

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 314**

51 Int. Cl.:

A61K 31/07	(2006.01) A61K 33/04	(2006.01)
A61K 31/197	(2006.01) A61K 33/32	(2006.01)
A61K 31/375	(2006.01) A61K 33/34	(2006.01)
A61K 31/4188	(2006.01) A61P 3/08	(2006.01)
A61K 31/4415	(2006.01) A61P 3/10	(2006.01)
A61K 31/455	(2006.01) A23L 33/00	(2006.01)
A61K 31/51	(2006.01) A23L 33/10	(2006.01)
A61K 31/519	(2006.01) A23L 33/115	(2006.01)
A61K 31/525	(2006.01)	
A61K 31/70	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2017** **PCT/US2017/017982**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.08.2017** **WO17142952**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2017** **E 17753758 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024** **EP 3416500**

54 Título: **Combinaciones de fármacos y métodos para estimular una regeneración similar a la embrionaria para tratar la diabetes**

30 Prioridad:

15.02.2016 US 201662295422 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA
(100.0%)
1150 South Olive Street, Suite 2300
Los Angeles, CA 90015, US**

72 Inventor/es:

**LONGO, VALTER D. y
BUONO, ROBERTA**

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 970 314 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Combinaciones de fármacos y métodos para estimular una regeneración similar a la embrionaria para tratar la diabetes

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º de serie 62/295.422, presentada el 15 de febrero de 2016.

Declaración con respecto a la investigación o el desarrollo con fondos federales

La invención se realizó con el apoyo del gobierno con el contrato n.º P01 AG034906 otorgada por el Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos. El gobierno posee determinados derechos sobre la invención.

Campo técnico

La presente invención, en general, se refiere a composiciones y métodos para: a) regenerar las células pancreáticas, 2) tratar la diabetes. En particular, la presente invención promueve la regeneración de las células β pancreáticas y puede usarse para tratar la diabetes y otros trastornos en los que la regeneración celular y tisular puede conducir a una reversión del fenotipo de la enfermedad.

Antecedentes

La capacidad de los animales para sobrevivir a la privación de alimentos es una respuesta adaptativa acompañada de la atrofia de muchos tejidos y órganos para minimizar el gasto calórico. Esta atrofia y su reversión tras el retorno a una dieta normal implica una regeneración basada en células madre en los sistemas hematopoyético y nervioso (Brandhorst *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2014). Sin embargo, se desconoce si el ayuno y la realimentación prolongados también pueden causar la regeneración pancreática y/o la reprogramación celular que conducen al desarrollo de un linaje funcional. Las células β que residen en los islotes pancreáticos se encuentran entre las más sensibles a la disponibilidad de nutrientes. Mientras que la diabetes de tipo 1 y tipo 2 (DT1 y T2D) se caracterizan por una desdiferenciación y transdiferenciación de las células β (Cnop *et al.*, 2005; Dor y Glaser, Talchai *et al.*, 2012; Wang *et al.*), se ha propuesto la reprogramación, proliferación y/o rediferenciación gradual de células β a partir de células pluripotentes como intervenciones terapéuticas (Baeyens *et al.*, 2014; Chera *et al.*, 2014; Maehr *et al.*, 2009; Pagliuca *et al.*, 2014; Sneddon *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2008), lo que sugiere que la conversión de linaje es fundamental tanto en la patogénesis como en la terapia de la diabetes (Weir *et al.*, 2013).

Aunque la intervención dietética con potencial para aliviar la resistencia a la insulina y la diabetes de tipo II se ha estudiado ampliamente durante décadas, aún se desconoce si estos tienen el potencial de promover una reprogramación de linaje semejante a la lograda por la ingeniería basada en CMPI. Anteriormente hemos mostrado que los ciclos de ayuno prolongado (2-3 días) pueden proteger a ratones y seres humanos de la toxicidad asociada a la quimioterapia y promover la regeneración dependiente de células madre hematopoyéticas (Cheng *et al.*, 2014; Laviano y Rossi Fanelli; Piran *et al.*, 2014; Raffaghello *et al.*, 2008).

El documento US2015/004280 A1 divulga una dieta que proporciona menos de 30 g de azúcar el día 1, menos de 28 g de proteínas el día 1, 20-30 g de grasas monosaturadas el día 1, 6-10 g de grasas poliinsaturadas el día 1 y menos de 12 g de grasas saturadas el día 1, menos de 20 g de azúcar los días 2-5, menos de 18 g de proteínas los días 2 a 5, 10-15 g de grasas monoinsaturadas los días 2 a 5, 3-5 g de grasas poliinsaturadas los días 2 a 5 y menos de 6 g de grasas saturadas los días 2-5. Esta dieta se puede utilizar para aliviar los síntomas o tratar el daño a las células beta pancreáticas en un sujeto. Al sujeto no se le administra un inhibidor de PKA ni de Tor.

En consecuencia, existe una necesidad continua de métodos para promover la regeneración celular.

Sumario

Teniendo en cuenta los problemas y efectos secundarios asociados con el ayuno prolongado en seres humanos, la presente invención proporciona un paquete de dieta que comprende un primer conjunto de raciones de una primera composición de dieta para administrar durante un periodo de tiempo predeterminado de 5 días, a un sujeto; proporcionando dicha primera composición de dieta: menos de 40 gramos de azúcar el día 1; menos de 30 gramos de azúcar los días 2 a 5 y los días restantes; 20-100 gramos de grasas monoinsaturadas el día 1; 6-30 gramos de grasas poliinsaturadas el día 1; 2-12 gramos de grasas saturadas el día 1; 10-50 gramos de grasas monoinsaturadas los días 2 a 5 y los días restantes; 3-15 gramos de grasas poliinsaturadas los días 2 a 5 y los días restantes; 1-30 gramos de grasas saturadas los días 2 a 5, o los días restantes; y una composición de micronutrientes cada día y los días restantes; dicho sujeto es un sujeto diabético con DT1 y además se le administra durante dicho periodo de tiempo predeterminado un inhibidor de PKA y/o de Tor; para su uso para tratar la diabetes DT1 como agente promotor de la regeneración de las células β pancreáticas.

El inhibidor de Tor puede ser rapamicina.

- 5 El inhibidor de PKA o Tor puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo, un antagonista o una molécula pequeña que bloquea el IGF-1R, rapamicina que inhibe la mTor, H89 que inhibe la PKA y combinaciones de los mismos.

Según una realización, el paquete de dieta comprende:

- 10 - una sopa de champiñones que contiene harina de arroz, zanahoria en polvo, cebolla seca, champiñones en polvo, inulina, champiñones secos, sal, extracto de levadura, almidón de patata, aceite de oliva, perejil seco, aromas naturales;
- 15 - una sopa de verduras que contiene harina de arroz, cebolla seca, inulina, tomate seco, zanahoria seca, sal, pimiento rojo seco, puerro seco, almidón de patata, aceite de oliva, albahaca liofilizada, espinacas en polvo, perejil seco, aromas naturales;
- 20 - una sopa de tomate que contiene harina de arroz, tomate seco en polvo, cebolla seca, trozos de tomate seco, zanahoria seca, fibra de achicoria, almidón de patata, aceite de oliva, sal, extracto de levadura, albahaca seca, perejil seco, aromas naturales;
- 25 - una sopa de calabaza que contiene calabaza en polvo, harina de arroz, inulina, zanahoria seca, sal, extracto de levadura, almidón de patata, aceite de oliva, cebolla seca, perejil seco, aromas naturales.
- una barrita energética que contiene harina de almendras, manteca de nuez de macadamia, miel, pacanas, coco, harina de linaza, aceite de coco, extracto de vainilla, sal marina.
- galletas de col rizada que contienen col rizada, semillas de lino amarillo, semillas de girasol, anacardos, semillas de sésamo, levadura nutricional, vinagre de sidra de manzana, semillas de cáñamo, semillas de calabaza, sal marina, cebolla en polvo, eneldo, pimienta negra;
- 30 - una cápsula de aceite de algas que contiene aceite de algas, gelatina, glicerina, agua purificada, cúrcuma, extracto de bija;
- infusiones que contienen manzanilla, hierbabuena o limón;
- una bebida energética que contiene agua purificada, glicerina vegetal natural, polilisina; y
- 35 - suplementos que contienen vitamina A en forma de betacaroteno, vitamina C, vitamina D en forma de colecalciferol, vitamina E en forma de acetato de dl-alfa tocoferol, vitamina K en forma de fitonadiona, tiamina en forma de mononitrato de tiamina, riboflavina, niacina en forma de niacinamida, vitamina B6 en forma de piridoxina HCl, ácido fólico, vitamina B12 en forma de cianocobalamina, biotina, ácido pantoténico en forma de d-pantotenato de calcio, calcio en forma de carbonato cálcico y fosfato cálcico tribásico, hierro en forma de fumarato ferroso, fósforo en forma de fosfato cálcico tribásico, yodo en forma de yodo potásico, magnesio en forma de óxido de magnesio, óxido de zinc, selenio en forma de selenato de sodio, cobre en forma de sulfato cúprico, manganeso en forma de sulfato de manganeso, cromo en forma de picolinato de cromo, molibdeno en forma de molibdato de sodio y una mezcla de remolacha en polvo, espinacas en polvo, tomates en polvo, zanahorias en polvo, berzas en polvo, berzas en forma de col rizada en polvo, otros ingredientes: ácido esteárico, celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, croscarmelosa sódica, estearato de magnesio, dióxido de silicio, esmalte farmacéutico.
- 40

Descripciones de los dibujos

- 45 FIGURAS 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I y 1J. Los ciclos de FMD promueven la regeneración de las células β y reversion la insuficiencia de las células β en la DT2. (A) Esquema experimental para determinar los efectos de la FMD periódica sobre la DT2 en los ratones deficientes en receptor de leptina ($Lepr^{db/db}$). Se supervisaron los ratones para detectar hiperglucemia e insulinemia durante dos semanas (valor inicial, VI) y después se distribuyeron a los grupos dietéticos. Cada ciclo de FMD contiene 4 días de FMD y hasta 10 días de realimentación (RF). Durante la realimentación, los ratones recibieron comida regular idéntica a la que se les daba antes de la FMD y a la que se les da constantemente a los controles a voluntad (AV). (B) Niveles de glucosa en plasma y (C) Niveles de insulina en plasma; las líneas discontinuas verticales indican cada ciclo de FMD y las líneas horizontales indican el intervalo de niveles de glucosa (media $\pm$ e.e.m.) en compañeros de camada de referencia, sanos, de la misma edad. Se recogieron muestras de sangre el último día de realimentación/1^{er} día de los ciclos indicados. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 6 horas (ayuno matutino) para realizar mediciones de glucosa en sangre. (D) Evaluación del modelo homeostático (HOMA) de insulinoresistencia (IR) y función de las células β en estado estacionario (% B) en los momentos indicados. $HOMA-B = (20 \times \text{insulina en ayunas}) / (\text{glucosa en ayunas} - 3,5) \%$. (E) Prueba de tolerancia a la glucosa y prueba de tolerancia a la insulina el día 60. (F) Curva de supervivencia. Media $\pm$ e.e.m., * $p < 0,05$, prueba de tendencia del orden logarítmico (Mantel-Cox). $n \geq 16$ ratones por grupo; para (B-E), cada punto representa la media $\pm$ e.e.m.; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, ANOVA bidireccional. (G) Proporción de células β por islote. (H) Proporción proliferativa de células β por islote. Para (G a I), media $\pm$ e.e.m., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, ANOVA unidireccional. (I) Inmunotinción en secciones pancreáticas de ratones $Lepr^{db/db}$ y sus compañeros de camada de referencia en los momentos indicados. La flecha en la imagen ilustrativa ampliada 8x indica una célula β proliferativa típica ($PCNA^{+}Insulina^{+}$). La barra de escala representa 50 μ m. (J) Imágenes representativas de islotes del mismo tamaño aislados de ratones AV-dbdb y FMD-dbdb y
- 60

resultados de la prueba de secreción de insulina estimulada por glucosa (SIEG) en islotes aislados de ratones $Lepr^{db/db}$ con FMD o alimentados a voluntad. La barra de escala representa 50 μ m. Los ratones son de la línea C57BL/6J, con la edad indicada en (A), no recibieron tratamientos adicionales además de la dieta indicada. Para (F-J), cada punto representa la media $\pm$ e.e.m.; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, ANOVA bidireccional. $n \geq 6$ ratones por grupo, $n \geq 15$ islotes por muestra.

FIGURAS 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F y 2G. Los ciclos de FMD revierten el agotamiento de las células β inducido por STZ y restauran la homeostasis de la glucosa. (A) Esquema experimental de los efectos de la FMD periódica sobre la DT1 inducida por STZ; Se realizaron mediciones de los valores iniciales (VI) el día 5 después del tratamiento con STZ. (B) Niveles de glucosa en ayunas y (C) Niveles de insulina plasmática durante y 55 días después de los ciclos de FMD (d5 a d35); las líneas discontinuas verticales indican cada ciclo de FMD; las líneas horizontales (125 ± 12 mg/dl) indican los niveles de glucosa en sangre en los ratones de control sin tratamiento previo. (D) Prueba de tolerancia a la glucosa en el d50. (E) Perfil de citocinas de ratones tratados con STZ o STZ+FMD en el d30, en comparación con el control sin tratamiento previo. Se analizaron muestras de páncreas recogidas en los momentos indicados para detectar: (F) Proporción de proliferación en células β y proporción de células β productoras de insulina por islote y (G) Microfotografías representativas con inmunotinción de insulina, glucagón y DAPI en secciones de páncreas de ratones tratados con STZ o STZ + FMD en los momentos indicados. La barra de escala representa 50 μ m. Los ratones son de la línea C57BL/6J, a la edad de 3-6 meses, recibieron tratamientos de STZ (150 mg/kg) como se indica en (A). Para (B-G), cada punto representa la media $\pm$ e.e.m. y el tamaño de la muestra (n) se indica entre paréntesis y para (F y G), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, ANOVA unidireccional. Ctrl, control sin tratamiento con STZ; VI STZ, nivel inicial de los ratones tratados con STZ el día 5. $n \geq 6$ ratones por grupo por punto temporal, $n \geq 15$ islotes por ratón.

FIGURAS 3A, 3B, 3C, 3D y 3E. La FMD y la realimentación posterior a la FMD promueven la proliferación y regeneración de las células β . (A) Tamaño y número de islotes pancreáticos por sección pancreática. (B) Proporción proliferativa de células β y proporción de células β por islote. (C) Imágenes representativas de islotes pancreáticos con inmunotinción de insulina, glucagón y PCNA. (D) Población de células de transición que coexpresan los marcadores de células α y β : Proporción de células α y células $Pdx1^+ \alpha$. (E) Esquema de los cambios celulares inducidos por la FMD y la realimentación posterior a FMD en los islotes pancreáticos. Los ratones son de línea C57BL/6J, a la edad de 3-6 meses, no recibieron tratamientos adicionales además de la dieta indicada. Se recogieron muestras de páncreas de ratones alimentados a voluntad (AV) o con una dieta que imita el ayuno (FMD) en los momentos indicados: el final de 4d de FMD (FMD), 1 día después de la realimentación (RF1d) y 3 días después de la realimentación (RF3d); para análisis inmunohistoquímico y morfométrico (A a E): $n \geq 6$ ratones por grupo, $n \geq 30$ islotes por tinción por punto temporal. Media $\pm$ e.e.m., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, ANOVA unidireccional. $p < 0,05$, prueba de la t.

FIGURAS 4A, 4B, 4C y 4D. El ayuno que imita la dieta (FMD) inicia la reprogramación metabólica en los islotes pancreáticos y redirige gradualmente el desarrollo de células β en ratones adultos. (A) perfil de expresión de ARNm que indica cambios de genes metabólicos en islotes pancreáticos y (B) perfil de expresión de ARNm que indica cambios en marcadores de linaje en islotes pancreáticos, al final de 4d de FMD (FMD) y 1d después de la realimentación (RF1d), comparando el control a voluntad (AV); * $p < 0,05$. Prueba de la t. Matriz cromática generada por matriz de PCR Qiagen RT² que indica un factor de regulación que oscila entre 77 (máximo, rojo) y -4 (mínimo, verde). (C) Cuantificación de células que expresan proteínas de marcadores de linaje en islotes pancreáticos, de ratones alimentados AV o con FMD en los momentos indicados. La expresión de proteínas se definió como un área de marcador/área total de islotes. Véase también la figura 13B * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$. Prueba de la t que compara con el control AV. (D) Imágenes representativas de tinción inmunofluorescente que indican la transición gradual de Sox17/Pdx1 y Pdx1/Ngn3. La barra de escala representa 50 μ m. Los ratones son de línea C57BL/6J, a la edad de 3-6 meses, no recibieron tratamientos adicionales además de la dieta indicada. Se recogieron muestras de páncreas de ratones alimentados a voluntad (AV) o con una dieta que imita el ayuno (FMD) en los momentos indicados: el final de 4d de FMD (FMD), 1 día después de la realimentación (RF1d) y 3 días después de la realimentación (RF3d); $n = 6$ ratones por grupo, $n \geq 30$ islotes por marcador.

FIGURAS 5A, 5B, 5C, 5D, 5E, 5F y 5G. La FMD promueve la reprogramación del linaje dependiente de Ngn3 para generar células β productoras de insulina. (A) Estrategia genética utilizada para realizar el rastreo de linaje (tdTomato) de células que expresan NGN3 en el páncreas y línea temporal esquemática de los tratamientos con tamoxifeno (TAM) para experimentos de rastreo de linaje. A, se trataron ratones alimentados a voluntad con TAM; B, ratones que recibieron FMD 3 días después de la inyección de TAM; C, ratones que recibieron TAM y FMD simultáneamente y D, ratones que recibieron FMD y vehículo (aceite de maíz) simultáneamente. Se recolectaron tejidos pancreáticos 11 días después de la inyección de TAM para analizar los efectos de la FMD en la generación del linaje Ngn3. Las células tdTomato+ (rojo, flechas) son células procedentes de Ngn3; $n = 6$ para cada grupo. (B) Imágenes representativas de las células del linaje Ngn3 marcadas (rojo, tdTomato) y de las células β productoras de insulina (verde, Ins) en los momentos indicados en los islotes pancreáticos. Panel izquierdo, la barra de escala representa 200 μ m; panel derecho, la barra de escala representa 100 μ m. (C) Cuantificación del total de células del linaje Ngn3 marcadas con tdTomato por islote (arriba) y proporción de células β productoras de insulina

- marcadas (ins+tdTomato+) (abajo). Media $\pm$ e.e.m., ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, prueba de la t. (D) Estrategia genética utilizada para realizar la ablación del linaje Ngn3 mediada por la cadena A (DTA) del gen de la toxina diftérica en el páncreas y línea de tiempo esquemática de los tratamientos con tamoxifeno (TAM) para experimentos de ablación del linaje (izquierda) y resultados de la homeostasis de la glucosa (derecha). A los ratones se les inyectó TAM antes y después de la FMD, para extirpar el linaje Ngn3 desarrollado y/o expandido durante la FMD y la realimentación temprana (RF3d). Como alternativa, a los ratones se les administró una inyección adicional de STZ y, a continuación, se distribuyeron en los grupos dietéticos indicados (es decir, AV+STZ o FMD+STZ), para analizar la contribución de la conversión de células β inducida por la FMD a la homeostasis de la glucosa. (E) Imágenes representativas de islotes pancreáticos con inmunotinción de insulina y Pdx1 para células β , DAPI para núcleos. Véase también la figura 13 para ver las imágenes de controles de vehículo. La barra de escala representa 50 μ m. (F) Cuantificación de células β productoras de insulina de ratones con ablación del linaje Ngn3 de los grupos indicados. Media $\pm$ e.e.m., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ prueba de la t, (arriba) prueba de la t para datos emparejados (abajo). $n=6$ para TAM y STZ, $n=3$ para controles de vehículos. (G) Niveles de glucosa en homeostasis y pruebas de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) de los grupos indicados. Media $\pm$ e.e.m., ** $p < 0,01$ prueba de la t, (arriba) prueba de la t para datos emparejados (abajo). $n=6$ para TAM y STZ, $n=3$ para controles de vehículos. Para (A) a (C), los ratones son línea mixta ICR y B6;129S6, a la edad de 3-6 meses, recibieron los tratamientos de dieta y/o STZ indicados en (A). Para (D) a (G), los ratones son línea mixta ICR y B6;129S6, a la edad de 3-6 meses, recibieron los tratamientos de dieta y/o STZ indicados en (D).
- FIGURAS 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6F, 6G, 6H, 6I, 6J y 6K. Expresión de Ngn3 y función productora de insulina de los islotes pancreáticos humanos en respuesta a condiciones de ayuno. (A) Esquema experimental para tratamientos de acondicionamiento en ayunas en islotes pancreáticos humanos. Los islotes pancreáticos de sujetos humanos sanos (IS) y de sujetos con DT1 (IDT1) se cultivaron por separado según las instrucciones del fabricante y después se trataron con condiciones de ayuno (es decir, medios STS, inhibidores de mTOR y PKA y ARNip de PKA) o medios de control durante 36 horas. (B) Niveles de hIGF-1, glucosa, insulina y cuerpos cetónicos en el suero de sujetos humanos, antes (valor inicial) y después de recibir FMD (FMD). $n=5$ por grupo. (C) Capacidad de secreción de insulina de IS e IDT1 pretratados con medio acondicionado de inanición a corto plazo (STS) (2 % de FBS y 0,5 g/l de glucosa) y después inducidos con glucosa 25 mM, en comparación con el cultivado en medio estándar (STD). $n=3$ por grupo. (D) Expresión de Sox2 y (E) Ngn3 de IS e IDT1 pretratados con medio acondicionado con STS con o sin administración de IGF-1 (40 ng/ml). $n=6$ por grupo. (F) Cuantificación de la inmunotinción para la expresión de la proteína Ngn3 en IS e IDT1. $n=5$ por grupo. La barra de escala representa 100 μ m. (G) Expresión del gen de la insulina, (H) actividades de PKA y (I) actividades de mTOR en IS e IDT1 pretratados con medio acondicionado con STS con o sin administración de IGF-1 (40 ng/ml); se utilizó la relación de p70S6K fosforilada frente a la total como indicador de las actividades de mTOR que se normalizó a los niveles de STD (medio estándar); $n=6$ por grupo. (J y K) expresión de marcadores de linaje (Sox2 y Ngn3) de IS e IDT1 tratados con inhibidores que amortiguan las señales de IGF-1; rapamicina, inhibidor de mTOR; H89, inhibidor de PKA y ARNip de PKA. Media $\pm$ e.e.m., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, prueba de la t para datos independientes.
- La FIGURA 7 es la tabla 2 que proporciona el perfil de los sujetos humanos, relacionada con los métodos STAR y la figura 6.
- La FIGURA 8 es la tabla 3 que proporciona los ingredientes de la FMD de ratón, relacionada con los métodos STAR.
- FIGURAS 9A, 9B, 9C y 9D. S1, Métodos STAR relacionados "Dieta FMD": efectos metabólicos de la FMD y la inanición a corto plazo (STS) en (A) los pesos corporales con relación de masa magra y grasa antes de, después de STS o FMD y 3 días después de la realimentación. (B) Consumo de agua, consumo de alimentos (kcal/día), movimiento total y VCO₂A/O₂ antes, durante y después de la STS y (C) después de la FMD. (D) Niveles de insulina circulante y cuerpos cetónicos (β -HB) en ratones con FMD y realimentación posterior a la FMD, en comparación con el de ratones en ayunas prolongadas (24, 36 y 60 h). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$, prueba de la t.
- FIGURAS 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, 10F y 10G. S2, relacionado con la figura 1 y los métodos STAR. Efectos de la FMD en ratones Lepr^{db/db}. (A) Números del tipo celular indicado por islote, (B) Frecuencia de proliferación del tipo celular indicado por islote, (C) Peso corporal y (D) Frecuencia y números de proliferación y (E) imagen ilustrativa de células no productoras de insulina/glucagón (no- α/β) y células Pdx1⁺ α . (F) Niveles de insulina circulante durante IPGTT. (G) Ilustración del muestreo de islotes pancreáticos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, ANOVA unidireccional
- FIGURAS 11A, 11B, 11C, 11D, 11E y 11F, en relación con la figura 2. Efectos de los ciclos de FMD en ratones tratados con STZ. (A) peso corporal, un ciclo de FMD (B) Número de tipos de células indicados por islote, (C) Frecuencia de proliferación del tipo celular indicado por islote, (D) Frecuencia de proliferación de células α y número de células Pdx1⁺ α por islote y (E) Frecuencia de proliferación y número de células no productoras de insulina/glucagón (no- α/β) y (F) Niveles de citocinas circulantes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, prueba de la t.

FIGURAS 12A, 12B, 12C, 12D, 12E, 12F, 12G y 12H. En relación con la figura 3. Efectos de la FMD y la realimentación posterior a la FMD en ratones de referencia no diabéticos. (A) Número y área de islotes pancreáticos por sección de páncreas. (B) Números del tipo celular indicado por islote. (C) Proporción y (D) número de frecuencia de proliferación del tipo celular indicado por islote. (E) Número de células de transición Pdx1⁺α por islote, (F) Imágenes representativas de células de transición Pdx1⁺α. (G) Imágenes de microscopia confocal de planos z de células Gluc+ Ins+ (H) Frecuencia de proliferación y números de células no productoras de insulina/glucagón (no-a/b) en ratones de referencia sin tratamientos con STZ. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005, ANOVA unidireccional.

FIGURAS 13A, 13B y 13C, en relación con las figuras 4 y 5. Efectos de la FMD sobre la expresión de marcadores de desarrollo de células β en ratones adultos. (A) Factor de regulación de genes significativamente (*p<0,05) regulados al alza o a la baja por la FMD o RF1d en comparación con AV. Los valores de p se calculan basándose en una prueba de t de Student de los valores repetidos de 2^{Δ(-ΔCt)} para cada gen en el grupo de control y en los grupos de tratamiento. (B) Inmunotinción para la expresión de proteínas de marcadores de linaje en islotes pancreáticos. (C) línea temporal esquemática e imágenes representativas de los tratamientos con aceite de maíz (control de vehículo) para los experimentos de ablación del linaje Ngn3 que se muestran en la figura 5F.

FIGURAS 14A y 14B, en relación con la figura 6. (A) Expresión génica y (B) producción de insulina de islotes pancreáticos sanos (IS) y sujetos IDT1 tratados en forma de suero en los momentos indicados. ****p<0,0001, prueba de la t.

Descripción detallada

Ahora se hará referencia en detalle a las composiciones, realizaciones y métodos actualmente preferidos de la presente invención que constituyen los mejores modos de poner en práctica la invención actualmente conocidos por los inventores. Las figuras no están necesariamente a escala. Sin embargo, debe entenderse que las realizaciones divulgadas son simplemente ejemplos de la invención que puede realizarse de diversas formas alternativas. Por lo tanto, los detalles específicos divulgados en el presente documento no deben interpretarse como limitantes, sino simplemente como una base representativa para cualquier aspecto de la invención y/o como una base representativa para enseñar a un experto en la materia a emplear de diversas formas la presente invención.

Excepto en los ejemplos, o donde se indique expresamente otra cosa, todas las cantidades numéricas en la presente descripción que indican cantidades de material o condiciones de reacción y/o uso deben entenderse modificadas por la palabra "aproximadamente" al describir el alcance más amplio de la invención. Generalmente se prefiere la práctica dentro de los límites numéricos establecidos. Además, a menos que se indique expresamente otra cosa: el porcentaje, "partes de", y los valores de las relaciones son en peso; la descripción de un grupo o clase de materiales como adecuados o preferidos para un propósito dado en relación con la invención implica que las mezclas de dos o más cualesquiera de los miembros del grupo o clase son igualmente adecuadas o preferidas; la descripción de los componentes en términos químicos se refiere a los componentes en el momento de la adición a cualquier combinación especificada en la descripción y no excluye necesariamente las interacciones químicas entre los componentes de una mezcla una vez mezclada; la primera definición de un acrónimo u otra abreviatura se aplica a todos los usos posteriores en el presente documento de la misma abreviatura y se aplica, cambiando lo que corresponda, a variaciones gramaticales normales de la abreviatura definida inicialmente; y, a menos que se indique expresamente lo contrario, la medición de una propiedad se determina mediante la misma técnica a la que se ha hecho referencia anterior o posteriormente para la misma propiedad.

La expresión "que comprende" es sinónimo de "que incluye", "que tiene", "que contiene" o "caracterizado por". Estas expresiones son inclusivas y abiertas y no excluyen información elementos o etapas de métodos adicionales no mencionados.

La expresión "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación. Cuando esta expresión aparece en una oración del cuerpo de una reivindicación, en lugar de inmediatamente después del preámbulo, limita solo el elemento expuesto en dicha oración; sin excluir otros elementos de la reivindicación en su conjunto.

La expresión "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados, más aquellos que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de la materia objeto reivindicada.

También debe entenderse que la presente invención no se limita a las realizaciones y métodos específicos que se describen a continuación, ya que componentes y/o condiciones específicas pueden, por supuesto, variar. Asimismo, la terminología utilizada en el presente documento se utiliza únicamente con el propósito de describir realizaciones particulares de la presente invención y no se pretende que sea limitante de ninguna manera.

Además hay que señalar que, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, la forma

singular "un", "uno/a" y "el/la" comprenden referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, se entiende que la referencia a un componente en singular comprende una pluralidad de componentes.

- 5 Los términos "kilocaloría" (kcal) y "Caloría" se refieren a la caloría grande. El término "caloría" se refiere a la llamada caloría pequeña.

La expresión "dieta que imita el ayuno" (FMD, por sus siglas en inglés) significa una dieta que imita los efectos del ayuno normalmente al proporcionar a un sujeto como máximo el 50 % de su ingesta calórica normal pero con algún
10 componente nutricional para que el ayuno se imite mientras que el sujeto no está en estado de total inanición.

Se ha descubierto que la administración de la dieta que imita el ayuno y el inhibidor de PKA Tor alivia (es decir, trata) los síntomas de los sujetos a los que se ha diagnosticado diabetes de tipo 1. En algunas circunstancias, se ha descubierto que la administración de la dieta que imita el ayuno y/o el inhibidor de PKA y/o Tor alivia los síntomas de
15 (es decir, trata a) los sujetos identificados como beneficiarios o que necesitan promover la desdiferenciación y/o reprogramación de las células somáticas. En particular, se puede promover la desdiferenciación y/o reprogramación de las células gastrointestinales. En otras circunstancias, se ha descubierto que la administración de la dieta que imita el ayuno y el inhibidor de PKA y/o Tor alivia los síntomas de (es decir, trata a) los sujetos identificados como beneficiarios o que necesitan promover el rejuvenecimiento muscular asociado a la generación de células madre. En
20 otras circunstancias más, se ha descubierto que la administración de la dieta que imita el ayuno y/o el inhibidor de PKA y/o Tor alivia los síntomas de (es decir, trata a) los sujetos identificados como beneficiarios o que necesitan una disminución de la resistencia a la insulina. En otras circunstancias más, se ha descubierto que la administración de la dieta que imita el ayuno y/o el inhibidor de PKA y/o Tor alivia los síntomas de (es decir, trata a) los sujetos identificados como beneficiarios o que necesitan una reducción de la hiperglucemia.

En algunas variaciones, el paquete de dieta proporciona como máximo, en orden de preferencia creciente, el 50 %, el 40 %, el 30 % o el 100 % del aporte calórico normal del sujeto. En un ajuste, el paquete de dieta proporciona al menos, en orden de preferencia creciente, el 5 %, el 10 % o el 20 % del aporte calórico normal del sujeto. El aporte calórico normal del sujeto es el número de kcal que consume el sujeto para mantener su peso. El aporte calórico normal del
30 sujeto puede estimarse entrevistando al sujeto o considerando su peso. Como guía aproximada, el aporte calórico normal del sujeto es, en promedio, 2600 kcal/día para los hombres y 1850 kcal/día para las mujeres. En ciertos casos, el paquete de dieta proporciona al sujeto entre 700 y 1200 kcal/día. En un ajuste particularmente útil, el paquete de dieta proporciona a un hombre de peso medio como máximo 1100 kcal/día y a una mujer de peso medio como máximo 900 kcal/día. En algunos ajustes, el paquete de dieta proporciona como máximo, en orden de preferencia creciente,
35 1500 kcal/día, 1400 kcal/día, 1300 kcal/día, 1200 kcal/día, 1100 kcal/día, 1000 kcal/día, 900 kcal/día, 800 kcal/día, 700 kcal/día, 600 kcal/día, 500 kcal/día o 2500 kcal/día. En algunos ajustes adicionales, el paquete de dieta proporciona al menos, en orden de preferencia creciente, 0 kcal/día, 10 kcal/día, 100 kcal/día, 200 kcal/día, 300 kcal/día, 400 kcal/día o 500 kcal/día.

40 En determinadas variaciones, el paquete de dieta proporciona entre 4,5 y 7 kilocalorías por cada 0,45359237 kg (= 1 libra) de sujeto el primer día (día 1) y, a continuación, entre 3 y 5 kilocalorías por cada 0,45359237 kg (= 1 libra) de sujeto por día del segundo día al último día.

Las pautas de consumo para la FMD incluyen información nutricional con respecto a calorías, macronutrientes y
45 micronutrientes. Las calorías se consumen según el peso corporal del usuario. El consumo total de calorías es de 4,5-7 calorías por libra (o 10-16 calorías por kilogramo) el día 1 y de 3-5 calorías por libra (o 7-11 calorías por kilogramo) los días 2 a 5 y los días restantes. Para alcanzar el mayor consumo de calorías descrito anteriormente, que puede ser tan alto como un aporte calórico normal, se pueden utilizar partes iguales de las grasas descritas anteriormente y de fuentes de hidratos de carbono de origen vegetal (sopas y chips vegetales) descritas en otra parte de la patente. Se
50 espera que un paquete de dieta con calorías que varían entre un 50 % de restricción y lo normal sea eficaz, pero menos eficaz que la dieta restringida en un 50 % o más descrita en la presente solicitud.

El paquete de dieta puede incluir prácticamente cualquier fuente de grasa, pero las fuentes ricas en grasas insaturadas, incluidas fuentes de grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas, son particularmente útiles. Los ejemplos adecuados
55 de fuentes de alimentos monoinsaturados incluyen, pero sin limitación, mantequilla de cacahuete, aceitunas, frutos secos (por ejemplo, almendras, pacanas, nueces, pistachos, anacardos, nueces de macadamia), aguacate, semillas (por ejemplo, sésamo), aceites (por ejemplo, de oliva, de sésamo, de cacahuete, de colza), etc. Los ejemplos adecuados de fuentes de alimentos poliinsaturados incluyen, pero sin limitación, nueces, pipas (por ejemplo, de calabaza, de girasol), semilla de lino, pescado (por ejemplo, salmón, atún, caballa), aceites (por ejemplo, de cártamo, de soja, de maíz). La primera dieta también incluye un componente seleccionado del grupo que consiste en extractos
60 vegetales, minerales, ácidos grasos esenciales omega-3/6 y combinaciones de los mismos. En un ajuste, dicho extracto vegetal proporciona el equivalente a 5 porciones diarias recomendadas de verduras. Las fuentes adecuadas para el extracto vegetal incluyen, pero sin limitación, col china, col rizada, lechuga, espárrago, zanahoria, calabaza, alfalfa, guisante verde, tomate, col, coliflor, remolacha. Las fuentes adecuadas de ácidos grasos esenciales omega-

3/6 incluyen pescado, tal como el salmón, atún, caballa, anjova, pez espada y similares.

La tabla 1 proporciona un ejemplo de complementos de micronutrientes adicionales que se pueden proporcionar en el paquete de dieta:

5

Tabla 1. Complementos de micronutrientes

	Complemento	Fórmula	Cantidad	Intervalo de cantidades	Unidad
Vit A			1250 UI	900-1600	UI
Vit C	Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	15,0000	10-20	mg
Ca	Carbonato cálcico	CaCO ₃	80,0000	60-100	mg

(continuación)

	Complemento	Fórmula	Cantidad	Intervalo de cantidades	Unidad
Fe	Fumarato ferroso	C ₄ H ₂ FeO ₄	4,5000	3-6	mg
Vit D3	Colecalciferol	C ₂₇ H ₄₄ O	0,0025	0,001-0,005	mg
Vit E	Acetato de dl-alfa tocoferilo	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	5,0000	3-7	mg
Vit K	Fitonadiona		0,0200	0,1-0,04	mg
Vit B1	Mononitrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₄ S	0,3750	0,15-0,5	mg
Vit B2	Riboflavina E101	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	0,4250	0,2-0,6	mg
Vit B3	Niacinamida	C ₆ H ₆ N ₂ O	5,0000	3-7	mg
Vit B5	Pantotenato de calcio	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	2,5000	1,5-4,0	mg
Vit B6	Clorhidrato de piridoxina	C ₈ H ₁₁ NO ₃ · HCl	0,5000	0,3-0,7	mg
Vit B7	Biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0,0150	0,01-0,02	mg
Vit B9	Ácido fólico	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	0,1000	0,07-0,14	mg
Vit B12	Cianocobalamina	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	0,0015	0,001-0,002	mg
Cr	Picolinato de cromo	Cr(C ₆ H ₄ NO ₂) ₃	0,0174	0,014-0,022	mg
Cu	Sulfato cúprico	CuSO ₄	0,2500	0,18-0,32	mg
I	Yoduro de potasio	KI	0,0375	0,03-0,045	mg
Mg	Óxido de magnesio	MgO	26,0000	20-32	mg
Mn	Sulfato de manganeso	MnSO ₄	0,5000	0,3-0,7	mg
Mo	Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄	0,0188	0,014-0,023	mg
Se	Selenato de sodio	Na ₂ O ₄ Se	0,0175	0,014-0,023	mg
Zn	Óxido de zinc	ZnO	3,7500	3-5	mg

El paquete de dieta incluye un primer conjunto de raciones para una primera dieta que se administrará durante un periodo de tiempo predeterminado a un sujeto con una pauta de administración. En un ajuste, el paquete de dieta también incluye instrucciones para administrar la dieta que imita el ayuno de acuerdo con los métodos del presente documento y, en particular, instrucciones para administrar el paquete de dieta a un sujeto para promover la regeneración de células β pancreáticas y la reprogramación de células somáticas con las instrucciones que incluyen la pauta de administración.

15

En una variación, el paquete de dieta proporciona 0-3 kcal por kilogramo de peso corporal por cada día de dieta; menos de 5 gramos de azúcar por cada día de dieta; menos de 3 gramos de proteína por cada día de dieta; y menos de 2,5 gramos de grasas monoinsaturadas por cada día de dieta, menos de 1 gramo de grasas polinsaturadas por cada día de la dieta y menos de 1 gramo de grasas saturadas por cada día de dieta.

20

El primer conjunto de raciones también puede proporcionar 400-800 mg de calcio al día los días 1-5; 7,2-14,4 mg de hierro al día los días 1-5; 200-400 mg de magnesio al día los días 1-5; 1-2 mg de cobre al día los días 1-5; 1-2 mg de manganeso al día los días 1-5; y 3,5-7 mcg de selenio al día los días 1-5. En un ajuste, el primer conjunto de raciones proporciona 2-4 mg de vitamina B1 al día los días 1-5; 2-4 mg de vitamina B2 al día los días 1-5; 20-30 mg de vitamina B3 al día los días 1-5; 1-1,5 mg de vitamina B5 al día los días 1-5; 2-4 mg de vitamina B6 al día los días 1-5; 240-480 mcg de vitamina B9 al día los días 1-5; 600-1000 UI de vitamina D al día los días 1-5; 14-30 mg de vitamina E al día los días 1-5; más de 80 mcg de vitamina K al día los días 1-5; y se proporcionan 16-25 mcg de vitamina B12 durante el periodo de tiempo predeterminado. En un ajuste adicional, el primer conjunto de raciones proporciona 600 mg de ácido docosahexaenoico (DHA, procedente de algas) durante el periodo de tiempo predeterminado. En un

25

ajuste, el primer conjunto de raciones también proporciona un componente que contiene vitamina A en una cantidad de 900-1600 UI; ácido ascórbico en una cantidad de 10-20 mg; carbonato de calcio en una cantidad de 60-100 mg; fumarato ferroso en una cantidad de 3-6 mg; colecalfiferol en una cantidad de 0,001-0,005 mg; acetato de dl-alfa tocoferilo en una cantidad de 3-7 mg; fitonadiona en una cantidad de 0,1-0,04 mg; mononitrato de tiamina en una cantidad de 0,15-0,5 mg; riboflavina en una cantidad de 0,2-0,6 mg; y niacinamida en una cantidad de 3-7 mg. En un ajuste, el primer conjunto de raciones también proporciona un componente que contiene pantotenato de calcio en una cantidad de 1,5-4,0 mg; clorhidrato de piridoxina en una cantidad de 0,3-0,7 mg; biotina en una cantidad de 0,01-0,02 mg; ácido fólico en una cantidad de 0,07-0,14 mg; cianocobalamina en una cantidad de 0,001-0,002 mg; picolinato de cromo en una cantidad de 0,014-0,022 mg; sulfato cúprico en una cantidad de 0,18-0,32 mg; yoduro de potasio en una cantidad de 0,03-0,045 mg; óxido de magnesio en una cantidad de 20-32 mg; sulfato de manganeso de 0,3-0,7 mg; molibdato de sodio en una cantidad de 0,014-0,023 mg; selenato de sodio en una cantidad de 0,014-0,023 mg; y óxido de zinc en una cantidad de 3-5 mg.

En algunas variaciones, el paquete de dieta incluye un segundo conjunto de raciones para una segunda dieta que se administrará al sujeto durante un segundo periodo de tiempo. La segunda dieta proporciona un consumo total de calorías que está dentro del 10 por ciento del consumo normal de calorías de un sujeto durante 25 a 26 días después de la primera dieta. En particular, la segunda dieta proporciona los requisitos calóricos, alimentarios y nutricionales para la dieta normal de un sujeto como se ha establecido anteriormente.

En particular, se proporciona un paquete de dieta con determinados componentes de comida específicos para implementar una dieta que imita el ayuno en el método establecido en el presente documento. En un ajuste, el paquete de dieta también incluye instrucciones para administrar la dieta que imita el ayuno de acuerdo con los métodos del presente documento y, en particular, instrucciones para administrar el paquete de dieta a un sujeto para promover la regeneración de células β pancreáticas y la reprogramación de células somáticas con las instrucciones que incluyen la pauta de administración. En una variación, el paquete de dieta que imita el ayuno y su dieta que imita el ayuno asociada proporcionan porciones de comida diarias durante un número predeterminado de días establecidos anteriormente (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días). El paquete de dieta que imita el ayuno incluye una composición de galleta de col rizada, una primera composición de caldo de verduras, una composición de sopa de champiñones, una composición de sopa de tomate, una composición de sopa minestrone que contiene quinoa, una composición de sopa minestrone que contiene judías y una composición de sopa de calabaza. De manera característica, las porciones de comida diarias se empaquetan en raciones de comida o en una ración diaria total que se divide en comidas. En un ajuste, el paquete de dieta que imita el ayuno y su dieta que imita el ayuno asociada incluyen además una barrita nutritiva que contiene nueces, una barrita nutritiva que contiene cacao, una primera composición que contiene aceitunas, una primera composición de caldo de verduras, una composición de infusión que incluye hierbabuena, una composición de bebida energética, una composición micronutritiva y una composición de aceite de algas. En un ajuste adicional, el paquete de dieta que imita el ayuno y su dieta que imita el ayuno asociada incluyen además una segunda composición que contiene aceitunas, una segunda composición de caldo de verduras, una composición de infusión que incluye hierbabuena y limón y una composición de infusión que incluye hibisco. Hay que valorar que cada una de las composiciones de sopa, caldo, infusión y bebida energética expuestas en el presente documento están diseñadas para que se les añada agua a la hora de consumirlas.

En otra variación de un paquete de dieta que imita el ayuno, el paquete de dieta incluye una barrita nutritiva que contiene nueces, una barrita nutritiva que contiene cacao, una primera composición que contiene aceitunas, una composición de galleta de col rizada, una composición de sopa de verduras, una primera composición de caldo de verduras, una composición de infusión que incluye hierbabuena, una composición de bebida energética, una composición micronutritiva y una composición de aceite de algas. De manera característica, las porciones de comida diarias se empaquetan en raciones de comida o en una ración diaria total que se divide en comidas. Este paquete de dieta también incluye porciones de comida diarias durante un número predeterminado de días como se ha establecido anteriormente, con las porciones de comida diarias empaquetadas en raciones de comida o en una ración diaria total para dividir en comidas. En un ajuste, el paquete de dieta que imita el ayuno incluye además una composición de sopa de champiñones, una composición de sopa de tomate, una composición de sopa minestrone que contiene quinoa y una composición de sopa de calabaza. En un ajuste adicional, el paquete de dieta que imita el ayuno incluye además una segunda composición que contiene aceitunas, una segunda composición de caldo de verduras, una composición de sopa minestrone que contiene judías, una composición de infusión que incluye hierbabuena y limón y una composición de infusión que incluye hibisco.

Como se ha expuesto anteriormente, los paquetes de dieta que imitan el ayuno incluyen componentes de comida específicos que se administran para la dieta que imita el ayuno. Normalmente, las composiciones son las siguientes. La barrita nutritiva que contiene nueces incluye harina de almendras y nueces de macadamia. La barrita nutritiva que contiene cacao incluye mantequilla de almendra, almendras y arroz integral crujiente (por ejemplo, arroz integral inflado). La composición de la sopa de champiñones incluye arroz integral en polvo, zanahorias, inulina y champiñones. La composición de la sopa minestrone que contiene judías incluye judías blancas, col y patatas. La primera composición de caldo de verduras incluye zanahorias, maltodextrina, apio, espinacas y tomates. La segunda composición de caldo de verduras incluye zanahorias, maltodextrina, apio, espinaca, lecitina de soja y tomates. La

composición de la bebida energética incluye glicerina y agua. La composición de aceite de algas incluye aceite de algas de *Schizocatrium*. La composición de micronutrientes incluye remolacha en polvo, carbonato cálcico, zanahorias, hoja de berza, hoja de col rizada y tomates. En un ajuste, la composición de micronutrientes incluye vitamina A, vitamina C, Ca, Fe, vitamina D3, vitamina E, vitamina K, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B7, vitamina B9, vitamina B12, Cr, Cu, I, Mg, Mn, Mo, Se y Zn.

En un ajuste, la barrita nutritiva que contiene nueces (L-Bar Nut based) incluye harina de almendras y nueces de macadamia. En un ajuste, la barrita nutritiva que contiene nueces (L-Bar Nut based) incluye harina de almendras preferentemente en una cantidad del 20 al 35 % en peso; coco preferentemente en una cantidad del 2 al 10 % en peso; aceite de coco preferentemente en una cantidad del 1 al 8 % en peso; harina de semillas de lino preferentemente en una cantidad del 1 al 8 % en peso; miel preferentemente en una cantidad del 10 al 30 % en peso; nueces de macadamia preferentemente en una cantidad del 10 al 30 % en peso; pacanas preferentemente en una cantidad del 10 al 25 % en peso; sal preferentemente en una cantidad del 0,1 al 0,8 % en peso; y opcionalmente vainilla preferentemente en una cantidad del 0,3 al 1,5 % en peso.

En un ajuste, la barrita nutritiva que contiene cacao (L-Bar ChocoCrisp) incluye mantequilla de almendra, almendras y arroz integral crujiente (PGP10235). En un ajuste, la barrita nutritiva que contiene cacao (L-Bar ChocoCrisp) incluye mantequilla de almendra preferentemente en una cantidad del 10 al 25 % en peso; almendras preferentemente en una cantidad del 3 al 12 % en peso; arroz integral crujiente (PGP10235) preferentemente en una cantidad del 10 al 25 % en peso; sirope de arroz integral preferentemente en una cantidad del 2 al 8 % en peso; pasta de cacao preferentemente en una cantidad del 1 al 4 % en peso, manteca de cacao preferentemente en una cantidad del 0,4 al 1,6 % en peso; cacao en polvo preferentemente en una cantidad del 4 al 12 % en peso; sirope de fibra SF75 preferentemente en una cantidad del 18 al 38 % en peso, aceite de semillas de lino preferentemente en una cantidad del 1 al 3 % en peso; sal preferentemente en una cantidad del 0,1 al 0,4 % en peso y azúcar preferentemente en una cantidad del 1 al 6 % en peso.

En un ajuste, la primera composición que contiene aceitunas (versión con sal marina) incluye aceitunas, aceite de oliva y sal marina. En un ajuste, la primera composición que contiene aceitunas (sal marina) incluye ácido láctico preferentemente en una cantidad del 0,3 al 1 % en peso; aceite (de oliva) preferentemente en una cantidad del 2 al 6 % en peso; aceitunas (crudas, verdes, sin hueso) preferentemente en una cantidad del 50 al 97 % en peso; sal (reg., *kosher*, sal marina) preferentemente en una cantidad del 0,8 al 3 % en peso; y tomillo preferentemente en una cantidad del 0,1 al 0,5 % en peso.

En un ajuste, la segunda composición que contiene aceitunas (versión con ajo) incluye aceitunas, aceite de oliva y ajo. En un ajuste, la segunda composición que contiene aceitunas (con ajo) incluye ajo preferentemente en una cantidad del 0,1 al 0,6 % en peso; ácido láctico preferentemente en una cantidad del 0,3 al 1 % en peso; aceite (de oliva) preferentemente en una cantidad del 2 al 6 % en peso; aceitunas (crudas, verdes, sin hueso) preferentemente en una cantidad del 50 al 97 % en peso; sal (reg., *kosher*, sal marina) preferentemente en una cantidad del 0,8 al 3 % en peso; tomillo preferentemente en una cantidad del 0,1 al 0,5 % en peso.

En un ajuste, la composición de galleta de col rizada incluye col rizada, almendras, harina de tapioca y, opcionalmente, semillas de sésamo. En otro ajuste, la composición de galleta de col rizada incluye almendras preferentemente en una cantidad del 15 al 40 % en peso; pimienta negra preferentemente en una cantidad del 0,1 al 0,4 % en peso; semillas de chícharo preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; guindilla preferentemente en una cantidad del 0,4 al 1,2 % en peso; semillas de comino preferentemente en una cantidad del 0,3 al 0,9 % en peso; semillas de lino preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; ajo preferentemente en una cantidad del 0,02 al 0,04 % en peso; col rizada preferentemente en una cantidad del 2 al 6 % en peso; aceite (de girasol) preferentemente en una cantidad del 2 al 7 % en peso; cebolla (en polvo, picada) normalmente en una cantidad del 0,3 al 0,9 % en peso; orégano preferentemente en una cantidad del 0,01 al 0,06 % en peso; sal preferentemente en una cantidad del 1 al 4 % en peso; semillas de sésamo preferentemente en una cantidad del 15 al 35 % en peso; azúcar (de coco) preferentemente en una cantidad del 1 al 5 % en peso; harina de tapioca preferentemente en una cantidad del 10 al 30 % en peso; vinagre (de coco) preferentemente en una cantidad del 1 al 4 % en peso; agua (purificada) preferentemente en una cantidad del 2 al 12 % en peso; y extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 0,3 al 1 % en peso.

En otro ajuste, la composición de galleta de col rizada incluye col rizada, semillas de lino doradas, semillas de sésamo y pipas de girasol. En otro ajuste, el vinagre de sidra de manzana preferentemente en una cantidad del 1 al 3 % en peso; pimienta negra preferentemente en una cantidad del 0,4 al 1,3 % en peso; anacardos preferentemente en una cantidad del 4 al 13 % en peso; eneldo preferentemente en una cantidad del 0,4 al 1,3 % en peso; semillas de lino doradas preferentemente en una cantidad del 13 al 40 % en peso; semillas de cáñamo preferentemente en una cantidad del 0,7 al 2 % en peso; col rizada preferentemente en una cantidad del 14 al 42 % en peso; cebolla, blanca, seca, (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 0,5 al 1,6 % en peso; pipas de calabaza preferentemente en una cantidad del 0,7 al 2 % en peso; sal (reg., *kosher*, sal marina) preferentemente en una cantidad del 0,7 al 2 % en peso; semillas de sésamo preferentemente en una cantidad del 2 al 8 % en peso; pipas de girasol preferentemente

en una cantidad del 10 al 30 % en peso; y extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 1 al 5 % en peso.

En un ajuste, la composición de sopa de verduras incluye cebollas, tomates, espinaca, extracto de té verde, opcionalmente harina de arroz, opcionalmente arroz integral en polvo, opcionalmente zanahorias y opcionalmente inulina, puerros, En un ajuste, la composición de sopa de verduras incluye albahaca (hoja entera, seca) preferentemente en una cantidad del 0,3 al 0,9 % en peso; arroz integral en polvo (con cáscara) preferentemente en una cantidad del 3 al 12 % en peso; zanahoria (deshidratada, hinchada, en polvo, en trozos) preferentemente en una cantidad del 4 al 14 % en peso; extracto de té verde preferentemente en una cantidad del 0,02 al 0,06 % en peso; inulina preferentemente en una cantidad del 5 al 15 % en peso; puerros (gránulos -10+40) preferentemente en una cantidad del 1 al 5 % en peso; aceite (de oliva) preferentemente en una cantidad del 1 al 6 % en peso; cebolla (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 4 al 15 % en peso; perejil preferentemente en una cantidad del 0,3 al 0,8 % en peso; pimientos rojos preferentemente en una cantidad del 1 al 5 % en peso; harina de arroz preferentemente en una cantidad del 18 al 50 % en peso; sal preferentemente en una cantidad del 2 al 7 % en peso; espinaca (hoja, en polvo) preferentemente en una cantidad del 0,4 al 1,5 % en peso; tomates (fruta en polvo, secados al sol, gránulos) preferentemente en una cantidad del 4 al 14 % en peso; extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 0,5 al 1,8 % en peso. En la composición de sopa de verduras y cualquiera de las composiciones establecidas en el presente documento que tengan harina de arroz, la harina de arroz puede ser glutinosa o no glutinosa, molida o sin moler.

En otro ajuste, la composición de sopa de verduras incluye zanahorias, inulina, puerros, cebollas y harina de arroz. En un ajuste, la composición de sopa de verduras incluye albahaca, en hoja entera, seca preferentemente en una cantidad del 0,3 al 1 % en peso; zanahoria (deshidratada, hinchada, en polvo, en trozos) preferentemente en una cantidad del 4 al 12 % en peso; inulina preferentemente en una cantidad del 6 al 18 % en peso; puerros en una cantidad del 1 al 5 % en peso; aceite (de oliva) preferentemente en una cantidad del 1 al 3 % en peso; cebolla, blanca, seca, (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 10 al 30 % en peso; perejil preferentemente en una cantidad del 0,3 al 1 % en peso; patata preferentemente en una cantidad del 1 al 5 % en peso; pimienta roja preferentemente en una cantidad del 1 al 6 % en peso; harina de arroz en una cantidad del 13 al 40 % en peso; sal (reg., *kosher*, sal marina) preferentemente en una cantidad del 4 al 12 % en peso; espinaca (hoja, en polvo) preferentemente en una cantidad del 0,2 al 1 % en peso; y tomates, (fruta en polvo, gránulos secados al sol) preferentemente en una cantidad del 3 al 13 % en peso.

En un ajuste, la composición de sopa de champiñones incluye champiñones, extracto de té verde, opcionalmente arroz integral en polvo, opcionalmente zanahorias y opcionalmente inulina. En un ajuste, la composición de sopa de champiñones incluye arroz integral en polvo (con cáscara) preferentemente en una cantidad del 10 al 30 % en peso; zanahoria (deshidratada, hinchada, en polvo, en trozos) preferentemente en una cantidad del 3 al 12 % en peso; extracto de té verde preferentemente en una cantidad del 0,02 al 0,06 % en peso; inulina preferentemente en una cantidad del 3 al 12 % en peso; champiñones (mezcla europea, en polvo, en trozos) preferentemente en una cantidad del 6 al 18 % en peso; aceite (de oliva) preferentemente en una cantidad del 1 al 6 % en peso; cebolla (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 3 al 12 % en peso; perejil preferentemente en una cantidad del 0,1 al 0,5 % en peso; harina de arroz preferentemente en una cantidad del 18 al 50 % en peso; sal preferentemente en una cantidad del 2 al 8 % en peso; extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 0,5 al 1,5 % en peso.

En otro ajuste, la composición de sopa de champiñones incluye zanahorias, inulina, champiñones, cebollas y harina de arroz. En otro ajuste, la composición de sopa de champiñones incluye zanahoria (deshidratada, hinchada, en polvo, en trozos) preferentemente en una cantidad del 7 al 22 % en peso; inulina preferentemente en una cantidad del 7 al 22 % en peso; champiñones (mezcla europea), (en polvo y en trozos) deshidratados preferentemente en una cantidad del 7 al 22 % en peso; aceite (de oliva) preferentemente en una cantidad del 0,6 al 2 % en peso; cebolla, blanca, seca, (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 7 al 22 % en peso; perejil preferentemente en una cantidad del 0,3 al 0,9 % en peso; patata preferentemente en una cantidad del 0,6 al 2 % en peso; harina de arroz preferentemente en una cantidad del 15 al 45 % en peso; sal (reg., *kosher*, sal marina) preferentemente en una cantidad del 6 al 18 % en peso; y extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 0,7 al 2,2 % en peso.

En un ajuste, la composición de sopa de tomate incluye tomates, extracto de té verde, opcionalmente inulina y opcionalmente cebollas. En un ajuste, la composición de sopa de tomate (nueva) incluye albahaca (hoja entera, seca) preferentemente en una cantidad del 0,2 al 0,7 % en peso; arroz integral en polvo (con cáscara) preferentemente en una cantidad del 1 al 5 % en peso; extracto de té verde preferentemente en una cantidad del 0,02 al 0,06 % en peso; inulina preferentemente en una cantidad del 7 al 20 % en peso; aceite (de oliva) preferentemente en una cantidad del 3 al 9 % en peso; cebolla (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 4 al 12 % en peso; perejil preferentemente en una cantidad del 0,1 al 0,6 % en peso; harina de arroz preferentemente en una cantidad del 18 al 50 % en peso; sal preferentemente en una cantidad del 2 al 9 % en peso; tomates (fruta en polvo, secados al sol, gránulos) preferentemente en una cantidad del 12 al 36 % en peso; y extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 0,5 al 3 % en peso.

En otro ajuste, la composición de sopa de tomate incluye tomates, inulina, aceitunas, cebollas, patatas y harina de

- arroz. En otro ajuste más, la composición de sopa de tomate incluye albahaca, en hoja entera, seca preferentemente en una cantidad del 0,3 al 1 % en peso; inulina preferentemente en una cantidad del 6 al 18 % en peso; aceite (de oliva) preferentemente en una cantidad del 4 al 14 % en peso; cebolla, blanca, seca, (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 8 al 24 % en peso; perejil preferentemente en una cantidad del 0,3 al 0,9 % en peso; patata preferentemente en una cantidad del 6 al 18 % en peso; harina de arroz preferentemente en una cantidad del 9 al 27 % en peso; sal (reg., *kosher*, sal marina) preferentemente en una cantidad del 4 al 14 % en peso; tomates, (fruta en polvo, gránulos secados al sol) preferentemente en una cantidad del 8 al 24 % en peso; y extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 0,7 al 2,2 % en peso.
- 10 En un ajuste, la composición de sopa minestrone que contiene quinoa incluye quinoa, extracto de té verde, opcionalmente aceite de oliva, opcionalmente col, opcionalmente patatas, opcionalmente harina de arroz y opcionalmente tomates y opcionalmente sin cúrcuma. En un ajuste, la composición de sopa minestrone que contiene quinoa incluye albahaca (hoja entera, seca) preferentemente en una cantidad del 0,7 al 2 % en peso; brócoli en polvo preferentemente en una cantidad del 0,6 al 2 % en peso; repollo blanco (copos) preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; zanahoria (deshidratada, hinchada, en polvo, en trozos) preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; apio preferentemente en una cantidad del 1 al 4 % en peso; semillas de apio (en polvo) preferentemente en una cantidad del 0,07 al 0,2 % en peso; ajo preferentemente en una cantidad del 0,7 al 2 % en peso; extracto de té verde preferentemente en una cantidad del 0,02 al 0,06 % en peso; inulina preferentemente en una cantidad del 1 al 5 % en peso; puerros (gránulos -10+40), preferentemente en una cantidad del 0,7 al 2 % en peso; aceite (de oliva) preferentemente en una cantidad del 0,6 al 2 % en peso; cebolla (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 2 al 8 % en peso; guisantes preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; patata preferentemente en una cantidad del 7 al 20 % en peso; quinoa preferentemente en una cantidad del 7 al 20 % en peso; harina de arroz preferentemente en una cantidad del 7 al 20 % en peso; sal, preferentemente en una cantidad del 1 al 6 % en peso; espinaca (hoja, en polvo) preferentemente en una cantidad del 0,5 al 2 % en peso; tomates (fruta en polvo, secados al sol, en gránulos) preferentemente en una cantidad del 2 al 6 % en peso; extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 0,6 al 2 % en peso; calabacín (en polvo, cortado en cubitos) preferentemente en una cantidad del 2 al 8 % en peso.
- 30 En otro ajuste, la sopa minestrone que contiene quinoa incluye quinoa, col, patatas y harina de arroz. En otro ajuste más, la sopa minestrone que contiene quinoa incluye albahaca, en hoja entera, seca preferentemente en una cantidad del 0,7 al 2,2 % en peso; brócoli en polvo preferentemente en una cantidad del 0,7 al 2,2 % en peso; repollo blanco (copos) preferentemente en una cantidad del 0,6 al 2,2 % en peso; zanahoria (deshidratada, hinchada, en polvo, en trozos) preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; apio nabo preferentemente en una cantidad del 2 al 6 % en peso; semillas de apio en polvo preferentemente en una cantidad del 0,6 al 1,8 % en peso; ajo preferentemente en una cantidad del 1 al 3 % en peso; cebolla, blanca, seca, (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 3 al 9 % en peso; guisantes preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; patata preferentemente en una cantidad del 6 al 20 % en peso; quinoa preferentemente en una cantidad del 8 al 23 % en peso; harina de arroz preferentemente en una cantidad del 7 al 22 % en peso; sal (reg., *kosher*, sal marina) preferentemente en una cantidad del 2 al 7 % en peso; col de Milán preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; espinaca (hoja, en polvo) preferentemente en una cantidad del 0,7 al 2,2 % en peso; cúrcuma preferentemente en una cantidad del 0,6 al 1,8 % en peso; extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; y calabacín (en polvo, troceado) preferentemente en una cantidad del 1 al 5 % en peso.
- 45 En un ajuste, la composición de sopa minestrone que contiene judías incluye judías blancas (por ejemplo, judías blancas medianas), extracto de té verde, opcionalmente col y opcionalmente patatas. En un ajuste, la composición de sopa minestrone que contiene judías incluye judías (blancas medianas) preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; repollo blanco (copos) preferentemente en una cantidad del 2 al 8 % en peso; zanahoria (deshidratada, hinchada, en polvo, en trozos) preferentemente en una cantidad del 2 al 8 % en peso; apio preferentemente en una cantidad del 1 al 4 % en peso; extracto de té verde preferentemente en una cantidad del 0,02 al 0,06 % en peso; inulina preferentemente en una cantidad del 2 al 10 % en peso; puerros (gránulos -10+40) preferentemente en una cantidad del 2 al 7 % en peso; aceite (de oliva) preferentemente en una cantidad del 2 al 7 % en peso; cebolla (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 2 al 7 % en peso; perejil preferentemente en una cantidad del 0,2 al 1 % en peso; guisantes preferentemente en una cantidad del 3 al 9 % en peso; patata preferentemente en una cantidad del 15 al 45 % en peso; harina de arroz preferentemente en una cantidad del 6 al 18 % en peso; sal preferentemente en una cantidad del 2 al 8 % en peso; espinaca (hoja, en polvo) preferentemente en una cantidad del 0,5 al 1,5 % en peso; tomates (fruta en polvo, secados al sol, en gránulos) preferentemente en una cantidad del 2 al 7 % en peso; y extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 0,5 al 1,5 % en peso.
- 60 En un ajuste, la composición de sopa minestrone que contiene judías incluye judías pintas, zanahorias, guisantes, patata y harina de arroz. En otro ajuste, la composición de sopa minestrone que contiene judías incluye zanahoria (deshidratada, hinchada, en polvo, en trozos) preferentemente en una cantidad del 4 al 14 % en peso; apio nabo preferentemente en una cantidad del 1 al 5 % en peso; apio preferentemente en una cantidad del 0,5 al 1,6 % en peso; puerros preferentemente en una cantidad del 2 al 8 % en peso; aceite (de oliva) preferentemente en una cantidad del 2 al 8 % en peso; cebolla, blanca, seca, (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso;

5 perejil preferentemente en una cantidad del 0,5 al 1,5 % en peso; guisantes preferentemente en una cantidad del 5 al 18 % en peso; patata preferentemente en una cantidad del 8 al 24 % en peso; harina de arroz preferentemente en una cantidad del 5 al 18 % en peso; sal (reg., *kosher*, sal marina) preferentemente en una cantidad del 4 al 14 % en peso; espinaca (hoja, en polvo) preferentemente en una cantidad del 0,5 al 1,5 % en peso; tomates, (fruta en polvo, gránulos secados al sol) preferentemente en una cantidad del 0,9 al 2,8 % en peso; cúrcuma preferentemente en una cantidad del 0,3 al 1,2 % en peso; y extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 0,5 al 1,5 % en peso.

10 En un ajuste, la composición de sopa de calabaza incluye calabaza, extracto de té verde, opcionalmente harina de arroz, opcionalmente zanahorias y opcionalmente arroz integral en polvo. En un ajuste, la composición de sopa de calabaza (nueva) incluye arroz integral en polvo (con cáscara) preferentemente en una cantidad del 3 al 9 % en peso; zanahoria (deshidratada, hinchada, en polvo, en trozos) preferentemente en una cantidad del 2 al 8 % en peso; extracto de té verde preferentemente en una cantidad del 0,02 al 0,06 % en peso; inulina preferentemente en una cantidad del 2 al 10 % en peso; aceite (de oliva) preferentemente en una cantidad del 1 al 7 % en peso; cebolla (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 1,0 al 3 % en peso; calabaza en polvo preferentemente en una cantidad del 20 al 60 % en peso; harina de arroz preferentemente en una cantidad del 15 al 45 % en peso; sal preferentemente en una cantidad del 2 al 10 % en peso; y extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 0,3 al 1 % en peso.

20 En un ajuste, el primer caldo de verduras incluye zanahorias, maltodextrina, apio, espinacas y tomates. En un ajuste, el primer caldo de verduras incluye zanahoria (deshidratada, hinchada, en polvo, en trozos) preferentemente en una cantidad del 6 al 18 % en peso; apio preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; ajo preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; maltodextrina preferentemente en una cantidad del 8 al 25 % en peso; aceite (de colza) preferentemente en una cantidad del 0,5 al 2 % en peso; cebolla (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 6 al 18 % en peso; perejil preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; patata preferentemente en una cantidad del 1 al 3 % en peso; sal preferentemente en una cantidad del 7 al 21 % en peso; espinaca (hoja, en polvo) preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; tomates (fruta en polvo, secados al sol, gránulos) preferentemente en una cantidad del 6 al 18 % en peso; y extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 1 al 6 % en peso.

30 En un ajuste, el segundo caldo de verduras (con sabor a pollo) incluye zanahorias, saborizante de pollo, maltodextrina, apio, espinaca, lecitina de soja y tomates. En un ajuste, la segunda composición de caldo de verduras incluye zanahoria (deshidratada, hinchada, en polvo, en trozos) preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; apio preferentemente en una cantidad del 3 al 12 % en peso; ajo preferentemente en una cantidad del 3 al 9 % en peso; maltodextrina preferentemente en una cantidad del 8 al 25 % en peso; aceite (de colza) preferentemente en una cantidad del 0,5 al 2 % en peso; cebolla (en polvo, picada) preferentemente en una cantidad del 3 al 12 % en peso; perejil preferentemente en una cantidad del 3 al 10 % en peso; patata preferentemente en una cantidad del 1 al 6 % en peso; sal preferentemente en una cantidad del 8 al 25 % en peso; lecitina de soja preferentemente en una cantidad del 0,5 al 3 % en peso; espinaca (hoja, en polvo) preferentemente en una cantidad del 3 al 12 % en peso; tomates (fruta en polvo, secados al sol, gránulos) preferentemente en una cantidad del 6 al 18 % en peso; goma xantana preferentemente en una cantidad del 0,5 al 4 % en peso; y extracto de levadura preferentemente en una cantidad del 4 al 12 % en peso.

45 En un ajuste, la composición de bebida energética incluye glicerina preferentemente en una cantidad del 20 al 60 % en peso; agua (purificada) preferentemente en una cantidad del 40 al 80 % en peso.

En un ajuste, la composición de infusión que incluye hierbabuena incluye hojas de hierbabuena ecológicas preferentemente en una cantidad del 70 al 100 % en peso.

50 En un ajuste, la composición de infusión que incluye limón y hierbabuena incluye mirto limón ecológico preferentemente en una cantidad del 3 al 12 % en peso; cáscara de limón ecológica preferentemente en una cantidad del 10 al 25 % en peso; hojas de hierbabuena ecológicas preferentemente en una cantidad del 50 al 95 % en peso.

En un ajuste, la composición de infusión que incluye hibisco incluye hojas de infusión de hibisco ecológicas preferentemente en una cantidad del 80 al 100 % en peso.

55 En un ajuste, la composición de aceite de algas incluye aceite de algas de *Schizocatrium* (DHA Omega-3) preferentemente en una cantidad del 80 al 100 % en peso.

60 En un ajuste, la composición de reposición de nutrientes (NR-1) incluye remolacha en polvo, carbonato cálcico, zanahorias, hoja de berza, hoja de col rizada y tomates. En un ajuste, la composición de reposición de nutrientes (NR-1) incluye ácido ascórbico preferentemente en una cantidad del 1 al 3 % en peso; remolacha en polvo preferentemente en una cantidad del 6 al 20 % en peso; betacaroteno preferentemente en una cantidad de 0,05 a 0,15 % en peso; carbonato cálcico preferentemente en una cantidad del 6 al 20 % en peso; zanahoria (deshidratada, hinchada, en polvo, en trozos) preferentemente en una cantidad del 6 al 20 % en peso; colecalciferol preferentemente en una

cantidad del 0,00 % en peso; picolinato de cromo preferentemente en una cantidad del 0,00 % en peso; hoja de berza en polvo preferentemente en una cantidad del 6 al 20 % en peso; sulfato cúprico preferentemente en una cantidad del 0,01 al 0,06 % en peso; cianocobalamina, 0,00; acetato de DI-alfa tocoferol preferentemente en una cantidad del 0,3 al 1 % en peso; fumarato ferroso preferentemente en una cantidad del 0,2 al 1 % en peso; ácido fólico preferentemente en una cantidad del 0,00 % en peso; hoja de col rizada preferentemente en una cantidad del 6 al 20 % en peso; 5
estearato de magnesio preferentemente en una cantidad del 1 al 6 % en peso; sulfato de manganeso preferentemente en una cantidad del 0,04 al 0,08 % en peso; niacinamida preferentemente en una cantidad del 0,3 al 1 % en peso; ácido pantoténico preferentemente en una cantidad del 0,1 al 0,6 % en peso; fitonadiona preferentemente en una cantidad del 0,00 % en peso; yodo potásico preferentemente en una cantidad del 0 % en peso; piridoxina HCl 10
preferentemente en una cantidad del 0,03 al 0,1 % en peso; riboflavina preferentemente en una cantidad del 0,02 al 0,1 % en peso; molibdato de sodio preferentemente en una cantidad del 0,00 % en peso; selenato de sodio preferentemente en una cantidad del 0,00 % en peso; espinaca (hoja, en polvo) preferentemente en una cantidad del 6 al 20 % en peso; mononitrato de tiamina preferentemente en una cantidad del 0,02 al 0,1 % en peso; tomates (fruta en polvo, secados al sol, gránulos) preferentemente en una cantidad del 6 al 20 % en peso; fosfato cálcico tribásico 15
preferentemente en una cantidad del 0,5 al 2 % en peso; y óxido de zinc preferentemente en una cantidad del 0,2 al 0,8 % en peso.

En una variación, cada uno de los componentes del paquete de dieta está sustancialmente exento de gluten (por ejemplo, cada componente tiene menos de 20 ppm de gluten) o es muy bajo en gluten (por ejemplo, cada componente 20
tiene de 20 a 100 ppm). En otras variaciones, cada uno de los componentes se proporciona en una ración de 20 a 60 g. En otras variaciones, la barrita nutritiva que contiene nueces se proporciona en una ración de 30 a 60 g; la barrita nutritiva que contiene cacao se proporciona en una ración de 15 a 40 g; la composición que contiene aceitunas (versión con sal marina) en una ración de 10 a 20 g; la composición que contiene aceitunas (versión con ajo) en una ración de 10 a 20 g; la composición de galleta de col rizada se proporciona en una ración de 30 a 60 g; En otra variación, las 25
composiciones de galleta de col rizada se proporcionan en una ración de 20 a 50 g; las composiciones de sopa de verduras se proporcionan en una ración de 20 a 50 g; las composiciones de sopa de champiñones se proporcionan en una ración de 20 a 50 g; las composiciones de sopa de tomate se proporcionan en una ración de 20 a 50 g; las composiciones de sopa minestrone que contienen judías se proporcionan en una ración de 20 a 50 g; las composiciones de sopa minestrone que contienen quinoa se proporcionan en una ración de 20 a 50 g; las composiciones de sopa de calabaza se proporcionan en una ración de 20 a 50; las composiciones del primer caldo de 30
verduras se proporcionan en una ración de 5 a 15; las composiciones del segundo caldo de verduras se proporcionan en una ración de 3 a 15; y la composición de la bebida energética se proporciona en raciones de 1 a 5 oz (29,6 a 147,9 ml).

Debe apreciarse que la presente invención proporciona una composición dietética y una combinación de fármacos enumerados como se ha expuesto anteriormente para promover la reprogramación celular para generar células multipotentes y promover la regeneración en múltiples sistemas y/u órganos, incluidos el sistema nervioso, el sistema hematopoyético, el hígado, el músculo, el sistema digestivo, el corazón, los pulmones, los riñones y los huesos con el fin de rejuvenecer estos sistemas y revertir las enfermedades que los afectan. 35
40

Los ciclos de una dieta que imita el ayuno (FMD) rescatan a ratones de la DT2 avanzada

Como consecuencia de la resistencia a la insulina, la disminución del número de células β funcionales productoras de insulina contribuye a la fisiopatología de la DT2 al conducir finalmente a una deficiencia de insulina (Cnop *et al.*, 2005; 45
Dor y Glaser, 2013). Anteriormente, se ha mostrado que una dieta que imita el ayuno (FMD) de 4 días podría inducir cambios metabólicos similares a los causados por el ayuno prolongado y reducir los niveles de insulina y glucosa al tiempo que aumenta los cuerpos cetónicos y la igfbp1 (Brandhorst *et al.*, 2015) (figura 9). Aunque se desconoce la función de las dietas de ayuno periódico y que imitan el ayuno sobre la función de la insulina, se han señalado con anterioridad los efectos del ayuno intermitente y las restricciones calóricas (RC) crónicas sobre la sensibilidad a la 50
insulina (Barnosky *et al.*, 2014). Aquí el asunto primordial son los posibles efectos de la FMD en la promoción de la regeneración de las células β , aunque también se han investigado los efectos de la FMD sobre la resistencia a la insulina.

Ya que las células β se replican a un ritmo extremadamente bajo en el páncreas adulto (Meier *et al.*, 2008; Teta *et al.*, 2005) y que la neogénesis de células β es infrecuente (Xiao *et al.*, 2013), el agotamiento de las células β y la 55
consecuente pérdida de secreción de insulina durante la diabetes avanzada se han considerado a menudo afecciones cuyas reversiones requieren el trasplante de islotes y células madre (Fiorina *et al.*, 2008; Kroon *et al.*, 2008; Milanesi *et al.*, 2012; Pipeleers *et al.*, 2002; Villani *et al.*, 2014). Para determinar si la FMD podría afectar a la deficiencia de células β asociada con la DT2, se ha estudiado su efecto en ratones con una mutación puntual en el gen del receptor de leptina (*Lepr^{db/db}*), lo que causa resistencia a la insulina y pérdida tardía de la secreción de insulina. Según han 60
señalado otros, los ratones db/db desarrollaron hiperglucemia a las 10 semanas de edad, lo que los inventores denominan valor inicial (VI) (figura 1A). Esto estuvo acompañado de niveles altos de insulina que inicialmente compensaban la resistencia a la insulina, seguido del desarrollo de hiperglucemia grave a las 12 semanas de edad causada por la disminución de la secreción de insulina (figura 1B a 1C) (Arakawa *et al.*, 2001). Como resultado, los

ratones db/db comenzaron a morir alrededor de los 4 meses de edad. Se intentó revertir estos fenotipos de DT2 tardía tratando ratones de 12 semanas de edad (14 días después de que se estabilizara la hiperglucemia, valor inicial) con ciclos semanales de FMD de 4 días (figura 1A). Los ciclos de FMD causaron una reducción importante y un retorno a niveles casi normales de glucosa en sangre en ratones db/db para el d60, (figura 1B). Los ciclos de FMD también
 5 revirtieron la disminución de la secreción de insulina el d30 y mejoraron los niveles plasmáticos de insulina el día 90 (figura 1C). Se realizó una evaluación del modelo homeostático (HOMA) para estimar la función de las células β en estado estacionario (%B) y la sensibilidad a la insulina (%S), como se ha descrito anteriormente (Hsu *et al.*, 2013; Matthews *et al.*, 1985). Los resultados indican que la reversión de la hiperglucemia fue causada principalmente por
 10 la inducción de la función de las células β en estado estacionario (%B), además del alivio menor de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) (figura 1D). No obstante, los ratones que recibieron la FMD mostraron una mejor tolerancia a la glucosa y a la insulina en comparación con los controles alimentados a voluntad (AV) (figura 1E), debido en parte a las funciones mejoradas de secreción de insulina (figura 10F). Cabe destacar que, aunque los ratones db/db con la dieta FMD ganaron menos peso en comparación con los que siguieron la dieta normal, mantuvieron un peso
 15 aproximadamente un 22 % mayor que el de sus compañeros de camada sanos de referencia (WT) durante todo el experimento (figura 10C). En conjunto, estos resultados indican que los ciclos de FMD rescataron a ratones de DT2 tardía al restaurar la secreción de insulina y reducir la resistencia a la insulina, lo que conduce a una mejora importante de la supervivencia (figura 1F, * $p < 0,05$, prueba del orden logarítmico para la tendencia).

Los ciclos de FMD revierten la insuficiencia de las células β en la DT2

20 La desdiferenciación de células β , que da lugar a un aumento de las células no productoras de hormonas dentro de los islotes pancreáticos, es una característica de la insuficiencia de las células β en la diabetes (Dor y Glaser, 2013; Kim-Muller *et al.*, 2014; Talchai *et al.*, 2012). De forma similar a lo que otros han señalado anteriormente, se ha encontrado un aumento de las células que no producen insulina ni glucagón (es decir, no α/β) y una disminución del
 25 número de células β en los islotes pancreáticos de ratones con DT2 tardía, pero no en los de controles sanos WT/AV (figuras 1G y 10, db/db VI en comparación con WT/AV). También se ha visto que la proliferación de células β fue baja en la etapa tardía de la enfermedad (figura 1H, día 60 AV en comparación con VI). Mientras que los ratones db/db alimentados a voluntad (db/db:AV) mostraron una reducción del 60-80 % en el recuento de células β el día 60, los ratones db/db que recibieron ciclos de FMD (db/db:FMD) presentaron una mejora importante en el número y la
 30 proliferación de células β generadoras de insulina (comparando db/db VI, figura 1G-I), pero no en el número de células no α/β (figura 10, día 60). Los islotes pancreáticos recogidos de ratones db/db tratados con ciclos de FMD (día 60) presentaron un aumento de la secreción de insulina estimulada por glucosa (SIEG), en comparación con la de los islotes de ratones db/db:AV (figura 1J). También se ha determinado que era necesario un tiempo de exposición más largo (punto temporal 120) para distinguir entre la funcionalidad de los islotes de los ratones de los grupos db/db:AV y
 35 db/db:FMD (figura 1J). En general, estos resultados sugieren que, además de mejorar la sensibilidad a la insulina, la FMD indujo la regeneración de células β para revertir la pérdida de células β , lo que puede aliviar los síntomas y la mortalidad de la DT2 tardía.

Los ciclos de FMD restauran la homeostasis de la glucosa dependiente de insulina en la DT1 inducida por STZ

40 Para examinar más a fondo la función de los ciclos de la FMD en la estimulación de la regeneración de las células β , se aplicaron ciclos de FMD en un modelo de DT1, en el que el tratamiento con dosis alta de estreptozotocina (STZ) provoca el agotamiento de las células β secretoras de insulina (Wu y Huan, 2008; Yin *et al.*, 2006). A partir de 5 días después del tratamiento con STZ, lo que los inventores denominan valor inicial (STZ VI), se observó hiperglucemia
 45 (>300 mg/dl) tanto en ratones alimentados AV como en los sometidos a múltiples ciclos de FMD de 4 días cada 7 días (4 días de FMD seguidos de 3 días de realimentación, cada 7 días por ciclo) (figuras 2A y 2B). Los niveles de glucosa en sangre continuaron aumentando en los ratones tratados con STZ que recibieron la dieta AV y alcanzaron niveles superiores a 450 mg/dl los días 30 y 50. Por otra parte, en ratones que recibieron ciclos de FMD, la hiperglucemia y la
 50 deficiencia de insulina se aliviaron significativamente el día 30. (Figura 2B, tamaño de muestra indicado entre paréntesis). Más notablemente, los niveles de estos parámetros fisiológicos regresaron a un intervalo casi normal entre los días 50 y 60 después de los ciclos de FMD (figuras 2B y 2C, tamaño de muestra indicado entre paréntesis). Las pruebas de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) el día 50 confirmaron que los ratones tratados con STZ sometidos a los ciclos de FMD tenían mayor capacidad para eliminar la glucosa en sangre exógena, en comparación
 55 con ratones con pienso normal (AV) (figura 2D).

Los niveles de determinadas citocinas circulantes se han utilizado como indicadores para determinar el estado patológico de los islotes en pacientes con DT1 de aparición reciente (Baeyens *et al.*, 2014; Grunnet *et al.*, 2009; Lebastchi y Herold, 2012). Se realizó un inmunoensayo de 23 factores para determinar los efectos de la FMD sobre los marcadores inflamatorios. Se descubrió que los ciclos de FMD no solo suprimieron las citocinas circulantes
 60 asociadas con el daño de las células β (por ejemplo, TNF α e IL-12), sino que también aumentaron las citocinas circulantes asociadas con la regeneración de las células β (por ejemplo, IL-2 e IL-10) (figura 2E, día 30) (Dirice *et al.*, 2014; Rabinovitch, 1998; Zhernakova *et al.*, 2006).

En conjunto, estos resultados indican que los ciclos de FMD reducen la inflamación y promueven cambios en los

niveles de citocinas y otras proteínas, lo que puede ser beneficioso para la restauración de la secreción de insulina y la reversión de la hiperglucemia.

Los ciclos de FMD revierten el agotamiento de las células β inducido por STZ

5

La caracterización de las células de los islotes pancreáticos indica una fuerte asociación entre la homeostasis restaurada de la glucosa y la reposición de células β pancreáticas en animales sometidos a ciclos de FMD. Los tratamientos con STZ dieron lugar a un aumento de células no α/β (figura 11) y un agotamiento de aproximadamente el 85 % de las células β secretoras de insulina (figura 2F, STZ VI). El aumento transitorio de células no α/β se había revertido el d30 en ambos grupos (figuras 10D y 10E). Los ratones que recibieron ciclos semanales de la FMD mostraron un aumento importante de células β proliferativas seguido de un retorno a un nivel casi normal de células β generadoras de insulina el d50 (figuras 2F y 2G). Por el contrario, los ratones que recibieron acceso a voluntad a pienso normal (AV) permanecieron sin células β durante más de 50 días (figuras 2F y 2G). En general, el aumento de células no α/β antes de la proliferación de células β plantea la posibilidad de que el ciclo semanal de la FMD pueda mediar en la conversión del destino de células no α/β en células β para revertir el agotamiento de células β inducido por STZ, aunque son posibles otros escenarios.

La FMD y la realimentación post-FMD promueven la regeneración de células β en ratones no diabéticos

20 Los inventores investigaron si, y cómo, la FMD y el periodo de realimentación posterior a la FMD podrían regular las poblaciones de células dentro de los islotes para promover la regeneración de las células β independientemente de la diabetes, con especial atención a las células no α/β y a las células β proliferativas. Para caracterizar los cambios celulares y hormonales, se recogieron muestras de páncreas y sangre periférica de ratones C57Bl6 de referencia alimentados con FMD durante 4 días antes de la dieta (VI), al final de la dieta (d4) y 1 día o 3 días después de que los ratones regresaran a la dieta normal (RF1d o RF3d). La FMD provocó una tendencia a la disminución del número y el tamaño de los islotes pancreáticos (figura 3A) y redujo la proporción de células β en un 35 % (figuras 3B y 3C; véase también la figura 12 para conocer los números absolutos). Estos efectos se revirtieron a los tres días de la realimentación (figuras 3A y 3C). Las células no- α/β comenzaron a proliferar al final de la FMD y esta proliferación persistió hasta 1 día después de la realimentación (RF1d), lo que llevó a un aumento de 2,5 veces de las células no- α/β (proporción por islote) en RF1d (figura 12). El RF3d, el número de células no α/β había disminuido y el de células β volvió a los valores iniciales (VI), aunque las células β permanecieron en un estado mucho más proliferativo en el grupo con FMD (figura 3B y 3C). La expresión del marcador de proliferación PCNA se elevó en las células β pero no en las células α después de la realimentación posterior a la FMD (figuras 3B, 3C y 12). A pesar de que el número de células α por islote sigue siendo el mismo, las células de transición α a β o β a α que coexpresan los marcadores de células α (es decir, glucagón) y β (es decir, Pdx-1 o insulina) aumentaron en ratones que recibieron la FMD (figura 3D). En resumen, la FMD promueve una disminución del número de células diferenciadas o comprometidas, seguido de la inducción de células de transición, lo que conduce a aumentos importantes de la proliferación y el número de células β generadoras de insulina (figura 3E).

40 La FMD promueve un perfil de expresión génica en ratones adultos similar al observado durante el desarrollo embrionario y fetal

Para identificar los genes que pueden mediar en la regeneración pancreática inducida por la FMD, se midió la expresión génica en los islotes pancreáticos al final de la FMD y la realimentación después de la FMD. En ambos momentos, se observó una regulación positiva transitoria de Foxo1 (6,9 veces en FMD, 5,3 veces en RF1d, * $p < 0,05$ en comparación con AV) y de un conjunto de genes que se han identificado previamente como reguladores dobles tanto para el metabolismo de las grasas como para la determinación del destino en células de mamíferos (Cook *et al.*, 2015; Haessler *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2004; Kim-Muller *et al.*, 2014; Mu *et al.*, 2006; Stanger, 2008; Talchai *et al.*, 2012; Talchai y Accili, 2015; Tonne *et al.*) (figura 4A), de acuerdo con los cambios metabólicos encontrados en ratones que recibieron la FMD (figura 9). Además, examinamos si la reprogramación metabólica causada por la FMD afecta la determinación del linaje en los islotes pancreáticos. En la figura 4B, la expresión de marcadores de linaje se determinó mediante la expresión de ARNm de islotes purificados de ratones alimentados a voluntad (AV) o con FMD. Los resultados de la matriz de qPCR indican que la regulación positiva de los siguientes genes fue estadísticamente significativa (* $p < 0,05$ en comparación con AV, figura 4B; véase también la figura 13): i) marcadores de pluripotencia (por ejemplo, Lefty1, 3,0 veces durante la FMD, 7,0 veces en RF1d; Podx1, 3,9 veces durante la FMD, 9,8 veces en RF1d; Nanog, 2,6 veces durante la FMD y 5,4 veces RF1d y Dnm3b, 31,6 veces durante la FMD y 18,3 veces RF1d), ii) marcadores de desarrollo embrionario (por ejemplo, Sox17, 3,4 veces durante la FMD y Gata6 3,1 veces durante la FMD y 2,7 veces en RF1d), iii) marcadores de etapa fetal pancreática y iv) marcadores de reprogramación de células β (por ejemplo, Mafa, 4,7 veces en RF1d; Pdx-1 3 veces durante la FMD, 5,07 veces en RF1d; y Ngn3, 21,5 veces durante la FMD, 45,6 veces en RF1d). (Figura 4B) (Zhou *et al.*, 2008). Estos cambios en la expresión genética sugieren que la FMD causa: i) una desdiferenciación de las células pancreáticas hacia la pluripotencia al final de la dieta seguida de una rediferenciación al linaje de células β pancreáticas durante la realimentación temprana (RF1d) o ii) reclutamiento de células con estas características desde fuera de los islotes pancreáticos. La evaluación de la expresión de proteínas de las células dentro de los islotes también se llevó a cabo mediante inmunotinción de proteínas

clave asociadas con el desarrollo pancreático (figura 4C y 4D). De acuerdo con los resultados de la matriz de qPCR (figura 4B), los inventores descubrieron proteicos de Sox17, como marcador del linaje temprano, estaban elevados al final de la FMD (FMD-4d) y los niveles proteicos de Ngn3, un marcador de progenitores endocrinos, aumentaban de forma transitoria durante la realimentación temprana (FMD-4d a RF1d) (figura 4C).

5 Para determinar si la conversión gradual de células β a partir de células desdiferenciadas se produce durante la realimentación temprana, se realizó una doble tinción para los marcadores de desarrollo específicos (es decir, Sox17, Pdx-1, Ngn3), en todos los puntos temporales de la FMD. También se midió la expresión de Oct4 (Pou5f1), que
10 previamente se había indicado que se expresaba en el núcleo de islotes pancreáticos adultos en asociación con la desdiferenciación de células β diabéticas relacionada con Foxo-1 (Talchai *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2013). La expresión de ARNm de Oct4 (Pou5f1) mostró una tendencia al aumento en ratones con FMD, que no es significativa (figura 4C, $p > 0,05$). Los resultados de la inmunotinción indican que Oct4 (Pou5f1) y Sox17 solo pueden coexpresarse de manera muy transitoria después de realimentación durante una noche (figura 13B, RF12h) seguida de una sólida expansión
15 de células Sox17⁺Pdx1⁺ y después Pdx1⁺Ngn3⁺ en RF1d (figura 4D y véase también la figura 13B para ver todos los puntos temporales). Aunque las células Ngn3⁺ también fueron detectables en ratones AV, estas estaban ubicadas principalmente fuera o en el borde de los islotes, de acuerdo con lo señalado en estudios previos (Baeyens *et al.*, 2014; Gomez *et al.*, 2015) (figura 4D). El número de células Ngn3⁺ aumentó tanto dentro como fuera de los islotes durante la FMD y la realimentación (figura 4D).

20 Estos resultados sugieren que, como resultado de la FMD y el ciclo de realimentación, los islotes pancreáticos contienen un número elevado de células con características de células progenitoras, que pueden diferenciarse y generar células productoras de insulina.

La FMD induce la expresión de Ngn3 para generar células β productoras de insulina

25 Las células Ngn3⁺ dentro de los islotes pancreáticos se han descrito previamente como células progenitoras capaces de generar todos los linajes de células endocrinas, incluidas las células β productoras de insulina, aunque la función de Ngn3 en la regeneración de células β adultas aún no está clara (Baeyens *et al.*, 2014; Van de Casteele *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2008). Para investigar si la FMD provoca la expresión *de novo* de Ngn3 y si las células Ngn3⁺ pueden
30 contribuir a la regeneración de células β inducida por la FMD, se generaron ratones indicadores de Ngn3-CreER;tdTomato^{LSL} para rastrear el linaje de posibles células que expresan Ngn3 y su descendencia en los ratones adultos tratados con la FMD (figura 5A). Para iniciar la recombinación de loxP para el rastreo del linaje, se administraron inyecciones de tamoxifeno en dosis bajas (2 mg por día, durante 3 días) que inducían la recombinación (maximizada a las 48 horas y minimizada en una semana) a ratones antes o después de la FMD y a ratones
35 alimentados a voluntad (control AV) (figura 5A). Los momentos de recogida de tejido son relativos al momento de la inyección y al de los tratamientos con FMD (figura 5A). Los resultados indican que la FMD indujo la expansión de los linajes derivados de Ngn3 (figura 5B y 5C). La caracterización de las células tdTomato⁺ mediante inmunotinción indica que las células tdTomato⁺ contribuyeron con el $50,8 \pm 8,3$ % del conjunto total de células beta después de la FMD (figura 5C, grupo C).

40 Para confirmar la contribución de los linajes de Ngn3 inducidos por la FMD en la reconstitución de las células beta secretoras de insulina, se generó otro modelo de ratón (Ngn3-CreER/LSL-R26R^{DTA}) y se realizaron experimentos de ablación de linaje tanto en ratones no diabéticos de referencia como en ratones tratados con STZ (figura 5D). Los resultados indican que la ablación del linaje Ngn3⁺ revirtió la regeneración de células β inducida por la FMD y sus
45 efectos sobre los niveles de glucosa en ayunas en los ratones de referencia sin exposición previa (figuras 5E, 5F y 13) y sobre las capacidades de eliminación de glucosa (ensayo IPGTT) en ratones diabéticos tratados con STZ (figura 5G), lo que confirma la generación inducida por la FMD de un linaje Ngn3 y sugiere una función fundamental para esta neogénesis de células β dependiente de Ngn3 en la homeostasis de la glucosa.

50 Las condiciones de ayuno o la inhibición de las vías de señalización de nutrientes promueven la expresión de Ngn3 y la producción de insulina en células pancreáticas humanas

Tanto en ratones como en seres humanos, la expresión de Ngn3 se produce justo antes y durante la generación de células endocrinas. La expresión del ARNm de Ngn3 en el páncreas del ratón en desarrollo alcanza su punto máximo
55 en torno a E15.5, lo que equivale aproximadamente a la semana 7-8 (etapas de Carnegie 21-22) del desarrollo humano. La expresión de Ngn3 en islotes de ratones adultos, aunque es poco habitual, se ha demostrado mediante un riguroso análisis de indicadores de linaje (Wang *et al.*, 2009). De acuerdo con los resultados de otros, los datos de los inventores (figuras 5 y 13) indican que las células Ngn3⁺ en los islotes pancreáticos de adultos son importantes para la regeneración de las células beta en ratones. Por otra parte, la función de Ngn3 en el desarrollo de los islotes
60 humanos y la regeneración de las células β en la edad adulta sigue sin conocerse bien (McKnight *et al.*, 2010).

Para investigar cómo las condiciones que imitan el ayuno afectan a la expresión de Ngn3 y las funciones de las células β en las células pancreáticas humanas, se realizaron experimentos *ex vivo* utilizando islotes pancreáticos humanos primarios (figura 6A). En resumen, se cultivaron los islotes pancreáticos de sujetos sanos y con DT1 (IS e IDT1,

respectivamente) según las instrucciones del fabricante. A continuación, los islotes cultivados se trataron con suero de sujetos inscritos en un ensayo clínico para probar los efectos de una FMD baja en proteínas y calorías que duró 5 días (NCT02158897)¹⁷. Se recogieron muestras de suero al inicio del estudio y el día 5 de la dieta que imita el ayuno en 5 sujetos. A continuación, se midió el IGF-1, la glucosa y los cuerpos cetónicos y se trataron los islotes pancreáticos humanos con el suero procedente del sujeto (figura 6B, tabla 2 (fig. 7)). Tanto en los islotes sanos como en los islotes con DT1 expuestos al suero de sujetos tratados con FMD, se observó una tendencia a la inducción dependiente de glucosa en la expresión de Sox2 y Ngn3 (figura 14A).

A continuación, se aplicó el medio que imita el ayuno (STS) con bajo contenido de glucosa y suero a los islotes pancreáticos cultivados y se descubrió que estimulaba significativamente la secreción de insulina tanto en IS como en IDT1 (figura 6C). Se investigó más a fondo la expresión de marcadores de reprogramación de linaje, que los inventores descubrieron que estaba regulada positivamente en ratones como resultado del tratamiento con FMD (es decir, Nanog, Sox17, Sox2, Ngn3 e Ins). Los resultados indican que las condiciones de imitación del ayuno tuvieron fuertes efectos en la inducción de la expresión de Sox2, Ngn3 e insulina en islotes pancreáticos humanos de sujetos sanos (islotes sanos, IS) y con DT1 (islotes con DT1, IDT1) (figura 6D-F). En células de sujetos humanos normales, estos efectos fueron revertidos por el tratamiento con IGF-1 (figura 6G). Cabe destacar que, en células con DT1 humanas, IGF-1 revirtió el aumento de la expresión de insulina y del gen de Sox 2, pero no la expresión de Ngn3 causada por el medio STS (figura 6G frente a figura 6D y 6E). Se justifican estudios futuros para investigar más a fondo la función del IGF-1 circulante en la expresión de marcadores de reprogramación de linaje y la regeneración de células de los islotes pancreáticos *in vivo*.

En los islotes humanos tanto sanos como con DT1, el medio STS redujo significativamente la actividad de PKA, un efecto revertido por el tratamiento con IGF-1 (figura 6H). También amortiguó la actividad de mTOR, que es un mediador clave de la señalización de aminoácidos (figura 6I). Para investigar más a fondo la función de estas vías de señalización de detección de nutrientes en la regulación de la expresión de marcadores de linaje (es decir, Sox2 y Ngn3), se probó la función de las vías de Tor-S6K y PKA, que actúan con posterioridad al IGF-1, en la reprogramación de las células pancreáticas. Los islotes pancreáticos humanos cultivados en medio estándar fueron tratados con rapamicina, que inhibe mTOR, y H89, que inhibe la PKA. El grupo de los inventores y otros han implicado mTOR y PKA en la regeneración de otros tipos celulares (Cheng *et al.*, 2014; Yilmaz *et al.*, 2012). Los inventores han descubierto que, en islotes humanos de sujetos con DT1 (IDT1), la expresión de los marcadores de linaje esenciales Sox2 y Ngn3 no fue inducida por la inhibición de mTOR o PKA, sino que se indujo significativamente cuando se inhibieron tanto mTOR como PKA (figura 6J y 6K). Curiosamente, la actividad constitutiva de mTOR, pero no la de PKA, tiene una tendencia mayor en las células IS en comparación con las IDT1 (figura 6I, carril 1 para ambos conjuntos para la actividad de mTOR y figura 6H para la actividad de PKA), lo que puede explicar las diferencias generales entre IS e IDT1 en la expresión de Sox2 y Ngn3 que se muestran en la figura 6J. Considerados en conjunto, estos resultados indican que el ayuno puede ser eficaz para promover la reprogramación del linaje y la generación de insulina en las células de los islotes pancreáticos, en parte mediante la reducción del IGF-1 y la inhibición de la señalización de Tor y PKA. Las células pancreáticas de sujetos con DT1 mostraron una actividad elevada de forma constitutiva de Tor-S6K y PKA, lo que apunta al potencial de inhibidores de ambas vías en la inducción de la reprogramación del linaje mediada por Ngn3. Estos resultados plantean la posibilidad de que el efecto de la FMD sobre la regeneración pancreática en sujetos con DT1 pueda imitarse o mejorarse mediante la inhibición farmacológica de estas vías.

Análisis

Durante el desarrollo del ratón, el día embrionario E8.5, las células progenitoras pancreáticas coexpresan los factores de transcripción de la secuencia HMG relacionados con SRY Sox17 y el factor de transcripción de homeodominio Pdx1. Estos progenitores pancreáticos multipotentes se convierten a continuación en células epiteliales bipotentes que generan células de los conductos o una población transitoria de células precursoras endocrinas que expresan el factor de bHLH Neurogenin3 (Ngn3). Los precursores endocrinos Ngn3⁺ dan lugar a todas las principales células endocrinas de los islotes, incluidas las células α glucagón⁺ y las células β insulina⁺ (Arnes *et al.*, 2012). En ratones, la expresión de Ngn3 en el páncreas en desarrollo es transitoria, detectable entre E11.5 y E18 (Arnes *et al.*, 2012). Hasta ahora se desconocía si los genes del desarrollo, incluidos Sox17, Pdx-1 y Ngn3, podían activarse para generar células β funcionales en adultos.

Tanto la terapia celular como el uso de citocinas y hormonas que estimulan la autorreplicación de las células β tienen el potencial de restaurar las células β productoras de insulina en pacientes diabéticos (Dirice *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de cierto éxito con la terapia basada en trasplantes, la escasez de páncreas de donantes unida a la conversión ineficiente de células madre en derivados especializados han representado obstáculos para la aplicación clínica, lo que sugiere que una regeneración exitosa de las células β podría depender de la activación coordinada y la reprogramación de progenitores endógenos (Blum *et al.*, 2014; Sneddon *et al.*, 2012; Wang *et al.*; Xiao *et al.*, 2013). Recientemente, esta reprogramación *in vivo* de linaje o transdiferenciación, se ha convertido en una estrategia emergente para regenerar células β (Cohen y Melton, 2011; Heinrich *et al.*, 2015) (Abad *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015).

En este estudio, los inventores han descubierto que una dieta que imita el ayuno (FMD) baja en proteínas y azúcar

provoca una reducción temporal del número de células β seguida de su retorno a niveles normales después de la realimentación, lo que sugiere una reprogramación del linaje *in vivo*. Los inventores muestran que la hiperglucemia y la insulinemia graves modelos de diabetes en ratones tanto T2 $Lepr^{db/db}$ tardía como T1 tratados con STZ estaban asociada con una deficiencia grave de células β en los islotes pancreáticos. Fueron necesarios de 6 a 8 ciclos de FMD y realimentación para restaurar la masa de células β , la función de secreción de insulina y devolver la glucosa en sangre en ayunas de 6 horas a niveles casi normales. En ratones de referencia no diabéticos, la porción de células beta por islote, además del número total de células β por páncreas se había reducido en aproximadamente un 60 % al final de una DFM de 4 días, pero su nivel normal se restableció por completo entre 3 y 5 días después de la realimentación. Además, los niveles de insulina y glucosa en sangre se redujeron en un 70 % o más al final del periodo de FMD, pero volvieron a los niveles normales en las 24 a 36 horas posteriores a la realimentación. Curiosamente, en ratones diabéticos, la mayoría de las células que residían en los islotes no expresaban insulina ni glucagón (es decir, no α/β). Este fenotipo también se encontró en ratones de referencia no diabéticos durante la FMD y estuvo acompañado por un aumento de otros tipos de células de transición (es decir, células $Pdx1$ +glucagón+ e insulina+glucagón+), seguido de una regeneración significativa de las células β tras la realimentación. Esto sugiere que la FMD altera el perfil de expresión genética que normalmente suprime la generación de células β . Lo que es más importante, estos resultados sugieren que la conversión del linaje inducida por la dieta que ocurre antes de la proliferación de las células β puede desempeñar una función importante en la regeneración de las células beta entre los modelos de ratones diabéticos y no diabéticos. Una posibilidad es que la expresión de glucagón e insulina se suprima transitoriamente en las células α y β durante la FMD, seguido de reprogramación del linaje en células comprometidas. Otra posibilidad es que la FMD pueda causar la muerte celular y después estimular progenitoras o

La FMD revirtió el perfil de expresión desdiferenciado de varios genes asociados con la diabetes juvenil de tipo 2 (MODY) y regulados por Foxo1 (Kim-Muller *et al.*, 2014). La FMD parece hacer que los islotes pancreáticos aumenten primero la expresión de Foxo1 y sus dianas transcripcionales, después inducir transitoriamente la expresión del marcador de células progenitoras Ngn3+ tras la realimentación, lo que lleva a la regeneración de las células β . Los inventores concluyen que, junto con los cambios en una amplia gama de citocinas asociadas con la regeneración de células β , la FMD y la realimentación posterior a la FMD generan las condiciones complejas y altamente coordinadas que promueven la generación de células β estables productoras de insulina para revertir el agotamiento grave de las células β . Los cambios clave que preparan las células de los islotes pancreáticos para la regeneración durante la FMD parecen ser la reducción de los niveles de IGF-1 y la consiguiente disminución de la actividad de PKA y mTor, de acuerdo con la función de estas vías en la autorrenovación de células madre hematopoyéticas (Cheng *et al.*, 2014) e intestinales (Yilmaz *et al.*, 2012). Se propuso que la desdiferenciación transitoria de las células β puede desempeñar una función en su dinámica *in vivo* (Kim-Muller *et al.*, 2014; Weinberg *et al.*, 2007). La capacidad de estas células desdiferenciadas para volver a diferenciarse cambia fundamentalmente el potencial terapéutico de las células existentes para promover la regeneración de las células β y revertir los síntomas de la DT1 (Blum *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Por lo tanto, el estudio de los inventores proporciona un ejemplo de una regulación dietética potente y coordinada de la determinación del destino celular con el potencial de actuar como intervención terapéutica para tratar la diabetes y otras enfermedades degenerativas. Sus resultados preliminares de un ensayo clínico piloto también indican que el uso de ciclos periódicos de FMD prolongada es factible y está listo para probar en grandes ensayos clínicos aleatorios para determinar los efectos tanto sobre la resistencia a la insulina como sobre la regeneración de las células β pancreáticas para el tratamiento de la DT1 y la DT2.

Modelo experimental y detalles de los sujetos en modelos de ratón. Todos los protocolos para animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (IACUC) de la Universidad del Sur de California (USC). Todos los ratones se mantuvieron en un ambiente sin patógenos y se alojaron en jaulas transparentes de tipo caja de zapatos en grupos de cinco animales por jaula con temperatura y humedad constantes y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h/12 h. Antes de suministrar la dieta FMD, los animales se transfirieron a jaulas nuevas para evitar que se alimentaran de comida residual y coprofagia. Todos los animales tuvieron acceso al agua en todo momento. A menos que se utilicen dietas experimentales de otra manera, los ratones fueron alimentados a voluntad con comida regular (por ejemplo, AIN93G).

DT1: Se realizó una inyección de estreptozotocina (STZ) en dosis altas (150 mg/kg) para inducir la DT1 para causar el agotamiento de las células β (pérdida >70 %) e hiperglucemia (>250 dl/ml) (Wu y Huan, 2008). Se pesaron ratones C57Bl6 macho (16 semanas, n=18) y se los dejó en ayunas de 4 a 6 horas antes de la inyección de STZ. En resumen, se disolvió STZ en tampón de citrato de sodio (pH 4,5, recién preparado) a una concentración de 10 mg/ml inmediatamente antes de su uso y la solución de STZ se administró por vía intraperitoneal (IP) en los 5 minutos posteriores a la preparación según el peso de los ratones. Se inyectó un volumen igual de tampón de citrato en ratones C57Bl6 machos y hembras (de 4 a 8 meses de edad, n=18) que se utilizaron como controles sanos. Los ratones fueron devueltos a su jaula y se les reemplazó la comida y se les proporcionó agua con sacarosa al 10 % para prevenir la hipoglucemia en los días inmediatamente posteriores a la inyección de STZ. DT2: Se adquirieron ratones macho de diez semanas BKS.Cg- $^{-/-}Lepr^{db/+}Jcl$ (db/db) y ratones de control BKS.Cg- $m^{+/+}Jcl$ (m/m) (n=15 para db/db y n=7 para control) de The Jackson Laboratory. Se utilizaron compañeros de camada de referencia de la misma edad como controles sanos. Salvo que se indique lo contrario, los ratones no estaban en ayunas en el momento de recoger el tejido. Todos los experimentos y procedimientos se realizaron según un protocolo aprobado por el Comité

Institucional de Uso y Cuidado de Animales (IACUC) en la Universidad del Sur de California (USC).

- Rastreo de linaje y ablación de linaje. Se criaron ratones Ngn3-CreER transgénicos hemicigóticos con ratones indicadores R26R^{CAG-LSL-tdTomato} para experimentos de rastreo de linaje o se criaron con ratones R26R^{DTA} para experimentos de ablación de linaje (Jackson Laboratory). Las inyecciones de tamoxifeno (TAM) se realizaron como se ha descrito anteriormente (Madisen *et al.*, 2010). En resumen, se inyectó TAM 75 mg/kg i.p. en los momentos de interés (como se indica en la figura 5B y la figura 5F). Se utilizaron ratones de ambos sexos (de 12 a 16 semanas de edad) n=6 para cada grupo, n=3 para control de vehículos.
- Islotes pancreáticos humanos: Se adquirieron células de Langerhans pancreáticas humanas de tipo 1 (n.º 35001-03) y el control no diabético (n.º 35002-04) de una fuente comercial Celprogen (Torrance, CA). Las células se sembraron al 80 % de confluencia y se cultivaron con medio estándar: Celprogen, M35002-04S para islotes sanos y M35001-03S para islotes DT1. Las células se sembraron a una densidad de 10⁵ por ml y se incubaron en un matraz del tamaño adecuado a 37 °C en una estufa humidificada con CO₂ al 5 %. Los medios se cambiaron cada 48 h. Cuando se alcanzó el 65-75 % de confluencia, las células se pasaron con Tripsina-EDTA (T1509-014) de Celprogen y se subcultivaron para su expansión.
- Sujetos humanos (FMD): Los sujetos del estudio fueron reclutados según protocolos aprobados por el IRB (n.º de aprobación HS-12-00391) de la Universidad del Sur de California (USC) en función de los criterios de inclusión y exclusión establecidos. Se obtuvo consentimiento informado de todos los sujetos. Los exámenes y pruebas incluyeron, pero sin limitación, extracciones de sangre mediante venopunción antes (AV) y después del 1^{er} Ciclo de FMD (FMD) y después de 5-8 días tras completar el 3^{er} ciclo de intervención dietética (FR). Se presentan los resultados preliminares de un conjunto de 6 a 8 sujetos sanos (véase la tabla 2 (fig. 7) para conocer los perfiles de estos individuos).
- Criterios para la inclusión de sujetos humanos: Voluntarios adultos en general sanos, sujetos de 18-70 años de edad, índice de masa corporal: 18,5 y más, capacidad y voluntad de proporcionar consentimiento informado por escrito, capacidad y voluntad de someterse a múltiples ciclos de un régimen dietético de 5 días, capacidad y voluntad de proporcionar muestras de sangre mediante venopunción. Criterios de exclusión: Cualquier afección médica importante y enfermedades crónicas, enfermedades mentales, incluidas la depresión grave y demencia, drogodependencia, terapia de reemplazo hormonal (DHEA, estrógeno, tiroides, testosterona), hipertensión grave (PA sistólica > 200 mm Hg y/o PA diastólica > 105 mm Hg), bajo peso (IMC < 18,5 kg/m²), mujeres embarazadas o lactantes, requisitos dietéticos especiales incompatibles con las intervenciones del estudio o alergias alimentarias, adicción al alcohol). Perfil: Los sujetos de este estudio tienen 49,1±6,9 años, con alturas de 166,7±4,7 cm, con pesos corporales de 63,32±4,8 kg al inicio y 61,36±4,3 al final de la FMD.

Detalles del método

- Dieta que imita el ayuno de los ratones (FMD): La versión para ratones de la FMD es un régimen de 4 días que utiliza ingredientes similares a la FMD humana (véase la tabla 3 (fig. 8)) (Brandhorst *et al.*, 2015). Todos los ingredientes de la dieta se mezclaron completamente y después se homogeneizaron con hidrogel calentado (ClearH2O, Maine). Los ratones fueron alimentados con el 50 % de la ingesta calórica diaria normal el día 1 y el 10 % de la ingesta calórica diaria normal los días 2 a 4. Todos los ratones recibieron alimento fresco durante las horas de la mañana (de 8 a 10). Naturalmente, los ratones con FMD tenían hambre y generalmente consumían la comida suministrada en unas pocas horas durante el ciclo de luz. Los animales con alimentación de control generalmente consumían el alimento suministrado durante las horas de oscuridad. Realimentación post-FMD: Después del final de la dieta del día 2-4, los ratones fueron alimentados a voluntad con comida normal durante un máximo de 10 días para recuperar el peso corporal antes de comenzar otros ciclos de FMD.
- Medición de glucosa e insulina en sangre. Salvo que se indique lo contrario, los ratones se mantuvieron en ayunas durante 6 horas (ayuno matutino) antes de las mediciones de glucosa en sangre. La glucosa en sangre se midió a través de sangrado de la vena de la cola con el uso del sistema de supervisión de glucosa en sangre OneTouch UltraMini (Lifescan, Milpitas, CA, EE.UU.). Los niveles de insulina en plasma se determinaron mediante un ensayo de inmunoabsorción enzimática en ratones (Mercodia, Winston-Salem, NC, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. Se extrajo sangre completa de la vena facial y el plasma se separó mediante centrifugación a 14 000 rpm durante 3 minutos en tubos separadores de plasma con heparina de litio (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). En resumen, se aplicaron alícuotas de 10 ml de muestras de plasma y calibradores en una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpo monoclonal de ratón antiinsulina. A continuación, se añadió a cada pocillo una solución de trabajo que contenía anticuerpo antiinsulina conjugado con peroxidasa (100 ml por pocillo) y la placa se puso en condiciones de agitación a temperatura ambiente (TA) durante 2 h. Después de seis lavados con tampón de lavado, se añadieron 200 ml de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina a cada pocillo y se dejaron incubar durante 15 min a TA. La reacción se detuvo con 0,5 mol/l de H₂SO₄ y se leyó la densidad óptica (DO) a 450 nm con el uso del lector de placas multietiqueta Victor3 (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.). Se dibujó una curva patrón trazando la DO₄₅₀ y la concentración de insulina de los calibradores con el uso del software de análisis de datos Sigmaplot 11 (Systat

Software Inc, San José, CA, EE.UU.) y se utilizó como referencia para extrapolar valores de muestra para concentraciones de insulina (Milanesi *et al.*, 2012; Villani *et al.*, 2014). La evaluación del modelo homeostático (HOMA) es un método utilizado para cuantificar la resistencia a la insulina (HOMA-IR) y la función de las células beta (%B). La HOMA-IR se calculó mediante la siguiente fórmula: $HOMA-B = (glucosa \text{ en ayunas} \times insulina) / 22,5$. La HOMA %B se calculó utilizando la siguiente fórmula: $HOMA-B = (20 \times insulina \text{ en ayunas}) / (glucosa \text{ en ayunas} - 3,5) \%$ (Matthews, 2001).

Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) y prueba de tolerancia a la insulina: Los ratones se colocaron en jaulas individuales y se mantuvieron en ayunas durante 4 horas antes de las inyecciones. Se inyectó por vía intraperitoneal glucosa (1,5 mg/g) o insulina (0,75 unidades/kg). Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los 5, 15, 30, 60 y 90 minutos después de la inyección.

Análisis de inmunofluorescencia. En resumen, las muestras pancreáticas se recogieron sin perfusión salina y se procesaron inmediatamente para inclusión en parafina e histología como se ha descrito anteriormente (Milanesi *et al.*, 2012; Villani *et al.*, 2014). Los tejidos se fijaron en formalina de tampón fosfato neutro al 10 % (Polysciences Inc, Warrington, PA, EE.UU.) durante 1 h a 4 °C y se almacenó en etanol al 70 % durante una noche a 4 °C. Posteriormente, los tejidos se deshidrataron con etanol graduado, tolueno y finalmente se incluyeron en parafina (TissuePrep, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EE.UU.). Se cortaron secciones pancreáticas (5 µm) con el uso de un microtomo rotatorio Leica RM2235 y se secaron durante una noche. Al día siguiente, las secciones se desparafinaron en el agente de clarificación Histochoice (Sigma-Aldrich) y se rehidrataron mediante series graduadas de etanol (100 %, 90 %, 70 %, 50 % y 30 %) seguido de enjuague en agua destilada antes de su uso. Se realizó una recuperación de antígenos mediada por calor con solución desmascaradora de antígenos (H-3300, Vector Laboratories) y las secciones se bloquearon con una solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 2 % durante 30 min a TA. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: antiinsulina (Abcam, ab8304), antiglucagón (Abcam, ab8055), anti-PCNA (Abcam, ab2426), anti-PDX1 (Abcam, ab47383). Los anticuerpos adicionales utilizados para los marcadores del desarrollo son el anticuerpo anti-Oct4 - para uso en ChIP (Abcam, n.º ab19857) y el mAb de conejo anti-Oct-4A (C30A3) (Cell Signaling, 2840P), anti-Sox17 (Santa Cruz Biotechnology n.º sc-17355) y anti-NGN3 (LifeSpan Biosciences, n.º LS-C97692). Las secciones se incubaron con anticuerpos primarios en una cámara humidificada durante 1 hora a TA. Después del lavado con PBS, las secciones se incubaron durante 30 min a TA con anticuerpos secundarios, respectivamente, inmunoglobulina (Ig)G de burro antirratón Alexa-fluor 555, IgG de burro anticonejo Alexa-fluor 488, anticabra 647 Alexa-fluor (dilución 1/500). Todos los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo se adquirieron de Life Technologies. Las secciones se montaron con medio de montaje Vectashield con 40,6-diamidino-2-fenilindol (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Las imágenes de las secciones teñidas se capturaron utilizando un objetivo 10x, 20x o 40x como se indica en las leyendas de las figuras con un microscopio fluorescente Leica AF6000. La doble tinción para células Pdx1⁺Glucagón⁺, células Insulina⁺Glucagón⁺ y células Ngn3⁺tdTomato⁺glucagón⁺ se verificaron mediante imágenes confocales (Zeiss LSM 710). Se midieron los números de células o áreas de interés de 3 a 5 ratones por grupo, 6-8 secciones de páncreas por ratón para 20-30 islotes por condición por punto temporal. El "área de los islotes" se midió como se ha descrito anteriormente (Brereton *et al.*, 2014). Básicamente, se midió el área transversal total de islotes por 2,5 mm² de sección de páncreas (%). Véanse también las figuras 10-12 para conocer los recuentos absolutos de células por islote, los números y/o el área de los islotes por sección de páncreas.

Aislamiento de islotes pancreáticos. Se aislaron islotes pancreáticos de ratones como se ha descrito anteriormente (Li *et al.*, 2009). En resumen, los ratones se sacrificaron mediante inhalación de CO₂ y se procesaron inmediatamente para perfusión pancreática. El páncreas se perfundió con 3 ml de collagenasa P (Roche Diagnostics Corp, 1-1,5 mg/ml, aprox. 1000 U/ml) disuelta en HBSS. La solución de collagenasa se inyectó insertando una aguja 30G1/2-G en el conducto colédoco a través del sitio de unión del conducto hepático bajo un microscopio de disección. Después de la distensión completa del páncreas, el tejido se digirió mediante incubación a 37 °C durante 30 min en un total de 2 ml de solución de digestión. El tejido digerido se agitó vigorosamente y posteriormente se lavó dos veces en HBSS que contenía CaCl₂. Los islotes se purificaron utilizando filtros de células Falcon (Fisher Scientific) y se seleccionaron manualmente con un microscopio de disección. Los islotes se lavaron con PBS y se usaron para extraer el ARN total para el análisis de qPCR (> 40 µM de tamaño) o se incubaron en soluciones HBSS para el ensayo SIEG (tamaño promedio entre 40 y 70 µM) en una estufa humidificada (95 % de aire, 5 % de CO₂) a 37 °C.

Matriz de qPCR de identificación de linaje celular

El ARN total se extrajo de los islotes purificados mediante el método de columna utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante y se cuantificó con el sistema Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA). El ADNc se obtuvo del ARN extraído mediante retrotranscripción con el kit RT2 First Strand (SABiosciences, Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se añadió el ADNc de cada muestra a la mezcla maestra de qPCR RT2 SYBR Green y se dividieron en alícuotas para el análisis de la expresión génica en matrices específicas para la identificación del linaje de células de ratón (PAMM-508Z, SABiosciences). El análisis genético, incluidos valores significativos y factores de cambios, se realizó con la herramienta en línea proporcionada por SABiosciences (www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php).

Ensayo de secreción de insulina estimulada por glucosa (SIEG). Los islotes purificados aislados se incubaron en medio RPMI1640 (que contenía 11 mmol/l de glucosa y complementado con 100 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de penicilina, 2 mmol/l de glutamina y 10 % de FBS) durante una noche a 37 °C (5 % de CO₂) y, a continuación, se pasan
 5 manualmente al siguiente medio para el ensayo de SIEG: preparación sin glucosa en tampón HEPES (pH 7,4, que contiene NaCl 125 mM, KCl 5,9 mM, MgCl₂ 1,2 mM y CaCl₂ 1,28 mM, 1 mg/ml de BSA) durante 45 min y después se transfirió al medio acondicionado con glucosa basal (2,5 G) (10 islotes por pocillo en 500 µl de medio de ensayo que contenía glucosa 2,5 mM) durante 60 min. Luego se lavaron los islotes en medio sin glucosa durante 5 minutos y, a
 10 continuación, se transfirieron a un medio de estimulación con glucosa (25 G) que contenía glucosa 25 mM durante 60 minutos. El medio se recogió en los momentos indicados (figura 1K). El experimento SIEG se realizó al menos tres veces y por triplicado en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos con 10 islotes del mismo tamaño por pocillo. Los lavados entre tratamientos se realizaron bajo un microscopio de disección para conservar el número de islotes durante todo el ensayo.

15 Perfilado de citocinas. Se utilizó un inmunoensayo de 23 factores de citocinas de ratón (BIO-RAD, EE.UU.) para realizar la detección cuantitativa simultánea de múltiples analitos a partir de una única muestra de suero.

Tratamientos de islotes pancreáticos humanos y qPCR: Las células se trataron durante 36 h con: Medio estándar: Celprogen, M35002-04S para islotes sanos y M35001-03S para islotes DT1). Condición STS (0,5 g/litro de glucosa; 2 % de FBS), H89 (20 µM) (Sigma-Aldrich), rapamicina (RAPA) (20 nM) (LC Laboratories, Woburn, MA, EE.UU.), IGF1 (40 ng/ml) (ProSpec, East Brunswick, NJ, EE.UU.) y ARNip de PKA (Cell signaling, 6574S). Para silenciar PKA, las células se sembraron al 80 % de confluencia, después de 24 h, se transfectaron durante 48 h con ARNip de PKA 100 nM (Cell signaling, 6574S) utilizando el reactivo Lipofectamine RNAiMax (ThermoFisher) según las instrucciones del fabricante. El ARN total se extrajo utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen) según las instrucciones del fabricante y se cuantificó con el uso del sistema Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). En resumen, se extrajo 1 µg de ARN total utilizando el kit RNeasy Mini y se transcribió de forma inversa con la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen) y la detección de los diferentes transcritos (*Ngn3*, *Sox2*, *Insulina* y 18S como gen de referencia) se realizó utilizando el kit de qPCR Kapa sybr fast (KAPA BIOSYSTEMS) según las instrucciones del fabricante. El nivel de expresión se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real en un Roche LightCycler 480II. La expresión génica se cuantificó mediante el método Ct comparativo.

Transferencia de Western: Los lisados celulares totales se prepararon utilizando el reactivo de extracción de proteínas M-Per (ThermoScientific, Rockford, IL, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La concentración de proteínas se midió con el ensayo de BCA (Thermo Scientific). Se desnaturalizaron con calor cantidades iguales de proteína (60 µg) en un tampón de muestras reductor de marcador de carril (Thermo Scientific), se resolvieron mediante SDS-PAGE usando minigeles de proteínas de Tris-glicina 4-20 % Novex (Thermo Scientific) y se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore, Darmstadt, Alemania). Los filtros se bloquearon en BSA al 5 % durante 1 h a temperatura ambiente y después se incubaron durante una noche a 4 °C con anticuerpo primario dirigido contra p70 S6 cinasa y fosfo-p70 S6 cinasa (Thr389) (MAb de conejo de Cell Signaling n.º 2708, mAb de conejo n.º 9234) y anticuerpo contra beta-tubulina (Millipore, n.º 05-661). Se utilizó IgG conjugada con peroxidasa (Santa Cruz, CA, EE.UU.) como anticuerpo secundario. Los complejos inmunitarios unidos a membranas se detectaron mediante un sistema de quimioluminiscencia mejorado ultrasensible (Thermo Scientific) en una película sensible a fotones (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Milán, Italia). La cuantificación se realizó mediante análisis densitométrico utilizando el software ImageJ64.

45 Actividad PKA: La actividad de PKA se midió utilizando el kit de actividad de cinasa de PKA (Enzo Life Science, Inc. Farmingdale, NY, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

Ayuno que imita la dieta en seres humanos: La versión humana de la FMD es una formulación patentada que pertenece a L-Nutra (<http://l-nutra.com/prolon/>). Es una dieta basada en plantas diseñada para lograr efectos similares a los del ayuno sobre los niveles séricos de IGF-I, IGFBP1, glucosa y cuerpos cetónicos al tiempo que proporciona macro y micronutrientes para minimizar la carga del ayuno y los efectos adversos (Brandhorst *et al.*, 2015). El día 1 de la FMD suministra ~4600 kJ (11 % de proteínas, 46 % de grasas, 43 % de hidratos de carbono), mientras que los días 2-5 proporcionan ~3000 kJ (9 % de proteínas, 44 % de grasas, 47 % de hidratos de carbono) por día. La FMD comprende formulaciones patentadas de sopas de verduras, barritas energéticas, bebidas energéticas, aperitivos de patatas fritas, infusión y un suplemento que aporta altos niveles de minerales, vitaminas y ácidos grasos esenciales (fig. 11). Todos los artículos que se van a consumir al día se empaquetaron individualmente para permitir a los sujetos elegir cuándo comer y evitar consumir accidentalmente los componentes del día siguiente. Para los sujetos humanos, se proporcionó un plan de alimentación sugerido que distribuye los alimentos del estudio para consumir como desayuno, almuerzo, merienda y cena. Véanse las listas a continuación para ver ingredientes y complementos:

60 Ingredientes de la FMD:

Sopa de champiñones: harina de arroz, zanahoria en polvo, cebolla seca, champiñones en polvo, inulina (fibra de achicoria), champiñones secos, sal, extracto de levadura, almidón de patata, aceite de oliva, perejil seco, aromas

naturales.

Sopa de verduras: harina de arroz, cebolla seca, inulina (fibra de achicoria), tomate seco, zanahoria seca, sal, pimiento rojo seco, puerro seco, almidón de patata, aceite de oliva, albahaca liofilizada, espinacas en polvo, perejil seco, aromas naturales.

- 5 Sopa de tomate: harina de arroz, tomate seco en polvo, cebolla seca, trozos de tomate seco, zanahoria seca, fibra de achicoria, almidón de patata, aceite de oliva, sal, extracto de levadura, albahaca seca, perejil seco, aromas naturales.

Sopa de calabaza: calabaza en polvo, harina de arroz, inulina (fibra de achicoria), zanahoria seca, sal, extracto de levadura, almidón de patata, aceite de oliva, cebolla seca, perejil seco, aromas naturales.

- 10 Barrita energética: harina de almendra, manteca de nuez de macadamia, miel, pacanas, coco, harina de linaza, aceite de coco, extracto de vainilla, sal marina.

Galletas de col rizada: col rizada, semillas de lino amarillo, semillas de girasol, anacardos, semillas de sésamo, levadura nutricional, vinagre de sidra de manzana, semillas de cáñamo, semillas de calabaza, sal marina, cebolla en polvo, eneldo, pimienta negra

- 15 Cápsula de aceite de algas: aceite de algas, gelatina, glicerina, agua purificada, cúrcuma, extracto de bija
Infusiones: manzanilla, hierbabuena o limón

Bebida energética: agua purificada, glicerina vegetal natural, polilisina.

Complementos:

- 20 vitamina A (en forma de Betacaroteno), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina D (en forma de colecalciferol), vitamina E (en forma de acetato de DL-alfa tocoferol), vitamina K (en forma de fitonadiona), tiamina (en forma de mononitrato de tiamina), riboflavina, niacina (en forma de niacinamida), vitamina B6 (en forma de piridoxina HCl), ácido fólico, vitamina B12 (en forma de cianocobalamina), biotina, ácido pantoténico (en forma de calcio-D-pantotenato), calcio (en forma de carbonato de calcio y fosfato de calcio tribásico), hierro (en forma de fumarato ferroso), fósforo (en forma de fosfato de calcio tribásico), yodo (en forma de yodo potásico), magnesio (en forma de óxido de magnesio), zinc (óxido de zinc), selenio (en forma de selenato de sodio), cobre (en forma de sulfato cúprico), manganeso (en forma de sulfato de manganeso), cromo (en forma de picolinato de cromo), molibdeno (en forma de molibdato de sodio). Mezcla patentada: remolacha en polvo, espinacas en polvo, tomates en polvo, zanahorias en polvo, berzas en polvo, hoja de berza (col rizada) en polvo. Otros ingredientes: ácido esteárico, celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, croscarmelosa sódica, estearato de magnesio, dióxido de silicio, esmalte farmacéutico.
- 30

- Jaulas metabólicas: La grasa corporal total y la masa magra se midieron de forma no invasiva utilizando el escáner de resonancia magnética nuclear de dominio temporal LF90 (Bruker Optics, Inc). Los parámetros calorimétricos indirectos y de equilibrio energético, incluido el consumo de alimentos/agua, el gasto de energía, el coeficiente respiratorio (CR) y la actividad física se evaluaron de forma no invasiva durante 10 días utilizando jaulas metabólicas (TSE Systems Inc., Chesterfield, MO, EE.UU.).
- 35

- Cuantificación y análisis estadístico. Todos los experimentos presentados en las figuras 1 a 4 se repitieron al menos tres veces de forma independiente y los de las figuras 5 y 6 se repitieron dos veces. Todas las muestras representan réplicas biológicas. Salvo que se indique lo contrario en las leyendas de las figuras, todos los valores centrales mostrados en los gráficos se refieren a la media. Para la significación estadística de las diferencias entre las medias de dos grupos, se utilizaron pruebas de t de Student bilaterales. La significación estadística de las diferencias entre múltiples grupos (≥ 3) se calculó realizando múltiples comparaciones de ANOVA de las medias para cada grupo. No se excluyeron muestras ni animales del análisis y no se utilizaron estimaciones del tamaño de las muestras. Los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos. Los estudios no se realizaron con enmascaramiento, con excepción de todos los análisis histológicos.
- 40
- 45

Bibliografía

- 50 Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Canamero, M., Rayon, T., Ors, I., Grana, O., Megias, D., Dominguez, O., Martinez, D., *et al.* (2013). Reprogramming *in vivo* produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* 502, 340-345.
- 55 Arakawa, K., Ishihara, T., Oku, A., Nawano, M., Ueta, K., Kitamura, K., Matsumoto, M. y Saito, A. (2001). Improved diabetic syndrome in C57BL/KsJ-db/db mice by oral administration of the Na(+)-glucose cotransporter inhibitor T-1095. *British journal of pharmacology* 132, 578-586.
- Arnes, L., Hill, J.T., Gross, S., Magnuson, M.A. y Sussel, L. (2012). Ghrelin expression in the mouse pancreas defines a unique multipotent progenitor population. *PloS one* 7, e52026.
- 60 Baeyens, L., Lemper, M., Leuckx, G., De Groef, S., Bonfanti, P., Stange, G., Shemer, R., Nord, C., Scheel, D.W., Pan, F.C., *et al.* (2014). Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice. *Nature biotechnology* 32, 76-83.
- Barnosky, A.R., Hoddy, K.K., Unterman, T.G. y Varady, K.A. (2014). Intermittent fasting vs daily calorie restriction for type 2 diabetes prevention: a review of human findings. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine* 164, 302-311.

- Blum, B., Roose, A.N., Barrandon, O., Maehr, R., Arvanites, A.C., Davidow, L.S., Davis, J.C., Peterson, Q.P., Rubin, L.L. y Melton, D.A. (2014). Reversal of beta cell de-differentiation by a small molecule inhibitor of the TGFbeta pathway. *eLife* 3, e02809.
- 5 Brandhorst, S., Choi, I.Y., Wei, M., Cheng, C.W., Sedrakyan, S., Navarrete, G., Dubeau, L., Yap, L.P., Park, R., Vinciguerra, M., *et al.* (2015). A Periodic Diet that Mimics Fasting Promotes Multi-System Regeneration, Enhanced Cognitive Performance, and Healthspan. *Cell Metab* 22, 86-99.
- Brereton, M.F., Iberl, M., Shimomura, K., Zhang, Q., Adriaenssens, A.E., Proks, P., Spiliotis, I., Dace, W., Mattis, K.K., Ramracheya, R., *et al.* (2014). Reversible changes in pancreatic islet structure and function produced by elevated blood glucose. *Nature communications* 5, 4639.
- 10 Cheng, C.W., Adams, G.B., Perin, L., Wei, M., Zhou, X., Lam, B.S., Da Sacco, S., Mirisola, M., Quinn, D.I., Dorff, T.B., *et al.* (2014). Prolonged fasting reduces IGF-1/PKA to promote hematopoietic-stem-cell-based regeneration and reverse immunosuppression. *Cell stem cell* 14, 810-823.
- Chera, S., Baronnier, D., Ghila, L., Cigliola, V., Jensen, J.N., Gu, G., Furuyama, K., Thorel, F., Gribble, F.M., Reimann, F., *et al.* (2014). Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic delta-cells into insulin producers. *Nature* 514, 503-507.
- 15 Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.C., Jorns, A., Lenzen, S. y Eizirik, D.L. (2005). Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2, S97-107.
- Cohen, D.E. y Melton, D. (2011). Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine. *Nature reviews Genetics* 12, 243-252.
- 20 Cook, J.R., Matsumoto, M., Banks, A.S., Kitamura, T., Tsuchiya, K. y Accili, D. (2015). A Mutant Allele Encoding DNA-Binding-Deficient Foxo1 Differentially Regulates Hepatic Glucose and Lipid Metabolism. *Diabetes*.
- Dirice, E., Kahraman, S., Jiang, W., El Ouaamari, A., De Jesus, D.F., Teo, A.K., Hu, J., Kawamori, D., Gaglia, J.L., Mathis, D., *et al.* (2014). Soluble factors secreted by T cells promote beta-cell proliferation. *Diabetes* 63, 188-202.
- 25 Dor, Y. y Glaser, B. (2013). beta-cell dedifferentiation and type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* 368, 572-573.
- Fiorina, P., Shapiro, A.M., Ricordi, C. y Secchi, A. (2008). The clinical impact of islet transplantation. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8, 1990-1997.
- 30 Gomez, D.L., O'Driscoll, M., Sheets, T.P., Hruban, R.H., Oberholzer, J., McGarrigle, J.J. y Shamblo, M.J. (2015). Neurogenin 3 Expressing Cells in the Human Exocrine Pancreas Have the Capacity for Endocrine Cell Fate. *PLoS one* 10, e0133862.
- Grunnet, L.G., Aikin, R., Tonnesen, M.F., Paraskevas, S., Blaabjerg, L., Stoning, J., Rosenberg, L., Billestrup, N., Maysinger, D. y Mandrup-Poulsen, T. (2009). Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells. *Diabetes* 58, 1807-1815.
- 35 Haeusler, R.A., Hartil, K., Vaitheeswaran, B., Arrieta-Cruz, I., Knight, C.M., Cook, J.R., Kammoun, H.L., Febbraio, M.A., Gutierrez-Juarez, R., Kurland, I.J., *et al.* (2014). Integrated control of hepatic lipogenesis versus glucose production requires FoxO transcription factors. *Nature communications* 5, 5190.
- Heinrich, C., Spagnoli, F.M. y Berninger, B. (2015). *In vivo* reprogramming for tissue repair. *Nature cell biology* 17, 204-211.
- 40 Hsu, F.L., Huang, C.F., Chen, Y.W., Yen, Y.P., Wu, C.T., Uang, B.J., Yang, R.S. y Liu, S.H. (2013). Antidiabetic effects of pteroin A, a small-molecular-weight natural product, on diabetic mouse models. *Diabetes* 62, 628-638.
- Johnson, J.D., Han, Z., Otani, K., Ye, H., Zhang, Y., Wu, H., Horikawa, Y., Miesler, S., Bell, G.I. y Polonsky, K.S. (2004). RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets. *J Biol Chem* 279, 24794-24802.
- 45 Kim-Muller, J.Y., Zhao, S., Srivastava, S., Mugabo, Y., Noh, H.L., Kim, Y.R., Madiraju, S.R., Ferrante, A.W., Skolnik, E.Y., Prentki, M., *et al.* (2014). Metabolic inflexibility impairs insulin secretion and results in MODY-like diabetes in triple FoxO-deficient mice. *Cell Metab* 20, 593-602.
- Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazar, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., Cunningham, J., *et al.* (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo*. *Nature biotechnology* 26, 443-452.
- 50 Laviano, A. y Rossi Fanelli, F. Toxicity in chemotherapy--when less is more. *The New England journal of medicine* 366, 2319-2320.
- Lebastchi, J. y Herold, K.C. (2012). Immunologic and metabolic biomarkers of beta-cell destruction in the diagnosis of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2, a007708.
- 55 Li, D.S., Yuan, Y.H., Tu, H.J., Liang, Q.L. y Dai, L.J. (2009). A protocol for islet isolation from mouse pancreas. *Nature protocols* 4, 1649-1652.
- Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., *et al.* (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature neuroscience* 13, 133-140.
- 60 Maehr, R., Chen, S., Snitow, M., Ludwig, T., Yagasaki, L., Golland, R., Leibel, R.L. y Melton, D.A. (2009). Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 15768-15773.
- Matthews, D.R. (2001). Insulin resistance and beta-cell function--a clinical perspective. *Diabetes, obesity & metabolism* 3 Suppl 1, S28-33.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F. y Turner, R.C. (1985). Homeostasis

- model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412-419.
- McKnight, K.D., Wang, P. y Kim, S.K. (2010). Deconstructing pancreas development to reconstruct human islets from pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 6, 300-308.
- 5 Meier, J.J., Butler, A.E., Saisho, Y., Monchamp, T., Galasso, R., Bhushan, A., Rizza, R.A. y Butler, P.C. (2008). Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57, 1584-1594.
- Milanesi, A., Lee, J.W., Li, Z., Da Sacco, S., Villani, V., Cervantes, V., Perin, L. y Yu, J.S. (2012). beta-Cell regeneration mediated by human bone marrow mesenchymal stem cells. *PloS one* 7, e42177.
- 10 Mu, J., Woods, J., Zhou, Y.P., Roy, R.S., Li, Z., Zychband, E., Feng, Y., Zhu, L., Li, C., Howard, A.D., *et al.* (2006). Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes* 55, 1695-1704.
- Pagliuca, F.W., Millman, J.R., Gurtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J.H., Peterson, Q.P., Greiner, D. y Melton, D.A. (2014). Generation of functional human pancreatic beta cells *in vitro*. *Cell* 159, 428-439.
- 15 Pipeleers, D., Keymeulen, B., Chatenoud, L., Hendrickx, C., Ling, Z., Mathieu, C., Roep, B. e Ysebaert, D. (2002). A view on beta cell transplantation in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 958, 69-76.
- Rabinovitch, A. (1998). An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes/metabolism reviews* 14, 129-151.
- Raffaghello, L., Lee, C., Safdie, F.M., Wei, M., Madia, F., Bianchi, G. y Longo, V.D. (2008). Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 8215-8220.
- 20 Sneddon, J.B., Borowiak, M. y Melton, D.A. (2012). Self-renewal of embryonic-stem-cell-derived progenitors by organ-matched mesenchyme. *Nature* 491, 765-768.
- Stanger, B.Z. (2008). HNF4A and diabetes: injury before insult? *Diabetes* 57, 1461-1462.
- 25 Talchai, C., Xuan, S., Lin, H.V., Sussel, L. y Accili, D. (2012). Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell* 150, 1223-1234.
- Talchai, S.C. y Accili, D. (2015). Legacy Effect Of Foxo1 In Pancreatic Endocrine Progenitors On Adult beta-cell Mass And Function. *Diabetes*.
- Teta, M., Long, S.Y., Wartschow, L.M., Rankin, M.M. y Kushner, J.A. (2005). Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* 54, 2557-2567.
- 30 Tonne, J.M., Sakuma, T., Deeds, M.C., Munoz-Gomez, M., Barry, M.A., Kudva, Y.C. e Ikeda, Y. Global gene expression profiling of pancreatic islets in mice during streptozotocin-induced beta-cell damage and pancreatic Glp-1 gene therapy. *Dis Model Mech* 6, 1236-1245.
- Van de Castele, M., Leuckx, G., Baeyens, L., Cai, Y., Yuchi, Y., Coppens, V., De Groef, S., Eriksson, M., Svensson, C., Ahlgren, U., *et al.* (2013). Neurogenin 3+ cells contribute to beta-cell neogenesis and proliferation in injured adult mouse pancreas. *Cell death & disease* 4, e523.
- 35 Villani, V., Milanesi, A., Sedrakyan, S., Da Sacco, S., Angelow, S., Conconi, M.T., Di Liddo, R., De Filippo, R. y Perin, L. (2014). Amniotic fluid stem cells prevent beta-cell injury. *Cytotherapy* 16, 41-55.
- Wang, S., Jensen, J.N., Seymour, P.A., Hsu, W., Dor, Y., Sander, M., Magnuson, M.A., Serup, P. y Gu, G. (2009). Sustained Neurog3 expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 9715-9720.
- 40 Wang, Z., York, N.W., Nichols, C.G. y Remedi, M.S. Pancreatic beta Cell Dedifferentiation in Diabetes and Redifferentiation following Insulin Therapy. *Cell Metab* 19, 872-882.
- Wang, Z., York, N.W., Nichols, C.G. y Remedi, M.S. (2014). Pancreatic beta cell dedifferentiation in diabetes and redifferentiation following insulin therapy. *Cell Metab* 19, 872-882.
- 45 Weinberg, N., Ouziel-Yahalom, L., Knoller, S., Efrat, S. y Dor, Y. (2007). Lineage tracing evidence for *in vitro* dedifferentiation but rare proliferation of mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* 56, 1299-1304.
- Weir, G.C., Aguayo-Mazzucato, C., y Bonner-Weir, S. (2013). beta-cell dedifferentiation in diabetes is important, but what is it? *Islets* 5, 233-237.
- 50 Wu, K.K. y Huan, Y. (2008). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol* capítulo 5, unidad 5 47.
- Xiao, X., Chen, Z., Shiota, C., Prasad, K., Guo, P., El-Gohary, Y., Paredes, J., Welsh, C., Wiersch, J. y Gittes, G.K. (2013). No evidence for beta cell neogenesis in murine adult pancreas. *The Journal of clinical investigation* 123, 2207-2217.
- 55 Xu, J., Du, Y. y Deng, H. (2015). Direct lineage reprogramming: strategies, mechanisms, and applications. *Cell stem cell* 16, 119-134.
- Xu, X., D'Hoker, J., Stange, G., Bonne, S., De Leu, N., Xiao, X., Van de Castele, M., Mellitzer, G., Ling, Z., Pipeleers, D., *et al.* (2008). Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132, 197-207.
- 60 Yilmaz, O.H., Katajisto, P., Lamming, D.W., Gultekin, Y., Bauer-Rowe, K.E., Sengupta, S., Birsoy, K., Dursun, A., Yilmaz, V.O., Selig, M., *et al.* (2012). mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature* 486, 490-495.
- Yin, D., Tao, J., Lee, D.D., Shen, J., Hara, M., Lopez, J., Kuznetsov, A., Philipson, L.H. y Chong, A.S. (2006). Recovery of islet beta-cell function in streptozotocin- induced diabetic mice: an indirect role for the spleen. *Diabetes* 55, 3256-3263.

Zhernakova, A., Alizadeh, B.Z., Eerligh, P., Hanifi-Moghaddam, P., Schloot, N.C., Diosdado, B., Wijmenga, C., Roep, B.O. y Koeleman, B.P. (2006). Genetic variants of RANTES are associated with serum RANTES level and protection for type 1 diabetes. *Genes and immunity* 7, 544-549.

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J. y Melton, D.A. (2008). *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455, 627-632.

5

REIVINDICACIONES

1. Un paquete de dieta que comprende un primer conjunto de raciones de una primera composición de dieta para administrar durante un periodo de tiempo predeterminado de 5 días, a un sujeto; proporcionando dicha primera composición de dieta:
 - menos de 40 gramos de azúcar el día 1;
 - menos de 30 gramos de azúcar los días 2 a 5 y los días restantes; menos de 28 gramos de proteína el día 1;
 - menos de 18 gramos de proteína los días 2 a 5 y los días restantes
 - 20-100 gramos de grasas monoinsaturadas el día 1;
 - 6-30 gramos de grasas poliinsaturadas el día 1;
 - 2-12 gramos de grasas saturadas el día 1;
 - 10-50 gramos de grasas monoinsaturadas los días 2 a 5 y los días restantes;
 - 3-15 gramos de grasas poliinsaturadas los días 2 a 5 y los días restantes;
 - 1-30 gramos de grasas saturadas los días 2 a 5, o los días restantes; y
 - una composición de micronutrientes cada día y los días restantes; para su uso para tratar la diabetes DT1 como agente promotor de la regeneración de células B pancreáticas en un sujeto diabético con DT1 al que además se le administra durante dicho periodo de tiempo predeterminado un inhibidor de PKA y/o Tor.
2. El paquete de dieta según la reivindicación 1, para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho inhibidor de Tor es rapamicina.
3. El paquete de dieta según la reivindicación 1, para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho inhibidor de PKA o Tor se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un antagonista o una molécula pequeña que bloquea el IGF-1R, rapamicina que inhibe mTOR, H89 que inhibe PKA y combinaciones de los mismos.
4. El paquete de dieta según la reivindicación 1, para su uso según la reivindicación 1, en donde comprende:
 - una sopa de champiñones que contiene harina de arroz, zanahoria en polvo, cebolla seca, champiñones en polvo, inulina, champiñones secos, sal, extracto de levadura, almidón de patata, aceite de oliva, perejil seco, aromas naturales;
 - una sopa de verduras que contiene harina de arroz, cebolla seca, inulina, tomate seco, zanahoria seca, sal, pimiento rojo seco, puerro seco, almidón de patata, aceite de oliva, albahaca liofilizada, espinacas en polvo, perejil seco, aromas naturales;
 - una sopa de tomate que contiene harina de arroz, tomate seco en polvo, cebolla seca, trozos de tomate seco, zanahoria seca, fibra de achicoria, almidón de patata, aceite de oliva, sal, extracto de levadura, albahaca seca, perejil seco, aromas naturales;
 - una sopa de calabaza que contiene calabaza en polvo, harina de arroz, inulina, zanahoria seca, sal, extracto de levadura, almidón de patata, aceite de oliva, cebolla seca, perejil seco, aromas naturales.
 - una barrita energética que contiene harina de almendras, manteca de nuez de macadamia, miel, pacanas, coco, harina de linaza, aceite de coco, extracto de vainilla, sal marina.
 - galletas de col rizada que contienen col rizada, semillas de lino amarillo, semillas de girasol, anacardos, semillas de sésamo, levadura nutricional, vinagre de sidra de manzana, semillas de cáñamo, semillas de calabaza, sal marina, cebolla en polvo, eneldo, pimienta negra;
 - una cápsula de aceite de algas que contiene aceite de algas, gelatina, glicerina, agua purificada, cúrcuma, extracto de bija;
 - infusiones que contienen manzanilla, hierbabuena o limón;
 - una bebida energética que contiene agua purificada, glicerina vegetal natural, polilisina; y
 - suplementos que contienen vitamina A en forma de betacaroteno, vitamina C, vitamina D en forma de colecalciferol, vitamina E en forma de acetato de dl-alfa tocoferol, vitamina K en forma de fitonadiona, tiamina en forma de mononitrato de tiamina, riboflavina, niacina en forma de niacinamida, vitamina B6 en forma de piridoxina HCl, ácido fólico, vitamina B12 en forma de cianocobalamina, biotina, ácido pantoténico en forma de d-pantotenato de calcio, calcio en forma de carbonato cálcico y fosfato cálcico tribásico, hierro en forma de fumarato ferroso, fósforo en forma de fosfato cálcico tribásico, yodo en forma de yodo potásico, magnesio en forma de óxido de magnesio, óxido de zinc, selenio en forma de selenato de sodio, cobre en forma de sulfato cúprico, manganeso en forma de sulfato de manganeso, cromo en forma de picolinato de cromo, molibdeno en forma de molibdato de sodio y una mezcla de remolacha en polvo, espinacas en polvo, tomates en polvo, zanahorias en polvo, berzas en polvo, berzas en forma de col rizada en polvo, otros ingredientes: ácido esteárico, celulosa microcristalina, fosfato dicálcico, croscarmelosa sódica, estearato de magnesio, dióxido de silicio, esmalte farmacéutico.

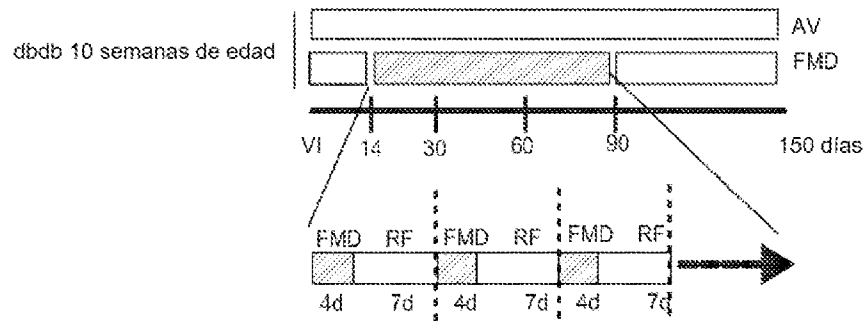


Fig. 1A

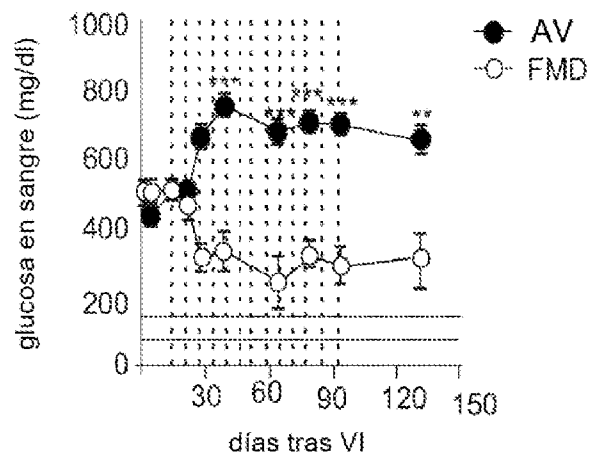


Fig. 1B

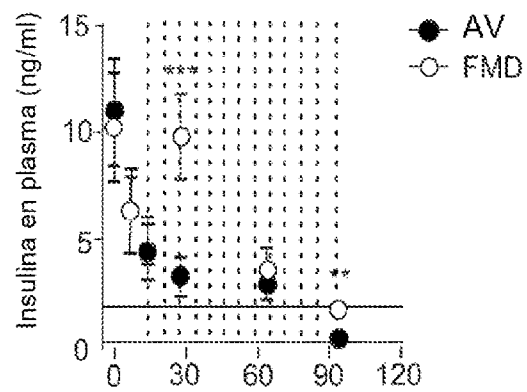


Fig. 1C

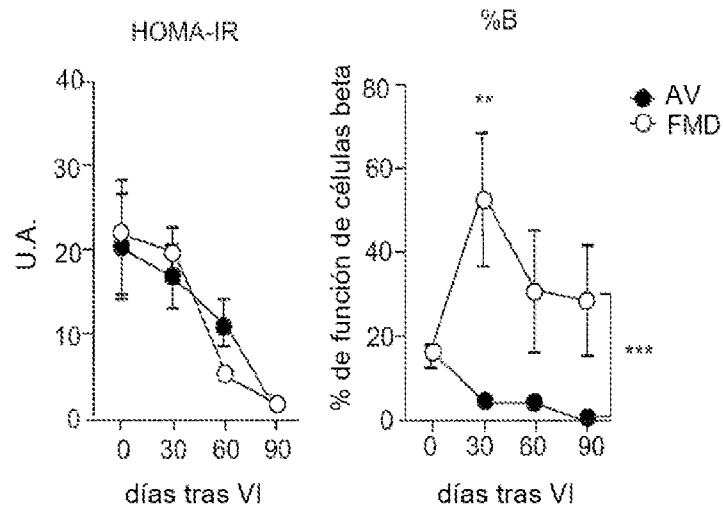


Fig. 1D

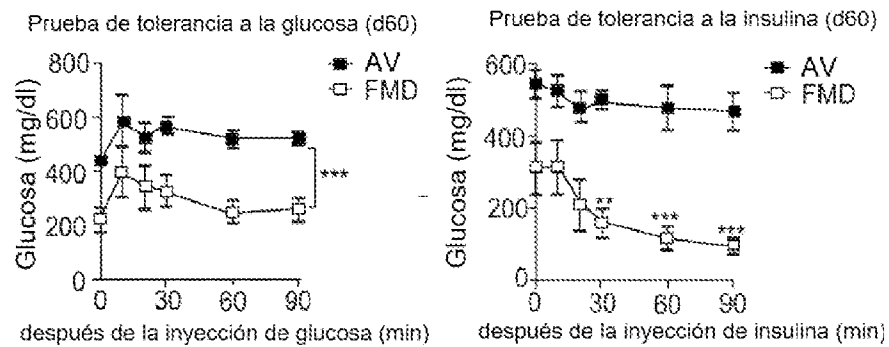


Fig. 1E

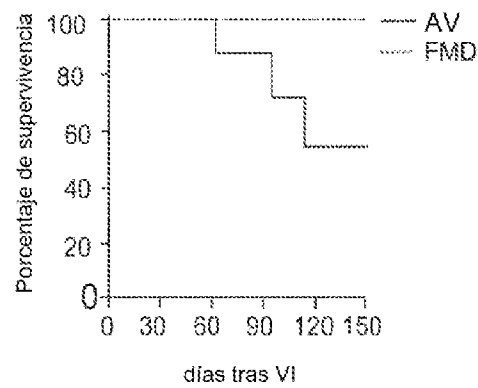


Fig. 1F

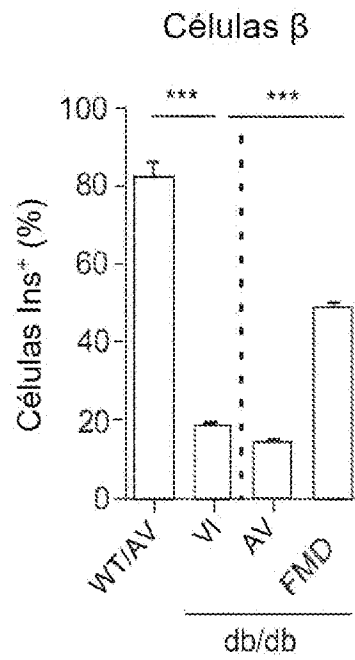


Fig. 1G

Células β proliferativas

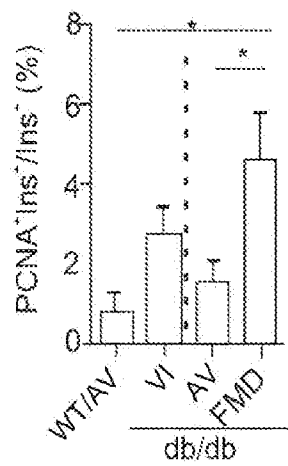


Fig. 1H

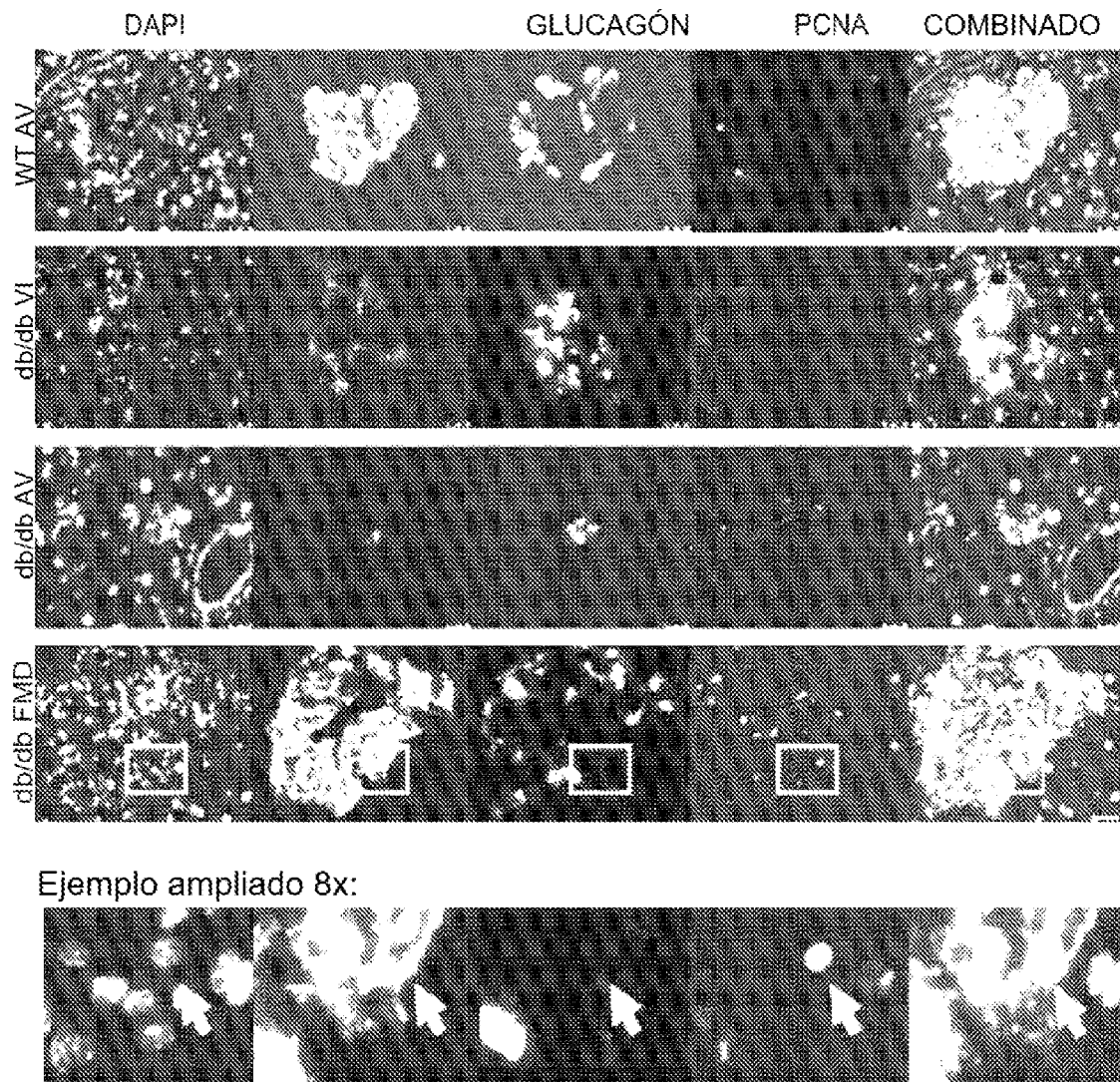


Fig. 1l

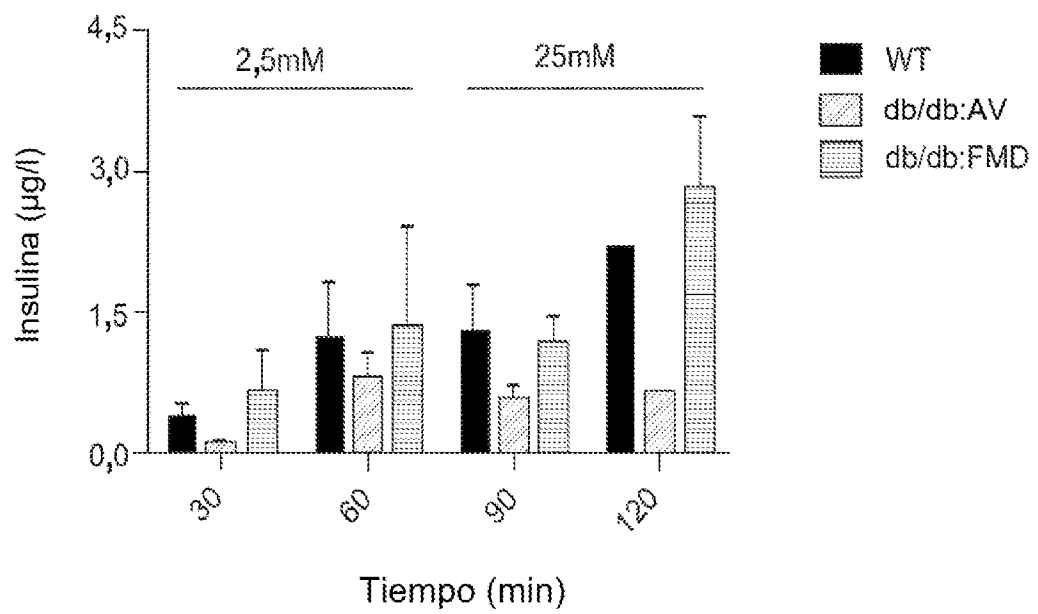
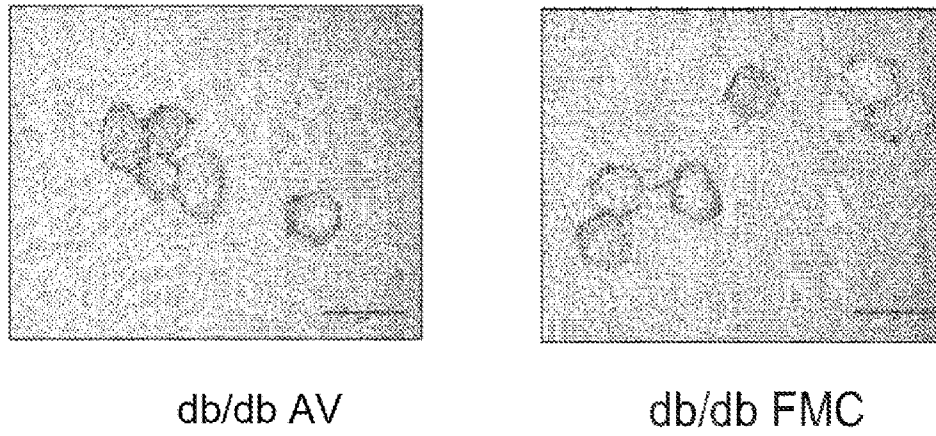


Fig. 1J

Dosis alta de STZ

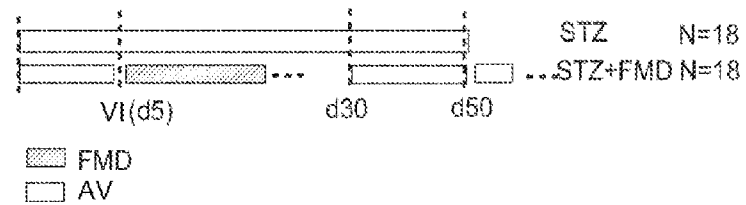


Fig. 2A

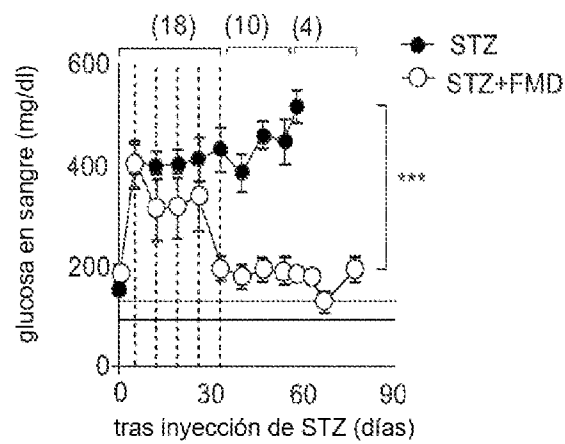


Fig. 2B

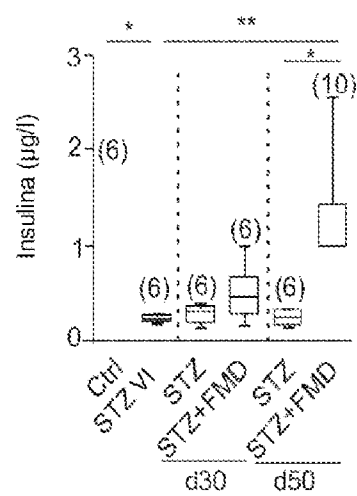


Fig. 2C

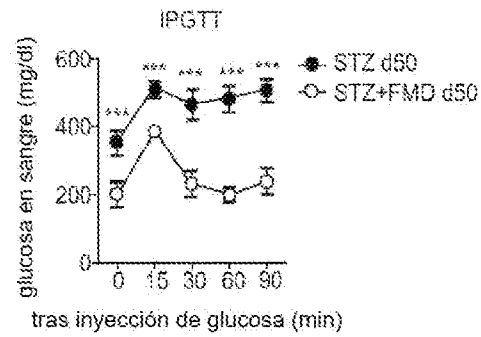


Fig. 2D

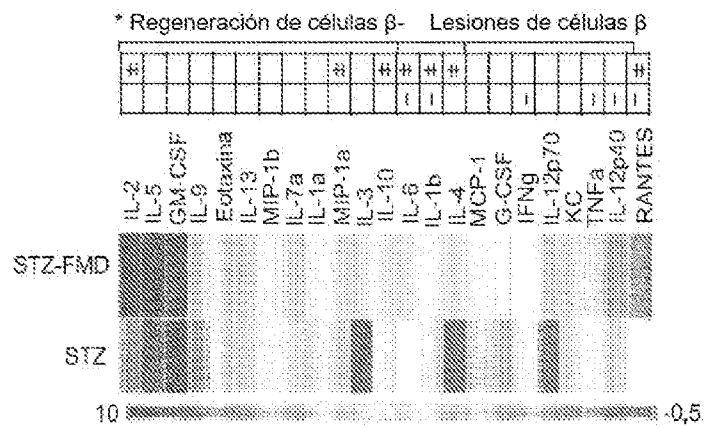


Fig. 2E

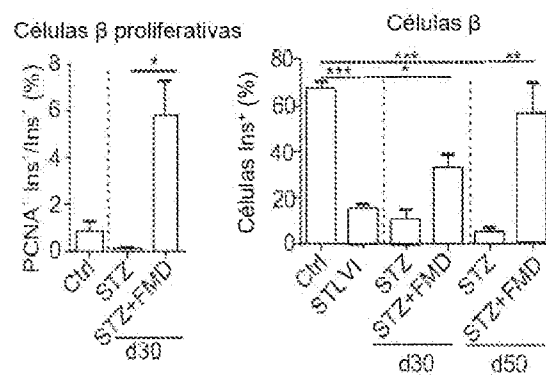


Fig. 2F

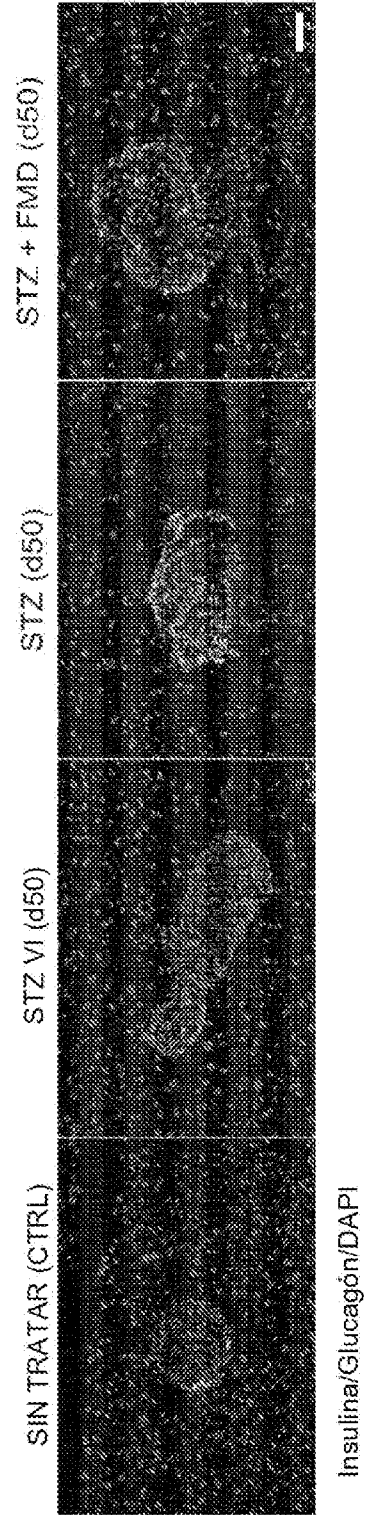


Fig. 2G

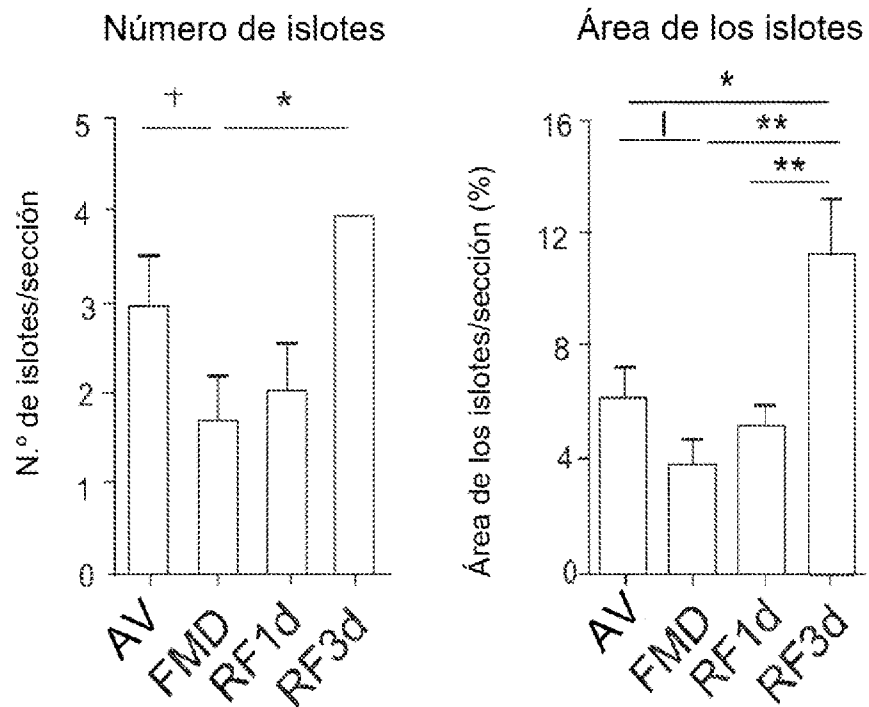


Fig. 3A

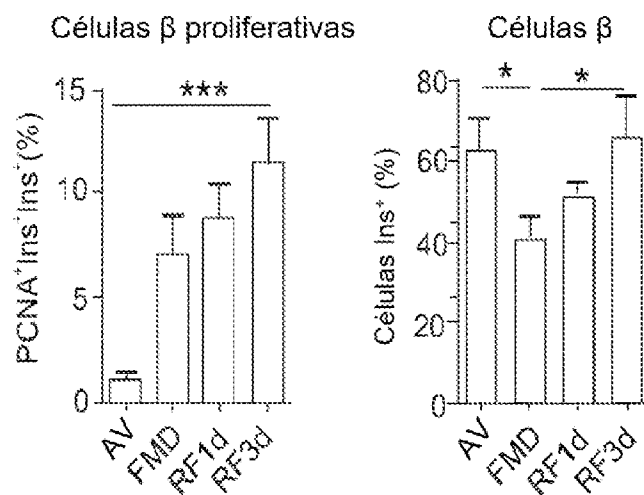


Fig. 3B

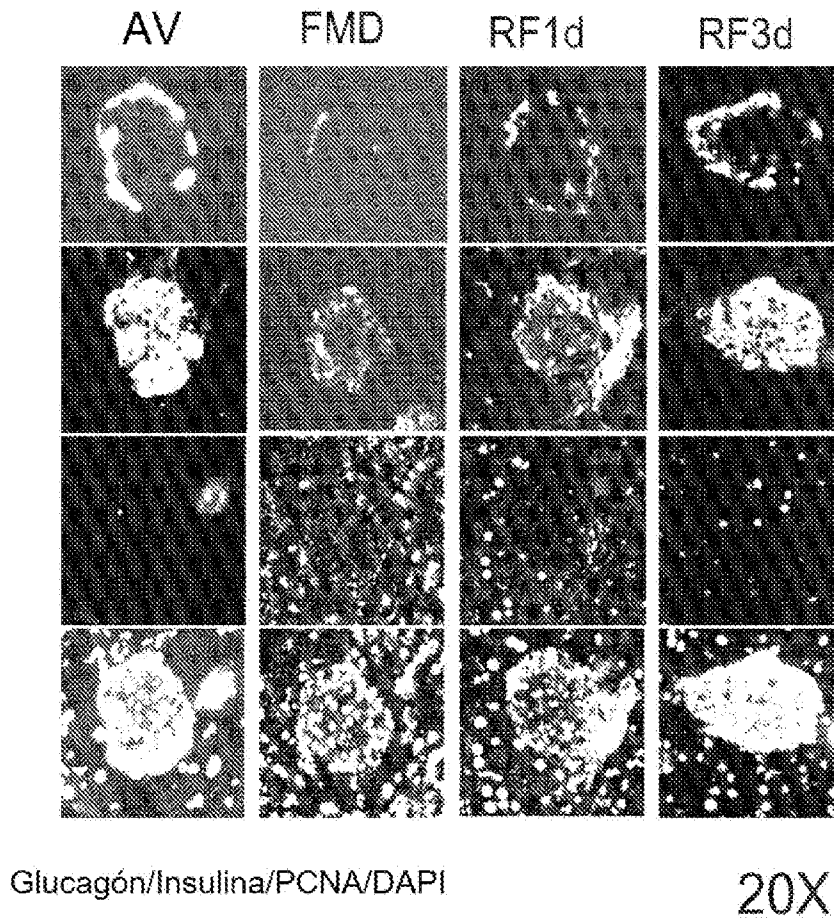


Fig. 3C

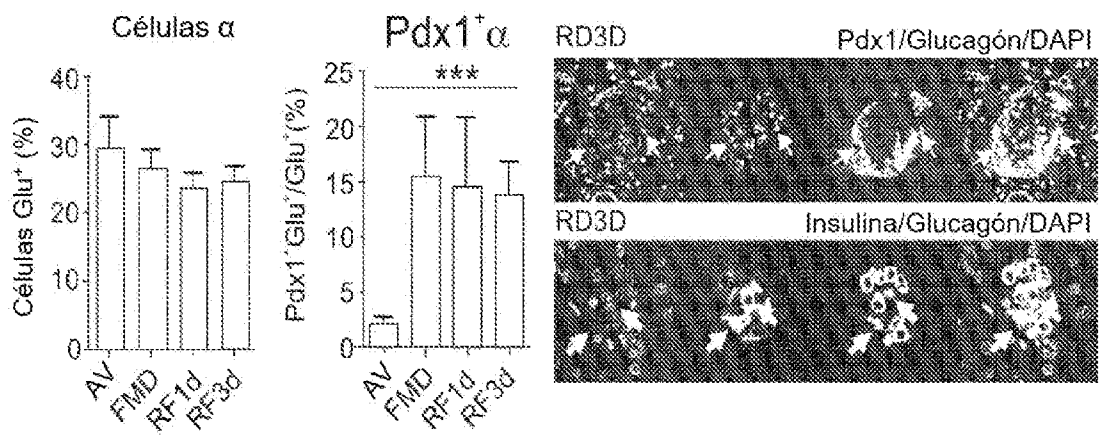


Fig. 3D

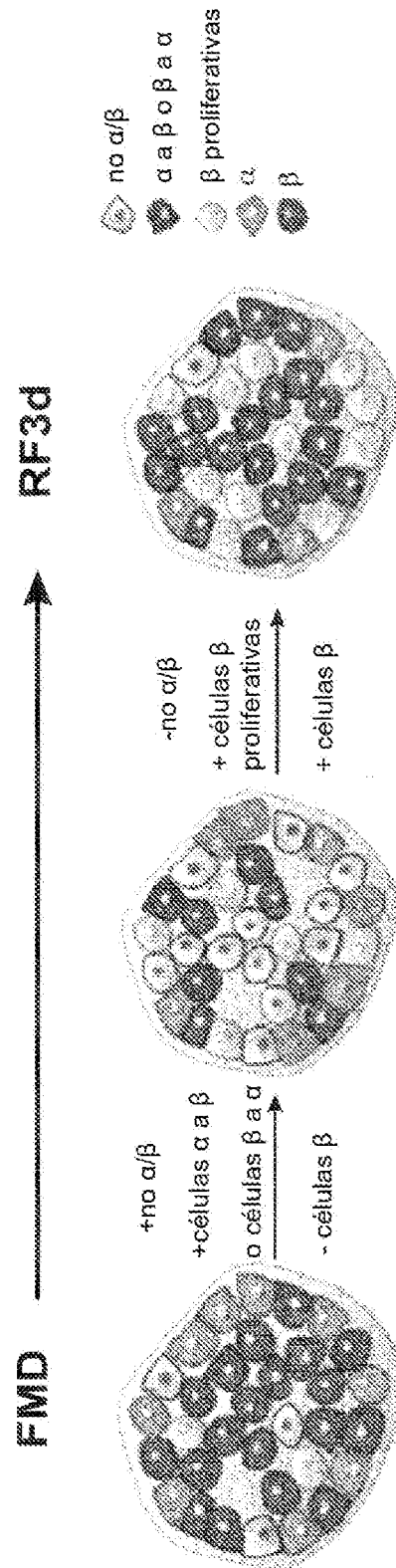


Fig. 3E

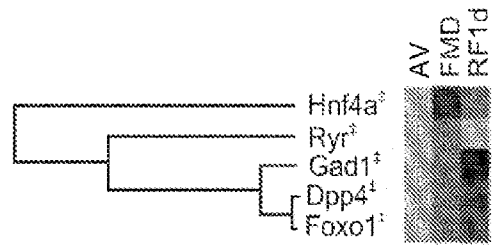


Fig. 4A

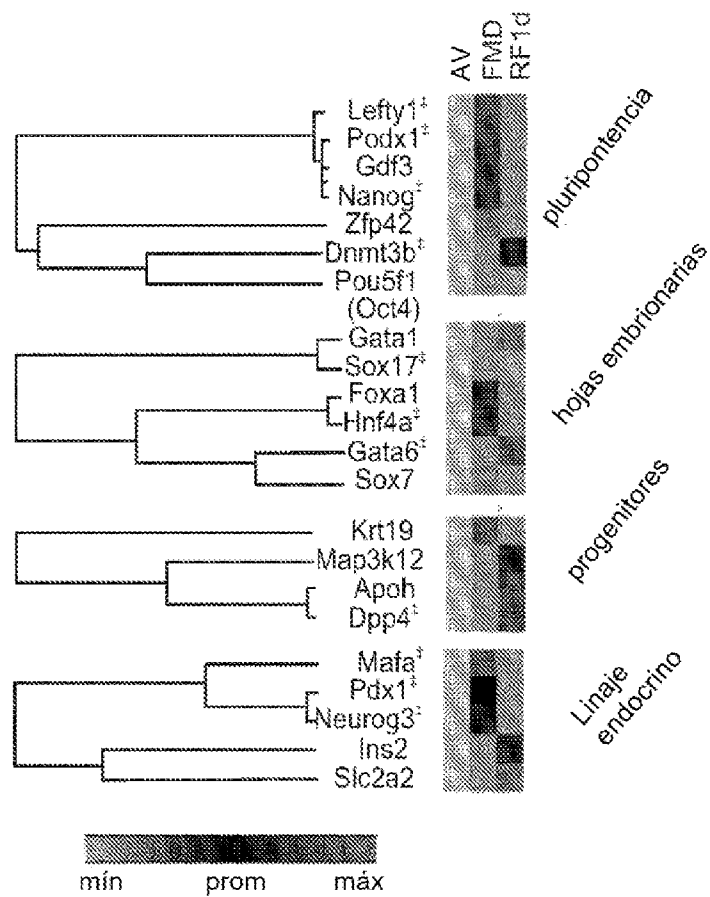


Fig. 4B

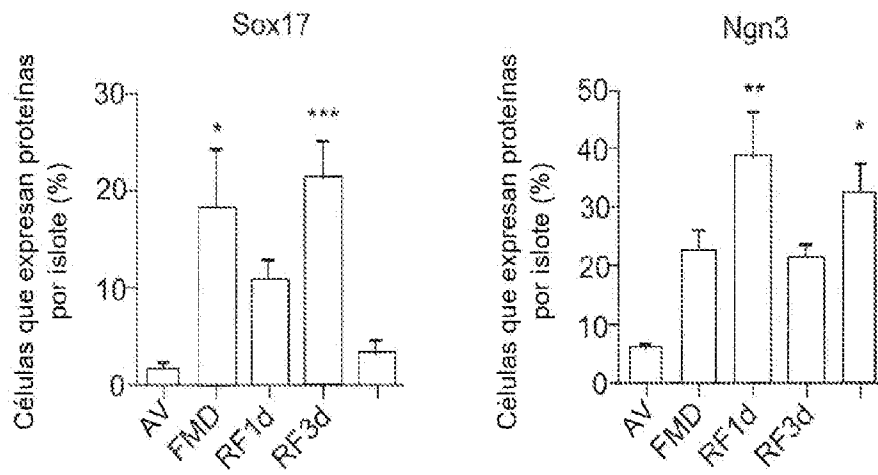


Fig. 4C

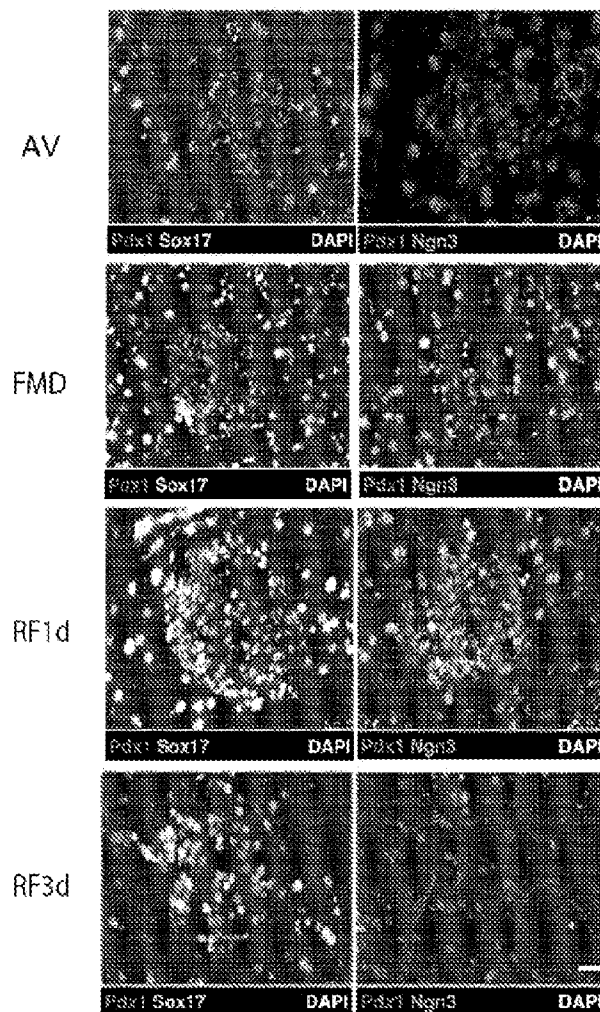


Fig. 4D

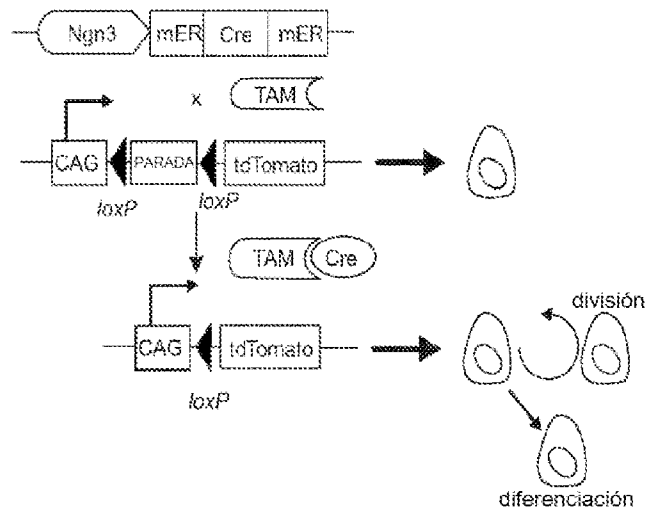


Fig. 5A

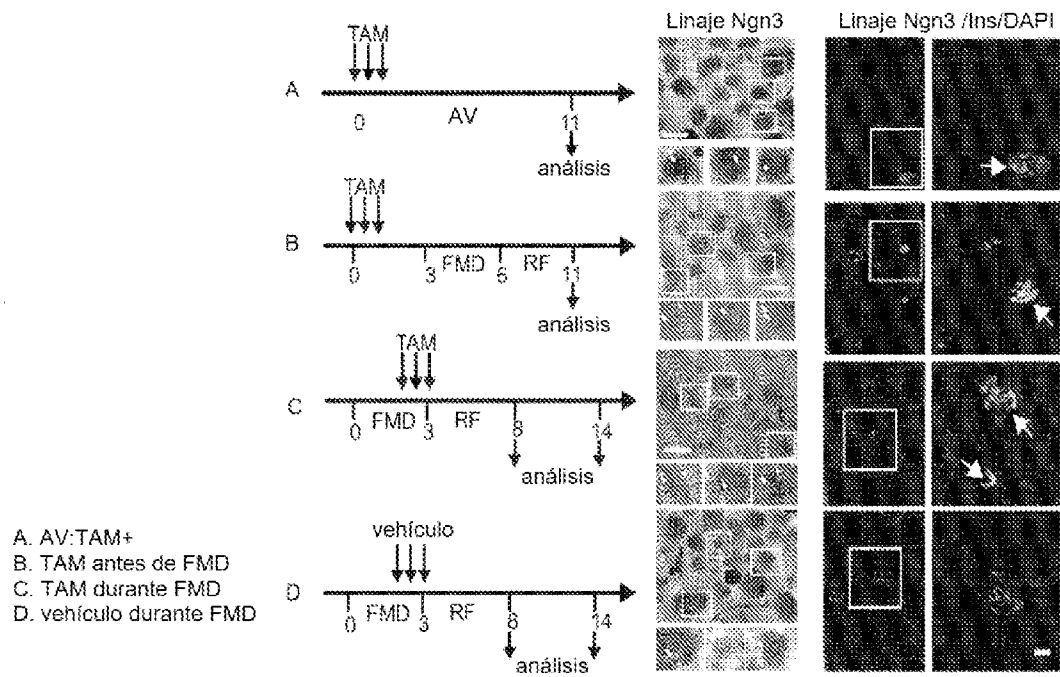


Fig. 5B

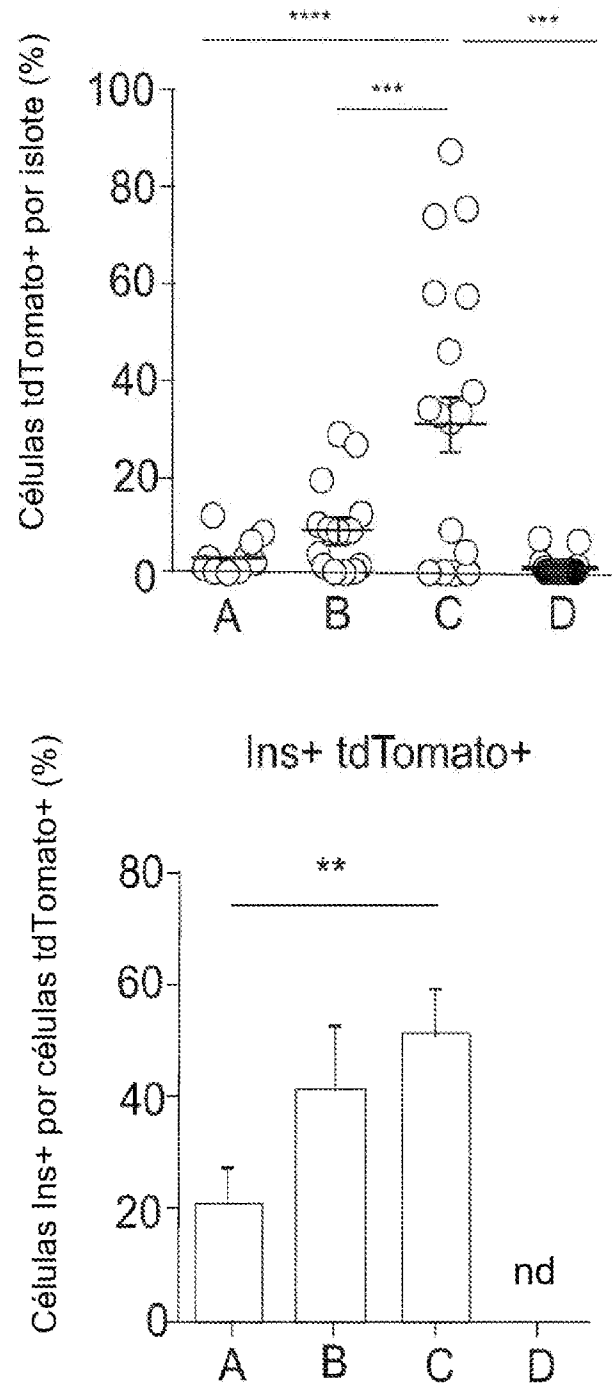


Fig. 5C

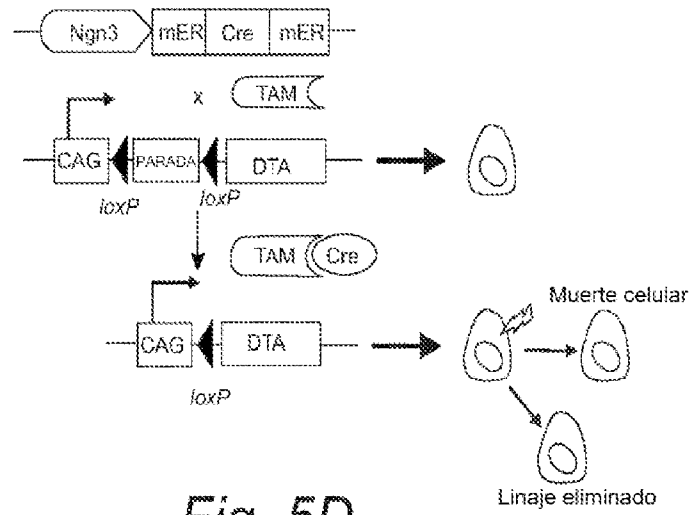


Fig. 5D

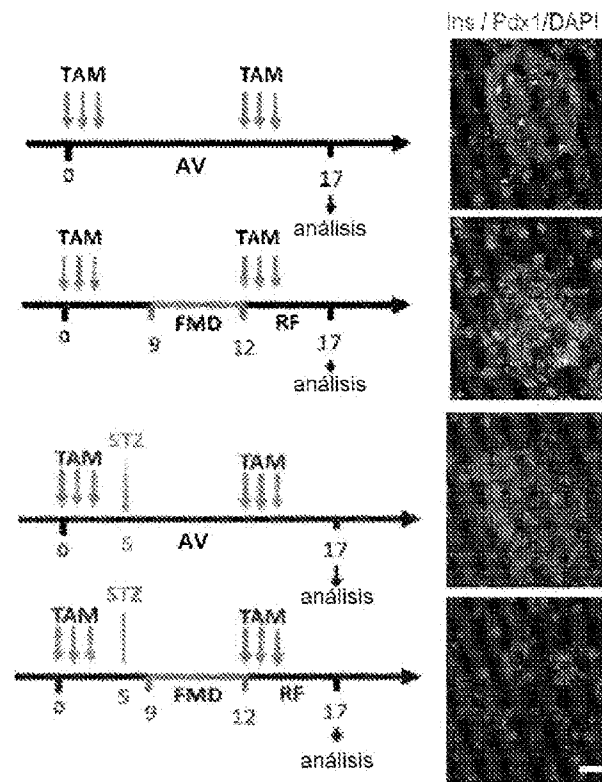


Fig. 5E

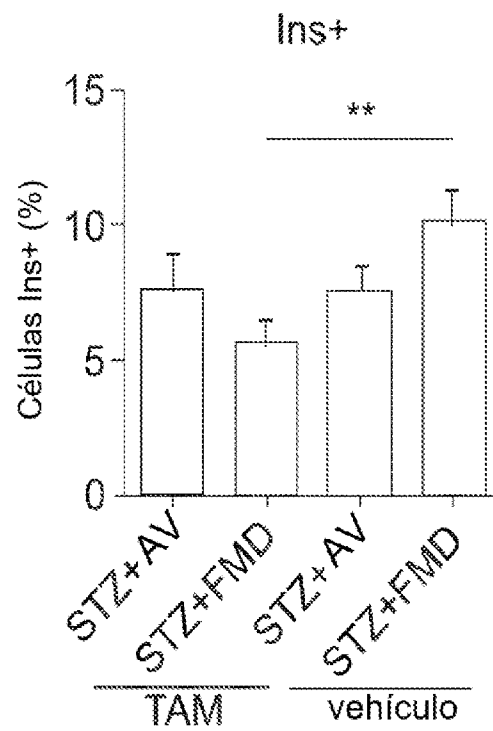
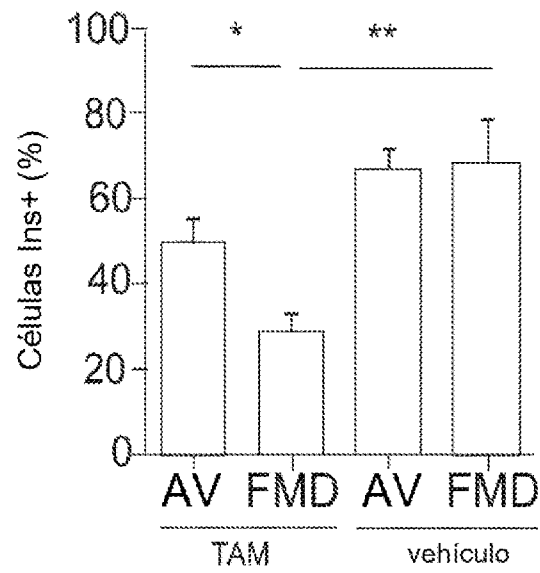


Fig. 5F

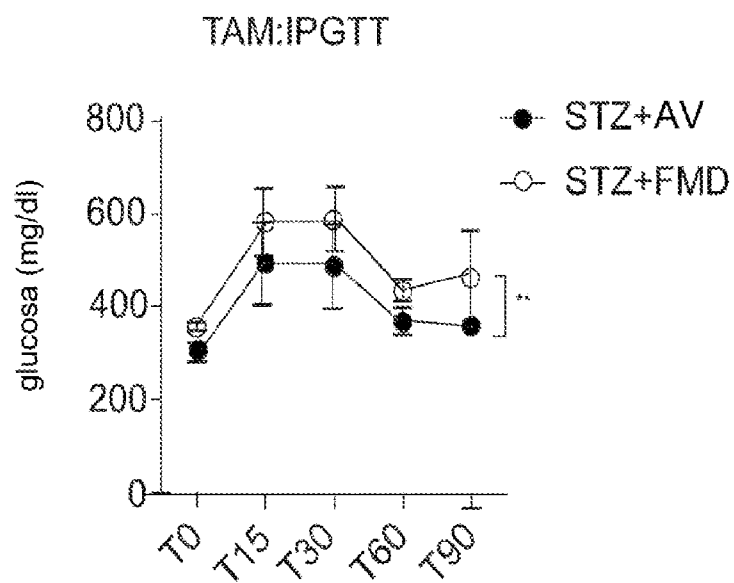
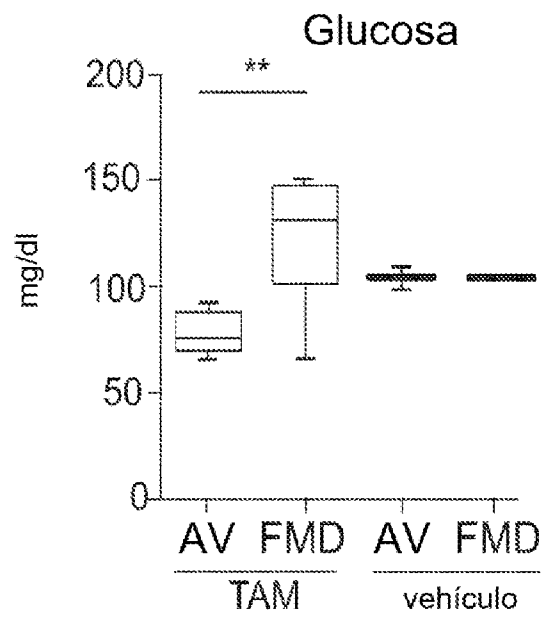


Fig. 5G

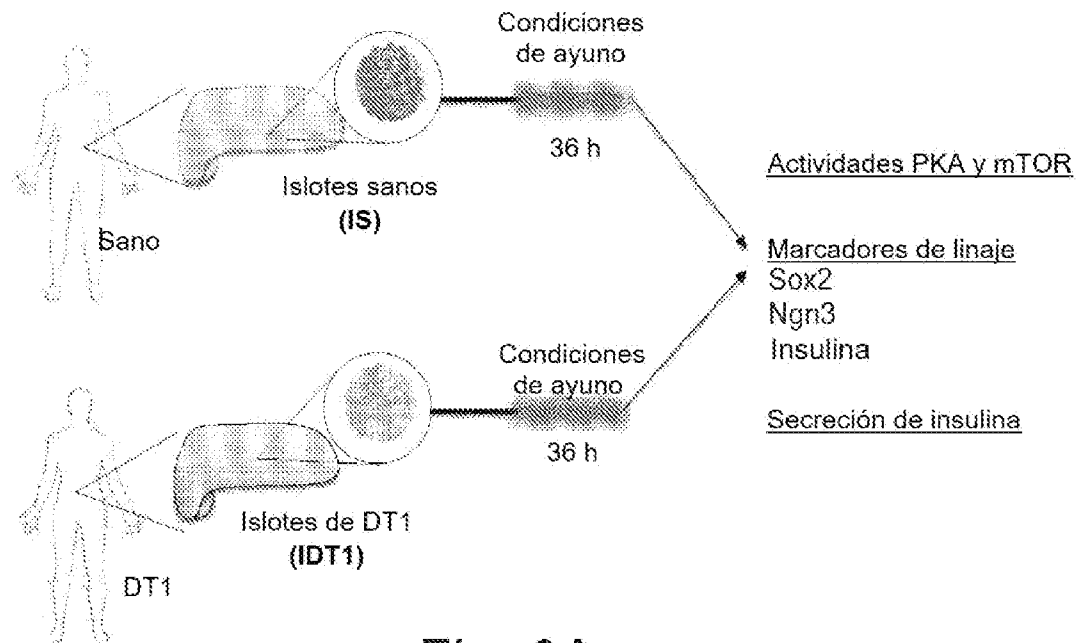


Fig. 6A

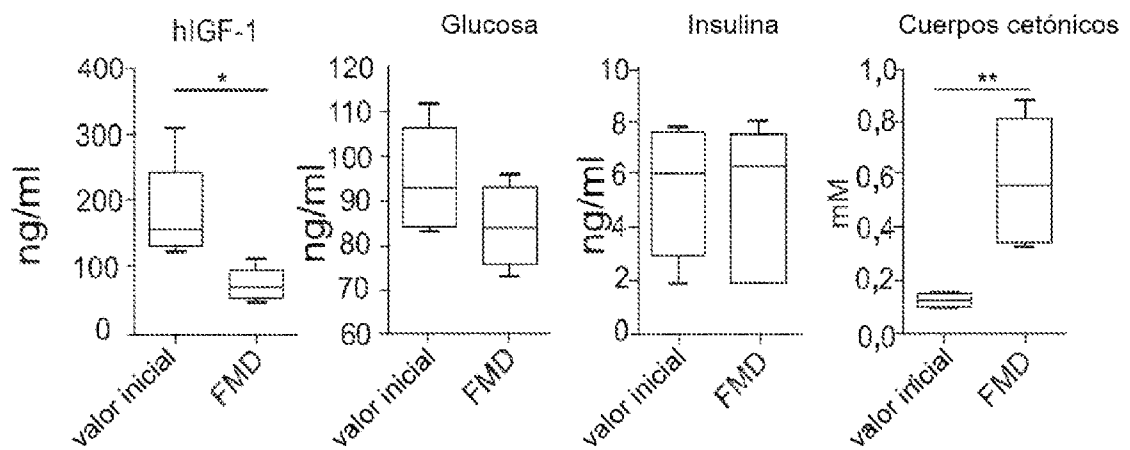


Fig. 6B

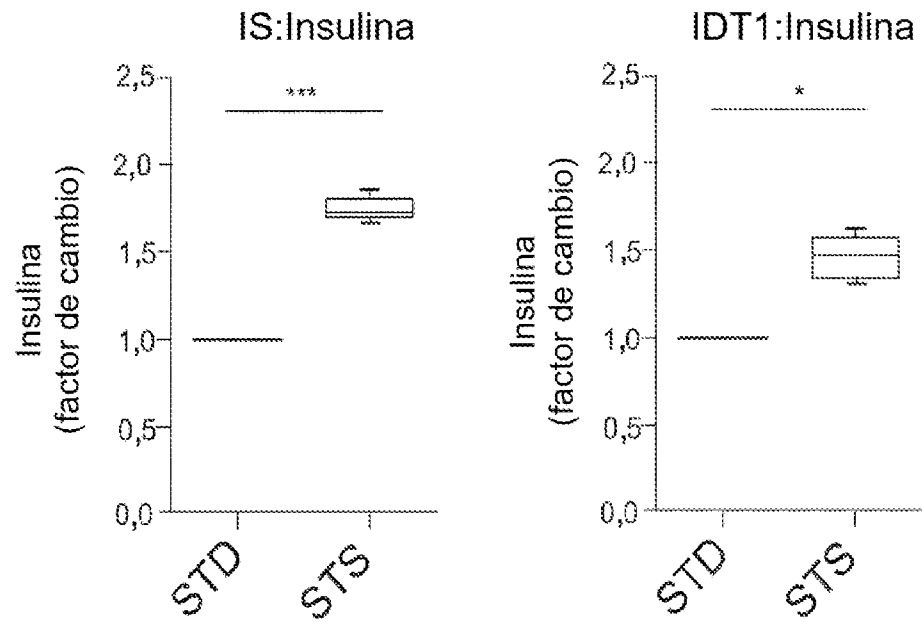


Fig. 6C

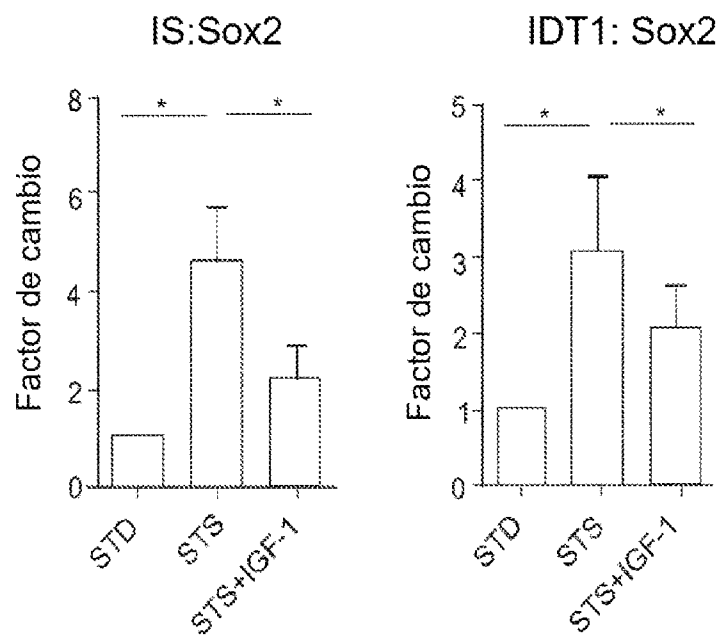


Fig. 6D

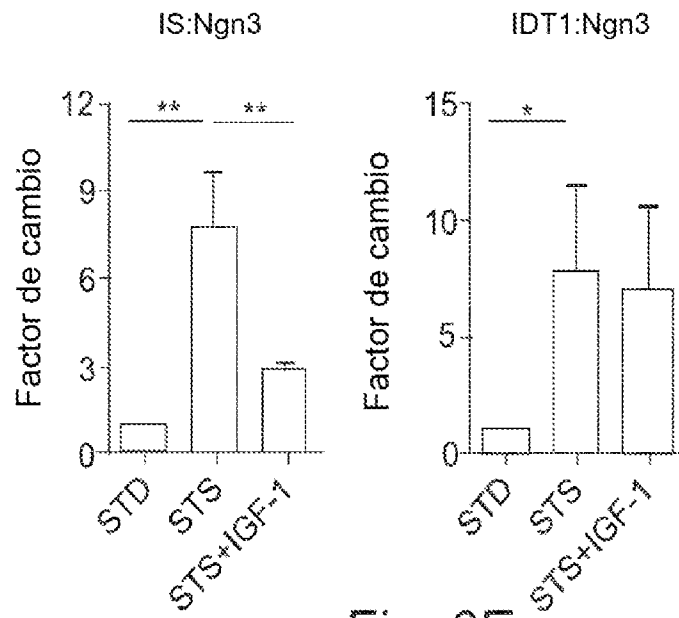


Fig. 6E

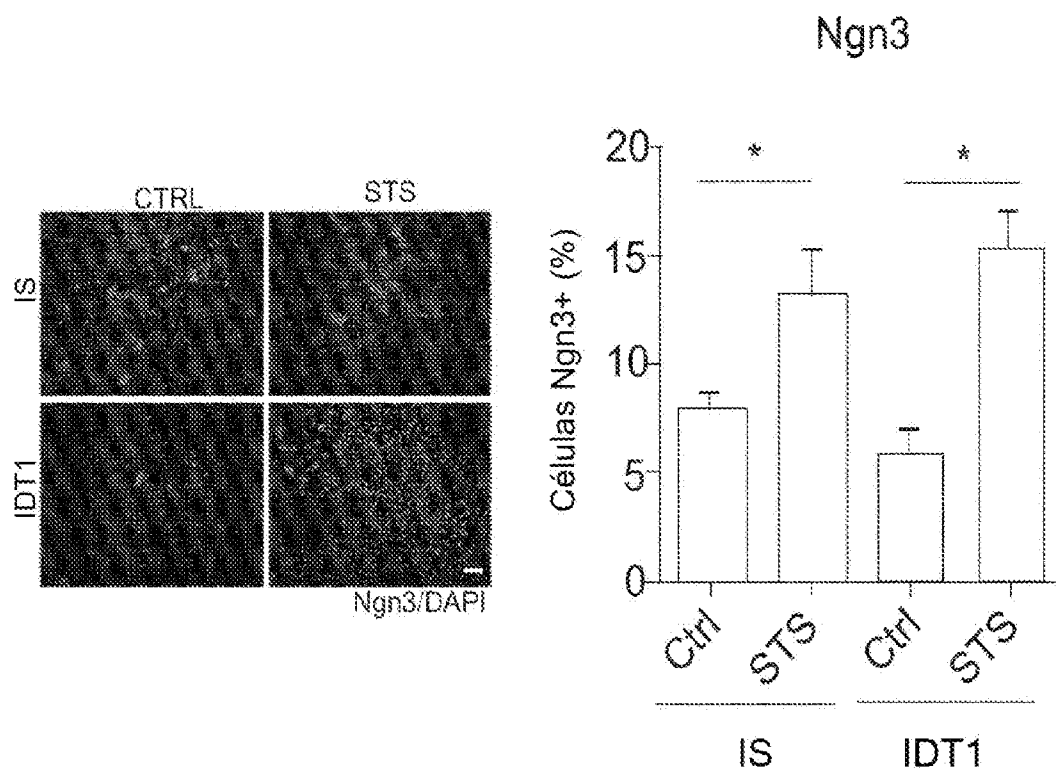


Fig. 6F

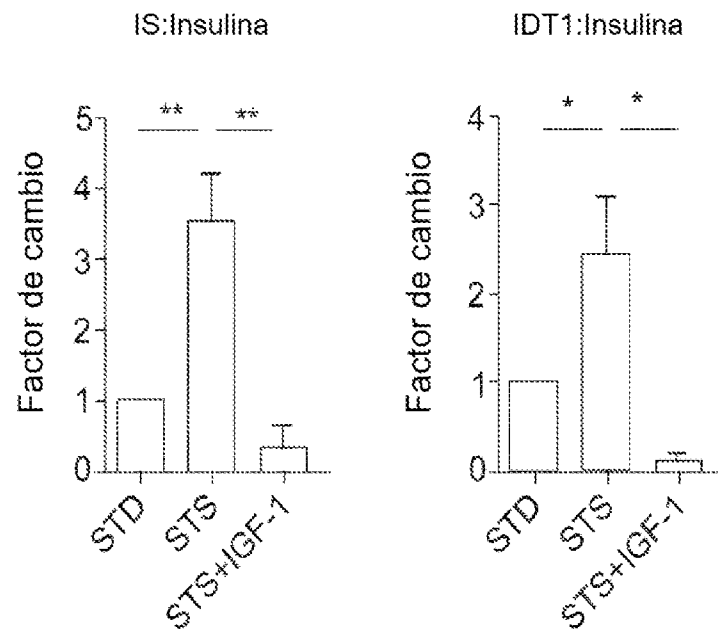


Fig. 6G

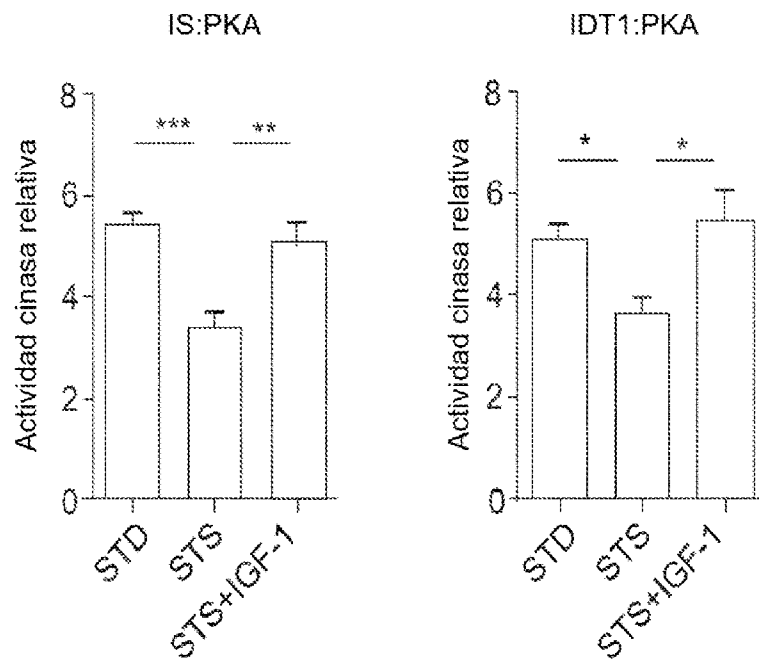


Fig. 6H

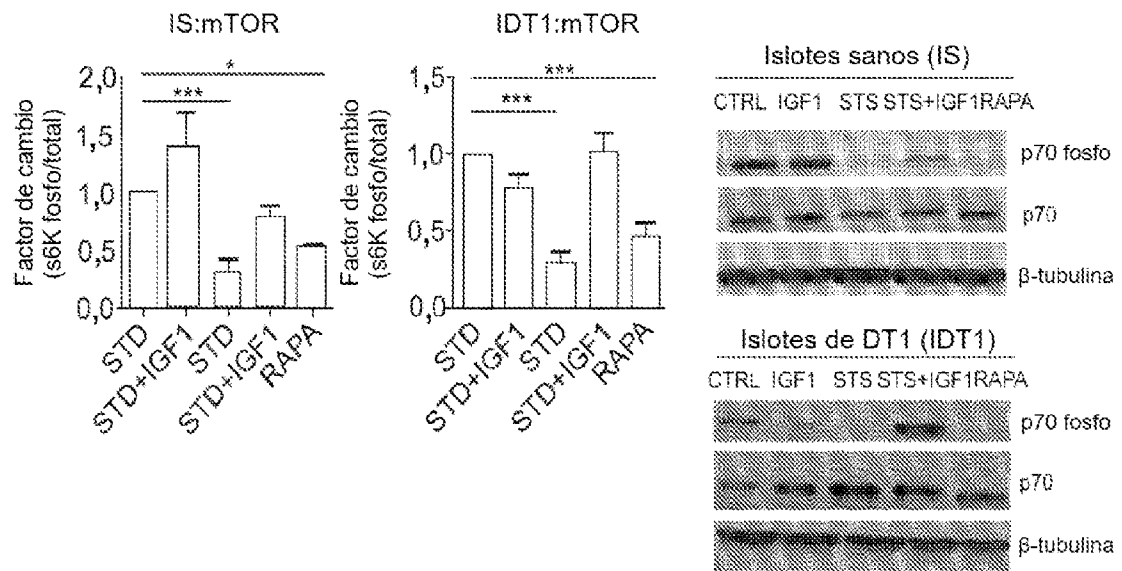


Fig. 6I

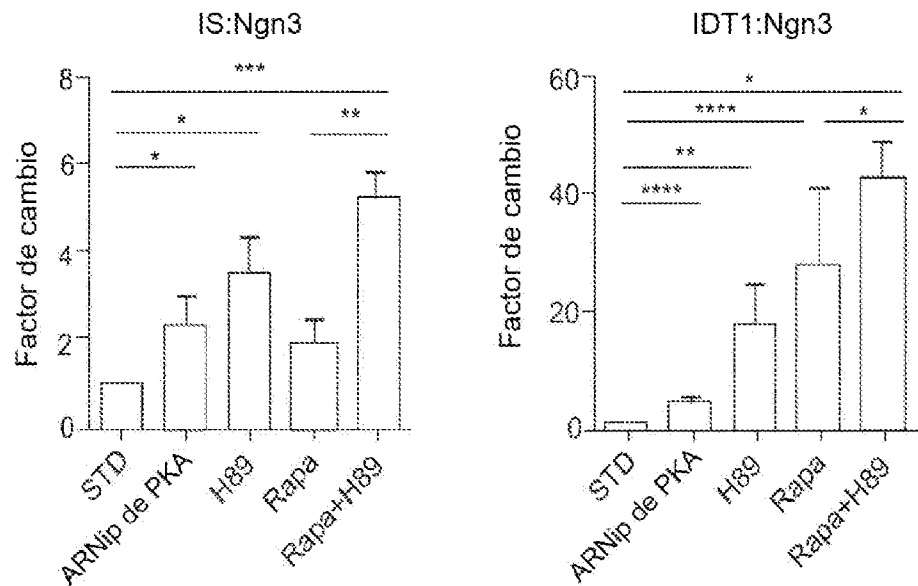


Fig. 6J

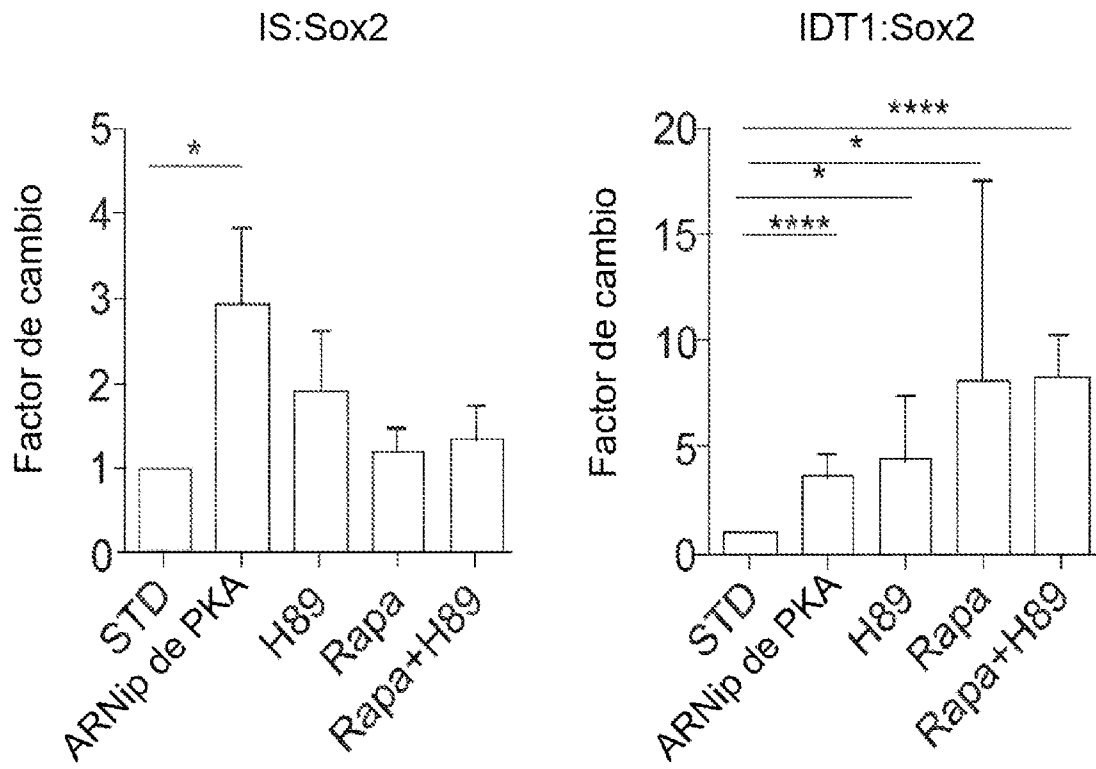


Fig. 6K

Tabla 1. Perfil de los sujetos humanos, en relación con los métodos STAR y la figura 6.

Sexo	Edad	IMC (kg/m ²)	hIGF-I (ng/ml)		hIGF-I (%A)		Insulina (Ulu/ml)		Glucosa (mg/dl)	
			A	B	A	B	A	B	A	B
F	49	23,0	125,2	48,4	100	39	N/D	N/D	83	72,5
F	59	24,7	141,3	57,4	100	41	N/D	N/D	85	90
F	28	22,4	310,0	112,0	100	36	6	8	93	79
M	42	24,7	177,0	78,0	100	44	1,9	1,9	112	96
F	68	18,9	157,3	70,0	100	44	4	1,9	101	84

Fig. 7

Tabla 2. Ingredientes de FMD de ratón, en relación con los métodos STAR.

	Día 1 (g)	Días 2-4 (g)	Nota
Mezcla de caldo	5,85	5,31	La relación de mezcla de 3 mezclas de caldo es 1:1:1. - Mezcla de caldo vegetal (n.º 60017, ABCO Laboratories, Fairfield, CA): Ingredientes: maltodextrina, sal, extracto de levadura autolisada, aroma natural, verduras deshidratadas (tomate, cebolla, apio, perejil, espinaca, ajo, zanahoria), harina de patata, goma xantana, especias, extracto de especia (que incluye cúrcuma), lecitina de soja. No se añade más de un 2 % de aceite de soja como adyuvante de procesamiento. - Mezcla de caldo con sabor a pollo (n.º 60018, ABCO Laboratories, Fairfield, CA): Ingredientes: maltodextrina, sal, extracto de levadura autolisada, aroma natural, verduras deshidratadas (cebolla, apio, perejil, espinaca, ajo, zanahoria), harina de patata, goma xantana, especias, extracto de especia (que incluye cúrcuma), lecitina de soja. No se añade más de un 2 % de aceite de soja como adyuvante de procesamiento. - Mezcla de caldo con sabor a temera (n.º 60024, ABCO Laboratories, Fairfield, CA): Ingredientes: maltodextrina, sal, extracto de levadura autolisada, aromas naturales, verduras deshidratadas (cebolla, apio, perejil, espinaca, ajo, zanahoria), colorante de caramelo, especias.
AOVE	12,75	0	AOVE, aceite de oliva virgen extra Bertolli (Mizkan American, Inc, Mount Prospect, Illinois).
Ácido graso esencial	0,21	0	Udo's Oil, relación de mezcla 3*6*9 (Udo's Choice) Ω3:6:9 (omega-3, ácido alfa-linolénico; omega-6, ácido linoleico; ácido oleico omega-9) es 6:3:2.5. (Flora Incorporated, Lynden, Washington).
Mezcla vegetal	14,88	0	- Remolacha en polvo (RM10711, The Synergy Company, Moab, Utah) (2,86 g). - Zanahoria en polvo (RM10437, The Synergy Company, Moab, Utah) (1,86 g). - Berza en polvo (RM10114, The Synergy Company, Moab, Utah) (1,24 g). - Col rizada en polvo (RM10115, The Synergy Company, Moab, Utah) (1,24 g). - Ortiga en polvo (RM10130, The Synergy Company, Moab, Utah) (1,24 g). - Espinaca en polvo (RM10747, The Synergy Company, Moab, Utah) (2,48 g). - Tomate en polvo (RM10409, The Synergy Company, Moab, Utah) (2,48 g). - Maitake en polvo (ZNature Foods, West Palm Beach, FL) (1,86 g).
Glicerol	0	0,75	G9012, Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri.
Hidrogel (agente aglutinante)	56,7	93,9	Clear H2O, Westbrook, Maine.
Fibra	5	0	Celulosa, n.º 3425, Bio-Serv, Flemington, Nueva Jersey.
Mineral (AIN-93G-MX)	3,5	0	Teklad, TD.94046, ENVIGO.
Vitamina (AIN-93-VX)	1	0	Teklad, TD.94047, ENVIGO.
Suma	100	100	

Fig. 8

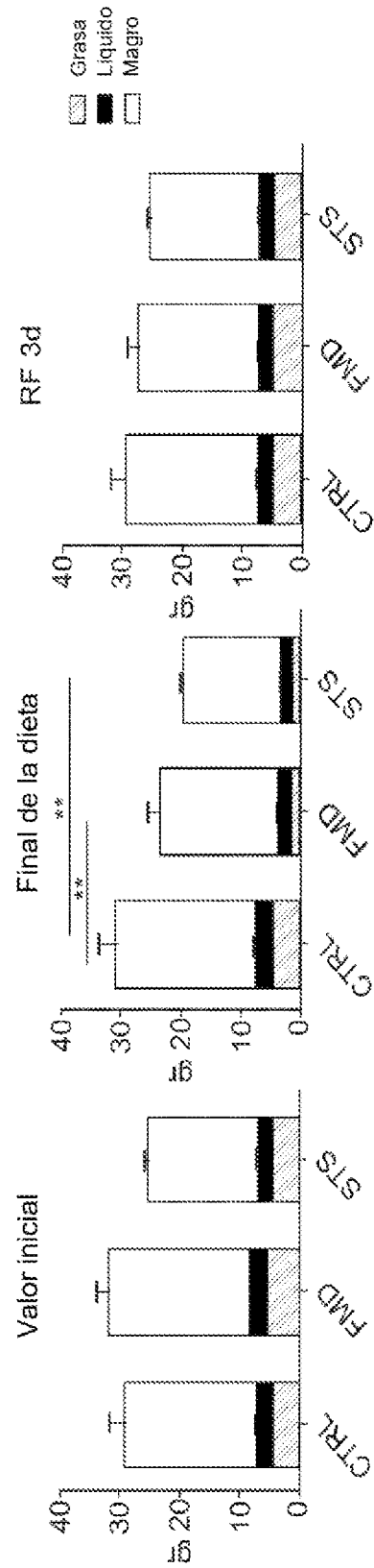


Fig. 9A

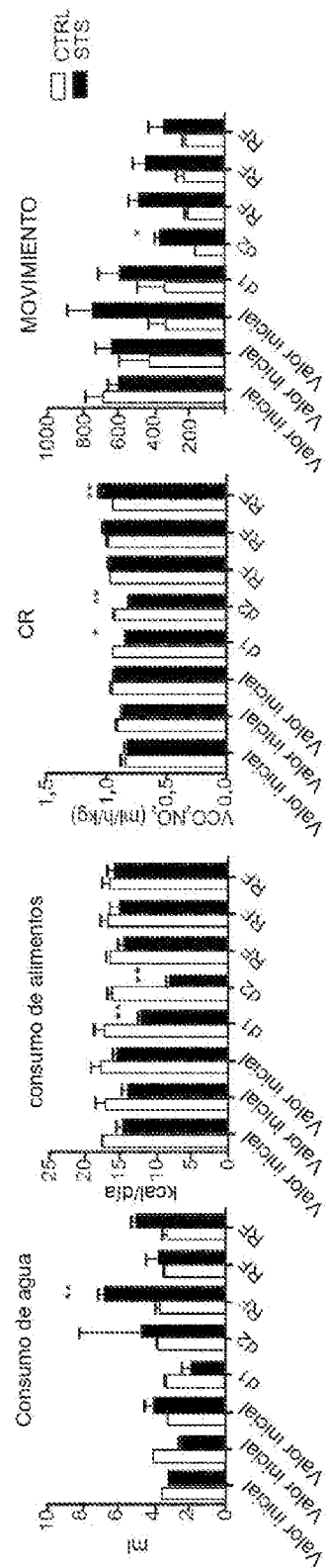


Fig. 9B

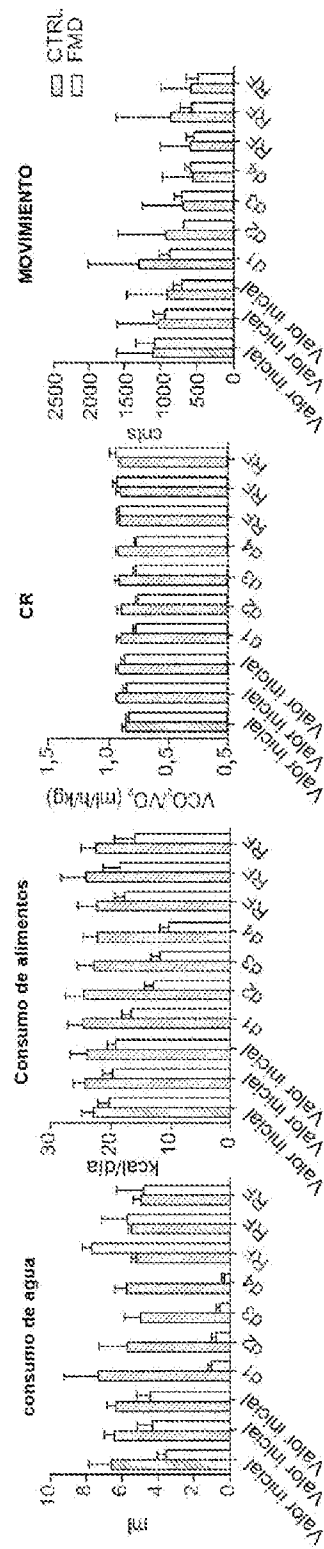


Fig. 9C

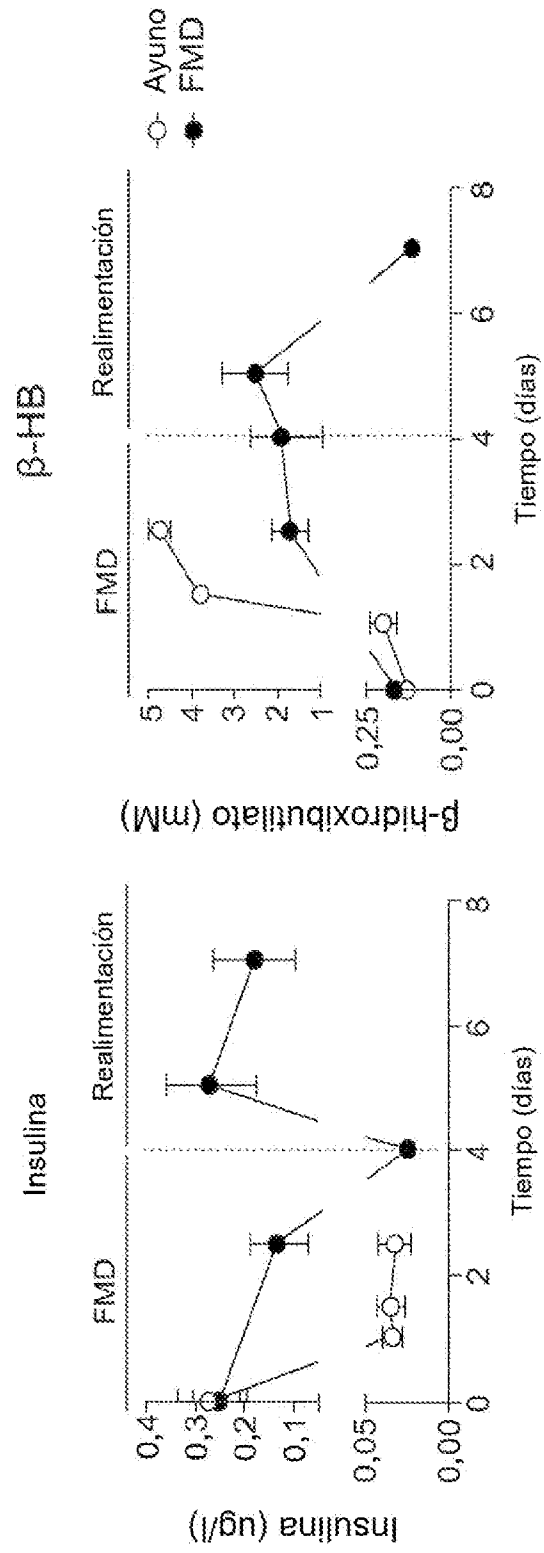


Fig. 9D

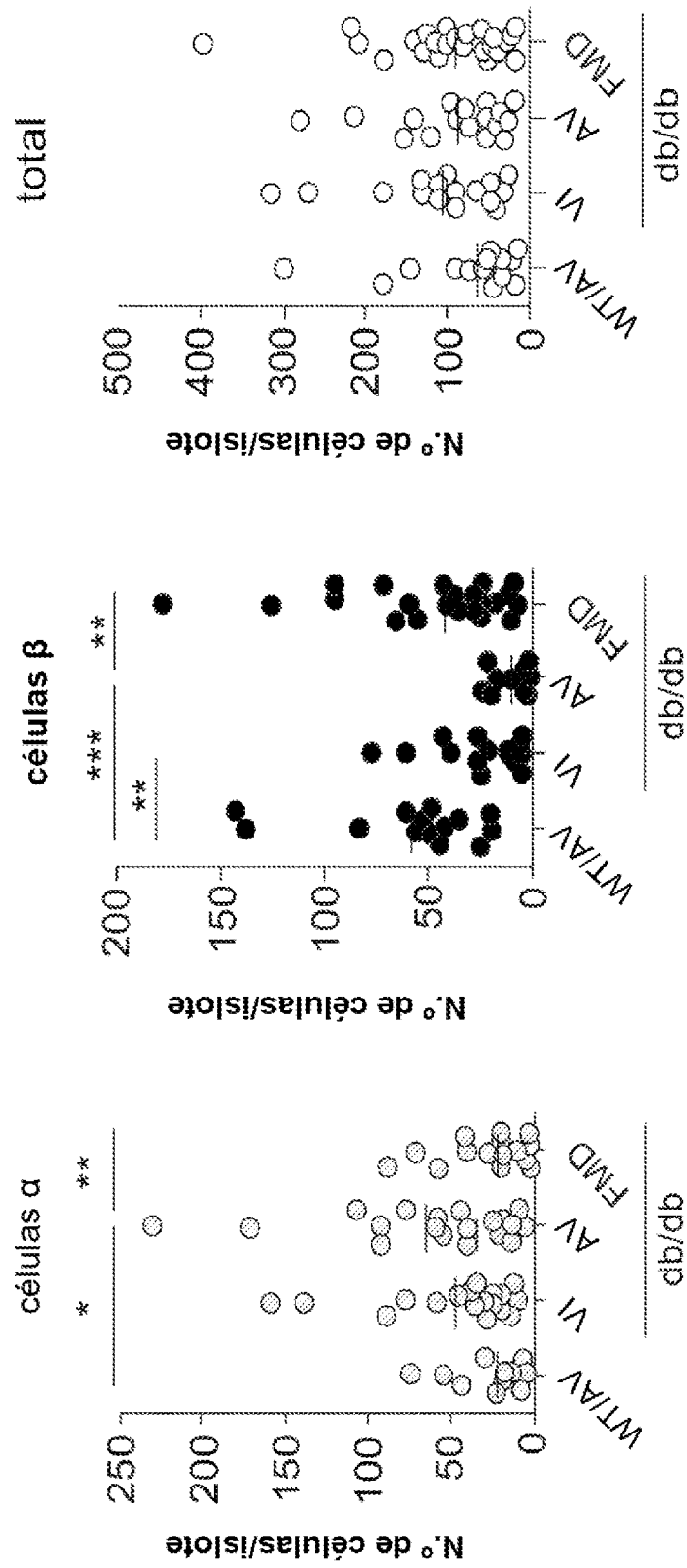


Fig. 10A

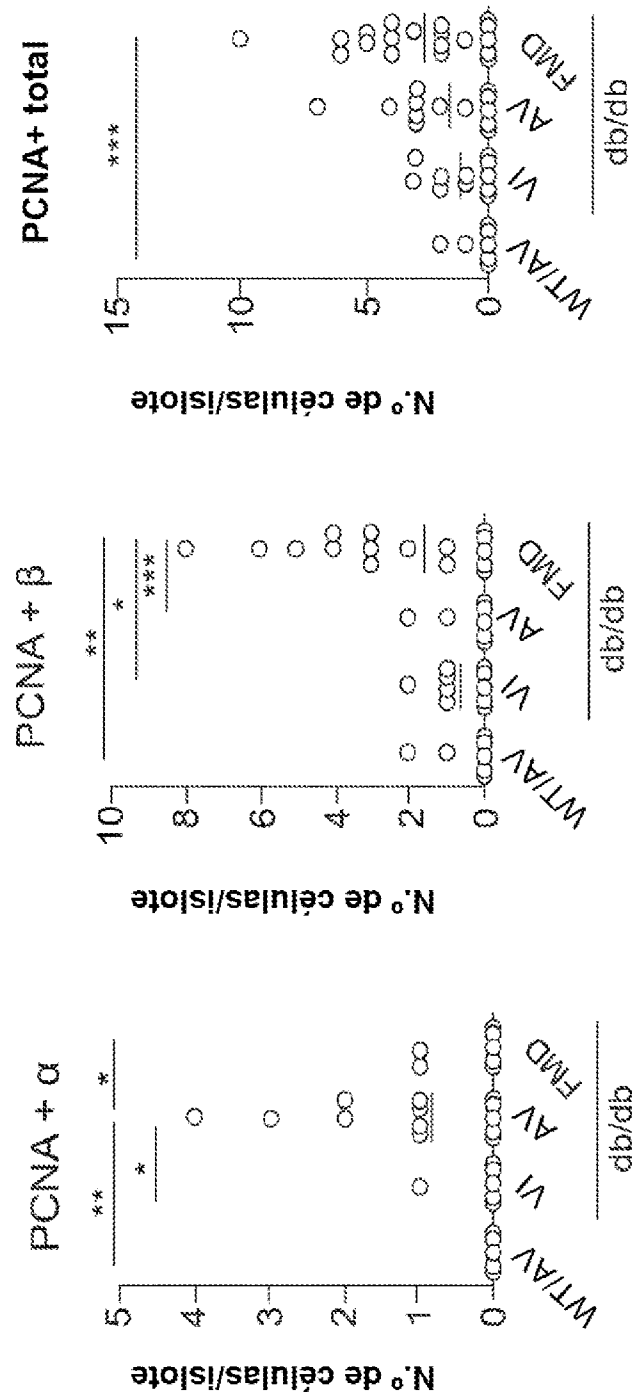


Fig. 10B

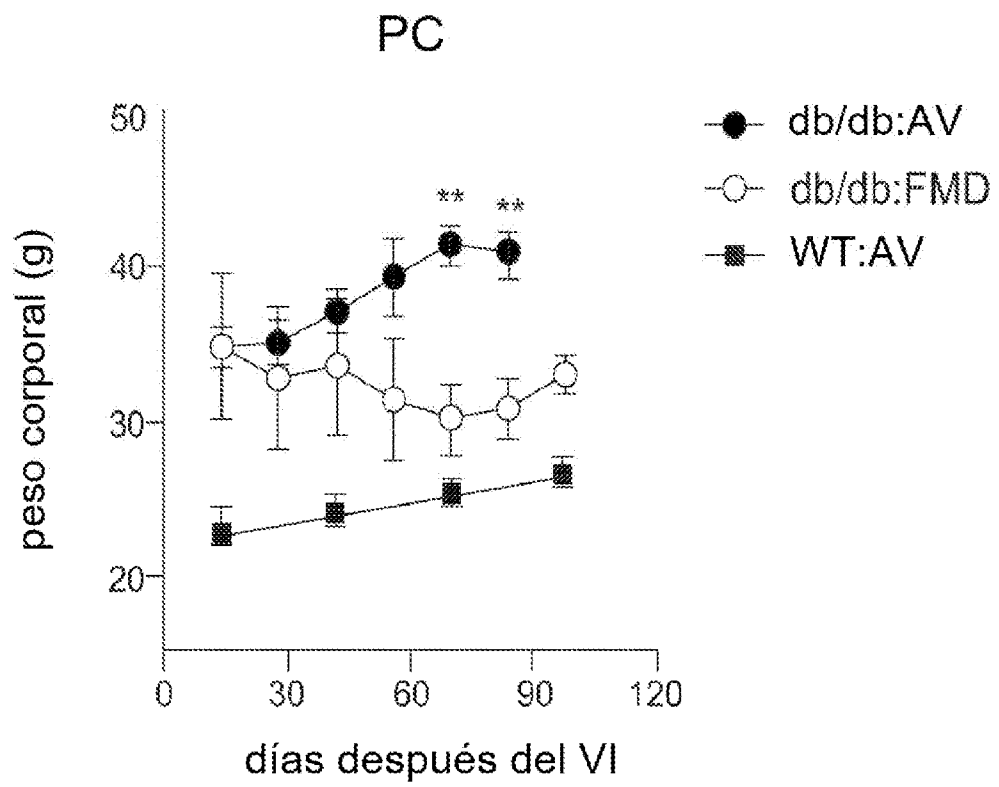
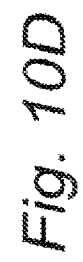


Fig. 10C



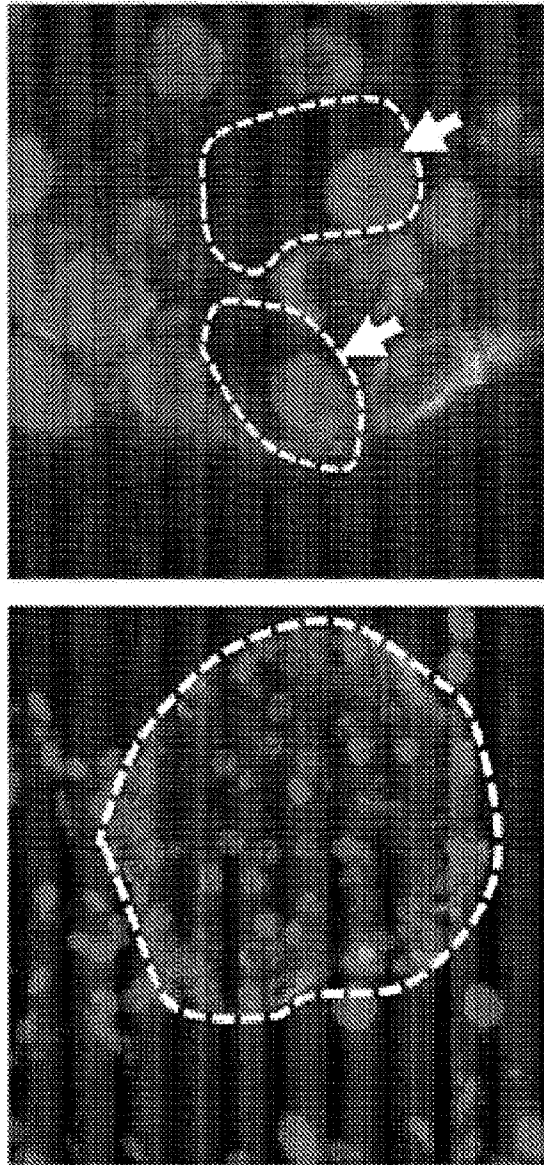
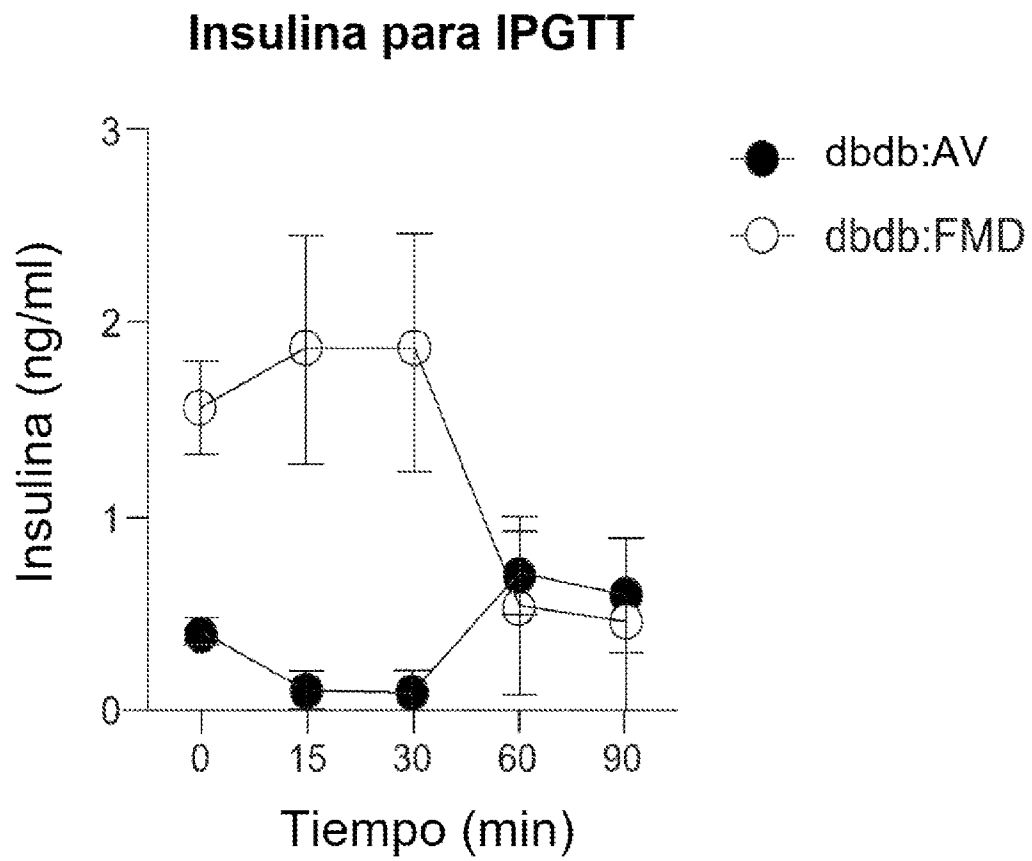


Fig. 10E

*Fig. 10F*

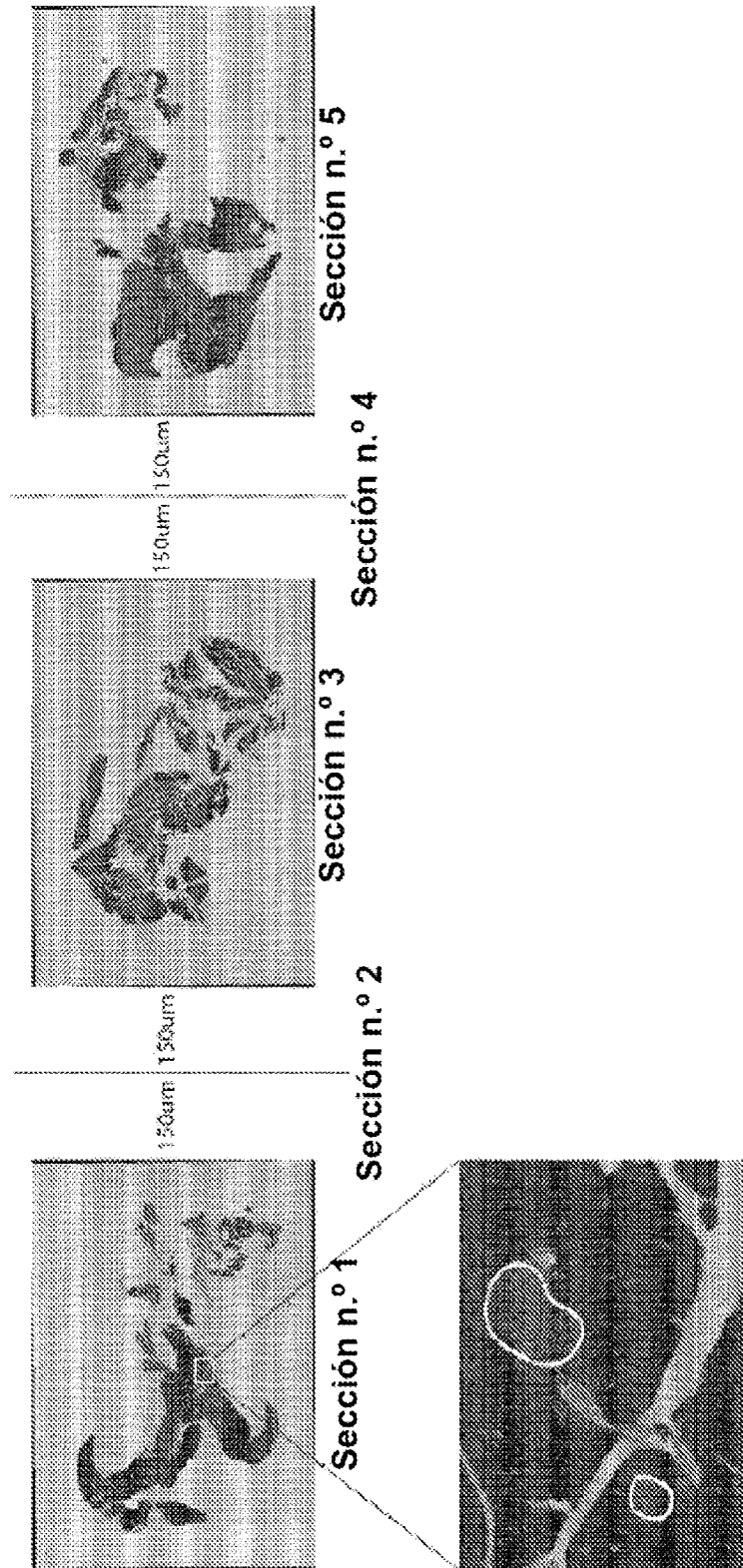


Fig. 10G

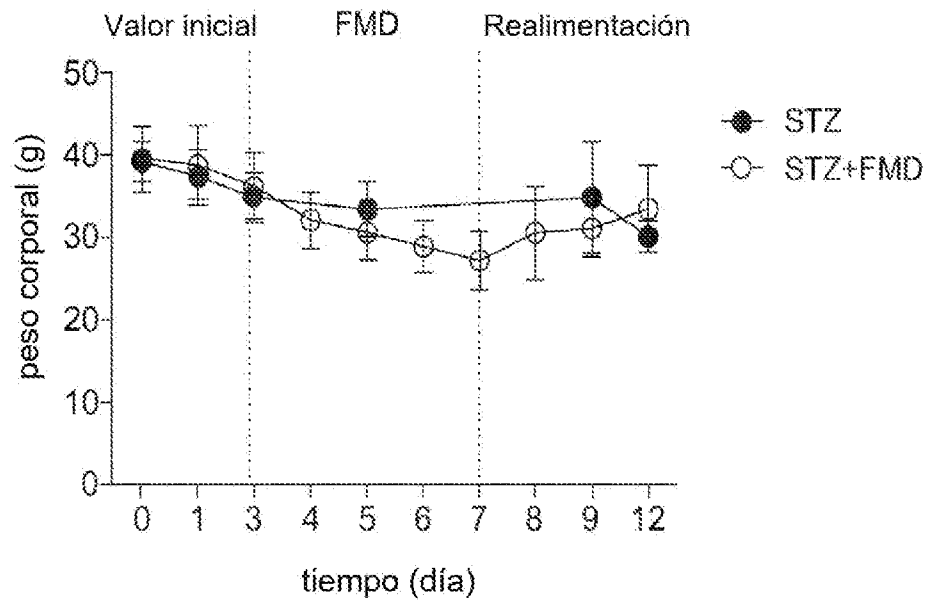


Fig. 11A

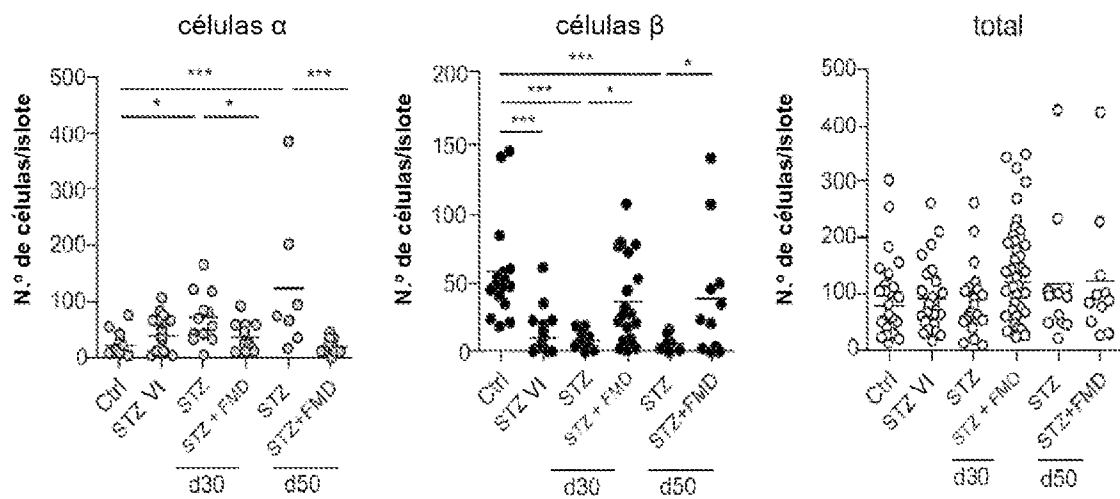


Fig. 11B

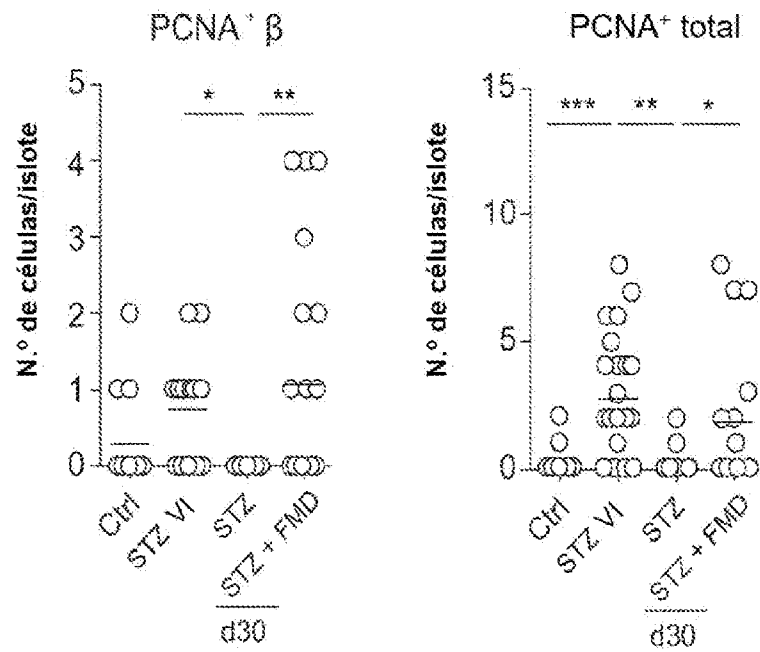


Fig. 11C

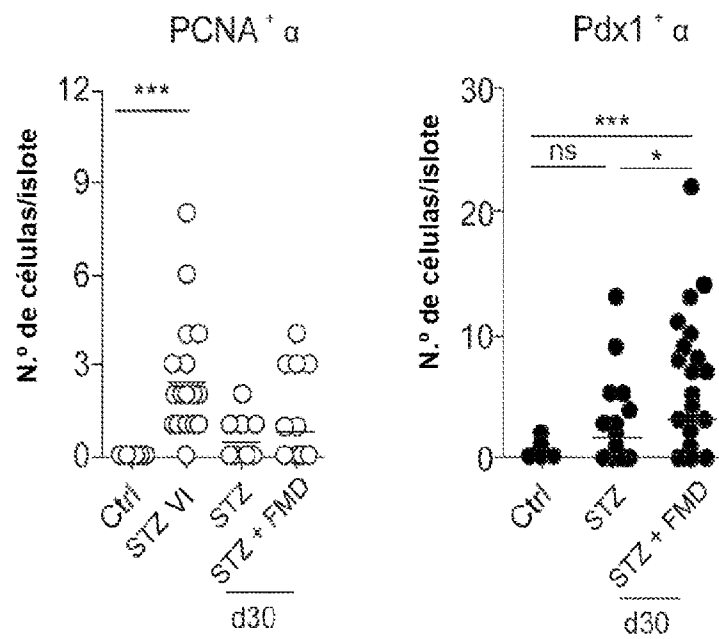


Fig. 11D

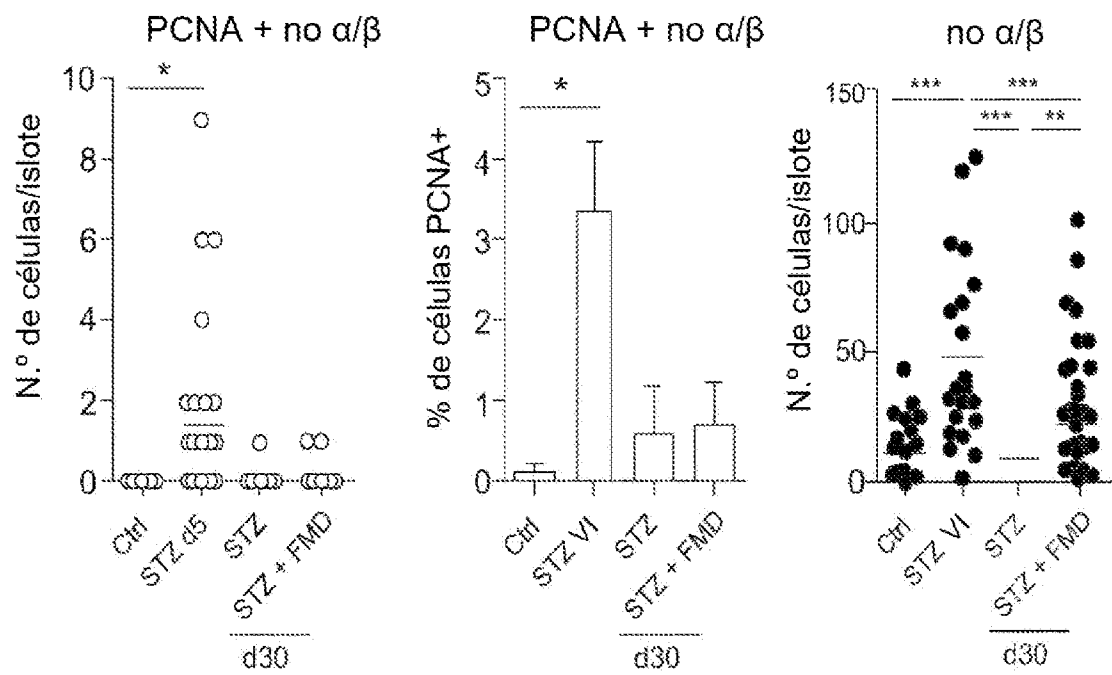


Fig. 11E

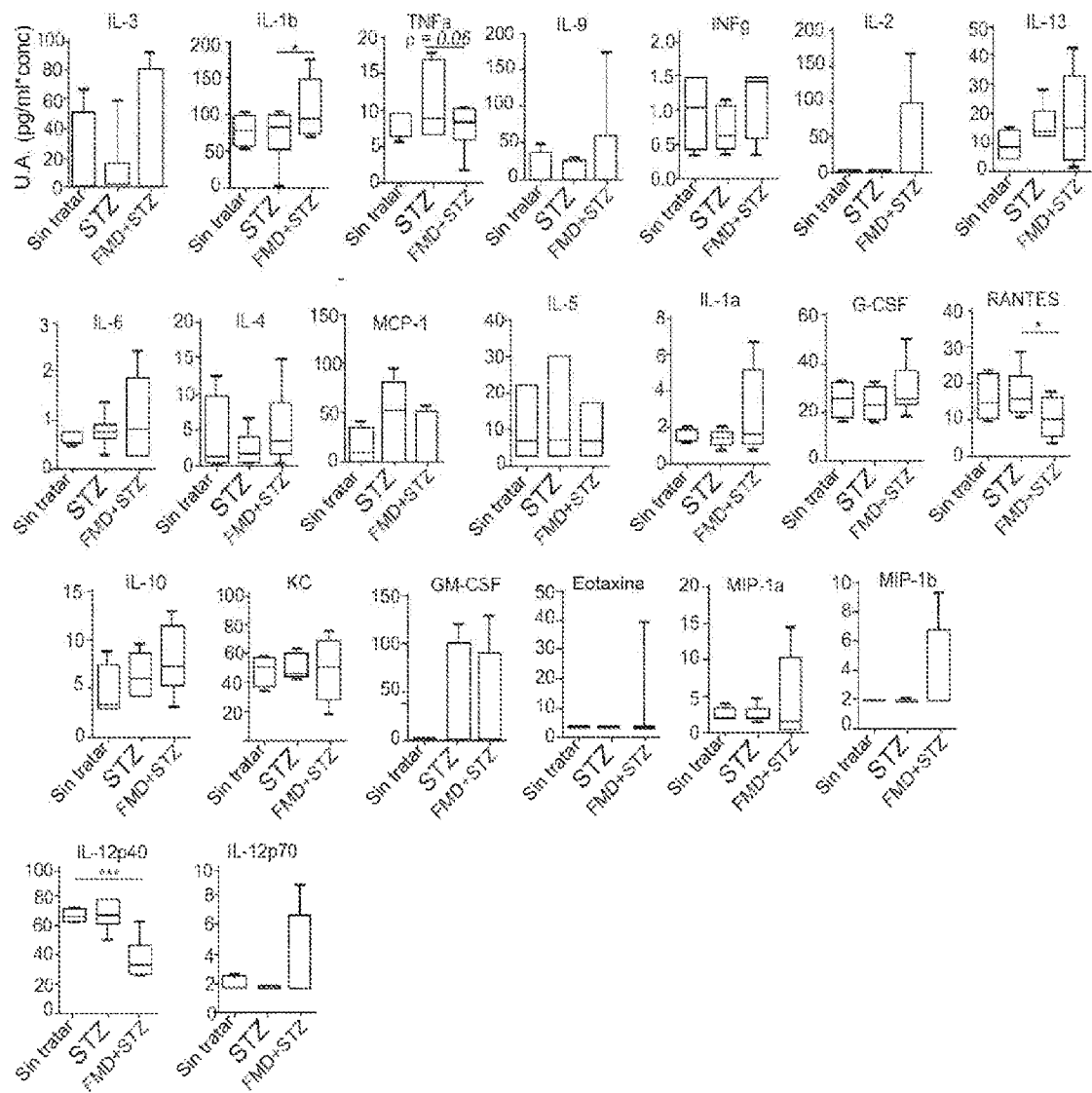


Fig. 11F

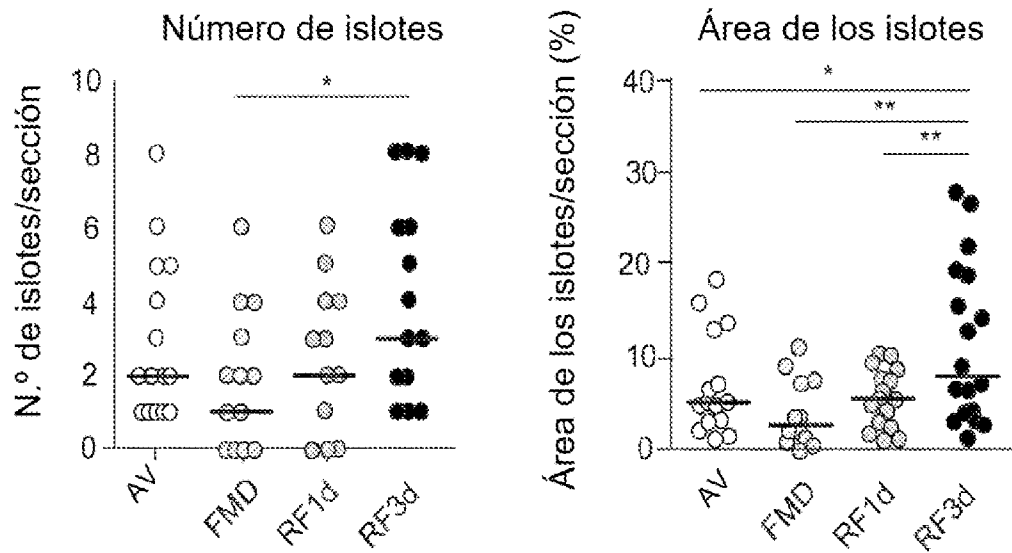


Fig. 12A

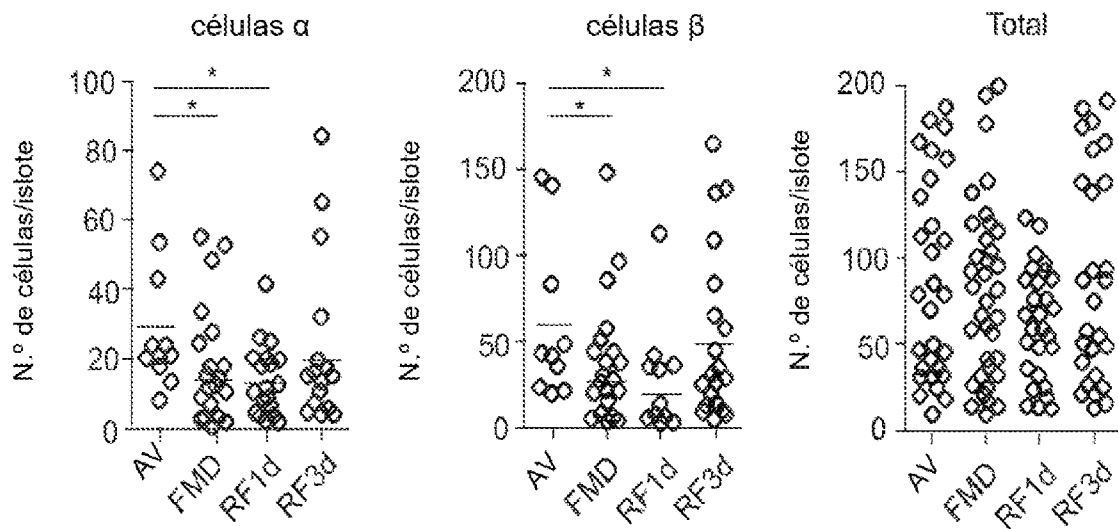


Fig. 12B

Células α proliferativas

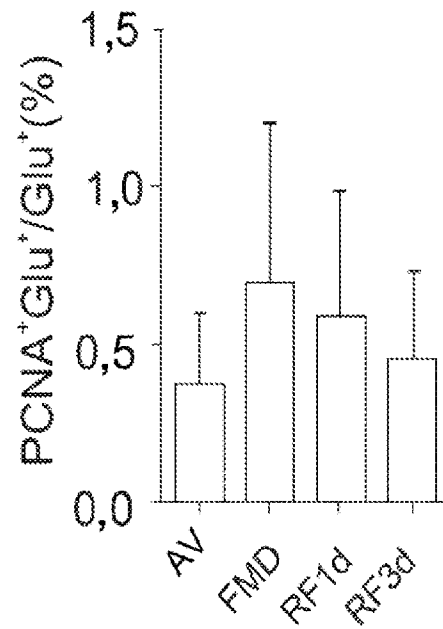


Fig. 12C

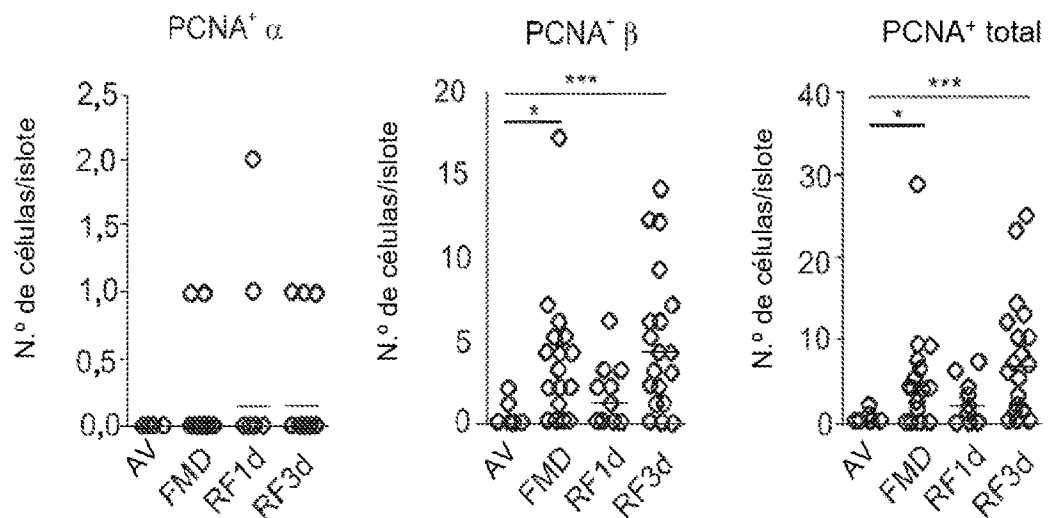


Fig. 12D

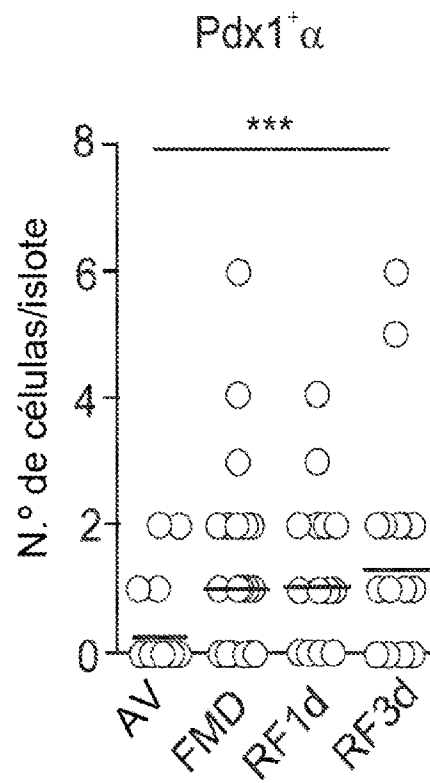


Fig. 12E

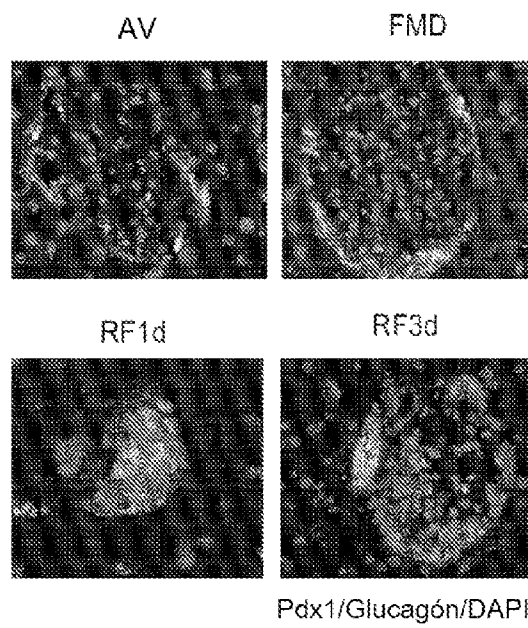


Fig. 12F

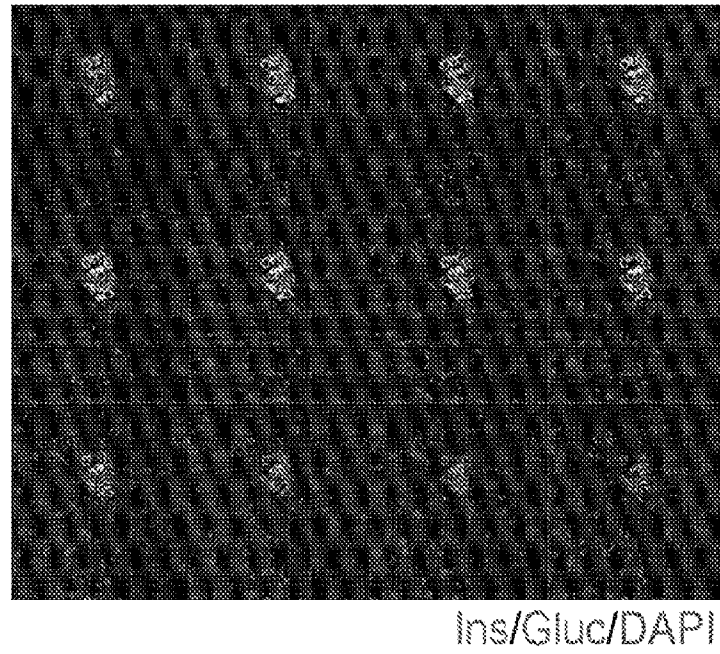


Fig. 12G

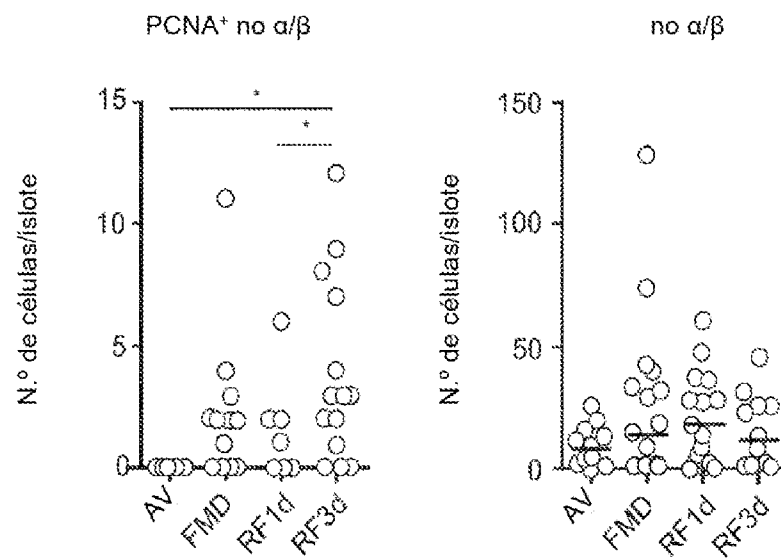


Fig. 12H

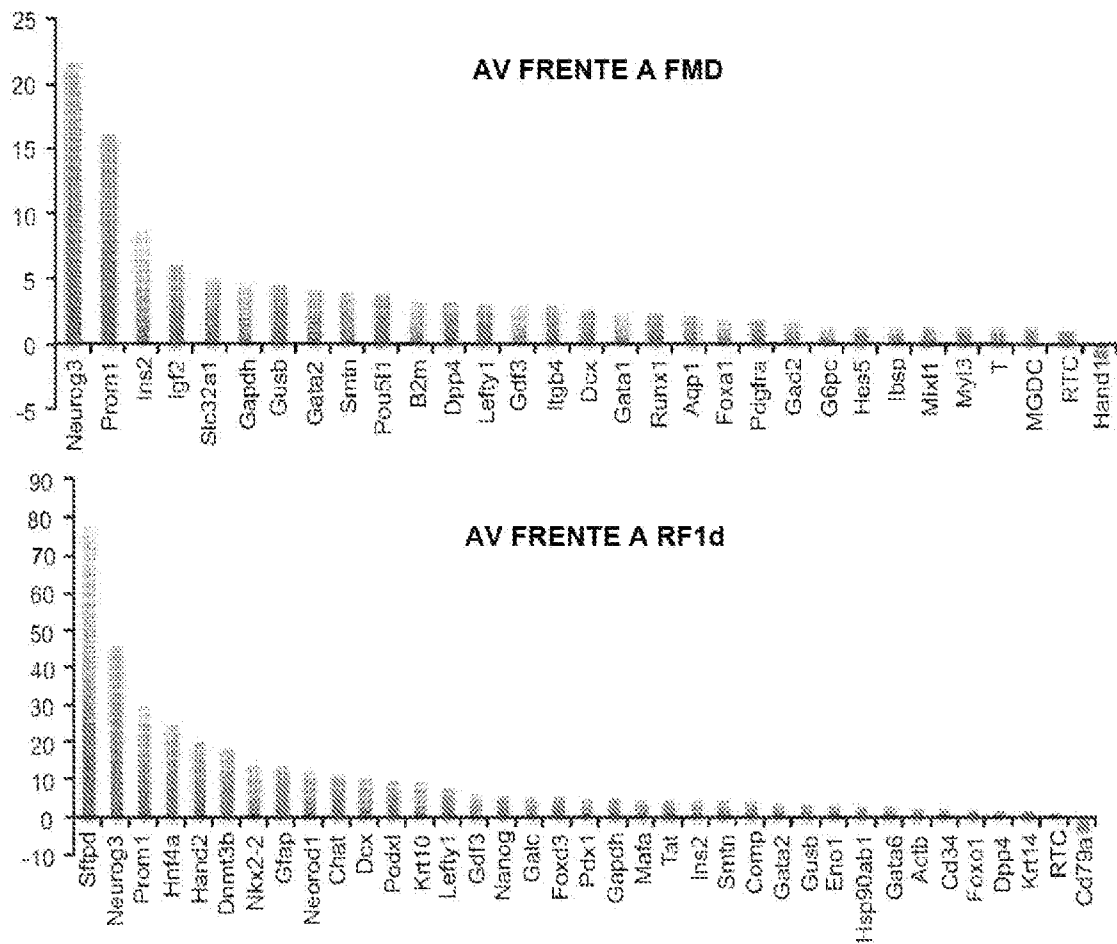


Fig. 13A

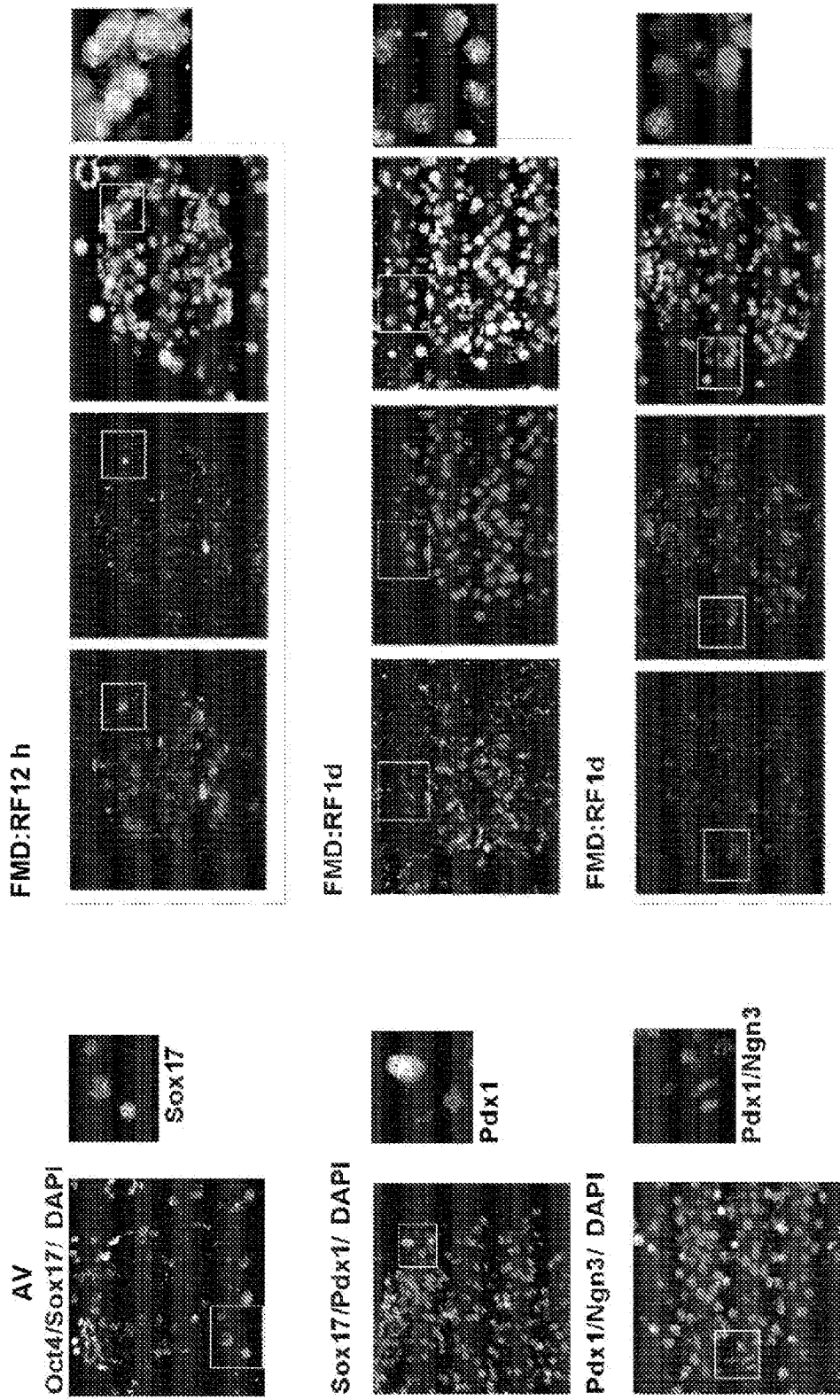


Fig. 13B

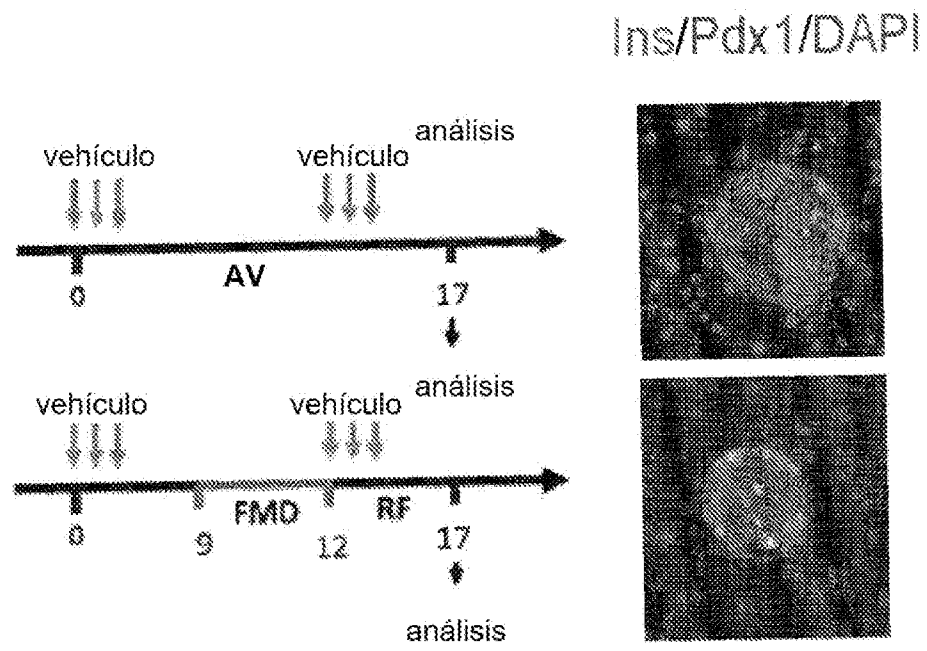


Fig. 13C

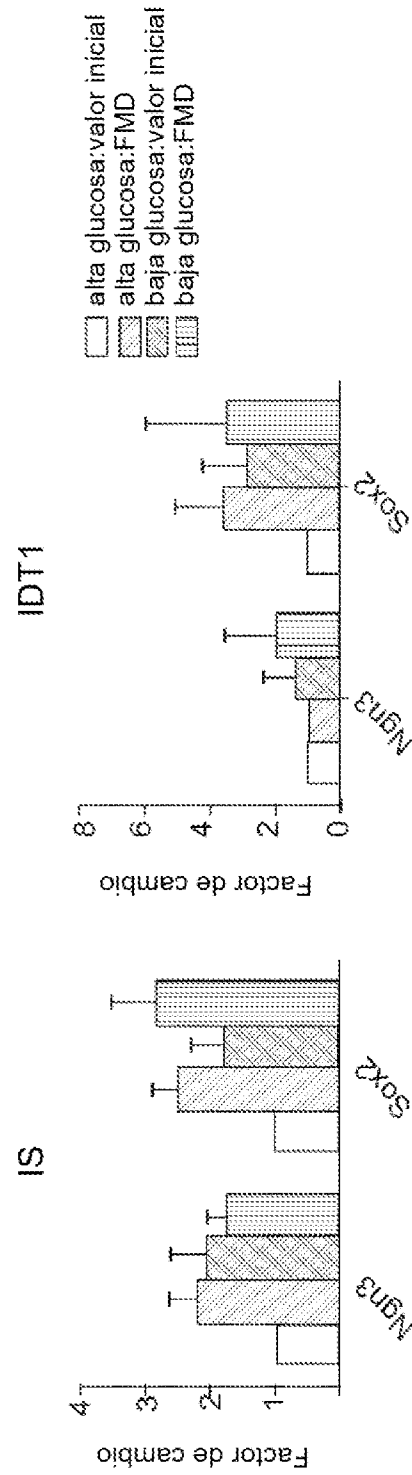


Fig. 14A

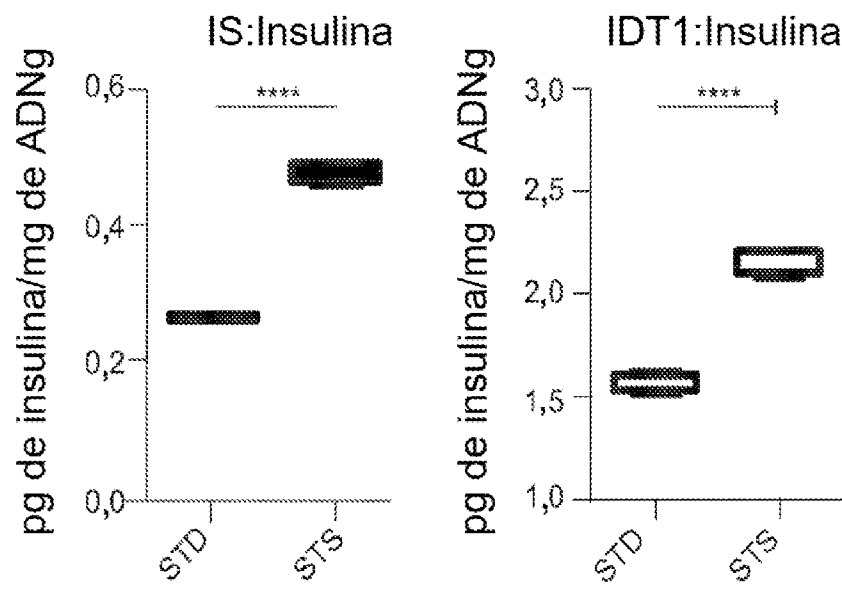


Fig. 14B