marca la realizan las desacetilasas de histonas (HDAC), como la sirtuina. En general la Kac en promotores se relaciona con activación transcripcional y la eliminación de esta modificación genera represión génica. La metilación de lisinas (Kme) puede generar tanto activación como represión transcripcional dependiendo del residuo de lisina que es modificado y del grado de metilación. La metilación está mediada por las enzimas lisina-metiltransferasas de histonas (KMTs) y la remoción por las desmetilasas de lisina (KDMs). En los promotores de genes activos frecuentemente la histona H3 sufre la acetilación de la lisina 9 (H3K9ac), la dimetilación o trimetilación de la lisina 4 (H3K4me2 y H3K4me3), mientras que los que están reprimidos poseen las marcas H3K9me, H3K27me3 (142).

Cambios en las MPTHs en órganos como páncreas, hígado y tejido adiposo pueden afectar la expresión de numerosos genes asociados con la diabetes y la obesidad. Experimentos *in vivo* e *in vitro* demostraron, por ejemplo, que este tipo de modificación en genes tales como los relacionados con la vía de TGF- β , que actúan sobre a expresión de proteínas fibróticas, de la matriz extracelular y sobre inhibidores del ciclo celular en células renales, contribuyen a la nefropatía diabética (143).

Capítulo I: Introducción

Experimentos con células endoteliales de retina (RECs) provenientes de ratones diabéticos han demostrado la influencia del ambiente en el epigenoma y sus consecuencias patológicas. Estas células generaron la disminución del ARNm de *Sod2* cuando fueron cultivadas en presencia de concentraciones elevadas de glucosa debido al aumento de la marca represiva H4K20me3 en el promotor de este gen. Además, la activación de la expresión del gen de la metaloproteinasa de matriz 9, que codifica una enzima implicada en la retinopatía diabética, se asoció con la reducción de la marca H3K9me2 y el aumento de H3K9ac en promotores de RECs (144,145).

A su vez, las complicaciones vasculares de la diabetes vienen acompañadas de inflamación crónicas y afectan principalmente al riñón y a pequeños vasos sanguíneos que irrigan los ojos. Varios estudios han demostrado que la activación de la vía inflamatoria NF- κ B es mediada por altas concentraciones de glucosa y genera aumento de la expresión de genes involucrados en mecanismo de inflamación, tanto en células vasculares como monocitos. Estos estudios revelaron que las MPTs y otras modificaciones epigenéticas están involucradas en este proceso (146).

I.5.2. ARNs no codificantes: miRNAs y lncRNAs.

Los ncRNAs son ARNs que no codifican para proteínas y que tienen influencia en el desarrollo de ciertas enfermedades, ya que modulan la expresión génica a través de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales. Se clasifican en: miRNAs, que son pequeños ARNs de aproximadamente 22 nucleótidos de largo y lncRNAs, los cuales abarcan una gran familia de ARNs con dimensiones mayores a 200 nucleótidos, hasta 100kb de largo (147,148). Se ha demostrado que ambos tipos de ARNs regulan la expresión de genes y modulan la acción de factores de crecimiento e inflamatorio.

Se ha reportado que, en pacientes con diabetes, las células de la retina, células vasculares y renales presentan una expresión anormal de miRNAs que se ha relacionado con las complicaciones de la diabetes (143). Tanto en la retinopatía como en la cardiomiopatía diabética, se demostró que el desbalance de miRNAs correlaciona con el aumento de factores asociados con angiogénesis, inflamación y EO (149,150).

Por otro lado, los lncRNAs pueden afectar la expresión génica a partir de varios mecanismos epigenéticos: actúan como andamiaje para unir complejos proteicos,

Capítulo I: Introducción

reclutan complejos de modificación de cromatina a localizaciones claves y actúan como esponjas de miRNAs. Varios lncRNA aumentan la expresión de genes inflamatorios regulados por la vía NF- κ B e inhiben genes antioxidantes, llevando al desarrollo de complicaciones vasculares como aterosclerosis y nefropatía diabética (151,152). Santulli et al demostraron que, dentro de la patología de la DT2, diferentes miRNAs y lncRNAs relacionados con disfunción endotelial (miR-185), metabolismo lipídico (miR-29), inflamación (lncRNA MALAT1), células de músculo liso (miR-504) se encontraban desregulados (153).

I.5.3. Metilación del ADN.

En 1975 se propuso que la metilación de residuos citosina en la posición 5' de las secuencias "CpG" se considerase como una marca epigenética de silenciamiento en vertebrados (154,155). Las secuencias podían tanto ser metiladas *de novo*, como ser heredadas a través de divisiones de células somáticas. Estudios más recientes confirmaron que existen otras secuencias que también sufren metilación y que están extendidas en vertebrados e invertebrados con características y funciones distintas (156,157).

Aunque en bacterias se encontraron metilaciones en adenina y/o citosina, que se interpretaron como marcas tanto para identificar y degradar el ADN invasor, como para rastrear reparaciones del propio ADN, en eucariotas esta modificación sólo ocurre en los residuos de citosina (158,159). Desde el descubrimiento de que el ADN metilado es transcripcionalmente inactivo cuando se transfecta en ovocitos de *Xenopus* o células de mamífero cultivadas, la metilación se ha relacionado funcionalmente con la represión génica, pero es importante destacar que la metilación no siempre es esencial para la regulación de genes eucarióticos, ya que está ausente en muchos organismos. Sin embargo, se ha relacionado con diferentes formas de represión epigenética estable, como el *imprinting*, la inactivación del cromosoma X y el silenciamiento del ADN repetitivo (139).

Los vertebrados son los únicos que pueden metilar citosinas en todo el genoma, a diferencia de plantas e invertebrados, que muestran patrones de metilación de

Capítulo I: Introducción

"mosaico", porque sólo se dirigen a elementos genómicos específicos (ADN repetitivo y las secuencias activamente transcritas) (159).

La metilación generalizada de los genomas de vertebrados sugiere que este sería su estado basal inicial, pero a medida que transcurre el tiempo, la línea germinal sufre desaminaciones espontáneas de las citosinas. Esto lleva a la activación de diferentes mecanismos de reparación que terminan reemplazando la citosina metilada por una timidina. Excepciones a esta pérdida general de secuencias CpG reside en elementos genómicos denominados islas CpG que son regiones del ADN de aproximadamente 1000 pb, ricas en CpG que están generalmente cercanas al sitio de comienzo de transcripción de los genes, pero que también pueden encontrarse en el cuerpo de los genes y hasta en regiones intergénicas (160,161).

I.5.3.A. Mecanismos de metilación del ADN.

La metilación del ADN es catalizada por enzimas ADN-metiltransferasas (DNMTs) en la posición 5' de los residuos de citosina en los dinucleótidos CpG por transferencia del grupo metilo desde S-adenosilmetionina (SAM), generando la 5-metilcitosina (5mC) (Figura I.19) (162).

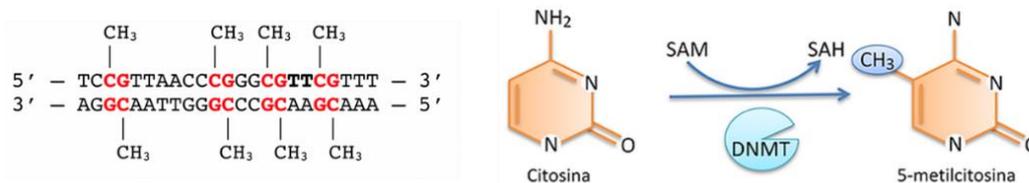


Figura I.19. Metilación de citosinas del ADN en sitios CpG. A la izquierda se representó una secuencia de ADN en la que se observan diversos sitios 5'-CpG-3' (resaltados en letra roja) metilados. A la izquierda se muestra la reacción de metilación en posición 5' de la citosina por acción de la enzima ADN-metiltransferasas (DNMTs), que, a expensas de su sustrato S-adenosilmetionina (SAM) genera la 5-metilcitosina (5mC) y libera S-adenosilhomocisteína (SAH).

Existen diferentes tipos de DNMTs, las que actúan de novo estableciendo un patrón de metilación en etapas tempranas del desarrollo son la DNMT3A y DNMT3B, en combinación con DNMT3L, y la DNMT1 es la que mantiene fielmente este patrón a través de las divisiones celulares (163,164).

Las metilaciones pueden perderse de manera pasiva, por un mantenimiento deficiente, o activa, por el accionar de diversas proteínas en un proceso complejo que

Capítulo I: Introducción

requiere de diversos mecanismos, como la escisión de base y reparación de ADN (165,166) en los que intervienen enzimas pertenecientes a la familia TET (ten-eleven translocation) y las enzimas TDG (thymine DNA glycosylase) y AID (activation-induced cytidine deaminasa) la cual remueve el grupo amino de 5mC.

Tanto la forma metilada como no metilada de los dinucleótidos CpG son reconocidos por diferentes dominios de proteínas. Los dominios MBD contribuyen de manera indirecta a la represión mediada por la metilación; en cambio, los dominios CXXC reconocen los CpG no metilados y se asocian a otras proteínas como CFP1 o a histonas desmetilasas como son KDM2A y KDM2B. Se sugiere que este reclutamiento podría ayudar a mantener un estado no metilado (167,168).

I.5.3.B. Partes del gen que pueden metilarse en el ADN genómico.

En el ADN de células somáticas, la mayoría de las islas CpG que se encuentran en los sitios de inicio de la transcripción (TSS, también por su denominación en inglés *transcription start site*) de genes activos permanecen desmetiladas, lo que permite la unión de factores de transcripción y *enhancers*, y sus promotores presentan regiones sin nucleosomas (NDR, por su expresión en inglés, *nucleosome-depleted region*). Como se ilustra en la [Figura I.20](#), los nucleosomas que flanquean el TSS están marcados por la trimetilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4me3), que se asocia con la transcripción activa, y la variante de histona H2A.Z, que es antagonista de las DNMTs.

Por el contrario, los genes que se encuentran reprimidos o silenciados (los localizados en el cromosoma X inactivo y genes que se expresan exclusivamente en células germinales) poseen metilaciones en las islas CpG de sus promotores (139,169).

La mayoría de los cuerpos de genes son pobres en sitios CpG, pero se encuentran ampliamente metilados y contienen repeticiones múltiples y elementos transponibles. Aunque la mayoría de las islas CpG se localizan en los promotores de los genes, también pueden hallarse, en menor medida, dentro del cuerpo de los genes. Paradójicamente, existe una correlación positiva entre la metilación del cuerpo del gen y la expresión (los genes transcriptos poseen una alta metilación del cuerpo del gen) (170,171). También existe evidencia para sostener la idea de que la función de la metilación en cuerpos de genes es silenciar elementos repetitivos (tales como

Capítulo I: Introducción

retrovirus, elementos LINE1 y elementos Alu), permitiendo la transcripción del gen huésped, o regular el *splicing*, ya que se demostró que los exones están más metilados que los intrones (172).

En cuanto a los elementos regulatorios, los *enhancers* (que potencian la transcripción de genes distantes) también son pobres en CpG y su metilación es bastante variable. Presentan regiones que no son 100% metiladas o desmetiladas, por lo tanto, el promedio de las metilaciones determina estas regiones binarias que se suelen denominar *low-methylated regions* (LMRs). En estos sitios CpG se generan competencias por la metilación por lo que son regiones muy dinámicas. Existe evidencia de que la metilación de los *enhancers* en sitios CpG reducen su actividad (173,174). Los nucleosomas que flanquean estas regiones, al igual de lo que ocurre en el sitio de inicio de transcripción (TSS), llevan la marca distintiva de monometilación en la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me1) y también presentan la variante de histona H2A.Z (Figura I.20).

Con respecto a los *insulators* (elementos que bloquean la interacción entre el *enhancer* y el promotor), no existen aún reglas generales en cuanto a la función de la metilación. El caso más estudiado es el caso de las secuencias de ADN a las que se une la proteína CTCF, y tanto la interacción como sus consecuencias no dependen de la metilación (173).

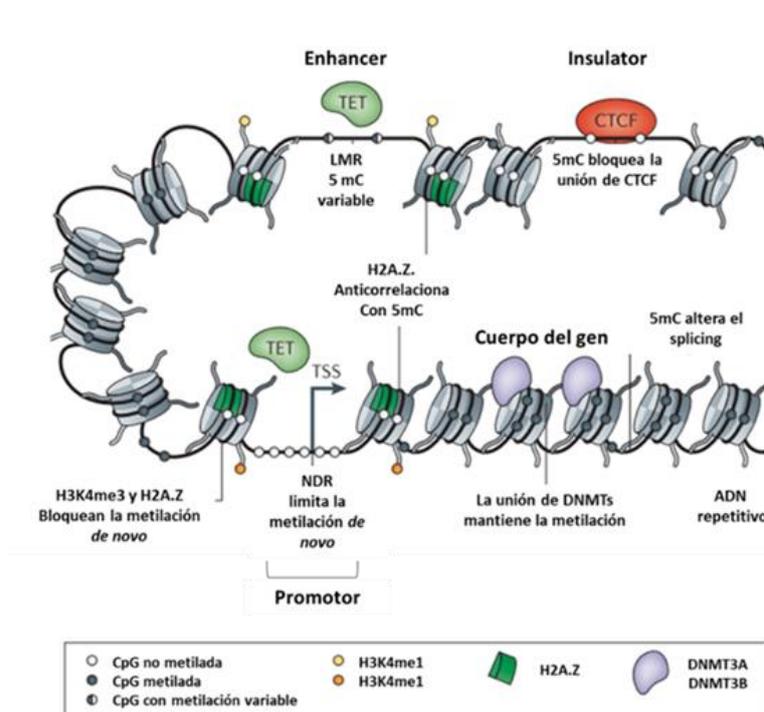


Figura I.20. Anatomía molecular de los sitios CpG en la cromatina y su rol en la expresión génica. Adaptado de (139).

I.5.3.C. La metilación en el ADN mitocondrial.

Las mitocondrias contienen su propio ADN, llamado ADN mitocondrial (ADNmt). El 99% de este ADN es heredado únicamente de la madre y las mitocondrias tienen la capacidad de replicarse y disparar la apoptosis de manera independiente de otros orgánulos celulares. El ADNmt de mamíferos es pequeño (sólo 16 kb) y posee una estructura circular similar al ADN bacteriano. Las dos hebras se diferencian por su contenido de nucleótidos, con una cadena rica en guanina denominada cadena pesada (o cadena H) y una cadena rica en citosina denominada cadena ligera (o cadena L). El ADNmt codifica un total de 37 genes, 28 localizados en la cadena H y 9 en la L. De los 37 genes totales: 22 codifican ARNs de transferencia (ARNt), 2 ARN ribosomal (ARNr subunidades pequeña y grande) y 13 codifican proteínas que forman parte de los complejos de la cadena transportadora de electrones (CTE) (175).

Los complejos proteicos que conforman la CTE son particulares, ya que están formados por subunidades codificadas por dos genomas diferentes, que son el mitocondrial y el nuclear. De las más de 90 proteínas que forman parte de la CTE, el ADNmt codifica, tal como mencionamos anteriormente, sólo 13 proteínas: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6 (pertenecientes al Complejo I), CYTB (pertenecientes al Complejo III), COX1, COX2 y COX3 (pertenecientes al Complejo IV), ATP6 y ATP8 (del Complejo V) (176).

A diferencia del ADN nuclear, que contiene al menos un promotor por cada gen, el ADNmt tiene sólo 3 promotores para todos sus genes: 2 alojados en la cadena H (los promotores de cadena pesada 1 y 2 ó HSP1 y HSP2) y el restante en la ligera (promotor de cadena ligera ó LSP). Los 3 promotores se agrupan en una región denominada *D-loop*, una secuencia reguladora que controla tanto la replicación como la transcripción del ADNmt. La transcripción en las mitocondrias se inicia de forma bidireccional desde ambos HSPs y desde LSP (175,177). La estructura del ADNmt descrita anteriormente se grafica en el esquema de la [Figura I.21](#).

Capítulo I: Introducción

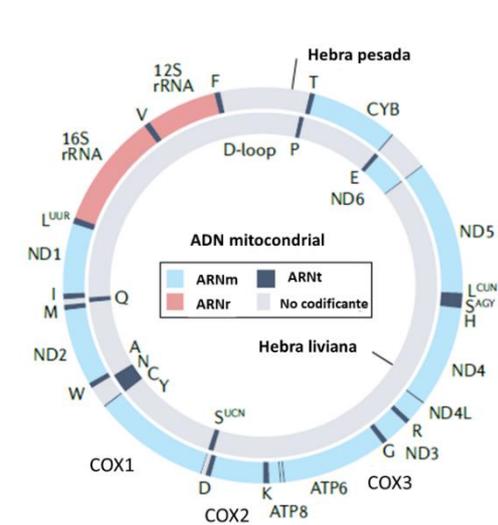


Figura I.21. Organización del genoma mitocondrial. El genoma mitocondrial es circular y tiene una organización similar en diferentes especies animales, donde los genes de ARNt se encuentran entre los genes de ARNm y ARNr. Los genes de ARNm (representados en color celeste e identificados con los nombres resumidos a un código de hasta 3 letras y números) se ubican, con excepción del gen ND6, en la cadena pesada (hebra pesada). Los dos genes que codifican ARNr se ubican en la cadena pesada y en la figura están representados en color rosa. Los genes de ARNt están representados en color azul, se ubican en ambas cadenas y se identifican con una letra que indica el aminoácido que transfieren (utilizando el código de aminoácidos de una sola letra). Las regiones no codificantes (mayoritariamente ubicadas en la hebra liviana), se representan en color gris. Adaptado de (178).

Otras características que diferencian al ADNmt del nuclear es que carece de secuencias intrónicas, intergénicas, y de varios codones de stop (175,177). Además, no se asocia a histonas y se empaqueta en lo que se denomina “mitocromosomas”, cuyo componente proteico más abundante es el factor de transcripción A (TFAM) que además de su función estructural de compactar y empaquetar al ADNmt, tiene un rol importante en su transcripción y replicación (179,180).

Aunque hubo cierta controversia inicial en cuanto a la existencia de la metilación del ADNmt, ésta fue confirmada hace aproximadamente 40 años utilizando diversos modelos celulares y animales (181,182). En este sentido, también se hallaron dentro de la mitocondria a las enzimas que forman parte de la maquinaria de metilación/desmetilación: DNMT1 (183,184), DNMT3A y DNMT3B (185,186) y TET (187,188).

Si bien se conoce que la expresión génica mitocondrial está regulada principalmente de manera postranscripcional por proteínas de unión a ARN (178), existe evidencia de que la metilación del ADNmt también tendría un rol en la regulación de la expresión génica. Esto fue planteado en varios trabajos en los que se observó una correlación significativa entre los niveles de metilación del ADNmt y el número de copias del ADNmt, así también como con la expresión del policistrón (189,190).

Otro aspecto que despierta debates es la existencia o no de Islas CpGs en el ADNmt. A diferencia de lo que ocurre en el ADN genómico, el ADNmt presenta altos niveles de

Capítulo I: Introducción

metilación en regiones no CpGs (183,185) y, aunque la mayoría de los trabajos niegan la existencia de Islas CpG (191,192), otros como el de Kowal (193) mostraron la presencia de unas pocas islas en diversos modelos animales.

I.5.4. Hitos en la relación entre DT2 y epigenética.

Desde hace mucho tiempo se ha relacionado el surgimiento de ciertas enfermedades con alteraciones génicas y su herencia, pero cada vez se reconoce con mayor fuerza la influencia de factores ambientales sobre su desarrollo. En relación a esto y con ayuda de las nuevas tecnologías de secuenciación, la epigenética surge en la interfase de lo genético y lo ambiental, logrando relacionarlas y proponiendo otro tipo de regulación génica mediante la modificación de la cromatina la cual afecta directamente la transcripción de genes (141). Otro elemento importante a tener en cuenta en el estudio del epigenoma y su influencia en enfermedades es que, dado que los patrones epigenéticos son específicos del tipo celular afectado (194), es esencial estudiar por separado cada tipo de tejido que se ve comprometido en una determinada enfermedad como es el caso de islotes pancreáticos, tejido adiposo e hígado en la DT2.

I.5.4.A. Primeros estudios.

Los primeros estudios realizados en islotes y en músculo esquelético de pacientes con DT2 estaban dirigidos al análisis sobre los promotores de genes candidatos o partes restringidas del genoma. En ese contexto, y debido a su influencia en la expresión de genes mitocondriales y su relación con la producción de ATP se estudió el promotor de PPAR γ , y se observó que se encontraba hipermetilado (y por lo tanto silenciado) (195). A partir de este trabajo pionero, creció el interés por la epigenética y surgieron diferentes avances técnicos y bioinformáticos que ayudaron a comprender el rol del epigenoma en la fisiopatología diabética.

En diversos estudios efectuados en muestras de ADN de islotes de pacientes con DT2 se observaron sitios CpGs hipermetilados ubicados en zonas promotoras o *enhancer* de genes importantes para la fisiopatología de la DT2, tales como insulina (196), el receptor de GLP-1 (197) y PDX-1 (198). Más recientemente, estudios efectuados en islotes cultivados, confirmaron la influencia de la hiperglucemia tanto en la expresión de genes como en la metilación del ADN (199).

Capítulo I: Introducción

En conclusión, estos primeros estudios demostraron que la patología de DT2 está relacionada con modificaciones epigenéticas en genes claves. Además, se evidenció claramente que la hiperglucemia se relaciona directamente con el aumento de los niveles de metilación de estos genes y termina generando la disminución de su expresión.

I.5.4.B. Nuevas tecnologías.

Uno de los hitos más importantes en el estudio de la epigenética fue el desarrollo de la tecnología de *arrays Illumina*, que cambió la manera de abordar este tipo de estudios, ya que hizo posible el análisis de numerosos sitios CpG en simultáneo (200). En este estudio se comprobó que islotes pancreáticos de pacientes con DT2 presentan alteraciones en la metilación de los sitios CpG, siendo la hipometilación la modificación más abundante, afectando la expresión de alrededor de un octavo de los genes que habían presentado alteraciones en la metilación (200).

El siguiente hito tecnológico que revolucionó este tipo de análisis fue la secuenciación de genoma completo luego del tratamiento con bisulfito. Este tipo de secuenciación permitió pasar de matrices que analizaban como máximo 450.000 sitios CpG, aproximadamente el 1,5 % del genoma humano, a matrices cuya capacidad de análisis abarca el 83% del total de sitios CpG del genoma humano, es decir $2,4 \times 10^7$ sitios CpGs. El tratamiento de ADN con bisulfito media la desaminación de citosinas no metiladas a uracilo, mientras que las citosinas metiladas en la posición 5' son resistentes a esta conversión y permanecen como citosinas (Figura I.22). Este método permitió identificar citosinas metiladas en todo el genoma a través de la comparación de la secuencia inicial y la obtenida luego del tratamiento con bisulfito (162,201).

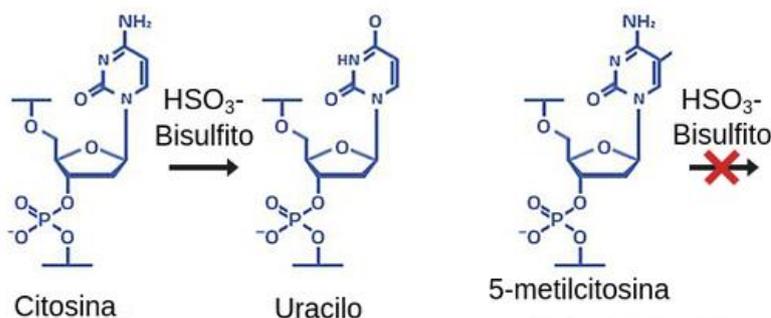


Figura I.22. Tratamiento del ADN con bisulfito. Las Citosinas sin metilaciones son convertidas en uracilo, mientras que las que habían sido previamente metiladas en posición 5' (5mC) son resistentes al tratamiento con bisulfito. Adaptada de (202).

Capítulo I: Introducción

Volkov publicó en 2017 un trabajo utilizando este tipo de plataforma en donde se identificaron 25820 regiones diferencialmente metiladas (DM) en islotes provenientes de pacientes con DT2. Las regiones DM cubrieron genes relacionados con la función insular y presentaron alteraciones en su expresión que fueron relacionadas con una secreción de insulina alterada (203). Los resultados de este estudio coincidieron con los encontrados por Scott et al en un meta-análisis de genoma total de pacientes con DT2 (204).

Además de la relación encontrada entre la DT2 y la metilación del genoma, también existe gran cantidad de evidencia que vincula los cambios epigenéticos directamente con las complicaciones de la diabetes, tales como nefropatía (205), retinopatía (206), el accidente cerebrovascular (207) y el infarto de miocardio (208).

Con todo esto podemos decir que hay suficiente evidencia para establecer que el epigenoma del ser humano contribuye al desarrollo de la DT2 y sus complicaciones y que es capaz de interactuar y responder frente a diversas condiciones fisiológicas. Además, la naturaleza transitoria y reversible de las modificaciones epigenéticas proporciona un campo abierto para el descubrimiento de dianas para la predicción y el tratamiento de DT2.

Capítulo II
Hipótesis y Objetivos.

Capítulo II: Hipótesis y Objetivos.

II.1. Hipótesis.

La hipótesis del presente trabajo de tesis doctoral es que, en el modelo murino de alimentación desbalanceada inducida por una DRF, se obtiene un estado semejante a la PD humana caracterizado por alteraciones que afectan de manera reversible diferentes niveles de regulación dentro de la célula β tales como metilación del ADN y expresión génica a nivel transcripcional y traduccional.

II.2. Objetivo.

II.2.1. Objetivo general.

El objetivo general del presente trabajo de tesis es:

- Identificar en islotes y leucocitos de ratas con fenotipo similar al de la PD humana, genes que modifiquen su patrón de metilación de ADN y funcionen como MEPD. Estos tendrían un valor predictivo de riesgo de desarrollar DT2 y permitirían el diagnóstico precoz y la implementación de estrategias costo-efectivas para su prevención, control y tratamiento.
- Profundizar el conocimiento sobre las alteraciones fisiopatológicas producidos en ratas alimentadas con DRF a nivel general e insular durante el estadio de PD y sobre los mecanismos regulatorios y compensatorios desarrollados en el transcurso de la reversión.

II.2.2. Objetivos específicos.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Validar el modelo de alimentación de ratas con una DRF durante 21 días para generar las alteraciones plurimetabólicas semejantes a la PD humana. Para lo cual se medirán parámetros dietarios y de crecimiento, se estudiará el metabolismo glucémico y lipídico, la SIEG y el EO.

Capítulo II: Hipótesis y Objetivos.

- Desarrollar un modelo que permita en un mismo período de tiempo, prolongar el cuadro de PD y generar una reversión de este fenotipo al reemplazar la DRF por dieta comercial estándar. Se evaluarán los mismos parámetros mencionados para 21 días.
- Evaluar la expresión génica a nivel transcripcional por RT-qPCR de genes claves para la función y el mantenimiento de la masa de las células β , como así también, genes relacionados con vías que son importantes para entender la fisiopatología del estadio de PD.
- Evaluar por Western Blot (Wb) los niveles de algunas de las proteínas que participan en las vías mencionadas anteriormente.
- Identificar cambios en la metilación del ADN de islotes y leucocitos en los animales con alteraciones plurimetabólicas semejantes a la PD humana y en aquellos que revirtieron el cuadro.
- Asociar estos sitios DM con genes y evaluar las principales vías celulares afectadas.
- Verificar por RT-qPCR si los genes asociados a las CpGs DM en islotes modificaron su expresión.
- Proponer algunos genes candidatos que puedan ser utilizados como MEPD.

Capítulo III
Materiales y Métodos.

Diseño experimental

La [Figura III.1](#) muestra un esquema a modo de resumen de los principales grupos experimentales y determinaciones realizadas a lo largo del trabajo de tesis.

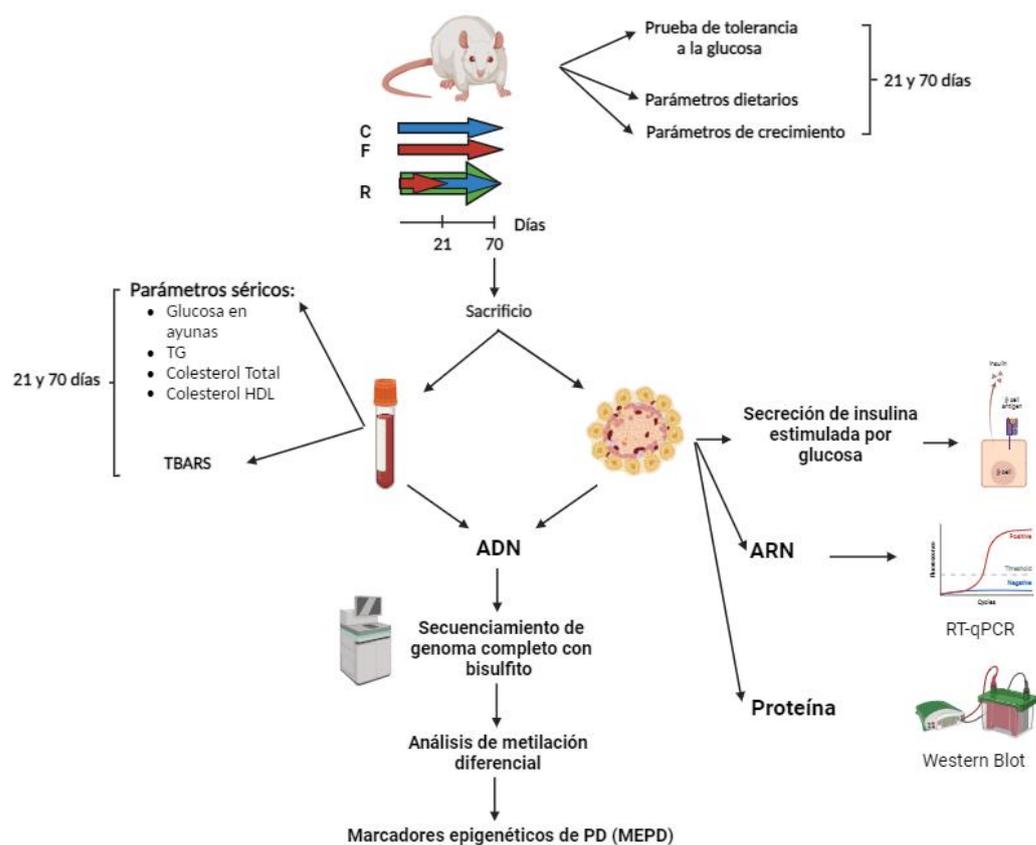


Figura III.1. Resumen gráfico del diseño experimental. Los animales fueron divididos en 3 grupos experimentales según la dieta recibida durante 70 días: un grupo control (C), otro con características fenotípicas similares a la prediabetes humana (grupo F, por haber recibido una dieta rica en fructosa -DRF-) y otro al que luego de 21 días de haber comenzado la DRF, le sustituimos la bebida por agua con el objetivo de revertir su fenotipo de PD (grupo R). Durante el tratamiento efectuamos un seguimiento que incluyó una prueba de tolerancia a la glucosa y el registro de la evolución de parámetros dietarios y de crecimiento. Luego de su sacrificio, se obtuvieron muestras de sangre (para la realización de determinaciones séricas y la obtención del ADN leucocitario) y se les extirpó el páncreas para el aislamiento posterior de islotes de Langerhans. Los islotes fueron sometidos a pruebas funcionales (secreción de insulina en respuesta al estímulo de glucosa), aislamiento de ARN y posterior análisis de expresión génica por RT-PCR cuantitativa, obtención de proteínas totales para determinación por Wb de la presencia de proteínas específicas y aislamiento de ADN. Al ADN aislado de leucocitos y de células insulares se lo secuenció luego del tratamiento con bisulfito y se analizó el grado de metilación diferencial en los diferentes grupos experimentales con el objetivo de poder aportar información útil para la identificación de posibles MEPD.

Capítulo III: Materiales y Métodos.

III.1. Animales

III.1.1. Características de los animales.

Se emplearon ratas normales de la especie *Rattus norvegicus* de la variedad Sprague Dawley (SD), criadas en el bioterio del CENEXA. Se optó por utilizar únicamente machos, con el fin de evitar cualquier influencia hormonal que pudiera surgir del ciclo sexual en las hembras, lo que garantizó la coherencia de los parámetros bajo estudio. Al momento de inicio de los tratamientos los animales tenían 60 días de vida y su peso corporal variaba entre los 300 y 390 g.

III.1.2. Mantenimiento de los animales.

Se mantuvieron en un ambiente con temperatura y ciclos de luz/oscuridad controlados. Se alojaron en una habitación con temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 50% de humedad y ciclos de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad.

Todos los protocolos utilizados fueron evaluados y autorizados por el CICUAL-FCM quien expidió el certificado de aprobación T02-01-2019 que se adjunta al final de este trabajo como Anexo I. Los procedimientos experimentales, el manejo y el mantenimiento de los animales de laboratorio se realizaron de acuerdo con el manual de procedimientos elaborado por la Academia Suiza de Medicina (209).

III.1.3. Grupos experimentales.

Los grupos experimentales que utilizamos en los diferentes capítulos de este trabajo consistieron en ratas que fueron alimentadas con dieta comercial estándar (Ganave, Argentina) y tuvieron acceso libre al alimento y a la bebida. Los animales se dividieron al azar conformando los siguientes grupos (Figura III.2):

C21: bebieron agua corriente por 21 días y luego fueron sacrificadas.

F21: bebieron una solución acuosa de fructosa al 10 % p/v por 21 días y luego fueron sacrificadas.

C: consumieron agua corriente como bebida por 70 días y luego fueron sacrificadas.

F: consumieron una solución acuosa de fructosa al 10 % p/v por 70 días y luego fueron sacrificadas.

Capítulo III: Materiales y Métodos.

R: comenzaron el período de seguimiento bebiendo la solución acuosa de fructosa al 10 % p/v por 21 días y luego se les cambió la bebida por agua corriente que consumieron por 49 días más. Al día 70 los animales fueron sacrificados.

RL: bebieron la solución acuosa de fructosa al 10 % p/v por 70 días y en los últimos 5 días de tratamiento se les administró de manera intraperitoneal un agente antioxidante (ácido α -lipoico) en una concentración de 35 mg/Kg de peso de corporal.

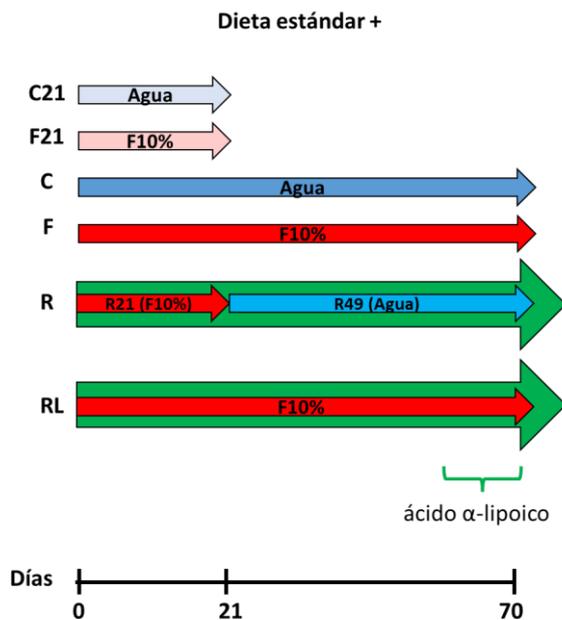


Figura III.2. Grupos experimentales utilizados. Ratas Sprague Dawley fueron alimentadas con dieta comercial estándar y divididas en diferentes grupos que se sacrificaron a los 21 ó 70 días. Los animales cuyo tratamiento duró 21 días fueron **C21**, que consumieron agua corriente como bebida y **F21**, cuya bebida se suplementó con 10% p/v de fructosa (DRF). En cuanto a las ratas cuyo tratamiento se prolongó hasta los 70 días, se conformaron 4 grupos: **C** (bebieron agua), **F** (DRF), **R** (se le suministró DRF por 21 días y luego la bebida fue cambiada por agua hasta el día 70) y **RL** (consumió la misma dieta que las F y recibieron inyecciones de ácido α -lipoico los últimos 5 días de tratamiento). El N de cada grupo se especificará en cada resultado.

III.1.4. Medidas y cálculos relacionados con el alimento y la bebida.

Durante todo el período de seguimiento, registramos la cantidad de bebida y comida sólida ingerida (tres veces por semana) y el peso corporal (una vez por semana) de todos los animales. Se calcularon los g de nutrientes y las calorías consumidos por los animales diariamente, teniendo en cuenta la concentración de la solución de fructosa ofrecida (10 g por cada 100 ml), los datos nutricionales aportados por el fabricante del alimento sólido (Ganave, Argentina) y los aportes calóricos individuales de cada uno de los diferentes nutrientes consumidos, tal como resumimos a continuación:

- Sólo el 62,8% del peso seco del alimento aporta nutrientes (hidratos de carbono, proteínas y grasa), ya que el 37,2% restante corresponde a fibra, calcio y fósforo.

Capítulo III: Materiales y Métodos.

- La distribución proporcional de hidratos de carbono:proteínas:lípidos en el alimento es 45:43:12, respectivamente.
- Para el cálculo de las Kcal ingeridas, debimos considerar adicionalmente el aporte calórico individual de cada nutriente ingerido que es de 4 Kcal/gr en el caso de hidratos de carbono o proteínas y de 9 kcal/g en el caso de los lípidos.

III.1.5. Sacrificio y obtención de las muestras.

Finalizado el período de tratamiento, los animales que no formaron parte de la PTGip se sacrificaron por decapitación y se recogieron muestras de sangre en tubos con heparina. Posteriormente se infiltró y removió el páncreas entero de cada animal y luego de su remoción se colocaron rápidamente en buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB), cuya composición en mmoles/l es la siguiente: NaCl 118; NaHCO₃ 25,96; KCl 4,74; CaCl₂ 2,24; MgSO₄ 1,19; KH₂PO₄ 0,91. El buffer se estabilizó por burbujeo con gas carbógeno (una mezcla de O₂ y CO₂ en relación 95:5% respectivamente) con el fin de equilibrar el pH final a un valor de 7,4.

Capítulo III: Materiales y Métodos.

III.2. Determinaciones del metabolismo glucémico.

III.2.1. Determinación de glucemia y obtención de plasma.

Al momento de la extracción de sangre se determinó la glucemia utilizando una gota de sangre y tiras reactivas (Roche, Suiza) y el resto se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min, conservándose el plasma obtenido a -20°C para el posterior dosaje de metabolitos.

III.2.2. Prueba de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (PTGip).

Algunos animales de cada grupo se destinaron para la prueba de tolerancia intraperitoneal (i.p.) a la glucosa (N=5 en el protocolo de 21 días y N=6 en el de 70 días). Los animales se mantuvieron con un ayuno previo de 12 horas. Luego se los anestesió mediante inyección i.p. con una mezcla de ketamina (80 mg/kg de peso corporal), tramadol (30 mg/kg) y diazepam (20 mg/kg). Esta anestesia tiene como objetivo disminuir el estrés ocasionado por las sucesivas extracciones de sangre que modifica los valores de la glucemia. Luego de un período de estabilización, se les suministró una solución glucosada hipertónica al 50% (Fada Pharma) por vía i.p. en una dosis de 1,5 g/kg de peso corporal. A los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos luego de la sobrecarga de glucosa, se obtuvieron muestras de sangre del plexo retroorbitario para determinar las glucemias. Con los valores obtenidos se calcularon las correspondientes áreas bajo la curva empleando el programa Prisma.

Capítulo III: Materiales y Métodos.

III.3. Determinaciones del metabolismo lipídico.

III.3.1. Determinación de TG.

Para medir los TG se utilizó un kit multienzimático (Wiener Lab, Argentina) que provee una premezcla (reactivo A) compuesta por buffer Good (pH 6,8), clorofenol, lipoprotein lipasa (LPL), glicerol kinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO), peroxidasa (POD), adenosina trifosfato (ATP) y 4-aminofenazona (4-AF). El procedimiento consiste en mezclar 10 µl de muestra o de estándar (cuya concentración es 2 g/l) con 1 ml de reactivo A e incubar durante 20 min a temperatura ambiente (18-25°C). El fundamento del kit se describe a continuación en la [Figura III.3](#).

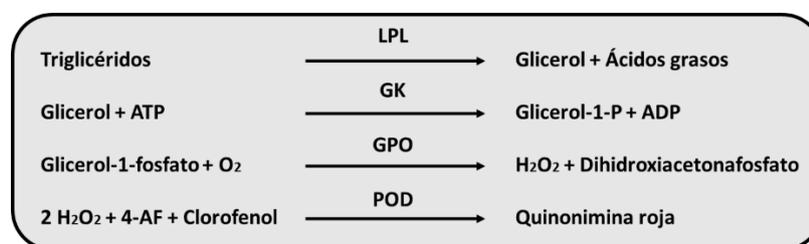


Figura III.3. Fundamento para la determinación de TG. Se detallan las reacciones que ocurren durante la determinación de TG utilizando el kit multienzimático de Wiener Lab.

Transcurrido el tiempo de incubación, se lee en un espectrofotómetro (Biotek, EEUU) a 505 nm y se efectúa el siguiente cálculo:

$$TG \left(\frac{g}{l} \right) = Do \text{ muestra} \times factor$$

$$Factor = \frac{2 \text{ g/l}}{Do \text{ estándar}}$$

III.3.2. Determinación de colesterol y cálculo del índice de IR.

III.3.2.A. Determinación de colesterol total.

Para la determinación del colesterol total y de su fracción HDL se utilizaron kits (BioSystems, Argentina) y con los datos obtenidos en ambas determinaciones se calculó (por diferencia) la fracción No-HDL. El kit provee una premezcla que contiene buffer pipes, colato sódico, fenol, colesterol esterasa (CE), colesterol peroxidasa (CP), peroxidasa (P) y 4-aminoantipirina. 10 µl de muestra o de estándar (200 mg/dl) se

Capítulo III: Materiales y Métodos.

mezclan con 1 ml de la premezcla provista por el kit y se incuban durante 10 min a temperatura ambiente (18-25°C). El fundamento de la medida del Colesterol Total se describe a continuación en la [Figura III.4](#).

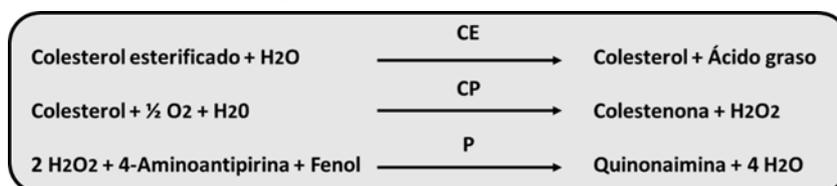


Figura III.4. Fundamento para la determinación de colesterol total. Se detallan las reacciones que ocurren durante la determinación de colesterol total utilizando el kit multienzimático de BioSystems.

Luego de la incubación, se lee en un espectrofotómetro la absorbancia a 500 nm y se realiza el siguiente cálculo:

$$\frac{Do\ muestra}{Do\ estandar} \times C\ estandar = C\ muestra$$

III.3.2.B. Determinación de fracción de colesterol HDL.

Para la determinación del colesterol presente en las lipoproteínas de muy alta densidad (HDL), el fundamento de la técnica es el mismo que para colesterol total, con la salvedad de que debe efectuarse un primer paso en el que las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) deben eliminarse previamente por precipitación con fosfotungstato y iones magnesio. Una vez descartado el pellet, recuperamos el sobrenadante que contiene las partículas HDL, y se procede tal como fue descrito previamente para el colesterol total.

III.3.2.C. Determinación de fracción de colesterol NO-HDL.

El valor de los niveles de colesterol NO-HDL (mg/dl) surge de restarle al valor del colesterol total, el correspondiente valor de la fracción HDL:

$$Colesterol\ Total - Colesterol\ HDL\ (col - HDL) = Colesterol\ NO - HDL\ (col - NO - HDL)$$

III.3.2.D. Cálculo del índice de insulinoresistencia (Índice IR).

Se calculó según lo descrito por Reaven (108) como:

$$Indice\ IR = \frac{TG}{colesterol\ HDL}$$

III.4. Determinación de sustancias reductoras del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Alícuotas de 150 μ l de plasma diluidas en agua bidestilada a un volumen final de 500 μ l se mezclaron con 4 ml de ácido sulfúrico 0,08 N y 0,5 ml de ácido fosfotúngstico al 10% y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. El precipitado se resuspendió con 4 ml de agua bidestilada, se agregó 1 ml de ácido tiobarbitúrico al 0,70% en ácido acético al 50%. Las muestras se calentaron a 95°C durante 1 hora y, luego de enfriarlas en baño de hielo, se agregaron 3 ml de butanol, se agitaron y centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min. Se transfirió la fase orgánica a placas de 96 pocillos y se leyó la absorbancia en un espectrofluorómetro con emisión a 553 nm y excitación a 515 nm. La peroxidación lipídica se expresó como picomoles de malondialdehído/mg de proteína (210).

Capítulo III: Materiales y Métodos.

III.5. Experimentos con islotes de Langerhans aislados.

III.5.1. Aislamiento de islotes de Langerhans.

Una vez perfundido el páncreas con buffer KRB, fue removido entero y se lo colocó en KRB frío para proceder a su limpiado por cuidadosa eliminación del tejido adiposo y conectivo circundante. En una placa de Petri conteniendo KRB se juntaron los páncreas obtenidos de dos ratas y posteriormente se los trituró hasta obtener pequeños trozos para facilitar su digestión por aumento del área de exposición a la enzima colagenasa. Una vez triturados, se colocaron en un tubo conteniendo 11-13 mg de Colagenasa P, (1,8 U/mg, Sigma, Japón), se agregó buffer KRB en una proporción 2:1 y se agitó vigorosamente en forma manual a 37°C. El punto final de la digestión se determinó bajo lupa binocular (8X) y se detuvo mediante el agregado de 50 ml de KRB frío, en el momento en que comenzó a observarse la aparición de islotes libres del tejido pancreático exocrino. Posteriormente los islotes se lavaron por sedimentación espontánea (3 veces) en buffer KRB y finalmente se recogieron individualmente con pipeta bajo lupa binocular colectándose en KRB suplementado con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% (211).

III.5.2. SIEG y determinación de insulina por ELISA.

III.5.2.A. SIEG.

Para estudiar la SIEG *in vitro* en respuesta glucosa basal (3,3 mM) y estímulo (16,7 mM), se incubaron grupos de 5 islotes (provenientes de la digestión de 2 páncreas del mismo grupo de animales) durante 60 min a 37° C en 600 µl de buffer KRB con 1% de BSA (212). Al término del período de incubación se tomaron alícuotas del medio y se conservaron a -20°C para la determinación posterior de insulina por ELISA.

III.5.2.B. ELISA.

La determinación de insulina se llevó a cabo en un ensayo de ELISA sándwich, utilizando el Rat Insulin ELISA Kit (Invitrogen, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, la técnica consiste en una primera incubación de las muestras en placas de 96 pocillos provistas por el kit que contaban con el primer anticuerpo anti-

Capítulo III: Materiales y Métodos.

insulina de rata previamente adherido que oficia como anticuerpo de captura. Luego de algunos lavados se agrega un segundo anticuerpo anti-insulina conjugado con biotina que se adhiere al complejo previamente formado, completando el “sándwich”. Se lava nuevamente y luego se agrega estreptavidina unida a la enzima peroxidasa HRP (*horseradish peroxidase*) y su sustrato (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; TMB) para llevar a cabo la reacción enzimática de revelado del ensayo. El producto de reacción se cuantifica por lectura de su absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro-lector de placas (*Multi-mode Microplate Reader- Synergy HT*, Biotek) y su software asociado BioTek's Gen5. La concentración de insulina en cada muestra se calcula utilizando una curva estándar que se corre simultáneamente en cada ensayo.

III.5.3. Aislamiento de ARN y evaluación de su integridad.

Luego del aislamiento, los islotes pancreáticos se los lava en buffer PBS en presencia de los inhibidores de proteasas Benzamidina (100 mM), PMSF (100 mM) y aprotinina (4 µg).

Los islotes son suspendidos en 1 ml de Trizol (Invitrogen, EEUU) en tubos estériles y luego se los hace pasar aproximadamente 200 veces por jeringa para favorecer la completa disgregación del tejido y la lisis celular de manera mecánica. A continuación, se mezclan con 200 µl de cloroformo y se centrifuga (12000 rpm, 15 min a 4°C). Se separa la fase acuosa superior que contiene el ARN y ésta se centrifuga (12000 rpm, 10 min a 4°C) con el agregado de 500 µl de isopropanol. El pellet obtenido se lava con 1 ml de etanol 75% y se centrifuga (7600 rpm, 5 min a 4°C). Finalmente, se deja secar el pellet a temperatura ambiente y se resuspende en 30 µl de agua DEPC (tratada con dietilpirocarbonato).

La concentración final de RNA se midió mediante cuantificación directa de su absorbancia a 260 nm en el equipo anteriormente mencionado. La posible contaminación con proteínas se controló midiendo la relación de absorbancia 260/280 nm. La integridad del ARN se controló mediante electroforesis en gel de agarosa-formaldehído al 1%, verificando la presencia de las bandas características de ARNr 28s y 18s. En la [Figura III.5](#). Se muestra un ejemplo de los ARNs aislados en cada grupo de animales sacrificados a los 70 días.

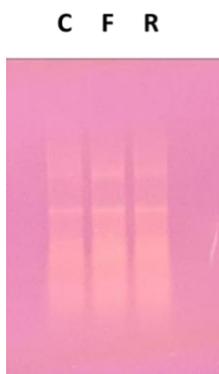


Figura III.5. Corrida electroforética de ARN en gel desnaturalizante. Se sembró 1 μg de RNA perteneciente a cada grupo (C, F y R).

III.5.4. Obtención de ADN complementario (ADNc) por retrotranscripción y evaluación de su eficacia.

Se realizó la retrotranscripción (RT) a partir de 1 μg de ARN total extraído de los grupos experimentales C, F y R. Para esto se utilizó la enzima transcriptasa reversa SuperScript III en una concentración de 200 U/ μl (Invitrogen, EEUU). Se realizó un control negativo sin el agregado de la enzima.

La eficacia de la RT de cada ADNc obtenido fue evaluada previamente a su utilización en determinaciones de expresión de genes específicos a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para β -actina utilizando la enzima Platinum Taq DNA Polymerasa (Invitrogen, EEUU). La visualización de la correspondiente banda se efectuó corriendo el producto de la reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se observa en la [Figura III.6](#).

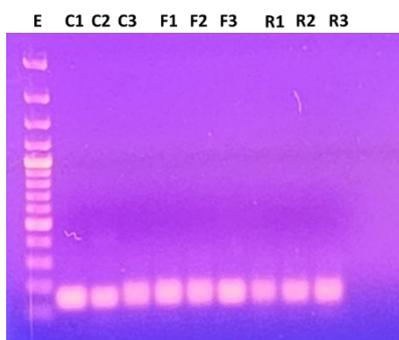


Figura III.6. Electroforesis de ADN en gel de agarosa. Se muestra una corrida electroforética a manera de ejemplo en la que se observan las bandas del amplicón de β -actina de 3 réplicas biológicas de ADNc obtenido de islotes de ratas provenientes de cada grupo experimental (C, F y R).

Capítulo III: Materiales y Métodos.

III.5.5 PCR en tiempo real (qPCR).

III.5.5.A. Obtención de *primers*.

Los *primers* empleados en esta técnica (Tabla III.1) se diseñaron usando las secuencias de referencia presentes en la base de datos de GenBank y el accesorio del software Lasergene que se denomina Primer Select. Una vez diseñados se utilizó la herramienta Blast, presente en la base de datos Pubmed, con el fin de comprobar que *primers* sólo amplificarían específicamente la región deseada. Se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

- Longitud del amplicón entre 100 y 200 pares de bases.
- Longitud de los *primers* entre 17 y 21 bases.
- Temperatura de *annealing* entre los 55° y 60°C.
- Porcentaje de G-C entre 45 y 55%.
- Alta estabilidad del extremo 3´.
- Evitar la formación de horquillas, homo y heterodímeros (no más de 3 nucleótidos iguales consecutivos).

Tabla III.1 Secuencias de los *primers* utilizados para las qPCRs.

Gen	Secuencias
β-Actina	Fw: 5´ AGAGGGAAATCGTGCGTGAC 3´
	Rv: 5´ CGATAGTGATGACCTGACCGT 3´
Insulina	Fw: 5´ TGTGGTTCTCACTTGGTGGGA 3´
	Rv: 5´ CAGTGCCAAGGTCTGAAGGT 3´
RI	Fw: 5´ ATATTGACCCGCCCCAGAGG 3´
	Rv: 5´ TAGGTCCGGCGTTCATCAGA 3´
Irs-1	Fw: 5´ TGTGCCAAGCAACAAGAAAG 3´
	Rv: 5´ ACGGTTTCAGAGCAGAGGAA 3´
Irs-2	Fw: 5´ CTACCCACTGAGCCCAAGAG 3´
	Rv: 5´ CCAGGGATGAAGCAGGACTA 3´
Pi3k	Fw: 5´ TGCCCCATTTATCCTTGTG 3´
	Rv: 5´ GGTTGTTGTTGCCCCAGAC 3´
Akt	Fw: 5´ GGACCACCGCCATTCAGAC 3´
	Rv: 5´ GGTGCCCTTGCCCAGTAG 3´
Pdx-1	Fw: 5´ GGCTTAACCTAAACGCCACA 3´
	Rv: 5´ GGGACCGCTCAAGTTTGTA 3´
Ck19	Fw: 5´ AGTAACGTGCGTGCTGACAC 3´
	Rv: 5´ AGTCGCACTGGTAGCAAGGT 3´
Caspasa 8	Fw: 5´ TAAAAAGCAGCCCAGAGGAA 3´
	Rv: 5´ ATCAAGCAGGCTCGAGTTGT 3´
Caspasa 9	Fw: 5´ CCAGATGCTGTCCCATACC 3´
	Rv: 5´ ATTGGCGACCCTGAGAAG 3´

Capítulo III: Materiales y Métodos.

Gen	Secuencias
Caspasa 3	Fw: 5' AGCTGGACTGCGGTATTGAGA 3'
	Rv: 5' AACCATGACCCGTCCTTGAA 3'
Bax	Fw: 5' CGAGCTGATCAGAACCATCA 3'
	Rv: 5' CTCAGCCCATCTTCTTCCAG 3'
Bcl-2	Fw: 5' CGGGAGAACAGGGTATGA 3'
	Rv: 5' CAGGCTGGAAGGAGAAGAT 3'
Bad	Fw: 5' CAGGCAGCAATAACAGTCA 3'
	Rv: 5' CCCTCAAATTCATCGCTCAT 3'
Ucp2	Fw: 5' GGCTGGCGGTGGTCGGAGATAC 3'
	Rv: 5' CATTTCGGGCAACATTGGGAGAGG 3'
Sirt1	Fw: 5' CCTGTGGGATACCTGAC 3'
	Rv: 5' AGAGATGGCTGGAAGT 3'
Ppary	Fw: 5' GCGAGGGCGATCTTGACAG 3'
	Rv: 5' GATGGCCACCTCTTTGCTCT 3'
Sod2	Fw: 5' ACCGAGGAGAAGTACCACGA 3'
	Rv: 5' TAGGGCTCAGGTTTGTCCAG 3'
Catalasa	Fw: 5' CCTCAGAAACCCGATGTCCTG 3'
	Rv: 5' GTCAAAGTGTCCATCTCGTCG 3'
Jak2	Fw: 5' TCCGTGATCTGAACAGCCTG 3'
	Rv: 5' ACATCTCCACACTCCCAAAG 3'
ObRb	Fw: 5' CTGCCCCACTGAAAGACA 3'
	Rv: 5' GGGCTGCAGTGACATTAGAG 3'
Stat3	Fw: 5' CTGACATTCCCAAGGAGGAG 3'
	Rv: 5' GGCAGTCAATGGTATTGCT 3'
Stat5b	Fw: 5' TCCTGAACAAGTCTGCGTC 3'
	Rv: 5' TCTCTCCGTGACCGACTCT 3'
Socs2	Fw: 5' TAAGCAGTTTGACAGCGTGG 3'
	Rv: 5' AATGCTGAGTCGGCAGAAGT 3'
Hifa	Fw: 5' AGCCGGGGGAGGACGATGAA 3'
	Rv: 5' CACTGCGGCTGGTTAC 3'
Vegfa	Fw: 5' GCTTTACTGCTGTACCTCCAC 3'
	Rv: 5' CAGGACGGCTTGAAGATATAC 3'
Vegfar2	Fw: 5' AGCGCTGTGAACGCTTGCCT 3'
	Rv: 5' GCTCGGTGCTCGCTGTGTGT 3'
Nd1	Fw: 5' AGCATCCTACCCCGTTTTTC 3'
	Rv: 5' TGCTAGGAAAATTGGCAGGGA 3'
Nd2	Fw: 5' TAGCCCCCTTCCACTACTGA 3'
	Rv: 5' TGGGTCTGGTTAAGTCTCCT 3'
Atp6	Fw: 5' GCCTCTTTCATTACCCCAACA 3'
	Rv: 5' TCGGTTGCTGATTAGGCGTT 3'
Uxs1	Fw: 5' GCAAACTGATGCTGGGGTG 3'
	Rv: 5' GCAGGCTGGGTTTAGGGAT 3'

III.5.5.B. qPCR.

Se utilizó Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, EEUU) y SYBG Green como fluoróforo. La reacción se corrió en un equipo Mini Opticon real-time PCR detection

Capítulo III: Materiales y Métodos.

system (Bio-Rad Laboratories, EEUU). Para la cuantificación se utilizó el método $\Delta\Delta C_t$ y se optó por β -actina como patrón interno. Se consideró la eficiencia máxima de los *primers*.

III.5.6. Obtención de proteínas insulares y posterior identificación y cuantificación de proteínas específicas por Wb.

Sonicamos los islotes en 3 ciclos de 5 seg en buffer Tris-HCl 1M pH 6,8 (Tritón 1%, EDTA 5mM, PMSF 100 mM y aprotinina 4 μ g) y cuantificamos la proteína total presente en el homogenado empleando el reactivo Biorad protein assay (BioRad, EEUU) en un espectrofotómetro Shimadzu (213). Las muestras se conservaron a -80°C .

Las proteínas se desnaturalizaron en buffer Laemmli y β -mercaptoetanol (en relación 1:1) y calentaron a 95°C durante 10 min. La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida con SDS utilizando un equipo Mini Protean 3 Cell (BioRad, EEUU) en el que sembramos hasta 40 μ g de proteínas totales. El porcentaje de acrilamida del gel fue del 10% (Tris-HCl 1M pH 8,8, SDS 10%, Persulfato de amonio 0,2% y TEMED 0,2%) y se empleó el Precision Plus Protein standards (Biorad, EEUU) como estándar de PM.

Las proteínas resueltas se transfirieron del gel a una membrana de PVDF utilizando el sistema de transferencia semi-húmeda (10 V durante 30 min) y posteriormente, las membranas se incubaron con leche al 10% en buffer TBS para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos.

Las membranas se lavaron con TBS-Tween 0,05 % y se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (diluido en TBS-Tween al 0,1% y BSA 1%). Posteriormente las membranas se volvieron a lavar y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora. Se reveló con ECL prime, empleando el kit AmershamTM ECLTM Western blotting analysis system (GE Healthcare, UK). Las intensidades de las bandas obtenidas se cuantificaron con el escáner C-DiGitR Blot Scanner (LI-COR) y el software Image Studio Digits 3.1, utilizando β -actina como estándar interno.

Capítulo III: Materiales y Métodos.

En la [Tabla III.2](#) se detallan el PM (Kda) de la proteína a detectar, la cantidad de proteína sembrada (μg proteína), los anticuerpos empleados, las diluciones utilizadas, tiempos de incubación (t) en minutos (m) u horas (h) y el tipo de revelado para cada proteína en particular.

Tabla III.2. Especificaciones de los anticuerpos utilizados en los Wbs efectuados.

Proteína	PM	μg	% del gel	Anticuerpo primario	t (h)	Anticuerpo secundario	t (min)	R
β-Actina	42	40	10	Anti β -Actina 1:10000	18	Anti ratón 1:20000 IgG-HRP	60	ECL
RI	95	40	10	Anti RI 1:100	18	Anti conejo 1:20000 IgG-HRP	60	ECL
Caspasa 3	17	40	10	Anti Caspasa 3 1:1000	18	Anti conejo 1:20000 IgG-HRP	60	ECL
Bcl-2	26	40	10	Anti Bcl-2 1:200	18	Anti conejo 1:20000 IgG-HRP	60	ECL
Bad	25	40	10	Anti Bad 1:50	18	Anti ratón 1:20000 IgG-HRP	60	ECL
SOD2	23	40	10	Anti SOD2 1:100	18	Anti conejo 1:20000 IgG-HRP	60	ECL
Catalasa	55	40	10	Anti Catalasa 1:1000	18	Anti conejo 1:20000 IgG-HRP	60	ECL

III.5.7. Aislamiento del ADN.

El aislamiento de ADN se llevó a cabo para islotes y leucocitos utilizando el Kit EasyPure Genomic DNA (Tansgene, Francia). La principal diferencia en el tratamiento de ambas muestras radicó en la cantidad del material de partida; en el caso de los islotes, se utilizaron entre 800 y 1000 islotes aislados en el mismo día, mientras que, en el caso de la sangre, se partió de 250 μl que podían haber sido extraídos el mismo día o haber estado congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El primer paso de la extracción consistió en incubar la mezcla del material biológico (islotes o leucocitos) con 100 μl de buffer de lisis y 10 μl de proteinasa K durante 30

Capítulo III: Materiales y Métodos.

min a 56°. En el caso de los islotes, se requirió la disrupción mecánica del tejido con una jeringa. Luego se agregaron 500 µl de buffer de unión y se incubó 10 min a temperatura ambiente, para luego transferirla a una columna de extracción. Se centrifugó a 12000 G durante 30 seg y se lavó la columna. El ADN retenido se eluyó con agua DEPC precalentada a 65°C y una centrifugación durante 1 min a 12000 G. Las muestras fueron conservadas a -80°C.

Capítulo III: Materiales y Métodos.

III.6. Análisis estadístico.

Todos los parámetros relevados se almacenaron en una base de datos confeccionada para su análisis.

Análisis estadístico descriptivo

Los datos de variables continuas numéricas se expresaron como la media \pm el error estándar de la media, mientras que los datos de variables categóricas se expresaron como proporciones o porcentajes.

Análisis estadístico inferencial

El análisis estadístico inferencial varió según el capítulo y el tipo de datos:

Capítulo IV: después de realizar el test de normalidad de datos (Shapiro-Wilk), se aplicó el Test-t Student para comparar las medias de dos grupos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0,05$.

Capítulos V, VI y VII: se realizó el Test ANOVA para comparar las medias de más de dos grupos independientes. Posteriormente, se verificó la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene. En función del resultado, se aplicaron las pruebas post hoc de Tukey (cuando se cumplía la igualdad de varianzas) o Tamhane (cuando no se cumplía la igualdad de varianzas). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0,05$.

Capítulos VIII y IX: se empleó el Test de Regresión Logística teniendo en cuenta secuencias cuya cobertura > 10 . Se consideró una CpG como DM cuando la diferencia de metilación $> |5|$ y $q < 0,05$.

III.7. Secuenciamiento masivo del metiloma y análisis bioinformático.

III.7.1. Muestras enviadas a secuenciar

Enviamos a la empresa Novogene (EEUU) tres 3 réplicas biológicas por grupo de islotes y 3 de sangre (C1, C2, C3, F1, F2, F3, R1, R2 y R3) para llevar a cabo el secuenciamiento del genoma completo con tratamiento previo con bisulfito (WGBS). Con el propósito de asegurar la calidad de las muestras enviadas, la cantidad total de ADN en cada una no podía ser inferior a 2,5 µg y debía estar diluido a una concentración mínima de 20 ng/µl en un volumen de 20 µl.

La verificación de la concentración y la evaluación de la contaminación (mediante la relación 260/280) se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro, mientras que la integridad del ADN se confirmó mediante análisis de electroforesis en gel de agarosa (Figura III.7).

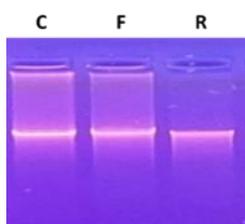


Figura III.7. Electroforesis de ADN en gel de agarosa. Se muestran 3 bandas correspondiente a muestras de ADN extraídas de islotes pancreáticos pertenecientes a animales de los grupos C, F y R.

En una primera instancia, Novogene informó que varias muestras de sangre y una de las muestras de islotes no cumplieron con los estándares de control de calidad, debido a la presencia de ADN levemente degradado, impurezas y contaminación por ARN. La Figura III.8 exhibe los resultados de la electroforesis realizada en las 18 muestras.

Capítulo III: Materiales y Métodos.

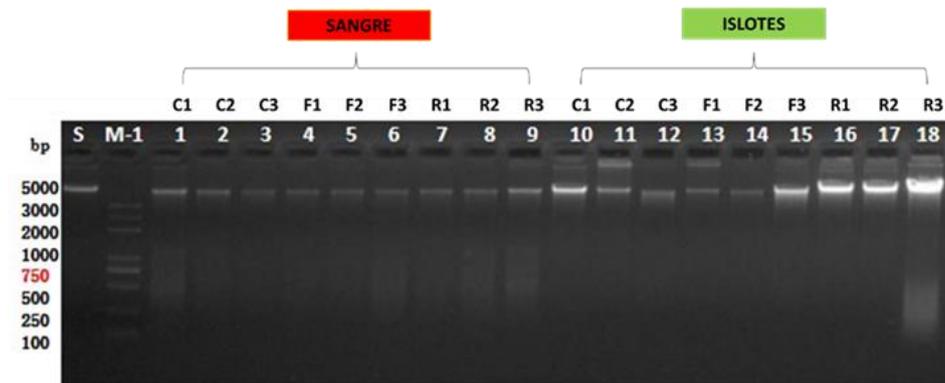


Figura III.8. Electroforesis de ADN extraído de sangre periférica (calles 1 a 9) e islotes (calles 10 a 18) pertenecientes a los grupos C, F y R. Se muestran 3 réplicas biológicas para cada tejido. S: muestra estándar, M-1: DNA Ladder (Trans 2k plus). Se sembraron 50 ng de ADN por muestra.

Para abordar este problema, se llevó a cabo una purificación de las muestras que no pasaron el control de calidad utilizando partículas magnéticas, lo cual resultó ser un procedimiento eficaz. A continuación, se presenta la imagen del gel de electroforesis efectuado luego del paso de purificación (Figura III.9).

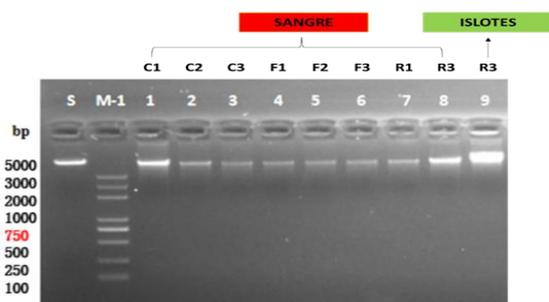


Figura III.9. Electroforesis de ADN de las muestras post purificación con beads magnéticas. 8 muestras de sangre (calle 1 a 8) y 1 muestra de islotes (calle 9). S: muestra estándar, M-1: DNA Ladder (Trans 2k plus). Se sembraron 50 ng de DNA por muestra.

III.7.2. Secuenciación NovaSeq PE 150.

III.7.2.A. Características de la secuenciación.

Se empleó la plataforma NovaSeq PE 150 para llevar a cabo el secuenciamiento de genoma completo con bisulfito. Este enfoque de secuenciación, desarrollado por Illumina, se encuadra en la categoría de secuenciación de nueva generación, que hace uso de tecnologías de alto rendimiento.

Capítulo III: Materiales y Métodos.

En términos generales, el proceso de secuenciación masiva comienza con la generación de bibliotecas de ADN. Para ello, se fragmenta el ADN genómico, enriquecido con ADN lambda, en un rango de 200 a 400 pares de bases (pb) y se somete a tratamiento con bisulfito, lo que da como resultado la formación de ADN monocatenario. Posteriormente, se lleva a cabo la ligación de adaptadores específicos y la síntesis de ADN de doble hebra mediante amplificación por PCR sobre un soporte sólido. A continuación, los fragmentos unidos se someten al proceso de secuenciación propiamente dicho, que implica ciclos de incorporación de nucleótidos. En cada ciclo, se incorpora un nucleótido marcado con fluorescencia a la cadena en crecimiento, se detecta la señal y se registra. En el caso de NovaSeq PE150, las moléculas de ADN se secuencian desde ambos extremos (*paired-end*), generando lecturas de 150 pb (214).

Durante el tratamiento con bisulfito, las citosinas se desaminan, transformándose en uracilo, mientras que las citosinas que se encontraban metiladas no pueden ser convertidas y permanecen inalteradas. De esta manera, la comparación entre la secuenciación estándar y la secuenciación posterior al tratamiento con bisulfito permite la identificación de las citosinas metiladas y no metiladas, desentrañando así su estado de metilación (Figura III.10) (201).

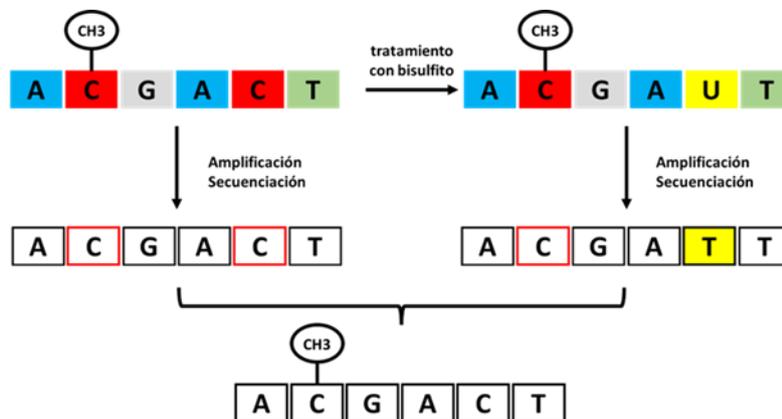


Figura III.10. Esquema donde se compara la secuenciación simple con la de bisulfito para desenmascarar citosinas metiladas y no metiladas. La comparación entre el secuenciamiento del genoma nativo vs el genoma tratado con bisulfito permite determinar las citosinas que se encuentran metiladas.

Capítulo III: Materiales y Métodos.

III.7.2.B. Controles de calidad.

Después de completar el proceso de secuenciación, se lleva a cabo un riguroso control de calidad de las lecturas resultantes. En este procedimiento, se emplea la escala de calidad Phred, la cual asigna un valor de calidad a cada base presente en la secuencia, indicando la probabilidad de que dicha base sea errónea. Estos valores de calidad se calculan utilizando la siguiente fórmula:

$$Phred = -10 \log_{10}(p)$$

En la fórmula, "p" representa la probabilidad de la base informada sea incorrecta. Se estableció un umbral de calidad de garantizando así que la gran mayoría de las lecturas cumplan con estándares de alta calidad. Como resultado, se generaron millones de lecturas en formato FASTQ, un archivo de texto que almacena tanto las secuencias como la información de calidad asociada a cada base.

III.7.2.C. Análisis de los datos de la secuenciación.

Para analizar los datos de secuenciación, se emplearon diversas herramientas bioinformáticas con el fin de identificar las regiones CpGs DM correspondientes a cada grupo utilizando los archivos FASTQ proporcionados por Novogene.

El **primer paso** del análisis involucró el control de calidad y el procesamiento de las secuencias, que incluyó la eliminación de adaptadores (que se habían añadido durante la creación de las bibliotecas) y de las lecturas de baja calidad. Para llevar a cabo esta tarea, se utilizó la herramienta Rfastp del paquete Bioconductor, lo que resultó en la obtención de archivos FASTQ procesados.

El **segundo paso** comprendió el alineamiento y la determinación del nivel de metilación. En este proceso, los archivos FASTQ se alinearon con el genoma de referencia de rata (versión rn6), utilizando el alineador de lectura Bowtie 2. Durante esta etapa, se eliminaron las lecturas que mapeaban exactamente al mismo lugar (proceso de "deduplicación de lecturas") y se realizó la extracción de sitios metilados. Cabe destacar que se excluyeron las primeras 5 bases de cada lectura en la dirección inversa debido al sesgo de metilación, un efecto secundario que surge durante la preparación de las bibliotecas y que resulta en la adición de citosinas no metiladas.

Capítulo III: Materiales y Métodos.

Como resultado de este paso, se obtuvieron archivos de alineamiento y de extracción de sitios metilados.

El **tercer paso** se enfocó en la determinación de los sitios CpGs DM, utilizando el paquete Methylkit dentro de Bioconductor. Para identificar estos sitios, se aplicó una prueba de regresión logística y se consideraron únicamente aquellos con una cobertura superior a 10. Los valores de corte para clasificar un sitio CpG como diferencialmente metilado fueron: $\text{meth.diff} > |5|$ y $q\text{-value} < 0,05$. Esto condujo a la generación de archivos que contenían información sobre los sitios CpGs, la cobertura y la cantidad de citosinas y timinas en cada muestra.

El **cuarto paso** se centró en la anotación de genes. Para llevar a cabo esta tarea, se utilizó un archivo de la base de datos RefSeq en formato BED12, que proporciona información sobre las características estructurales de los genes en el genoma de la rata, así como el archivo que indicaba la ubicación de las CpGs diferencialmente metiladas. En este caso, se empleó la herramienta bioinformática Genomation, que forma parte de Methylkit. Se utilizaron criterios específicos para definir las regiones del ADN genómico: promotores, cuerpos de genes e intergénicas (Figura III.11.A), además de las islas CpGs, *Shores* y *Open Sea* (Figura III.11.B). Los criterios se basaron en la ubicación relativa a los genes y a las islas CpGs, con el objetivo de asignar a cada región su correspondiente anotación.

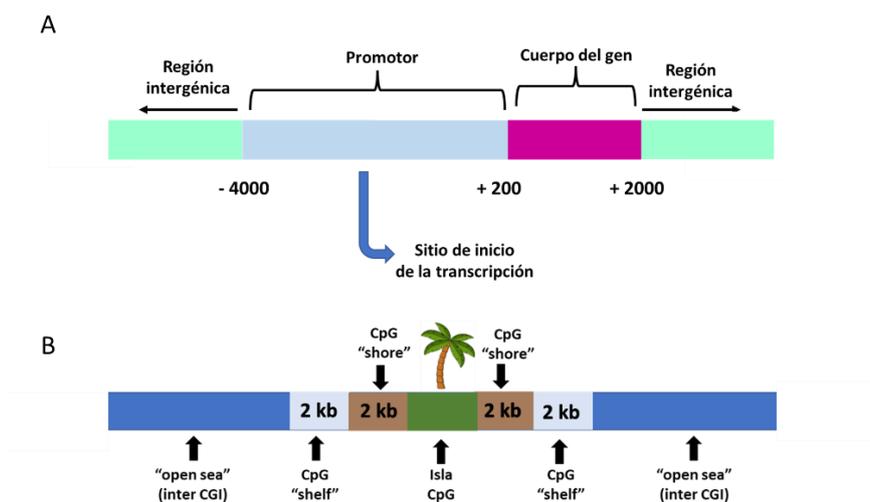


Figura III.11. Regiones del ADN genómico. A. El esquema resume los criterios adoptados para determinar las regiones del ADN genómico. Las regiones intergénicas son las que se encuentran $> + 2000$ pb y < -4000 pb; el promotor se encuentra entre -4000 y $+200$ pb, mientras que el cuerpo de gen entre $> + 200$ pb y $< + 2000$ pb. B. Esquema general de anotaciones CpG. Las denominadas isla CpG (CGI) se encuentran rodeadas a ambos lados por los *shores*, que tienen un tamaño

Capítulo III: Materiales y Métodos.

de 2 kb. A continuación de los *shores* se encuentran los denominados *CpG shelf* que también poseen un tamaño de 2 kb y a partir de estos está lo que se denomina *Open Sea* o inter CGI.

En el caso particular de que los sitios DM estuvieran situados en el cromosoma mitocondrial, se categorizaron teniendo en cuenta las características particulares de su estructura mencionadas en la introducción. Según esto, consideramos la región promotora como la comprendida dentro del *D-loop* entre las posiciones de los nucleótidos 15416 y 16313. Todas las demás metilaciones fueron consideradas como ubicadas dentro del cuerpo del gen correspondiente a su ubicación (Figura III.12). Por otro lado, todas las CpG DM ubicadas dentro de este cromosoma se consideraron ubicadas en regiones *Open sea*.

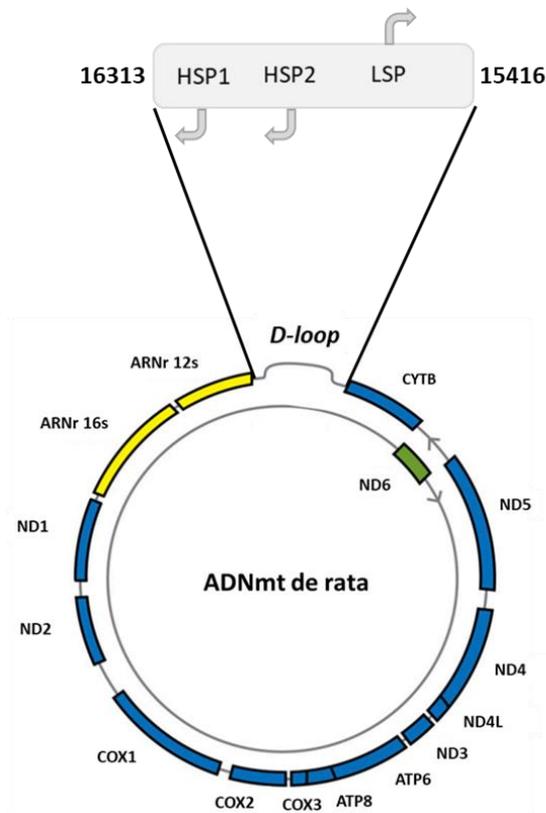


Figura III.12. Criterios adoptados para diferenciar las regiones del ADNmt de rata. El esquema muestra la ubicación de la región *D-loop* (formada por los 3 promotores, HSP1, HSP2 y LSP que se muestran en la región ampliada y coloreada en gris), de los cuerpos de los 13 genes que codifican ARNm (en azul los ubicados en la cadena pesada y en verde el ND6, único gen de ARNm ubicado en la cadena liviana) y de los cuerpos de los genes que codifican los ARNr 16s y 12s (en amarillo). En el esquema se omitió la ubicación de los ARNt. Las secuencias metiladas que se ubiquen en la región *D-loop* (en posición 15416-16313 pb) serán consideradas como pertenecientes a la región promotora, mientras que cualquier otra ubicación será considerada como perteneciente al cuerpo del gen, dependiendo de la ubicación particular. Adaptada de (215).

El **quinto paso** realizado fue el análisis de enriquecimiento funcional de los genes asociados a las CpGs DM. Esto nos permitió determinar las vías de señalización y funciones biológicas enriquecidas en los genes de interés. Para esto se utilizó la herramienta web Enrichr y, dentro de ésta, la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Capítulos IV a IX

Resultados y Discusiones

Capítulo IV

**Validación del modelo basado en DRF por
21 días para generar alteraciones
plurimetabólicas semejantes a la PD
humana.**

Capítulo IV: Validación del modelo PD.

IV.1. Resultados

En este capítulo se analizarán los grupos C21 y F21 (detallados anteriormente) con el objetivo de validar el modelo de DRF por 21 días como inductora de PD.

IV.1.A. Parámetros dietarios.

Al comparar el comportamiento alimenticio de las ratas de ambos grupos observamos que las del grupo F21 consumieron diariamente un volumen significativamente mayor de bebida que las del C, y en paralelo, disminuyeron significativamente la cantidad de comida sólida ingerida a manera de compensación espontánea ($p < 0,05$), tal como se puede observar en la [Figura IV.1 A y B](#).

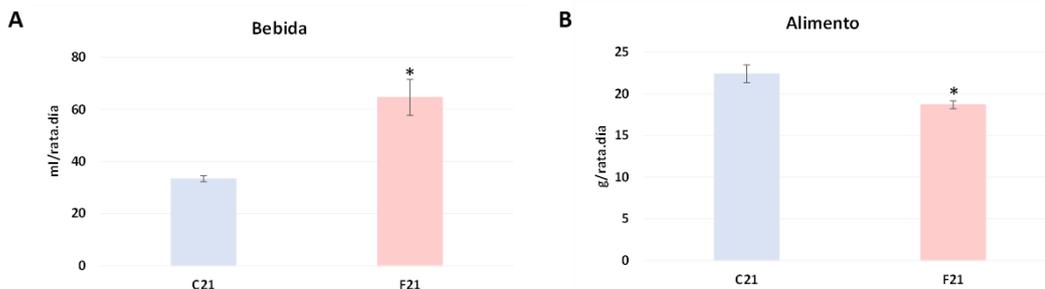


Figura IV.1. Parámetros dietarios de ratas sacrificadas a los 21 días. En color celeste se representan los datos de las ratas del grupo C21 y en rosa los de las ratas del grupo F21. Cada valor representa la media \pm EEM de los 10 animales que integran cada grupo experimental. * $p < 0,05$ con respecto a C21. **A)** Cantidad de bebida ingerida diariamente por los animales de ambos grupos experimentales. Los resultados se expresan en ml/rata.día. **B)** Cantidad de alimento sólido ingerido diariamente por cada animal expresado en g/rata.día.

Para la realización de los cálculos de nutrientes y calorías ingeridas se tuvo en consideración lo explicado en la sección de Materiales y Métodos (Capítulo III) con respecto a la composición del alimento sólido. En cuanto a los nutrientes ingeridos, los animales del grupo F21 consumieron significativamente más que los controles ($p < 0,05$), tal como se observa en la [Figura IV.2](#). Debido al consumo extra de fructosa en la bebida de las ratas del grupo F21, la distribución de los diferentes nutrientes (hidratos de carbono, proteínas y lípidos) fue muy diferente entre ambos grupos.

Capítulo IV: Validación del modelo PD.

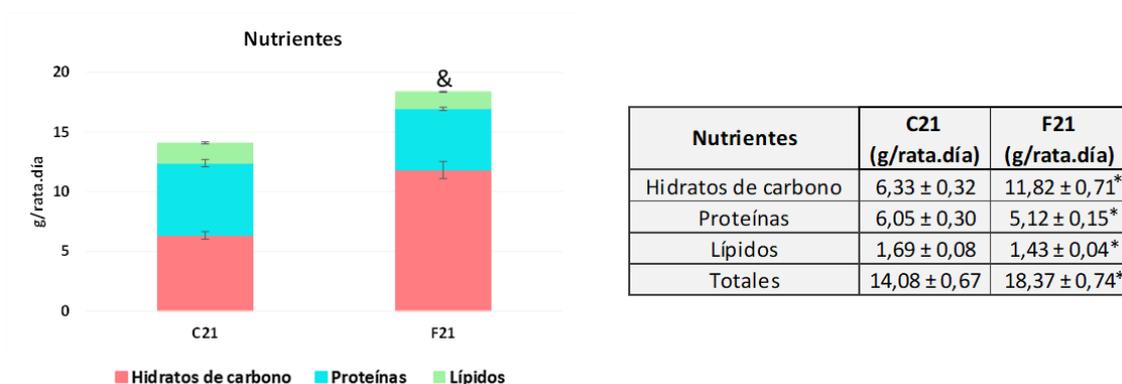


Figura IV.2. Consumo de nutrientes Se grafica el consumo neto e individual de los diferentes nutrientes: hidratos de carbono (sector inferior de la barra, color rosa), proteínas (sector central de la barra, color celeste) y lípidos (sector superior de la barra, color verde) ingeridos diariamente por ratas de ambos grupos (C21 y F21) expresados en g/rata.día. &p<0,05 respecto de C21. La Tabla de la derecha resume los valores numéricos representados en el gráfico de barras apiladas. Cada valor representa la media ± EEM de los 10 animales que integran cada grupo experimental. *p<0,05 respecto a C21.

Este cambio cuali/cuantitativo de nutrientes se vio reflejado en el total de calorías ingeridas. Observamos que la compensación espontánea que realizaron las ratas F21 resultó parcial, ya que el aporte calórico extra proporcionado por la bebida edulcorada con fructosa provocó que la dieta resultase hipercalórica con respecto a la consumida por los animales del grupo C21 (Figura IV.3).

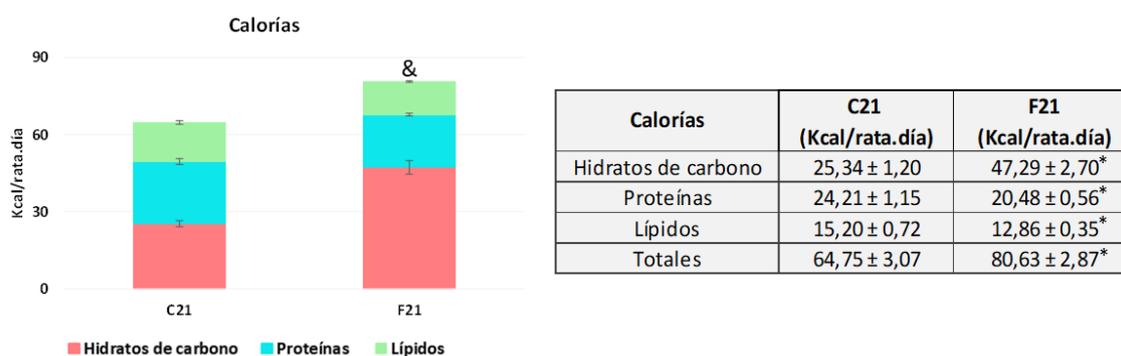


Figura IV.3. Consumo calórico diario Se grafica el consumo diario ingerido por las ratas de ambos grupos experimentales (C21 y F21) expresado en Kcal/rata.día y aporte individual de los hidratos de carbono (sector inferior de la barra, color rosa), proteínas (sector central de la barra, color celeste) y lípidos (sector superior de la barra, color verde). &p<0,05 respecto de C21. La Tabla de la derecha resume los valores numéricos representados en el gráfico de barras apiladas. Cada valor representa la media ± EEM de los 10 animales que integran cada grupo experimental. *p<0,05 respecto a C21.

Capítulo IV: Validación del modelo PD.

IV.1.B. Parámetros de crecimiento.

A pesar de que la dieta del grupo F21 fue hipercalórica, este cambio en las calorías ingeridas no resultó suficiente como para repercutir en la tasa de crecimiento corporal, no observándose diferencias significativas en la cantidad de gramos diarios de crecimiento corporal registrado en las ratas de ambos grupos experimentales, ni en la curva de evolución del peso corporal (Figura IV.4 A y B).

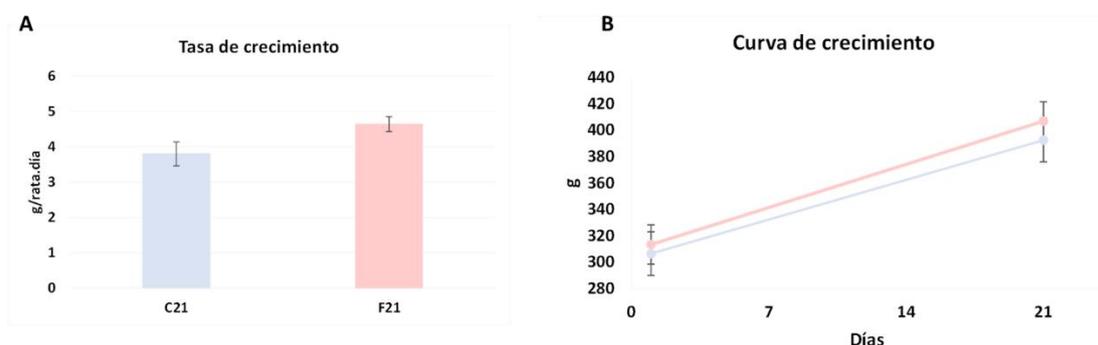


Figura IV.4. Parámetros de crecimiento corporal de ratas sacrificadas a los 21 días. En color celeste se representan los datos de las ratas del grupo C21 y en rosa los de las ratas del grupo F21. Cada valor representa la media \pm EEM de los 10 animales que integran cada grupo experimental. * $p < 0,05$ con respecto a C21. **A)** Tasa de crecimiento expresada en g/rata.día. **B)** Curva de evolución del peso corporal de cada animal expresada en g a lo largo del período de tratamiento.

IV.1.C. Metabolismo glucémico.

La glucemia de los animales al final del período de seguimiento la registramos tanto sin ayuno previo (determinaciones de “glucemia al azar”) como con ayuno nocturno (las ratas de ambos grupos pasaron la noche con libre acceso a agua corriente pero privadas de alimento sólido y de fructosa). Como se aprecia en la Figura IV.5 A y B, no se registraron diferencias significativas entre los grupos C21 y F21 tanto en los valores de glucemia al azar como en los de glucemia en ayunas. Sin embargo, al evaluar la tolerancia a la glucosa a través de la PTGip, observamos diferencias significativas ($p < 0,05$) en el grupo F21 respecto del C21 a los 30 y 60 minutos luego de la sobrecarga de glucosa. Esto se pudo corroborar al calcular el área bajo la curva que resultó significativamente mayor en las ratas tratadas con fructosa (área total C21 vs F21: $319,57 \pm 36,13$ vs $584,81 \pm 65,83$ UA; $p < 0,05$; Figura IV.5 C1 y C2).

Capítulo IV: Validación del modelo PD.

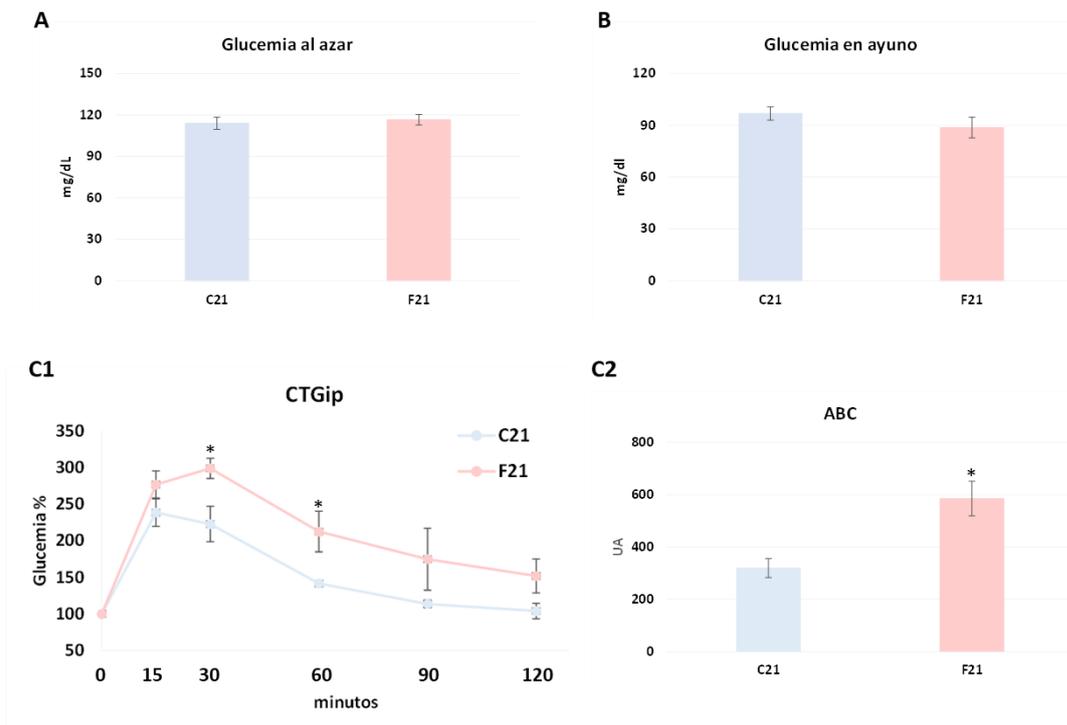


Figura IV.5. Metabolismo glucémico de ratas sacrificadas a los 21 días. En color celeste se representan los datos de las ratas del grupo C21 y en rosa los de las ratas del grupo F21. **A)** Glucemia al azar (mg/dl) **B)** Glucemia en ayuno (mg/dl) **C1)** Curva registrada en la PTGip (CTGip), se grafica la evolución de la glucemia a lo largo de los 120 minutos posteriores a la carga de glucosa **C2)** Área bajo la CTGip (ABC) expresada en unidades arbitrarias. Para los paneles A y B cada valor representa la media \pm EEM de los 10 animales que integran cada grupo experimental. Para los paneles C1 y C2 cada valor representa la media \pm EEM de los 5 animales que integran cada grupo experimental. * $p < 0,05$ respecto a C21.

IV.1.D. SIEG en islotes aislados.

La secreción de insulina en respuesta a una concentración basal de glucosa (glucosa 3,3 mM) por parte de islotes aislados incubados durante 60 minutos no mostró diferencias entre grupos. Sin embargo, los islotes aislados de los animales del grupo F21 secretaron más insulina que los provenientes del grupo C21 en respuesta a altas concentraciones de glucosa como es 16,7 mM (C21 vs F21: $11,38 \pm 2,85$ vs $22,3 \pm 2,22$ ng insulina/hora.islote; $p < 0, 05$; [Figura IV.6](#)).

Capítulo IV: Validación del modelo PD.

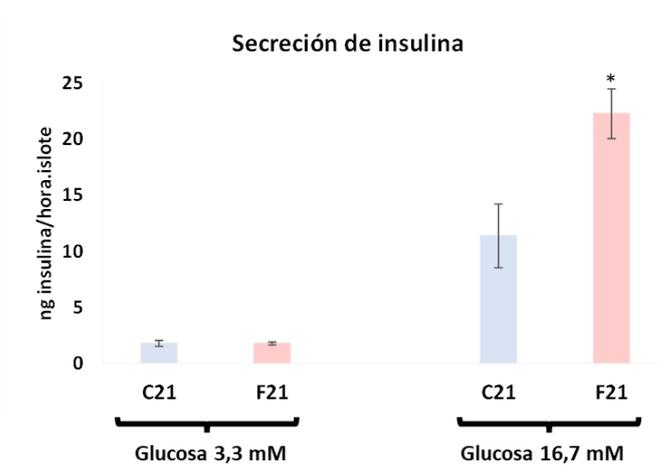


Figura IV.6. Secreción de insulina estimulada por glucosa. Los valores se expresan como ng insulina/hora.islote, y representan la media \pm EEM de 15 medidas independientes (tubos conteniendo 5 islotes cada uno) provenientes de 3 experimentos con islotes aislados de 6 ratas por cada grupo experimental. En celeste, C21 y en rosa, F21. * $p < 0,05$ respecto a C21 a la misma concentración de glucosa.

IV.1.E. Metabolismo lipídico.

El valor de TG plasmáticos registrado en los animales de grupo F21 no sólo fue significativamente mayor que el del grupo control, sino que llegó a duplicar su valor promedio (C21 vs F21: $95,65 \pm 8,54$ vs $187,70 \pm 18,60$ mg/dl; $p < 0,05$). Por otro lado, no encontramos diferencias significativas en los valores de colesterol total y de sus fracciones, col-HDL y col-NO-HDL (Figura IV.7 A y B). Adicionalmente, calculamos el índice IR y observamos que las ratas F21 presentaron valores significativamente mayores a los registrados en el grupo C21 ($p < 0,05$) (Figura IV.7C).

Capítulo IV: Validación del modelo PD.

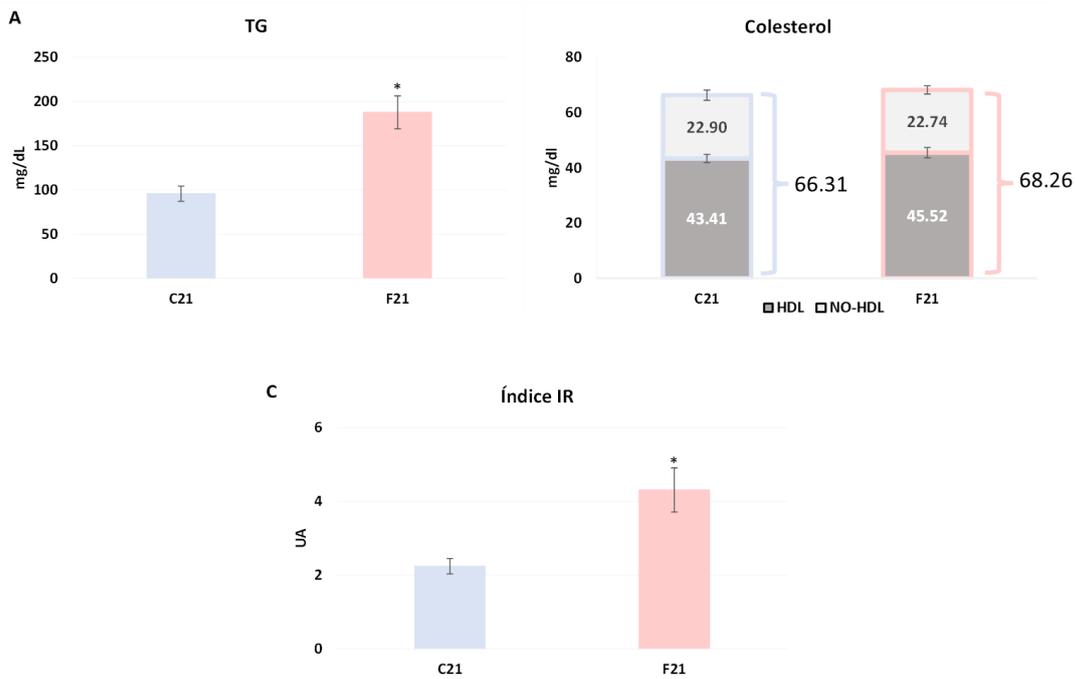


Figura IV.7. Metabolismo lipídico y cálculo del índice IR. En color celeste se representan los datos de las ratas del grupo C21 y en rosa los de las ratas del grupo F21. Cada valor representa la media \pm EEM de los 10 animales que integran cada grupo experimental. * $p < 0,05$ con respecto a C21. **A)** Gráfico de los valores de TG plasmáticos expresados como mg/dl **B)** Las barras apiladas representan los valores de colesterol total con sus dos fracciones, la fracción col-HDL (columna inferior, gris oscura) y col-NO-HDL (columna superior, gris clara) expresadas en mg/dl. **C)** Índice IR expresado en unidades arbitrarias (UA).

VI.1.F. TBARS.

Se evaluó el EO de manera indirecta, a través de la medida de peroxidación lipídica representada por los TBARS. Tal como se observa en la [Figura IV.8](#), no registramos diferencias significativas entre los grupos.

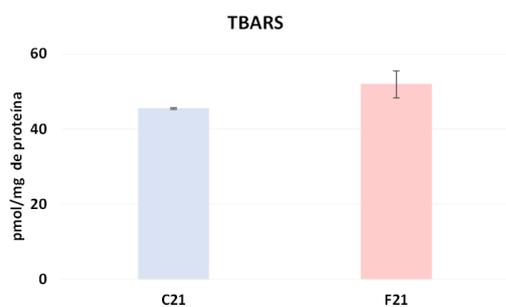


Figura IV.8. Peroxidación lipídica. Se representan las Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) para cada grupo experimental formado por 10 animales expresadas como pmol/mg de proteína. En celeste se representa al grupo C21 y en rosa al F21. Los resultados se expresan como la media \pm EEM en pmol/mg de proteína.

Capítulo IV: Validación del modelo PD.

VI.1.G. Apoptosis.

En relación con proceso de apoptosis, determinamos los niveles de dos de las proteínas claves que participan en el proceso de apoptosis: la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la fracción activa (clivada) de la Caspasa-3, proteasa efectora de ambas vías, extrínseca e intrínseca. A través de la técnica de Wb, observamos que en el homogenado de islotes provenientes de animales del grupo F21 se registró simultáneamente un descenso del nivel de la proteína Bcl-2 y un incremento de la forma activa de la Caspasa-3 (aunque no resultaron estadísticamente significativos), evidenciando que la apoptosis de células insulares estaría siendo estimulada en animales que recibieron la alimentación con una DRF (Figura IV.9).

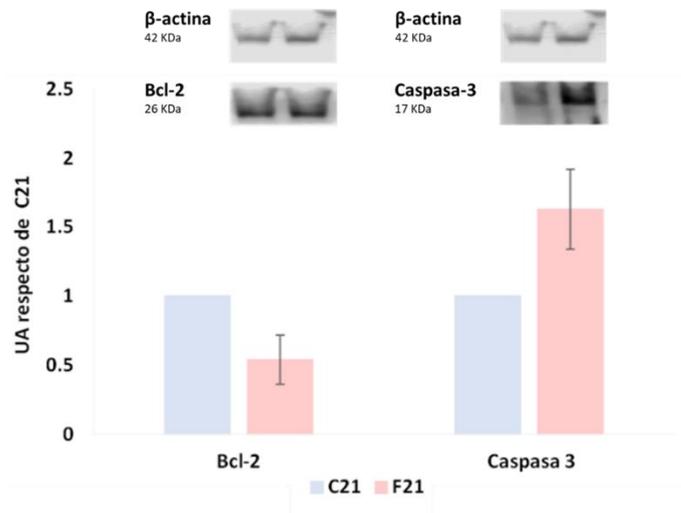


Figura IV.9. Wb de Bcl-2 y Caspasa-3. Se utilizaron homogenados de islotes aislados de animales de ambos grupos experimentales (C21 -celeste- y F21 -rosa-) Se muestran imágenes representativas de las bandas de las proteínas de interés (Bcl-2 y caspasa-3 activa) y del estándar interno (β -actina) en uno de los 3 Wbs realizados. El gráfico de barras representa la intensidad relativa de las bandas de Bcl-2 y Caspasa-3 respecto al estándar interno β -actina (unidades arbitrarias respecto al control). Cada valor representa la media \pm EEM de 3 experimentos independientes, utilizando 6 ratas por grupo. * $p < 0,05$ con respecto a C21.

Capítulo IV: Validación del modelo PD.

IV.2. Discusión y conclusiones.

IV.2.1. Discusión.

En este capítulo validamos el modelo murino que venimos utilizando en nuestro laboratorio que emula las alteraciones plurimetabólicas ocurridas en la PD humana con el fin de poder usarlo como base para luego desarrollar el modelo de reversión.

En este camino de validación y estandarización de los valores de los principales parámetros, encontramos que el grupo F21 consumió un volumen significativamente mayor de bebida que los del grupo C21 y, esto fue acompañado por una disminución del consumo del alimento sólido. Esto se debe, al menos en parte, a que, debido a su cambio en la palatabilidad, la solución edulcorada les resulta más atractiva para consumir que el agua. Este aumento del consumo de carbohidratos en la bebida generó un comportamiento de compensación espontánea donde disminuyeron el consumo de nutrientes provenientes del alimento sólido.

En relación con este punto, es sabido que los animales normalmente regulan su peso corporal de forma tal, que, si comen más de lo necesario, posteriormente ayunarán como mecanismo compensatorio (216). Sin embargo, la fructosa es uno de los pocos nutrientes que posee la capacidad de desencadenar respuestas similares a la inanición, induciendo tanto el hambre como la sed a través de un efecto de resistencia a la leptina, y de un efecto osmótico que provoca un desplazamiento de agua hacia la célula, respectivamente (217). Esto se debe a que la fructosa en el hígado se metaboliza a través de actividad de la enzima fructoquinasa de manera independiente de los mecanismos de retroalimentación negativa del metabolismo glucídico. El resultado neto es que la fructosa estimula la ingesta de alimentos y agua, aumenta los depósitos de energía (grasas y glucógeno), induce resistencia a la insulina (para proporcionar preferentemente glucosa al cerebro), aumenta la presión arterial, reduce las pérdidas de sodio, y disminuye las necesidades de oxígeno al reducir la actividad mitocondrial y depender más de la glucólisis. Por todo esto, la fructosa actúa como una señal de alarma que dispara una respuesta de búsqueda de alimento (218).

Capítulo IV: Validación del modelo PD.

En nuestro modelo se comprueban el efecto inductor de la sed y en el equilibrio entre la inducción del hambre propuesto por Johnson (217) y la compensación descrita por Keesey & Hirvonen (216) y, pareciese que prima este segundo efecto. A pesar de la existencia de esta compensación espontánea por parte de nuestros animales del grupo F21, ésta no tuvo una eficiencia del 100% y, por lo tanto, las dietas no resultaron isocalóricas, sino que hubo una cierta diferencia en las calorías ingeridas, siendo la dieta de F21 hipercalórica con respecto al control. A pesar de esto, no se evidenciaron cambios en la tasa de crecimiento.

La fructosa estimula los receptores del sabor dulce en la lengua y genera una respuesta de dopamina en el cuerpo estriado ventral del cerebro (219). El componente adictivo de la fructosa se relaciona con que disminuye los receptores de dopamina (específicamente el D2R) y esto genera un mecanismo para asegurar la búsqueda continua de alimento mediante la creación de un deseo adictivo de ingerir más (220). Además, la reducción en el receptor de dopamina se asocia con la reducción de la actividad cortical prefrontal y con el aumento de la impulsividad (221). Adicionalmente, el ácido úrico, producto del metabolismo de la fructosa, también aumenta en animales hambrientos, y dispara la respuesta de búsqueda de alimento que se asocia con un aumento en la actividad locomotora, exploratoria e impulsividad (222,223). En humanos también fue asociada con aumento en la impulsividad (222,224), desinhibición (225) y excitación (223). Según Choi (226), la administración de sacarosa a ratas preñadas resultó en un aumento de la impulsividad y actividad locomotora con una disminución en la expresión de los receptores D2R y D4R en el cuerpo estriado. En nuestros animales, si bien no realizamos ningún test de comportamiento, observamos que los pertenecientes al grupo F21 solían ser mucho más activos físicamente que los del grupo C21. Podríamos sospechar que una diferencia pequeña, aunque significativa, entre las calorías consumidas por ambos grupos en un período corto de tratamiento no generarían diferencias en los pesos corporales de animales tratados y controles producto de la hiperactividad desarrollada por los que consumieron la DRF.

Con respecto a la evaluación de la homeostasis glucémica, se realizaron diferentes medidas, en las cuales encontramos que las ratas de los grupos C21 y F21 no

Capítulo IV: Validación del modelo PD.

presentaron diferencias en glucemias al azar ni en ayunas, pero sí se evidenció su estado de PD ya que la realizarles una PTGip presentaron TGA, lo cual se puso de manifiesto en las diferencias significativas obtenidas en dos puntos de la curva de glucemia, pero mucho más evidentemente al calcular las áreas bajo la curva tal como ya había sido reportado previamente por nuestro grupo (227).

Las ratas del grupo F21 presentaron una marcada dislipemia, característica de la PD, generada a partir del dramático aumento de los TG. A pesar de que no presentaron diferencias significativas en el colesterol total ni en sus fracciones, el valor de TG influyó directamente en el cálculo del índice IR, cuyo valor duplicó al de las ratas controles, tal como ha sido reportado en reiteradas publicaciones del CENEXA (228-230).

El último factor clave de PD que presentó el grupo F21 fue la hiper-respuesta secretora de insulina ante el estímulo de glucosa, como mecanismo compensatorio parcial de las células β que se encuentran hiperfuncionando para enfrentar a la IR. Esta adaptación de las células pancreáticas también se ha encontrado en ratas Wistar alimentadas con DRS (230).

En concordancia con lo establecido en diferentes trabajos realizados con animales (231) como con humanos (232), encontramos que los TBARS se vieron aumentados en el grupo F21 con respecto al C21, aunque en nuestro caso, este aumento no fue de significancia estadística.

Por último, la evaluación de los niveles proteicos de factores claves en el desarrollo de apoptosis como son las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y la caspasa efectora de ambas vías apoptóticas (Caspasa-3) mostraron que la tendencia de los islotes pertenecientes a animales del grupo sometido a la dieta fructosada fue pro-apoptótica, evidenciando un aumento (no significativo) de Caspasa-3 y la disminución de Bcl-2. Los resultados fueron concordantes con lo encontrado en anteriores trabajos publicados por nuestro grupo y es una característica del modelo PD la disminución de la masa de los islotes pancreático (233).

Capítulo IV: Validación del modelo PD.

IV.2.2. Conclusiones.

Las ratas SD alimentadas con una DRF por 21 días generan un desbalance metabólico similar a la PD humana, con presencia de TGA, dislipemia, IR, hipersecreción de insulina (hiperfunción de células β) y aumento de la apoptosis que nos permite continuar utilizándolo en procura de desarrollar un modelo de reversión, como veremos en el siguiente capítulo.

Capítulo V

Elección del modelo de reversión.

Capítulo V: Elección del modelo de reversión.

V.1. Resultados.

Se probaron diferentes estrategias con el objetivo de encontrar un modelo que nos permita ver una reversión parcial o total del estado similar a PD instalado a los 21 días con la DRF.

V.1.A. Primer intento: reversión por cambios en el hábito alimenticio utilizando un período total de seguimiento de 42 días.

En una primera instancia se evaluó llevar a cabo un período de alimentación en el que a partir del día 21 se replicase una segunda ventana temporal de la misma longitud durante la cual, un grupo de animales que venía consumiendo la DRF por las primeras 3 semanas completase los 42 días con una dieta estándar y consumiendo agua corriente como bebida. Para esto, tal como se observa en la [Figura V.1](#), generamos 3 nuevos grupos en los que todos los animales recibieron la misma comida comercial estándar y diferentes bebidas:

- C42, en el que los animales consumieron agua por 42 días,
- F42, en el que los animales consumieron la solución 10% p/v de fructosa por 42 días y
- R42, en el que los animales consumieron la misma solución fructosada que los F42, pero sólo por 21 días y luego cambiamos su bebida por agua corriente por 21 días más.

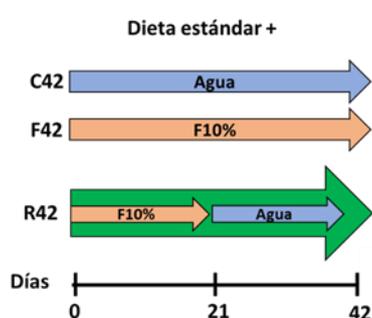


Figura V.1. Grupos experimentales. Ratas Sprague Dawley fueron alimentadas con dieta comercial estándar y divididas en 3 grupos que fueron sacrificados a los 42 días: C42 consumió agua como bebida, F42 una solución de fructosa en agua al 10% p/v y R42 consumió los primeros 21 días solución de fructosa en agua al 10% p/v y posteriormente consumió agua corriente por 21 días más. N C42= 4, N F42= 4 y N R42= 4.

No encontramos diferencias significativas en los valores plasmáticos de TG entre las ratas de los grupos C42 y F42. Observamos que la prolongación del tratamiento con

Capítulo V: Elección del modelo de reversión.

fructosa generó un descenso de los valores obtenidos a los 21 días, estabilizándolos cercanos a los hallados en el grupo control. De manera análoga, el grupo R42 tampoco mostró diferencias en la medida de TG con respecto a los otros grupos (Figura V.2, panel A). La fracción del colesterol HDL, al igual que lo encontrado en 21 días, no mostró diferencias significativas entre los 3 grupos (Figura V.2, panel B). Como una consecuencia lógica que se desprende de los resultados descritos anteriormente, esta similitud en los valores encontrados para los grupos de 42 días también se vio reflejada en el cálculo del índice de IR, en donde no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura V.2, panel C).

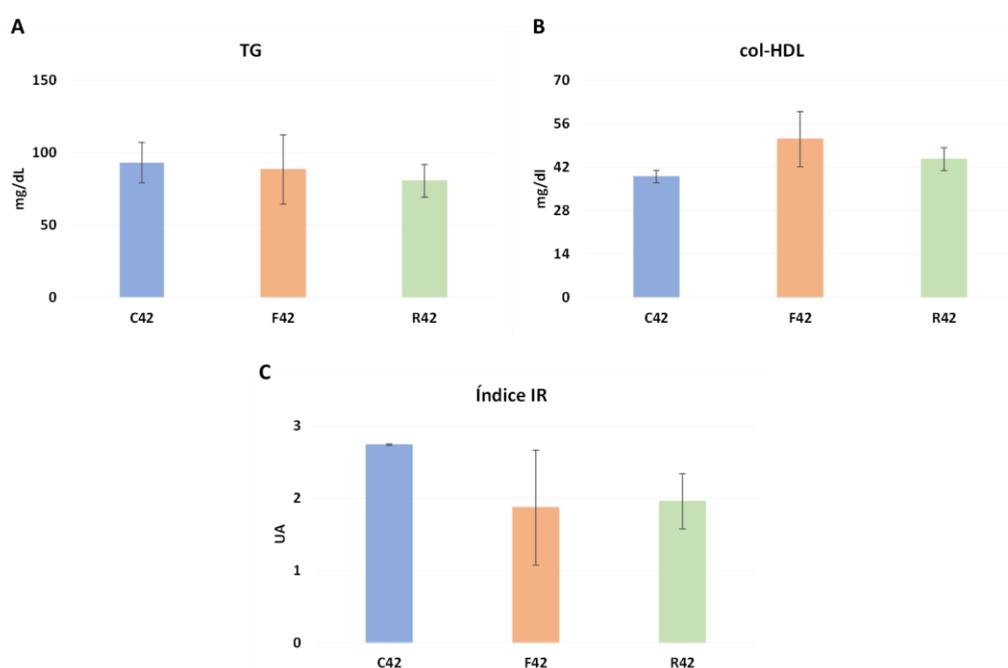


Figura V.2. Metabolismo lipídico y cálculo del índice IR. Los valores representan la media \pm EEM de 4 animales por grupo (barra azul para C42, naranja para F42 y verde para R42) **A)** Gráfico de los valores de TG plasmáticos expresados como mg/dl **B)** Fracción del colesterol HDL expresada en mg/dl. **C)** Índice IR (UA).

V.1.B. Segundo intento: reversión por cambio de hábitos alimenticios utilizando un período de 70 días.

Como la elección del período en el intento anterior resultó inadecuada, se decidió probar un período de reversión más largo, hasta completar un seguimiento de 70 días en total, constituidos por una primera etapa de 21 días de consumo de DRF, en el que

Capítulo V: Elección del modelo de reversión.

se logra el fenotipo similar a la PD humana, y luego 49 días de consumo de agua corriente. La elección de este período prolongado de cambio de hábito alimenticio se llevó a cabo tomando como referencia resultados previamente publicados por el grupo de la Dra. Lombardo, de Santa Fé (134). Los grupos de este nuevo ensayo se ilustran en la [Figura V.3](#) y se denominaron:

- C, grupo control que se mantuvo con agua corriente como bebida por 70 días,
- F, grupo que consumió la DRF durante el período completo de 70 días, y
- R, el mencionado grupo de reversión que fue desdoblado en R21 (primeros 21 días en los que recibieron la DRF) y R49 (49 días de seguimiento en los que la bebida ofrecida volvió a ser agua corriente).

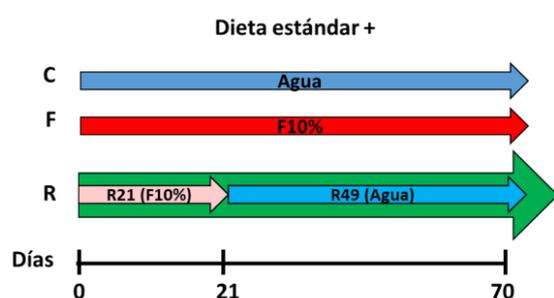


Figura V.3. Grupos experimentales. Ratas Sprague Dawley fueron alimentadas con dieta comercial estándar y divididas en 3 grupos que fueron sacrificados a los 70 días: C consumió agua como bebida, F una solución de fructosa en agua al 10% p/v y R consumió los primeros 21 días solución de fructosa en agua al 10% p/v y posteriormente consumió agua por 49 días más. N C= 30, N F= 30 y N R= 30.

Este diseño experimental fue exitoso en términos de poder recuperar en el grupo R valores de TG y de índice de IR semejantes a los del grupo C ([Tabla V.1](#)).

Tabla V.1. Valores de TG, colesterol HDL e índice IR para los grupos C, F y R.

	TG (mg/dl)	Colesterol HDL (mg/dl)	Índice IR (UA)
C	94,57 ± 5,04	48,73 ± 1,69	1,98 ± 0,11
F	225,48 ± 7,73*	47,10 ± 1,61	5,11 ± 0,30*
R	100,44 ± 5,80 [#]	51,94 ± 2,17	2,02 ± 0,16 [#]

*p<0,05 vs C y [#]p<0,05 vs F.

Como este modelo fue el que a la postre decidimos utilizar en el desarrollo del presente trabajo de tesis y se analizó de manera pormenorizada, los resultados se mostrarán y discutirán en los próximos capítulos (capítulos VI, VII, VIII y IX).

Capítulo V: Elección del modelo de reversión.

V.1.C. Tercer intento: reversión por incorporación de un agente antioxidante.

Por otro lado, también se probó un grupo de reversión que consistía en animales alimentados con DRF por 70 días a los cuales se le administró de forma intraperitoneal un agente antioxidante, el ácido α -lipoico, en una dosis de 35 mg/Kg de peso de corporal, durante los últimos 5 días de tratamiento. A este grupo se lo denominó RL (Figura V.4).

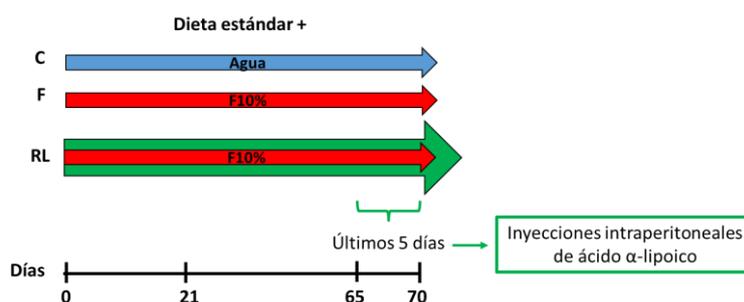


Figura V.4. Grupos experimentales. Ratas Sprague Dawley fueron alimentadas con dieta comercial estándar y divididas en 3 grupos que fueron sacrificados a los 70 días: C consumió agua como bebida, F una solución de fructosa en agua al 10% p/v y R consumió por 70 días una solución de fructosa en agua al 10% p/v y los últimos 5 días recibió inyecciones intraperitoneales de ácido α -lipoico (35 mg/Kg de peso corporal). N C= 30, N F= 30 y N RL= 4.

Para la evaluación de esta variante de modelo de reversión se tuvieron en consideración los mismos parámetros mencionados anteriormente. Como resultado se obtuvo que el valor de TG del grupo RL no mostró diferencias significativas con los hallados en F, pero sí resultó significativamente mayor que lo obtenido en los animales del grupo C. En cuanto al col-HDL, el grupo RL presentó valores menores que los grupos C y F ($p < 0,05$). Al calcular el índice de IR observamos que el grupo RL no presentó diferencias con el grupo F, pero registró un aumento significativo con respecto al grupo C (tal como se puede apreciar en la Figura V.5).

Capítulo V: Elección del modelo de reversión.

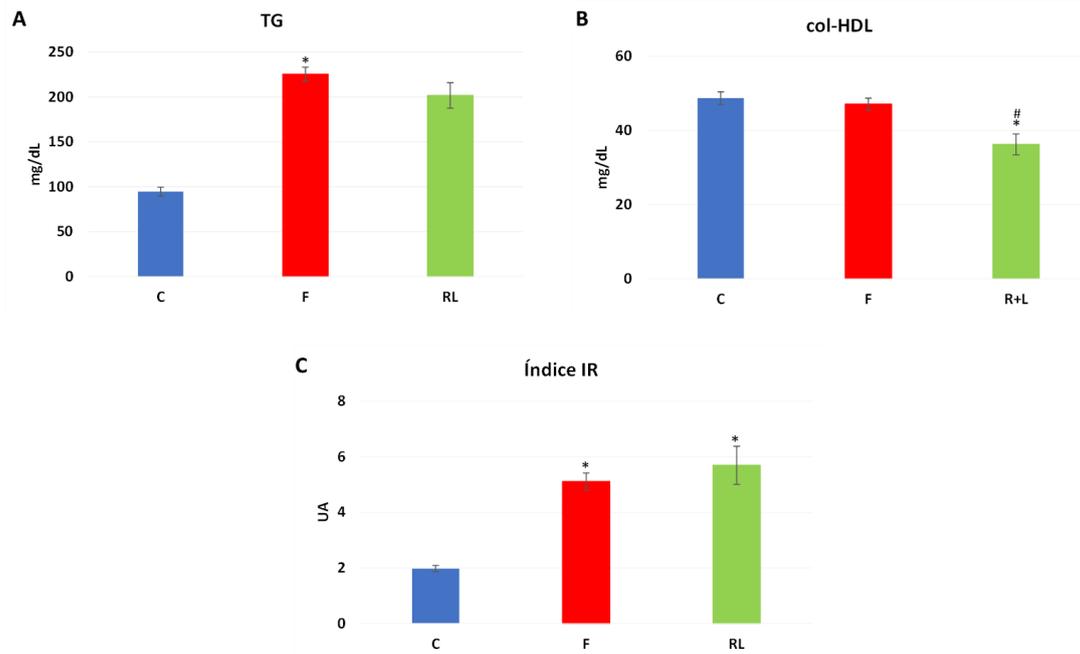


Figura V.5. Metabolismo lipídico y cálculo del índice IR. En los diferentes colores se representan los datos de las ratas de los diferentes grupos: azul C, rojo F y verde RL. Para C y F cada valor representa la media \pm EEM de los 30 animales que integran cada grupo experimental y para RL cada valor representa la media \pm EEM de los 4 animales que integran cada grupo experimental. * $p < 0,05$ con respecto a C y # $p < 0,05$ respecto de F. **A)** Gráfico de los valores de TG plasmáticos expresados como mg/dl **B)** Fracción del colesterol HDL expresada en mg/dl. **C)** Índice IR (UA).

Capítulo V: Elección del modelo de reversión.

V.2. Discusión y conclusiones.

V.2.1. Discusión.

Para evaluar la posible reversión del fenotipo similar a la PD humana generado a partir del consumo del carbohidrato refinado fructosa, se probaron diferentes estrategias.

La primera estrategia puesta en marcha, y tal vez la más intuitiva, consistió en asumir que a los animales que desarrollaron el cuadro de alteración metabólica por consumo de la DRF por 21 días les llevaría el mismo tiempo poder revertirlo gracias al consumo de una dieta equilibrada en la que reemplazamos la solución fructosada por agua corriente. En consecuencia, el período de seguimiento se prolongó a 42 días totales, al cabo de los cuales evaluamos en los 3 grupos (C42, F42 y R42) los niveles séricos de TG y col-HDL, dos parámetros claves en el desarrollo de la dislipemia y la IR características del estado semejante a la PD humana. Los resultados mostraron, en primer lugar, que el grupo de animales que consumió la DRF (grupo F42) no fue capaz de mantener durante todo el período de seguimiento el fenotipo similar a PD humana logrado a los 21 días, dado que al cabo de los 42 días de tratamiento los niveles de TG plasmáticos no mostraron diferencias significativas con los obtenidos en ratas del grupo control y además, vimos la repercusión de estos valores en el cálculo del índice de IR, el que fue similar para ambos grupos. En segundo término, encontramos que los animales del grupo R42 también se comportaron de forma similar a los de los otros dos grupos (valores semejantes de TG y del índice IR).

Pudimos concluir que no solamente falló el modelo de reversión, sino que también todos los grupos se comportaron de manera similar en el período elegido, como si no hubieran sido intervenidos. Como mencionamos en la introducción, Gutman (134) mostró que en un modelo de DRS administrada en el alimento sólido a ratas Wistar macho, existe un período denominado adaptación en donde los cambios metabólicos y hormonales sufridos por los animales (entre los que se encuentran la hipertriglicidemia), retornan espontáneamente a la normalidad y, justamente, 42 días se encuentran dentro de este período. Como conclusión de este resultado,

Capítulo V: Elección del modelo de reversión.

podemos decir que, a pesar de que nuestro modelo discrepa en algunos aspectos experimentales con el modelo comentado anteriormente, el resultado obtenido es representativo de un período de adaptación que equipara el metabolismo de todos los animales independientemente del tratamiento elegido. Observamos que hay patrones generales en el comportamiento metabólico ante la fructosa, los cuales parecen ser independientes tanto de la cepa de rata utilizada, como de la forma en que se administra la fructosa, ya sea de manera aislada o como parte de la sacarosa.

Luego del fracaso del modelo de reversión a 42 días, se probó un tratamiento de reversión en donde posterior al desarrollo del fenotipo PD se cambió la bebida a agua hasta el día 70 de tratamiento, es decir se suministró agua por 49 días. En el día 70 según la mencionada publicación de Gutman y colaboradores (134), nos encontraríamos dentro del período denominado recurrencia, en donde los mecanismos defectuosos volverían a operar. Por otro lado, otros trabajos confirmaron que, entre las 9 y 10 semanas de tratamiento con fructosa, los animales permanecen con PD y no llegan a desarrollar DT2 (234). Como el objetivo final de este trabajo consiste en encontrar MEPD que permitan realizar un diagnóstico temprano de esta situación patológica reversible, es importante remarcar que el grupo F, que en nuestro modelo constituye un control positivo de PD, no llegue a desarrollar diabetes. Existe evidencia de que los animales a partir de las 30 semanas ya presentan características similares a la DT2 humana (134). Pudimos confirmar, haciendo las mediciones previamente descritas, que este período de reversión elegido funcionó, y que los animales que consumieron la DRF por 70 días presentaban un fenotipo similar al de la PD humana, ya que presentaron dislipemia (aumento dramático de TG) e IR. Por otro lado, las ratas que fueron forzadas a cambiar de dieta hacia una alimentación más equilibrada lograron revertir ambos parámetros y mostraron valores semejantes a los obtenidos en los animales del grupo control. Más adelante en los siguientes capítulos, mostraremos mayor evidencia que refuerza ambas situaciones:

- los animales del grupo F a los 70 días presentan el estado de PD sin llegar a desarrollar DT2 y,
- el grupo R logra revertir con éxito todos los parámetros que se habían alterado a los 21 días de tratamiento con DRF.

Capítulo V: Elección del modelo de reversión.

En este punto es importante destacar que el tiempo necesario para que se establezca la PD a partir de un cambio en los hábitos alimenticios resulta menor, que el que se necesita para reestablecer la fisiología normal de las ratas. Por lo tanto, las consecuencias metabólicas de este tratamiento parecieran ser potentes y durar a largo plazo.

En el tercer modelo evaluado, se intentó generar un grado de reversión mayor, a partir de la administración intraperitoneal del antioxidante ácido α -lipoico a los animales sometidos a DRF por 70 días. Este compuesto derivado del ácido graso octanoico funciona como un agente repositor de grupos tioles y un modulador redox que en varios trabajos demostró tener un efecto benéfico sobre los desbalances metabólicos generados por las diferentes dietas (235). Su administración a ratas obesas mostró efectos beneficiosos y preventivos del desarrollo de diabetes. En ratas Zucker (obesas por mutación en el gen del receptor de leptina, ObRb) mejoró la sensibilidad a la insulina y la hipertrigliceridemia (236). En otro modelo de obesidad, previno el desarrollo de diabetes a través de una reducción en la acumulación de lípidos en tejido adiposo (efecto logrado por modulación de AMPK) y un aumento de la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético (237). Por otro lado, se demostró que su coadministración con vitamina E, en animales alimentados con una DRF, mejoró el EO, la hiperinsulinemia y la IR (238).

Además de toda esta evidencia, en nuestro modelo de PD a 21 días se probó que el EO, el aumento de la actividad de la fructoquinasa hepática y la tríada hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina logran revertirse al inyectar a los animales intraperitonealmente el ácido α -lipoico en los últimos 5 días de tratamiento con fructosa (239,240). Con todas estas premisas, probamos este mismo cronograma de inyecciones diarias durante los últimos 5 días de nuestro tratamiento de 70 días con DRF. Lamentablemente, los resultados no fueron los esperados, y tanto los TG plasmáticos como el índice de IR en los animales del grupo RL presentaron valores similares a los obtenidos en ratas del grupo F. Evidentemente, las consecuencias metabólicas establecidas durante un período más extenso de tiempo no pudieron ser removidas con 5 inyecciones del antioxidante. Teniendo en cuenta que anteriormente este tratamiento resultó exitoso en el modelo de DRF por 21 días y que la

Capítulo V: Elección del modelo de reversión.

concentración de ácido lipoico utilizada no podía ser aumentada por haber trabajado a dosis máxima, se nos ocurrió que podríamos prolongar el período de administración del antioxidante para lograr un resultado favorable. Sin embargo, y por consejo veterinario, este ensayo no pudo realizarse debido a que luego de las 5 aplicaciones surgieron durezas en el sitio de las aplicaciones que podrían provocar el sufrimiento animal y deteriorar su calidad de vida.

Teniendo en cuenta todos estos inconvenientes, optamos por abortar otras posibles alternativas de optimización del modelo de reversión y continuar el desarrollo de la tesis con el protocolo de 70 días que incluía el grupo R con suspensión de la administración de fructosa durante los últimos 49 días.

V.2.2. Conclusiones.

El modelo a 70 días logra provocar la instalación de un estado de alteraciones metabólicas múltiples similar al de la PD en el grupo F, así como la reversión del cuadro en los animales del R. En los siguientes capítulos ahondaremos el estudio de este modelo a través de diferentes abordajes, tales como el estudio a nivel transcripcional de genes y a nivel epigenético.

Capítulo VI

**Administración por 70 días de una DRF y
la posible reversión de sus efectos por
adopción de hábito alimenticio saludable.**

Capítulo VI: Modelo de 70 días.

VI.1. Resultados.

En este capítulo se presentarán y analizarán los resultados obtenidos en animales provenientes de los grupos C, F Y R con el objetivo de caracterizarlos metabólicamente.

VI.1.A. Parámetros dietarios.

El comportamiento alimenticio de los grupos C y F luego de 70 días de seguimiento fue semejante al observado en estos mismos grupos evaluados anteriormente en períodos más cortos (21 y 42 días). Los animales del grupo F consumieron diariamente una cantidad significativamente mayor de bebida que los del grupo C ($p < 0,05$; [Figura VI.1.A](#)).

En cuanto al grupo R, tanto para analizar el consumo de bebida y comida, como para los nutrientes y calorías que de estos se desprenden, decidimos analizar por separado cada uno de los periodos en que se dividió su dieta (R21 y R49). En este contexto, en los primeros 21 días de tratamiento consumieron un mayor volumen de bebida por día que en los segundos 49 días ($p < 0,05$). El volumen de solución fructosada ingerido diariamente en los primeros 21 días fue significativamente más alto al registrado para las ratas del grupo C ([Figura VI.1.A](#)), pero significativamente inferior al registrado en las ratas del grupo F al cabo de los 70 días. Por otra parte, no registramos diferencias entre el consumo diario de agua corriente de las ratas del grupo C y las del grupo R en los últimos 49 días del período de seguimiento (R49).

Una situación análoga a la ya observada en períodos de alimentación más cortos ocurrió con el consumo diario de comida sólida, en donde los animales del grupo F ingirieron diariamente una cantidad significativamente menor de alimento sólido que los del grupo C ($p < 0,05$; [Figura VI.1.B](#)). Este comportamiento también se observó en los primeros 21 días del grupo R, en donde el consumo de alimento de estos animales fue menor que el de las ratas del grupo C ($p < 0,05$). Con respecto a los últimos 49 días del grupo R, las ratas volvieron a consumir mayores cantidades que las del grupo F y que ellas mismas en el primer período de 21 días ([Figura VI.1.B](#)).

Capítulo VI: Modelo de 70 días.

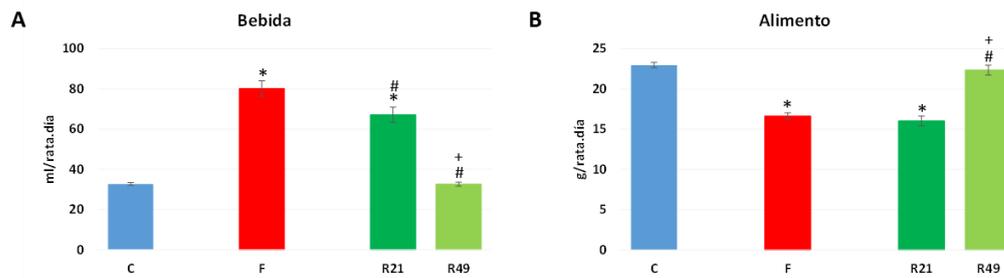


Figura VI.1. Parámetros dietarios de ratas sacrificadas a los 70 días. En color azul se representan los datos de las ratas del grupo C, en rojo los de las ratas del grupo F y en dos tonos de verde los datos del grupo R, siendo el verde oscuro el que representa los datos del primer tramo de 21 días en los que los animales bebieron la solución acuosa de fructosa al 10% y en verde claro el segundo tramo de 49 días en los que los animales bebieron agua corriente. Cada valor representa la media \pm EEM de los 30 animales que integran cada grupo experimental. * $p < 0,05$ con respecto a C; # $p < 0,5$ respecto a F; + $p < 0,05$ respecto a R21. **A)** Bebida (ml/rata.día) **B)** Alimento (g/rata.día).

De la misma manera que para el caso de los tratamientos a 21 días, se calculó la cantidad en gramos netos de nutrientes, hidratos de carbono, proteínas y lípidos (Tabla VI.1 y Figura VI.2.A) y la equivalencia en calorías que cada animal consumió diariamente (Tabla VI.2 y Figura VI.2.B).

Al sumar los aportes individuales de hidratos de carbono, proteínas y lípidos ingeridos, observamos que aquellos animales que bebieron agua corriente (tanto los del grupo R en los últimos 49 días y los del grupo C a lo largo de los 70 días) consumieron una cantidad total de nutrientes significativamente menor que la ingerida por aquellos que se alimentaron con la DRF (los animales del grupo F y los del grupo R en el primer período de 21 días) tal como se describe en la Tabla VI.1 y en la Figura VI.2.A.

Tabla VI.1. Consumo diario de nutrientes por los animales de los tres grupos experimentales (C, F y R) a lo largo de todo el período de seguimiento.

Nutrientes	C (g/rata.día)	F (g/rata.día)	R21 (g/rata.día)	R49 (g/rata.día)
Hidratos de carbono	6,49 \pm 0,09	12,71 \pm 2,10*	11,42 \pm 0,38*#	6,48 \pm 0,13#+
Proteínas	6,20 \pm 0,09	4,49 \pm 0,70*	4,41 \pm 0,14*	6,20 \pm 0,12#+
Lípidos	1,73 \pm 0,02	1,25 \pm 0,20*	1,23 \pm 0,04*	1,73 \pm 0,03#+
Totales	14,41 \pm 0,21	18,46 \pm 2,89*	17,05 \pm 0,44*##	14,41 \pm 0,28#+

N=30 para cada grupo. * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs F y + $p < 0,05$ vs R21.

Capítulo VI: Modelo de 70 días.

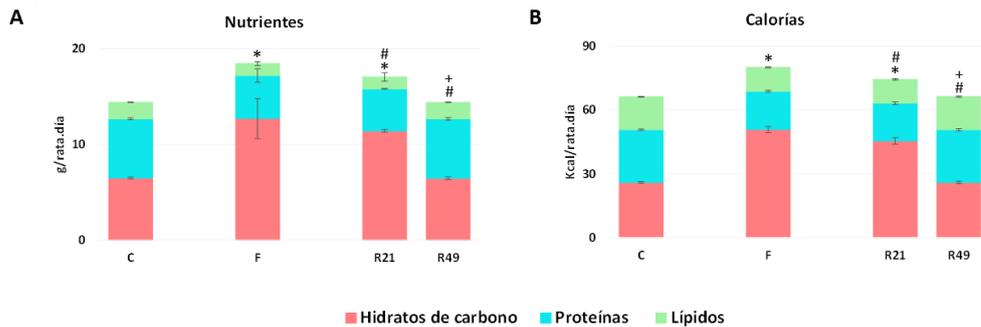


Figura VI.2. Consumo diario de nutrientes y calorías. Las ratas del grupo del grupo R presentan dos columnas ya que se registraron por separado los datos obtenidos en los primeros 21 días (R21) y los 49 días finales del período de seguimiento (R49). Cada valor representa la media \pm EEM de los 30 animales que integran cada grupo experimental. * $p < 0,05$ con respecto a C; # $p < 0,5$ respecto a F; + $p < 0,05$ respecto a R21. **A)** Consumo de nutrientes netos y aporte individual de los hidratos de carbono (sector inferior de la barra), proteínas (sector central de la barra) y lípidos (sector superior de la barra) ingeridos diariamente expresados en g/rata.día. **B)** Calorías ingeridas diariamente por las ratas de todos los grupos experimentales expresado en Kcal/rata.día y aporte individual de los hidratos de carbono (sector inferior de la barra), proteínas (sector central de la barra) y lípidos (sector superior de la barra).

En función del aporte diferencial de nutrientes que recibieron los animales del grupo C y aquellos que recibieron una DRF, el cálculo de las calorías ingeridas por unos y otros determinó que la dieta consumida por el grupo F fue hipercalórica con respecto a la ingerida por las ratas del grupo C ($p < 0,05$), tal como se describe en la [Tabla VI.2](#) y se ilustra en la [Figura VI.2.B](#). Dentro de los animales del grupo R también se observó que los animales consumieron una cantidad de calorías mayor en los primeros 21 días que en la parte final del período de seguimiento en el que cambiaron el tipo de bebida ingerida ([Figura VI.2.B](#) y [Tabla VI.2](#)).

Tabla VI.2. Consumo de calorías diarias ingeridas por los animales de los tres grupos experimentales (C, F y R) a lo largo de todo el período de seguimiento.

Calorías	C (Kcal/rata.día)	F (Kcal/rata.día)	R21 (Kcal/rata.día)	R49 (Kcal/rata.día)
Hidratos de carbono	25,94 \pm 0,37	50,86 \pm 1,43*	45,46 \pm 1,54*#	25,95 \pm 0,53#+
Proteínas	24,79 \pm 0,35	17,97 \pm 0,43*	17,78 \pm 0,57*	24,80 \pm 0,50#+
Lípidos	15,57 \pm 0,22	11,28 \pm 0,27*	11,16 \pm 0,36*	15,57 \pm 0,32#+
Totales	66,30 \pm 0,94	80,11 \pm 1,54*	74,39 \pm 1,96*#	66,32 \pm 1,35#+

N=30 para cada grupo. * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs F y + $p < 0,05$ vs R21.

VI.1.B. Parámetros de crecimiento.

La tasa de crecimiento corporal registrada para los animales entre el inicio del tratamiento y el día 21 no mostró diferencias significativas entre los grupos. Sin

Capítulo VI: Modelo de 70 días.

embargo, en los últimos 49 días de tratamiento, el grupo F tuvo un crecimiento significativamente mayor que C y que R ($p < 0,05$). Cuando se analizó la evolución de los pesos corporales a lo largo de los 70 días, no se encontraron diferencias en las curvas obtenidas para los animales de los tres grupos experimentales (C, F y R) aunque se evidenció un cambio en el ritmo de ganancia de peso a lo largo del período, siendo que en los primeros 21 días de tratamiento el crecimiento fue mucho más rápido que en el segundo tramo de 49 días, tal como se observa en la [Figura VI.3 A y B](#).

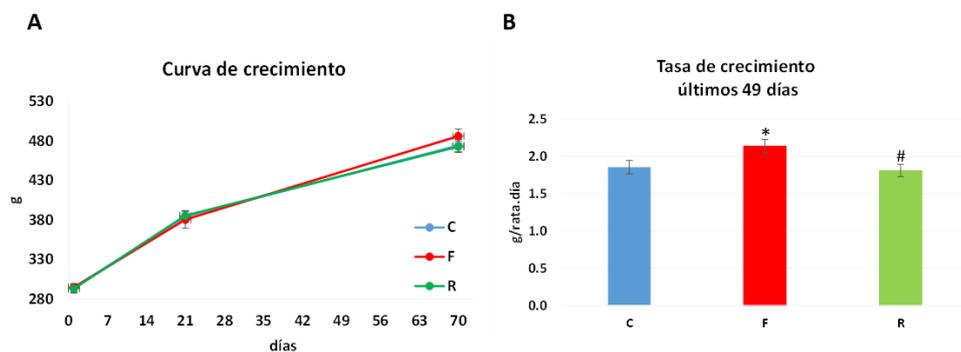


Figura VI.3. Crecimiento corporal. Parámetros de crecimiento y evolución del peso corporal de ratas sacrificadas a los 70 días. En color azul se representan los datos de las ratas del grupo C, en rojo los de las ratas del grupo F y en verde los del grupo R. Cada valor representa la media \pm EEM de los 30 animales que integran cada grupo experimental. * $p < 0,05$ con respecto a C; # $p < 0,05$ respecto a F **A)** Curva de evolución del peso corporal de cada animal expresada en g a lo largo del período de tratamiento. **B)** Tasa de crecimiento de los últimos 49 días (expresada en g/rata.día).

VI.1.C. Metabolismo glucémico.

En cuanto a las medidas de glucemia sin previo ayuno obtenidas al finalizar el período de seguimiento de 70 días (glucemias al azar), no encontramos diferencias entre los grupos C y F, pero, para nuestra sorpresa, el grupo R registró un valor significativamente más bajo que los otros dos grupos ($p < 0,05$). Las glucemias de ayuno no mostraron diferencias entre ninguno de los tres grupos experimentales ([Figura VI.4 A y B](#)).

Para evaluar la tolerancia a la glucosa al cabo de los 70 días de tratamiento, le realizamos a 6 animales de cada grupo experimental (C, F y R) una PTGip. Observamos que tanto a los 90 como a los 120 minutos post-carga de glucosa, las ratas del grupo F presentaron glucemias mayores que las registradas en los animales de los grupos C y

Capítulo VI: Modelo de 70 días.

R, aunque sólo fueron de significancia estadística las diferencias entre los grupos F y C (Figura VI.4.C1). Si bien la comparación punto a punto no arrojó diferencias significativas entre las ratas de los grupos F y R a ninguno de los tiempos evaluados, las áreas bajo la curva mostraron que las ratas del grupo F presentaban una TGA respecto tanto a las provenientes del grupo C (F vs C: $975,29 \pm 111,44$ vs $657,95 \pm 73,28$ UA, $p < 0,05$) como a las del grupo R (F vs R: $975,29 \pm 111,44$ vs $704,73 \pm 45,72$ UA; $p < 0,05$), tal como se observa en la Figura VI.4.C2.

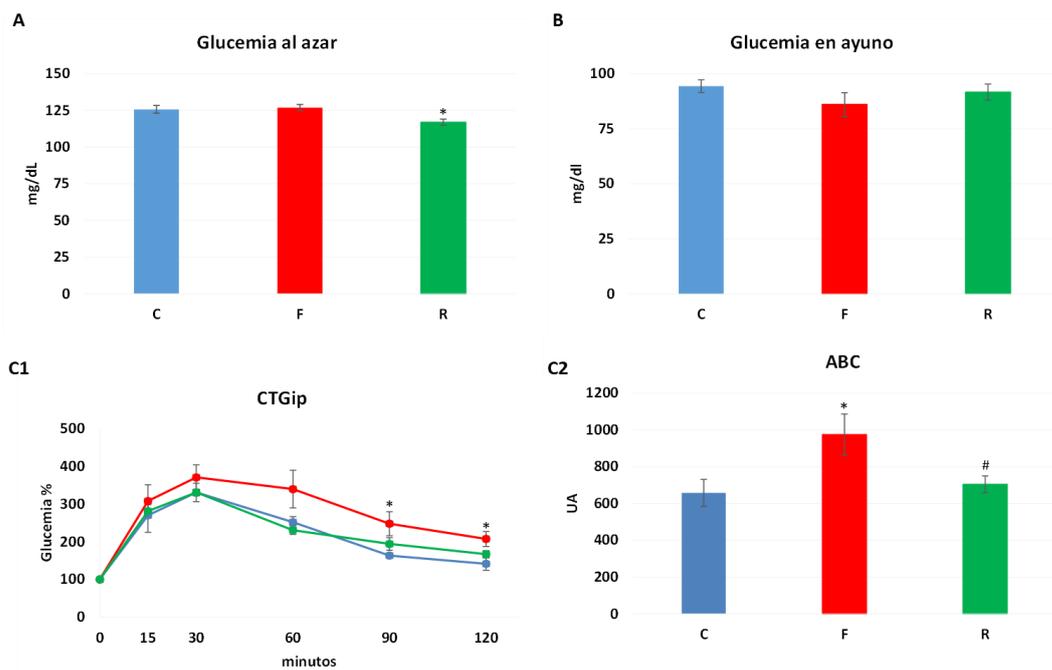


Figura VI.4. Metabolismo glucémico de ratas sacrificadas a los 70 días. En color azul se representan los datos de las ratas del grupo C, en rojo los de las ratas del grupo F y en verde los datos del grupo R. **A)** Glucemia al azar (mg/dl), N= 30 para cada grupo **B)** Glucemia en ayuno (mg/dl). **C1)** Curvas registrada en la PTGip (CTGip), se grafica la evolución de la glucemia de ratas previamente ayunadas a lo largo de los 120 minutos posteriores a la carga intraperitoneal de glucosa **C2)** Área bajo la CTGip (ABC) expresada en unidades arbitrarias. Para los paneles B, C1 y C2, N= 6 para cada grupo. Cada valor representa la media \pm EEM. * $p < 0,05$ con respecto a C; # $p < 0,05$ respecto a F.

IV.1.D. SIEG en islotes aislados.

La Figura VI.5 muestra la cantidad de insulina secretada al medio de incubación de islotes aislados de ratas provenientes de los 3 grupos experimentales que fueron incubados una hora en medios conteniendo diferentes concentraciones de glucosa como estímulo para la secreción de esta hormona. La secreción de insulina en

Capítulo VI: Modelo de 70 días.

respuesta a una concentración basal de glucosa (glucosa 3,3 mM) no mostró diferencias significativas entre los grupos, sin embargo, en respuesta a altas concentraciones de glucosa (16,7 mM), los islotes aislados de los animales del grupo F secretaron casi 3 veces más insulina que los provenientes del grupo C (C vs F: $6,16 \pm 0,85$ vs $18,1 \pm 5,82$; $p < 0,05$ ng insulina/islote.hora). El grupo R logró valores de secreción de insulina cercanos al grupo C (C vs R: $6,16 \pm 0,85$ vs $8,74 \pm 1,47$; $p < 0,05$ ng insulina/hora.islote).

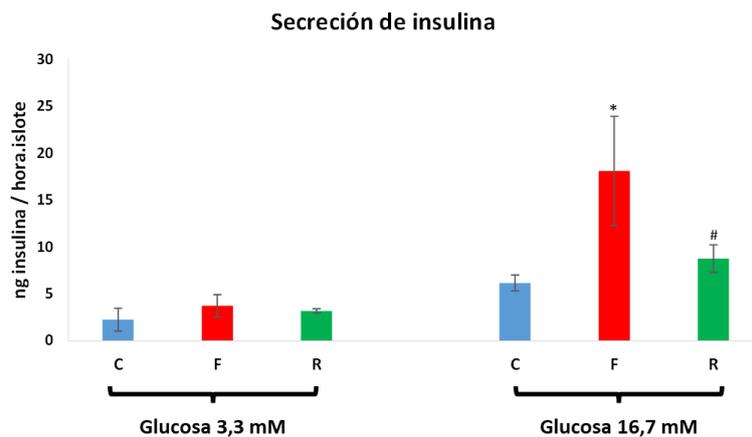


Figura VI.5. Secreción de insulina estimulada por glucosa. Los valores se expresan como ng insulina/hora.islote, y representan la media \pm EEM de 15 medidas independientes (tubos conteniendo 5 islotes cada uno) provenientes de 3 experimentos con islotes aislados de 6 ratas por cada grupo experimental. En color azul se representan los datos de las ratas del grupo C, en rojo los de las ratas del grupo F y en verde los datos del grupo R. * $p < 0,05$ con respecto a C en la condición 16,7mM; # $p < 0,05$ con respecto de F en la condición 16,7mM.

VI.1.E. Metabolismo lipídico.

En lo que respecta a la medida de los TG medidos el día 70, se encontró que los animales alimentados con fructosa ostentaban valores que superaban en 2,4 veces al valor obtenido en las ratas control (C vs F: $94,57 \pm 5,04$ vs $225,48 \pm 7,73$ mg/dl; $p < 0,05$) tal como se aprecia en la [Figura VI.6.A](#). El grupo R logró revertir el aumento de los TG que le produjo la DRF que consumió en los primeros 21 días, llegando a presentar un valor de TG similar al hallado en las ratas del grupo C ($100,44 \pm 5,8$ mg/dl) y significativamente diferentes a los de los animales pertenecientes al grupo F ($p < 0,05$).

Capítulo VI: Modelo de 70 días.

En relación a lo ocurrido con la determinación del colesterol total y sus fracciones (col-HDL y col-NO-HDL), al igual que había ocurrido a los 21 días, no encontramos diferencias significativas entre los tres grupos (Figura VI.6.B).

El índice de IR mostró que el grupo F seguía manteniendo valores significativamente mayores al control (C vs F: $1,98 \pm 0,11$ vs $5,11 \pm 0,3$ UA; $p < 0,05$) y que el grupo R logró revertirlo, llegando a valores similares al del grupo C ($2,02 \pm 0,16$ UA), tal como se observa en el panel C de la Figura VI.6.

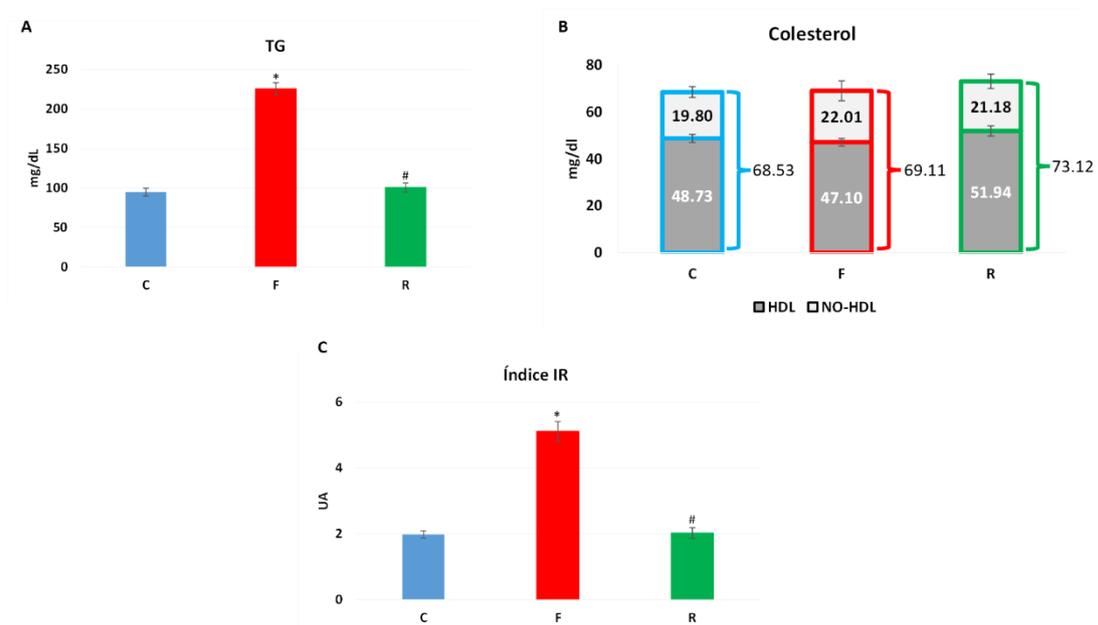


Figura VI.6. Perfil lipídico y cálculo del índice IR. Metabolismo lipídico de ratas sacrificadas el día 70. En color azul se representan los datos de las ratas del grupo C, en rojo los de las ratas del grupo F y en verde los datos del grupo R. Cada valor representa la media \pm EEM de los 30 animales que integran cada grupo experimental. * $p < 0,05$ con respecto a C; # $p < 0,05$ respecto a F. **A)** TG (mg/dl) **B)** Colesterol total y sus fracciones (en cada barra, el sector inferior gris oscuro corresponde al col-HDL y el sector superior gris claro corresponde al col-No-HDL, las llaves muestran el valor del colesterol total) en mg/dl **C)** Índice IR (UA).

Capítulo VI: Modelo de 70 días.

VI.1.F. TBARS.

Al igual que lo ocurrido a 21 días de tratamiento, cuando se evaluó la peroxidación lipídica a través de la determinación de TBARS a 70 días, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, como se aprecia en la [Figura VI.7](#).

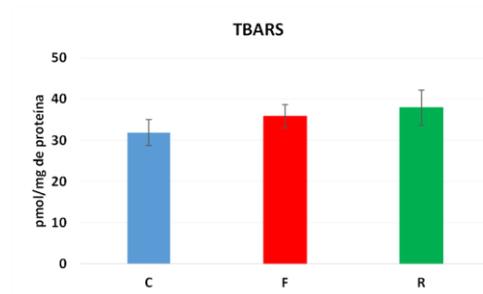


Figura VI.7. TBARS. Se representan las Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (pmol/mg) para cada grupo experimental (N=30). Los resultados se expresan como la media \pm EEM. En color azul se representan los datos de las ratas del grupo C, en rojo los de las ratas del grupo F y en verde los datos del grupo R.

Capítulo VI: Modelo de 70 días.

VI.2. Discusión y conclusiones.

VI.2.1. Discusión.

El modelo extendido a 70 días resultó de gran utilidad ya que, por un lado, logró generar y mantener el estado similar a PD en los animales del grupo F (sin que estos desarrollen DT2) y, además, mostró resultados muy positivos respecto al grupo reversión.

Comenzando a analizar los parámetros dietarios, observamos que los animales alimentados con la DRF en los dos períodos estudiados (21 y 70 días) consumieron significativamente más bebida y menos comida que los del grupo C. Sin embargo, esta compensación espontánea que hicieron las ratas en su conducta alimenticia no fue suficiente para que las dietas fuesen isocalóricas, por lo que hubo cierta diferencia en las calorías ingeridas. De manera semejante a lo que había ocurrido con los animales sacrificados a los 21 días, no se evidenciaron diferencias en los pesos en los primeros 21 días de tratamiento. Sin embargo, debido al gran aumento de consumo de fructosa que tuvo lugar los últimos 49 días, las ratas del grupo F mostraron un aumento significativo en la tasa de crecimiento de su peso respecto a la de las ratas del grupo C y del grupo R.

Es de destacar que, a lo largo de los 70 días de seguimiento, las ratas del grupo F fueron experimentando un aumento en el consumo de solución fructosada a medida que iban incrementando su peso corporal (y la demanda energética), pasando de un consumo promedio de 64,64 ml/rata.día a los 21 días de comenzado el tratamiento para terminar redondeando un promedio diario de 80,12 ml/rata.día al cabo de los 70 días.

El hecho de que los animales de todos los grupos hayan demostrado un crecimiento del peso corporal similar a pesar de que, por ejemplo, la dieta consumida por las ratas del grupo F haya resultado ser hipercalórica respecto a la que consumieron las ratas del grupo C, si bien puede llamar la atención, es algo que ya ha sido señalado en la literatura (234). Burgeiro reportó estos mismos resultados en un modelo de PD inducido por DRS y justificó que la absorción y digestión de los nutrientes aportados por cada dieta es diferente, lo cual repercute en la cantidad de energía "biodisponible".

Capítulo VI: Modelo de 70 días.

Otro aspecto importante que se debe tener en cuenta para analizar este resultado es la composición corporal del aumento de peso. En este sentido, junto a otros investigadores del CENEXA, hemos demostrado que los animales del grupo F presentan un aumento en los porcentajes de tejido adiposo tanto visceral (32,8%) como pardo (28,5%) en comparación con los del grupo C (241).

A diferencia de lo que sucedió con la medida de glucemia en ayunas, la determinación al azar mostró en el grupo R una diferencia pequeña, pero significativa, con respecto a los otros dos grupos. La determinación de glucosa sin haber sometido a los animales a un ayuno previo lleva aparejado un factor de incertidumbre debido a desconocemos el tiempo exacto de ayuno de cada animal individual. Sin embargo, no deja de ser una medida útil, ya que, si los valores obtenidos en las ratas del grupo F hubiesen sido mayores a los de las ratas del grupo C, podríamos sospechar de la aparición de una alteración que se parezca más a la DT2 que a la PD.

La glucemia en ayunas, que sí es una medida contundente para evaluar la homeostasis glucémica, no arrojó diferencias entre ninguno de los tres grupos. A pesar de este resultado, el estado de PD fue corroborado por la presencia de tolerancia a la glucosa alterada. Aunque los perfiles de las curvas de los grupos F y F21 fueron ligeramente diferentes, ambos presentaron áreas bajo la curva mayores al grupo control ($p < 0,05$). La diferencia de perfiles radicó en que las ratas del grupo F21 mostraron picos de incursión hiperglucémica a tiempos cortos (30 y 60 minutos), corrigiendo los valores en tiempos superiores y, los animales del grupo F mostraron diferencias respecto al grupo C a los 90 y 120 minutos. Ya se han reportado este tipo de resultados en modelos similares, en los que ratas Wistar sometidas a DRF por 21 días presentaron una TGA con diferencias respecto a los del grupo control a los 15, 30 y 60 minutos (227). Asimismo, se ha demostrado que ratas alimentadas con una DRS por 9 semanas generan diferencias en la PTGip a los 30, 60 y 120 minutos (234). En ambos trabajos las glucemias en ayuno de los controles versus los tratados no presentaron diferencias.

En cuanto a las ratas del grupo R, durante toda la PTGip se mantuvieron con valores de glucemia inferiores al grupo F y no mostraron diferencias significativas con el grupo C. Por lo tanto, podemos concluir que los animales pertenecientes al grupo R lograron

Capítulo VI: Modelo de 70 días.

revertir el estado de TGA luego de cambiar sus hábitos alimenticios por una dieta saludable.

Podemos concluir que el modelo de desbalance nutricional genera alteraciones frente a una sobrecarga de glucosa en períodos cortos, como son 3 semanas, como más largos a 9 ó 10. En estas condiciones no modifica la glucemia en ayunas, debido a que los islotes tienen aún la capacidad de poder responder adecuadamente a una demanda de insulina mayor para mantener la GA normal. Sin embargo, los islotes resultan incapaces de atender una sobrecarga inmediata como ocurre en una PTG.

Para analizar la capacidad funcional de los islotes de las ratas provenientes de todos los grupos experimentales efectuamos los ensayos de SIEG *ex vivo*. Esta evaluación evidenció una hiperfunción por parte de los islotes aislados de ratas del grupo F que secretaron significativamente mayores cantidades de insulina que los aislados de animales de los otros dos grupos (C y R) ante un mismo estímulo (glucosa 16,7 mM). La hiperfunción de las células β en este estadio con características similares a la PD es un mecanismo adaptativo que compensa la IR y que logra sostener una glucemia en ayunas normal pero que no puede compensar una sobrecarga de glucosa como ocurre en la PTGip. Como es sabido, la homeostasis de la glucosa depende del balance entre la secreción de insulina y la respuesta (sensibilidad) de los tejidos periféricos a la acción de la hormona. De esta manera en estado de IR en donde disminuye la sensibilidad de los tejidos periféricos, se produce una mayor liberación de insulina para mantener la homeostasis a costa de una sobrecarga funcional del páncreas endocrino (242). Estos resultados concuerdan con otros trabajos en donde se utilizaron diferentes modelos de IR como ratas obesas (243,244) y preñadas con normogluceemia (245). Cabe recordar que la falla de este mecanismo de adaptación o el estrés crónico causado por el hiperfuncionamiento de las células β en el tiempo lleva a su agotamiento y genera DT2 (246).

Nuevamente, al igual que ocurrió a los 21 días y como ha sido reportado por otros autores (247), el grupo F presentó una marcada dislipemia respecto al grupo C, manifestada por el gran aumento registrado en los niveles de TG y su disminución en las ratas del grupo R en la que se obtuvieron valores similares a los mostrados por las ratas del grupo C. Además, si bien no se encontraron diferencias en los niveles de

Capítulo VI: Modelo de 70 días.

colesterol total ni en sus fracciones, el índice de IR calculado fue más del doble para el grupo F con respecto del C y esto logró revertirse en el grupo R. Es decir que nuestros animales con DRF por 70 días son simultáneamente dislipémicos e insulinoresistentes y los del grupo R no presentan ninguna de estas dos alteraciones.

Por último, si bien con la extensión del tratamiento de DRF a 70 días también observamos un aumento en los niveles de TBARS, estos cambios no fueron significativos con respecto a los valores de los animales del grupo control, al igual que lo ocurrido a 21 días de tratamiento, probablemente debido a la baja sensibilidad de la técnica utilizada.

VI.2.2. Conclusiones.

El modelo establecido de animales alimentados con una DRF mantenida por 70 días genera un estado semejante a la PD humana caracterizado por la presencia de TGA, dislipemia, IR e hiperfunción insular. Todas estas alteraciones pudieron ser revertidas en el grupo R. Este modelo animal refuerza el concepto de que para revertir el estado de PD o, dicho de otra manera, para impedir o retrasar su progresión a DT2 es esencial que los pacientes logren hacer un cambio en sus hábitos de vida, fundamentalmente por adquisición de planes de alimentación saludables y equilibrados, a los que deberíamos sumarle la práctica de actividad física.

Capítulo VII

Efecto de las dietas utilizadas en nuestro modelo de 70 días sobre la expresión génica de factores que participan en procesos y vías claves para la función insular.

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

VII.1. Resultados.

Con el objetivo de ampliar el conocimiento de la influencia de las dietas sobre la transcripción de genes claves para la función insular, en este capítulo analizamos la expresión génica en islotes aislados de animales provenientes de los grupos C, F Y R, enfocándonos en genes relacionados con la señalización de insulina y leptina, el mantenimiento de la masa celular, la vasculogénesis y la respuesta a ROS, aspectos cruciales para comprender la fisiopatología de la DT2.

VII.1.A. Efecto sobre la expresión del gen de insulina.

La expresión del gen de insulina a nivel de ARNm se vio claramente influenciada por el tratamiento dietario que recibieron los animales durante 70 días. Observamos que la expresión aumenta significativamente ($p < 0,05$) en el grupo F, mostrando un aumento del 275% respecto a C, tal como se muestra en la [Figura VII.1](#). El grupo R, por su parte, mostró niveles similares a los obtenidos en el grupo C, evidenciando una disminución significativa en comparación al grupo F ($p < 0,05$).

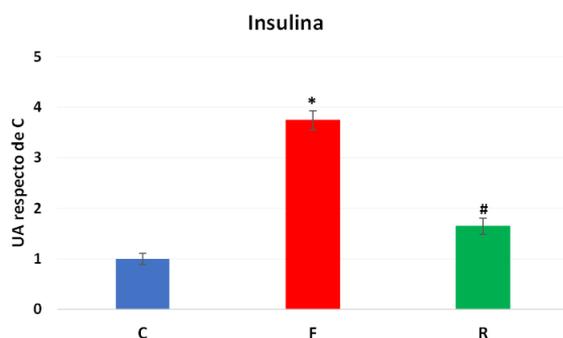


Figura VII.1. Expresión del gen de insulina. Se muestra la expresión génica a nivel de ARNm analizada por RT-qPCR en islotes aislados de ratas de los grupos C (barra azul), F (barra roja), y R (barra verde). Se utilizó β -actina como estándar interno. Los valores fueron expresados en unidades arbitrarias (UA) respecto del nivel de ARNm determinado en los islotes del grupo C. Las barras representan las medias \pm EEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs C y # $p < 0,05$ vs F.

VII.1.B Efecto sobre intermediarios de la cascada de señalización de insulina.

Con el objetivo de analizar el efecto de las diferentes dietas sobre la sensibilidad de las propias células insulares a la acción de la insulina a través de su acción autocrina (en células β) o paracrina (células insulares no β), analizamos los niveles de expresión de

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

diversos genes involucrados en la cascada de señalización intracelular de la insulina, tales como el propio receptor de la hormona (Ri), sus dos sustratos intracelulares más importantes (Irs1 e Irs2), así como 2 de las principales enzimas que se estimulan corriente abajo, como son la Pi3k y la Akt.

El estudio de estos genes mostró que no todos tuvieron el mismo tipo de respuesta ante el tratamiento dietario:

Si bien, tanto el gen del Ri como el de Pi3k sufrieron una disminución significativa de su expresión en el grupo F con respecto a C ($p < 0,05$), los resultados obtenidos para el grupo R fueron discordantes entre ambos genes. La media obtenida para Ri en el grupo R no mostró diferencias con el grupo C y si bien fue notoriamente más elevada que la del F, las diferencias no fueron significativas (Figura VII.2). Con respecto a la expresión del gen de Pi3k, el grupo R mantuvo niveles bajos de expresión similares a los obtenidos en F, mostrando diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,05$).

Los otros 3 genes medidos correspondientes a los sustratos del Ri (Irs 1 y 2) y la enzima Akt, mostraron un comportamiento similar entre sí y diferente a los dos genes anteriormente descritos. Los tres mostraron para el grupo F un aumento significativo respecto al C, mientras que en el grupo R se registraron niveles semejantes a los obtenidos en el grupo C y, consecuentemente, menores a los del F ($p < 0,05$) (Figura VII.2).

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

Cascada de señalización de insulina

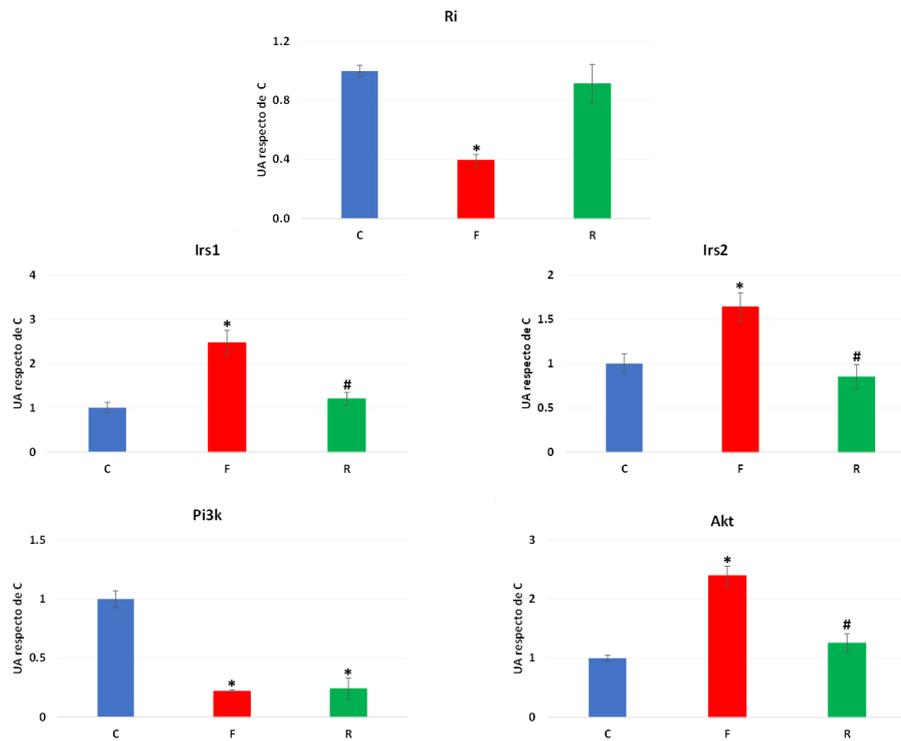


Figura VII.2. Expresión génica de mediadores de la cascada intracelular de insulina (Irs1, Irs2, Pi3k y Akt). Se muestra la expresión génica a nivel de ARNm (RT-qPCR) en islotes aislados de ratas de los grupos C (barra azul), F (barra roja), y R (barra verde). Se utilizó β -actina como estándar interno. Los valores fueron expresados en unidades arbitrarias (UA) respecto del nivel de ARNm determinado en los islotes del grupo C. Las barras representan las medias \pm EEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs C y # $p < 0,05$ vs F.

Para el caso del receptor de insulina (RI), también pudimos determinar sus niveles proteicos por Wb. En la cuantificación se observan valores mayores para los grupos F y R respecto del grupo control, aunque estas diferencias no fueron significativas (Figura VII.3).

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

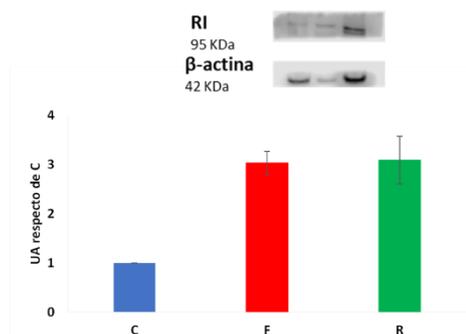


Figura VII.3. Wb de RI en homogenados de islotes. Utilizamos homogenados de islotes aislados de animales de los grupos C, F y R. Se muestra una imagen representativa de las bandas de la proteína de interés (RI) y del estándar interno (β -actina) obtenidas en una de las dos corridas efectuadas. En el gráfico de barras se representa la cuantificación de la intensidad relativa de las bandas de RI, expresada de manera relativa a la intensidad del estándar interno β -actina y se expresaron en unidades arbitrarias (UA) respecto al control. En color azul se representan los datos de las ratas del grupo C, en rojo los de las ratas del grupo F y en verde el grupo R. Cada valor representa la media \pm EEM de 2 experimentos independientes, utilizando 4 ratas por grupo.

VII.1.C. Efecto sobre la expresión génica de factores involucrados en procesos que regulan la masa.

VII.1.C1. Neogénesis.

Tanto el factor de transcripción Pdx1, como el marcador de células ductales, Ck19, mostraron una disminución significativa de su expresión génica en el grupo F con respecto al grupo C ($p < 0,05$). En cuanto al grupo R, Pdx1 mostró niveles semejantes a los obtenidos en el grupo C que resultaron, en consecuencia, significativamente mayores a lo que se habían encontrado en F ($p < 0,05$). En el caso del marcador de neogénesis, Ck19, el grupo R presentó valores similares a los encontrados en F, que fueron significativamente menores a los encontrados en el grupo C. Vale aclarar que, si bien la media obtenida en R es mayor a la de F, dicho incremento no fue suficiente para obtener valores semejantes a los del grupo C ni para diferenciarse significativamente de los del F (Figura VII.4).

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

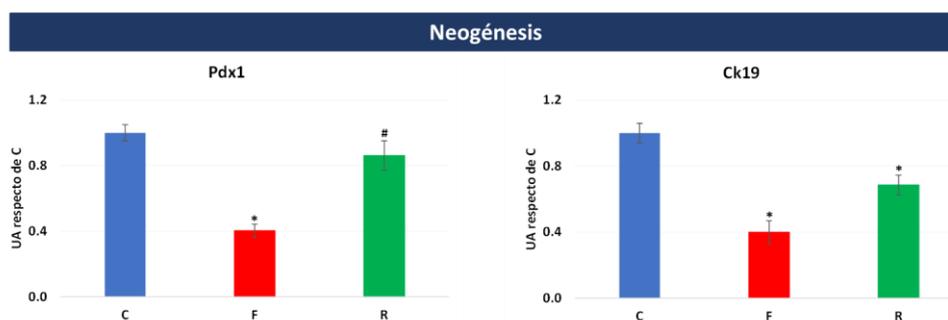


Figura VII.4. Expresión génica de marcadores de regulación de masa insular (Pdx1 y Ck19). Se muestra la expresión génica a nivel de ARNm (RT-qPCR) en isletos aislados de ratas de los grupos C (barra azul), F (barra roja), y R (barra verde). Se utilizó β -actina como estándar interno. Los valores fueron expresados en unidades arbitrarias (UA) respecto del nivel de ARNm determinado en los isletos del grupo C. Las barras representan las medias \pm EEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs C y # $p < 0,05$ vs F.

VII.1.C2. Apoptosis.

Se evaluaron distintos genes que participan en el proceso de apoptosis, tanto aquellos que favorecen su progresión (pro-apoptóticos), como los que previenen o impiden su desarrollo (anti-apoptóticos).

En la [Figura VII.5.A](#) se muestran los resultados obtenidos para la caspasa efectora, común a ambas vías apoptóticas (Caspasa-3; Casp3) y, las caspasas iniciadoras de las vías extrínseca (Caspasa-8; Casp8) y la vía intrínseca (Caspasa-9; Casp9). Todas las Caspasas mostraron un aumento significativo de su expresión en el grupo F respecto del C ($p < 0,05$). En los 3 casos, el grupo R presentó valores significativamente menores al grupo F y, adicionalmente, en el caso de Casp8 este valor fue también significativamente menor al del grupo C ($p < 0,05$).

Por otra parte, también estudiamos los niveles de expresión de los genes que codifican proteínas de la familia Bcl2. En el panel B de la [Figura VII.5](#) se muestra la expresión génica de dos marcadores pro-apoptóticos (Bad y Bax) y de un marcador anti-apoptótico (la proteína Bcl-2). En el caso de Bax, tanto F como R mostraron una disminución en sus niveles de expresión con respecto al grupo C, aunque ésta sólo fue significativa en el caso de R ($p < 0,05$). Bcl-2, en cambio, disminuyó sus niveles con respecto a C de manera significativa tanto el grupo F como en el grupo R ($p < 0,05$).

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

Adicionalmente, podemos destacar que Bad mostró valores de expresión significativamente mayores para el grupo F respecto del C ($p < 0,05$), lo cual no fue replicado en el grupo R, cuyos valores fueron semejantes al control.

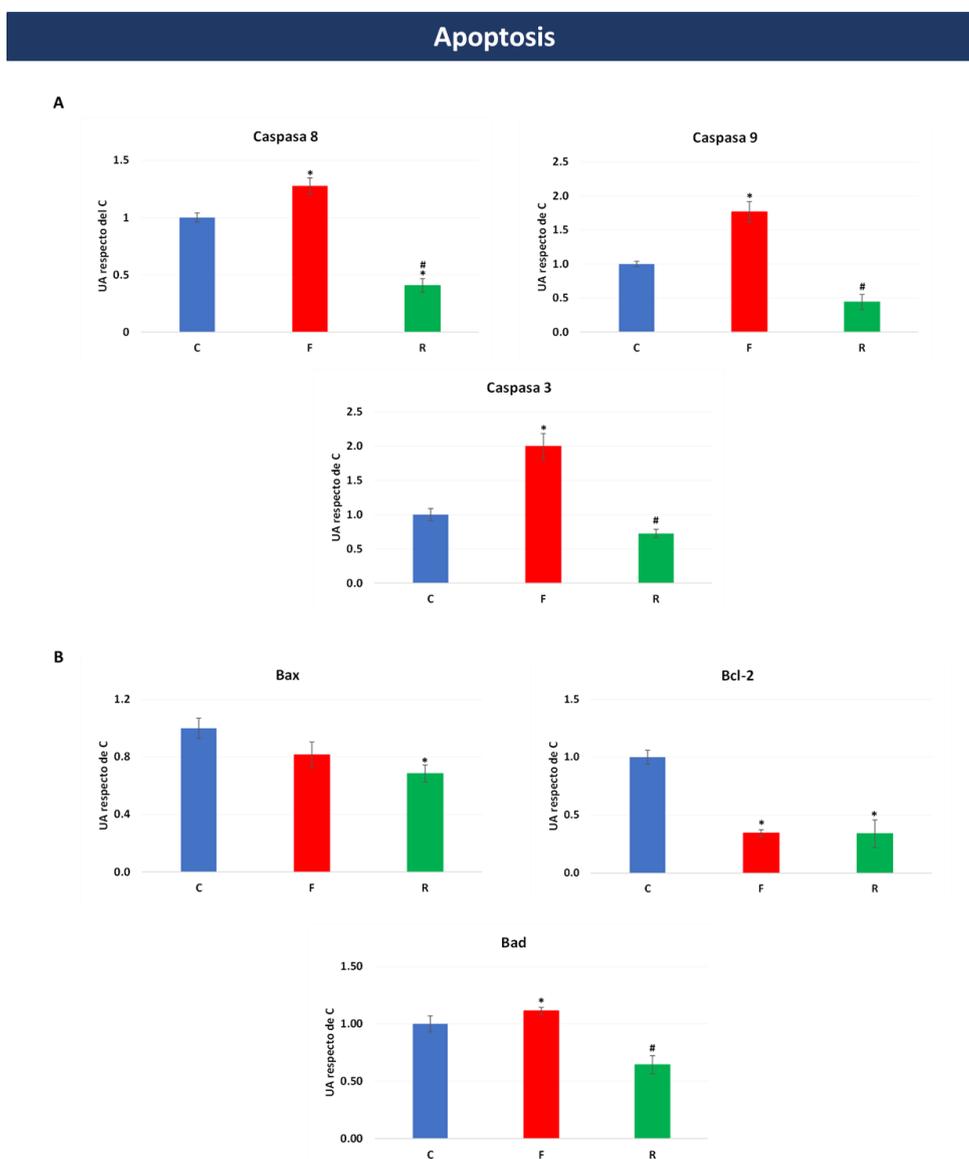


Figura VII.5. Expresión génica de marcadores pro- y anti-apoptóticos. A) Caspasas 8, 9 y 3, (Casp8, Casp9 y Casp3 respectivamente). **B)** Bax, Bcl-2 y Bad. Se muestra la expresión génica a nivel de ARNm (RT-qPCR) en islotes aislados de ratas de los grupos C (barra azul), F (barra roja), y R (barra verde). Se utilizó β -actina como estándar interno. Los valores fueron expresados en unidades arbitrarias (UA) respecto del nivel de ARNm determinado en los islotes del grupo C. Las barras representan las medias \pm EEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs C y # $p < 0,05$ vs F.

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

Con los niveles de expresión obtenidos para los genes que codifican los factores Bcl-2 y Bax, calculamos el índice de apoptosis, dado por la relación Bcl-2/Bax (248). Observamos que tanto en el grupo F como en R obtuvimos valores inferiores al del grupo control, al que le asignamos el valor unitario (0,42 y 0,50 para F y R respectivamente). Aunque en el grupo R el valor es levemente superior al del F, se evidenció un estado proapoptótico en ambos grupos.

Se estudió el nivel proteico de algunas de las enzimas y factores proteicos que intervienen en el proceso de apoptosis. Bad y Casp3 (clivada) mostraron un aumento en los islotes de ratas del grupo F, aunque dicho incremento sólo fue significativo en el caso de Casp3 ($p < 0,05$). El grupo R presentó en ambos casos valores semejantes al grupo C. Bcl-2, en cambio, mostró tanto en el grupo F como en el R valores semejantes al grupo control (Figura VII.6).

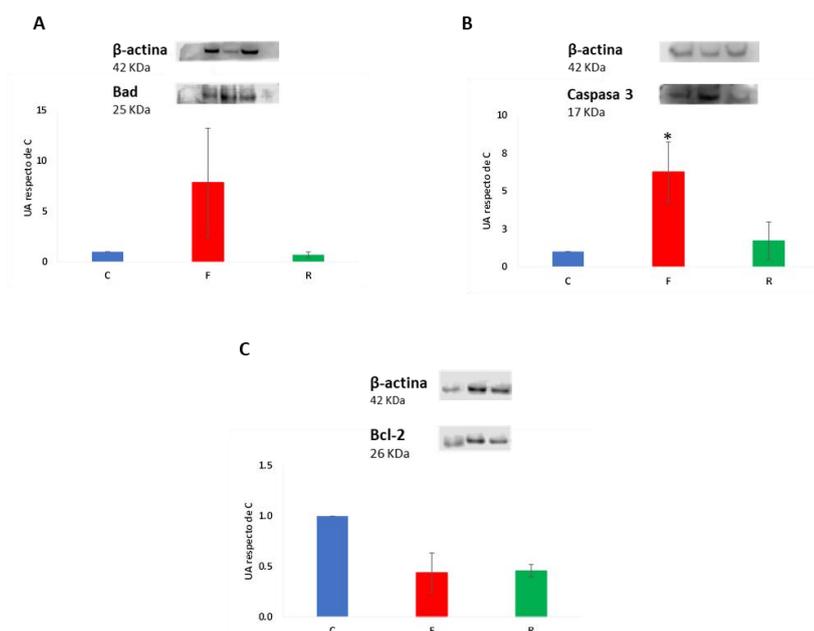


Figura VII.6. Wb de BAD, Caspasa 3 y Bcl-2 en homogenados de islotes. Se realizó en homogenados de islotes aislados de animales pertenecientes a los grupos C (azul), F (rojo) y R (verde) En cada panel se muestra una imagen representativa de las bandas obtenidas para las proteínas de interés (BAD, Caspasa-3 y Bcl-2) junto a los gráficos de barra que representa la cuantificación de la Intensidad relativa de las bandas de BAD (panel A), Caspasa-3 (panel B) y Bcl-2 (Panel C). Los valores mostrados se expresan de manera relativa a la intensidad del estándar interno β -actina y se expresaron en unidades arbitrarias (UA) respecto al obtenido en el grupo C. Cada valor representa la media \pm EEM de 2 experimentos independientes, utilizando 4 ratas por grupo. * $p < 0,05$ vs C.

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

VII.1.D. Efecto sobre la expresión de moduladores del EO de origen mitocondrial.

En cuanto al EO, estudiamos la expresión de los genes que codifican para la proteína desacoplante 2 (Ucp2), su regulador negativo, Sirtuina 1 (Sirt1) y positivo Ppar γ (receptor y activado por proliferadores de peroxisomas), así como para la enzima superóxido dismutasa 2 (Sod2) y catalasa.

Los niveles de Ucp2 fueron significativamente mayores en el grupo F respecto al grupo control ($p < 0,05$; [Figura VII.7.A](#)), mientras que en el grupo R, obtuvimos un valor intermedio entre el registrado en C y F que no mostró diferencias significativas con ninguno de ellos. En cuanto a los reguladores negativos, obtuvimos resultados discordantes, Sirt1 mostró un nivel de expresión significativamente menor en F y en R respecto a C ($p < 0,05$ en ambos casos) y Ppar- γ mostró que, si bien no se evidenciaron diferencias entre los islotes provenientes de ratas del grupo C y F, los islotes de ratas del grupo R mostraron un significativo aumento de su expresión génica ($p < 0,05$ respecto a C y a F).

En el panel B de la [Figura VII.7](#) vemos como Sod2 incrementó significativamente su expresión génica en islotes de ratas del grupo F con respecto al control. El grupo R logró revertir lo ocurrido siendo el nivel de expresión significativamente más bajo que en F y asemejándose así al del grupo control ($p < 0,05$). Cabe destacar que los cambios en la expresión de Sod2 tuvieron valores absolutos más elevados en comparación con los obtenidos de manera general en los otros genes, es decir que este gen se ve muy afectado por el cambio de dieta ejercido en el modelo. En este mismo panel también se presenta la expresión génica de Catalasa, la cual aumentó en el grupo F de manera significativa con respecto al grupo C ($p < 0,05$). Por su parte, el grupo R logró valores significativamente menores al F, pero estos no alcanzaron a ser similares al control.

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

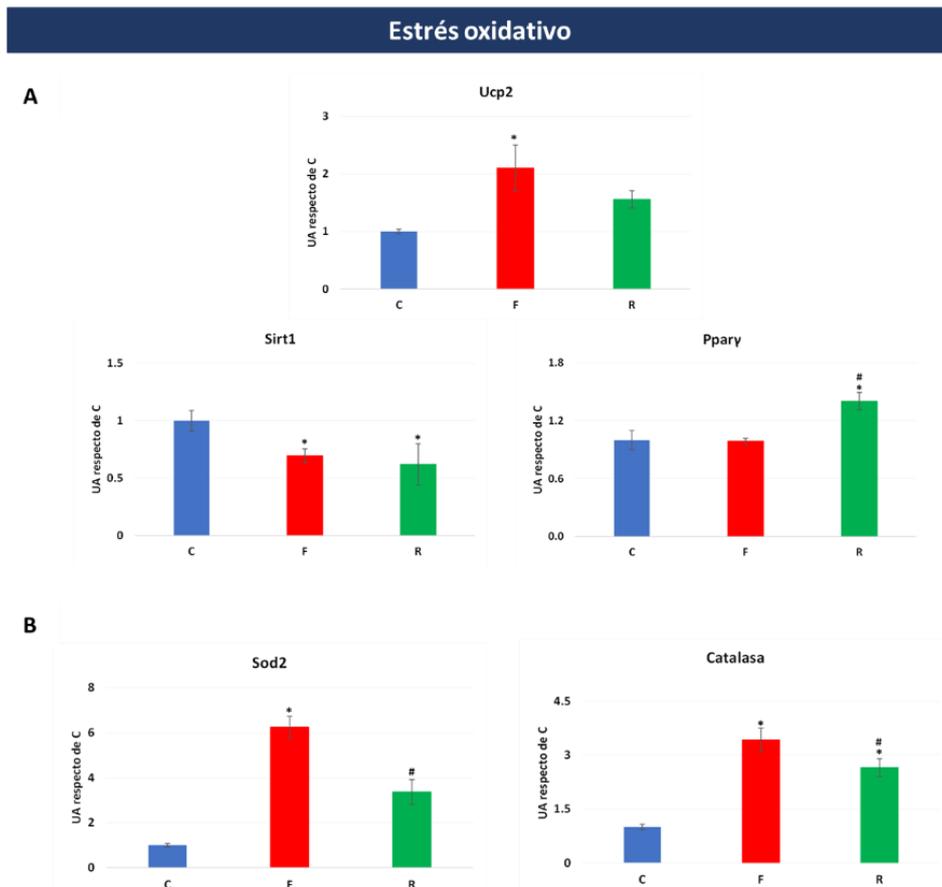


Figura VII.7. Expresión génica de marcadores de estrés oxidativo de origen mitocondrial. Panel A: Ucp2, Sirt1 y Pparg, panel B: Sod2, Catalasa. Se muestra la expresión génica a nivel de ARNm a (RT-qPCR) en islotes aislados de ratas de los grupos C (barra azul), F (barra roja), y R (barra verde). Se utilizó β -actina como estándar interno. Los valores fueron expresados en unidades arbitrarias (UA) respecto del nivel de ARNm determinado en los islotes del grupo C. Las barras representan las medias \pm EEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs C y # $p < 0,05$ vs F.

Las determinaciones de niveles proteicos de SOD2 y Catalasa mostraron un aumento de su expresión en el grupo F y una disminución en el grupo R, aunque en ninguno de los dos casos observamos diferencias significativas (Figura VII.8).

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

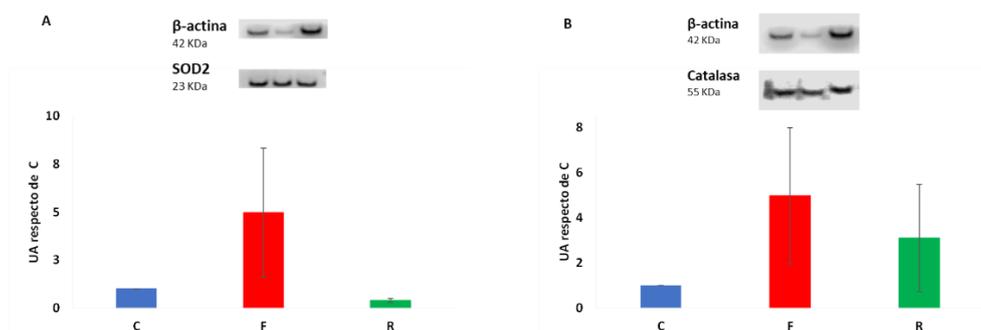


Figura VII.8. Wb de SOD2 y Catalasa en homogenados de islotes Utilizamos homogenados de islotes aislados de animales pertenecientes a los grupos C (azul), F (rojo) y R (verde). Los paneles A y B muestran imágenes representativas de las bandas de las proteínas de interés SOD2 y Catalasa, respectivamente. Además de los gráficos de barras en los que se cuantificó la Intensidad relativa de las bandas de SOD2 y Catalasa respecto a la intensidad del estándar interno β -actina. Los valores mostrados se expresan en unidades arbitrarias (UA) respecto al control, y cada valor representa la media \pm EEM de 2 experimentos independientes, utilizando 4 ratas por grupo.

VII.1.E. Efecto sobre la expresión génica de intermediarios de la cascada de señalización de leptina.

Se midió la expresión de algunos de los genes que codifican intermediarios y reguladores de la cascada de señalización intracelular activada por leptina, entre los que incluimos al receptor de leptina (ObRb), el intermediario catalítico intracelular Jak2 (enzima Janus quinasa 2), las proteínas 3 y 5b “transductoras de la señal y activador de la transcripción” (Stat3 y Stat5b) y su regulador negativo, la proteína 2 “supresora de señalización por citoquinas” (Socs2).

El receptor de leptina presentó una disminución significativa de su expresión en el grupo F respecto al control ($p < 0,05$), al tiempo que el intermediario intracelular Jak2 no mostró diferencias significativas entre ninguno de los tres grupos experimentales (Figura VII.9).

Los mediadores intracelulares Stat3 y Stat5b exhibieron en el grupo F un aumento significativo de su expresión al ser comparados con la expresión obtenida en el grupo control ($p < 0,05$). Sin embargo, en el grupo R presentaron diferentes comportamientos, mientras que Stat3 sufrió un descenso abrupto de su expresión, Stat5b presentó un valor significativamente mayor al obtenido en el grupo control ($p < 0,05$).

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

Por último, el regulador negativo *Socs2* sólo evidenció cambios significativos en su expresión en el grupo R, en donde se notó una disminución en comparación tanto al grupo control como al F ($p < 0,05$; Figura VII.9).

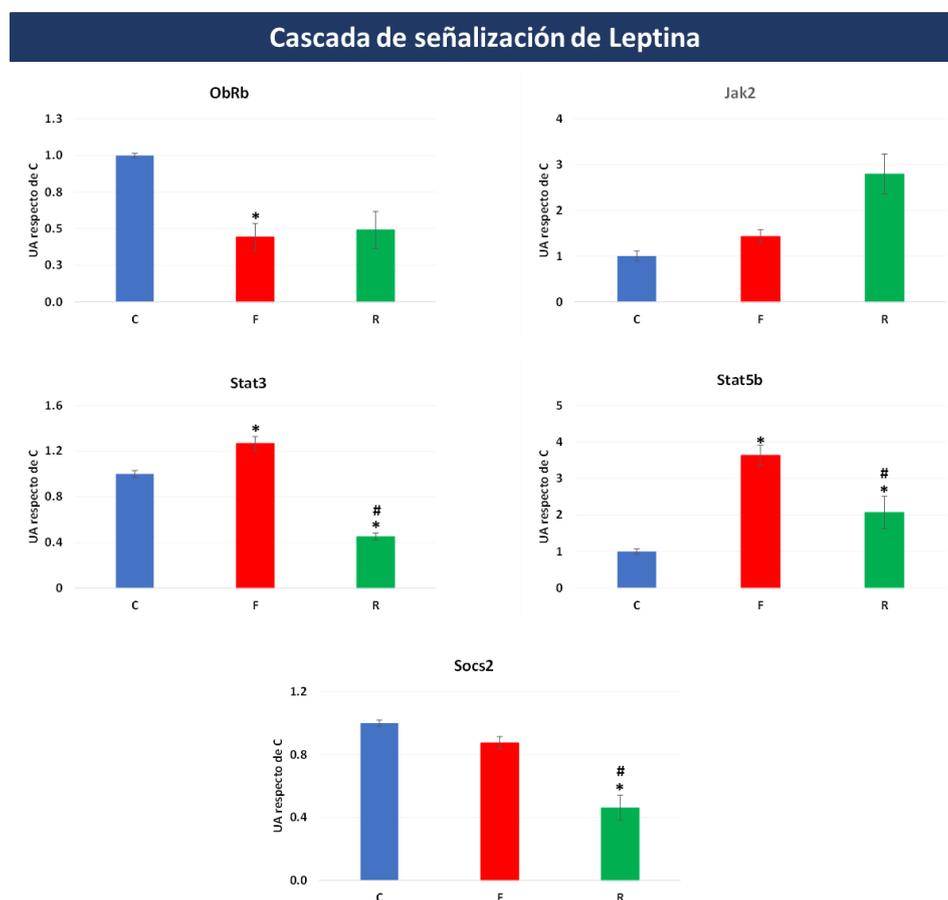


Figura VII.9. Expresión génica de mediadores de la cascada de señalización de leptina: *ObRb*, *Jak2*, *Stat3* y *5b* y *Socs2*. Se muestra la expresión génica a nivel de ARNm a (RT-qPCR) en islotes aislados de ratas de los grupos C (barra azul), F (barra roja), y R (barra verde). Se utilizó β -actina como estándar interno. Los valores fueron expresados en unidades arbitrarias (UA) respecto del nivel de ARNm determinado en los islotes del grupo C. Las barras representan las medias \pm EEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs C y # $p < 0,05$ vs F.

VII.1.F. Efecto sobre la expresión de genes que codifican factores que modulan el proceso de angiogénesis.

Finalmente, analizamos el efecto de las dietas sobre la expresión de los genes que codifican tanto la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (*Hif α*), como los que expresan el factor de crecimiento endotelial vascular (*Vegf α*) y su receptor, *Vegfr2*; tres factores íntimamente relacionados con la angiogénesis (Figura VII.10).

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

Los islotes obtenidos de animales provenientes de los grupos F y R mostraron niveles del ARNm de Hif1 α que resultaron ser significativamente menores que los de animales del grupo C ($p < 0,05$). Por otro lado, Vegf α presentó un aumento significativo de la expresión en el grupo F respecto al observado en islotes de animales del grupo C ($p < 0,05$), y no mostró diferencias con este último en el grupo R. Para terminar, al analizar los resultados hallados respecto a la expresión del Vegfr2, podemos mencionar que los islotes de ratas del grupo F no mostraron diferencias con los de ratas del grupo C y, que el único cambio que se registró fue la caída en los niveles de expresión que experimentaron los islotes de las ratas del grupo R respecto tanto a sus pares del grupo C como a las del grupo F ($p < 0,05$ respectivamente).

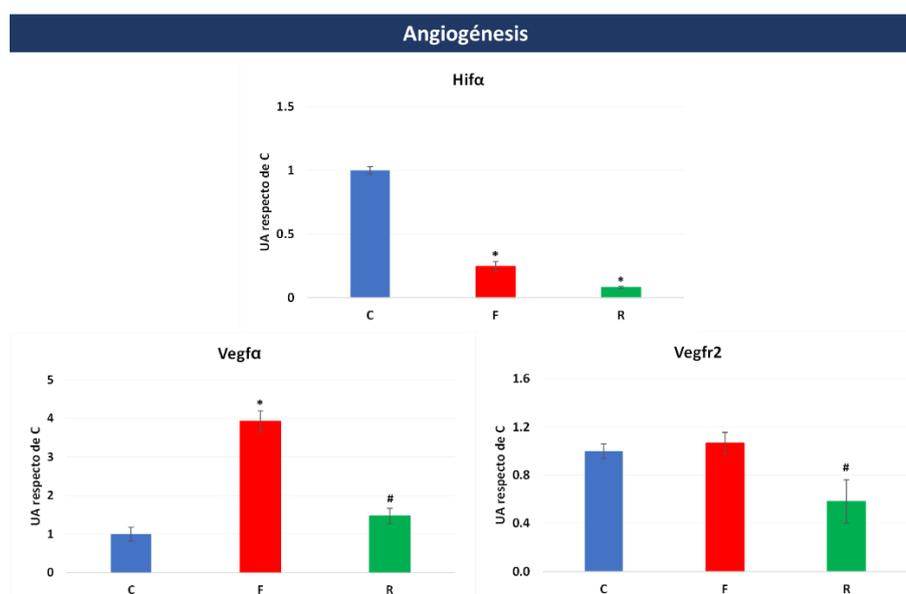


Figura VII.10. Expresión génica de marcadores de angiogénesis: Hif1 α , Vegf α y Vegfr2. Se muestra la expresión génica a nivel de ARNm a (RT-qPCR) en islotes aislados de ratas de los grupos C (barra azul), F (barra roja), y R (barra verde). Se utilizó β -actina como estándar interno. Los valores fueron expresados en unidades arbitrarias (UA) respecto del nivel de ARNm determinado en los islotes del grupo C. Las barras representan las medias \pm EEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs C y # $p < 0,05$ vs F.

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

VII.2. Discusión y conclusiones.

VII.2.1. Discusión.

VII.2.1.A y B. Impacto en la expresión del gen de Insulina y de intermediarios de su vía de señalización.

Se examinó la expresión de insulina y de otros genes que forman parte de su vía de señalización a nivel de islotes. Tanto la insulina, como los mediadores Irs1, Irs2 y Akt mostraron un comportamiento similar con un aumento de sus niveles en el grupo F y una recuperación a valores similares al control en el grupo R. Esto sugiere la existencia de mecanismos adaptativos y compensatorios frente a la IR y a la TGA, establecidas durante el estado prediabético, y una reversión de estas alteraciones en el grupo R.

La expresión génica de insulina concuerda con el resultado de secreción, mostrado en el Capítulo VI, y refuerza la hipótesis de la hiperfunción de células β bajo las condiciones estudiadas. Además, da cuenta de que la intervención alimentaria elegida influyó tanto en la liberación de los gránulos de insulina preformados, como en las primeras etapas de su biosíntesis. Es decir que su impacto fue tanto a corto como a largo plazo.

El efecto de la DRF sobre la expresión de intermediarios de la vía de señalización de insulina ha sido estudiado previamente por Maiztegui y colaboradores en un estudio llevado a cabo con ratas de la cepa Wistar durante 21 días, en el que no encontró cambios en la expresión de Irs1 e Irs2 (230). Teniendo en cuenta este reporte y nuestros resultados, podemos plantear que para que ocurran modificaciones a nivel del ARNm insular de estos dos genes se necesita una PD instalada y que haya perdurado y progresado en el tiempo, tal como ocurre a los 70 días. Otros autores como Fariña (229), reportaron que la transcripción de Irs1 e Irs2 se encuentra disminuida en tejido adiposo visceral de animales que consumen DRF por 21 días. Esto da cuenta de que la regulación de la expresión génica por parte de los diferentes hábitos alimenticios influye de manera específica en cada tejido en particular.

Por otra parte, tanto en el trabajo de Maiztegui como en esta tesis se encontró que los genes Ri y Pi3k disminuyeron su expresión en el grupo F. Es decir que sufren

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

alteraciones tempranamente en el desarrollo de la PD y que estas se mantienen a largo plazo. En cuanto al estudio de la reversión, mientras Maiztegui (utilizando un antioxidante) logró revertir la alteración en la expresión de ambos genes, nosotros sólo encontramos que Ri logró valores semejantes al control. Por lo tanto, la recuperación de la expresión de Pi3k pareciera ser más compleja en comparación al resto de los mediadores estudiados dentro de esta vía.

VII.2.1.C. Mantenimiento de la masa de células β .

VII.2.1.C1. Neogénesis.

El estudio también abordó la expresión de marcadores de neogénesis celular β , encontrando una disminución de Ck19 en el grupo F. Según estos resultados, el proceso de neogénesis se ve afectado por el estado PD y no logra ser un mecanismo compensatorio frente a las anomalías generadas por la fructosa. Nuestro grupo, utilizando el modelo de DRF por 21 días, documentó una disminución tanto en el número de islotes pancreáticos por unidad de área, como en la densidad de volumen de células β (231). Por lo tanto, aunque no hayamos efectuado medidas morfométricas, sería coherente pensar que nuestros animales con 70 días de tratamiento también presenten estas alteraciones.

Por su parte, el grupo R mostró para ambos genes una tendencia a la reversión, aunque sólo en el caso de Pdx1 los valores fueron iguales al control. Esto es importante, ya que este gen también es clave para la activación de la expresión del gen de insulina y, como vimos anteriormente, el grupo R logra normalizar tanto la expresión como la secreción. Además, es evidente que existen muchos otros elementos regulatorios de una hormona tan crucial como es la insulina ya que el grupo F logra mantener la hipersecreción de insulina a pesar de la disminución de la expresión de Pdx1. Otro factor que no hay que perder de vista en esta puja molecular compleja es el tiempo del tratamiento y las modificaciones epigenéticas. En relación a esto último, recientemente se ha demostrado que uno de los mecanismos que Pdx1 utiliza para promover la activación del promotor de insulina es a través de modificaciones en histonas (249).

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

VII.2.1.C2. Apoptosis.

Todas las caspasas evaluadas presentaron un aumento de su expresión génica en el grupo F, evidenciando que la apoptosis en los islotes pancreáticos sería uno de los procesos promovidos por la DRF. Este resultado concuerda con lo previamente hallado por otros autores (230) y, además, en el caso particular de la Caspasa 3 fue acompañado por un aumento de su expresión proteica tanto a 21 (Capítulo IV) como a 70 días. Resultó interesante que el grupo R haya logrado revertir este perfil apoptótico, presentando niveles de expresión iguales (Caspasas 3 y 9) o hasta menores (Caspasa 8) que los encontrados en el grupo control.

La misma tendencia en cuanto al aumento de la apoptosis en el grupo F y la disminución de este efecto hasta valores menores al control en el grupo R se observó con la proteína pro-apoptótica Bad. Acompañando estos datos, el índice de apoptosis (Bcl-2/Bax) evidenció la prevalencia del efecto pro-apoptótico en los grupos que habían consumido DRF (F y R) respecto del grupo C. Además, el valor de este índice fue mayor para el grupo R en comparación con el F, por lo que podemos inferir un mayor grado de apoptosis de células insulares en los animales F que en los R.

VII.2.1.D. EO y defensa contra ROS.

Los genes de las tres proteínas estudiadas (UCP2, SOD2 y catalasa) cuya función es atenuar de diferentes maneras el EO, mostraron el mismo perfil de alteraciones frente a los cambios de dieta. Todas aumentaron su expresión en el grupo sometido a DRF y presentaron valores similares o iguales al control en el grupo R. Esta evidencia nos lleva a inducir que los islotes de ratas del grupo F experimentan un aumento del EO y, en consecuencia, para paliar esta anomalía se genera un aumento de las proteínas de defensa contra ROS de una manera compensatoria.

VII.2.1.D1. UCP2

Se conoce que los niveles de expresión de Ucp2 dependen de la concentración del ion superóxido (O_2^-) (250,251), por lo que un aumento en el EO dispara su transcripción. En el trabajo publicado por Castro, se encontró que tanto los niveles de ARNm como de proteína estaban aumentados en el hígado de ratas alimentadas por 21 días con DRF (228). Esto denota que el efecto protector ejercido por UCP2 ocurre en diversos

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

tejidos y desde etapas tempranas donde se inicia la PD, hasta fases más tardías como son 70 días. Además, está documentado que en las células insulares un aumento de la expresión de esta proteína promueve la fuga de protones disminuyendo el gradiente que activa la fosforilación del ADP para formar ATP, con la consecuente disminución de la SIEG (252,253). Con respecto a esto, en el período estudiado, al igual que el caso de Pdx1, esta alteración no afecta la SIEG, pero seguramente en tiempos prolongados del tratamiento terminaría generando fallas irreversibles en la función insular.

VII.2.1.D2. Defensa antioxidante, enzimas SOD2 y catalasa.

Diversos trabajos señalaron la relación entre DT2 y SOD2, tanto que los polimorfismos de esta enzima se asocian a la enfermedad (254) como la detección de su sobreexpresión en paciente con DT2 (255) o personas obesas no diabéticas con antecedentes familiares de la enfermedad (256). En relación con la función insular, Kang y colaboradores realizaron la deleción heterocigota de SOD2 en ratones alimentados con una dieta rica en grasas y encontraron cambios en la SIEG (257).

En concordancia con nuestros resultados, ya ha sido reportado que, en islotes expuestos a hiperglucemia, la catalasa incrementa su expresión a modo de mecanismo de defensa frente al aumento de ROS (258).

VII.2.1.E. Cascada de señalización de leptina.

Los mediadores Stat3 y Stat5b se encontraron aumentados en los animales alimentados con DRF por 70 días y en el grupo R disminuyeron significativamente respecto del grupo F. En cuanto al receptor de leptina (ObRb) presentó una marcada disminución de la expresión en el grupo F. A los 21 días de tratamiento con DRF, también fue hallada la disminución de ObRb, aunque en esa publicación no se reportaron diferencias para Jak2, Socs2 y Stat5b (230).

El comportamiento general de esta vía de señalización coincide con lo hallado en la cascada de insulina y, si bien no se midió leptina sérica, nos hace sospechar que en nuestro modelo exista una LR, acompañada por hiperleptinemia. Esta hipótesis también se sostiene en que a los 21 días de DRF se reportó que los adipocitos blancos experimentan disfunciones endócrino-metabólicas en las que se encuentra la disminución de la sensibilidad al efecto estimulatorio de la insulina sobre la secreción

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

de leptina, aumento de la secreción y de la transcripción de leptina (259,260). Además, se conoce que pacientes con sobrepeso desarrollan LR que impacta a nivel de las células β contribuyendo a la desregulación del eje adipo-insular y promoviendo el desarrollo de hiperinsulinemia y DT2 (261).

VII.2.1.F. Angiogénesis.

Encontramos que Vegf α siguió el comportamiento general, aumentando su expresión en el grupo F y logrando presentar valores similares al control en el grupo R. Con respecto a la expresión de Hif α ésta fue disminuida tanto en F como en R.

El Vegf α es el principal factor angiogénico y en células β , su presencia es necesaria para el correcto crecimiento pancreático y desarrollo de fenestraciones capilares específicas de los islotes (262,263). Los resultados encontrados en bibliografía muestran que personas con síndrome metabólico poseen niveles plasmáticos aumentados de VEGF α y que estos se asocian a diferentes variables, entre las que se encuentran la glucemia y la insulinemia (264). Estos datos refuerzan la probabilidad de un vínculo potencial entre este factor angiogénico y riesgo metabólico.

La expresión de Vegf α es inducida por HIF α , pero en nuestro caso, sospechamos que otros mecanismos impulsaron el aumento de su expresión ya que HIF α se encuentra disminuido en ambos grupos tratados con DRF (F y R). También vimos anteriormente que PI3K está disminuida en estos grupos y eso tendría sentido ya que la transcripción de Hif α es estimulada por medio de la vía PI3K (265). Se sabe que la delección de Hif α en células β de ratón genera TGA debido a una alteración de la SIEG (266) y que las complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes se relacionan con la desregulación de Hif α (267).

VII.2. Conclusiones.

En este capítulo se estudiaron los cambios en la expresión génica generados por la dieta. Se observó una tendencia recurrente en la mayoría de los genes estudiados, donde los cambios de expresión génica en los islotes del grupo alimentado con fructosa (grupo F) se normalizaron en el grupo R. Este fenómeno sugiere que la modificación de

Capítulo VII: Expresión génica (70 días).

la dieta tras la tercera semana de consumo de fructosa puede revertir alteraciones a nivel transcripcional.

Consideramos que algunas de las alteraciones halladas a este nivel podrían ser parte de los mecanismos de adaptación y compensación desarrollados por el islote pancreático en un ambiente metabólico prediabético. En este sentido, hipotetizamos que, frente a la resistencia a la insulina y a la leptina, se genera un aumento de la expresión de insulina y de mediadores de ambas vías, y que el aumento del EO disparó la transcripción de enzimas de defensa contra ROS y de mediadores de angiogénesis. Este estado transcripcional, activado por la emergencia metabólica creada por la DRF, fue revertido luego de 49 días de dieta saludable en el grupo R.

Otros procesos estudiados, como son la apoptosis y la neogénesis, no pudieron ser contrarrestados por el islote. En relación con esto, el grupo F mostró un marcado aumento de la apoptosis y una disminución de su neogénesis y ambas alteraciones fueron parcial o totalmente equilibradas en el grupo R.

Finalmente, los resultados de expresión proteica fueron considerados preliminares. En este caso, nos encontramos con la problemática de no contar con todos los anticuerpos necesarios para realizar las validaciones de las RT-qPCRs. En consecuencia, el número de muestras evaluadas fue pequeño y las diferencias estadísticas no llegaron a ser significativas.

Capítulo VIII

Análisis general de metilación diferencial en el ADN de islotes y posible repercusión a nivel transcripcional.

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

VIII.1. Resultados.

En este capítulo analizamos la metilación de CpGs en islotes pertenecientes a los grupos C, F y R. Este análisis se basó en determinar los sitios DM, asociarlos a los genes correspondientes y a las vías que estos enriquecen. Además, estudiamos la posible reversión de estas alteraciones y seleccionamos algunos genes de interés para evaluar el impacto a nivel transcripcional.

VIII.1.1. Identificación de sitios CpGs DM entre los grupos experimentales.

Analizamos el grado de metilación diferencial en secuencias CpGs por comparación entre los grupos (C vs F; C vs R; y F vs R) y encontramos un total de 1005 secuencias CpGs DM:

C vs F: el ADN de los islotes F presentó 132 secuencias CpGs DM respecto al de los islotes C, siendo 88 CpGs hipometiladas (HipoM) y 44 secuencias hipermetiladas (HiperM).

C vs R: encontramos 518 secuencias CpGs DM. En el ADN de los islotes del grupo R obtuvimos 486 CpGs HipoM y 32 HiperM respecto al ADN de los islotes de ratas del grupo C.

F vs R: en esta última comparación encontramos 355 CpGs DM, siendo que en el ADN de islotes R encontramos 313 HipoM y 42 HiperM respecto al de las células insulares de ratas del grupo F.

De este análisis surgió que la mayoría de las modificaciones se encontraron en la comparación entre el grupo C con el grupo R y el efecto predominante en las comparaciones efectuadas fue la hipometilación (siendo mayor en el grupo F respecto al C y en el R respecto tanto al F como al C) ([Figura VIII.1](#)).

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

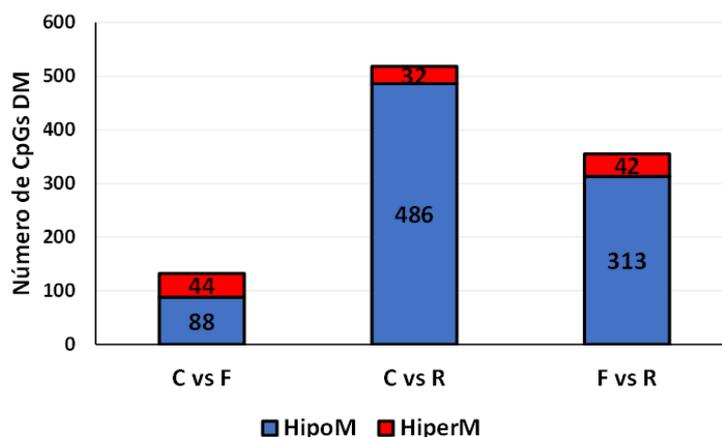


Figura VIII.1. Número de sitios CpGs DM en cada comparación. Se grafica el número de secuencias CpGs DM en cada comparación (C vs F; C vs R y F vs R). En las barras se distinguen con diferentes colores las secuencias CpGs hipometiladas (sector azul -inferior- en cada barra) e hipermetiladas (sector rojo -superior- en cada barra). Los números en cada subsector indican la cantidad de secuencias CpGs DM para cada uno. N = 1005. Meth.diff > |5|. q<0,05.

VIII.1.2 Distribución en el genoma de los sitios CpGs DM.

VIII.1.2.A. Distribución cromosómica.

En relación con la ubicación cromosómica de las 1005 CpGs DM, se observó que sólo los cromosomas 10, 21 y 22 no presentaron cambios en la metilación de sus sitios CpGs. Además, se destacó que el cromosoma mitocondrial (cromosoma M) fue el que registró el mayor número de modificaciones (681, lo que representa el 67,8% del total de sitios CpGs DM). Las 324 secuencias CpGs DM restantes se distribuyeron a lo largo de todo el genoma, siendo los cromosomas 1, 2, 9, 14 y 19 los que alojaron a la mayoría de los cambios: 63 (6,27%), 23 (2,29%), 107 (10,66%), 19 (1,89%) y 30 (2,99%) sitios CpGs DM, respectivamente ([Figura VIII.2.A](#)).

Tal como se observa en la [Figura VIII.2.B](#), en el cromosoma mitocondrial encontramos sitios DM en las tres comparaciones efectuadas, siendo más numerosos los cambios registrados en la comparación C vs R. Por otro lado, en los cromosomas nucleares la distribución fue más despareja:

- En los cromosomas 1, 2, 3, 4, 9, 14, 15, 16 y 19 encontramos cambios en la metilación de sitios CpGs en las tres comparaciones efectuadas. En el

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

cromosoma 9, la gran mayoría de modificaciones se registraron en las comparaciones C vs F y F vs R, mientras que en los cromosomas 1, 2, 4 y 19 las comparaciones más representadas fueron las C vs R y F vs R.

- En los cromosomas sexuales (X e Y) y en los cromosomas autosómicos 5, 6, 8, 13, 17 y 20 no encontramos cambios en la metilación cuando comparamos al grupo F contra el C.
- El cromosoma 12 no registró diferencias en la comparación C vs R.
- Los cromosomas 7, 11 y 18 sólo registraron cambios en la metilación de sitios CpGs en la comparación F vs R.

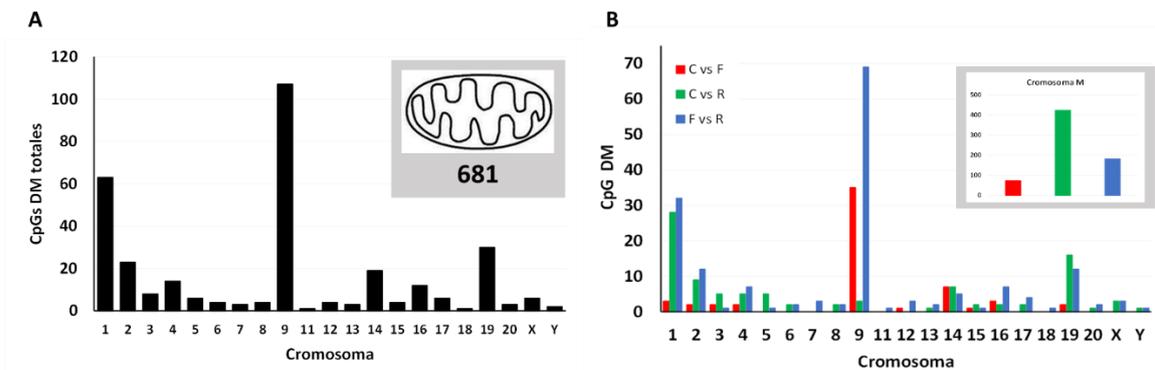


Figura VIII.2. Distribución cromosómica de los 1005 sitios CpGs DM. A) El gráfico representa los 324 sitios CpGs DM alojados en los cromosomas nucleares, el inset hace mención a los 681 sitios DM hallados en cromosoma M. B) Discriminación de los sitios DM para cada una de las comparaciones efectuadas tanto para el ADN mitocondrial (inset de arriba a la derecha) como para los cromosomas nucleares. Para cada cromosoma, se grafican en rojo los sitios DM hallados en la comparación C vs F, en verde los de C vs R y en azul los de F vs R.

VIII.1.2.B. Distribución en las diferentes regiones de los cromosomas.

En cuanto a la localización de las 1005 secuencias DM dentro de los cromosomas, hicimos el análisis de si estas se encontraban en regiones no codificantes (intergénicas) o dentro de las secuencias correspondientes a los genes. En esta última región hicimos la distinción de si las secuencias se localizaban dentro del promotor o en el “cuerpo del gen” (exones e intrones). Observamos que las secuencias CpGs DM aparecían representadas en las tres regiones cromosómicas descritas, siendo la región cuerpo

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

del gen la más preponderante (65,57%), seguida por la región intergénica (31,64%) y el resto (2,99 %) que se encontraba en el promotor del gen (Figura VIII.3).

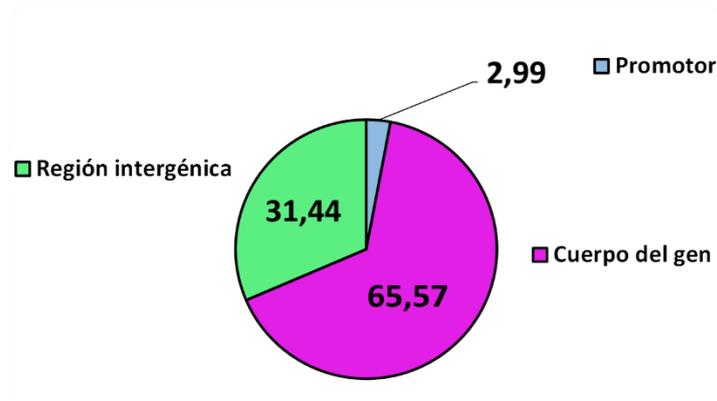


Figura VIII.3. Distribución porcentual de los sitios CpGs DM en regiones cromosómicas. En celeste se indica el porcentaje de sitios ubicados en el promotor, en púrpura los del cuerpo del gen y en verde los de la región intergénica. Como se detalló en el Capítulo III, se consideró promotor a los sitios ubicados en posiciones entre -4000 y +200 pb del inicio de transcripción, cuerpo del gen a los localizados entre +200 y +2000 pb y región intergénica a los alojados en posiciones > +2000 ó < -4000. N=1005.

VIII.1.2.C. Distribución en Islas CpGs, *Shores* y *Open Sea*.

En otro tipo de análisis, estudiamos si las metilaciones de residuos de citosina se ubicaban dentro de las regiones llamadas Islas CpGs, en sus adyacencias (*Shores*) o en regiones más alejadas (*Open Sea*) siguiendo los criterios enunciados en el Capítulo III.

Tal como se observa en la Figura VIII.4, la inmensa mayoría de las secuencias DM se localizaron en *Open Sea* y sólo una fracción minoritaria lo hizo en Islas CpGs y *Shores*.

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

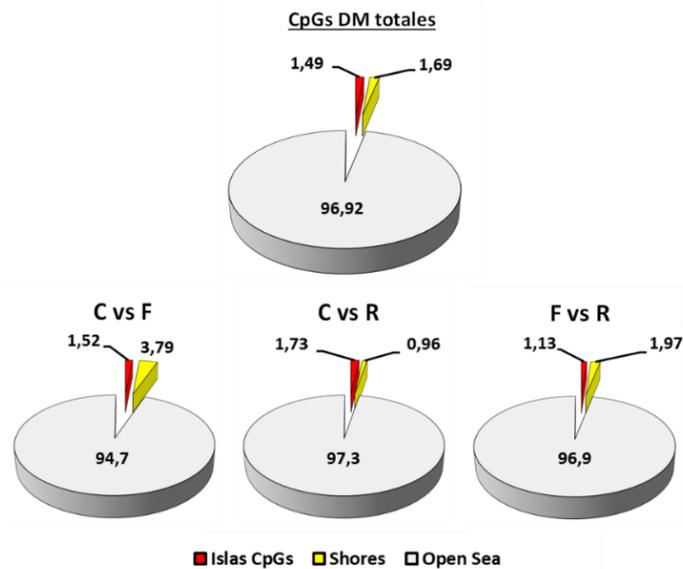


Figura VIII.4. Distribución de los sitios CpGs DM en Islas CpG, *Shores* u *Open Sea*. Se analizó la localización de todas las secuencias CpGs DM en conjunto (N=1005; panel superior) y en cada una de las comparaciones efectuadas (panel inferior): C vs F (N=132), C vs R (N=518) y F vs R (N=355) respecto a su ubicación en Islas CpG (sectores rojos), *Shores* (sectores amarillos) u *Open Sea* (sectores grises).

La [Tabla VIII.1](#) compila información de la ubicación de las diferentes secuencias CpGs encontradas en Islas CpG y *Shores* para cada comparación, identificando el cromosoma y la región cromosómica en la que se localizan, así como el gen asociado a ellas.

Tabla VIII.1. Distribución de las secuencias CpGs DM ubicadas en Islas o *Shores*.

	Cromosoma	CpG DM	Isla CpG/shore	Gen afectado	Ubicación
C vs F	1	11908750	Isla	LOC310926	Intergénico
	4	77452044	Shore	Pdia4	Intergénico
	14	46565022	Shore	Rn18s	Intergénico
		46580797			Promotor
		46645052			
19	5836811	Isla	Cdh8	Intergénico	
C vs R	1	11911613	Isla	LOC310926	Intergénico
		11911779			
		11911789			
		11912152			
		11912154			
		11912219			
	19	11971894	Shore	Mcc	
	4	77446682	Shore	Pdia4	Intergénico
	14	46643559	Shore	Rn18s	Cuerpo del gen
	16	66344943	Shore	Ces1f	Intergénico
C vs R	19	5836681	Isla	Cdh8	Intergénico
		5836780			
		5836911			
X	73101686	Shore	Zfp36l3	Intergénico	
C vs R	1	11911196	Isla	LOC310926	Intergénico
		11966932		Mcc	
		11966978			
	4	77446908	Shore	Pdia4	Intergénico
		77447065		Fam13a	
		89678403			
	6	30643175	Shore	LOC257642	Promotor
	13	89441171	Isla	Cfap126	Cuerpo del gen
	14	46580797	Shore	Rn18s	Intergénico
		46643649		Rn45s	Cuerpo del gen
46643655					

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

VIII.1.3. Análisis de los genes asociados a las CpGs DM.

VIII.1.3.A. Número de genes asociados a CpGs DM por comparación.

Mediante el análisis de la ubicación en el genoma de los sitios CpGs DM pudimos identificar cuáles serían los genes que podrían verse afectados en su expresión en cada una de las comparaciones. La mayoría de los genes asociados se encontraron en las comparaciones del grupo R con el grupo F (69 genes) y con el C (65 genes), mientras que en la comparación C vs F sólo encontramos 28 genes (Figura VIII.5). Sin embargo, teniendo en cuenta que existen genes que fueron afectados en dos o en tres de las comparaciones efectuadas, la suma total se reduce a 104 genes diferentes.

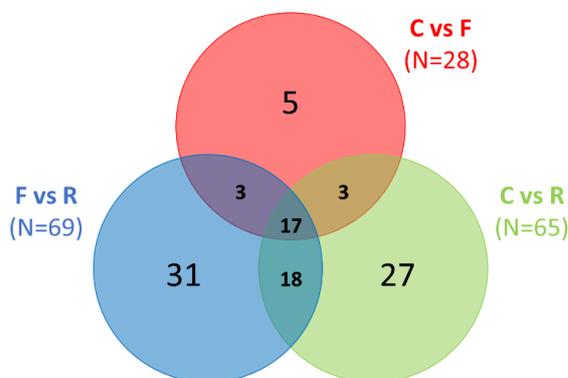


Figura VIII.5. Número de genes asociados a las CpGs DM en cada comparación. El diagrama de Venn grafica el número de genes asociados a las secuencias CpGs DM en cada una de las comparaciones: en rojo C vs F, en verde C vs R y en azul F vs R. N=104. $q < 0,05$.

Como se visualiza en el diagrama de Venn de la Figura VIII.5, 63 genes experimentaron metilación diferencial exclusivamente en una de las tres comparaciones posibles (5 para C vs F; 31 para F vs R y 27 para C vs R), 24 genes fueron afectados simultáneamente en dos comparaciones, y 17 genes mostraron metilación diferencial en las tres comparaciones (Tabla VIII.2).

Tabla VIII.2. Identificación de los genes que se encuentran simultáneamente modificados en más de una comparación.

Comparación	Número de genes DM	Genes DM
C vs F + C vs R + F vs R	17	Atg7, Atp6, Cox1, Cox2, Cox3, Cytb, Emb, LOC310926, Nd1, Nd2, Nd4, Nd5, Nd6, Pdia4, Rn18s, Uxs1 y Zfp868
C vs F + F vs R	3	Adgre4, Lzts1 y Vom2r7
C vs F + C vs R	3	Cdh8, LOC363337 y LOC499742
F vs R + C vs R	18	Atp8, Ces1f, Dazl, Ddx3, Erap1, Gas8, LOC257642, Man2b1, Mcc, Nd3, Rras2, Rwdd1, Smok2a, Spetex-2F, Tsn, Vom2r37, Vom2r9 y Zfp3613

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

VIII.1.3.B. Identificación de los 104 genes asociados a CpGs DM y localización en las diferentes regiones génicas.

Para cada comparación efectuada, identificamos los genes modificados en los cromosomas (ADN nuclear) o en el ADNmt. En cada uno registramos tanto el número de sitios CpGs DM como las regiones génicas en las que se localizaron y si correspondían a una hipometilación o a una hipermetilación.

En la [Tabla VIII.3](#), la cual se dividió en tres secciones que corresponden a las 3 comparaciones efectuadas (C vs F, C vs R y F vs R) se resumen los registros efectuados en el ADN nuclear. Los genes identificados con un nombre que comienza con el prefijo “LOC” seguido de un número (por ejemplo, LOC310926) hacen referencia a loci genómicos provisionales que aún no han sido completamente caracterizados o anotados en el genoma de referencia, pero que se consideran potencialmente funcionales.

Tabla VIII.3 Genes asociados a las CpGs DM (HipoM/HiperM) y su ubicación génica para cada comparación en el ADN nuclear.

C vs F				
ADN nuclear				
Gen	ID	N° de CpG HipoM	N° de CpG HiperM	Región génica
Rn18s	NR_046238.1	2	0	Promotor
Adgre4	NM_001007558.1	1	0	Intergénico
Atg7	NM_001012097.1	0	1	
Bcl2l11	NM_171988.2	0	1	
Brca2	NM_031542.2	1	0	
Cdh8	NM_053393.2	1	0	
Emb	NM_053719.1	2	0	
LOC310926	NM_001025002.1	0	1	
LOC363337	NM_001014221.1	0	1	
LOC498368	NM_001017500.1	1	0	
LOC499742	NM_001024308.1	1	0	
LOC680200	NM_001139491.1	1	0	
Lzts1	NM_153470.1	1	0	
Pdia4	NM_053849.1	0	1	
Rn18s	NR_046237.1	2	2	
Tdrd3	NM_001012043.1	1	0	
Uxs1	NM_139336.1	0	34	
Vom2r7	NM_001099463.1	0	1	
Zfp868	NM_001009538.1	0	2	

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

C vs R				
ADN nuclear				
Gen	ID	Nº de CpG HipoM	Nº de CpG HiperM	Región génica
Rn18s	NR_046239.1	0	1	Cuerpo del gen
LOC363337	NM_001014221.1	1	0	
Vom2r9	NM_001099465.1	7	1	Intergénico
LOC310926	NM_001025002.1	6	0	
Rras2	NM_001013434.1	5	1	
Cdh8	NM_053393.2	3	0	
Rn18s	NR_046237.1	3	0	
Emb	NM_053719.1	2	3	
Kdm4c	NM_001106663.3	2	0	
LOC499742	NM_001024308.1	2	0	
Spetex-2F	NM_001009968.1	2	0	
Uxs1	NM_139336.1	2	0	
Zfp322a	NM_001135084.1	2	0	
Arap2	NM_001107216.1	1	0	
Arrdc3	NM_001007797.1	1	0	
Clec4a2	NM_001005880.1	1	0	
Dact2	NM_001107464.2	1	0	
Ddx3	NM_001167665.1	1	0	
Dhx36	NM_001107678.1	1	0	
Grem1	NM_019282.3	1	0	
Ndp	NM_001108814.1	1	0	
Ndufaf4	NM_198783.1	1	0	
Nova1	NM_001100541.1	1	0	
Olr1217	NM_001000439.1	1	0	
Olr753	NM_001000921.1	1	0	
Oprk1	NM_017167.3	1	0	
Pabpc5	NM_017167.3	1	0	
Pdia4	NM_053849.1	1	0	
Rfk	NM_001014106.1	1	0	
Rwdd1	NM_147146.2	1	0	
Slc2a2	NM_012879.2	1	0	
Smok2a	NM_001191619.1	1	0	
Tsn	NM_021762.1	1	0	
Ube3a	NM_001191837.2	1	0	
Vom2r70	NM_001099477.1	1	0	
Vps13a	NM_001100975.2	1	0	
Zfp36l3	NM_001318118.1	1	0	
Zfp868	NM_001009538.1	1	0	
Atg7	NM_001012097.1	0	2	
Ces1f	NM_001107319.2	0	4	
Dazl	NM_001109414.1	0	1	
Erap1	NM_030836.1	0	1	
Ezh2	NM_001134979.1	0	1	
Fam205c	NM_001024343.2	0	1	
Flrt3	NM_001126291.1	0	1	
Gas8	NM_001039030.1	0	8	
LOC257642	NM_147136.1	0	1	
LOC689840	NM_001047979.1	0	1	
Man2b1	NM_199404.1	0	1	
Mcc	NM_001170534.2	0	1	
Mctp2	NM_001191625.1	0	1	
Meis1	NM_001134702.1	0	1	
Vom2r37	NM_001099487.1	0	1	

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

F vs R				
ADN nuclear				
Gen	ID	N° de CpG HipoM	N° de CpG HiperM	Región génica
LOC257642	NM_147136.1	1	0	Promotor
Rn45s	NR_046239.1	0	2	Cuerpo del gen
Rn5s	NR_033176.2	1	0	
Uxs1	NM_139336.1	67	0	Intergénico
Rras2	NM_001013434.1	9	1	
Emb	NM_053719.1	5	2	
Atg7	NM_001012097.1	4	0	
Vom2r9	NM_001099465.1	4	0	
Lzts1	NM_153470.1	3	1	
Pdia4	NM_053849.1	2	0	
Vom2r7	NM_001099463.1	2	1	
Zfp868	NM_001009538.1	2	1	
Actr1	NM_001013961.1	1	0	
Adamts12	NM_001106420.3	1	0	
Cntn5	NM_053746.1	1	0	
Copb1	NM_080781.2	1	0	
Dazl	NM_001109414.1	1	0	
Ddx3	NM_001167665.1	1	0	
Erap1	NM_030836.1	1	0	
Galnt5	NM_031796.1	1	0	
LOC100910945	NR_131086.1	1	0	
LOC300308	NM_001013952.1	1	0	
LOC367515	NM_001014271.1	1	0	
Lrrc10	NM_001108096.1	1	0	
Man2b1	NM_199404.1	1	1	
Msx2	NM_012982.3	1	1	
Or2m12	NM_001000041.1	1	0	
Or2w2	NM_001000105.1	1	0	
Pcsk1	NM_017091.2	1	0	
Ppp1r14c	NM_133425.3	1	1	
Rn18s	NR_046237.1	1	1	
Shox2	NM_013028.1	1	0	
Smok2a	NM_001191619.1	1	0	
Spetex-2F	NM_001009968.1	1	0	
Trdn	NM_021666.2	1	0	
Tsn	NM_021762.1	1	0	
Vom2r37	NM_001099487.1	1	1	
Vom2r55	NM_001099495.1	1	0	
Zfp36l3	NM_001318118.1	1	1	
Zfp455l1	NM_001139491.1	1	4	
Zfp958	NM_001142758.1	1	0	
Adgre4	NM_001007558.1	0	1	
Alg6	NM_001033709.1	0	1	
C18h5orf46	NM_001106149.1	0	1	
Ces1f	NM_001103359.2	0	3	
Cfap126	NM_001109075.1	0	1	
Cobl	NM_001107236.1	0	1	
Fam13a	NM_001100862.1	0	1	
Gas8	NM_001039030.1	0	6	
Gata3	NM_133293.1	0	1	
LOC257642	NM_147136.1	0	1	
LOC310926	NM_001025002.1	0	1	
LOC499530	NM_001047941.1	0	1	
Mcc	NM_001170534.2	0	2	
Or8b101c	NM_001000439.1	0	1	
Rwdd1	NM_147146.2	0	1	
Tmem132b	NM_001134536.1	0	1	
NA		1	0	

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

En la [Tabla VIII. 4](#) resumimos los registros efectuados para los genes asociados a CpGs DM que estuvieran dentro del ADNmt (*D-loop* o cuerpo del gen) en cada comparación.

Tabla VIII.4 Genes asociados a las CpGs DM (HipoM) y su ubicación génica para cada comparación en el ADN mitocondrial.

Ubicación de CpGs HipoM en <i>D-loop</i>		Genes asociados a CpGs HipoM en el cuerpo del gen				
CpG ID	Comparación	Gen	ID	C vs F	C vs R	F vs R
CpG 15692	C vs F + C vs R + F vs R	Atp6	YP_665634.1	5	11	5
CpG 15708		Atp8	YP_665633.1	0	25	14
CpG 15716		Cox1	YP_665631.1	6	37	16
CpG 15730		Cox2	YP_665632.1	8	26	13
CpG 15735		Cox3	YP_665635.1	12	25	14
CpG 15745		Cytb	YP_665641.1	11	48	24
CpG 15817		C vs R	Nd1	YP_665629.1	7	118
CpG 15825	Nd2		YP_665630.1	9	37	17
CpG 15848	Nd3		YP_665636.1	0	12	9
CpG 15857	Nd4		YP_665638.1	1	15	5
CpG 15920	Nd4l		YP_665637.1	0	4	0
CpG 15942	Nd5		YP_665639.1	5	27	15
CpG 16018	Nd6		YP_665640.1	4	24	16
CpG 16242						
CpG 16243						

VIII.1.3.C. Vías celulares en las que participan los genes.

A través de un análisis de enriquecimiento funcional, encontramos que 16 de los 104 genes asociados a CpGs DM se agruparon en 12 vías celulares ([Figura VIII.6](#)). Los 16 genes que enriquecieron estas vías fueron 13 mitocondriales (Cox1, Cox2, Cox3, Nd1, Nd2, Nd3, Nd4, Nd5, Nd6, Nd4l, Atp6, Atp8 y Cytb) y 3 nucleares (Nduf4, Trdn y Bcl2l11). Mientras que, en el caso del ADNmt, los sitios CpGs DM se localizaron tanto en la región *D-loop* como en el cuerpo de los genes, en el caso de los tres genes nucleares lo hicieron en regiones intergénicas.

La fuerte presencia de genes mitocondriales justifica el hallazgo de que las 3 vías o procesos más representados fueron la fosforilación oxidativa (FO), la termogénesis y la cardiomiopatía diabética, todas directamente relacionadas con el estado prediabético. Sin embargo, el dato más llamativo que arrojó este análisis, fue que muchas de las vías están fuertemente relacionadas con enfermedades neurológicas.

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

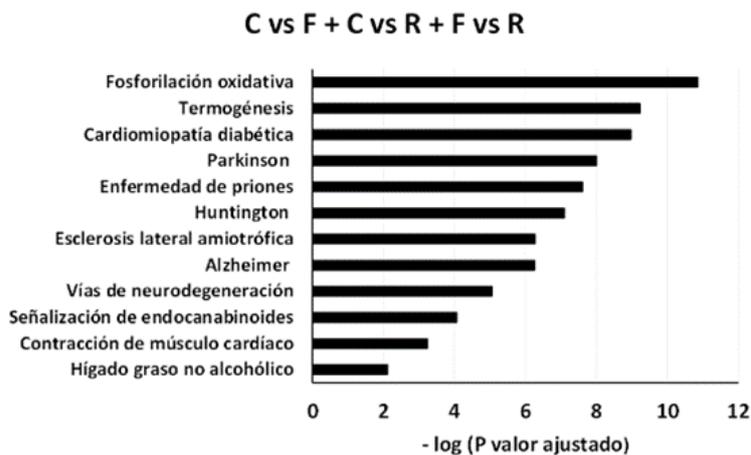


Figura VIII.6. Vías celulares en las que intervienen los genes DM. Se utilizaron los genes asociados a CpGs DM de todas las comparaciones (C vs F, C vs R y F vs R, N=104). Las vías se muestran en orden decreciente del valor de $-\log(P \text{ valor ajustado})$.

VIII.1.4. Análisis de la posible reversión de los cambios epigenéticos registrados en el grupo F.

El objetivo de este análisis fue determinar cuáles de las 132 CpGs DM en el grupo F respecto al grupo C, lograron en el grupo R tener valores similares al del grupo control. Se realizó en dos etapas: una general, con el objetivo de encontrar genes ya relacionados con PD, y una más específica, aumentando las restricciones.

VIII.1.4.A. Análisis con bajas restricciones.

Se tuvieron en cuenta aquellos sitios CpGs que mostraron diferencias significativas en la comparación C vs F y que no las mostraron en la comparación C vs R. A continuación, en la [Figura VIII.7](#) se ilustra a manera de ejemplo, las condiciones fijadas para este primer análisis más permisivo o con bajo poder restrictivo.

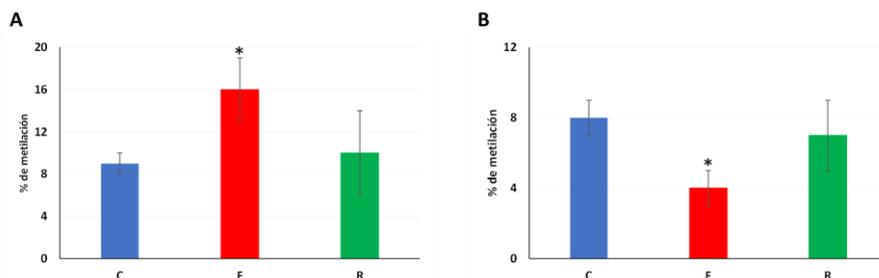


Figura VIII.7. Ejemplos de CpGs que revierten su % de metilación en el análisis de baja restricción. En ambos casos el grupo R presenta porcentajes de metilación similares al grupo C **A)** Ejemplo de un sitio HiperM en el grupo F respecto al C **B)** Ejemplo de un sitio HipoM en el grupo F respecto al C. * $q < 0,05$ respecto de C.

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

Con estas condiciones, identificamos 55 secuencias CpGs DM en el grupo F respecto del C que pudieron revertir parcialmente con el cambio de dieta (por no haber diferencias significativas entre el grado de metilación del ADN en esos sitios de los grupos C y R). Estas CpGs representaron un 42% del total y se distribuyeron en 16 genes, tal como lo detallamos en la [Tabla VIII.5](#) y la [Figura VIII.8](#).

Tabla VIII.5. Sitios GpGs que habiendo experimentado hipo/hiper metilación en la comparación C vs F, no mostraron diferencias significativas entre los grupos C y R.

Tipo de modificación de las CpGs	Número de CpGs DM	Genes
Hipometilación	12	Lzts1, Adgre4, Tdrd3, Rn18s, Brca2, LOC498368, LOC680200, Cdh8 y LOC499742
Hipermetilación	43	Rn18s, Pdia4, Zfp868, Uxs1, LOC363337, Vom2r7, LOC310926 y Bcl2l11

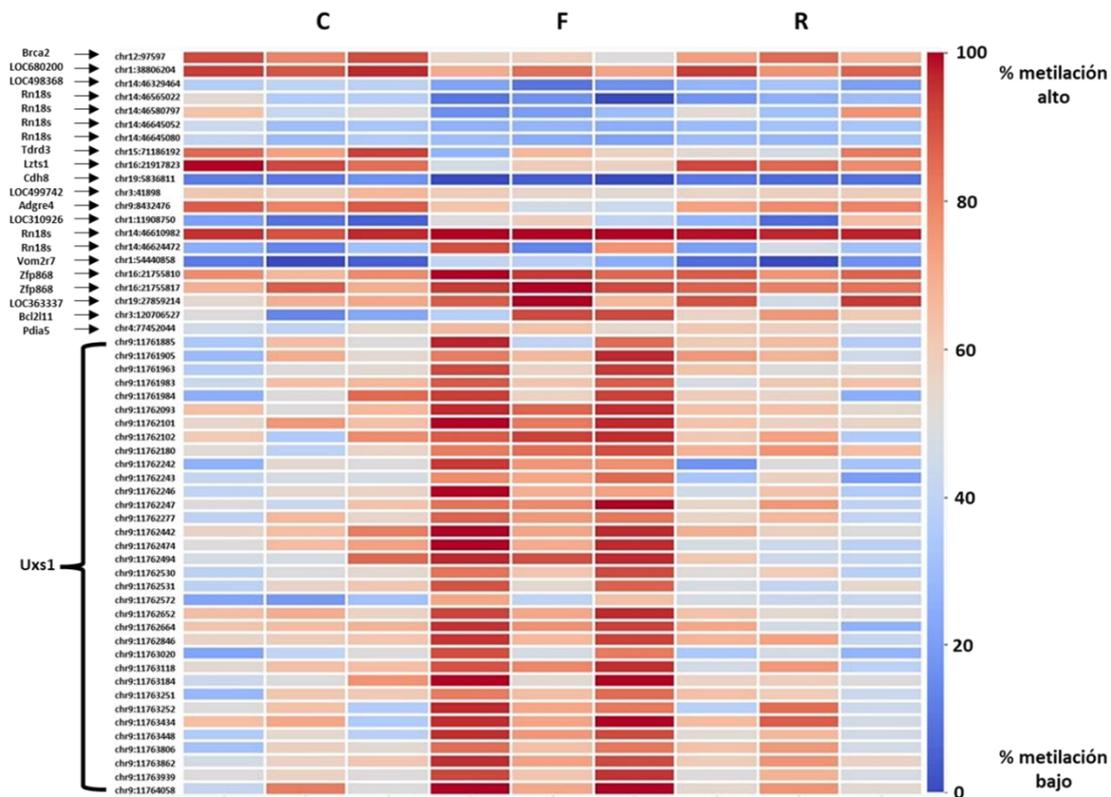


Figura VIII.8. Mapa de calor de reversión parcial (análisis con bajas restricciones).

Se muestran las CpGs cuyos % de metilación son significativamente diferentes entre los grupos C y F y similares entre C y R ($q < 0,05$). Para cada grupo experimental (C, F y R) se realizaron 3 réplicas biológicas (N=3). En la escala de valores cromáticos, rojo representa alto % de metilación y azul representa bajo % de metilación. Se observa que, si bien hubo un cambio de tonalidad en el mapa de calor entre los grupos C y F, en las muestras del grupo R se obtuvieron tonalidades semejantes a las obtenidas en el grupo C, evidenciando la reversión. A la izquierda de los ID de las CpGs DM y se referencian los genes afectados por esas modificaciones epigenéticas.

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

VIII.1.4.B. Análisis con restricciones altas.

Con el objetivo de refinar los resultados, introdujimos la restricción adicional de que el sitio presente diferencias significativas entre los grupos F y R ($q < 0,05$). En la [Figura VIII.9](#) se muestra un ejemplo ilustrativo.

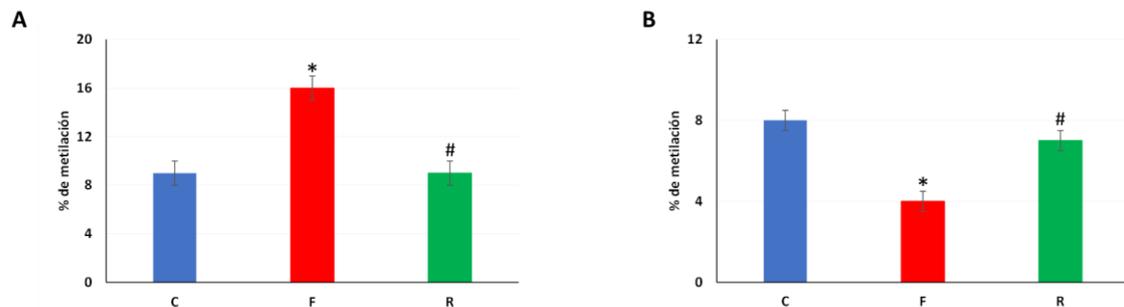


Figura VIII.9. Ejemplos de CpGs que revierten su % de metilación en el análisis de alta restricción. En ambos casos el grupo R presenta valores similares al grupo C y diferencias significativas respecto a F (señaladas con #). **A)** Ejemplo de un sitio que se encuentra HiperM en el grupo F respecto al C, pero HipoM en el R respecto al F. **B)** Ejemplo de un sitio que se encuentra HipoM en el grupo F respecto al C, pero HiperM en el R respecto al F. * $q < 0,05$ respecto de C y # $q < 0,05$ respecto de F.

Como resultado de este análisis, identificamos 30 sitios CpGs DM que lograron revertir que representan 23% de los 132 sitios analizados. Estos sitios se localizaron en la región intergénica de sólo 3 genes: Rn18s y Vom2r7 (con un sitio cada uno) y Uxs1 (28 sitios), como se resume y grafica en la [Tabla VIII.6](#) y [Figura VIII.10](#).

Tabla VIII.6. Sitios CpGs que habiendo experimentado hipometilación en la comparación C vs F, mostraron hipermetilación en la comparación F vs R y viceversa. En todos los casos la comparación C vs R no mostró diferencias significativas en el % de metilación.

Tipo de modificación de las CpGs	Número de CpGs DM	Genes
Hipometilación	1	Rn18s
Hipermetilación	29	Vom2r7 (1) y Uxs1 (28)

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

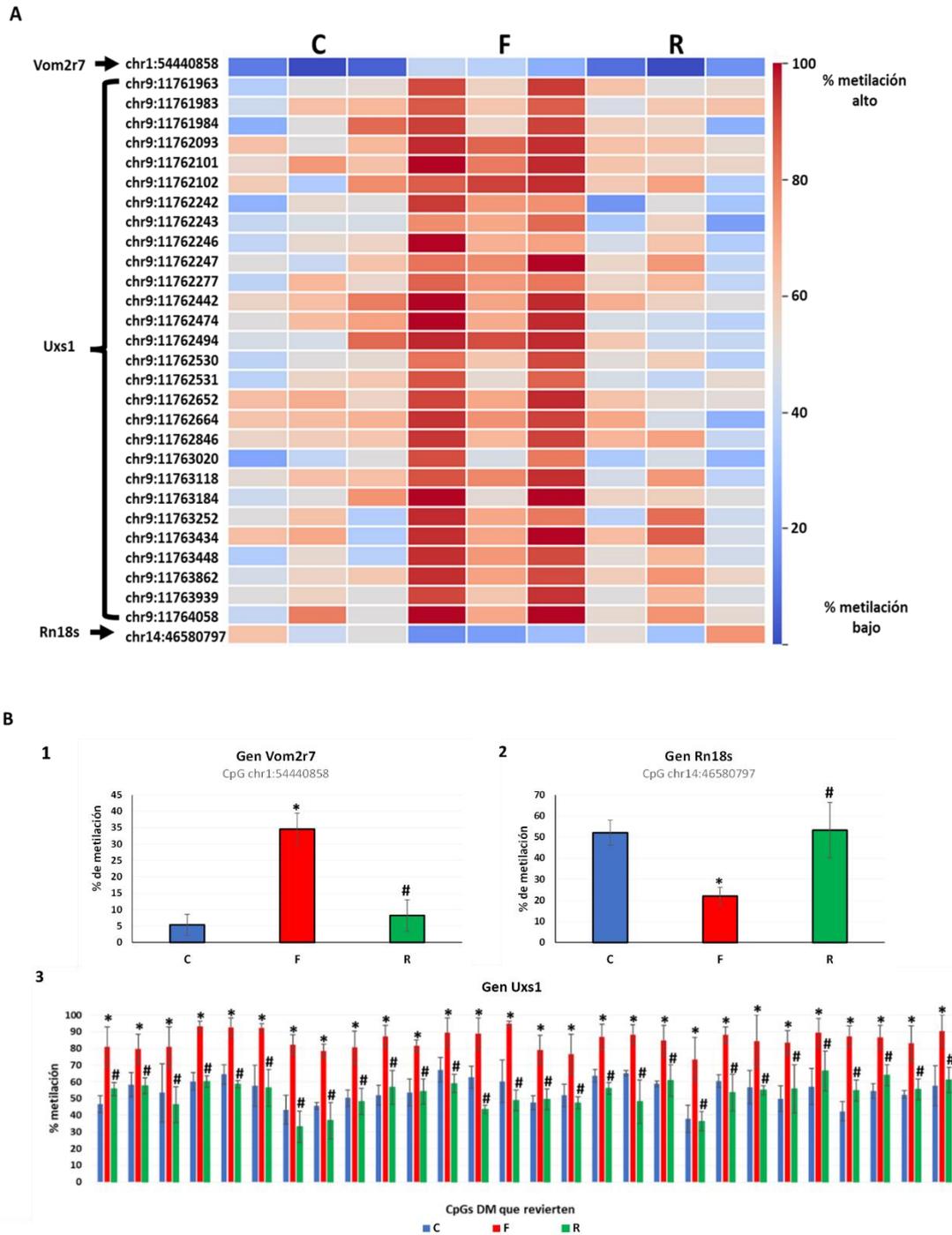


Figura VIII.10. Grado de metilación que presentan los sitios CpGs que lograron revertir totalmente (análisis de altas restricciones). **A)** Mapa de calor que representa el % de metilación que mostraron cada una de las secuencias CpGs que revirtieron totalmente en el grupo R los cambios sufridos en el grupo F respecto del C ($q < 0,05$). Las 30 CpGs DM se asocian 3 genes: Vom2r7 (1), Uxs1 (28) y Rn18s (1). Para cada grupo experimental (C, F y R) se realizaron 3 réplicas biológicas ($N=3$). En la escala de valores cromáticos se representa el % de metilación (azul es bajo y rojo alto). **B)** En cada panel se muestran los genes asociados a las CpGs que lograron revertir: Vom2r7 (**panel B.1**), Rn18s (**panel B.2**) y Uxs1 (**panel B.3**). Se grafican los % de metilación de la o las CpGs para en cada uno de los grupos: en azul C, en rojo F y en verde R. * $q < 0,05$ vs C, # $q < 0,05$ vs F. chr: cromosoma.

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

VIII.1.5. Otros análisis complementarios:

VIII.1.5.A. Este análisis incluyó los sitios DM en el grupo F respecto al C, que poseen el mismo grado de metilación en el grupo R que el encontrado en el F. Conceptualmente, estos sitios representan aquellos cambios provocados por la DRF que lograron instalarse de manera irreversible y que siguen presentes aun en aquellos animales que cambiaron sus hábitos alimenticios (grupo R). Se ilustra un ejemplo en la [Figura VIII.11](#).

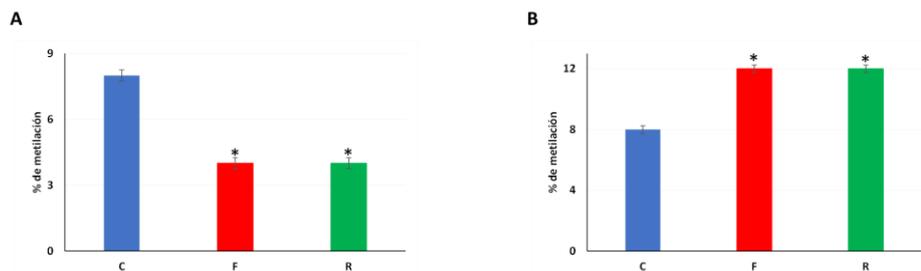


Figura VIII.11. Ejemplos de sitios CpGs DM que no reversion el cambio en el grupo R. En ambos paneles se muestran los % de metilación de sitios CpGs en donde no existen diferencias significativas entre los grupos F y R **A)** HipoM en F y R respecto de C **B)** HiperM en F y R respecto de C. * $q < 0,05$ respecto de C.

Como resultado de este análisis obtuvimos ([Figura VIII.12](#)):

- 16 sitios CpGs HipoM en F asociados a 10 genes: Atp6, Cox1, Cox2, Cox3, Cytb, Emb, Nd1, Nd2, Nd4 y Nd6.
- 1 sitio CpG HiperM en F localizado en el gen Atg7.

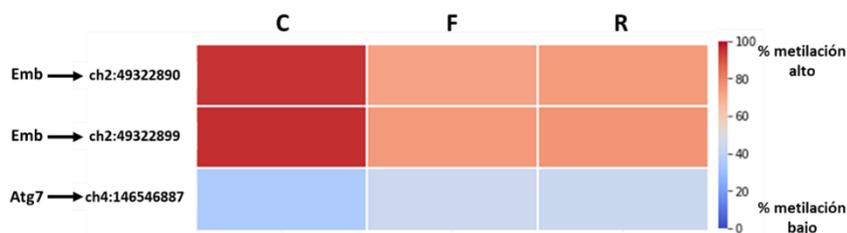


Figura VIII.12. Ejemplos más representativos de 3 CpGs DM entre C y F que no reversion en el grupo R. Mapa de calor que representa el % de metilación que mostraron en los tres grupos experimentales (C, F y R) 3 secuencias CpGs que presentan cambios en el grupo F respecto al C ($q < 0,05$) pero que no los presentan en el grupo R respecto de F. Se muestran también los genes asociados a estas secuencias. Para cada grupo experimental se graficó el promedio de las tres réplicas biológicas realizadas (N=3), en la escala de valores cromáticos se representa el % de metilación (rojo es alto y azul bajo). $q < 0,05$.

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

VIII.1.5.B. Por último, analizamos los sitios CpGs DM en F respecto a C que en el grupo R mostraron una diferencia mayor respecto al C, y que incluso eran significativamente diferentes al F (Figura VIII.13). Estos sitios representan las alteraciones que una vez disparadas por la DRF no sólo no pueden ser revertidas con el cambio de dieta, sino que se intensificaron aún en animales que han dejado de consumirla por un tiempo prolongado (49 días).

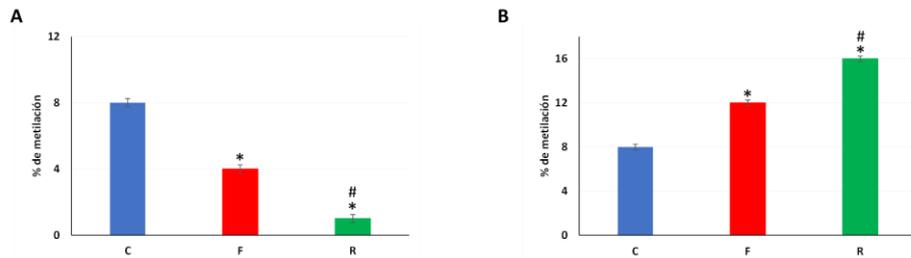


Figura VIII.13. Ejemplos de sitios que cambiaron el grado de metilación en F y que el cambio se acentuó aún más en R. A) Ejemplo de un sitio HipoM en F respecto a C que también se encuentra HipoM en R respecto tanto de C como de F. B) Ejemplo de un sitio HiperM en F respecto a C que también está HiperM en R respecto tanto de C como de F, * $q < 0,05$ respecto de C y # $q < 0,05$ respecto de F.

Como fruto de este análisis encontramos 60 sitios hipometilados distribuidos en 9 genes mitocondriales (Atp6, Cox1, Cox2, Cox3, Cytb, Nd1, Nd2, Nd5 y Nd6), como se observa en la Figura VIII.14.

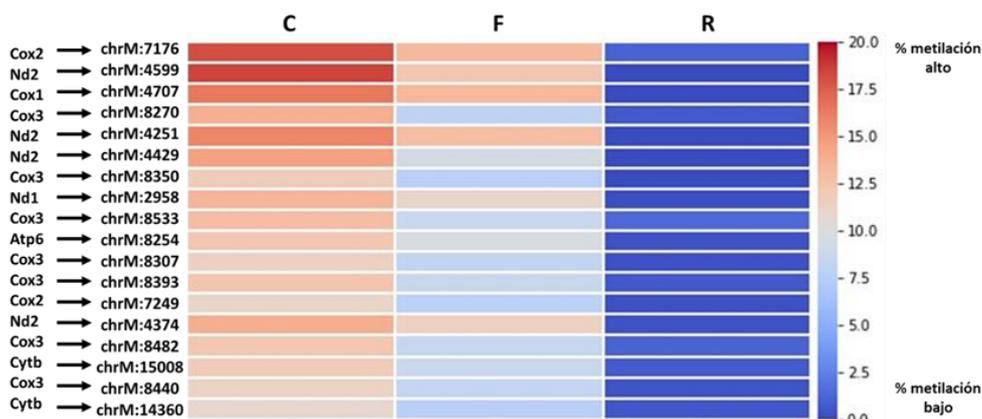


Figura VIII.14. % de metilación de sitios CpGs DM en F respecto a C que en el grupo R mostraron una diferencia mayor respecto al C e incluso que resultó significativa respecto al F. De las 60 secuencias CpG que cumplían con esta condición, seleccionamos 18 para construir el mapa de calor que representa el porcentaje de metilación en sitios que presentaron el mismo tipo de cambio en el grupo F respecto al C ($q < 0,05$) que en el grupo R respecto al F ($q < 0,05$). Para cada grupo experimental (C, F y R) se graficó el promedio de las tres réplicas biológicas realizadas (N=3), en la escala de valores cromáticos se representan los % de metilación (rojo es alto y azul bajo). Se muestran, además los nombres de los genes que alojan los sitios CpGs analizados.

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

A manera de resumen de lo descrito en esta sección en la que analizamos los cambios del grado de metilación encontrados en las ratas del grupo F respecto a las ratas control y su posible evolución en el grupo R, podemos concluir que (Figura VIII.15):

- Unas 30 secuencias CpGs DM en el grupo F respecto al C (el 23%) logran revertir la modificación epigenética al cambiar su hábito alimenticio hacia una dieta equilibrada. Estas secuencias se asocian con 3 genes.
- Un grupo de 17 sitios CpGs DM en F respecto a C (13%) presentan el mismo grado de metilación en el grupo R que en el F. Por lo tanto, en estos sitios, que están asociados con 11 genes, no habría una reversión de los cambios.
- Un gran número de sitios CpG DM que se modifican en el estado prediabético (60 sitios, representando el 46%) no sólo no logran revertir este cambio por la adopción de una dieta equilibrada, sino que, por el contrario, muestran un % de cambio aún mayor. Estos sitios se asocian con 9 genes.

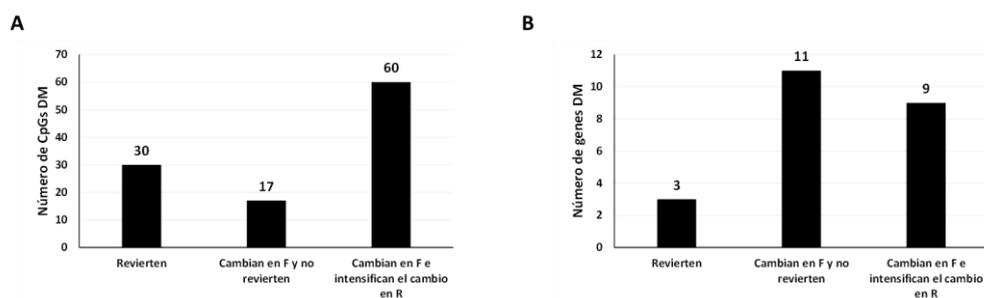


Figura VIII.15. Resumen de los cambios registrados en el grado de metilación de sitios CpGs sufridos en F respecto a C y su evolución en el grupo R. A) Representación gráfica del número de CpGs DM en F respecto a C que en el grupo R logran o no revertir el cambio. **B.** Número de genes asociados a los sitios CpGs DM y su evolución en el grupo R respecto al estado de PD (grupo F).

VIII.1.6. Efecto de los cambios de metilación del ADN sobre la expresión génica.

En esta sección abordamos el estudio de la posible repercusión transcripcional que pudieron ejercer los cambios epigenéticos sobre algunos genes de interés.

Elegimos a Nd1, Nd2 y Atp6 como representantes de los genes mitocondriales que además de ser modificados en todas las comparaciones entre grupos, fueron los que enriquecieron las principales vías celulares afectadas. Por otro lado, resultó

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

interesante indagar sobre la posible influencia directa de las metilaciones en el cuerpo de genes mitocondriales en la expresión génica.

También optamos por el gen *Uxs1*, el cual resultó atractivo porque fue uno de los 3 genes que logró revertir su estado de metilación en el grupo R, siendo también el que más CpGs consiguió cambiar (28 CpGs). A diferencia de los otros genes seleccionados, todas las modificaciones ocurrieron en la zona intergénica del ADN nuclear, por lo que a priori, tampoco existieron especulaciones en relación a qué se esperaba que ocurra a nivel transcripcional.

VIII.1.6.A. Efecto de la metilación en la expresión génica mitocondrial (Nd1, Nd2 y Atp6).

Al analizar el nivel de expresión génica de las subunidades 1 y 2 de la NADH deshidrogenasa (Nd1 y Nd2) y de la subunidad 6 de la ATP sintasa (Atp6), encontramos un perfil similar con aumento de expresión en F respecto de C y, valores similares entre R y C (Figura VIII.16). Estas diferencias sólo fueron significativas ($p < 0,05$) sólo en el caso de Nd1.

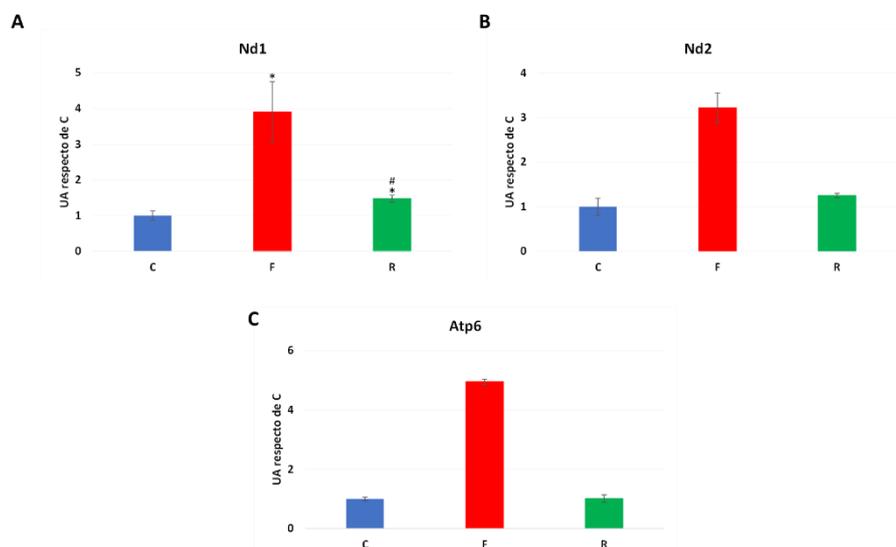


Figura VIII.16. Expresión génica mitocondrial (Nd1, Nd2 y Atp6). Se muestra la expresión relativa a nivel de ARNm analizada por RT-qPCR en islotes aislados de ratas de los grupos C (barra azul), F (barra roja), y R (barra verde). Se utilizó β -actina como estándar interno. Los valores fueron expresados en unidades arbitrarias (UA) respecto del nivel de ARNm determinado en el grupo C. Las barras representan las medias \pm EEM de 2 experimentos independientes (6 réplicas técnicas en total) para Nd1 y 1 experimento para Nd2 y Atp6 (3 réplicas técnicas en total). * $p < 0,05$ respecto de C y # $p < 0,05$ respecto de F.

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

VIII.1.6.B. Efecto de la metilación en la expresión génica de Uxs1.

La expresión a nivel transcripcional del gen de la UDP-ácido glucurónico descarboxilasa 1 (Uxs1) presentó un comportamiento diferente al patrón hallado anteriormente (Figura VIII.17). El grupo F mostró un aumento significativo en su expresión génica en comparación al grupo controles ($p < 0,05$). En cuanto al grupo R, presentó un aumento significativo tanto en comparación con el grupo C como con el grupo F ($p < 0,05$ en ambas comparaciones).

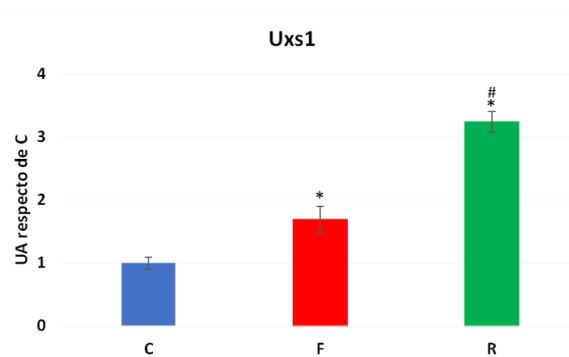


Figura VIII.17. Expresión génica de Uxs1. Se muestra la expresión relativa a nivel de ARNm analizada por RT-qPCR en islotes aislados de ratas de los grupos C (barra azul), F (barra roja), y R (barra verde). Se utilizó β -actina como estándar interno. Los valores fueron expresados en unidades arbitrarias (UA) respecto del nivel de ARNm determinado en el grupo C. Las barras representan las medias \pm EEM de 2 experimentos independientes con 6 réplicas técnicas en total. * $p < 0,05$ respecto de C y # $p < 0,05$ respecto de F.

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

VIII.2. Discusión y conclusiones.

VIII.2.1. Discusión.

Tanto en islotes pancreáticos como en otros tejidos, ya sea músculo o el tejido adiposo, se ha reportado que diversos factores genéticos (polimorfismos), no genéticos (sexo, edad) y ambientales (estado nutricional y gluco/lipotoxicidad) podrían ser responsables de las alteraciones en su metiloma y transcriptoma. En la DT2 se ha encontrado que este tipo de modificaciones desencadenan cambios en la función celular y/o la supervivencia (268).

Nuestro trabajo demostró la influencia que ejercen las diferentes dietas en el metiloma de islotes pancreáticos, encontrando, de manera global, un millar de sitios CpG DM. El metiloma de los islotes de animales provenientes del grupo F se presentó mayoritariamente HipoM respecto del control, en concordancia con publicaciones previas que dan cuenta de una disminución de la metilación en el ADN de diversos tipos celulares de pacientes con DT2, como son las células insulares (269), musculares (270), hepáticas (271,272) y sanguíneas (273).

En términos generales, las CpGs DM se distribuyeron entre la mayoría de los cromosomas, pero mostraron un amplio predominio en el ADNmt, particularmente afectando regiones en el cuerpo de los genes (65,57%) más que en sus sitios promotores (que no alcanzó al 3%).

VIII.2.1.1. Modificaciones en la metilación del ADN nuclear.

VIII.2.1.1.A. Localización.

Si bien se hallaron CpGs DM en todas las regiones génicas de los cromosomas nucleares, las regiones intergénicas fueron ampliamente predominantes, en comparación con las ocurridas en promotores y cuerpos génicos.

A pesar de que no se conoce la relación directa entre las metilaciones del ADN en regiones intergénicas y la transcripción, existe evidencia de que estas alteraciones constituyen un mecanismo de regulación de microRNAs que tiene influencia en la fisiopatología de la DT2 (274). En los pocos casos en donde se afectaron los cuerpos

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

génicos, tampoco podemos hacer una especulación acerca de cuál será el efecto transcripcional (positivo o negativo) más allá de sugerir que podrían tener una influencia, ya que sólo se conocen algunas correlaciones entre la metilación de esta región y las repercusiones transcripcionales (275).

Por otro lado, sólo un 10% de las modificaciones totales halladas en promotores pertenecieron al genoma nuclear. Los genes asociados a estas alteraciones fueron: Rn18s (que acumuló 2 CpGs HipoM en el grupo F respecto del control) y LOC257642, un gen no anotado en el genoma de referencia que en el grupo R presentó 1 CpG HipoM respecto de F. Al tratarse de sitios promotores, podemos afirmar que en estos casos las hipometilaciones generarían un aumento de la transcripción de estos dos genes. Un estudio realizado por Ko y colaboradores (276) en donde se evaluaron personas con enfermedad renal crónica (incluida la nefropatía diabética), ya había señalado que las modificaciones epigenéticas en promotores son minoritarias en comparación a las que se encuentran en regiones *enhancers* o en secuencias de unión a factores de transcripción de genes profibróticos.

VIII.2.1.1.B. Genes asociados a CpGs DM en la comparación C vs F.

Genes relacionados con cáncer.

En un estudio prospectivo lograron demostrar que las personas que desarrollan cáncer de páncreas después de haber sido diagnosticadas con diabetes eran portadoras del alelo predisponente de esta enfermedad autosómica dominante (277). Sin embargo, también se ha demostrado en diversas publicaciones que existe una mayor predisposición a desarrollar cáncer de páncreas en personas que consumen grandes cantidades de bebidas edulcoradas (278,279), así como en aquellas que presentan hiperglucemias ó hiperinsulinemias en ayunas (280,281), hiperglucemias poscarga (282), IR o algunos de los factores de riesgo asociados a la diabetes (283,284). Con toda esta información, no fue sorprendente que en nuestro modelo de PD inducida por una dieta con el agregado fructosa (grupo F) hallamos detectado varias CpGs DM asociadas a genes que ya han sido relacionados con cáncer pancreático, como:

- Emb (Embigena), gen que codifica una glicoproteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas que está involucrada en la

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

formación y plasticidad de la unión neuromuscular. Esta proteína, que está aumentada en tejidos derivados de adenocarcinoma ductal pancreático, interviene en la regulación de la transición mesenquimatosa de células cancerosas pancreáticas, aumentando la capacidad migratoria e invasora (285).

- Lzts1 (supresor tumoral putativo con cremallera de leucina 1) codifica una proteína supresora de tumores. Se ha determinado que la pérdida o reducción de LZTS1 es un evento frecuente en el desarrollo y progresión del cáncer (286,287). Lzts1 disminuye la proliferación de células pancreáticas cancerígenas a través de la ubiquitinación y posterior degradación en proteosomas de las proteínas Ras (288).
- Brca2 (proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 2) tiene un rol importante en la regulación de la alineación y unión de las cromátides hermanas y en la respuesta al daño del ADN por recombinación (289,290). Mutaciones de este gen se encontraron en personas con cáncer pancreático y se sabe su inactivación ocurre en etapas tardías de la tumorigénesis (291).

También encontramos modificaciones epigenéticas en genes relacionados con otros tipos de cánceres:

- Pdia4 (proteína disulfuro isomerasa miembro de la familia A) es un gen que está asociado a carcinoma hepatocelular y adenocarcinoma de pulmón (292,293). La ablación de este gen en modelos animales con diabetes mostró un aumento de la secreción de insulina acompañado por una disminución en las ROS, la glucemia y la HbA1c (294), además, el aumento sérico de Pdia4 se asocia a un mayor riesgo de DT2 (295).
- Cdh8 (cadherina 8) se relacionó con la tumorigénesis de algunos tipos de carcinomas renales (296).
- Tdrd3 (proteína 3 con dominio Tudor) es un regulador positivo de la proliferación e invasión celular en cáncer de mama, promoviendo tanto la tumorigénesis como la progresión de la enfermedad (297).

Otros genes.

Otros dos genes que sufrieron modificaciones en su estado de metilación en el grupo F respecto del C fueron:

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

- Bcl2l11 codifica a la proteína pro-apoptótica Bim (mediador interactivo de Bcl-2 en muerte celular), que sería la mediadora del aumento de la apoptosis en células β en ratones deficientes en IRS2 (298). Además, se ha encontrado sobreexpresada en células insulares de personas con DT2 (299) y en estos pacientes, se la ha propuesto como marcador de placa aterosclerótica (300).
- Atg7 (proteína relacionada con la autofagia 7) codifica una proteína implicada en la inducción de la autofagia para eliminar organelas o macromoléculas dañadas. Islotes derivados de ratones KO para este gen mostraron degeneración de los islotes, TGA y una reducción en la secreción de insulina (301). También se han encontrado menores niveles de esta proteína en cerebro de ratones con DT2 y Alzheimer (302) y, en suero de mujeres embarazadas con Diabetes Gestacional (303).

VIII.2.1.1.C. Reversión de las modificaciones epigenéticas.

Basados en los resultados presentados en los capítulos VI y VII, en los que encontramos que los animales del grupo R mostraban grandes similitudes con los del grupo C en cuanto a sus perfiles metabólicos y transcripcionales, nos resultó muy sorprendente el hallazgo de que el metiloma del grupo R fuese el que mayor número de CpGs DM presentara con respecto al control. Pareciera que las marcas epigenéticas de metilación del ADN generadas por la dieta son perdurables, siendo más difíciles de remover que las alteraciones fisiológicas y/o metabólicas. Suponemos que para los efectos fisiológicos existirían mecanismos de compensación rápidos que permiten recuperar la homeostasis en tiempos cortos, aunque los 49 días hayan resultado insuficientes para que el paisaje epigenético de los islotes vuelva a una situación similar al hallado en el grupo control.

Por otro lado, el grupo R presenta la complejidad de atravesar diferentes momentos metabólicos a los 21 y 70 días. Lamentablemente, no tenemos la información de cómo es el epigenoma de los islotes de estos animales a los 21 días, y sólo tenemos los datos surgidos al final del tratamiento, influenciados por la historia metabólica a la que fueron sometidos esos islotes. En este aspecto, consideramos que, por haber experimentado dos cambios sucesivos en la dieta, las modificaciones epigenéticas que

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

acumula el ADN de los animales del grupo R son mayores a las ocurridas en los de los grupos C y F que presentaron durante los 70 días una uniformidad en los tratamientos.

Cuando analizamos más detenidamente las CpGs capaces de revertir su estado de metilación nos encontramos nuevamente con que el metiloma se resiste a revertir con el cambio de dieta. Aplicando primero un criterio estadísticamente más laxo, para tener un panorama más general, encontramos que menos de la mitad de las CpGs totales lograban revertir (42%) y, curiosamente, todas pertenecían al ADN nuclear. Cuando aplicamos un criterio con mayor robustez estadística, sólo el 23% de las CpGs logró revertir. Estas CpGs se distribuyeron en zonas intergénicas de 3 genes:

- Rn18s es la denominación que recibe la porción del gen 45s que contiene la secuencia del ARN 18s que se formará en el nucleolo luego del procesamiento del transcrito inmaduro ARN 45s y cuyo resultado es la generación de los ARNr 18s, 28s y 5,8s (304). Recientemente se halló que la modificación de su pre-ARN, por medio de la metilación N6 de los residuos de adenosina internos, promueve la progresión de cáncer de páncreas (305).
- Vom2r7 (receptor 7 vomeronasal tipo 2) codifica un receptor olfatorio responsable de la detección de feromonas, que en roedores se expresa en neuronas basales (306). Además, se ha encontrado formando parte de regiones DM en islotes de ratones con restricción de crecimiento uterino, el cual lleva a la DT2 en edad adulta (307).
- Uxs1 codifica UDP-glucuronato descarboxilasa 1, una enzima involucrada en la síntesis de heparán sulfato (308,309), un glucosaminoglucano íntimamente relacionado con la remodelación de la matriz extracelular y con el desarrollo de la diabetes y sus complicaciones (310,311). A pesar de que no hallamos bibliografía que relacione a Uxs1 con la DT2, si se sabe que este gen está regulado negativamente en individuos chinos con susceptibilidad a la obesidad, el síndrome metabólico y la hipertensión (312). Además, se ha reportado la disminución de heparán sulfato en células β de ratones con DT1 (313,314) y DT2 (315). Se conoce también que la actividad de la enzima heparanasa en islotes promueve la muerte de las células β , la aterosclerosis y conduce a la miocardiopatía diabética (316). Es importante destacar que el gen Uxs1 fue el que resultó ser más sensible a los

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

cambios de metilación generados por la dieta, presentando un total de 103 CpGs DM, y el que más CpGs logró revertir (28 de 34). Por todo esto, fue que lo seleccionamos para investigar la injerencia de estas modificaciones epigenéticas a nivel transcripcional. El perfil de expresión mostró un aumento en el grupo F con respecto al control y un aumento aún mayor en el grupo R. Es decir, no se evidenció la reversión del metiloma a nivel transcripcional, lo cual muestra la complejidad de los mecanismos que regulan la expresión génica. Recordemos que no evaluamos otros componentes del paisaje epigenético (como son las modificaciones en histonas y los ARNs pequeños de interferencia), ni mecanismos indirectos o más complejos que podrían intervenir en la transcripción de *Uxs1*. Por otro lado, el aumento de la expresión en el grupo F podría ser un mecanismo adaptativo generado en el período de PD para compensar la disminución de heparán sulfato.

VIII.2.1.2. Modificaciones en la metilación del ADN mitocondrial.

VIII.2.1.2.A. Localización.

Si bien el ADNmt experimentó una mayor cantidad de modificaciones en la región promotora que el ADN genómico (27 vs 3 CpGs DM respectivamente), la mayoría de las CpGs DM se encontraron en el cuerpo de los genes. En cuanto a la región promotora *D-loop*, cabe destacar que 6 CpGs (ubicadas en posiciones 15692, 15708, 15716, 15730, 15735 y 15745) cambiaron su estado de metilación en todas las comparaciones mostrando su sensibilidad frente a las diferentes dietas.

Se conoce que la metilación en la región *D-loop* genera una alteración en la curvatura del ADN que altera la capacidad de unión del TFAM, provocando una disminución en la transcripción de los genes mitocondriales (317,318). Este fenómeno también se evidenció en células de retina obtenidas de pacientes con retinopatía diabética expuestas a altas concentraciones de glucosa (319), sugiriendo que las modificaciones epigenéticas del ADNmt tendrían un impacto en el desarrollo y progresión de la DT2. Además, investigaciones desarrolladas en células de pacientes con cáncer colorrectal (188,320) y con enfermedades metabólicas como son la IR y la obesidad (321)

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

demonstraron que la HiperM de esta región se asocia la disminución del número de copias de ADNmt.

VIII.2.1.2.B. Consecuencias transcripcionales de las metilaciones en el ADNmt.

En todas las comparaciones evaluadas, las CpGs DM en la región *D-loop* de nuestro modelo fueron HipoM. Por lo tanto, esperaríamos que la expresión génica de algunos genes mitocondriales esté aumentada en el grupo F respecto del C y, en el grupo R respecto del F. Con respecto a esto, es importante aclarar que las modificaciones en la metilación de CpGs que se alojan en el ADNmt es un campo de investigación novedoso que se encuentra en pleno desarrollo, por lo que existe escasa información que relacione estas alteraciones con su función en la expresión génica. Esto difiere con la gran cantidad de evidencia existente que señala la relación directa y causal entre la metilación de un promotor en el ADN genómico y el silenciamiento génico. Por otro lado, teniendo en cuenta que podemos suponer el aumento de la expresión de genes mitocondriales en el grupo F, esto alimentaría la teoría de compensación en el período de PD.

Encontramos como dato llamativo que los cuerpos de los genes *Nd6* y *Cytb* resultaron ser muy sensibles a los cambios de dieta, ya que teniendo en cuenta todas las comparaciones, presentaron un gran número de CpGs HipoM (44 para *Nd6* y 83 para *Cytb*). Ya se ha descrito la presencia de hipermetilación de *Nd6* en paciente con DT2 y en ratones resistentes a la insulina, hecho que se asoció con la disminución de la transcripción del gen y con una función deteriorada de FO (322). En cuanto a *Cytb*, se halló un aumento en su metilación en células musculares de pacientes con miopatía y esto tuvo una asociación negativa con la producción de ATP (323).

Siguiendo esta línea de pensamiento, y para dilucidar la influencia de las metilaciones diferenciales en la expresión génica, evaluamos el impacto transcripcional por RT-qPCRs de los genes mitocondriales *Nd1*, *Nd2* y *Atp6*, que mostraron perfiles similares de aumento de expresión en el grupo F, lo cual concuerda con la tendencia esperada según los resultados del metiloma y, niveles análogos al control en el grupo R. Los resultados obtenidos en el grupo F son similares a lo publicado por Dreja, en un modelo de PD de ratones NZO (obesos, con IR y TGA) que fueron sometidos a una dieta

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

diabetogénica con alto contenido en grasa. Estos ratones mostraron un aumento de más del 80% en la expresión génica, principalmente de aquellos genes que codifican enzimas que forman parte de la cascada de FO (324).

Como primera conclusión podemos decir que los genes mitocondriales bajo las alteraciones generadas por la dieta modifican tanto la metilación de su ADN como su expresión génica y refuerzan nuestra hipótesis de que en PD se activan mecanismos compensatorios para lograr mantener la GA normal a costa de la hipersecreción de insulina. En ese contexto, el aumento de la expresión de enzimas que forman parte de los complejos de la FO sería clave para aumentar la cantidad de ATP y así sostener una secreción de insulina mayor, que amortigüe la sobrecarga metabólica generada por la DRF.

Esta situación de adaptación y compensación hiperfuncional, lamentablemente no puede ser sostenida en tiempos prolongados, conduciendo de manera casi inexorable a la disfunción y falla de las células β que terminará con la progresión a DT2 y sus complicaciones. Una vez instalada la DT2, seguramente se instalará un nuevo paisaje epigenético y, consecuentemente, la expresión de genes mitocondriales disminuirá, consolidando así el estado hiperglucémico. La disminución en la expresión de estos genes y su impacto negativo sobre la secreción de insulina ya han sido demostrados en islotes de pacientes con DT2 (325).

En cuanto a la reversión, es evidente que existen otros mecanismos que permiten que la transcripción vuelva a niveles análogos al control pasando por alto las marcas epigenéticas. En este sentido, no lo hemos evaluado, pero tanto los ARN pequeños de interferencia como el TFAM podrían estar ejerciendo su influencia en la expresión génica. Algunos autores proponen que las metilaciones en el cuerpo de genes mitocondriales podrían generar un precursor del ARNm mitocondrial policistrónico que sufriría modificaciones postranscripcionales aún no claramente definidas, que tendrían influencia en la expresión génica (326). Otro punto a destacar es que la incapacidad del grupo R en revertir las marcas epigenéticas, acompañada de la compensación que logra a nivel metabólico y transcripcional alimenta el concepto de “memoria metabólica” que se incorporó luego de los estudios DCCT-EDIC (tratado con mayor profundidad en el próximo capítulo).

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

VIII.2.1.2.C. Estudio de enriquecimiento funcional.

No resultó extraño que el análisis de las vías enriquecidas por los genes asociados a las modificaciones epigenéticas arrojase como resultado principal la FO y la termogénesis. En todas las comparaciones efectuadas, las vías fueron las mismas, ya que 14 de los 16 genes que las enriquecen forman parte de complejos mitocondriales, 13 codificados en el ADNmt (Nd1, Nd2, Nd3, Nd4, Nd4L, Nd5, Nd6, Cytb, Cox1, Cox2, Cox3, Atp6 y Atp8) y 1 en el cromosoma 6 (Ndufaf4). A continuación, se detallan las subunidades codificadas por estos genes que forman los complejos:

- El Complejo I, denominado NADH-ubiquinona deshidrogenasa, incluye las subunidades ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6 y ND4L. A pesar de ser el punto principal de entrada para los electrones en la cadena respiratoria, no se conoce mucho sobre su montaje, función y rol en diferentes trastornos. En humanos se sabe que variantes polimórficas de ND1 y ND2 se asocian a DT2 en población taiwanesa (327) y china (328). Trabajos como el de Elango reportaron mutaciones en ND1 y ND5 asociadas con la aparición de neuropatía diabética (329). En modelos animales, se determinó que variantes de ND1, ND2 y ND5 tienen influencia sobre el metabolismo glucémico ya que generan resistencia a la insulina (330). Un factor de ensamblaje del Complejo I es el codificado por el gen Ndufaf4 (Factor de ensamblaje 4 del complejo NADH:ubiquinona oxidorreductasa), que se encuentra en ADN nuclear. Se sabe que mutaciones en este gen causan disfunción mitocondrial (331), pero no hay bibliografía que lo relacione directamente con DT2.
- El Complejo III o citocromo bc_1 tiene como una de sus subunidades a Cytb. Varios estudios demostraron que la disminución de su transcripción se relaciona con el aumento de la producción de ROS y, por ende, con daño del ADNmt (332,333). En músculo esquelético, la disminución del ARNm de Cytb estuvo acompañada por acumulación de lípidos y IR (334). En un modelo de ratas diabéticas sometidas a ejercicio aeróbico se logró atenuar la disminución de la transcripción de Cytb. Por lo tanto, se consideró que el ejercicio tendría un efecto protector contra la disfunción mitocondrial y de esta manera contribuiría a mejorar la dislipemia establecida durante la DT2 (335).

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

- El Complejo IV es el denominado Citocromo C Oxidasa (COX), formado por 13 subunidades, constituye el eslabón final de la cadena transportadora de electrones. Las subunidades I a III son las más grandes e incluyen el núcleo catalítico de la enzima y catalizan el transporte de electrones desde el citocromo C hasta el oxígeno y el bombeo de protones. Las subunidades restantes se codifican en el ADN nuclear y tienen funciones regulatorias (336). En un modelo de ratas diabéticas inducidas por estreptozocina se encontró que la actividad de este complejo estaba disminuida, mientras que la producción de ROS estaba aumentada (337). Otro estudio también mostró la disminución de la actividad de este complejo en islotes derivados de ratones diabéticos, que además presentaron signos de EO y disminución de la secreción de insulina (338). Estas correlaciones también se hallaron en humanos (324) y en modelos de ratas sensibles o resistentes a la diabetes que se les suministró una DRS (339).
- El Complejo V, denominado ATP sintasa mitocondrial, es el encargado de fosforilar el ADP para formar ATP en la FO. Está compuesto por 15 subunidades estructurales y 2 de ensamblaje, codificadas tanto en el ADNmt (ATP6, ATP8), como en cromosomas del genoma nuclear (15 subunidades). Mutaciones presentes en 6 de las 17 subunidades se asocian al desarrollo de diferentes enfermedades como cardiomiopatía, neuropatías y diabetes (340). Numerosos estudios relacionan variantes polimórficas de la subunidad ATP6 con DT2, retinopatía, cataratas, neuropatía e hipogonadismo hipergonadotrópico (341-343).

Además de las vías mencionadas, en nuestro análisis aparecieron otras vías que están estrechamente relacionadas con la DT2. Estas son, la contracción del músculo cardíaco en conjunto con la cardiomiopatía diabética. Por otro lado, surgió la vía de enfermedad del hígado graso no alcohólico, la cual tiene una prevalencia cinco veces mayor en personas con DT2 (344).

Sorprendentemente, muchas de las vías que aparecieron tienen que ver con enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Enfermedad de priones, Huntington, Esclerosis lateral amiotrófica y Alzheimer. Estudios recientes han enfatizado sobre mecanismos patológicos compartidos entre este tipo de enfermedades y la DT2 que incluyen inflamación, disfunción mitocondrial y EO. Uno de

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

los trabajos que demostró esto fue el de Carvalho en donde se compararon modelos de ratones con Alzheimer y diabetes inducida por sacarosa (302). En ambos modelos aparecieron anomalías ultraestructurales a nivel mitocondrial y un desequilibrio oxidativo con deterioro de la cadena respiratoria y la FO. Diversos estudios en humanos determinaron que las personas con DT2 tienen mayor riesgo de desarrollar disfunción cognitiva o demencia (345,346). En este sentido, también se han asociado niveles altos de HbA1c con deterioro verbal y de la memoria (347) y, se documentó que personas con DT2 tienen un riesgo 65% más elevado para desarrollar Alzheimer (348).

Resumiendo, e integrando nuestros resultados con lo disponible en la literatura, la alteración en la metilación del ADNmt (especialmente en la región *D-loop*) es una característica que se encuentra presente en diferentes enfermedades (Figura VIII.18) y que genera deterioro tanto de la estructura como de la función mitocondrial. Las patologías más relacionadas son: obesidad (320), IR (349), Diabetes (350), enfermedades cardiovasculares (351), enfermedades neurológicas y neurodegenerativas como Alzheimer (352,353), Parkinson (354) y Esclerosis lateral amiotrófica (192), Cáncer colorrectal y de mama (355,356).

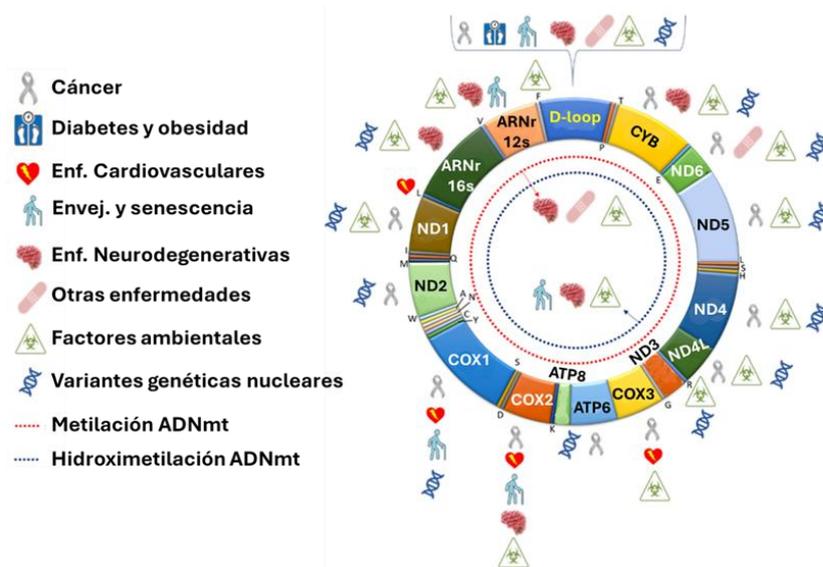


Figura VIII.18. Asociación entre alteraciones en el metiloma mitocondrial y enfermedades. Regiones del ADN mitocondrial cuyos niveles de metilación se asociaron con diferentes enfermedades humanas, factores ambientales y variantes genéticas del ADN nuclear. Adaptado de (192).

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

VIII.2.1.2.D. Modificaciones epigenéticas que no revierten.

En su gran mayoría, las alteraciones en el grado de metilación de CpGs del ADNmt no lograron revertir en el grupo R, evidenciando la gran estabilidad de los cambios epigenéticos mitocondriales generados con la dieta en comparación a los ocurridos en el ADN genómico.

El análisis de las CpGs que no revirtieron en el grupo R mostró que unas 17 lograron mantener los valores de metilación generados en el grupo F, y otras 60 intensificaron los cambios ocurridos en F respecto de C. Esto demuestra que la mayoría de las alteraciones, una vez establecidas, se mantienen (o en el caso de sufrir algún cambio, lo exacerban) a pesar de que se hayan eliminado los estímulos que las originó. En conclusión, y recordando que sólo 30 CpGs del total lograron revertir, podemos decir que los cambios generados por la dieta en el metiloma son estables y que, a pesar de obtener una reversión muy notoria de las alteraciones fisiológicas y metabólicas generales, el ADN de los islotes de los animales del grupo R lleva marcas epigenéticas permanentes, al menos en el período estudiado de 70 días.

VIII.2.2. Conclusiones.

- El metiloma de los islotes provenientes de cada grupo experimental fue diferente, lo cual demostró la influencia de la dieta en las modificaciones epigenéticas.
- Si bien las alteraciones se distribuyeron tanto en el ADN genómico como en el mitocondrial, este último fue el que albergó la mayoría.
- Los genes asociados a las CpGs DM enriquecieron principalmente las vías celulares de termogénesis, FO, algunas patologías relacionadas con la diabetes y enfermedades neurodegenerativas.
- En el grupo F, los genes que codifican subunidades de los complejos mitocondriales sufrirían modificaciones en la metilación de sus CpGs como mecanismo adaptativo que permite en el estado de PD provocar su mayor actividad y generar mayores cantidades de ATP, necesario para sostener la hipersecreción de insulina.

Capítulo VIII: Metiloma de islotes.

- El grupo R no logró generar un metiloma similar al grupo control, por el contrario, la mayoría de las modificaciones generadas por la DRF se mantuvieron y hasta se intensificaron. Esto demuestra que a pesar de lograr un perfil fisiológico similar al control (en donde intervienen claramente otro tipo de mecanismos más rápidos y que operan a otro nivel), las marcas epigenéticas generadas por el daño son estables y difíciles de remover.

Capítulo IX

**Análisis general de metilación diferencial
en el ADN de leucocitos y su comparación
con ADN insular.**

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

IX.1. Resultados.

En este capítulo abordaremos el mismo análisis de metilación hecho anteriormente en islotes, pero para leucocitos. El objetivo principal es encontrar MEPD en un tejido accesible para diagnóstico.

IX.1.1. Identificación de sitios CpGs DM entre los grupos experimentales.

Se evaluó el grado de metilación diferencial en sitios CpGs que se registraron en el ADN aislado de leucocitos de animales de los tres grupos experimentales (C, F y R). Teniendo en cuenta todas las comparaciones posibles encontramos un total de 195 CpGs DM distribuidas de la siguiente manera (Tabla IX.1):

Tabla IX.1. Distribución de CpGs DM en leucocitos por comparación.

	CpGs DM totales	CpGs DM HipoM	CpGs DM HiperM
C vs F	62	57	5
C vs R	67	41	26
F vs R	66	36	30

HipoM: hipometilado; HiperM: hipermetilado.

Es de destacar que el número total de CpGs DM en leucocitos fue muy inferior al hallado en islotes (195 en células sanguíneas contra 1005 en células del islote). Además, en el caso de los leucocitos, las CpGs DM se distribuyeron de manera más uniforme, presentando aproximadamente 65 CpGs DM en cada comparación. Si bien en ambos tejidos la intervención dietética generó un efecto preponderante hacia la hipometilación, el porcentaje de CpGs HiperM fue mayor en el caso de los leucocitos (Figura IX.1).

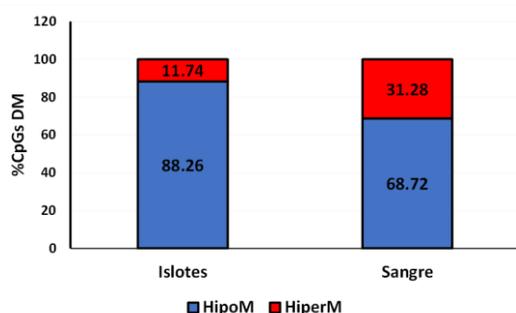


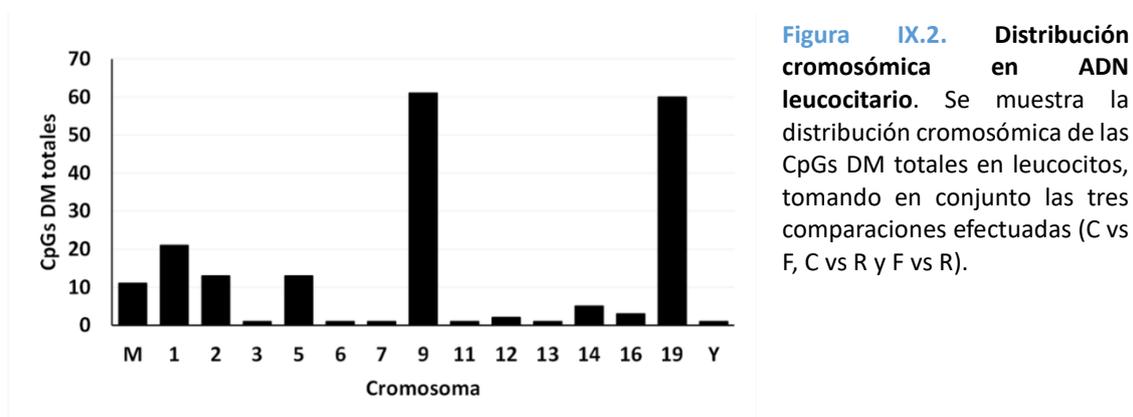
Figura IX.1. Porcentaje de sitios CpGs hipo- e hiper-metilados en islotes y leucocitos. El sector inferior (azul) de cada barra representa el porcentaje de hipometilaciones y el superior (rojo) el de hipermetilaciones. N para islotes =1005 y N para leucocitos =195 sitios CpGs DM.

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

IX.1.2 Distribución en el genoma de los sitios CpGs DM.

IX.1.2.A. Distribución cromosómica.

Mientras que los cromosomas leucocitarios que acumularon una mayor cantidad de sitios CpGs DM fueron el 1, 2, 5, 9, 19 y el M, otros, tales como el 4, 8, 10, 15, 17, 18, 20 y X, no sufrieron modificaciones epigenéticas (Figura IX.2). Es de destacar que la mayoría de los sitios DM se ubicaron en los cromosomas 9 y 19 y que si bien el cromosoma M es uno de los que acumuló un mayor número de CpGs DM (5,64%), no se destaca por sobre los demás cromosomas como ocurrió en islotes, en los que había acumulado el 67,8%.



IX.1.2.B. Distribución en las diferentes regiones de los cromosomas.

La inmensa mayoría de los sitios DM (175 sitios) se localizaron en las regiones intergénicas, representando el 89,74 %. El 10,26 % restante se repartió con un 8,72% en el cuerpo de los genes (18 sitios DM) y 1,54% en regiones promotoras (2 sitios DM asociados con el gen nuclear Rn5-8s y a la región D-loop del ADNmt) (Figura IX.3.A).

Este resultado difiere con lo hallado en islotes, en donde la región que comprende el cuerpo de los genes fue la que sufrió más modificaciones (Figura IX.3.B). En ambos tejidos observamos que los promotores acumularon la menor cantidad de cambios.

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

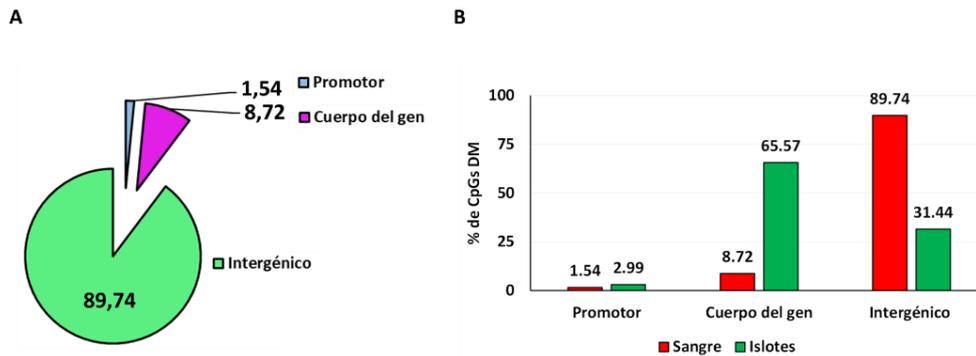


Figura IX.3. Distribución de CpGs DM totales en regiones cromosómicas y su comparación con islotes. A) Distribución porcentual en las diferentes partes del gen (promotor en celeste, cuerpo del gen en púrpura y región intergénica en verde) del total de CpGs DM en leucocitos, considerando las 3 comparaciones (C vs F; C vs R y F vs R). B) Comparación del % de CpGs DM en promotor, cuerpo del gen y regiones intergénicas entre leucocitos (rojo) e islotes (verde). N leucocitos = 195 y N islotes = 1005.

IX.1.2.C. Distribución en Islas CpGs, *Shores* y *Open Sea*.

Las CpGs DM de leucocitos se hallaron mayoritariamente en la región *Open Sea* (90,26 %) y, en menor medida (9,74 %) en Islas CpGs (Figura XI.4). A diferencia de lo encontrado en islotes, las regiones *Shores* no se vieron afectadas.

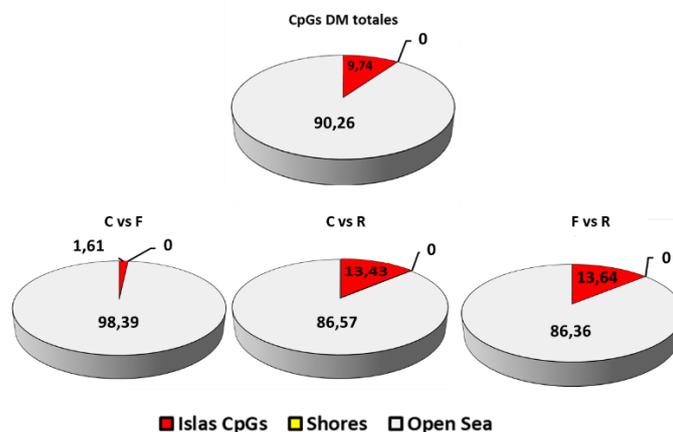


Figura IX.4. Ubicación de las CpGs DM en Islas, *Shores* u *Open Sea*. Los gráficos de tortas representados corresponden a la totalidad de secuencias CpGs DM analizadas en conjunto (N=195; panel superior) y al análisis individual de cada una de las comparaciones efectuadas (panel inferior): C vs F (N=62), F vs R (N=67) y C vs R (N=66). Rojo para Islas CpGs, amarillo para *Shores* (ausente en los 4 gráficos) y gris para *Open Sea*.

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

IX.1.3. Análisis de los genes asociados a las CpGs DM.

IX.1.3.A. Número de genes asociados a CpGs DM por comparación.

Los 195 sitios CpGs DM detectadas en las tres comparaciones se asociaron a 30 genes (Figura IX.5). De estos, sólo Gas8 se vio modificado en todas las comparaciones y 10 genes acumularon sitios CpG DM simultáneamente en dos comparaciones. Observamos que el número de genes asociados a CpGs DM fue mayor en el caso de islotes respecto de lo obtenido en leucocitos (104 vs 30), y que esto tiene correlación directa con el número de CpGs DM que presenta cada tejido.



Figura IX.5. Genes asociados a CpGs DM en leucocitos. El diagrama de Venn grafica la distribución de los 30 genes asociados a sitios CpGs DM en cada una de las comparaciones (C vs F en rojo, C vs R en verde y F vs R en azul). La tabla de la derecha identifica los 11 genes que resultaron asociados a las secuencias CpGs DM en más de una comparación.

IX.1.3.B. Identificación de los 30 genes asociados a CpGs DM y localización en las diferentes regiones génicas.

A continuación, se identifican los nombres de los genes asociados a las CpGs DM, su ubicación cromosómica y el tipo de modificación (HipoM/HiperM). Se muestran por separado los genes pertenecientes al ADN nuclear y al mitocondrial (Tabla IX.2.A y Tabla IX.2.B).

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

Tablas IX.2. Genes asociados a las CpGs DM (HipoM/HiperM) y su ubicación génica para cada comparación y tipo de ADN.

Tabla IX.2.A. ADN nuclear.

C vs F				
ADN nuclear				
Gen	ID	N° de CpG HipoM	N° de CpG HiperM	Región génica
Rn5-8s	NR_046238.1	0	1	Promotor
Gas8	NM_001039030.1	53	1	Intergénico
Vom2r57	NM_001099474.1	1	0	
Tlr4	NM_019178.1	1	0	
Esrp1	NM_001127564.2	1	0	
Brca2	NM_031542.2	1	0	
Zfp385b	NM_001107736.1	0	1	
Lzts1	NM_153470.1	0	1	
Kdm4c	NM_001106663.3	0	1	

C vs R				
ADN nuclear				
Gen	ID	N° de CpG HipoM	N° de CpG HiperM	Región génica
LOC310926	NM_001025002.1	0	6	Cuerpo del gen
Uxs1	NM_139336.1	28	0	Intergénico
Kdm4c	NM_001106663.3	10	0	
Nampt	NM_177928.3	1	0	
Veph1	NM_001014171.1	1	0	
Emb	NM_053719.1	1	5	
Mcc	NM_001170534.2	0	3	
Ces1f	NM_001103359.2	0	1	
Clec4m	NM_001170397.1	0	1	
Gas8	NM_001039030.1	0	1	
Mab2l12	NM_001109391.1	0	1	
Rn18s	NR_046237.1	0	1	
Zfp455l1	NM_001139491.1	0	1	

F vs R				
ADN nuclear				
Gen	ID	N° de CpG HipoM	N° de CpG HiperM	Región génica
LOC310926	NM_001025002.1	0	2	Cuerpo del gen
Uxs1	NM_139336.1	33	0	Intergénico
Emb	NM_053719.1	1	3	
Lekr1	NM_001115029.2	1	0	
Nfkbiz	NM_001107095.1	1	0	
Mcc	NM_001170534.2	0	5	
Zfp455l1	NM_001013434.1	0	3	
Gas8	NM_001039030.1	0	3	
Rn18s	NR_046237.1	0	3	
Ces1f	NM_001103359.2	0	1	
Clvs2	NM_001108459.1	0	1	
Ddx3	NM_001167665.1	0	1	
Tsn	NM_021762.1	0	1	
Lzts1	NM_153470.1	0	1	
Zfp868	NM_001009538.1	0	1	

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

Tabla IX.2.B. ADN mitocondrial.

B.1. Número de CpGs HiperM en ADNmt y sus genes asociados por comparación.

N° de CpG HiperM en cuerpo de genes del ADNmt			
Gen	ID	C vs R	F vs R
Nd6	YP_665640.1	4	4
Nd5	YP_665639.1	1	0
Cox2	YP_665632.1	1	0

B.2. CpGs HiperM en la región *D-loop* del ADNmt.

CpG ID	HiperM en
CpG 15920	F vs R

IX.1.3.C. Vías celulares en las que participan los genes.

El análisis de enriquecimiento funcional de los 30 genes modificados en todas las comparaciones arrojó resultados similares a los obtenidos anteriormente en islotes, tanto a nivel de los procesos afectados (FO, cardiomiopatía diabética, termogénesis y enfermedades neurológicas) como de los genes asociados (Cox2, Nd5, Nd6 y Cytb) (Figura IX.6). Una diferencia que encontramos con respecto a los islotes fue que los 4 genes que aparecieron en el análisis de leucocitos poseían hipermetilaciones en el cuerpo del gen.

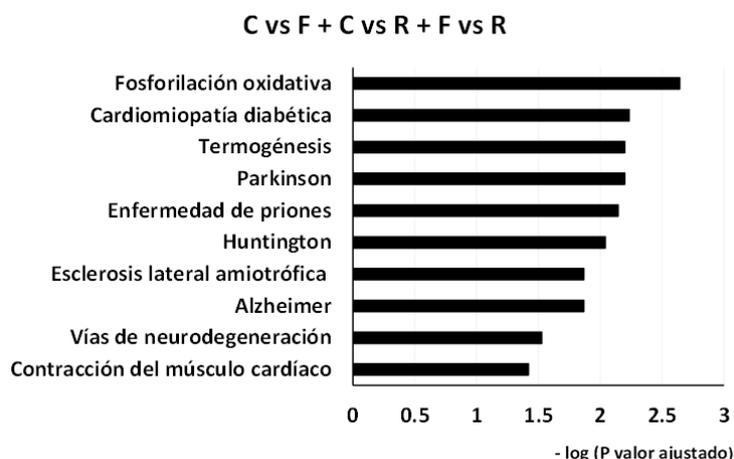


Figura IX.6. Vías celulares en las que intervienen los genes DM registrados en forma conjunta en las tres comparaciones (C vs F, C vs R y F vs R, N=30). Las vías se muestran en orden decreciente del valor de $-\log$ (P valor ajustado).

IX.4. Análisis de la posible reversión de los cambios epigenéticos registrados en el grupo F.

Para encontrar los sitios CpGs que logran revertir los efectos de la DRF, realizamos los dos análisis previamente descritos en el capítulo anterior en el que impusimos diferentes grados de restricción.

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

IX.1.4. A. Análisis con bajas restricciones.

Aplicando este criterio vimos que 59 de los 62 sitios que se encontraban DM en la comparación C vs F (el 95%), lograron niveles de metilación similares a los del grupo control. Cabe destacar que en el grupo F, 57 estaban HipoM y sólo 2 habían sido HiperM con respecto al control (Figura IX.7).

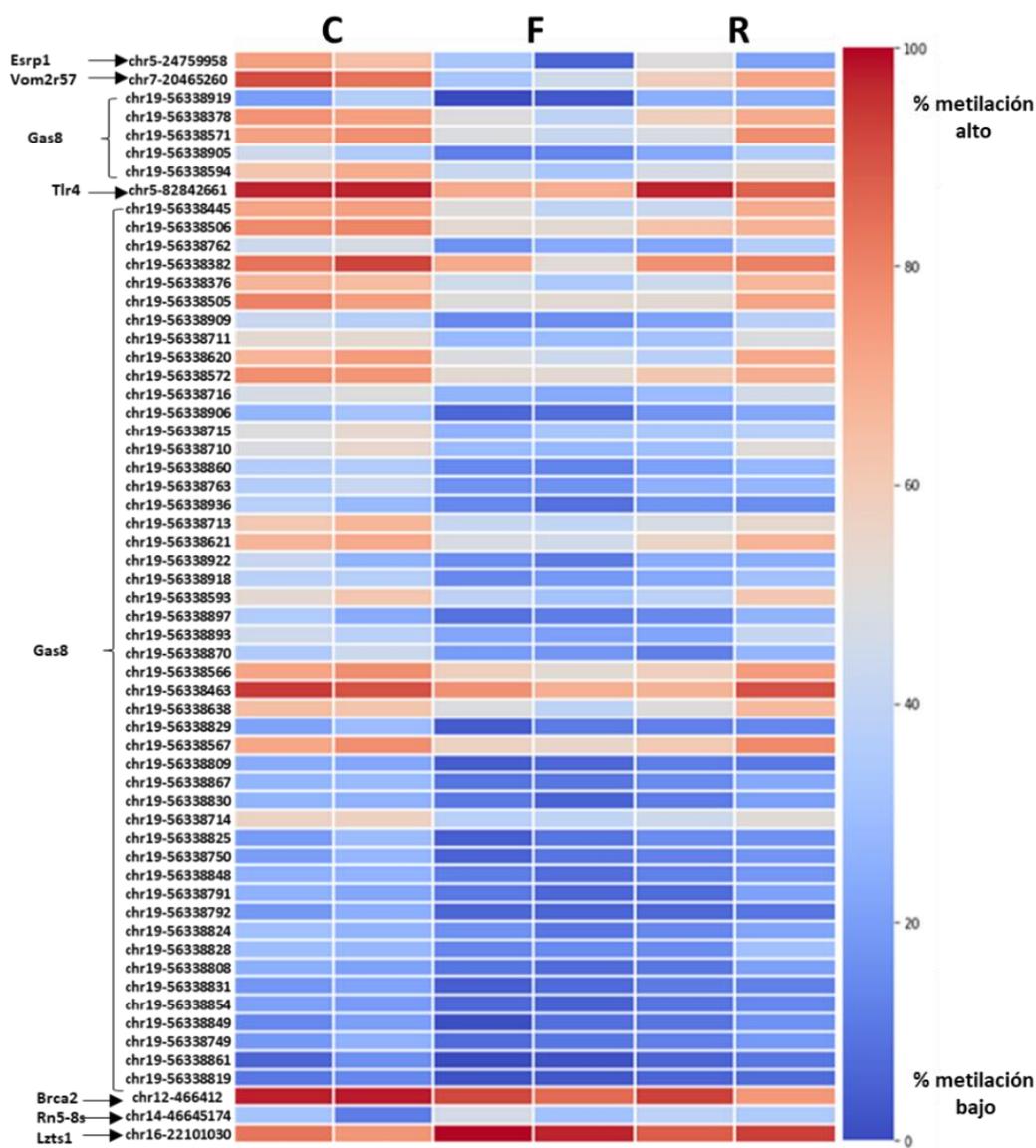


Figura IX.7. Mapa de calor de reversión parcial (análisis de bajas restricciones). Se muestran las CpGs cuyos % de metilación son significativamente diferentes entre los grupos C y F y similares entre C y R ($q < 0,05$). Para cada grupo experimental (C, F y R) se realizaron 2 réplicas biológicas (N=2). En la escala de valores cromáticos, rojo representa alto % de metilación y azul representa bajo % de metilación. A la izquierda de los ID de las CpGs DM y se referencian los genes afectados por esas modificaciones epigenéticas.

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

IX.1.4.B. Análisis con restricciones altas.

Como resultado de este análisis, sólo 3 de los 62 sitios CpGs DM en F respecto a C lograron en el grupo R un nivel de metilación similar al del grupo C pero significativamente diferente de F. Esto representó un porcentaje de reversión de 5%. Las 3 CpGs revertidas se encontraron asociadas al gen Gas8 y sufrieron HipoM en el grupo F (Figura IX.8).

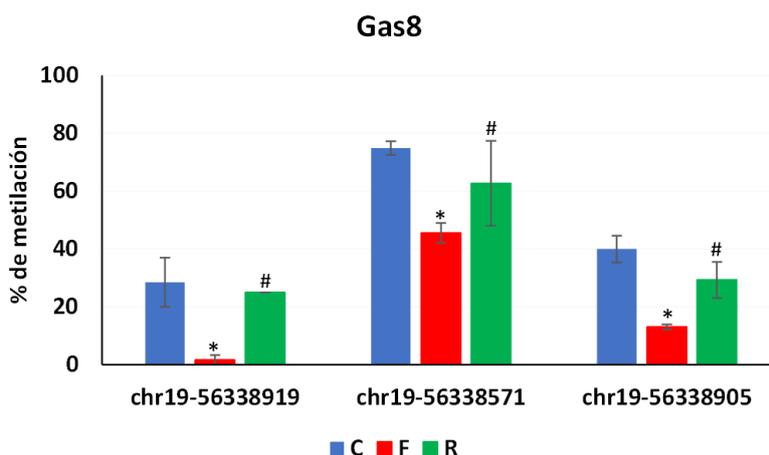


Figura IX.8. Análisis de alta restricción: reversión total de 3 CpGs asociadas al gen Gas8. Se graficaron los porcentajes de metilación de 3 sitios CpG asociados al gen Gas8 para cada grupo experimental: control (azul), fructosa (rojo) y reversión (verde). * $q < 0,05$ vs C, # $q < 0,05$ vs F. chr: cromosoma.

A diferencia del análisis anterior, donde el porcentaje de sitios CpGs DM que cumplían las condiciones impuestas era superior en células sanguíneas que en células insulares (95 % vs 42%), en este análisis más restrictivo, encontramos que el porcentaje de CpGs que revierten en el ADN de células sanguíneas es inferior al encontrado en los islotes (5% vs 23%). Cabe destacarse también, que la mayoría de las reversiones ocurridas en los islotes eran de sitios CpGs que se encontraban hipermetilados en el grupo F respecto del control y, en el caso de los leucocitos, todas fueron hipometilaciones.

IX.1.5. Otros análisis complementarios:

No encontramos casos de sitios CpGs que, habiendo cambiado su estado de metilación en el grupo F respecto al C, este cambio se exacerbe en el grupo R (Figura IX.9). Sólo encontramos una CpG, asociada al gen Gas8 (chr19-56338489), que aumentó su grado

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

de metilación en F y en R respecto a C, pero que no presentó diferencias entre F y R. Esto se ilustra en la [Figura IX.9](#), en donde se agregan también las CpGs revertidas del anterior análisis.

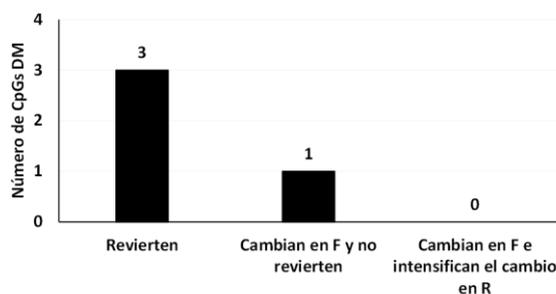


Figura IX.9. Resumen de los cambios registrados en el grado de metilación de sitios CpGs sufridos en F respecto a C y su evolución en el grupo R. Representación gráfica del número de CpGs DM en F respecto a C que en el grupo R logran o no revertir el cambio.

IX.1.6. Genes afectados simultáneamente en islotes y leucocitos.

Para cada una de las tres comparaciones efectuadas, existen genes que presentan secuencias DM tanto en islotes como en leucocitos como se resume en la [Tabla IX.3](#).

Tabla IX.3. Genes asociados a CpGs DM tanto en células insulares como sanguíneas.

Comparación	Número de genes	Genes
C vs F	2	Lzts1, Brca2
C vs R	11	LOC310926, Uxs1, Rn18s, Kdm4c, Emb Cox2, Nd5, Nd6, Gas8, Ces1f, Mcc
F vs R	14	Uxs1, Ddx3, Rn18s, Lzts1, Emb, Tsn, Zfp868 Cytb, Nd6, Zfp455l1, Gas8, Ces1f, LOC310926, Mcc

Analizando las comparaciones C vs R y F vs R encontramos que hay 6 genes que presentan un gran número de CpGs DM (10 ó más) en uno de los tipos celulares estudiados (leucocitos o islotes) y que, a su vez, también presentan modificaciones en el otro. Los genes que cumplieron estas condiciones fueron Kdm4c, Uxs1, Nd6, Cox2 y Nd5 en la comparación C vs R y Uxs1, Cytb y Nd6 en la comparación F vs R ([Figura IX.10](#)).

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

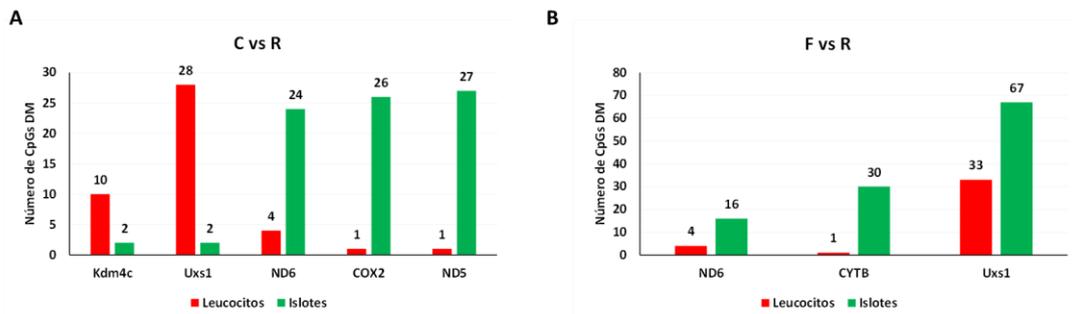


Figura IX.10. Genes asociados a CpGs DM en leucocitos e islotes. Se ilustran los genes que poseen más de 10 CpGs DM en uno de los tipos celulares analizados (leucocitos y células insulares) y al menos 1 CpG DM en el otro. **A)** Comparación C vs R. **B)** Comparación F vs R. Las barras rojas representan el número de CpG DM en leucocitos y las verdes, en células insulares.

Por último, con el objetivo de identificar MEPD robustos y representativos, buscamos modificaciones en la metilación del grupo F con respecto a C que ocurran tanto en islotes como en células sanguíneas. De los 28 genes que presentaron sitios DM en F respecto a C en islotes y los 9 que lo hacen en células sanguíneas, encontramos dos (Lzts1 y Brca2) que lo hacen simultáneamente en ambos tejidos. A pesar de esto, las CpGs DM no fueron las mismas y los cambios en el % de metilación no siempre tuvieron la misma tendencia (Tabla IX.4 y Figura IX.11).

Tabla IX.4. Genes que simultáneamente sufren modificaciones en la metilación en islotes y leucocitos.

Gen	Tejido	CpG	Cromosoma	Condición	Ubicación
Lzts1	islotes	CpG 21917823	16	HipoM	Región intergénica
	leucocitos	CpG 22101030		HiperM	
Brca2	islotes	CpG 97597	12	HipoM	
	leucocitos	CpG 466412			

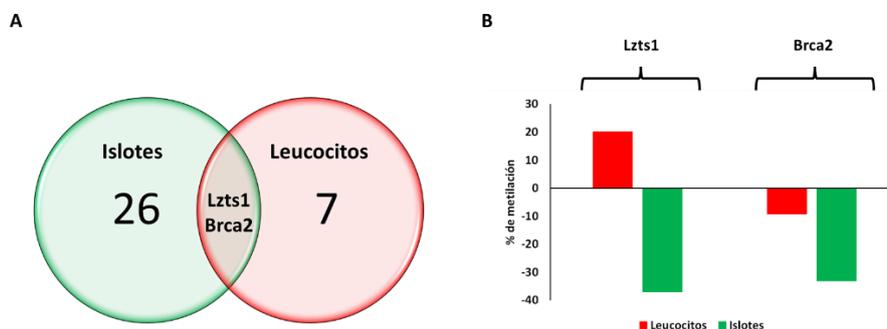


Figura IX.11. Genes que sufren modificaciones en la metilación en la comparación C vs F en islotes y leucocitos. **A)** Se observan tanto los genes que se modifican sólo en un tejido como los genes que se modifican en ambos. N de islotes = 28, N de leucocitos = 9. **B)** Se ilustra el cambio del grado de metilación de dos genes en la comparación C vs F en islotes y leucocitos.

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

Finalmente, debido a no haber encontrado marcadores de PD que se reproduzcan en ambos tejidos, se seleccionaron varias CpGs que, debido a que presentaran una mayor diferencia en los porcentajes de metilación en leucocitos, podrían usarse como posibles MEPD. De este análisis surgieron 5 CpGs candidatas, asociadas a los genes *Esrp1*, *Vom2r57*, *Gas8*, *Zfp385b* y *Kdm4c* (Tabla IX.5).

Tabla IX.5. Marcadores Epigenéticos de Prediabetes.

CpG	Cromosoma	Gen	Condición en F vs C
CpG 24759958	5	<i>Esrp1</i>	HipoM
CpG 20465260	7	<i>Vom2r57</i>	
CpG 56338919	19	<i>Gas8</i>	
CpG 64849717	3	<i>Zfp385b</i>	HiperM
CpG 91132402	5	<i>Kdm4c</i>	

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

IX.2. Discusión y conclusiones.

IX.2.1. Discusión.

La identificación de marcadores de PD es de fundamental importancia como herramienta de diagnóstico y prevención, que permita adoptar medidas tendientes a detener o ralentizar el progreso a DT2. Los posibles marcadores deben cumplir características tales como tener una alta especificidad por la enfermedad a diagnosticar, ser fácil de medir y de bajo costo (357). Por esta razón, en nuestra búsqueda de MEPD elegimos CpGs DM que se detecten en leucocitos, para poder buscarlos en muestras de sangre periférica.

IX.2.1.1. Generalidades del análisis.

Estudiando el metiloma de los leucocitos, advertimos que este tipo celular fue menos sensible que las células insulares pancreáticas a las modificaciones ejercidas por el consumo de las diferentes dietas, como se desprende del menor número de CpGs DM y de genes asociados detectados en las células sanguíneas. Volkmar, quien realizó el primer perfil completo de metilación de ADN de islotes pancreáticos y leucocitos pertenecientes a pacientes diabéticos ya había mostrado que los cambios en los metilomas de islotes y leucocitos no eran exactamente iguales (358). Estos resultados reflejan una característica conocida del epigenoma que es su especificidad de tejido o tipo celular (194).

Por otro lado, todas las comparaciones efectuadas en leucocitos presentaron un número similar de CpGs DM, aunque, del mismo modo que en islotes, la comparación C vs R fue la que más sitios DM acumuló. Otro punto para destacar fue que, si bien las hipometilaciones también fueron mayoritarias en estas células, registramos un porcentaje mayor de hipermetilaciones que en los islotes.

IX.2.1.2. Localización de las CpGs DM y enriquecimiento funcional.

En leucocitos encontramos que la mayoría de las modificaciones epigenéticas ocurrieron en regiones intergénicas del ADN nuclear y, llamativamente, sólo el sitio promotor del gen nuclear Rn5-8s presentó una CpG DM. Con estos resultados

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

podemos sospechar que, si bien los leucocitos cambian su paisaje epigenético, no sufrirían alteraciones de su transcriptoma de manera tan directa, como el caso de los islotes cuyos promotores se ven más afectados.

Un caso interesante para analizar fue el gen *Uxs1*, el que no habiendo registrado cambios en la comparación C vs F, alojó un total de 28 CpGs HipoM en R respecto de C y 33 HipoM en R respecto de F. Resulta evidente que se trata de un gen muy susceptible al tratamiento con fructosa y a los consecuentes cambios en el metabolismo glucémico ya que se encuentra modificado en un gran número de CpGs en ambos tejidos estudiados.

En cuanto al ADNmt, si bien alojó algunas modificaciones en leucocitos, éstas no fueron de la magnitud que habíamos encontrado en islotes. Creemos que la mayor influencia de la metilación como elemento regulatorio de la expresión en células β está dada por el papel que desempeñan las enzimas mitocondriales en la activación del mecanismo de SIEG, que necesita del aumento de la producción ATP en las mitocondrias. El estudio de enriquecimiento funcional en leucocitos coincidió con el de islotes y arrojó vías relacionadas con la función mitocondrial, como son la termogénesis y la FO y, vías relacionadas con enfermedades asociadas a la DT2 (cardiomiopatía diabética y enfermedades neurológicas y neurodegenerativas). Este resultado tuvo que ver con las modificaciones en la metilación en varios genes mitocondriales (*Cox2*, *Nd5*, *Nd6* y *Cytb*) que enriquecen estas vías. Como mencionamos anteriormente, si bien el impacto de la metilación diferencial en el ADNmt fue menor que en islotes, la afección de los genes mencionados es suficiente para conseguir que se modifiquen vías celulares mitocondriales de manera significativa. En este sentido, nuestros resultados también están en línea con numerosas publicaciones que sostienen que las intervenciones dietarias ejercen efectos diferenciales sobre la función mitocondrial (359,360) y, que existe una asociación entre la aparición de alteraciones en la función mitocondrial en la DT2 y los cambios en la metilación del ADN (361,362).

IX.2.1.3. Genes asociados a CpGs DM en la comparación C vs F.

Al analizar cuáles fueron los genes que alojaron modificaciones en la metilación de sus CpGs en el grupo F, encontramos que algunos de ellos están relacionados con la DT2.

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

Entre ellos podemos mencionar a *Lzts1* y *Brca2*, de los cuales ya hemos hablado en el capítulo anterior, y los genes *Tlr4*, *Esrp1* y *Kdm4c*:

- *Tlr4*: codifica el receptor de tipo Toll 4, perteneciente a la familia de receptores TLRs. Este receptor reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (363) y desencadena la vía NF- κ B, con el consecuente aumento de citoquinas proinflamatorias como IL1 β , IL-6 y TNF α (364). Adicionalmente, desempeña un papel clave en el metabolismo de los glucolípidos y contribuye a la IR por interferir en la señalización de la insulina (365). La expresión del gen *Tlr4* se ha encontrado aumentada en monocitos y células mononucleares de pacientes con DT2 (366,367) y ciertas variantes polimórficas han sido asociadas tanto al desarrollo de DT2 (368) como de nefropatía (369) y retinopatía diabética (370).
- *Esrp1*: codifica la proteína epitelial 1 reguladora del *splicing*, cuya actividad anormal se ha relacionado con diferentes tipos de cánceres (371,372). En el estudio prospectivo CORDIOPREV, en donde participaron pacientes con enfermedad cardiovascular y alto riesgo de desarrollar DT2, se encontró que los niveles de esta proteína estaban más elevados en aquellos pacientes que durante el estudio desarrollaron DT2 (373). En otro trabajo, se asoció su expresión alterada con el aumento del miR-4454 en plasma de personas obesas, que alteró la respuesta celular a la insulina debido a cambios en la expresión del gen del receptor de insulina y de sus variantes de *splicing* (374).
- *Kdm4c*: codifica la enzima lisina-desmetilasa 4C, que cataliza la eliminación de grupos metilo de las lisinas 9 y 36 de la histona H3 (375), y se encuentra sobreexpresada en varios tipos de cánceres (376). Desempeña un papel protector contra la obesidad y el riesgo de DT2 (377), y una de sus variantes polimórficas se asoció con DT2 (378). Estudios realizados con linfocitos T de pacientes con diabetes LADA demostraron que estos poseían simultáneamente un mayor nivel de expresión de *Kdm4c* y una reducción de la metilación de la lisina 9 en la histona H3 (379).

IX.2.1.4. Análisis de la reversión.

Con respecto a la reversión de las CpGs DM, en el caso de leucocitos fue más evidente la tendencia de las marcas epigenéticas a permanecer estables una vez que se

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

manifestó el estado PD. La participación de las modificaciones epigenéticas en la regulación de la expresión génica afecta niveles iniciales, y su remoción sería más compleja y requeriría de más tiempo que otros mecanismos rápidos de compensación que actúan en niveles más bien funcionales. Un ejemplo de estos podrían ser diferentes sistemas moleculares que modulen el aumento de la secreción de insulina una vez que ésta ya está sintetizada y acumulada en los gránulos. Por lo mencionado, suponemos que, aunque se prolongue considerablemente el tiempo de tratamiento para revertir el paisaje epigenético generado, es posible que no se logre una reversión total. También consideramos que los cambios fisiológicos y metabólicos observados en el desarrollo del estado de PD que revirtieron en el grupo R están relacionados con la activación de mecanismos regulatorios a nivel transcripcional que posteriormente influenciarían en el nivel de expresión y la función proteica.

Esta dificultad para eliminar las marcas generadas por un estado con incursiones hiperglucémicas periódicas podría generar predisposición futura a desarrollar DT2 y sus complicaciones, incluso si se lograra normalizar el metabolismo y restablecer la homeostasis fisiológica. Esto tiene relación con el concepto de “memoria metabólica” o “memoria hiperglucémica” que fue descrito luego de los reconocidos estudios prospectivos en diabetes como DCCT/EDIC (380,381), UKPDS (382) y STENO-2 (383). El concepto de “memoria metabólica o hiperglucémica” plantea que el daño causado por el EO inducido por la hiperglucemia se puede prevenir cuando se inicia un control temprano y eficiente de la glucemia, pero no se revierte fácilmente si se mantiene un control deficiente durante un período prolongados (384). Es decir, que, a pesar de los esfuerzos por controlar los niveles glucémicos mediante la adopción de una dieta equilibrada, la práctica de ejercicios físicos y hasta la prescripción de medicamentos (incluida la insulina), muchos sujetos con diabetes continúan desarrollando diversas complicaciones tiempo después de haber normalizado la glucemia (379). Este fenómeno también se observó en ratas, en un estudio realizado con animales que tenían 6 ó 12 semanas de evolución de diabetes se demostró que las que llevaban más tiempo de evolución desarrollaron retinopatía por más de que ambos grupos fueron trasplantados con islotes normales (385). Recientemente se ha propuesto que la memoria metabólica podría tener su fundamento en los mecanismos epigenéticos que se manifiestan en estos individuos (386). Es sabido que estos mecanismos actúan en la

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

interfaz de factores genéticos y ambientales, por lo tanto, frente a la DRF que desencadena hiperglucemia, se inducen una variedad cambios en el epigenoma capaces de perdurar luego de la normalización de la glucemia, gracias a que las enzimas modificadoras de histonas y las DNMTs continúan con una actividad modificada respecto a la desarrollada durante la homeostasis (387-389).

En los leucocitos de nuestras ratas, sólo 3 sitios CpGs de los 62 DM en el grupo F lograron revertir totalmente su estado de metilación en el grupo R, y todos ellos se alojaron en regiones intergénicas asociadas a un único gen, *Gas8*. Este gen demostró ser muy sensible a los cambios de hábitos alimenticios ya que, además de ser el único que presentó CpGs capaces de revertir, también fue el único que alojó CpGs DM en un número elevado en todas las comparaciones. *Gas8* (proteína específica de arresto del crecimiento 8) es un supresor tumoral que codifica un elemento del complejo regulador nexina-dineína, que es clave para el movimiento ciliar (390). En el genoma humano, el locus de este gen contiene un marco de lectura abierto en dirección opuesta, que genera un ARN no codificante largo llamado GAS8-AS1 que es utilizado como biomarcador de esclerosis múltiple y ha sido asociado con cáncer (391). Adicionalmente, se ha demostrado que la expresión de GAS8-AS1 regula muchas funciones celulares, incluidas proliferación, migración, invasividad y autofagia (392).

IX.2.1.5. MEPD.

Si bien existen muchos estudios que analizan la metilación diferencial del ADN en pacientes con DT2, no existen demasiadas publicaciones acerca de su efecto en la PD. El trabajo de Pheiffer (274), mencionado anteriormente, reportó que en personas con PD y DT2, el ADN leucocitario presenta diferencias de metilación en regiones intergénicas reguladoras de miRNAs. Adicionalmente, un estudio prospectivo demostró que las personas con DT2 poseían modificaciones en la metilación con respecto a las que presentaban PD, siendo el 80% de éstas HipoM (393). En dicho trabajo, las alteraciones afectaron genes relacionados con el EO mitocondrial y varios se asociaron al desarrollo de nefropatía diabética, por lo que fueron propuestos como posibles marcadores tempranos de esta enfermedad.

Capítulo IX: Metiloma de leucocitos.

Si bien las modificaciones epigenéticas se dan de una manera tejido-específica, en primera instancia intentamos encontrar algún MEPD que se manifieste simultáneamente en islotes y leucocitos, para que este sea lo más representativo posible de PD. Lamentablemente, y aunque encontramos dos genes (Lzts1 y Brca2) que presentaban cambios en el nivel de metilación en ambos tejidos, los sitios CpG afectados en células de ambos tejidos fueron diferentes, lo que los excluye para ser tenidos en cuenta como posibles MEPD.

Debido a esto es que sólo proponemos como posibles MEPD a los sitios CpG que en leucocitos presentaron las mayores diferencias en sus grados de metilación entre los grupos F y C, correspondientes a 5 sitios CpGs DM asociados a los genes *Esrp1*, *Vom2r57* (receptor 57 vomeronasal tipo 2), *Zfp385b* (proteína dedo de zinc 385B), *Kdm4c* y *Gas8*.

IX.2.2. Conclusiones.

El metiloma de leucocitos se modificó con los diferentes hábitos alimenticios en todas las comparaciones. Resultó ser menos sensible que el metiloma insular, presentando un menor número de CpGs DM y genes asociados. Aunque la mayoría de las modificaciones se hallaron en regiones intergénicas del ADN nuclear, la influencia de éstas en el ADN mitocondrial hizo que el enriquecimiento funcional arroje las mismas vías que en el caso de islotes. Otros resultados comunes tienen que ver con la resistencia del metiloma a la reversión (sólo 3 CpGs asociadas a *Gas8* lograron revertir), la sensibilidad del gen *Uxs1* a la DRF y la aparición de genes relacionados con DT2 y cáncer en la comparación C vs F.

Por lo tanto, si bien existen disparidades en los resultados obtenidos en islotes y leucocitos, la tendencia al cambio en ambos tejidos es similar y proponemos 5 sitios CpGs asociados a los genes *Esrp1*, *Vom2r57*, *Zfp385b*, *Kdm4c* y *Gas8* como candidatos a ser MEPD.

Capítulo X

Conclusiones globales y perspectivas a futuro.

Capítulo X: Conclusiones globales y perspectiva a futuro.

Nuestro modelo de DRF suministrada a ratas por 21 días (F21), generó un estado de alteración plurimetabólica similar al de la PD humana, con presencia de dislipemia, IR y TGA. Las incursiones hiperglucémicas generadas luego de cada comida, fueron responsables del aumento en el EO y su consecuente implicancia en la posible aparición de futuras complicaciones propias de la diabetes. A su vez, la GA permaneció normal a costa de la hiperfunción de las células β , que mantuvieron la insulina en niveles superiores a los normales en condiciones de ayuno.

El consumo extendido de DRF por 70 días generó las mismas alteraciones presentadas por los animales F21. En el grupo R, se revirtieron las modificaciones del estado fisiológico y/o metabólico gracias a la adopción de una dieta saludable durante un período mucho más prolongado que el que se había necesitado para instalar la PD. Este resultado, sumado a que no pudimos generar un grupo R administrando α -lipoico en el grupo F, pero sí en el F21, podemos confirmar que los cambios producidos por la dieta desbalanceada durante 70 días generan consecuencias a largo plazo que son difíciles de remover.

El análisis transcripcional demostró que en el grupo F, la expresión de los genes relacionados con apoptosis y neogénesis evidenciaron la disminución de la masa celular β característico del estado PD-símil. Por el contrario, la mayoría de los genes claves para la función de las células β y para procesos como la vasculogénesis y la defensa contra el aumento de las ROS aumentaron sus niveles de expresión en el grupo F a manera de mecanismo adaptativo disparado por las células β para compensar los daños generados por la DRF. Por lo tanto, los resultados de expresión acompañan la hipótesis de que en el estado PD habría una hiperfunción de la célula β acompañada de una disminución de su masa, lo cual desencadenaría a largo plazo DT2. En cuanto al grupo R, encontramos una tendencia general a revertir los cambios transcripcionales ocurridos en F. En algunos casos la reversión fue total y los valores de R fueron iguales a los C y, en otros, si bien R mostró un comportamiento antagónico al cambio generado en F, no mostró valores idénticos al control.

En cuanto al metiloma de islotes, todos los grupos fueron diferentes. Sorprendentemente, el mayor número de CpGs DM se encontró al comparar el grupo reversión con el control. En esta misma línea, sólo el 23% de las CpGs DM que se

Capítulo X: Conclusiones globales y perspectiva a futuro.

modificaron en el grupo F con respecto a C lograron revertir. Esto evidenció tanto la complejidad del grupo R, que atraviesa diferentes estados metabólicos, como la dificultad para la remoción de marcas epigenéticas generadas por la DRF aun cuando pudieron revertirse los cambios fisiológicos, metabólicos y transcripcionales. Este resultado suma evidencia a que la “memoria metabólica” sería sostenida por mecanismos epigenéticos.

La amplia mayoría de las modificaciones en la metilación del ADN de células insulares (67,8%) se ubicó dentro del cromosoma mitocondrial, alterando tanto el *D-loop* como los cuerpos génicos. La mayoría de las variaciones encontradas fueron HipoM y, los genes asociados a éstas enriquecieron vías relacionadas con la termogénesis y la FO en todas las comparaciones realizadas. A partir de estos resultados y teniendo en cuenta la escasa información sobre las consecuencias transcripcionales que traen las modificaciones en el metiloma mitocondrial decidimos estudiar la expresión génica de 3 de estos genes, que codifican para subunidades de complejos mitocondriales. Hallamos perfiles de expresión análogos, con aumento en el grupo F y, valores similares al control para el grupo R. Interpretamos que la DRF induce cambios en el metiloma mitocondrial que repercuten en el aumento de la expresión génica de enzimas de la CTE, con el consecuente aumento de la relación ATP/ADP que dispara la secreción de insulina. O sea, el aumento de la expresión génica como consecuencia de las modificaciones epigenéticas sufridas a partir de estímulos diabetogénicos sería un mecanismo compensatorio para mantener la hipersecreción de insulina típica de la PD. Sin embargo, como el estado compensatorio generado durante la PD no es sostenible en el tiempo, una prolongación de la exposición al estímulo diabetogénico (como la DRF) terminará agotando a las células β y sus mitocondrias llegarán a una disfunción, desencadenando nuevos paisajes epigenéticos, transcripcionales y metabólicos típicos de DT2 y sus posibles complicaciones.

En cuanto al grupo R, proponemos que existen otros mecanismos (que involucren a TFAM y ARNs no codificantes) no estudiados en esta tesis, que podrían estar actuando sobre la expresión génica de manera independiente de la resistencia que ejercen las marcas de metilación para volver a condiciones iniciales.

Con respecto al genoma nuclear, la mayoría de las modificaciones se encontraron en regiones intergénicas. Además, dentro de la comparación entre el grupo control y F

Capítulo X: Conclusiones globales y perspectiva a futuro.

surgieron genes relacionados con distintos tipos de cánceres, incluido el pancreático. También surgió el gen Uxs1 como un candidato interesante para seguir siendo estudiado, ya que fue el que presentó el mayor número de modificaciones en todas las comparaciones.

En cuanto a los leucocitos, encontramos un menor impacto de las modificaciones en el metiloma, mostrando un número menor de CpGs DM y de genes asociados. Además, la mayoría de las CpGs DM se ubicaron en regiones intergénicas del ADN nuclear, a diferencia de la supremacía del cromosoma mitocondrial en islotes. Esto tiene que ver tanto con el rol central del islote en el mantenimiento de la homeostasis glucémica y los desbalances generados durante la PD y DT2, como con la importancia particular de la función mitocondrial en las células β para promover la SIEG.

A pesar de las diferencias mencionadas, el metiloma de los leucocitos mostró tendencias similares a lo que ocurrió en islotes. En este sentido, la comparación C vs R fue la que mayor cantidad de CpGs DM presentó y, de la mano con esto, sólo 3 CpGs (pertenecientes al gen Gas8) lograron revertir. Además, las vías celulares enriquecidas en genes asociados a CpGs DM fueron las mismas que las encontradas en islotes. El gen Uxs1 también se destacó por ser muy sensible en células sanguíneas al tratamiento con fructosa y la comparación C vs F arrojó varios genes relacionados con cáncer.

En la búsqueda de MEPD hallamos 2 genes (Lzts1 y Brcas2) que simultáneamente sufrieron modificaciones en su nivel de metilación en ambos tejidos, aunque no lo hicieron en la misma CpG. De todas maneras, destacamos este hallazgo porque al ser las marcas epigenéticas tejido-específicas, denota que ambos genes podrían tener un rol importante en la fisiopatología de la PD.

Finalmente, proponemos sólo 5 CpGs asociadas a los genes Esrp1, Vom2r57, Zfp385b, Kdm4c y Gas8 en leucocitos de sangre periférica como posibles MEPD. Queda como desafío futuro poder diseñar una PCR que sea capaz de distinguir alguno de los marcadores (ver Anexo 2), y de esta manera utilizarlos en el diagnóstico temprano de PD para detener o ralentizar su evolución a DT2. Por otro lado, sería interesante enriquecer nuestro estudio, extendiéndolo a otros órganos involucrados en la instalación de la hiperglucemia típica de la fisiopatología DT2, como son el resto de los

Capítulo X: Conclusiones globales y perspectiva a futuro.

integrantes del “octeto ominoso” de DeFronzo y el más reciente grupo de los “once malvados”.

Además de los MEPD propuestos, los resultados ampliamente discutidos en este trabajo de tesis (y resumidos en la [Figura X.1](#)), nos permiten ampliar el conocimiento de la fisiopatología y de las bases moleculares a diferentes niveles (fisiológicos/metabólicos, transcripcionales y epigenéticos) de la PD y su reversión parcial.

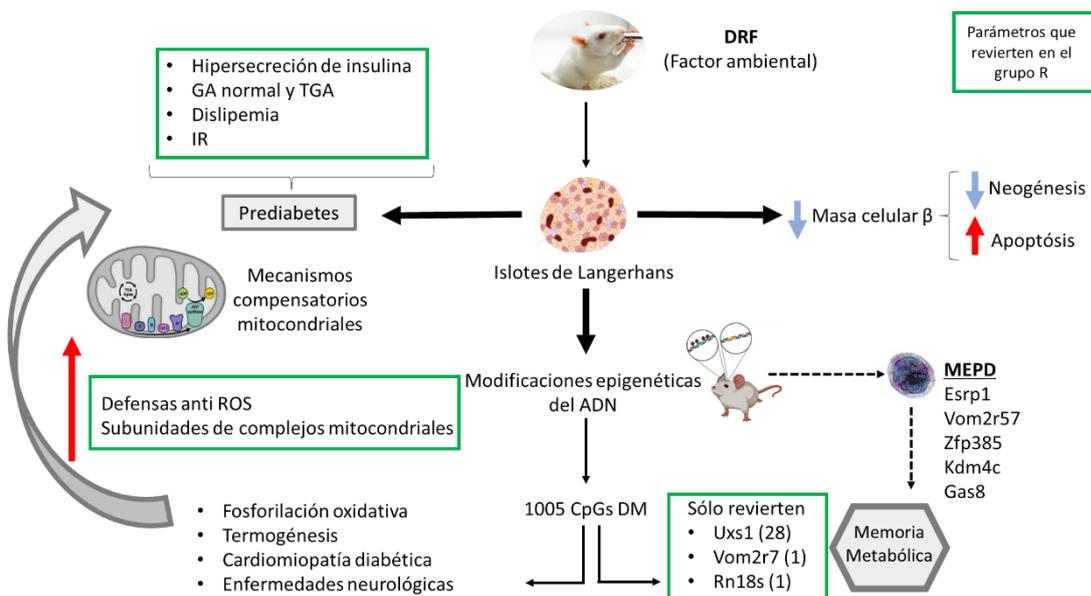


Figura X.1. Resumen de los principales resultados de la tesis. Las flechas rojas y azules hacen referencia al aumento o disminución de la expresión génica respectivamente. Los rectángulos verdes enmarcan modificaciones ocurridas en el grupo F que pudieron ser revertidas en el grupo R.

Anexos

Anexo 1

SECRETARIA DE CIENCIA Y TECNICA 60 y
120 P.B.
(0221) 423-6711 / 424-1596 / 424-3068 / 424-2711 / Int. 344
Fax: (0221) 425-8989
secyt@med.unlp.edu.ar

La Plata, may 13, 2019.-

It is hereby certified that the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, has reviewed the protocols and procedures for the care and use of laboratory animals submitted by **Lucía Ahrtz** of a research project entitled **Search of predictive markers of diabetes and prediabetes through the identification of differentially methylated genes in islets and leukocytes of rats subjected to a diet rich in sucrose**. This Committee has found that the above procedures are in agreement with local guidelines for vertebrate animal welfare as well as with USPHS and/or European Union policy on this matter.

(National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, and/or European Union Directive for Animal Experiments 2010/63/EU)

The above project is approved, effective on the above date.

Protocol Number: **T02-01-2019**

La Plata, 13 de mayo de 2019.-

Se deja constancia de que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata evaluó los protocolos de utilización de animales presentados por **Lucía Ahrtz**, titulado **Búsqueda de marcadores predictivos de diabetes y prediabetes a través de la identificación de genes diferencialmente metilados en islotes y leucocitos de ratas sometidas a una DRS**. Este comité considera que el mencionado protocolo se ajusta a las normas éticas de tratamiento humanitario locales e internacionales que deben aplicarse a los animales vertebrados que se utilizan en investigación biomédica y por tanto lo aprueba en el día de la fecha.

(Consejo Nacional de Investigaciones, National Academy Press, Washington DC, 2010, y/o Directiva de la Unión Europea para Experimentos en Animales, 2010/63/EU)

Número de Protocolo: **T02-01-2019**

Med. Vet. Juan Manuel Lofeudo
Croce Presidente - CICUAL
Técnica
(Comité Institucional para el cuidado y
UNLP uso de animales de laboratorio)

Prof. Dra. María Virginia
Secretaria de Ciencia y
Facultad de Ciencias Médicas -



Anexo 2

PCR específica de metilación

Para poder utilizar CpGs DM propuestas como diagnóstico de PD se debería diseñar una PCR específica de metilación. Esta técnica sería la de elección por ser simple, rápida, de bajo costo y porque permite el procesamiento de varias muestras en simultáneo (357). Para realizarla, en primer lugar, se deben diseñar dos pares de *primers* específicos para la secuencia de interés: uno que sea capaz de detectar la secuencia no metilada (*primers* U) y otro que solo detecte la metilada (par de *primers* M) y correr en paralelo dos PCRs con la misma muestra de ADN tratado previamente con bisulfito de sodio. Los productos de amplificación serán resueltos en una electroforesis en gel de agarosa y la presencia de una banda en la calle de la reacción efectuada con los cebadores M será suficiente para determinar presencia de metilaciones. Por el contrario, la presencia de bando en la calle de la reacción corrida con cebadores U, da información de la carencia de metilaciones. La presencia de banda en ambas reacciones da idea de una metilación parcial (en sólo uno de ambos alelos) (Figura X.2) (394).

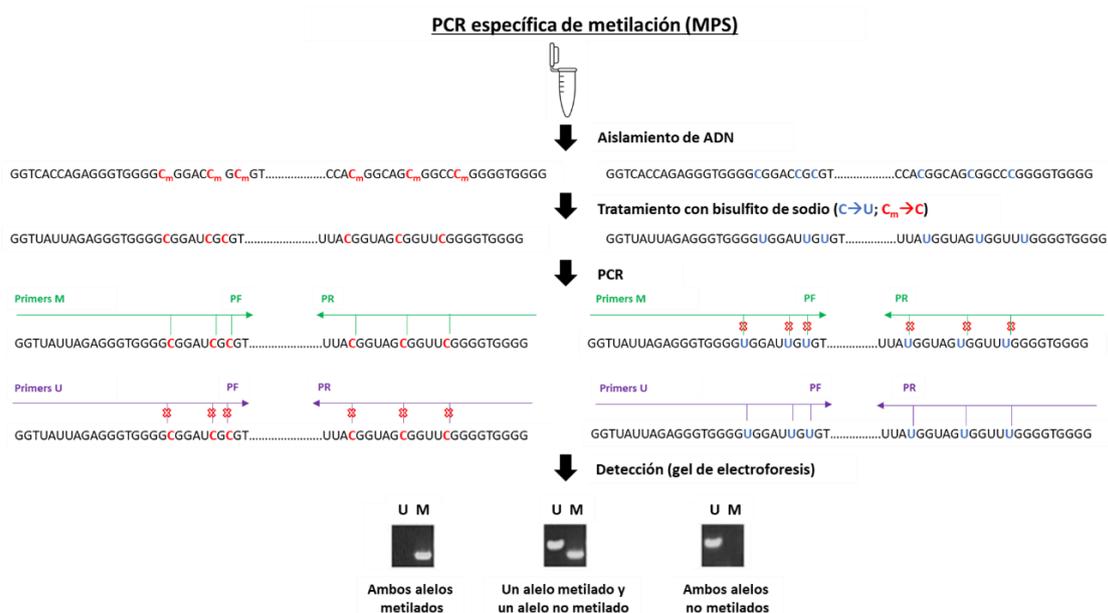


Figura X.2. PCR específica de metilación. Adaptado de (394).

Bibliografía

1. DeFronzo RA, Abdul-Ghani M. Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Am J Cardiol.* 2011 Aug 2;108(3 Suppl):3B-24B. doi: 10.1016/j.amjcard.2011.03.013. PMID: 21802577.
2. Chan JC, Gagliardino JJ, Baik SH, Chantelot JM, Ferreira SR, Hancu N, Ilkova H, Ramachandran A, Aschner P; IDMPs Investigators. Multifaceted determinants for achieving glycemic control: the International Diabetes Management Practice Study (IDMPS). *Diabetes Care.* 2009 Feb;32(2):227-33. doi: 10.2337/dc08-0435. Epub 2008 Nov 25. PMID: 19033410; PMCID: PMC2628684.
3. Williams R, Van Gaal L, Lucioni C; CODE-2 Advisory Board. Assessing the impact of complications on the costs of Type II diabetes. *Diabetologia.* 2002 Jul;45(7):S13-7. doi: 10.1007/s00125-002-0859-9. Epub 2002 Jun 12. PMID: 12136406.
4. Bolin K, Gip C, Mörk AC, Lindgren B. Diabetes, healthcare cost and loss of productivity in Sweden 1987 and 2005--a register-based approach. *Diabet Med.* 2009 Sep;26(9):928-34. doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02786.x. PMID: 19719715.
5. Gagliardino JJ, Elgart JF, Bourgeois M, Etchegoyen G, Fantuzzi G, Ré M, Ricart JP, García S, Giampieri C, González L, Suárez-Crivaró F, Kronsbein P, Angelini JM, Martínez C, Martínez J, Ricart A, Spinedi E. Diabetes primary prevention program: New insights from data analysis of recruitment period. *Diabetes Metab Res Rev.* 2018 Jan;34(1). doi: 10.1002/dmrr.2943. Epub 2017 Oct 19. PMID: 28843031.
6. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, Collins BS, Hilliard ME, Isaacs D, Johnson EL, Kahan S, Khunti K, Leon J, Lyons SK, Perry ML, Prahalad P, Pratley RE, Seley JJ, Stanton RC, Gabbay RA, on behalf of the American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care.* 2023 Jan 1;46(Suppl 1):S19-S40. doi: 10.2337/dc23-S002. Erratum in: *Diabetes Care.* 2023 May 1;46(5):1106. doi: 10.2337/dc23-er05. Erratum in: *Diabetes Care.* 2023 Sep 1;46(9):1715. doi: 10.2337/dc23-ad08. PMID: 36507649; PMCID: PMC9810477.
7. Gerstein HC, Santaguida P, Raina P, Morrison KM, Balion C, Hunt D, Yazdi H, Booker L. Annual incidence and relative risk of diabetes in people with various categories of dysglycemia: a systematic overview and meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007 Dec;78(3):305-12. doi: 10.1016/j.diabres.2007.05.004. Epub 2007 Jun 29. PMID: 17601626.
8. Elgart JF, Torrieri R, Ré M, Salazar M, Espeche W, Angelini JM, Martínez C, Martínez J, Giampieri C, Etchegoyen G, Ricart JP, Rodríguez ME, Gagliardino JJ. Prediabetes is more than a pre-disease: additional evidences supporting the importance of its early diagnosis and appropriate treatment. *Endocrine.* 2023 Jan;79(1):80-85. doi: 10.1007/s12020-022-03249-8. Epub 2022 Nov 9. PMID: 36352336.
9. Kirthi V, Reed KI, Alattar K, Zuckerman BP, Bunce C, Nderitu P, Alam U, Clarke B, Hau S, Al-Shibani F, Petropoulos IN, Malik RA, Pissas T, Bergeles C, Vas P, Hopkins D, Jackson TL. Multimodal testing reveals subclinical neurovascular dysfunction in prediabetes, challenging the diagnostic threshold of diabetes. *Diabet Med.* 2023 Mar;40(3):e14952. doi: 10.1111/dme.14952. Epub 2022 Sep 12. PMID: 36054221; PMCID: PMC10087038.
10. Rett K, Gottwald-Hostalek U. Understanding prediabetes: definition, prevalence, burden and treatment options for an emerging disease. *Curr Med Res Opin.* 2019 Sep;35(9):1529-1534. doi: 10.1080/03007995.2019.1601455. Epub 2019 Apr 15. PMID: 30935247.
11. Zhou Q, Melton DA. Pancreas regeneration. *Nature.* 2018 May;557(7705):351-358. doi: 10.1038/s41586-018-0088-0. Epub 2018 May 16. Erratum in: *Nature.* 2018 Aug;560(7720):E34. doi: 10.1038/s41586-018-0294-9. PMID: 29769672; PMCID: PMC6168194.
12. Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med.* 2016 Mar 11;48(3):e219. doi: 10.1038/emmm.2016.6. PMID: 26964835; PMCID: PMC4892884.
13. O'Dowd JF, Stocker CJ. Endocrine pancreatic development: impact of obesity and diet. *Front Physiol.* 2013 Jul 18;4:170. doi: 10.3389/fphys.2013.00170. PMID: 23882220; PMCID: PMC3714448.
14. Bonner-Weir S. Regulation of pancreatic beta-cell mass in vivo. *Recent Prog Horm Res.* 1994;49:91-104. doi: 10.1016/b978-0-12-571149-4.50008-8. PMID: 8146438.
15. Zhu Y, Liu Q, Zhou Z, Ikeda Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Nov 2;8(1):240. doi: 10.1186/s13287-017-0694-z. PMID: 29096722; PMCID: PMC5667467.

16. de Leiva A, Brugués E, de Leiva-Pérez A. El descubrimiento de la insulina: continúan las controversias después de noventa años [The discovery of insulin: continued controversies after ninety years]. *Endocrinol Nutr.* 2011 Nov;58(9):449-56. Spanish. doi: 10.1016/j.endonu.2011.10.001. Epub 2011 Oct 28. PMID: 22036099.
17. Da Silva Xavier G. The Cells of the Islets of Langerhans. *J Clin Med.* 2018 Mar 12;7(3):54. doi: 10.3390/jcm7030054. PMID: 29534517; PMCID: PMC5867580.
18. Dolenšek J, Rupnik MS, Stožer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets.* 2015;7(1):e1024405. doi: 10.1080/19382014.2015.1024405. PMID: 26030186; PMCID: PMC4589993.
19. Suckale J, Solimena M. The insulin secretory granule as a signaling hub. *Trends Endocrinol Metab.* 2010 Oct;21(10):599-609. doi: 10.1016/j.tem.2010.06.003. Epub 2010 Jul 6. PMID: 20609596.
20. Campbell JE, Newgard CB. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021 Feb;22(2):142-158. doi: 10.1038/s41580-020-00317-7. Epub 2021 Jan 4. PMID: 33398164; PMCID: PMC8115730.
21. Brereton MF, Vergari E, Zhang Q, Clark A. Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination? *J Histochem Cytochem.* 2015 Aug;63(8):575-91. doi: 10.1369/0022155415583535. PMID: 26216135; PMCID: PMC4530398.
22. Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept.* 2002 Jul 15;107(1-3):63-9. doi: 10.1016/s0167-0115(02)00067-8. PMID: 12137967.
23. Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):2924-9. doi: 10.1073/pnas.0308604100. Epub 2004 Feb 17. PMID: 14970313; PMCID: PMC365721.
24. Andralojc KM, Mercalli A, Nowak KW, Albarello L, Calcagno R, Luzi L, Bonifacio E, Doglioni C, Piemonti L. Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia.* 2009 Mar;52(3):486-93. doi: 10.1007/s00125-008-1238-y. Epub 2008 Dec 19. PMID: 19096824.
25. Aamodt KI, Powers AC. Signals in the pancreatic islet microenvironment influence β -cell proliferation. *Diabetes Obes Metab.* 2017 Sep;19 Suppl 1(Suppl 1):124-136. doi: 10.1111/dom.13031. PMID: 28880471; PMCID: PMC5679109.
26. Baron M, Veres A, Wolock SL, Faust AL, Gaujoux R, Vetere A, Ryu JH, Wagner BK, Shen-Orr SS, Klein AM, Melton DA, Yanai I. A Single-Cell Transcriptomic Map of the Human and Mouse Pancreas Reveals Inter- and Intra-cell Population Structure. *Cell Syst.* 2016 Oct 26;3(4):346-360.e4. doi: 10.1016/j.cels.2016.08.011. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27667365; PMCID: PMC5228327.
27. Weir GC, Bonner-Weir S. Islets of Langerhans: the puzzle of intraislet interactions and their relevance to diabetes. *J Clin Invest.* 1990 Apr;85(4):983-7. doi: 10.1172/JCI114574. PMID: 1969425; PMCID: PMC296525.
28. Levetan CS, Pierce SM. Distinctions between the islets of mice and men: implications for new therapies for type 1 and 2 diabetes. *Endocr Pract.* 2013 Mar-Apr;19(2):301-12. doi: 10.4158/EP12138.RA. PMID: 23186955.
29. Eynard AR, Valentich MA, Rovasio RA. Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares. *Médica Panamericana*; 2008. 292–293 ISBN 9789500606806.
30. Gagliardino JJ. Capítulo Fisiología del páncreas endocrino. En: *Fisiología Humana de Houssay*. Buenos Aires: El Ateneo; 2000. p. 571–92 ISBN: 978-950-02-0376-0.
31. Gilon P, Henquin JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev.* 2001 Oct;22(5):565-604. doi: 10.1210/edrv.22.5.0440. PMID: 11588141.
32. Rodríguez-Díaz R, Caicedo A. Neural control of the endocrine pancreas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014 Oct;28(5):745-56. doi: 10.1016/j.beem.2014.05.002. Epub 2014 May 20. PMID: 25256769.
33. Kirchgessner AL, Pintar JE. Guinea pig pancreatic ganglia: projections, transmitter content, and the type-specific localization of monoamine oxidase. *J Comp Neurol.* 1991 Mar 22;305(4):613-31. doi: 10.1002/cne.903050407. PMID: 1710627.

34. Orci L, Malaisse-Lagae F, Ravazzola M, Rouiller D, Renold AE, Perrelet A, Unger R. A morphological basis for intercellular communication between alpha- and beta-cells in the endocrine pancreas. *J Clin Invest.* 1975 Oct;56(4):1066-70. doi: 10.1172/JCI108154. PMID: 1099118; PMCID: PMC301963.
35. Shu JC, Donald F. S. Insulin Through the Ages: Phylogeny of a Growth Promoting and Metabolic Regulatory Hormone. *American Zoologist.* 2000 Apr;56(40):213-222. doi: 10.1093/icb/40.2.
36. Sanger F. Chemistry of insulin. *Br Med Bull.* 1960 Sep;16:183-8. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a069832. PMID: 13746240.
37. Hay CW, Docherty K. Comparative analysis of insulin gene promoters: implications for diabetes research. *Diabetes.* 2006 Dec;55(12):3201-13. doi: 10.2337/db06-0788. PMID: 17130462.
38. Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordell B, Tischler E, Goodman HM. Sequence of the human insulin gene. *Nature.* 1980 Mar 6;284(5751):26-32. doi: 10.1038/284026a0. PMID: 6243748.
39. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2013 Jan 1;9(1):25-53. PMID: 22974359; PMCID: PMC3934755.
40. Halban PA, Wollheim CB. Intracellular degradation of insulin stores by rat pancreatic islets in vitro. An alternative pathway for homeostasis of pancreatic insulin content. *J Biol Chem.* 1980 Jul 10;255(13):6003-6. PMID: 6993463.
41. Suckale J, Solimena M. Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Front Biosci.* 2008 May 1;13:7156-71. doi: 10.2741/3218. PMID: 18508724.
42. Hermans MP, Schmeer W, Henquin JC. The permissive effect of glucose, tolbutamide and high K⁺ on arginine stimulation of insulin release in isolated mouse islets. *Diabetologia.* 1987 Aug;30(8):659-65. doi: 10.1007/BF00277325. PMID: 3308605.
43. Dixon G, Nolan J, McClenaghan N, Flatt PR, Newsholme P. A comparative study of amino acid consumption by rat islet cells and the clonal beta-cell line BRIN-BD11 - the functional significance of L-alanine. *J Endocrinol.* 2003 Dec;179(3):447-54. doi: 10.1677/joe.0.1790447. PMID: 14656214.
44. Sener A, Malaisse WJ. L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature.* 1980 Nov 13;288(5787):187-9. doi: 10.1038/288187a0. PMID: 7001252.
45. Prentki M, Matschinsky FM. Ca²⁺, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev.* 1987 Oct;67(4):1185-248. doi: 10.1152/physrev.1987.67.4.1185. PMID: 2825225.
46. Gonzalo S, Linder ME. SNAP-25 palmitoylation and plasma membrane targeting require a functional secretory pathway. *Mol Biol Cell.* 1998 Mar;9(3):585-97. doi: 10.1091/mbc.9.3.585. PMID: 9487128; PMCID: PMC25287.
47. McTaggart JS, Clark RH, Ashcroft FM. The role of the KATP channel in glucose homeostasis in health and disease: more than meets the islet. *J Physiol.* 2010 Sep 1;588(Pt 17):3201-9. doi: 10.1113/jphysiol.2010.191767. Epub 2010 Jun 2. PMID: 20519313; PMCID: PMC2976015.
48. Félix-Martínez GJ, Godínez-Fernández JR. Mathematical models of electrical activity of the pancreatic β -cell: a physiological review. *Islets.* 2014;6(3):e949195. doi: 10.4161/19382014.2014.949195. PMID: 25322829; PMCID: PMC4292577.
49. Reimann F, Tucker SJ, Proks P, Ashcroft FM. Involvement of the n-terminus of Kir6.2 in coupling to the sulphonylurea receptor. *J Physiol.* 1999 Jul 15;51:325-36. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0325p.x. PMID: 10381582; PMCID: PMC2269423.
50. Doyle ME, Egan JM. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther.* 2007 Mar;113(3):546-93. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.11.007. Epub 2006 Dec 28. PMID: 17306374; PMCID: PMC1934514.
51. Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J.* 2006 Jan 1;393(Pt 1):7-20. doi: 10.1042/BJ20051578. PMID: 16336196; PMCID: PMC1383660.
52. Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ. Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Jul;283(1):E187-92. doi: 10.1152/ajpendo.00542.2001. PMID: 12067860.
53. Unger RH. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology.* 2003 Dec;144(12):5159-65. doi: 10.1210/en.2003-0870. Epub 2003 Sep 4. PMID: 12960011.

54. Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, Hamnvik OP, Koniaris A. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Oct;301(4):E567-84. doi: 10.1152/ajpendo.00315.2011. Epub 2011 Jul 26. PMID: 21791620; PMCID: PMC3191548.
55. Laubner K, Kieffer TJ, Lam NT, Niu X, Jakob F, Seufert J. Inhibition of preproinsulin gene expression by leptin induction of suppressor of cytokine signaling 3 in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 2005 Dec;54(12):3410-7. doi: 10.2337/diabetes.54.12.3410. PMID: 16306356.
56. Hedekov CJ. Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol Rev.* 1980 Apr;60(2):442-509. doi: 10.1152/physrev.1980.60.2.442. PMID: 6247727.
57. Daniel S, Noda M, Straub SG, Sharp GW. Identification of the docked granule pool responsible for the first phase of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes.* 1999 Sep;48(9):1686-90. doi: 10.2337/diabetes.48.9.1686. PMID: 10480595.
58. Getty L, Hamilton-Wessler M, Ader M, Dea MK, Bergman RN. Biphasic insulin secretion during intravenous glucose tolerance test promotes optimal interstitial insulin profile. *Diabetes.* 1998 Dec;47(12):1941-7. doi: 10.2337/diabetes.47.12.1941. PMID: 9836528.
59. Jones PM and Persaud SJ. Islet Function and Insulin Secretion (Chapter 6). En: *Textbook of Diabetes.* 4th edition. Holt RIG, Cockram CS Flyvbjerg A and Goldstein BJ eds; 2010. ISBN: 9781405191814
60. Lang DA, Matthews DR, Peto J, Turner RC. Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings. *N Engl J Med.* 1979 Nov 8;301(19):1023-7. doi: 10.1056/NEJM197911083011903. PMID: 386121.
61. Bratusch-Marrain PR, Komjati M, Waldhäusl WK. Efficacy of pulsatile versus continuous insulin administration on hepatic glucose production and glucose utilization in type I diabetic humans. *Diabetes.* 1986 Aug;35(8):922-6. doi: 10.2337/diab.35.8.922. PMID: 3525288.
62. Mosthaf L, Grako K, Dull TJ, Coussens L, Ullrich A, McClain DA. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J.* 1990 Aug;9(8):2409-13. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07416.x. PMID: 2369896; PMCID: PMC552265.
63. Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle.* 2011 Jun 1;10(11):1750-6. doi: 10.4161/cc.10.11.15824. Epub 2011 Jun 1. PMID: 21597332; PMCID: PMC3142458.
64. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature.* 1991 Jul 4;352(6330):73-7. doi: 10.1038/352073a0. PMID: 1648180.
65. Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG Jr, Miralpeix M, White MF. Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7418-28. doi: 10.1128/mcb.13.12.7418-7428.1993. PMID: 7504175; PMCID: PMC364813.
66. Voliovitch H, Schindler DG, Hadari YR, Taylor SI, Accili D, Zick Y. Tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in vivo depends upon the presence of its pleckstrin homology region. *J Biol Chem.* 1995 Jul 28;270(30):18083-7. doi: 10.1074/jbc.270.30.18083. PMID: 7629118.
67. E Maratos-Flier BG y CK. The insulin receptor and postreceptor mechanisms (Chapter 10). En: *Textbook of diabetes.* 2nd ed. Pickup J and Williams G (Eds.); 1997. ISBN: 0-632-03802-0
68. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature.* 1998 Feb 26;391(6670):900-4. doi: 10.1038/36116. PMID: 9495343.
69. Bouzakri K, Zachrisson A, Al-Khalili L, Zhang BB, Koistinen HA, Krook A, Zierath JR. siRNA-based gene silencing reveals specialized roles of IRS-1/Akt2 and IRS-2/Akt1 in glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Cell Metab.* 2006 Jul;4(1):89-96. doi: 10.1016/j.cmet.2006.04.008. PMID: 16814735.
70. Vadas O, Burke JE, Zhang X, Berndt A, Williams RL. Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Sci Signal.* 2011 Oct 18;4(195):re2. doi: 10.1126/scisignal.2002165. PMID: 22009150.
71. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med.* 2013 Apr-Jun;34(2-3):121-38. doi: 10.1016/j.mam.2012.07.001. PMID: 23506862; PMCID: PMC4104978.
72. Kruszynska YT. Normal metabolism: the physiology of fuel homeostasis (Chapter 11). En: *Textbook of diabetes.* 2nd ed. Pickup J and Williams G (Eds.); 1997. ISBN: 0-632-03802-0

Bibliografía

73. David L. Nelson. Lehninger. Principios de Bioquímica (Capítulo 23). 7th ed. Omega.; 2019. ISBN:9788428216678.
74. Lustig RH. Fructose: metabolic, hedonic, and societal parallels with ethanol. *J Am Diet Assoc.* 2010 Sep;110(9):1307-21. doi: 10.1016/j.jada.2010.06.008. PMID: 20800122.
75. DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes.* 2009 Apr;58(4):773-95. doi: 10.2337/db09-9028. PMID: 19336687; PMCID: PMC2661582.
76. Schwartz SS, Epstein S, Corkey BE, Grant SFA, Gavin Iii JR, Aguilar RB, Herman ME. A Unified Pathophysiological Construct of Diabetes and its Complications. *Trends Endocrinol Metab.* 2017 Sep;28(9):645-655. doi: 10.1016/j.tem.2017.05.005. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28629897.
77. Gagliardino JJ, Del Zotto H, Flores LE, Francini F, Maiztegui B, Massa ML y Spinedi E. Disfunciones endocrinas y metabólicas de la Diabetes Tipo 2. En: *Fisiopatología Molecular y Clínica Endocrinológica.* Calandra RS y Barontini MB (Eds.) Eli Lilly Interamericana Sucursal Argentina; 2015. p. 1131-55. ISBN: 978-987-45792-1-8.
78. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337. PMID: 17562483; PMCID: PMC2117903.
79. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):813-20. doi: 10.1038/414813a. PMID: 11742414.
80. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010 Oct 29;107(9):1058-70. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545. PMID: 21030723; PMCID: PMC2996922.
81. Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry.* 1995 Mar 21;34(11):3702-9. doi: 10.1021/bi00011a027. PMID: 7893666.
82. Thornalley PJ. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J.* 1990 Jul 1;269(1):1-11. doi: 10.1042/bj2690001. PMID: 2198020; PMCID: PMC1131522.
83. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest.* 1994 Jul;94(1):110-7. doi: 10.1172/JCI117296. PMID: 8040253; PMCID: PMC296288.
84. Huijberts MS, Wolfenbuttel BH, Boudier HA, Crijns FR, Kruseman AC, Poitevin P, Lévy BI. Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J Clin Invest.* 1993 Sep;92(3):1407-11. doi: 10.1172/JCI116716. PMID: 8376593; PMCID: PMC288284.
85. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes.* 1998 Jun;47(6):859-66. doi: 10.2337/diabetes.47.6.859. PMID: 9604860.
86. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, King GL. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes.* 1994 Sep;43(9):1122-9. doi: 10.2337/diab.43.9.1122. PMID: 8070612.
87. Craven PA, Studer RK, DeRubertis FR. Impaired nitric oxide-dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats. Evidence for protein kinase C-mediated suppression of the cholinergic response. *J Clin Invest.* 1994 Jan;93(1):311-20. doi: 10.1172/JCI116961. PMID: 7506712; PMCID: PMC293768.
88. Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science.* 1996 May 3;272(5262):728-31. doi: 10.1126/science.272.5262.728. PMID: 8614835.
89. Hart GW. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:315-35. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.315. PMID: 9242909.
90. Goldberg HJ, Scholey J, Fantus IG. Glucosamine activates the plasminogen activator inhibitor 1 gene promoter through Sp1 DNA binding sites in glomerular mesangial cells. *Diabetes.* 2000 May;49(5):863-71. doi: 10.2337/diabetes.49.5.863. PMID: 10905498.

91. Wilson DK, Bohren KM, Gabbay KH, Quiocho FA. An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science*. 1992 Jul 3;257(5066):81-4. doi: 10.1126/science.1621098. PMID: 1621098.
92. Chung SS, Chung SK. Aldose reductase in diabetic microvascular complications. *Curr Drug Targets*. 2005 Jun;6(4):475-86. doi: 10.2174/1389450054021891. PMID: 16026266.
93. Pesaro AE, Bittencourt MS, Franken M, Carvalho JAM, Bernardes D, Tuomilehto J, Santos RD. The Finnish Diabetes Risk Score (FINDRISC), incident diabetes and low-grade inflammation. *Diabetes Res Clin Pract*. 2021 Jan;171:108558. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108558. Epub 2020 Nov 23. PMID: 33242513.
94. World Health Organization. Diabetes. Key Facts. 2023 <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/diabetes>
95. International Diabetes Federation. Datos y cifras. 2024. <https://idf.org/es/about-diabetes/diabetes-facts-figures/>
96. Instituto Nacional de Estadística y Censos - I.N.D.E.C. 4º Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. Resultados definitivos. - 1a ed. Secretaría de Gobierno de Salud de la Nación, 2019. ISBN 978-950-896-554-7
97. Organización Panamericana de la Salud y WHO. Número total de muertes por Diabetes 2019. Argentina; 2023. <https://www.paho.org/es/documentos/perfil-carga-enfermedad-por-diabetes-2023-argentina>
98. Huang Y, Cai X, Mai W, Li M, Hu Y. Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2016 Nov 23;355:i5953. doi: 10.1136/bmj.i5953. PMID: 27881363; PMCID: PMC5121106.
99. WHO TEAM: Management-Screening, Diagnosis and Treatment (MND). In: Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. 2006. WHO and International Diabetes Federation (Eds.) ISBN: 9241594934.
100. Centers for Disease Control and Prevention. National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States, 2011. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2011. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/13329>.
101. Forouhi NG, Luan J, Hennings S, Wareham NJ. Incidence of Type 2 diabetes in England and its association with baseline impaired fasting glucose: the Ely study 1990-2000. *Diabet Med*. 2007 Feb;24(2):200-7. doi: 10.1111/j.1464-5491.2007.02068.x. PMID: 17257284.
102. Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA, Heine RJ, Henry RR, Pratley R, Zinman B; American Diabetes Association. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes Care*. 2007 Mar;30(3):753-9. doi: 10.2337/dc07-9920. PMID: 17327355.
103. Ferrannini E, Gastaldelli A, Miyazaki Y, Matsuda M, Mari A, DeFronzo RA. beta-Cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jan;90(1):493-500. doi: 10.1210/jc.2004-1133. Epub 2004 Oct 13. PMID: 15483086.
104. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care*. 2006 May;29(5):1130-9. doi: 10.2337/diacare.2951130. PMID: 16644654.
105. Reaven, G.M. The insulin resistance syndrome. *Current Atherosclerosis Reports*. 2003 Sept; 5, 364–371. doi: 10.1007/s11883-003-0007-0.
106. Tabák AG, Jokela M, Akbaraly TN, Brunner EJ, Kivimäki M, Witte DR. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *Lancet*. 2009 Jun 27;373(9682):2215-21. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60619-X. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19515410; PMCID: PMC2726723.
107. Chakarova N, Tankova T, Atanassova I, Dakovska L. Serum lipid and hsCRP levels in prediabetes--impaired fasting glucose (IFG) and impaired glucose tolerance (IGT). *Diabetes Res Clin Pract*. 2009 Oct;86(1):56-60. doi: 10.1016/j.diabres.2009.04.005. Epub 2009 Aug 11. PMID: 19674805.
108. Laws A, Reaven GM. Evidence for an independent relationship between insulin resistance and fasting plasma HDL-cholesterol, triglyceride and insulin concentrations. *J Intern Med*. 1992 Jan;231(1):25-30. doi: 10.1111/j.1365-2796.1992.tb00494.x. PMID: 1732395.

109. Salazar MR, Carbajal HA, Espeche WG, Leiva Sisniegues CE, Balbín E, Dulbecco CA, Aizpurúa M, Marillet AG, Reaven GM. Relation among the plasma triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol concentration ratio, insulin resistance, and associated cardio-metabolic risk factors in men and women. *Am J Cardiol.* 2012 Jun 15;109(12):1749-53. doi: 10.1016/j.amjcard.2012.02.016. Epub 2012 Mar 24. PMID: 22449634.
110. DECODE Study Group, the European Diabetes Epidemiology Group.. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch Intern Med.* 2001 Feb 12;161(3):397-405. doi: 10.1001/archinte.161.3.397. PMID: 11176766.
111. Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, Lauria G, Malik RA, Spallone V, Vinik A, Bernardi L, Valensi P; Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care.* 2010 Oct;33(10):2285-93. doi: 10.2337/dc10-1303. Erratum in: *Diabetes Care.* 2010 Dec;33(12):2725. PMID: 20876709; PMCID: PMC2945176.
112. Wu JS, Yang YC, Lin TS, Huang YH, Chen JJ, Lu FH, Wu CH, Chang CJ. Epidemiological evidence of altered cardiac autonomic function in subjects with impaired glucose tolerance but not isolated impaired fasting glucose. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Oct;92(10):3885-9. doi: 10.1210/jc.2006-2175. Epub 2007 Jul 31. PMID: 17666483.
113. Diabetes Prevention Program Research Group. The prevalence of retinopathy in impaired glucose tolerance and recent-onset diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Diabet Med.* 2007 Feb;24(2):137-44. doi: 10.1111/j.1464-5491.2007.02043.x. PMID: 17257275; PMCID: PMC2267935.
114. Fox CS, Larson MG, Leip EP, Meigs JB, Wilson PW, Levy D. Glycemic status and development of kidney disease: the Framingham Heart Study. *Diabetes Care.* 2005 Oct;28(10):2436-40. doi: 10.2337/diacare.28.10.2436. PMID: 16186276.
115. Elgart JF, Asteazarán S, De La Fuente JL, Camillucci C, Brown JB, Gagliardino JJ. Direct and indirect costs associated to type 2 diabetes and its complications measured in a social security institution of Argentina. *Int J Public Health.* 2014 Oct;59(5):851-7. doi: 10.1007/s00038-014-0604-4. Epub 2014 Sep 5. PMID: 25189732.
116. Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J.* 1990 Jun;4(9):2652-60. doi: 10.1096/fasebj.4.9.2189777. PMID: 2189777.
117. Hanover LM, White JS. Manufacturing, composition, and applications of fructose. *Am J Clin Nutr.* 1993 Nov;58(5 Suppl):724S-732S. doi: 10.1093/ajcn/58.5.724S. PMID: 8213603.
118. Vos MB, Kimmons JE, Gillespie C, Welsh J, Blanck HM. Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Medscape J Med.* 2008 Jul 9;10(7):160. PMID: 18769702; PMCID: PMC2525476.
119. Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem.* 2009 Dec;332(1-2):145-59. doi: 10.1007/s11010-009-0184-4. Epub 2009 Jun 18. PMID: 19536638.
120. Giroix MH, Jijakli H, Courtois P, Zhang Y, Sener A, Malaisse WJ. Fructokinase activity in rat liver, ileum, parotid gland, pancreas, pancreatic islet, B and non-B islet cell homogenates. *Int J Mol Med.* 2006 Mar;17(3):517-22. PMID: 16465401.
121. Diggle CP, Shires M, Leitch D, Brooke D, Carr IM, Markham AF, Hayward BE, Asipu A, Bonthron DT. Ketohexokinase: expression and localization of the principal fructose-metabolizing enzyme. *J Histochem Cytochem.* 2009 Aug;57(8):763-74. doi: 10.1369/jhc.2009.953190. Epub 2009 Apr 13. PMID: 19365088; PMCID: PMC2713076.
122. Bizeau ME, Pagliassotti MJ. Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metabolism.* 2005 Sep;54(9):1189-201. doi: 10.1016/j.metabol.2005.04.004. PMID: 16125531.
123. Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Shafiu M, Sundaram S, Le M, Ishimoto T, Sautin YY, Lanaspá MA. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes.* 2013 Oct;62(10):3307-15. doi: 10.2337/db12-1814. PMID: 24065788; PMCID: PMC3781481.
124. Lê KA, Tappy L. Metabolic effects of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006 Jul;9(4):469-75. doi: 10.1097/01.mco.0000232910.61612.4d. PMID: 16778579.

125. Davies DR, Detheux M, Van Schaftingen E. Fructose 1-phosphate and the regulation of glucokinase activity in isolated hepatocytes. *Eur J Biochem.* 1990 Sep 11;192(2):283-9. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb19225.x. PMID: 2145154.
126. Sleder J, Chen YD, Cully MD, Reaven GM. Hyperinsulinemia in fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism.* 1980 Apr;29(4):303-5. doi: 10.1016/0026-0495(80)90001-3. PMID: 6990170.
127. Malik VS, Schulze MB, Hu FB. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2006 Aug;84(2):274-88. doi: 10.1093/ajcn/84.1.274. PMID: 16895873; PMCID: PMC3210834.
128. Gross LS, Li L, Ford ES, Liu S. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. *Am J Clin Nutr.* 2004 May;79(5):774-9. doi: 10.1093/ajcn/79.5.774. PMID: 15113714.
129. Perez-Pozo SE, Schold J, Nakagawa T, Sánchez-Lozada LG, Johnson RJ, Lillo JL. Excessive fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response. *Int J Obes (Lond).* 2010 Mar;34(3):454-61. doi: 10.1038/ijo.2009.259. Epub 2009 Dec 22. PMID: 20029377.
130. Zavaroni I, Sander S, Scott S, Reaven GM. Effect of fructose feeding on insulin secretion and insulin action in the rat. *Metabolism.* 1980 Oct;29(10):970-3. doi: 10.1016/0026-0495(80)90041-4. PMID: 6999292.
131. Konopelnyuk V, Yurchenko A, Karpovets T, Ostapchenko L. The development of obesity and prediabetes under conditions of long-term consumption of fructose solution in rats. *J App Pharm Sci,* 2015; 5 (01): 001-005. doi: 10.7324/JAPS.2015.50101.
132. Galipeau D, Verma S, McNeill JH. Female rats are protected against fructose-induced changes in metabolism and blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Dec;283(6):H2478-84. doi: 10.1152/ajpheart.00243.2002. PMID: 12427595.
133. Galipeau D, Arikawa E, Sekirov I, McNeill JH. Chronic thromboxane synthase inhibition prevents fructose-induced hypertension. *Hypertension.* 2001 Oct;38(4):872-6. PMID: 11641301.
134. Gutman RA, Basílico MZ, Bernal CA, Chicco A, Lombardo YB. Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose-rich diet. *Metabolism.* 1987 Nov;36(11):1013-20. doi: 10.1016/0026-0495(87)90019-9. PMID: 3670072.
135. Ferreira Mdel R, Lombardo YB, Chicco A. β -Cell adaptation/dysfunction in an animal model of dyslipidemia and insulin resistance induced by the chronic administration of a sucrose-rich diet. *Islets.* 2010 Nov-Dec;2(6):367-73. doi: 10.4161/isl.2.6.13869. Epub 2010 Nov 1. PMID: 21099338.
136. Desiderio A, Spinelli R, Ciccarelli M, Nigro C, Miele C, Beguinot F, Raciti GA. Epigenetics: spotlight on type 2 diabetes and obesity. *J Endocrinol Invest.* 2016 Oct;39(10):1095-103. doi: 10.1007/s40618-016-0473-1. Epub 2016 May 14. PMID: 27180180.
137. Fuggle NR, Laskou F, Harvey NC, Dennison EM. A review of epigenetics and its association with ageing of muscle and bone. *Maturitas.* 2022 Nov;165:12-17. doi: 10.1016/j.maturitas.2022.06.014. Epub 2022 Jul 11. PMID: 35841774.
138. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):693-705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005. PMID: 17320507.
139. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012 May 29;13(7):484-92. doi: 10.1038/nrg3230. PMID: 22641018.
140. Reddy MA, Zhang E, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia.* 2015 Mar;58(3):443-55. doi: 10.1007/s00125-014-3462-y. Epub 2014 Dec 7. PMID: 25481708; PMCID: PMC4324095.
141. Ling C, Groop L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2009 Dec;58(12):2718-25. doi: 10.2337/db09-1003. PMID: 19940235; PMCID: PMC2780862.
142. Zhou VW, Goren A, Bernstein BE. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat Rev Genet.* 2011 Jan;12(1):7-18. doi: 10.1038/nrg2905. Epub 2010 Nov 30. PMID: 21116306.

143. Kato M, Natarajan R. Diabetic nephropathy--emerging epigenetic mechanisms. *Nat Rev Nephrol*. 2014 Sep;10(9):517-30. doi: 10.1038/nrneph.2014.116. Epub 2014 Jul 8. PMID: 25003613; PMCID: PMC6089507.
144. Zhong Q, Kowluru RA. Epigenetic changes in mitochondrial superoxide dismutase in the retina and the development of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2011 Apr;60(4):1304-13. doi: 10.2337/db10-0133. Epub 2011 Feb 25. PMID: 21357467; PMCID: PMC3064104.
145. Zhong Q, Kowluru RA. Regulation of matrix metalloproteinase-9 by epigenetic modifications and the development of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2013 Jul;62(7):2559-68. doi: 10.2337/db12-1141. Epub 2013 Feb 19. PMID: 23423566; PMCID: PMC3712057.
146. Miao F, Gonzalo IG, Lanting L, Natarajan R. In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions. *J Biol Chem*. 2004 Apr 23;279(17):18091-7. doi: 10.1074/jbc.M311786200. Epub 2004 Feb 19. PMID: 14976218.
147. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, Cabili MN, Jaenisch R, Mikkelsen TS, Jacks T, Hacohen N, Bernstein BE, Kellis M, Regev A, Rinn JL, Lander ES. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*. 2009 Mar 12;458(7235):223-7. doi: 10.1038/nature07672. Epub 2009 Feb 1. PMID: 19182780; PMCID: PMC2754849.
148. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5. PMID: 14744438.
149. Kato M, Castro NE, Natarajan R. MicroRNAs: potential mediators and biomarkers of diabetic complications. *Free Radic Biol Med*. 2013 Sep;64:85-94. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.009. Epub 2013 Jun 12. PMID: 23770198; PMCID: PMC3762900.
150. Alvarez ML, Distefano JK. The role of non-coding RNAs in diabetic nephropathy: potential applications as biomarkers for disease development and progression. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013 Jan;99(1):1-11. doi: 10.1016/j.diabres.2012.10.010. Epub 2012 Oct 25. PMID: 23102915.
151. Kato M, Putta S, Wang M, Yuan H, Lanting L, Nair I, Gunn A, Nakagawa Y, Shimano H, Todorov I, Rossi JJ, Natarajan R. TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nat Cell Biol*. 2009 Jul;11(7):881-9. doi: 10.1038/ncb1897. Epub 2009 Jun 21. PMID: 19543271; PMCID: PMC2744130.
152. Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:145-66. doi: 10.1146/annurev-biochem-051410-092902. PMID: 22663078; PMCID: PMC3858397.
153. De Rosa S, Arcidiacono B, Chiefari E, Brunetti A, Indolfi C, Foti DP. Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Genetic and Epigenetic Links. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Jan 17;9:2. doi: 10.3389/fendo.2018.00002. PMID: 29387042; PMCID: PMC5776102.
154. Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet*. 1975;14(1):9-25. doi: 10.1159/000130315. PMID: 1093816.
155. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975 Jan 24;187(4173):226-32. PMID: 1111098.
156. Sadler KC. Epigenetics across the evolutionary tree: New paradigms from non-model animals. *Bioessays*. 2023 Jan;45(1):e2200036. doi: 10.1002/bies.202200036. Epub 2022 Nov 20. PMID: 36403219.
157. Suzuki MM, Kerr AR, De Sousa D, Bird A. CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome. *Genome Res*. 2007 May;17(5):625-31. doi: 10.1101/gr.6163007. Epub 2007 Apr 9. PMID: 17420183; PMCID: PMC1855171.
158. Wion D, Casadesús J. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Mar;4(3):183-92. doi: 10.1038/nrmicro1350. PMID: 16489347; PMCID: PMC2755769.
159. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*. 2015 Jan 15;517(7534):321-6. doi: 10.1038/nature14192. PMID: 25592537.
160. Smallwood SA, Tomizawa S, Krueger F, Ruf N, Carli N, Segonds-Pichon A, Sato S, Hata K, Andrews SR, Kelsey G. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat Genet*. 2011 Jun 26;43(8):811-4. doi: 10.1038/ng.864. PMID: 21706000; PMCID: PMC3146050.

161. Cortázar D, Kunz C, Selfridge J, Lettieri T, Saito Y, MacDougall E, Wirz A, Schuermann D, Jacobs AL, Siegrist F, Steinacher R, Jiricny J, Bird A, Schär P. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature*. 2011 Feb 17;470(7334):419-23. doi: 10.1038/nature09672. Epub 2011 Jan 30. PMID: 21278727.
162. Zheng J, Cheng J, Zhang Q, Xiao X. Novel insights into DNA methylation and its critical implications in diabetic vascular complications. *Biosci Rep*. 2017 Mar 15;37(2):BSR20160611. doi: 10.1042/BSR20160611. PMID: 28183874; PMCID: PMC5350598.
163. Hodges E, Molaro A, Dos Santos CO, Thekkat P, Song Q, Uren PJ, Park J, Butler J, Rafii S, McCombie WR, Smith AD, Hannon GJ. Directional DNA methylation changes and complex intermediate states accompany lineage specificity in the adult hematopoietic compartment. *Mol Cell*. 2011 Oct 7;44(1):17-28. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.026. Epub 2011 Sep 15. PMID: 21924933; PMCID: PMC3412369.
164. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013 Mar;14(3):204-20. doi: 10.1038/nrg3354. Epub 2013 Feb 12. PMID: 23400093.
165. Zhang L, Lu X, Lu J, Liang H, Dai Q, Xu GL, Luo C, Jiang H, He C. Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA. *Nat Chem Biol*. 2012 Feb 12;8(4):328-30. doi: 10.1038/nchembio.914. PMID: 22327402; PMCID: PMC3307914.
166. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 2011 Sep 2;333(6047):1300-3. doi: 10.1126/science.1210597. Epub 2011 Jul 21. PMID: 21778364; PMCID: PMC3495246.
167. Bogdanović O, Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*. 2009 Oct;118(5):549-65. doi: 10.1007/s00412-009-0221-9. Epub 2009 Jun 9. PMID: 19506892; PMCID: PMC2729420.
168. Long HK, Blackledge NP, Klose RJ. ZF-CxxC domain-containing proteins, CpG islands and the chromatin connection. *Biochem Soc Trans*. 2013 Jun;41(3):727-40. doi: 10.1042/BST20130028. PMID: 23697932; PMCID: PMC3685328.
169. Kelly TK, Miranda TB, Liang G, Berman BP, Lin JC, Tanay A, Jones PA. H2A.Z maintenance during mitosis reveals nucleosome shifting on mitotically silenced genes. *Mol Cell*. 2010 Sep 24;39(6):901-11. doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.026. PMID: 20864037; PMCID: PMC2947862.
170. Hellman A, Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science*. 2007 Feb 23;315(5815):1141-3. doi: 10.1126/science.1136352. PMID: 17322062.
171. Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet*. 1999 Jan;15(1):34-7. doi: 10.1016/s0168-9525(98)01636-9. PMID: 10087932.
172. Schwartz S, Meshorer E, Ast G. Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 Sep;16(9):990-5. doi: 10.1038/nsmb.1659. PMID: 19684600.
173. Stadler MB, Murr R, Burger L, Ivanek R, Lienert F, Schöler A, van Nimwegen E, Wirbelauer C, Oakeley EJ, Gaidatzis D, Tiwari VK, Schübeler D. DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature*. 2011 Dec 14;480(7378):490-5. doi: 10.1038/nature10716. Erratum in: *Nature*. 2012 Apr 26;484(7395):550. van Nimwegen, Erik [added]. PMID: 22170606.
174. Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, Gregory BD, Berry CC, Millar AH, Ecker JR. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*. 2008 May 2;133(3):523-36. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.029. PMID: 18423832; PMCID: PMC2723732.
175. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Feb 9;1410(2):103-23. doi: 10.1016/s0005-2728(98)00161-3. PMID: 10076021.
176. Calvo SE, Mootha VK. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010;11:25-44. doi: 10.1146/annurev-genom-082509-141720. PMID: 20690818; PMCID: PMC4397899.
177. Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull*. 2013;106(1):135-59. doi: 10.1093/bmb/ldt017. Epub 2013 May 22. PMID: 23704099; PMCID: PMC3675899.
178. Rackham O, Filipovska A. Organization and expression of the mammalian mitochondrial genome. *Nat Rev Genet*. 2022 Oct;23(10):606-623. doi: 10.1038/s41576-022-00480-x. Epub 2022 Apr 22. PMID: 35459860.

179. Kaufman BA, Durisic N, Mativetsky JM, Costantino S, Hancock MA, Grutter P, Shoubridge EA. The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol Biol Cell*. 2007 Sep;18(9):3225-36. doi: 10.1091/mbc.e07-05-0404. Epub 2007 Jun 20. PMID: 17581862; PMCID: PMC1951767.
180. Kukat C, Wurm CA, Spähr H, Falkenberg M, Larsson NG, Jakobs S. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 16;108(33):13534-9. doi: 10.1073/pnas.1109263108. Epub 2011 Aug 1. PMID: 21808029; PMCID: PMC3158146.
181. Pollack Y, Kasir J, Shemer R, Metzger S, Szyf M. Methylation pattern of mouse mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*. 1984 Jun 25;12(12):4811-24. doi: 10.1093/nar/12.12.4811. PMID: 6330684; PMCID: PMC318881.
182. Shmookler Reis RJ, Goldstein S. Variability of DNA methylation patterns during serial passage of human diploid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Jul;79(13):3949-53. doi: 10.1073/pnas.79.13.3949. PMID: 6287455; PMCID: PMC346553.
183. Bellizzi D, D'Aquila P, Scafone T, Giordano M, Riso V, Riccio A, Passarino G. The control region of mitochondrial DNA shows an unusual CpG and non-CpG methylation pattern. *DNA Res*. 2013 Dec;20(6):537-47. doi: 10.1093/dnares/dst029. Epub 2013 Jun 26. PMID: 23804556; PMCID: PMC3859322.
184. Saini SK, Mangalharra KC, Prakasam G, Bamezai RNK. DNA Methyltransferase1 (DNMT1) Isoform3 methylates mitochondrial genome and modulates its biology. *Sci Rep*. 2017 May 8;7(1):1525. doi: 10.1038/s41598-017-01743-y. PMID: 28484249; PMCID: PMC5431478.
185. Dou X, Boyd-Kirkup JD, McDermott J, Zhang X, Li F, Rong B, Zhang R, Miao B, Chen P, Cheng H, Xue J, Bennett D, Wong J, Lan F, Han JJ. The strand-biased mitochondrial DNA methylome and its regulation by DNMT3A. *Genome Res*. 2019 Oct;29(10):1622-1634. doi: 10.1101/gr.234021.117. Epub 2019 Sep 19. PMID: 31537639; PMCID: PMC6771398.
186. Wong M, Gertz B, Chestnut BA, Martin LJ. Mitochondrial DNMT3A and DNA methylation in skeletal muscle and CNS of transgenic mouse models of ALS. *Front Cell Neurosci*. 2013 Dec 25;7:279. doi: 10.3389/fncel.2013.00279. PMID: 24399935; PMCID: PMC3872319.
187. Dzitoyeva S, Chen H, Manev H. Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in brain mitochondria. *Neurobiol Aging*. 2012 Dec;33(12):2881-91. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.02.006. Epub 2012 Mar 22. PMID: 22445327; PMCID: PMC3462297.
188. Chen H, Dzitoyeva S, Manev H. Effect of valproic acid on mitochondrial epigenetics. *Eur J Pharmacol*. 2012 Sep 5;690(1-3):51-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.06.019. Epub 2012 Jun 20. PMID: 22728245; PMCID: PMC3419440.
189. Gao J, Wen S, Zhou H, Feng S. De-methylation of displacement loop of mitochondrial DNA is associated with increased mitochondrial copy number and nicotinamide adenine dinucleotide subunit 2 expression in colorectal cancer. *Mol Med Rep*. 2015 Nov;12(5):7033-8. doi: 10.3892/mmr.2015.4256. Epub 2015 Aug 26. PMID: 26323487.
190. Sanyal T, Bhattacharjee P, Bhattacharjee S, Bhattacharjee P. Hypomethylation of mitochondrial D-loop and ND6 with increased mitochondrial DNA copy number in the arsenic-exposed population. *Toxicology*. 2018 Sep 1;408:54-61. doi: 10.1016/j.tox.2018.06.012. Epub 2018 Jun 22. PMID: 29940200.
191. Sharma N, Pasala MS, Prakash A. Mitochondrial DNA: Epigenetics and environment. *Environ Mol Mutagen*. 2019 Oct;60(8):668-682. doi: 10.1002/em.22319. Epub 2019 Aug 6. PMID: 31335990; PMCID: PMC6941438.
192. Stoccoro A, Coppedè F. Mitochondrial DNA Methylation and Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 27;22(9):4594. doi: 10.3390/ijms22094594. PMID: 33925624; PMCID: PMC8123858.
193. Kowal K, Tkaczyk A, Ząbek T, Pierzchała M, Ślaska B. Comparative Analysis of CpG Sites and Islands Distributed in Mitochondrial DNA of Model Organisms. *Animals (Basel)*. 2020 Apr 11;10(4):665. doi: 10.3390/ani10040665. PMID: 32290485; PMCID: PMC7222804.
194. Ling C, Rönn T. Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metab*. 2019 May 7;29(5):1028-1044. doi: 10.1016/j.cmet.2019.03.009. Epub 2019 Apr 11. PMID: 30982733; PMCID: PMC6509280.

195. Barrès R, Osler ME, Yan J, Rune A, Fritz T, Caidahl K, Krook A, Zierath JR. Non-CpG methylation of the PGC-1 α promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab.* 2009 Sep;10(3):189-98. doi: 10.1016/j.cmet.2009.07.011. PMID: 19723495.
196. Yang BT, Dayeh TA, Kirkpatrick CL, Taneera J, Kumar R, Groop L, Wollheim CB, Nitert MD, Ling C. Insulin promoter DNA methylation correlates negatively with insulin gene expression and positively with HbA(1c) levels in human pancreatic islets. *Diabetologia.* 2011 Feb;54(2):360-7. doi: 10.1007/s00125-010-1967-6. Epub 2010 Nov 23. PMID: 21104225; PMCID: PMC3017313.
197. Hall E, Dayeh T, Kirkpatrick CL, Wollheim CB, Dekker Nitert M, Ling C. DNA methylation of the glucagon-like peptide 1 receptor (GLP1R) in human pancreatic islets. *BMC Med Genet.* 2013 Jul 23;14:76. doi: 10.1186/1471-2350-14-76. PMID: 23879380; PMCID: PMC3727960.
198. Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, Kirkpatrick CL, Malmgren S, Jing X, Renström E, Wollheim CB, Nitert MD, Ling C. Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol.* 2012 Jul;26(7):1203-12. doi: 10.1210/me.2012-1004. Epub 2012 May 8. PMID: 22570331; PMCID: PMC5416998.
199. Hall E, Dekker Nitert M, Volkov P, Malmgren S, Mulder H, Bacos K, Ling C. The effects of high glucose exposure on global gene expression and DNA methylation in human pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol.* 2018 Sep 5;472:57-67. doi: 10.1016/j.mce.2017.11.019. Epub 2017 Nov 26. PMID: 29183809.
200. Dayeh T, Volkov P, Salö S, Hall E, Nilsson E, Olsson AH, Kirkpatrick CL, Wollheim CB, Eliasson L, Rönn T, Bacos K, Ling C. Genome-wide DNA methylation analysis of human pancreatic islets from type 2 diabetic and non-diabetic donors identifies candidate genes that influence insulin secretion. *PLoS Genet.* 2014 Mar 6;10(3):e1004160. doi: 10.1371/journal.pgen.1004160. PMID: 24603685; PMCID: PMC3945174.
201. Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology (Basel).* 2016 Jan 6;5(1):3. doi: 10.3390/biology5010003. PMID: 26751487; PMCID: PMC4810160.
202. AlRashidi FT, Gillespie KM. Biomarkers in Islet Cell Transplantation for Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2018 Sep 5;18(10):94. doi: 10.1007/s11892-018-1059-4. PMID: 30187134; PMCID: PMC6132734.
203. Volkov P, Bacos K, Ofori JK, Esguerra JL, Eliasson L, Rönn T, Ling C. Whole-Genome Bisulfite Sequencing of Human Pancreatic Islets Reveals Novel Differentially Methylated Regions in Type 2 Diabetes Pathogenesis. *Diabetes.* 2017 Apr;66(4):1074-1085. doi: 10.2337/db16-0996. Epub 2017 Jan 4. PMID: 28052964.
204. Scott RA, Scott LJ, Mägi R et al. An Expanded Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Europeans. *Diabetes.* 2017 Nov;66(11):2888-2902. doi: 10.2337/db16-1253. Epub 2017 May 31. PMID: 28566273; PMCID: PMC5652602.
205. Bell CG, Teschendorff AE, Rakyan VK, Maxwell AP, Beck S, Savage DA. Genome-wide DNA methylation analysis for diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genomics.* 2010 Aug 5;3:33. doi: 10.1186/1755-8794-3-33. PMID: 20687937; PMCID: PMC2924253.
206. Agardh E, Lundstig A, Perfilyev A, Volkov P, Freiburghaus T, Lindholm E, Rönn T, Agardh CD, Ling C. Genome-wide analysis of DNA methylation in subjects with type 1 diabetes identifies epigenetic modifications associated with proliferative diabetic retinopathy. *BMC Med.* 2015 Aug 6;13:182. doi: 10.1186/s12916-015-0421-5. PMID: 26248552; PMCID: PMC4527111.
207. Natarajan R. Epigenetic Mechanisms in Diabetic Vascular Complications and Metabolic Memory: The 2020 Edwin Bierman Award Lecture. *Diabetes.* 2021 Feb;70(2):328-337. doi: 10.2337/dbi20-0030. PMID: 33472942; PMCID: PMC7881871.
208. Nakatochi M, Ichihara S, Yamamoto K, Naruse K, Yokota S, Asano H, Matsubara T, Yokota M. Epigenome-wide association of myocardial infarction with DNA methylation sites at loci related to cardiovascular disease. *Clin Epigenetics.* 2017 May 15;9:54. doi: 10.1186/s13148-017-0353-3. PMID: 28515798; PMCID: PMC5432989.
209. Swiss Academy of Medical Sciences (SAMS) and Swiss Academy of Sciences (SCNAT) Ethical Principles and Guidelines for Experimental Animals. 3era ed. Suiza; 2005. <https://www.samw.ch/en/Projects/Overview-of-projects/Animal-experimentation.html>
210. Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med.* 1976 Apr;15(2):212-6. doi: 10.1016/0006-2944(76)90049-1. PMID: 962904.

211. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*. 1967 Jan;16(1):35-9. doi: 10.2337/diab.16.1.35. PMID: 5333500.
212. Gagliardino JJ, Nierle C, Pfeiffer EF. The effect of serotonin on in vitro insulin secretion and biosynthesis in mice. *Diabetologia*. 1974 Oct;10(5):411-4. doi: 10.1007/BF01221630. PMID: 4615963.
213. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999. PMID: 942051.
214. Illumina. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf.
215. Hunter RG, Seligsohn M, Rubin TG, Griffiths BB, Ozdemir Y, Pfaff DW, Datson NA, McEwen BS. Stress and corticosteroids regulate rat hippocampal mitochondrial DNA gene expression via the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 9;113(32):9099-104. doi: 10.1073/pnas.1602185113. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27457949; PMCID: PMC4987818.
216. Keeseey RE, Hirvonen MD. Body weight set-points: determination and adjustment. *J Nutr*. 1997 Sep;127(9):1875S-1883S. doi: 10.1093/jn/127.9.1875S. PMID: 9278574.
217. Johnson RJ, Wilson WL, Bland ST, Lanaspá MA. Fructose and Uric Acid as Drivers of a Hyperactive Foraging Response: A Clue to Behavioral Disorders Associated with Impulsivity or Mania? *Evol Hum Behav*. 2021 May;42(3):194-203. doi: 10.1016/j.evolhumbehav.2020.09.006. Epub 2020 Oct 1. PMID: 33994772; PMCID: PMC8117086.
218. Softic S, Stanhope KL, Boucher J, Divanovic S, Lanaspá MA, Johnson RJ, Kahn CR. Fructose and hepatic insulin resistance. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2020 Aug;57(5):308-322. doi: 10.1080/10408363.2019.1711360. Epub 2020 Jan 14. PMID: 31935149; PMCID: PMC7774304.
219. Bernal SY, Dostova I, Kest A, Abayev Y, Kandova E, Touzani K, Sclafani A, Bodnar RJ. Role of dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens shell on the acquisition and expression of fructose-conditioned flavor-flavor preferences in rats. *Behav Brain Res*. 2008 Jun 26;190(1):59-66. doi: 10.1016/j.bbr.2008.02.003. Epub 2008 Feb 8. PMID: 18339434; PMCID: PMC2440572.
220. Levy A, Marshall P, Zhou Y, Kreek MJ, Kent K, Daniels S, Shore A, Downs T, Fernandes MF, Mutch DM, Leri F. Fructose:glucose ratios--a study of sugar self-administration and associated neural and physiological responses in the rat. *Nutrients*. 2015 May 22;7(5):3869-90. doi: 10.3390/nu7053869. PMID: 26007337; PMCID: PMC4446784.
221. Wang GJ, Volkow ND, Thanos PK, Fowler JS. Imaging of brain dopamine pathways: implications for understanding obesity. *J Addict Med*. 2009 Mar;3(1):8-18. doi: 10.1097/ADM.0b013e31819a86f7. PMID: 21603099; PMCID: PMC3098897.
222. Barrera CM, Hunter RE, Dunlap WP. Hyperuricemia and locomotor activity in developing rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1989 Jun;33(2):367-9. doi: 10.1016/0091-3057(89)90515-7. PMID: 2813475.
223. Sutin AR, Cutler RG, Camandola S, Uda M, Feldman NH, Cucca F, Zonderman AB, Mattson MP, Ferrucci L, Schlessinger D, Terracciano A. Impulsivity is associated with uric acid: evidence from humans and mice. *Biol Psychiatry*. 2014 Jan 1;75(1):31-7. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.02.024. Epub 2013 Apr 10. PMID: 23582268; PMCID: PMC3859133.
224. Ooki S, Yamada K, Asaka A. Relationship between blood uric acid level and personality traits. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*. 1990;39(1):117-22. doi: 10.1017/s000156600005638. PMID: 2392888.
225. Lorenzi TM, Borba DL, Dutra G, Lara DR. Association of serum uric acid levels with emotional and affective temperaments. *J Affect Disord*. 2010 Feb;121(1-2):161-4. doi: 10.1016/j.jad.2009.05.023. Epub 2009 Jun 12. PMID: 19524303.
226. Choi CS, Kim P, Park JH, Gonzales EL, Kim KC, Cho KS, Ko MJ, Yang SM, Seung H, Han SH, Ryu JH, Cheong JH, Shin CY. High sucrose consumption during pregnancy induced ADHD-like behavioral phenotypes in mice offspring. *J Nutr Biochem*. 2015 Dec;26(12):1520-6. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.07.018. Epub 2015 Aug 8. PMID: 26452319.
227. Maiztegui B, Borelli MI, Raschia MA, Del Zotto H, Gagliardino JJ. Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: beta-cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion. *J Endocrinol*. 2009 Feb;200(2):139-49. doi: 10.1677/JOE-08-0386. Epub 2008 Nov 27. PMID: 19039094.

228. Castro MC, Massa ML, Del Zotto H, Gagliardino JJ, Francini F. Rat liver uncoupling protein 2: changes induced by a fructose-rich diet. *Life Sci.* 2011 Oct 24;89(17-18):609-14. doi: 10.1016/j.lfs.2011.07.024. Epub 2011 Aug 9. PMID: 21855553.
229. Fariña JP, García ME, Alzamendi A, Giovambattista A, Marra CA, Spinedi E, Gagliardino JJ. Antioxidant treatment prevents the development of fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. *Clin Sci (Lond).* 2013 Jul 1;125(2):87-97. doi: 10.1042/CS20120470. PMID: 23384123.
230. Maiztegui B, Román CL, Gagliardino JJ, Flores LE. Impaired endocrine-metabolic homeostasis: underlying mechanism of its induction by unbalanced diet. *Clin Sci (Lond).* 2018 Apr 30;132(8):869-881. doi: 10.1042/CS20171616. PMID: 29626110.
231. Román CL, Flores LE, Maiztegui B, Raschia MA, Del Zotto H, Gagliardino JJ. Islet NADPH oxidase activity modulates β -cell mass and endocrine function in rats with fructose-induced oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Dec;1840(12):3475-82. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.09.011. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25230159.
232. Niskanen LK, Salonen JT, Nyssönen K, Uusitupa MI. Plasma lipid peroxidation and hyperglycaemia: a connection through hyperinsulinaemia? *Diabet Med.* 1995 Sep;12(9):802-8. doi: 10.1111/j.1464-5491.1995.tb02083.x. PMID: 8542741.
233. Maiztegui B, Boggio V, Román CL, Flores LE, Zotto HD, Ropolo A, Grasso D, Vaccaro MI, Gagliardino JJ. VMP1-related autophagy induced by a fructose-rich diet in β -cells: its prevention by incretins. *Clin Sci (Lond).* 2017 Apr 25;131(8):673-687. doi: 10.1042/CS20170010. Epub 2017 Feb 10. PMID: 28188238.
234. Burgeiro A, Cerqueira MG, Varela-Rodríguez BM, Nunes S, Neto P, Pereira FC, Reis F, Carvalho E. Glucose and Lipid Dysmetabolism in a Rat Model of Prediabetes Induced by a High-Sucrose Diet. *Nutrients.* 2017 Jun 21;9(6):638. doi: 10.3390/nu9060638. PMID: 28635632; PMCID: PMC5490617.
235. Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, Rihn BH. Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med.* 1998 Apr;24(6):1023-39. doi: 10.1016/s0891-5849(97)00371-7. PMID: 9607614.
236. Jacob S, Streeper RS, Fogt DL, Hokama JY, Tritschler HJ, Dietze GJ, Henriksen EJ. The antioxidant alpha-lipoic acid enhances insulin-stimulated glucose metabolism in insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes.* 1996 Aug;45(8):1024-9. doi: 10.2337/diab.45.8.1024. PMID: 8690147.
237. Song KH, Lee WJ, Koh JM, Kim HS, Youn JY, Park HS, Koh EH, Kim MS, Youn JH, Lee KU, Park JY. alpha-Lipoic acid prevents diabetes mellitus in diabetes-prone obese rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jan 7;326(1):197-202. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.213. PMID: 15567171.
238. Patel J, Matnor NA, Iyer A, Brown L. A Regenerative Antioxidant Protocol of Vitamin E and α -Lipoic Acid Ameliorates Cardiovascular and Metabolic Changes in Fructose-Fed Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:120801. doi: 10.1155/2011/120801. Epub 2011 Mar 9. PMID: 21437191; PMCID: PMC3062110.
239. Castro MC, Massa ML, Schinella G, Gagliardino JJ, Francini F. Lipoic acid prevents liver metabolic changes induced by administration of a fructose-rich diet. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jan;1830(1):2226-32. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.10.010. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23085069.
240. Castro MC, Francini F, Gagliardino JJ, Massa ML. Lipoic acid prevents fructose-induced changes in liver carbohydrate metabolism: role of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Mar;1840(3):1145-51. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.12.005. Epub 2013 Dec 19. PMID: 24361606.
241. Dumrauf B, Ahrtz L, Benitez A, Maiztegui B, Flores LE, Francini F, Gagliardino JJ, Román CL. Relación tejido adiposo visceral/tejido adiposo pardo: cambios inducidos por administración de dieta desbalanceada. *Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes.* 2022;56:87-8.
242. Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, Neifing JL, Ward WK, Beard JC, Palmer JP, et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes.* 1993 Nov;42(11):1663-72. doi: 10.2337/diab.42.11.1663. PMID: 8405710.
243. Timmers KI, Voyles NR, Recant L. Genetically obese rats with (SHR/N-cp) and without diabetes (LA/N-cp) share abnormal islet responses to glucose. *Metabolism.* 1992 Oct;41(10):1125-33. doi: 10.1016/0026-0495(92)90298-o. PMID: 1406299.
244. Curry DL, Stern JS. Dynamics of insulin hypersecretion by obese Zucker rats. *Metabolism.* 1985 Sep;34(9):791-6. doi: 10.1016/0026-0495(85)90100-3. PMID: 3897767.

245. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology*. 1992 Mar;130(3):1459-66. doi: 10.1210/endo.130.3.1537300. PMID: 1537300.
246. Weyer C, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction are independent predictors of worsening of glucose tolerance during each stage of type 2 diabetes development. *Diabetes Care*. 2001 Jan;24(1):89-94. doi: 10.2337/diacare.24.1.89. PMID: 11194248.
247. Mohd Nor NS, Lee S, Bacha F, Tfayli H, Arslanian S. Triglyceride glucose index as a surrogate measure of insulin sensitivity in obese adolescents with normoglycemia, prediabetes, and type 2 diabetes mellitus: comparison with the hyperinsulinemic-euglycemic clamp. *Pediatr Diabetes*. 2016 Sep;17(6):458-65. doi: 10.1111/pedi.12303. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26251318.
248. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res*. 2002 Aug 15;62(16):4592-8. PMID: 12183413.
249. Wang W, Shi Q, Guo T, Yang Z, Jia Z, Chen P, Zhou C. PDX1 and ISL1 differentially coordinate with epigenetic modifications to regulate insulin gene expression in varied glucose concentrations. *Mol Cell Endocrinol*. 2016 Jun 15;428:38-48. doi: 10.1016/j.mce.2016.03.019. Epub 2016 Mar 17. PMID: 26994512.
250. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*. 2002 Jan 3;415(6867):96-9. doi: 10.1038/415096a. PMID: 11780125.
251. Azzu V, Affourtit C, Breen EP, Parker N, Brand MD. Dynamic regulation of uncoupling protein 2 content in INS-1E insulinoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Oct;1777(10):1378-83. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.07.001. Epub 2008 Jul 22. PMID: 18692019; PMCID: PMC2568827.
252. Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*. 2001 Jun 15;105(6):745-55. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00378-6. PMID: 11440717.
253. Chan CB, De Leo D, Joseph JW, McQuaid TS, Ha XF, Xu F, Tsushima RG, Pennefather PS, Salapatek AM, Wheeler MB. Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes*. 2001 Jun;50(6):1302-10. doi: 10.2337/diabetes.50.6.1302. PMID: 11375330.
254. Vats P, Sagar N, Singh TP, Banerjee M. Association of Superoxide dismutases (SOD1 and SOD2) and Glutathione peroxidase 1 (GPx1) gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Free Radic Res*. 2015 Jan;49(1):17-24. doi: 10.3109/10715762.2014.971782. Epub 2014 Oct 31. PMID: 25283363.
255. Ziegler D, Strom A, Brüggemann J, Ziegler I, Ringel B, Püttgen S, Roden M; GDS Group. Overexpression of cutaneous mitochondrial superoxide dismutase in recent-onset type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2015 Jul;58(7):1621-5. doi: 10.1007/s00125-015-3609-5. Epub 2015 May 2. PMID: 25933618.
256. Aguer C, Pasqua M, Thrush AB, Moffat C, McBurney M, Jardine K, Zhang R, Beauchamp B, Dent R, McPherson R, Harper ME. Increased proton leak and SOD2 expression in myotubes from obese non-diabetic subjects with a family history of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1832(10):1624-33. doi: 10.1016/j.bbadi.2013.05.008. Epub 2013 May 16. PMID: 23685312.
257. Kang L, Dai C, Lustig ME, Bonner JS, Mayes WH, Mokshagundam S, James FD, Thompson CS, Lin CT, Perry CG, Anderson EJ, Neuffer PD, Wasserman DH, Powers AC. Heterozygous SOD2 deletion impairs glucose-stimulated insulin secretion, but not insulin action, in high-fat-fed mice. *Diabetes*. 2014 Nov;63(11):3699-710. doi: 10.2337/db13-1845. Epub 2014 Jun 19. PMID: 24947366; PMCID: PMC4207395.
258. Acharya JD, Ghaskadbi SS. Islets and their antioxidant defense. *Islets*. 2010 Jul-Aug;2(4):225-35. doi: 10.4161/isl.2.4.12219. PMID: 21099317.
259. Alzamendi A, Giovambattista A, García ME, Rebolledo OR, Gagliardino JJ, Spinedi E. Effect of pioglitazone on the fructose-induced abdominal adipose tissue dysfunction. *PPAR Res*.

- 2012;2012:259093. doi: 10.1155/2012/259093. Epub 2012 Oct 2. PMID: 23091482; PMCID: PMC3469242.
260. Alzamendi A, Giovambattista A, Raschia A, Madrid V, Gaillard RC, Rebolledo O, Gagliardino JJ, Spinedi E. Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats. *Endocrine*. 2009 Apr;35(2):227-32. doi: 10.1007/s12020-008-9143-1. Epub 2009 Jan 23. PMID: 19165636.
261. Seufert J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes*. 2004 Feb;53 Suppl 1:S152-8. doi: 10.2337/diabetes.53.2007.s152. PMID: 14749281.
262. Lammert E, Gu G, McLaughlin M, Brown D, Brekken R, Murtaugh LC, Gerber HP, Ferrara N, Melton DA. Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Curr Biol*. 2003 Jun 17;13(12):1070-4. doi: 10.1016/s0960-9822(03)00378-6. PMID: 12814555.
263. Brissova M, Shostak A, Shiota M, Wiebe PO, Poffenberger G, Kantz J, Chen Z, Carr C, Jerome WG, Chen J, Baldwin HS, Nicholson W, Bader DM, Jetton T, Gannon M, Powers AC. Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor--a is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes*. 2006 Nov;55(11):2974-85. doi: 10.2337/db06-0690. PMID: 17065333.
264. Jesmin S, Akter S, Rahman MM, Islam MM, Islam AM, Sultana SN, Mowa CN, Yamaguchi N, Okazaki O, Satoru K, Kimura S, Hiroe M, Mizutani T, Moroi M. Disruption of components of vascular endothelial growth factor angiogenic signalling system in metabolic syndrome. Findings from a study conducted in rural Bangladeshi women. *Thromb Haemost*. 2013 Apr;109(4):696-705. doi: 10.1160/TH12-09-0654. Epub 2013 Jan 31. PMID: 23364276.
265. Bento CF, Pereira P. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular response to hypoxia in diabetes. *Diabetologia*. 2011 Aug;54(8):1946-56. doi: 10.1007/s00125-011-2191-8. Epub 2011 May 26. PMID: 21614571.
266. Cheng K, Ho K, Stokes R, Scott C, Lau SM, Hawthorne WJ, O'Connell PJ, Loudovaris T, Kay TW, Kulkarni RN, Okada T, Wang XL, Yim SH, Shah Y, Grey ST, Biankin AV, Kench JG, Laybutt DR, Gonzalez FJ, Kahn CR, Gunton JE. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates beta cell function in mouse and human islets. *J Clin Invest*. 2010 Jun;120(6):2171-83. doi: 10.1172/JCI35846. Epub 2010 May 3. PMID: 20440072; PMCID: PMC2877560.
267. Gunton JE. Hypoxia-inducible factors and diabetes. *J Clin Invest*. 2020 Oct 1;130(10):5063-5073. doi: 10.1172/JCI137556. PMID: 32809974; PMCID: PMC7524477.
268. Davegårdh C, García-Calzón S, Bacos K, Ling C. DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes in humans. *Mol Metab*. 2018 Aug;14:12-25. doi: 10.1016/j.molmet.2018.01.022. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29496428; PMCID: PMC6034041.
269. Thurner M, van de Bunt M, Torres JM, Mahajan A, Nylander V, Bennett AJ, Gaulton KJ, Barrett A, Burrows C, Bell CG, Lowe R, Beck S, Rakyán VK, Gloyn AL, McCarthy MI. Integration of human pancreatic islet genomic data refines regulatory mechanisms at Type 2 Diabetes susceptibility loci. *Elife*. 2018 Feb 7;7:e31977. doi: 10.7554/eLife.31977. PMID: 29412141; PMCID: PMC5828664.
270. Kulkarni SS, Salehzadeh F, Fritz T, Zierath JR, Krook A, Osler ME. Mitochondrial regulators of fatty acid metabolism reflect metabolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2012 Feb;61(2):175-85. doi: 10.1016/j.metabol.2011.06.014. Epub 2011 Aug 3. Erratum in: *Metabolism*. 2014 Jun;63(6):e9. PMID: 21816445.
271. Nilsson E, Matte A, Perfilyev A, de Mello VD, Käkälä P, Pihlajamäki J, Ling C. Epigenetic Alterations in Human Liver From Subjects With Type 2 Diabetes in Parallel With Reduced Folate Levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Nov;100(11):E1491-501. doi: 10.1210/jc.2015-3204. Epub 2015 Sep 29. PMID: 26418287; PMCID: PMC4702449.
272. Kirchner H, Sinha I, Gao H, Ruby MA, Schönke M, Lindvall JM, Barrès R, Krook A, Näslund E, Dahlman-Wright K, Zierath JR. Altered DNA methylation of glycolytic and lipogenic genes in liver from obese and type 2 diabetic patients. *Mol Metab*. 2016 Jan 2;5(3):171-183. doi: 10.1016/j.molmet.2015.12.004. PMID: 26977391; PMCID: PMC4770265.
273. Toperoff G, Aran D, Kark JD, Rosenberg M, Dubnikov T, Nissan B, Wainstein J, Friedlander Y, Levy-Lahad E, Glaser B, Hellman A. Genome-wide survey reveals predisposing diabetes type 2-related DNA methylation variations in human peripheral blood. *Hum Mol Genet*. 2012 Jan 15;21(2):371-83. doi: 10.1093/hmg/ddr472. Epub 2011 Oct 12. PMID: 21994764; PMCID: PMC3276288.

274. Pheiffer C, Erasmus RT, Kengne AP, Matsha TE. Differential DNA methylation of microRNAs within promoters, intergenic and intragenic regions of type 2 diabetic, pre-diabetic and non-diabetic individuals. *Clin Biochem*. 2016 Apr;49(6):433-438. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.11.021. Epub 2015 Dec 2. PMID: 26656639.
275. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Jan;38(1):23-38. doi: 10.1038/npp.2012.112. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22781841; PMCID: PMC3521964.
276. Ko YA, Mohtat D, Suzuki M, Park AS, Izquierdo MC, Han SY, Kang HM, Si H, Hostetter T, Pullman JM, Fazzari M, Verma A, Zheng D, Grealley JM, Susztak K. Cytosine methylation changes in enhancer regions of core pro-fibrotic genes characterize kidney fibrosis development. *Genome Biol*. 2013;14(10):R108. doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r108. PMID: 24098934; PMCID: PMC4053753.
277. Evans JP, Burke W, Chen R, Bennett RL, Schmidt RA, Dellinger EP, Kimmey M, Crispin D, Brentnall TA, Byrd DR. Familial pancreatic adenocarcinoma: association with diabetes and early molecular diagnosis. *J Med Genet*. 1995 May;32(5):330-5. doi: 10.1136/jmg.32.5.330. PMID: 7616537; PMCID: PMC1050425.
278. Schernhammer ES, Hu FB, Giovannucci E, Michaud DS, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS. Sugar-sweetened soft drink consumption and risk of pancreatic cancer in two prospective cohorts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Sep;14(9):2098-105. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0059. PMID: 16172216.
279. Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Consumption of sugar and sugar-sweetened foods and the risk of pancreatic cancer in a prospective study. *Am J Clin Nutr*. 2006 Nov;84(5):1171-6. doi: 10.1093/ajcn/84.5.1171. PMID: 17093171.
280. Jee SH, Ohrr H, Sull JW, Yun JE, Ji M, Samet JM. Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women. *JAMA*. 2005 Jan 12;293(2):194-202. doi: 10.1001/jama.293.2.194. PMID: 15644546.
281. Stolzenberg-Solomon RZ, Graubard BI, Chari S, Limburg P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Insulin, glucose, insulin resistance, and pancreatic cancer in male smokers. *JAMA*. 2005 Dec 14;294(22):2872-8. doi: 10.1001/jama.294.22.2872. PMID: 16352795.
282. Gapstur SM, Gann PH, Lowe W, Liu K, Colangelo L, Dyer A. Abnormal glucose metabolism and pancreatic cancer mortality. *JAMA*. 2000 May 17;283(19):2552-8. doi: 10.1001/jama.283.19.2552. PMID: 10815119.
283. Larsson SC, Permert J, Håkansson N, Näslund I, Bergkvist L, Wolk A. Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. *Br J Cancer*. 2005 Nov 28;93(11):1310-5. doi: 10.1038/sj.bjc.6602868. PMID: 16288300; PMCID: PMC2361517.
284. Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS. Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA*. 2001 Aug 22-29;286(8):921-9. doi: 10.1001/jama.286.8.921. PMID: 11509056.
285. Jung DE, Kim JM, Kim C, Song SY. Embigin is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates cell motility through epithelial to mesenchymal transition via the TGF- β pathway. *Mol Carcinog*. 2016 May;55(5):633-45. doi: 10.1002/mc.22309. Epub 2015 Mar 14. PMID: 25773908.
286. Nonaka D, Fabbri A, Roz L, Mariani L, Vecchione A, Moore GW, Tavecchio L, Croce CM, Sozzi G. Reduced FEZ1/LZTS1 expression and outcome prediction in lung cancer. *Cancer Res*. 2005 Feb 15;65(4):1207-12. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3461. PMID: 15735004.
287. Vecchione A, Galetti TP, Gardiman M, Ishii H, Giarnieri E, Pagano F, Gomella LG, Croce CM, Baffa R. Collecting duct carcinoma of the kidney: an immunohistochemical study of 11 cases. *BMC Urol*. 2004 Sep 9;4:11. doi: 10.1186/1471-2490-4-11. PMID: 15357873; PMCID: PMC517938.
288. Palanivel C, Chaudhary N, Seshacharyulu P, Cox JL, Yan Y, Batra SK, Ouellette MM. The GSK3 kinase and LZTR1 protein regulate the stability of Ras family proteins and the proliferation of pancreatic cancer cells. *Neoplasia*. 2022 Mar;25:28-40. doi: 10.1016/j.neo.2022.01.002. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35114566; PMCID: PMC8814762.
289. Abaji C, Cousineau I, Belmaaza A. BRCA2 regulates homologous recombination in response to DNA damage: implications for genome stability and carcinogenesis. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):4117-25. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3071. PMID: 15899802.
290. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 2002 Jan 25;108(2):171-82. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00615-3. PMID: 11832208.

291. Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J. The Role of BRCA2 Mutation Status as Diagnostic, Predictive, and Prognosis Biomarker for Pancreatic Cancer. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1869304. doi: 10.1155/2016/1869304. Epub 2016 Dec 18. PMID: 28078281; PMCID: PMC5203890.
292. Liu GM, Zeng HD, Zhang CY, Xu JW. Key genes associated with diabetes mellitus and hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2019 Nov;215(11):152510. doi: 10.1016/j.prp.2019.152510. Epub 2019 Jul 6. PMID: 31591054.
293. Tufo G, Jones AW, Wang Z, Hamelin J, Tajeddine N, Esposti DD, Martel C, Boursier C, Gallerne C, Migdal C, Lemaire C, Szabadkai G, Lemoine A, Kroemer G, Brenner C. The protein disulfide isomerases PDIA4 and PDIA6 mediate resistance to cisplatin-induced cell death in lung adenocarcinoma. *Cell Death Differ.* 2014 May;21(5):685-95. doi: 10.1038/cdd.2013.193. Epub 2014 Jan 24. PMID: 24464223; PMCID: PMC3978299.
294. Kuo TF, Hsu SW, Huang SH, Chang CL, Feng CS, Huang MG, Chen TY, Yang MT, Jiang ST, Wen TN, Yang CY, Huang CY, Kao SH, Tsai KC, Yang G, Yang WC. Pdia4 regulates β -cell pathogenesis in diabetes: molecular mechanism and targeted therapy. *EMBO Mol Med.* 2021 Oct 7;13(10):e11668. doi: 10.15252/emmm.201911668. Epub 2021 Sep 20. PMID: 34542937; PMCID: PMC8495450.
295. Su SC, Hung YJ, Lin FH, Hsieh CH, Lu CH, Chien CY, Chen YC, Li PF, Kuo FC, Liu JS, Chu NF, Lee CH. Circulating protein disulfide isomerase family member 4 is associated with type 2 diabetes mellitus, insulin sensitivity, and obesity. *Acta Diabetol.* 2022 Aug;59(8):1001-1009. doi: 10.1007/s00592-022-01892-1. Epub 2022 Apr 23. PMID: 35460376.
296. Blaschke S, Mueller CA, Markovic-Lipkovski J, Puch S, Miosge N, Becker V, Mueller GA, Klein G. Expression of cadherin-8 in renal cell carcinoma and fetal kidney. *Int J Cancer.* 2002 Oct 1;101(4):327-34. doi: 10.1002/ijc.10623. PMID: 12209956.
297. Morettin A, Paris G, Bouzid Y, Baldwin RM, Falls TJ, Bell JC, Côté J. Tudor Domain Containing Protein 3 Promotes Tumorigenesis and Invasive Capacity of Breast Cancer Cells. *Sci Rep.* 2017 Jul 11;7(1):5153. doi: 10.1038/s41598-017-04955-4. PMID: 28698590; PMCID: PMC5506013.
298. Ren D, Sun J, Mao L, Ye H, Polonsky KS. BH3-only molecule Bim mediates β -cell death in IRS2 deficiency. *Diabetes.* 2014 Oct;63(10):3378-87. doi: 10.2337/db13-1814. Epub 2014 Apr 23. PMID: 24760140; PMCID: PMC4171655.
299. Wali JA, Rondas D, McKenzie MD, Zhao Y, Elkerbout L, Fynch S, Gurzov EN, Akira S, Mathieu C, Kay TW, Overbergh L, Strasser A, Thomas HE. The proapoptotic BH3-only proteins Bim and Puma are downstream of endoplasmic reticulum and mitochondrial oxidative stress in pancreatic islets in response to glucotoxicity. *Cell Death Dis.* 2014 Mar 13;5(3):e1124. doi: 10.1038/cddis.2014.88. PMID: 24625983; PMCID: PMC3973197.
300. Li YY, Zhang S, Wang H, Zhang SX, Xu T, Chen SW, Zhang Y, Chen Y. Identification of Crucial Genes and Pathways Associated with Atherosclerotic Plaque in Diabetic Patients. *Pharmgenomics Pers Med.* 2021 Feb 4;14:211-220. doi: 10.2147/PGPM.S281705. PMID: 33568933; PMCID: PMC7869704.
301. Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, Azuma K, Hirose T, Tanaka K, Kominami E, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab.* 2008 Oct;8(4):325-32. doi: 10.1016/j.cmet.2008.08.009. PMID: 18840363.
302. Carvalho C, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI. Alzheimer's disease and type 2 diabetes-related alterations in brain mitochondria, autophagy and synaptic markers. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Aug;1852(8):1665-75. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.05.001. Epub 2015 May 7. PMID: 25960150.
303. Lu L, Ma Y, Deng J, Xie J, Huang C. Lower ATG7 Levels are Associated with a Higher Risk of Gestational Diabetes Mellitus: A Cross-Sectional Study. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2022 Aug 4;15:2335-2343. doi: 10.2147/DMSO.S377041. PMID: 35958873; PMCID: PMC9359373.
304. National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. Rn18s 18S ribosomal RNA [Rattus norvegicus (Norway rat)] Gene ID: 100861533, updated on 10-Jul-2024 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100861533>.
305. Huang H, Li H, Pan R, Wang S, Khan AA, Zhao Y, Zhu H, Liu X. Ribosome 18S m6A methyltransferase METTL5 promotes pancreatic cancer progression by modulating c-Myc translation. *Int J Oncol.* 2022 Jan;60(1):9. doi: 10.3892/ijo.2021.5299. Epub 2021 Dec 31. PMID: 34970694.

306. Silvotti L, Cavalca E, Gatti R, Percudani R, Tirindelli R. A recent class of chemosensory neurons developed in mouse and rat. *PLoS One*. 2011;6(9):e24462. doi: 10.1371/journal.pone.0024462. Epub 2011 Sep 9. PMID: 21931725; PMCID: PMC3170373.
307. Lien YC, Pinney SE, Lu XM, Simmons RA. Identification of Novel Regulatory Regions Induced by Intrauterine Growth Restriction in Rat Islets. *Endocrinology*. 2022 Feb 1;163(2):bqab251. doi: 10.1210/endo/bqab251. PMID: 34894232; PMCID: PMC8743043.
308. Eixelsberger T, Sykora S, Egger S, Brunsteiner M, Kavanagh KL, Oppermann U, Brecker L, Nidetzky B. Structure and mechanism of human UDP-xylose synthase: evidence for a promoting role of sugar ring distortion in a three-step catalytic conversion of UDP-glucuronic acid. *J Biol Chem*. 2012 Sep 7;287(37):31349-58. doi: 10.1074/jbc.M112.386706. Epub 2012 Jul 18. PMID: 22810237; PMCID: PMC3438964.
309. Götting C, Kuhn J, Kleesiek K. Serum xylosyltransferase activity in diabetic patients as a possible marker of reduced proteoglycan biosynthesis. *Diabetes Care*. 2008 Oct;31(10):2018-9. doi: 10.2337/dc08-0909. Epub 2008 Jul 23. PMID: 18650370; PMCID: PMC2551647.
310. Wang Q, Chi L. The Alterations and Roles of Glycosaminoglycans in Human Diseases. *Polymers (Basel)*. 2022 Nov 18;14(22):5014. doi: 10.3390/polym14225014. PMID: 36433141; PMCID: PMC9694910.
311. Waseem T, Ahmed M, Rajput TA, Babar MM. Molecular implications of glycosaminoglycans in diabetes pharmacotherapy. *Int J Biol Macromol*. 2023 Aug 30;247:125821. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125821. Epub 2023 Jul 17. PMID: 37467830.
312. Wang J, Wang Q, Li L, Li Y, Zhang H, Zheng L, Yang L, Zheng Y, Yang Y, Peng G, Zhang Y, Han Y. Phlegm-dampness constitution: genomics, susceptibility, adjustment and treatment with traditional Chinese medicine. *Am J Chin Med*. 2013;41(2):253-62. doi: 10.1142/S0192415X13500183. PMID: 23548117.
313. Ziolkowski AF, Popp SK, Freeman C, Parish CR, Simeonovic CJ. Heparan sulfate and heparanase play key roles in mouse β cell survival and autoimmune diabetes. *J Clin Invest*. 2012 Jan;122(1):132-41. doi: 10.1172/JCI46177. Epub 2011 Dec 19. PMID: 22182841; PMCID: PMC3248281.
314. Simeonovic CJ, Popp SK, Starrs LM, Brown DJ, Ziolkowski AF, Ludwig B, Bornstein SR, Wilson JD, Pugliese A, Kay TWH, Thomas HE, Loudovaris T, Choong FJ, Freeman C, Parish CR. Loss of intra-islet heparan sulfate is a highly sensitive marker of type 1 diabetes progression in humans. *PLoS One*. 2018 Feb 7;13(2):e0191360. doi: 10.1371/journal.pone.0191360. PMID: 29415062; PMCID: PMC5802856.
315. Dhouchak S, Popp SK, Brown DJ, Laybutt DR, Biden TJ, Bornstein SR, Parish CR, Simeonovic CJ. Heparan sulfate proteoglycans in beta cells provide a critical link between endoplasmic reticulum stress, oxidative stress and type 2 diabetes. *PLoS One*. 2021 Jun 4;16(6):e0252607. doi: 10.1371/journal.pone.0252607. PMID: 34086738; PMCID: PMC8177513.
316. Wang F, Wan A, Rodrigues B. The function of heparanase in diabetes and its complications. *Can J Diabetes*. 2013 Oct;37(5):332-8. doi: 10.1016/j.jcjd.2013.05.008. PMID: 24500561.
317. Dostal V, Churchill MEA. Cytosine methylation of mitochondrial DNA at CpG sequences impacts transcription factor A DNA binding and transcription. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2019 May;1862(5):598-607. doi: 10.1016/j.bbagr.2019.01.006. Epub 2019 Feb 23. PMID: 30807854; PMCID: PMC7806247.
318. Hao Z, Wu T, Cui X, Zhu P, Tan C, Dou X, Hsu KW, Lin YT, Peng PH, Zhang LS, Gao Y, Hu L, Sun HL, Zhu A, Liu J, Wu KJ, He C. N6-Deoxyadenosine Methylation in Mammalian Mitochondrial DNA. *Mol Cell*. 2020 May 7;78(3):382-395.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2020.02.018. Epub 2020 Mar 16. PMID: 32183942; PMCID: PMC7214128.
319. Mishra M, Kowluru RA. Epigenetic Modification of Mitochondrial DNA in the Development of Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Aug;56(9):5133-42. doi: 10.1167/iovs.15-16937. PMID: 26241401; PMCID: PMC4525675.
320. Stocco A, Smith AR, Baldacci F, Del Gamba C, Lo Gerfo A, Ceravolo R, Lunnon K, Migliore L, Coppedè F. Mitochondrial D-Loop Region Methylation and Copy Number in Peripheral Blood DNA of Parkinson's Disease Patients. *Genes (Basel)*. 2021 May 12;12(5):720. doi: 10.3390/genes12050720. PMID: 34065874; PMCID: PMC8151519.
321. Zheng LD, Linarelli LE, Liu L, Wall SS, Greenawald MH, Seidel RW, Estabrooks PA, Almeida FA, Cheng Z. Insulin resistance is associated with epigenetic and genetic regulation of mitochondrial DNA in obese

- humans. *Clin Epigenetics*. 2015 Jun 10;7(1):60. doi: 10.1186/s13148-015-0093-1. PMID: 26110043; PMCID: PMC4479353.
322. Cao K, Lv W, Wang X, Dong S, Liu X, Yang T, Xu J, Zeng M, Zou X, Zhao D, Ma Q, Lin M, Long J, Zang W, Gao F, Feng Z, Liu J. Hypermethylation of Hepatic Mitochondrial ND6 Provokes Systemic Insulin Resistance. *Adv Sci (Weinh)*. 2021 May 2;8(11):2004507. doi: 10.1002/adv.202004507. PMID: 34141522; PMCID: PMC8188198.
323. Mposhi A, Liang L, Mennega KP, Yildiz D, Kampert C, Hof IH, Jellema PG, de Koning TJ, Faber KN, Ruiters MHJ, Niezen-Koning KE, Rots MG. The Mitochondrial Epigenome: An Unexplored Avenue to Explain Unexplained Myopathies? *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 16;23(4):2197. doi: 10.3390/ijms23042197. PMID: 35216315; PMCID: PMC8879787.
324. Dreja T, Jovanovic Z, Rasche A, Kluge R, Herwig R, Tung YC, Joost HG, Yeo GS, Al-Hasani H. Diet-induced gene expression of isolated pancreatic islets from a polygenic mouse model of the metabolic syndrome. *Diabetologia*. 2010 Feb;53(2):309-20. doi: 10.1007/s00125-009-1576-4. Epub 2009 Nov 10. PMID: 19902174; PMCID: PMC2797618.
325. Olsson AH, Yang BT, Hall E, Taneera J, Salehi A, Nitert MD, Ling C. Decreased expression of genes involved in oxidative phosphorylation in human pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2011 Oct;165(4):589-95. doi: 10.1530/EJE-11-0282. Epub 2011 Jul 20. PMID: 21775499; PMCID: PMC3178933.
326. Mposhi A, Van der Wijst MG, Faber KN, Rots MG. Regulation of mitochondrial gene expression, the epigenetic enigma. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2017 Mar 1;22(7):1099-1113. doi: 10.2741/4535. PMID: 28199194.
327. Chalkia D, Chang YC, Derbeneva O, Lvova M, Wang P, Mishmar D, Liu X, Singh LN, Chuang LM, Wallace DC. Mitochondrial DNA associations with East Asian metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2018 Sep;1859(9):878-892. doi: 10.1016/j.bbabi.2018.07.002. Epub 2018 Jul 8. PMID: 29997041; PMCID: PMC6530988.
328. Liao WQ, Pang Y, Yu CA, Wen JY, Zhang YG, Li XH. Novel mutations of mitochondrial DNA associated with type 2 diabetes in Chinese Han population. *Tohoku J Exp Med*. 2008 Aug;215(4):377-84. doi: 10.1620/tjem.215.377. PMID: 18679013.
329. Elango S, Venugopal S, Thangaraj K, Viswanadha VP. Novel mutations in ATPase 8, ND1 and ND5 genes associated with peripheral neuropathy of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014 Mar;103(3):e49-52. doi: 10.1016/j.diabres.2013.12.015. Epub 2014 Jan 5. PMID: 24456990.
330. Houštek J, Hejzlarová K, Vrbacký M, Drahota Z, Landa V, Zídek V, Mlejnek P, Šimáková M, Šilhavy J, Mikšík I, Kazdová L, Oliarynyk O, Kurtz T, Pravenec M. Nonsynonymous variants in mt-Nd2, mt-Nd4, and mt-Nd5 are linked to effects on oxidative phosphorylation and insulin sensitivity in rat conplastic strains. *Physiol Genomics*. 2012 May 1;44(9):487-94. doi: 10.1152/physiolgenomics.00156.2011. Epub 2012 Mar 13. PMID: 22414913; PMCID: PMC3426424.
331. Ugarteburu O, Teresa Garcia-Silva M, Aldamiz-Echevarria L, Gort L, Garcia-Villoria J, Tort F, Ribes A. Complex I deficiency, due to NDUF4F4 mutations, causes severe mitochondrial dysfunction and is associated to early death and dysmorphia. *Mitochondrion*. 2020 Nov;55:78-84. doi: 10.1016/j.mito.2020.09.003. Epub 2020 Sep 17. PMID: 32949790.
332. Jarrett SG, Lin H, Godley BF, Boulton ME. Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2008 Nov;27(6):596-607. doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.09.001. Epub 2008 Sep 23. PMID: 18848639.
333. Santos JM, Tewari S, Kowluru RA. A compensatory mechanism protects retinal mitochondria from initial insult in diabetic retinopathy. *Free Radic Biol Med*. 2012 Nov 1;53(9):1729-37. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.588. Epub 2012 Sep 1. PMID: 22982046; PMCID: PMC3632051.
334. Dos Santos JM, de Oliveira DS, Moreli ML, Benite-Ribeiro SA. The role of mitochondrial DNA damage at skeletal muscle oxidative stress on the development of type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem*. 2018 Dec;449(1-2):251-255. doi: 10.1007/s11010-018-3361-5. Epub 2018 Apr 20. PMID: 29679277.
335. Benite-Ribeiro SA, Lucas-Lima KL, Jones JN, Dos Santos JM. Transcription of mtDNA and dyslipidemia are ameliorated by aerobic exercise in type 2 diabetes. *Mol Biol Rep*. 2020 Sep;47(9):7297-7303. doi: 10.1007/s11033-020-05725-8. Epub 2020 Aug 17. PMID: 32804305.

336. Kadenbach B, Hüttemann M. The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*. 2015 Sep;24:64-76. doi: 10.1016/j.mito.2015.07.002. Epub 2015 Jul 17. PMID: 26190566.
337. Friday DP, Alleyne TA, Ignacio DN, Arrindell D, Rao SR, Legall G. The Impact of Diabetes Mellitus on Oxygen Utilization by Complex IV: Preliminary Insights. *J Endocrinol Metab*. 2017 Marzo;7(1):18-24. doi: 10.14740/jem375w.
338. Lu H, Koshkin V, Allister EM, Gyulhandanyan AV, Wheeler MB. Molecular and metabolic evidence for mitochondrial defects associated with beta-cell dysfunction in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2010 Feb;59(2):448-59. doi: 10.2337/db09-0129. Epub 2009 Nov 10. PMID: 19903739; PMCID: PMC2809957.
339. Arroum T, Pham L, Raisanen TE, Morse PT, Wan J, Bell J, Lax R, Saada A, Hüttemann M, Weksler-Zangen S. High Sucrose Diet-Induced Subunit I Tyrosine 304 Phosphorylation of Cytochrome c Oxidase Leads to Liver Mitochondrial Respiratory Dysfunction in the Cohen Diabetic Rat Model. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Dec 21;13(1):19. doi: 10.3390/antiox13010019. PMID: 38275639; PMCID: PMC10812566.
340. Ganetzky RD, Stendel C, McCormick EM, Zolkipli-Cunningham Z, Goldstein AC, Klopstock T, Falk MJ. MT-ATP6 mitochondrial disease variants: Phenotypic and biochemical features analysis in 218 published cases and cohort of 14 new cases. *Hum Mutat*. 2019 May;40(5):499-515. doi: 10.1002/humu.23723. Epub 2019 Mar 4. PMID: 30763462; PMCID: PMC6506718.
341. Birtel J, von Landenberg C, Gliem M, Gliem C, Reimann J, Kunz WS, Herrmann P, Betz C, Caswell R, Nesbitt V, Kornblum C, Charbel Issa P. Mitochondrial Retinopathy. *Ophthalmol Retina*. 2022 Jan;6(1):65-79. doi: 10.1016/j.oret.2021.02.017. Epub 2021 Jul 10. PMID: 34257060.
342. Guo LJ, Oshida Y, Fuku N, Takeyasu T, Fujita Y, Kurata M, Sato Y, Ito M, Tanaka M. Mitochondrial genome polymorphisms associated with type-2 diabetes or obesity. *Mitochondrion*. 2005 Feb;5(1):15-33. doi: 10.1016/j.mito.2004.09.001. PMID: 16060290.
343. Kasinathan D, Matrougui K, Elango S, Belmandani S, Srinivas B, Muthusamy K, Narayanasamy Marimuthu P. Mitochondrial ATP6 and ND3 genes are associated with type 2 diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Metab Syndr*. 2022 Jun;16(6):102501. doi: 10.1016/j.dsx.2022.102501. Epub 2022 May 16. PMID: 35613490.
344. Fujii H, Kawada N, Japan Study Group Of Nafld Jsg-Nafld. The Role of Insulin Resistance and Diabetes in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2020 May 29;21(11):3863. doi: 10.3390/ijms21113863. PMID: 32485838; PMCID: PMC7312931.
345. Stewart R, Liolitsa D. Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabet Med*. 1999 Feb;16(2):93-112. doi: 10.1046/j.1464-5491.1999.00027.x. PMID: 10229302.
346. Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*. 1999 Dec 10;53(9):1937-42. doi: 10.1212/wnl.53.9.1937. PMID: 10599761.
347. Maggi S, Limongi F, Noale M, Romanato G, Tonin P, Rozzini R, Scafato E, Crepaldi G; ILSA Study Group. Diabetes as a risk factor for cognitive decline in older patients. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009;27(1):24-33. doi: 10.1159/000183842. Epub 2008 Dec 17. PMID: 19088471.
348. Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol*. 2004 May;61(5):661-6. doi: 10.1001/archneur.61.5.661. PMID: 15148141.
349. Zheng LD, Linarelli LE, Brooke J, Smith C, Wall SS, Greenawald MH, Seidel RW, Estabrooks PA, Almeida FA, Cheng Z. Mitochondrial Epigenetic Changes Link to Increased Diabetes Risk and Early-Stage Prediabetes Indicator. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5290638. doi: 10.1155/2016/5290638. Epub 2016 May 19. PMID: 27298712; PMCID: PMC4889851.
350. Kowluru RA. Retinopathy in a Diet-Induced Type 2 Diabetic Rat Model and Role of Epigenetic Modifications. *Diabetes*. 2020 Apr;69(4):689-698. doi: 10.2337/db19-1009. Epub 2020 Jan 16. PMID: 31949005; PMCID: PMC7085254.
351. Liu YF, Zhu JJ, Yu Tian X, Liu H, Zhang T, Zhang YP, Xie SA, Zheng M, Kong W, Yao WJ, Pang W, Zhao CR, Tang YJ, Zhou J. Hypermethylation of mitochondrial DNA in vascular smooth muscle cells impairs cell contractility. *Cell Death Dis*. 2020 Jan 20;11(1):35. doi: 10.1038/s41419-020-2240-7. PMID: 31959742; PMCID: PMC6971246.

352. Xu Y, Cheng L, Sun J, Li F, Liu X, Wei Y, Han M, Zhu Z, Bi J, Lai C, Wang Y. Hypermethylation of Mitochondrial Cytochrome b and Cytochrome c Oxidase II Genes with Decreased Mitochondrial DNA Copy Numbers in the APP/PS1 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neurochem Res*. 2021 Mar;46(3):564-572. doi: 10.1007/s11064-020-03192-y. Epub 2021 Feb 12. PMID: 33580369.
353. Xu Y, Xu L, Han M, Liu X, Li F, Zhou X, Wang Y, Bi J. Altered mitochondrial DNA methylation and mitochondrial DNA copy number in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Nov 26;520(1):41-46. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.09.094. Epub 2019 Sep 26. PMID: 31564416.
354. Blanch M, Mosquera JL, Ansoleaga B, Ferrer I, Barrachina M. Altered Mitochondrial DNA Methylation Pattern in Alzheimer Disease-Related Pathology and in Parkinson Disease. *Am J Pathol*. 2016 Feb;186(2):385-97. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.10.004. PMID: 26776077.
355. Han X, Zhao Z, Zhang M, Li G, Yang C, Du F, Wang J, Zhang Y, Wang Y, Jia Y, Li B, Sun Y. Maternal trans-general analysis of the human mitochondrial DNA pattern. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Nov 4;493(1):643-649. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.138. Epub 2017 Sep 1. PMID: 28865962.
356. Feng S, Xiong L, Ji Z, Cheng W, Yang H. Correlation between increased ND2 expression and demethylated displacement loop of mtDNA in colorectal cancer. *Mol Med Rep*. 2012 Jul;6(1):125-30. doi: 10.3892/mmr.2012.870. Epub 2012 Apr 12. PMID: 22505229.
357. FitzGerald GA. Measure for Measure: Biomarker standards and transparency. *Sci Transl Med*. 2016 Jun 15;8(343):343fs10. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8590. PMID: 27306662.
358. Volkmar M, Dedeurwaerder S, Cunha DA, Ndlovu MN, Defrance M, Deplus R, Calonne E, Volkmar U, Igoillo-Esteve M, Naamane N, Del Guerra S, Masini M, Bugliani M, Marchetti P, Cnop M, Eizirik DL, Fuks F. DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *EMBO J*. 2012 Mar 21;31(6):1405-26. doi: 10.1038/emboj.2011.503. Epub 2012 Jan 31. PMID: 22293752; PMCID: PMC3321176.
359. Sergi D, Naumovski N, Heilbronn LK, Abeywardena M, O'Callaghan N, Lionetti L, Luscombe-Marsh N. Mitochondrial (Dys)function and Insulin Resistance: From Pathophysiological Molecular Mechanisms to the Impact of Diet. *Front Physiol*. 2019 May 3;10:532. doi: 10.3389/fphys.2019.00532. PMID: 31130874; PMCID: PMC6510277.
360. Georgiev A, Granata C, Roden M. The role of mitochondria in the pathophysiology and treatment of common metabolic diseases in humans. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2022 Jun 1;322(6):C1248-C1259. doi: 10.1152/ajpcell.00035.2022. Epub 2022 May 4. PMID: 35508191.
361. Low HC, Chilian WM, Ratnam W, Karupaiah T, Md Noh MF, Mansor F, Ng ZX, Pung YF. Changes in Mitochondrial Epigenome in Type 2 Diabetes Mellitus. *Br J Biomed Sci*. 2023 Feb 14;80:10884. doi: 10.3389/bjbs.2023.10884. PMID: 36866104; PMCID: PMC9970885.
362. Rautenberg EK, Hamzaoui Y, Coletta DK. Mini-review: Mitochondrial DNA methylation in type 2 diabetes and obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Aug 25;13:968268. doi: 10.3389/fendo.2022.968268. PMID: 36093112; PMCID: PMC9453027.
363. Wang Z, Ni X, Zhang L, Sun L, Zhu X, Zhou Q, Yang Z, Yuan H. Toll-Like Receptor 4 and Inflammatory Micro-Environment of Pancreatic Islets in Type-2 Diabetes Mellitus: A Therapeutic Perspective. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020 Nov 10;13:4261-4272. doi: 10.2147/DMSO.S279104. PMID: 33204132; PMCID: PMC7666984.
364. Aly RH, Ahmed AE, Hozayen WG, Rabea AM, Ali TM, El Askary A, Ahmed OM. Patterns of Toll-Like Receptor Expressions and Inflammatory Cytokine Levels and Their Implications in the Progress of Insulin Resistance and Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetic Patients. *Front Physiol*. 2020 Dec 23;11:609223. doi: 10.3389/fphys.2020.609223. PMID: 33442388; PMCID: PMC7798354.
365. Zeng F, Zheng J, Shen L, Herrera-Balandrano DD, Huang W, Sui Z. Physiological mechanisms of TLR4 in glucolipid metabolism regulation: Potential use in metabolic syndrome prevention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2023 Jan;33(1):38-46. doi: 10.1016/j.numecd.2022.10.011. Epub 2022 Oct 18. PMID: 36428186.
366. Sepehri Z, Kiani Z, Nasiri AA, Mashhadi MA, Javadian F, Haghighi A, Kohan F, Bahari A, Sargazi A. Human Toll like receptor 4 gene expression of PBMCs in diabetes mellitus type 2 patients. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2015 Jul 31;61(3):92-5. PMID: 26255137.

367. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2010 Apr;33(4):861-8. doi: 10.2337/dc09-1799. Epub 2010 Jan 12. PMID: 20067962; PMCID: PMC2845042.
368. Jiang ZS, Wang SX, Jia HX, Wang J, Liu YT. Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Inflammation*. 2013 Feb;36(1):251-7. doi: 10.1007/s10753-012-9541-7. PMID: 22956123.
369. Khaghanzadeh N, Naderi N, Pournasrollah N, Farahbakhsh E, Kheirandish M, Samiei A. TLR4 Polymorphisms (896A>G and 1196C>T) Affect the Predisposition to Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020 Apr 3;13:1015-1021. doi: 10.2147/DMSO.S238942. PMID: 32308451; PMCID: PMC7138628.
370. Zhang Y, Li H, Wang C, Lv H, Fu S. Toll like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism increases the risk of diabetic microvascular complications: a meta analysis. *Diabetol Metab Syndr*. 2022 Jun 7;14(1):79. doi: 10.1186/s13098-022-00849-2. PMID: 35672795; PMCID: PMC9172045.
371. Zhao Y, Li M, Wu W, Miao W, Liu H. Downregulated ESRP1/2 promotes lung metastasis of bladder carcinoma through altering FGFR2 splicing and macrophage polarization. *Front Immunol*. 2023 Apr 5;14:1161273. doi: 10.3389/fimmu.2023.1161273. PMID: 37090731; PMCID: PMC10113678.
372. Cui J, Ren P, Li Y, Ma Y, Wang J, Lin C, Jing L, Tong X, Ma S, Chen J. ESRP1 as a prognostic factor of non-small-cell lung cancer is related to the EMT transcription factor of Twist. *Thorac Cancer*. 2021 Sep;12(18):2449-2457. doi: 10.1111/1759-7714.14088. Epub 2021 Aug 2. PMID: 34342121; PMCID: PMC8447917.
373. Del Río-Moreno M, Luque RM, Rangel-Zúñiga OA, Alors-Pérez E, Alcalá-Díaz JF, Roncero-Ramos I, Camargo A, Gahete MD, López-Miranda J, Castaño JP. Dietary Intervention Modulates the Expression of Splicing Machinery in Cardiovascular Patients at High Risk of Type 2 Diabetes Development: From the CORDIOPREV Study. *Nutrients*. 2020 Nov 17;12(11):3528. doi: 10.3390/nu12113528. PMID: 33212780; PMCID: PMC7696699.
374. Herrero-Aguayo V, Jiménez-Vacas JM, Sáez-Martínez P, Gómez-Gómez E, López-Cánovas JL, Garrido-Sánchez L, Herrera-Martínez AD, García-Bermejo L, Macías-González M, López-Miranda J, Castaño JP, Gahete MD, Luque RM. Influence of Obesity in the miRNome: miR-4454, a Key Regulator of Insulin Response Via Splicing Modulation in Prostate. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021 Jan 23;106(2):e469-e484. doi: 10.1210/clinem/dgaa580. PMID: 32841353.
375. Yang Y, Luan Y, Feng Q, Chen X, Qin B, Ren KD, Luan Y. Epigenetics and Beyond: Targeting Histone Methylation to Treat Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Pharmacol*. 2022 Jan 11;12:807413. doi: 10.3389/fphar.2021.807413. PMID: 35087408; PMCID: PMC8788853.
376. Labbé RM, Holowatyj A, Yang ZQ. Histone lysine demethylase (KDM) subfamily 4: structures, functions and therapeutic potential. *Am J Transl Res*. 2013 Dec 1;6(1):1-15. PMID: 24349617; PMCID: PMC3853420.
377. Claycombe-Larson KJ, Bundy A, Lance EB, Darland DC, Casperson SL, Roemmich JN. Postnatal exercise protects offspring from high-fat diet-induced reductions in subcutaneous adipocyte beiging in C57Bl6/J mice. *J Nutr Biochem*. 2022 Jan;99:108853. doi: 10.1016/j.jnutbio.2021.108853. Epub 2021 Sep 11. PMID: 34517093; PMCID: PMC9040048.
378. Li J, Ye Q, Jiao H, Wang W, Zhang K, Chen C, Zhang Y, Feng S, Wang X, Chen Y, Gao H, Wei F, Li WD. An early prediction model for type 2 diabetes mellitus based on genetic variants and nongenetic risk factors in a Han Chinese cohort. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Oct 25;14:1279450. doi: 10.3389/fendo.2023.1279450. PMID: 37955008; PMCID: PMC10634500.
379. Liu XY, Li H. Reduced Histone H3 Lysine 9 Methylation Contributes to the Pathogenesis of Latent Autoimmune Diabetes in Adults via Regulation of SUV39H2 and KDM4C. *J Diabetes Res*. 2017;2017:8365762. doi: 10.1155/2017/8365762. Epub 2017 Mar 15. PMID: 28396876; PMCID: PMC5370514.
380. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC). Design, implementation, and preliminary results of a long-term follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial cohort. *Diabetes Care*. 1999 Jan;22(1):99-111. doi: 10.2337/diacare.22.1.99. PMID: 10333910; PMCID: PMC2745938.

381. Nathan DM; DCCT/EDIC Research Group. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes Care*. 2014;37(1):9-16. doi: 10.2337/dc13-2112. PMID: 24356592; PMCID: PMC3867999.
382. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008 Oct 9;359(15):1577-89. doi: 10.1056/NEJMoa0806470. Epub 2008 Sep 10. PMID: 18784090.
383. Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH, Pedersen O. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008 Feb 7;358(6):580-91. doi: 10.1056/NEJMoa0706245. PMID: 18256393.
384. Testa R, Bonfigli AR, Prattichizzo F, La Sala L, De Nigris V, Ceriello A. The "Metabolic Memory" Theory and the Early Treatment of Hyperglycemia in Prevention of Diabetic Complications. *Nutrients*. 2017 Apr 28;9(5):437. doi: 10.3390/nu9050437. PMID: 28452927; PMCID: PMC5452167.
385. Hammes HP, Klinzing I, Wiegand S, Bretzel RG, Cohen AM, Federlin K. Islet transplantation inhibits diabetic retinopathy in the sucrose-fed diabetic Cohen rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993 May;34(6):2092-6. PMID: 8491559.
386. Wegner M, Neddermann D, Piorunski-Stolzmann M, Jagodzinski PP. Role of epigenetic mechanisms in the development of chronic complications of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014 Aug;105(2):164-75. doi: 10.1016/j.diabres.2014.03.019. Epub 2014 Apr 2. PMID: 24814876.
387. Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C, Balcerzyk A, George P, Baker EK, Calkin AC, Brownlee M, Cooper ME, El-Osta A. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. *Diabetes*. 2009 May;58(5):1229-36. doi: 10.2337/db08-1666. Epub 2009 Feb 10. PMID: 19208907; PMCID: PMC2671038.
388. Reddy MA, Natarajan R. Role of epigenetic mechanisms in the vascular complications of diabetes. *Subcell Biochem*. 2013;61:435-54. doi: 10.1007/978-94-007-4525-4_19. PMID: 23150262; PMCID: PMC6684114.
389. Al-Haddad R, Karnib N, Assaad RA, Bilen Y, Emmanuel N, Ghanem A, Younes J, Zibara V, Stephan JS, Sleiman SF. Epigenetic changes in diabetes. *Neurosci Lett*. 2016 Jun 20;625:64-9. doi: 10.1016/j.neulet.2016.04.046. Epub 2016 Apr 27. PMID: 27130819.
390. Colantonio JR, Vermot J, Wu D, Langenbacher AD, Fraser S, Chen JN, Hill KL. The dynein regulatory complex is required for ciliary motility and otolith biogenesis in the inner ear. *Nature*. 2009 Jan 8;457(7226):205-9. doi: 10.1038/nature07520. Epub 2008 Nov 30. PMID: 19043402; PMCID: PMC3821763.
391. Patoughi M, Ghafouri-Fard S, Arsang-Jang S, Taheri M. GAS8 and its naturally occurring antisense RNA as biomarkers in multiple sclerosis. *Immunobiology*. 2019 Jul;224(4):560-564. doi: 10.1016/j.imbio.2019.04.005. Epub 2019 Apr 13. PMID: 31003831.
392. Li G, Zhang T, Huang K, Zhu Y, Xu K, Gu J, Huang S, Gu C, Zhan R, Shen J. Long noncoding RNA GAS8-AS1: A novel biomarker in human diseases. *Biomed Pharmacother*. 2021 Jul;139:111572. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111572. Epub 2021 Apr 7. PMID: 33838502.
393. VanderJagt TA, Neugebauer MH, Morgan M, Bowden DW, Shah VO. Epigenetic profiles of pre-diabetes transitioning to type 2 diabetes and nephropathy. *World J Diabetes*. 2015 Aug 10;6(9):1113-21. doi: 10.4239/wjd.v6.i9.1113. PMID: 26265998; PMCID: PMC4530325.
394. Derks S, Lentjes MH, Hellebrekers DM, de Bruïne AP, Herman JG, van Engeland M. Methylation-specific PCR unraveled. *Cell Oncol*. 2004;26(5-6):291-9. doi: 10.1155/2004/370301. PMID: 15623939; PMCID: PMC4611123.