

T
532

90910



Casa Abierta al Tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA MITOCONDRIA Y
DE LA PROTEÍNA P53 EN LA MUERTE DE LAS CÉLULAS
DE INSULINOMA INDUCIDA POR CONCENTRACIONES
ELEVADAS DE GLUCOSA”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTA
M EN C CLARA ORTEGA CAMARILLO

MÉXICO, D.F.

ENERO 2006

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades
Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Clara Ortega Camarillo

El día 13 de enero del 2006

Comité Tutorial

Presidente: Dra. Ana María Rosales Torres.



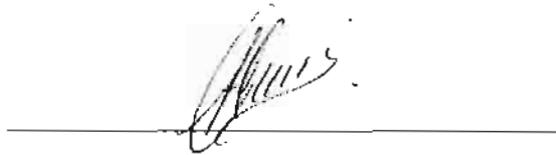
Vocal: Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell



Vocal: Dra. Rebeca García Macedo



Vocal: Dr. Francisco Alarcón Aguilar



Secretario: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman



COMITÉ TUTORIAL

TUTORES DE TESIS

Dr. ALBERTO MARTIN GUZMÁN GRENFELL

INVESTIGADOR DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS.

INVESTIGADOR NACIONAL NIVEL I

DRA. ANA MARÍA ROSALES TORRES

PROFESOR TITULAR "C" DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
INVESTIGADOR NACIONAL NIVEL I

ASESOR

DRA. REBECA GARCÍA MACEDO

INVESTIGADOR DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
INVESTIGADOR NACIONAL NIVEL I

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social; en colaboración con el Laboratorio de Bioquímica Inorgánica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción del Departamento de Producción Agrícola y Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Este proyecto fue financiado en parte por la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (FP-2003/328) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (No. 37767-B). La alumna contó con Beca-Crédito del CONACyT (No. 110926).

AGRADECIMIENTOS

A MIS HIJOS:

Daniel Alejandro y Paulina Ximena

Por enseñarme el verdadero sentido de la vida

A Alejandro

Por todo el amor y apoyo incondicional que me otorgas

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres

Sr. Tomas Ortega de la Rosa y Sra. Graciela Camarillo Sánchez.

*Por darme vida, amor y apoyo en todo momento
y por que gracias a ellos he logrado ser lo que soy.*

A mis hermanos

*Olga, Marcela, Laura, Alfredo, Norma, Salvador, Felipe
por ser fuente de inspiración para mi superación diaria.*

A todos mis sobrinos.

A la memoria de mis abuelos

Sra. Juventina Sánchez Luna y Sr. Tomas Camarillo Cruz

Sra. Antonia de la Rosa y Sr. Narcizo Ortega

AGRADECIMIENTOS

A Luz María Santamaría García

Por tu amistad y porque siempre estas conmigo a pesar de la distancia.

A Margarita Díaz Flores.

Por ser una persona muy importante en mi desarrollo profesional y por distinguirme con tu amistad. Gracias por tus consejos tanto académicos como personales, y por permitirme colaborar contigo.

A Gisela Fuentes Mascorro

Por su amistad y por ser ejemplo de fortaleza y lucha continúa.

A Marcela Vergara Onofre y Manuel González Bustamante

Por distinguirme con su amistad, por ser ejemplo de bondad, nobleza y solidaridad, porque son parte de mi familia

AGRADECIMIENTOS

A todos mis compañeros y estudiantes de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica. Juanito, Edgar, Patricia, David, Adan, Alfonso, Genoveva, Mago Díaz, Mago Gutierrez, Olga, Gabby, Reyna, Irma, Ceci y Norma, en especial a las "chicas", por su gran apoyo moral, su amistad y por hacerme reír y soportarme todos los días.

A la Dra. Ana María Rosales Torres.

Por ser un pilar importante en mi formación académica, por su amistad y por su acertada participación en la dirección de esta tesis.

A la Dra. Rebeca García Macedo.

Por su gran apoyo diario, solidaridad, confianza, amistad y por su ayuda para concluir esta etapa tan importante de mi vida.

Al Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell.

Por distinguirme con su amistad y por ser una guía en el árduo camino de la ciencia. Por brindarme su apoyo para la dirección y culminación de este trabajo.

Al Dr. Miguel Cruz López, jefe de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica.

HE. CMN SXXI. IMSS. Por las facilidades otorgadas.

Al Dr. José Moreno Rodríguez, Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes del IMSS, por permitirme amablemente utilizar citómetro de flujo.

Al Dr. Jorge Antonio Sosa Melgarejo, Investigador del Instituto Mexicano del Seguro Social, por permitirme amablemente utilizar el microscopio confocal.

*Ni la carrera más asombrosa me hará olvidar la alegría de
volver a casa y estar de nuevo rodeada por aquello
que una recibe con su nacimiento:
la visión del paisaje natal,
la intimidad de unas cuantas paredes,
y la compañía de sus padres.*

ÍNDICE

	Pag.
Índice de figuras	1
Índice de cuadros	2
Abreviaturas	3
Resumen	5
aBSTRACT	7
1. Introducción	
1.1. Aspectos generales de la diabetes	9
2. Antecedentes	
2.1. Fisiología de la célula β	12
2.1.1. Función mitocondrial	14
2.1.2. Mitocondria y apoptosis	21
2.1.3. Secreción de insulina	23
2.2. Estrés oxidante	
2.2.1. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidante	26
2.2.2. Sistemas antioxidantes	29
2.2.3. Estrés oxidante en diabetes	30
2.3. Alteraciones en la célula β por hiperglucemia	41
2.3.1. Resistencia a la insulina	45

	Pag.
2.3.2 Apoptosis de la célula β	47
2.4. La proteína p53	50
2.4.1. Regulación de la expresión de p53	53
2.4.2. Degradación de p53	54
2.4.3. La proteína p53 en el ciclo celular	56
2.4.4. La proteína p53 y apoptosis	58
3. Planteamiento del problema	61
4. Hipótesis	63
5. Objetivos	
5.1. Objetivo general	64
5.2. Objetivos particulares	65
6. Material y métodos	66
7. Resultados	74
8. Discusión	87
9. Conclusiones	96
10. Bibliografía	97
11. Difusión de los resultados	108
12. Premios y distinciones	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la mitocondria	17
Figura 2. Transporte de electrones durante la respiración mitocondrial	22
Figura 3. Mecanismos de secreción de la insulina	38
Figura 4. Especies reactivas de oxígeno	30
Figura 5. Vía del sorbitol	35
Figura 6. Glicosilación no enzimática de proteínas	37
Figura 7. Autooxidación de la glucosa	39
Figura 8. Proteína p53	55
Figura 9. Regulación de p53	59
Figura 10. P53 y ciclo celular	61
Figura 11. Gráfica de puntos que se obtiene por citometría de flujo	85
Figura 12. La hiperglucemia aumenta el porcentaje de células anexina-V-FITC ⁺ /-IP	86
Figura 13. Apoptosis de las células RINm5F por hiperglucemia	87
Figura 14. Actividad de glutamato deshidrogenasa	91
Figura 15. Identificación de p53 (A) y citocromo c (B) por “Western blot”.	92
Figura 16. Distribución intracelular de p53 en células RINm5F	93
Figura 17. Efecto de la hiperglucemia en la producción de ERO en células RINm5F	94
Figura 18. Efecto de la hiperglucemia en el $\Delta\psi_m$ en células RINm5F	95

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Clasificación de la diabetes	12
Cuadro II. Patologías y procesos degenerativos relacionados con disfunción mitocondrial	19

ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido ribonucleico mensajero	RNA_m
Canal aniónico dependiente de voltaje	VDAC
Canal de potasio dependiente de ATP	KATP
Dihidroxiacetona	DHAP
Carbonil-cianida m-clorofenilhidrazona	cccp
Citocromo c	Cit c
Diabetes tipo 2	DT2
2'7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína	DCDHF-DA
2'7'-diclorodihidrofluoresceína	DCDHF
2'7'-diclorofluoresceína	DCF
Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido	NADH
Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido	NADPH
Dinucleótido de flavina –adenina reducido	FADH
Difosfato de adenina	ADP
Especies reactivas de oxígeno	ERO
Factor inductor de apoptosis	AIF
Factor de crecimiento transformante	TGF-β, TGF-α
Fosfato inorgánico	P_i
Factor nuclear de proliferación celular	PCNA
Genes inducidos por p53	PIGs
Glucosa-6-fosfato	G-6-P
Glutación	GSH
Glutación oxidado	GSSG
Factor transcripcional de genes para la fase S del ciclo celular	E2F
Fructosa-6-fosfato amidotransferasa	GFA
Factor transcripcional de genes κ de inmunoglobulinas en linfocitos B	NF-κB

Inhibidor del activador del plasminógeno	PAI-1
Ioduro de propidio	
Inhibidor del ciclo celular	P21
Isotiocianato de fluoresceína	FITC
Oncoproteína que regula la vida media de p53	MDM2
Oxido nítrico	NO°
Productos de glicosilación avanzada	AGES
Proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2	Bax, Bad, Bid, Bik
Proteínas pertenecientes a la familia de p53	P73, P63
Proteína que interviene en la reparación del DNA	GADD45
Proteína cinasa de ciclinas	Chk2
Protooncogén de linfomas	<i>bcl2</i>
Proteína cinasa c	PKC
Proteínas desacoplantes	UCPS
Receptor de muerte tipo 5	DR5
Receptor de muerte	Fas
Sociedad Americana de Diabetes	ADA
Suero fetal bovino	SFB
Superóxido dismutasa	SOD
Transportador de glucosa tipo 2	GLUT-2
Trifosfato de adenosina	ATP
Ubiquinona Q	CoQ

**ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA MITOCONDRIA Y DE LA PROTEÍNA
P53 EN LA MUERTE DE LAS CÉLULAS DE INSULINOMA INDUCIDA POR
CONCENTRACIONES ELEVADAS DE GLUCOSA.**

Clara Ortega Camarillo

Universidad Autónoma Metropolitana, 2005.

RESUMEN

El mecanismo mediante el cual la hiperglucemia induce la apoptosis de las células β pancreáticas no está completamente entendido. Sin embargo, se sabe que la hiperglucemia crónica promueven un estado de estrés oxidativo que activa a la proteína p53, la cual participa en la regulación de la supervivencia celular. El presente trabajo pretende conocer si el estrés oxidativo generado por hiperglucemia esta relacionado con la apoptosis de las células RINm5F vía translocación de p53 hasta la mitocondria. Con este propósito se cultivaron células productoras de insulina (RINm5F) en medio RPMI 1640-SFB 10%, en presencia de 11 ó 30 mM de glucosa durante 30 minutos, 2, 4, 24 y 48 h. La apoptosis se evaluó mediante citometría de flujo por tinción de las células con anexina-V-FITC e ioduro de propidio (IP); de forma adicional se analizó la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa. Las especies reactivas de oxígeno (ERO), así como su origen se detectaron con la sonda 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCDHF-DA) en presencia de: rotenona 5 μ M (inhibidor del complejo I mitocondrial), cccp 0.1 μ M (desacoplador de la fosforilación oxidativa) y apocinina 10 μ M (inhibidor de la NADPH oxidasa). Con el propósito de conocer la distribución intracelular de p53 y la liberación de citocromo c se realizó un estudio por "Western blot" y por microscopia confocal para lo cual se tiñeron las mitocondrias con

MitoFluor 589 y p53 con un anticuerpo específico. Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial se estimaron mediante los cambios en la fluorescencia del colorante JC-1 (Estuche de R&D Systems). Los resultados demostraron que la concentración alta de glucosa a tiempos cortos (30 minutos, 2, 4 y 24 h), no es un estímulo suficiente para inducir apoptosis en las células RINm5F; ya que no se observaron cambios en el porcentaje de células positivas a anexina V-FITC/negativas a IP (7.52 ± 0.89 y 9.53 ± 1.03 , control y a las 24 h, respectivamente). Un aumento significativo en esta población celular ($36 \pm 11.3\%$) se observó únicamente a las 48 h de cultivo con 30 mM de glucosa, estos eventos correlacionaron con la fragmentación oligonucleosomal del DNA proveniente de estas mismas células. Además se observó un aumento de 2.5 veces con respecto al control (67.32 ± 7.54 y 175.6 ± 18.3 respectivamente) en la producción de ERO de origen mitocondrial, con una importante contribución por parte de la NADPH oxidasa en condiciones de alta glucosa. El análisis por "Western blot" reveló la presencia de p53 en las mitocondrias y por microscopía confocal se determinó que esta proteína puede localizarse en las mitocondrias a partir de las 24 h de cultivo con 30 mM de glucosa, con un incremento a las 48 h. Las modificaciones en la permeabilidad mitocondrial se confirmaron por los cambios en la fluorescencia de JC-1 mediante microscopía confocal y por la liberación citosólica de citocromo c. Con base en estos resultados podemos concluir que en condiciones de estrés oxidativo por alta glucosa, la proteína p53 se moviliza hacia la mitocondria e induce cambios en el potencial de membrana y la liberación de citocromo c, llevando finalmente a la apoptosis de las células RINm5F.

**A STUDY OF THE PARTICIPATION OF THE MITOCHONDRIA AND THE P53
PROTEIN IN THE DEATH OF INSULINOMA CELLS INDUCED BY HIGH
GLUCOSE CONCENTRATIONS**

Clara Ortega Camarillo

Universidad Autónoma Metropolitana, december 2005.

ABSTRACT

The mechanism by which hyperglycemia induces pancreatic β cell apoptosis is not completely understood. However, it is known that chronic states of hyperglycemia promote a state of oxidative stress that activates the p53 protein which participates in cell survival. The aim of this study was to find whether oxidative stress generated by hyperglycemia was the cause of RINm5F cell apoptosis via the translocation of p53 to the mitochondria. In order to carry this out, insulin producing cells (RINm5F) were cultured in RPMI 1640-SFB 10% medium in the presence of 11 or 30 mM glucose for 30 minutes, 2, 4, 24 or 48 hours. Apoptosis was assessed using flow cytometry through the staining of cells with annexin-V-FITC and propidium iodide (PI). Additionally, DNA integrity was analyzed using electrophoresis in agarose gel. The reactive oxygen species (ROS), as well as their origin, were detected using dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCDHF-DA) in the presence of rotenone 5 μ M (mitochondrial complex I inhibitor), cccp 0.1 μ M (de-coupler of oxidative phosphorylation) and apocinine 10 μ M (NADPH oxidase inhibitor). For the purpose of assessing intracellular p53 distribution and the release of cytochrome c, a Western Blot test and confocal microscopy was done for which the mitochondria were stained with MitoFluor 589 and p53 with a specific

antibody. The changes in mitochondrial membrane potential were estimated through the fluorescent changes of the JC-1 stain (R&D Systems Kit). The results demonstrated that short term high glucose concentrations (30 minutes, 2, 4 and 24 hours) is not a strong stimulus for inducing apoptosis in RINm5F cells, since no changes were detected in the percentage of cells positive to annexin V-FITC/negative to PI (7.52 ± 0.89 and 9.53 ± 1.03 , control and at 24 hours, respectively). A significant increase in this cell population ($36 \pm 11.3\%$) was seen only at 48 hours of incubating with glucose 30 mM. These events correlate with the DNA oligonucleosomal fragmentation from these same cells. In addition, a 2.5 fold increase was seen with respect to the control (67.32 ± 7.54 and 175.6 ± 18.3 , respectively) in the production of mitochondrial ROS under hyperglycemic conditions with an important contribution of NADPH oxidase system. The Western blot analysis showed the presence of p53 in mitochondria, and by confocal microscopy, it was determined that this protein is located in mitochondria within the first 24 hours of incubating with 30 mM of glucose, with further increase at 48 hours. Modifications on mitochondrial permeability are confirmed by changes in JC-1 fluorescence using confocal microscopy and the cytosolic release of cytochrome c. Based on these results, we can conclude that under oxidative stress conditions due to hyperglycemia, protein p53 moves towards the mitochondria and induces changes in the membrane potential and the release of cytochrome c, finally leading to the apoptosis of RINm5F cells.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Aspectos generales de la Diabetes

La diabetes es un grave problema de salud pública a nivel mundial, debido al aumento en su incidencia, particularmente en los países en vías de desarrollo o de reciente industrialización. En México, los datos presentados por la Encuesta Nacional de Salud del 2000, estimaron que existen alrededor de 3.6 millones de mexicanos mayores de 20 años que padecen diabetes con prevalencia del 7.5%, ligeramente mayor en las mujeres que en los hombres a partir de los 50 años. La diabetes es la tercera causa de mortalidad general desde 1997 y la primera causa en el grupo de 45 y 64 años de edad. Anualmente se registran 210 mil casos nuevos y se estima que por cada diabético que muere se detectan siete nuevos enfermos. Estas alarmantes cifras se asocian a un cambio en la alimentación y disminución de la actividad física cotidiana. La diabetes tipo 2 (DT2) es la más frecuente en la población y en particular en la población mexicana. Se ha identificado a la obesidad como factor de riesgo en 21.4% de la población, así como también un aumento de la prevalencia asociado al aumento del índice de masa corporal y a la edad. Los pacientes viven en promedio 20 años con la enfermedad y se estima que por cada dos pacientes conocidos existe uno que no se ha identificado. Actualmente es de preocupar el aumento que se observa en la prevalencia de diabetes tipo 2 en niños y jóvenes (Zimmet et al., 2001).

La diabetes comprende un grupo heterogéneo de desordenes hiperglucémicos con dependencia genética que afecta al metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, bien por falta de secreción de insulina o por disminución de la sensibilidad tisular a esta hormona (Giogino et al., 2005). La diabetes está asociada con complicaciones tardías como retinopatía, neuropatía, nefropatía y problemas vasculares, siendo las causas principales de muerte

asociadas con esta enfermedad, la falla renal, gangrena e infarto al miocardio (Tapia, 1999).

De acuerdo a la Sociedad Americana de Diabetes (ADA, 2004), la diabetes se ha clasificado en 4 categorías principales con base en su fisiopatología, destacando la diabetes tipo 1 y 2 (Cuadro I). En la diabetes tipo 1 se presenta un proceso autoinmune que provoca la destrucción progresiva y selectiva de las células β pancreáticas, lo que conlleva a una deficiencia absoluta de insulina. La diabetes tipo 2, en la mayoría de los casos, involucra un estado prediabético que se caracteriza por una menor sensibilidad de los tejidos efectores a las acciones de la insulina (músculo y tejido adiposo principalmente), que lleva a fallas para internalizar la glucosa en respuesta a las concentraciones normales de esta hormona; este evento se conoce como "resistencia a la insulina"; las manifestaciones clínicas de la enfermedad sobrevienen cuando las células β son incapaces de producir la cantidad extra de insulina para contrarrestar la resistencia a esta hormona. Las causas de este tipo de diabetes son hasta ahora desconocidas. Una de las características más notables de la diabetes, es la hiperglucemia, aunque la DT2 y en menor grado la intolerancia a la glucosa, comúnmente ocurren junto con una colección de problemas bioquímicos que constituyen el denominado síndrome metabólico X, que incluye obesidad central, hipertensión, aterosclerosis, hipertrigliceridemia y bajas concentraciones de lipoproteínas de alta densidad-colesterol (HDL-colesterol) (Lebovitz, 1999).

La DT2 está caracterizada por alteraciones en la secreción de insulina. Investigaciones recientes sugieren que una disminución en la masa de células β puede contribuir a este efecto. Analizando biopsias de tejido pancreático de sujetos sanos obesos y delgados, y de diabéticos, se ha demostrado una disminución en la masa de células β de los diabéticos. El mecanismo

responsable de esta disminución, es el incremento en la tasa de muerte por apoptosis (Butler et al., 2003). La destrucción de las células β pancreáticas en cultivo con concentraciones elevadas de glucosa, se ha asociado a la activación de la apoptosis (Augstein et al., 1998; Didac y Mandrup-Poulsen, 1998; Donath et al., 1999; Mandrup-Poulsen, 2001); por lo que los estudios encaminados a detener la apoptosis pueden ser de gran importancia en la prevención y manejo de la diabetes.

La apoptosis constituye una medida fisiológica de eliminación celular, bajo control genético, que se caracteriza por colapso celular, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA. Las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas por células vecinas o macrófagos, previniendo una reacción inflamatoria. La apoptosis se ha propuesto como un evento crítico para mantener la homeostasis tisular, que asegura el estado de salud de los organismos (Hengartner, 2000).

Cuadro I. Clasificación de la Diabetes

Tipo de Diabetes	Características
1	- Destrucción total de células β - Mediada por inmunidad idiopática
2	- Resistencia a la Insulina - Destrucción parcial de células β
Otros tipos específicos	- Defectos genéticos en la función de la célula β - Defectos genéticos de la insulina - Endocrinopatías - Inducida por químicos o fármacos - Asociada a infecciones
Diabetes gestacional	

(ADA, 2004).

2. ANTECEDENTES

2.2.- Fisiología de la célula β :

El páncreas humano cuenta con 1 a 2 millones de islotes de Langerhans, lo que corresponde entre el 3 y 5% de la masa pancreática total, éstos se encuentran distribuidos de forma aparentemente aleatoria; cada islote mide aproximadamente 0.3 mm de diámetro; están organizados en torno a pequeños capilares, hacia los que vierten sus hormonas. La localización de los islotes está relacionada con su ontogenia, aquellos islotes relativamente grandes en el ratón están claramente situados de forma adyacente al conducto pancreático del que se desarrollan en el feto. En el humano, el desarrollo de los islotes comienza a las 10 semanas de la gestación y se cree que continúa hasta la niñez (Bonner-Weir, 2000). Los islotes están constituidos por 3 tipos fundamentales de células, *alfa*, *beta* y *delta*, que se diferencian entre sí por sus características morfológicas y de tinción. Las células β representan entre el 60 y 80% de la totalidad, se localizan en el centro de cada islote y se encargan de secretar insulina y amilina, esta última suele liberarse paralelamente a la insulina aunque su función no se conoce con certeza. Las células β son células altamente especializadas que secretan insulina en respuesta a una gran variedad de estímulos, el más importante lo constituye la glucosa. Su función normal es dependiente de la expresión de un grupo reducido de genes que permiten que responda de igual manera a un pequeño incremento de la glucosa sanguínea, con la liberación de una cantidad apropiada de insulina a la circulación (Jonas et al., 1999).

La masa de células β pancreáticas está regulada por al menos cuatro mecanismos independientes: (i) replicación (mitosis de células existentes), (ii) tamaño, (iii) neogénesis

(células β nuevas a partir de células epiteliales del ducto pancreático) y (iv) apoptosis. La suma de los tres primeros menos la tasa de apoptosis da como resultado la masa total de células β pancreáticas. La contribución de cada uno de ellos es variable y puede cambiar en los diferentes estados de la vida o bien cuando la masa de células β se adapta a los cambios metabólicos (Rhodes, 2005). En condiciones normales, justo después del nacimiento, hay un incremento transitorio en la replicación y neogénesis de las células β , también se observa apoptosis, probablemente necesaria para el arreglo final de los islotes pancreáticos. Debido a que la tasa de apoptosis es baja, el resultado es un aumento neto en la masa celular; estos eventos se han descrito en roedores (Bonner-Weir, 2000). Posteriormente, durante la niñez y la adolescencia la tasa de replicación celular, la neogénesis y la apoptosis disminuyen de forma importante. En el adulto, el tiempo de vida estimado para las células β , es de aproximadamente 60 días. En condiciones fisiológicas cerca de 0.5% de células β experimentan apoptosis, que se neutraliza por la tasa de replicación y en menor grado por la neogénesis. Normalmente, el tamaño de las células β es relativamente constante, por lo tanto la masa celular a lo largo de la vida del adulto, también es constante; no así en los últimos años de la vida, donde se observa una disminución en la masa de células β por un ligero incremento en la apoptosis, lo que puede explicar parcialmente por qué las personas de edad avanzada muestran mayor predisposición a padecer diabetes tipo 2 (Rhodes, 2005). Las células β conservan su capacidad de adaptación a la carga metabólica, aún en condiciones de obesidad y resistencia a la insulina, sin embargo llega un momento en el cual se presenta una disminución progresiva en la masa de las células β tanto en roedores como en humanos y que coincide con el inicio de la diabetes tipo 2, ésta disminución se debe al incremento en la tasa

de apoptosis.

2.1.1.- Función mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo citoplasmático de características muy especiales, quizá debido a su posible origen endosimbiótico siendo un componente importante en la vida de la célula. La hipótesis endosimbiótica del origen de la mitocondria se basa en la presencia de la doble membrana que la rodea y de DNA circular mitocondrial, muy parecido al de las bacterias. El DNA mitocondrial en el humano, contiene solamente 37 genes (16 569 pares de bases), codifica para 13 polipéptidos, que son parte del complejo enzimático de multisubunidades de la cadena respiratoria. El genoma nuclear especifica el resto de subunidades enzimáticas y otras proteínas mitocondriales; las cuales son sintetizadas en el citosol e importadas a la mitocondria. El núcleo también controla la actividad transcripcional del DNA mitocondrial a través de proteínas reguladoras como: el factor transcripcional mitocondrial A, codificado por el mismo. El DNA mitocondrial es muy susceptible a mutaciones, debido a que posee únicamente secuencias codificantes y sus mecanismos de reparación son muy pobres; como consecuencia es muy sensible al estrés oxidante (Maechler y Wolheim, 2001). Estructuralmente, la mitocondria presenta dos compartimentos bien definidos. matriz y espacio intermembranal, delimitados por dos membranas, interna y externa, con características morfológicas y funcionales bien definidas (De Pierre y Ernster, 1997; Gray et al., 1999; Gottlieb 2000). En la matriz se localizan varias copias del genoma circular mitocondrial (herencia de su pasado procarionta), ribosomas y numerosos complejos enzimáticos necesarios tanto para las funciones energéticas, como para la expresión y replicación génica. El espacio intermembranal tiene un menor contenido proteico, en el que se

localizan las enzimas que median el tránsito de sustancias entre la matriz mitocondrial y el citosol. Del mismo modo, sus membranas presentan también diferencias significativas. La membrana interna, caracterizada morfológicamente por presentar invaginaciones denominadas crestas, presenta multitud de complejos enzimáticos (los componentes de la cadena transportadora de electrones, la ATP sintasa) y proteínas que regulan el paso de metabolitos (el transportador de nucleótidos de adenina), resultando especialmente impermeable a iones. La membrana externa, a diferencia de la interna posee la proteína porina (Gray et al., 1999), conocida en la actualidad como canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), el cual es permeable, en condiciones fisiológicas, al paso de iones y metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6000 daltones (Figura 1).

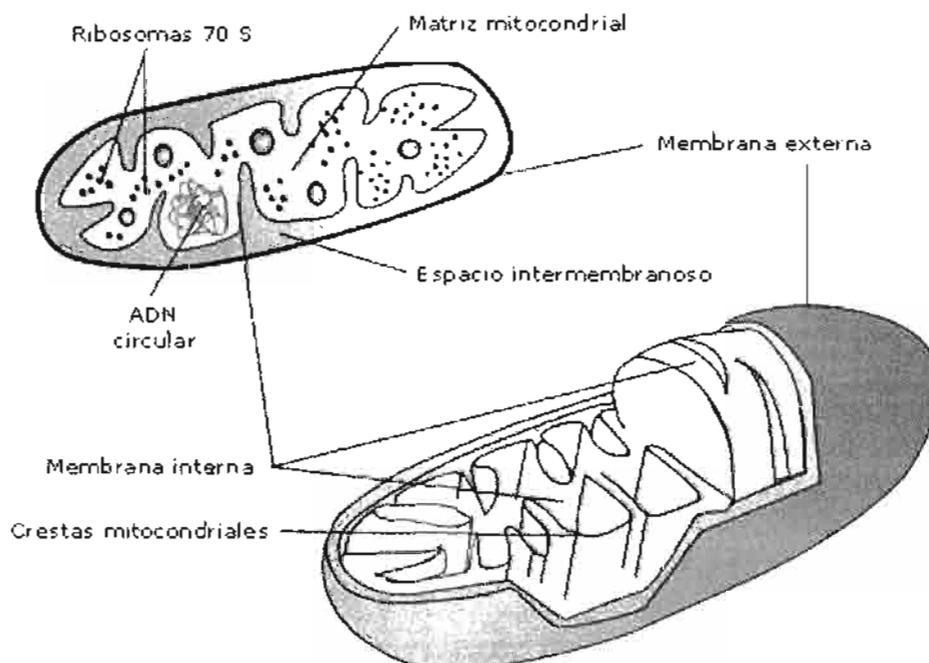


Figura 1.- Estructura de la mitocondria.

La mitocondria constituye el centro en la vida y muerte de la célula. Aproximadamente el 98% del oxígeno que respiramos es consumido por las mitocondrias, en un proceso indispensable para la formación de ATP, necesario para las funciones vitales de la célula, como: mantenimiento del gradiente iónico transmembranal, síntesis de proteínas y transporte de vesículas. De forma adicional a la provisión de ATP, la mitocondria participa en eventos importantes de la fisiología celular. Específicamente, en las células β pancreáticas, el ATP y otros factores mitocondriales acompañan el acoplamiento del metabolismo de la glucosa a la secreción de insulina y como sensor de la tensión de oxígeno en la carótida y la vasculatura pulmonar. Hace un par de décadas se observó que su presencia era necesaria para la inducción de muerte celular por apoptosis, por lo que actualmente se sitúa a la mitocondria como el punto donde convergen diferentes vías de señalización para la apoptosis (Wang, 2001). Los cambios en la permeabilidad de las membranas de la mitocondria controlan la liberación de diversas proteínas como el citocromo c (cit c) y el factor inductor de apoptosis (AIF), los que activan diferentes rutas de señalización necesarias para la inducción de la muerte celular por apoptosis (Ortega-Camarillo et al., 2001). Además de las enzimas necesarias para el metabolismo intermediario, la mitocondria alberga enzimas limitantes de la biosíntesis de esteroides, del grupo hemo y la anhidrasa carbónica. Por lo que no es de sorprender que las alteraciones en la función mitocondrial conduzcan al desarrollo de enfermedades, a cambios sutiles en la fisiología e incluso la muerte de la célula. Un número creciente de estudios coloca a la disfunción mitocondrial como el centro de diversas patologías, principalmente en el corazón y en el sistema nervioso central, diabetes y padecimientos relacionados con el envejecimiento (Olson et al., 2001) (Cuadro II).

Cuadro II.

Enfermedades y procesos relacionados con disfunción mitocondrial.

Procesos neurodegenerativos:	Parkinson
	Alzheimer
	Esclerosis aminotrófica lateral
Diabetes	
Envejecimiento	
Corazón, cerebro y riñón	
Diabetes tipo mody	

Una de las principales características fisiológicas de la mitocondria es la generación de un potencial de membrana a través de su membrana interna, como consecuencia directa de reacciones bioquímicas que constituyen la cadena respiratoria, el que es alimentado por el metabolismo de substratos como el piruvato, algunos aminoácidos y los productos de la β -oxidación de los ácidos grasos que entran al ciclo de los ácidos tricarbóxicos y mantienen el estado reducido de las coenzimas dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) y dinucleótido de adenina-flavina (FADH₂). La cadena respiratoria conduce los electrones que eventualmente son transferidos al oxígeno, también se transfieren protones que cruzan la

membrana interna mitocondrial, y generan un gradiente que se manifiesta en el potencial de membrana mitocondrial, con un valor entre 150 - 180 mV, con carga negativa con respecto al citosol. La energía de este potencial es utilizada para la producción de ATP (Hicks y Medina, 2001).

El flujo de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial se lleva a cabo por 4 complejos enzimáticos anclados a la membrana, junto con el citocromo c y la ubiquinona Q (CoQ). El NADH proveniente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos dona electrones al complejo I, éste a su vez los transfiere a la CoQ, la cual también puede ser reducida por los electrones donados por varias deshidrogenasas que contienen FADH₂, como la succinato-ubiquinona reductasa (complejo II). Los electrones de la CoQ son transferidos al complejo III. Posteriormente pasan a través del citocromo c, al complejo IV y finalmente al oxígeno molecular. La transferencia de electrones a través de los complejos I, III y IV generan un gradiente de protones (voltaje) y gran parte de la energía de este gradiente, es utilizada para producir ATP a través de la ATP sintasa (complejo V). Así mismo esta energía puede ser disipada en forma de calor a través de las proteínas desacoplantes (UCPs). Cuando hay una sobrecarga de protones, el transporte de electrones en el complejo III se inhibe parcialmente y promueve el retorno de electrones a la coenzima Q y su donación al oxígeno molecular, facilitando así la producción del anión superóxido (Figura 2) (Hicks y Medina, 2001; Duchon, 2004). Este proceso está regulado no solamente por el suministro de sustratos sino también por Ca²⁺, el cual incrementa la actividad de varias deshidrogenasas. Un aumento en las concentraciones de Ca²⁺ intracelular, es dirigido a la mitocondria a través del transportador unidireccional de Ca²⁺, lo que asegura que los requerimientos energéticos de la célula se cubran de forma adecuada. En la célula β, la glucosa favorece la entrada de Ca²⁺ por

activación de la cadena respiratoria mitocondrial. El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), conduce a la producción de ATP y a la acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria.

Por otro lado, las mitocondrias, gracias a su capacidad de internar Ca^{2+} y precipitarlo en forma de fosfatos, participan junto con el retículo endoplásmico, las bombas iónicas y canales localizados en la membrana celular, en la regulación de los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} libre (Gray et al., 1999). Esto es un hecho de suma importancia, ya que el Ca^{2+} constituye una de las moléculas de señalización de mayor importancia fisiológica, en diversos procesos metabólicos, incluyendo el mecanismo de secreción de la insulina en las células β pancreáticas.

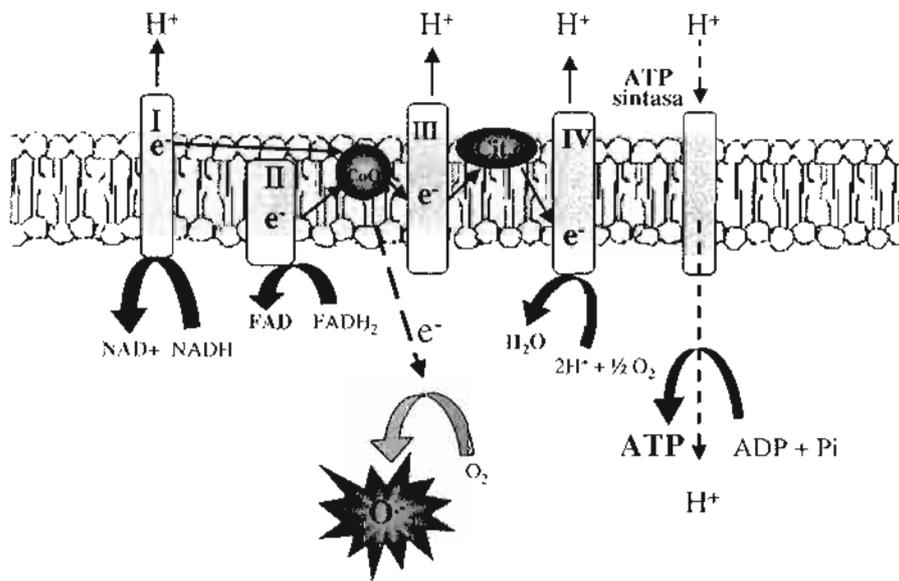


Figura 2. Flujo de electrones y protones a través de los cuatro complejos de la cadena respiratoria. La coenzima Q (CoQ) captura vía los complejos I y II. El ubiquinol sirve como un acarreador móvil para los electrones y protones y pasa los electrones al complejo III, el cual los transfiere a otro conector móvil, el citocromo c. El complejo IV pasa los electrones del citocromo c reducido al oxígeno. El flujo de electrones a través de los complejos I, III y IV se acompaña por uno de protones, que va desde la matriz hacia el espacio intermembranoso. Cuando hay una sobrecarga de protones, el transporte de electrones en el complejo III se inhibe parcialmente y promueve su retorno a la CoQ y su donación al oxígeno molecular, facilitando así la producción del anión superóxido.

2.1.2. Mitocondria y Apoptosis

La apoptosis constituye un mecanismo fisiológico mediante el cual son eliminadas las células dañadas, envejecidas y/o mutadas, también participa en otros procesos vitales como el desarrollo embrionario, el control de la homeostasis y la regulación del sistema inmunitario. Además la apoptosis por exceso o defecto, está involucrada en una amplia variedad de procesos patológicos (proliferación maligna) (Olson y Kornblut, 2001). Una diversidad de eventos señalan a la mitocondria como el efector principal de la apoptosis. Estos incluyen la liberación de activadores de caspasas como el citocromo c, cambios en el transporte de electrones, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, alteración de mecanismos de óxido-reducción celular y la participación de las proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2.

En los últimos años la mitocondria ha recibido atención especial por su participación en la fase efectora de la apoptosis. El interés se ha centrado alrededor de la apertura de canales o poros de transición mitocondrial y la liberación de diversos factores proapoptóticos, entre ellos el citocromo c. En la mayoría de los sistemas donde ocurre la apoptosis se observa, en la membrana mitocondrial, la formación de un canal de gran conductancia conocido como poro PT. Su estructura y composición no se conocen por completo, pero entre sus constituyentes se encuentran proteínas de la membrana interna como el traslocador de adenina nucleótido (ANT) y porinas o VDAC, que actúan en los sitios de contacto de la membrana interna y externa, creando un canal a través del cual pasan moléculas ≤ 1.5 kDa. La apertura de este canal provoca la desregulación de la mitocondria y pérdida del potencial transmembranal, debido a un aumento de la osmolaridad de la matriz, haciendo que ésta se

expanda y eventualmente se rompa y libere proteínas activadoras de caspasas, localizadas en el espacio intramembranal hacia el citosol y el desacoplamiento de la cadena respiratoria, que se reconoce como una falla temprana de muerte, donde participan diversos factores como la vía de señalización de la ceramida. Los oxidantes y los aumentos patológicos de Ca^{2+} citosólico pueden también inducir la ruptura de la membrana externa de la mitocondria (James y Murphy, 2002).

Por otro lado, informes recientes sugieren que los cambios mitocondriales están bajo el control de los productos génicos de *bcl-2*. Se han establecido modelos con liposomas que llevan los canales VDAC, en los que se demuestra que las proteínas proapoptóticas Bax y Bak aceleran la apertura de los canales VDAC y permiten la salida de citocromo c, mientras que las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L cierran estos canales por unión directa con Bax y Bak. La explicación de ello es que durante la interacción de VDAC con Bax y Bak ocurren cambios conformacionales, formando un megacanal que permite la salida de citocromo c (Adams y Cory, 1998). El cual al interactuar con Apaf 1 y la procaspasa 9 forman el apoptosoma en los vertebrados, resultando en la activación de la caspasa 9; únicamente después de este proceso la caspasa 9 puede activar otras caspasas, como la caspasa 3, y de esta manera desencadenar la cascada proteolítica esencial para la apoptosis. Las mitocondrias de algunas células también liberan al factor inductor de apoptosis (AIF), una flavoproteína que se transloca hasta el núcleo e induce la condensación de la cromatina y fragmentación del DNA a gran escala (Wang, 2001). No obstante, algunos estudios demuestran que la liberación de citocromo c y la activación de las caspasas puede ocurrir antes de que se detecte la pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria. Esto sugiere que hay mecanismos diferentes que regulan la permeabilidad de las membranas interna y externa de la mitocondria (Bernardi et

al., 1999).

El hecho que Bcl-2 se localice en la membrana mitocondrial ha permitido pensar que la función antiapoptótica de Bcl-2 podría relacionarse con el mantenimiento de la integridad de la membrana mitocondrial y, en un sentido más amplio, en regular los procesos de tráfico intracelular. En este contexto, cabe destacar que la cooperación de Bcl-2 con c-myc inhiben la translocación de p53 desde el citoplasma al núcleo, durante la fase G0/G1 del ciclo celular, periodo en el que la célula es susceptible a la inducción de apoptosis (Ryan et al., 1994).

2.1.3.- Secreción de insulina

Las concentraciones de insulina están normalmente determinadas por un sistema de retroalimentación responsable de mantener los niveles de glucosa sanguíneos. La respuesta de las células β pancreáticas a la glucosa está determinada por la sensibilidad de los tejidos periféricos a la acción de insulina. Los sujetos con resistencia a esta hormona tienen una tasa de secreción elevada y, por lo tanto, los niveles también se encuentran altos con respecto a los sujetos sensibles a la acción de insulina. La insulina también se secreta en respuesta a aminoácidos, ácidos grasos y la magnitud de respuesta está modulada por una gran variedad de factores neurales (Sistema autónomo simpático y parasimpático) y hormonales (glucagón, polipéptido inhibidor gástrico y la somatostatina), siendo la glucosa, el estímulo principal (Macchler et al., 1999).

La secreción de insulina muestra una respuesta muy rápida a la glucosa y un perfil pulsátil complejo. El incremento en la secreción de insulina después de la administración

intravenosa de glucosa es virtualmente instantáneo; de igual manera ocurre en un intervalo de minutos después de la ingesta de glucosa. El perfil temporal de secreción de insulina consiste en pulsos de amplitud pequeña que se presentan entre 5 y 10 min, seguido por oscilaciones de mayor amplitud, entre 1 y 2 h (Webb et al., 2001).

Las células β controlan la homeostasis de la glucosa en los vertebrados mediante la secreción de insulina por un mecanismo altamente regulado. La insulina se almacena en vesículas secretoras, las cuales son liberadas en respuesta a concentraciones elevadas de Ca^{2+} , como resultado de la apertura de los canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje (Ashcroft y Rorsman 2004). El acoplamiento estímulo-secreción tiene lugar en el orden de segundos a minutos e implica un aumento en la producción de ATP proveniente del metabolismo de glucosa. Las células β también responden a la glucosa a largo plazo (minutos a horas) por un incremento en la traducción y biosíntesis de proinsulina en el retículo endoplásmico. Las alteraciones en este proceso disminuyen la producción de insulina y son un factor determinante para la presentación de DT2 (Satiel y Kahn, 2001).

En presencia de glucosa hay un aumento de las vías glucolíticas y por lo tanto de las coenzimas reducidas NADH y FADH_2 , las cuales favorecen un aumento en la producción de ATP a través de la cadena respiratoria mitocondrial y de la relación ATP/ADP. Esta condición induce el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}), con una subsecuente despolarización de la membrana plasmática, la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y un aumento intracelular de Ca^{2+} necesario para la activación de la exocitosis de los gránulos de insulina (Webb et al., 2001). El incremento de Ca^{2+} citosólico activa a la calmodulina, la cual a su vez induce la fosforilación de miosina y tubulina, quienes favorecen

el movimiento y fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática (Meglasson y Matschinsky, 1986) (Figura 3). Las alteraciones en este proceso conducen a una reducción en la producción de insulina, un factor muy importante y característico en el desarrollo de DT2, esto sugiere que la célula β en el diabético es incapaz de sintetizar cantidades suficientes de insulina (Maechler et al., 1999; Webb et al., 2001).

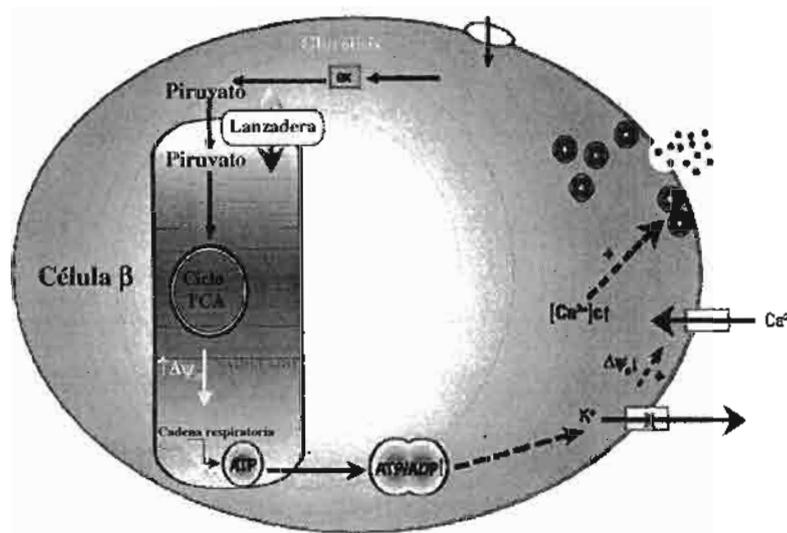


Figura 3. Mecanismo de secreción de insulina en respuesta a glucosa. La glucosa se metaboliza a través de la glucólisis y es convertida en piruvato, el cual entra al TCA y provee los equivalentes reductores a la cadena respiratoria, aumentando la producción de ATP, y el cierre de canales K_{ATP} , despolarización de la membrana y apertura de canales de Ca^{2+} el aumento de Ca^{2+} es esencial para la exocitosis de insulina.

2.2.- Estrés oxidante

2.21.- Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidante

El término radical libre se aplica a especies químicas que contienen uno o más electrones no apareados, ya sea por pérdida o ganancia de ellos. La presencia de electrones no apareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y la hace generalmente más reactiva que su correspondiente “no radical”. Sin embargo, la reactividad química de los diferentes tipos de radicales libres es muy variable (Zentella y Saldaña, 1996).

La mayoría de los radicales libres de interés biológico son los derivados del oxígeno, también llamados “especies reactivas de oxígeno” (ERO). La mitocondria ha sido propuesta como su fuente principal. Como se mencionó antes, de forma paralela a la reducción del O_2 hasta H_2O por la citocromo c oxidasa en la cadena transportadora de electrones, tiene lugar la reducción, no enzimática y monoelectrónica del O_2 molecular, dando lugar a la formación de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Se estima que más del 1% del flujo de electrones mitocondriales conduce en condiciones normales, a la formación de este radical, por lo que, cualquier alteración en el transporte de electrones aumenta de forma importante su producción. De forma adicional, el anión superóxido puede dar origen a otras especies reactivas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Figura 4) (Medina-Navarro y Hicks, 2001).

Existen otras fuentes de ERO en el organismo, por ejemplo el $O_2^{\cdot-}$ se produce durante la fagocitosis y es parte del mecanismo utilizado para la destrucción de microorganismos extraños (Zentella y Saldaña, 1996). El radical HO^{\cdot} se produce como consecuencia de la interacción de las radiaciones electromagnéticas con baja longitud de onda con el agua o por el

rompimiento del ONOOH y por la reacción de Fenton. Este radical tiene la propiedad de interactuar prácticamente con cualquier molécula.

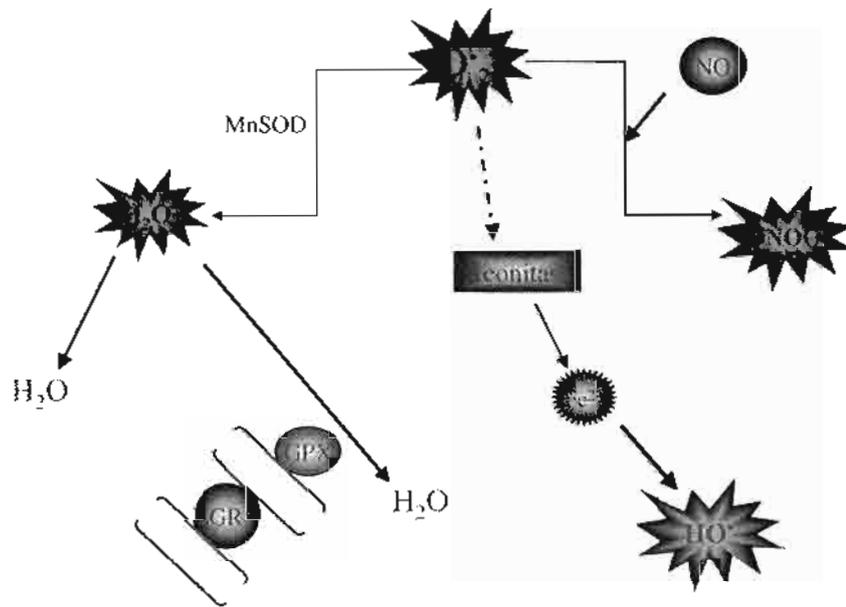


Figura 4.- Especies reactivas de oxígeno. El anión superóxido puede dar lugar a la formación de otras especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. En este esquema también se muestran los sistemas antioxidantes.

Las especies reactivas de oxígeno generadas por el metabolismo normal existen en concentraciones muy bajas, de 1×10^{-4} a 1×10^{-9} M; no viajan muy lejos de los sitios en los que se forman, debido a que su vida media no sobrepasa los microsegundos. Cuando las ERO

reaccionan con una molécula, pueden dar origen a otras especies reactivas y desencadenar una reacción en cadena autocatalítica, por ejemplo durante la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, de tal manera que la especie reactiva secundaria y los productos de la degradación oxidativa tienen efectos amplificados a distancia del sitio de origen (Zentella y Saldaña, 1996).

Las ERO tienen una función muy importante en diversos procesos biológicos, por ejemplo, son parte de la cascada de eventos relacionados con la acción antimicrobiana de las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos), vía la NADPH oxidasa. Además están involucrados en una gran variedad de vías de señalización celular, actuando en algunas instancias como segundos mensajeros de ligandos específicos; incluyendo el factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento derivado de plaquetas, angiotensina II, el factor de crecimiento de fibroblastos y endotelina, entre otros. Las ERO también participan en la regulación de algunos factores de transcripción, como el NF- κ B (Szewczyk y Wojtczak, 2000). Sin embargo un exceso en la producción de estas especies reactivas es capaz de oxidar diversas biomoléculas (lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos) y promover de esta manera el daño tisular y la muerte celular. Por esta razón, las células poseen sistemas antioxidantes para controlar fisiológicamente la producción excesiva de las ERO, o bien para limitar su capacidad de daño. A pesar de ello, diversas condiciones alteran el balance entre la producción de ERO y las defensas celulares, lo que genera un estado conocido como estrés oxidante, el cual resulta en disfunción y destrucción celulares (Ortega-Camarillo et al., 1999; Medina-Navarro y Hicks, 2001). Un desbalance entre los factores pro- y antioxidantes juega un papel muy importante en el desarrollo de diversas patologías como la diabetes mellitus, el

cáncer y la aterosclerosis entre otras (Halliwell, 1994). Por esta razón es de suma importancia que las células posean sistemas antioxidantes que protejan y/o inhiban la producción de las especies reactivas de oxígeno.

2.2.2.- Sistemas antioxidantes.

Los antioxidantes se pueden clasificar con base en su estructura y función biológica en: 1) enzimáticos, como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa y; 2) no enzimáticos, como las vitaminas C y E, el β -caroteno, el ácido úrico y la bilirrubina, entre otros (Medina-Navarro, 2001).

Enzimáticos: El más importante es la superóxido dismutasa (SOD), enzima encargada de catalizar la dismutación del anión superóxido, con la subsecuente formación de peróxido de hidrógeno, el cual puede constituir un problema aún más grave para la célula, ya que en presencia de metales (reacción de Fenton), puede propiciar la formación del radical hidroxilo; para evitarlo entran en acción otras enzimas como la catalasa presente en los peroxisomas, la cual cataliza la formación de dos moléculas de agua y oxígeno molecular a partir de dos moléculas de peróxido de hidrógeno. Otro grupo de enzimas antioxidantes lo constituyen las peroxidases, de éstas la más importante en el mamífero es la glutatión peroxidasa la cual cataliza la formación de agua y glutatión oxidado a partir de peróxido.

No enzimáticos: En este grupo destaca la vitamina E, la cual en el ser humano protege contra la lipoperoxidación, al actuar de manera directa con varios radicales entre los que se

incluyen el HO[•], el O₂^{•-}; la vitamina C interactúa con los mismos oxirradicales, pero además es capaz de regenerar el α -tocoferol a su estado activo.

2.2.3.- Estrés oxidante en diabetes

El paciente diabético descompensado presenta un estado de hiperglucemia crónico que favorece la producción excesiva de ERO y un estado de estrés oxidante, el cual es considerado un elemento fundamental en el desarrollo de diversos cambios fisiopatológicos relacionados con algunas de las complicaciones crónicas de la diabetes (West, 2000; Brownlee, 2001). En estos sujetos la ausencia de insulina o de sensibilidad celular para esta hormona hace que los tejidos muscular, hepático y adiposo, que normalmente son los principales consumidores de glucosa, no puedan captar esta hexosa. Por el contrario, el resto de los tejidos que no necesitan de insulina para que la glucosa ingrese al interior, se encuentran con una elevada concentración de glucosa intracelular (Taniguchi et al., 1998).

El grupo de investigación de Nishikawa y col. (2000) han considerado que la sobreproducción de anión superóxido por la mitocondria en condiciones de hiperglucemia es responsable de tres de los mecanismos propuestos del fenómeno de toxicidad producido por concentraciones elevadas de glucosa (“glucotoxicidad”): (1) el aumento en el flujo de la glucosa a través de la vía del poliol, (2) el aumento en la formación de los productos de glicosilación avanzada, (3) la activación de la proteína cinasa C (Min et al., 1999; Brownlee, 1995, 2001 y 2005). Un cuarto mecanismo propuesto de la glucotoxicidad, lo constituye el aumento de la biosíntesis de las hexosaminas (Hawkins et al., 1997). La activación de estos

cuatro mecanismos patogénicos converge en un sólo proceso: la sobreproducción de anión superóxido por la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Nishikawa et al., 2000; Brownlee, 2001; Sakai et al., 2003).

1.- La vía de los polioles a través de la participación de la enzima aldolasa reductasa, conduce a la acumulación intracelular del sorbitol y fructosa y, favorece un desbalance de los sistemas intracelulares de óxido-reducción dado por los nucleótidos de niacinamida: NADH/NAD⁺ (Figura 5). Se ha propuesto que estos nucleótidos participan de manera preponderante en las alteraciones propias de la diabetes mellitus, debido a que catalizan principalmente reacciones de óxido-reducción. De tal manera que el incremento en la relación NADH/NAD⁺ es considerado como sinónimo de una diabetes mal controlada que mimetiza los efectos de una hipoxia verdadera sobre las funciones neuronales y vasculares tan importantes en la patología de las complicaciones diabéticas, cuyos efectos son mediados por una alteración en el metabolismo de lípidos y un aumento en la producción del anión superóxido. Otra consecuencia del aumento en la relación NADH/NAD⁺ es la disminución en la disponibilidad del NADPH, la cual afecta en forma negativa la actividad de otras enzimas que lo requieren, como la óxido nítrico sintasa (NOS), la glutatión reductasa (GR), la catalasa y la NADPH oxidasa. Algunas de ellas participan en los mecanismos antioxidantes; por lo tanto, el agotamiento de NADPH explicaría en parte la deficiencia de los sistemas antioxidantes en el paciente diabético, como el dependiente del glutatión y de la catalasa. Para que el glutatión realice su acción como principal antioxidante intracelular en respuesta a ERO, es requisito indispensable que mantenga su forma reducida (GSH), por acción de la glutatión reductasa, sobre la forma oxidada (GSSG), lo que requiere del consumo de NADPH. Por otra parte, la activación de la catalasa también depende de NADPH (Díaz-Flores et al., 2004).

VIA DEL SORBITOL

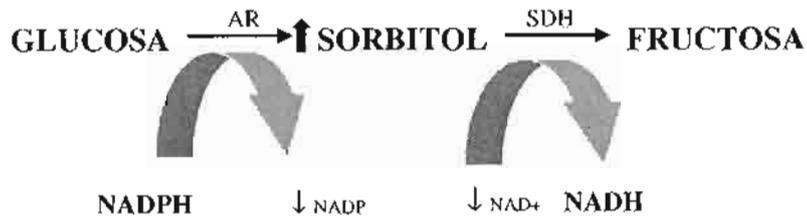


Figura 5. Vía del sorbitol. La glucosa es transformada por la acción de dos enzimas: la aldolasa reductasa (AR) y la sorbitol deshidrogenasa (SDH). La primera reduce de forma irreversible a la glucosa en sorbitol y la segunda, cataliza la transformación de sorbitol en fructosa.

2.- La glicosilación no enzimática de un gran número de proteínas intra y extra celulares, con la formación de productos de glicosilación intermedia y avanzada, por ejemplo la carboximetil-lisina y la hidroximetil-lisina (Brownlee, 1995). En este tipo de reacciones, la glucosa es el carbohidrato generalmente considerado, sin embargo, cualquier carbohidrato que posea un grupo carbonilo libre como la fructosa y la glucosa-6-fosfato (o sus derivados), puede reaccionar con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos para formar productos de glicosilación

avanzada, conocidos como AGE, por sus siglas en inglés (advanced glycation end products) (González et al., 2000; Ulrich y Cerami, 2001). Este proceso inicia con la interacción de los grupos carbonilos de carbohidratos con los grupos amino de proteínas, en especial con el amino terminal y el ϵ -amino de residuos de lisina, dando origen a los productos tempranos de glicosilación, también llamados de Amadori o fructosamina. A partir de estos productos y por cambios moleculares y oxidaciones, se forman compuestos α -dicarbonilos (α -oxoaldehídos) aún más reactivos, como la 3-desoxiglucosona (Niwa, 1999), el metilglioxal y el glioxal, conocidos como precursores de los AGEs y que al combinarse simultáneamente con dos grupos reactivos de proteínas, forman puentes cruzados muy estables, formando agregaciones y pérdida de sus funciones biológicas (Figura 6). La 3-desoxiglucosona se puede formar también por la autooxidación de la glucosa (Figura 7) en una reacción catalizada por metales, en este proceso se produce el radical superóxido que puede dar origen a HO \cdot . El metilglioxal y el glioxal derivan de los intermediarios de la glucólisis, como el gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato que se acumulan a consecuencia de la hiperglucemia (Best y Thornally, 1999), cuya concentración se encuentra elevada en animales con hiperglucemia y en el paciente diabético.

GLUCOSILACION

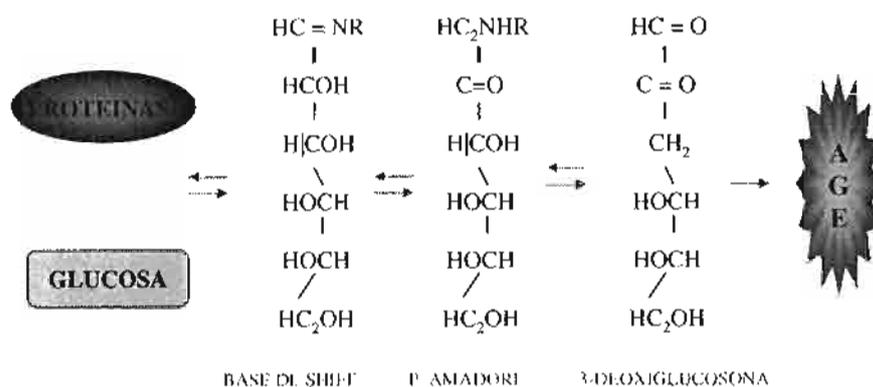


Figura 6. Glicosilación no enzimática de proteínas. La interacción del grupo amino de las proteínas con el grupo ϵ -amino de los residuos de lisina da origen a los productos de glicosilación temprana o de Amadori. Estos a su vez pueden dar origen a compuestos α -dicarbonilos como la 3-desoxiglucosona, el metilglioxal y el glioxal, aún más reactivos.

Las proteínas modificadas por los AGEs pueden encontrarse en el plasma, en el compartimiento intracelular y en la matriz extracelular; especialmente en la pared arterial, el mesanglio glomerular, las membranas basales glomerulares, los vasos capilares sanguíneos, la vasculatura retiniana, el cristalino, el perineurium y las fibras nerviosas mielínicas y amielínicas (Amore et al., 2004). La acumulación de los AGEs ocurre más frecuentemente en proteínas de larga vida como la colágena de distintos tipos, las de citoesqueleto, la mielina y las histonas. De esta manera modifican el ensamble del citoesqueleto y la función reguladora de la matriz extracelular sobre las células (Díaz-Flores et al., 2004). Los estudios realizados *in vitro* poniendo en contacto proteínas con carbohidratos muestran que la glucación puede afectar o no la actividad biológica. Dicho efecto debe ser cuidadosamente estudiado con el objeto de establecer una relación causa-efecto. Hasta ahora, la disminución en la actividad biológica se ha observado en un número reducido de casos, como el de superóxido dismutasa, que desempeña un papel fundamental en los mecanismos de defensa del organismo contra las ERO (Cerami et al., 1987; Okitani et al., 1984). Los efectos de los AGEs no se restringen únicamente a las proteínas. El DNA es una molécula de bajo recambio (al menos en células que no se encuentran en pleno proceso de división), posee grupos amino primarios y se encuentra dentro del núcleo celular en contacto con el azúcar reductor ADP-ribosa (Cervantes-Laurean et al., 1996), por lo que es un blanco potencial para la formación de AGEs y contribuir al incremento de alteraciones cromosómicas y deterioro de la reparación, replicación y transcripción del DNA. Dichos cambios genéticos disminuirían la capacidad de las células para renovar sus proteínas y por lo tanto comprometen la supervivencia del organismo (Cerami et al., 2000). Adicionalmente, los AGEs pueden actuar como inductores de apoptosis (Brownlee, 1995; Kaneto et al., 1996; Min et al., 1999).

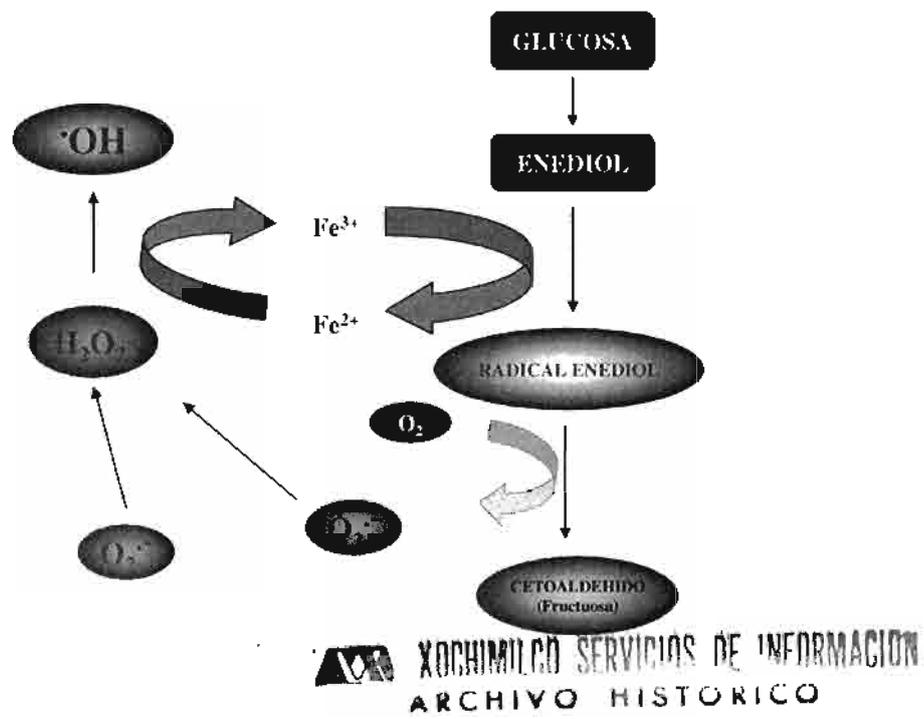


Figura 7. Durante la autooxidación de la glucosa se forma un radical enediol que en presencia de metales puede dar lugar a la producción del radical hidróxilo.

3.- Activación de proteína cinasa C

La acumulación de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y glucosa-6-fosfato (G6P) promueve la producción de diacilglicerol (DAG) y la subsecuente activación de la proteína cinasa C (PKC), mismos que también afectan la homeostasis vascular. La PKC pertenece a la familia de las serinas/treoninas fosfocinasas y presenta por lo menos 11 isoformas (α , β_1 , β_2 , γ , δ , ϵ , ξ , η , θ , λ y μ), codificadas por 10 genes diferentes. Estas proteínas se clasifican en cuatro clases: las convencionales o clásicas (α , β_1 , β_2 y γ), las dependientes de Ca^{2+} y fosfolípidos; las nuevas isoformas independientes de Ca^{2+} (ϕ , ϵ , η , θ , μ), las atípicas (ξ y λ) y las independientes de Ca^{2+} y fosfolípidos (μ) (Yuan et al., 2000). El DAG es un activador natural de PKC y su producción aumenta en las células del endotelio, la retina y los glomérulos renales durante las complicaciones diabéticas en modelos animales y en el humano. Las alteraciones celulares y funcionales atribuidas a la activación de PKC son muy variadas y dependen de la función de esta enzima en los mecanismos de transducción de señales y en su participación en la regulación de la expresión de diversos genes, incluyendo a los de las proteínas de matriz extracelular (fibronectina y colágeno tipo IV), del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y su receptor. Su activación induce la expresión de los genes antes señalados en células mesangiales en cultivo o en glomérulos de ratas diabéticas. Además, afecta la producción de sustancias vasoactivas, por una parte deprime la producción de óxido nítrico y por otra estimula la expresión de ET-1 (Park et al., 2000), lo que conduce a la disminución del flujo sanguíneo de la retina, los nervios periféricos y el riñón, en un modelo de diabetes experimental (Díaz-Flores et al., 2004).

4.- Activación de la vía de las hexosaminas

La fructosa vía sorbitol contribuye a la activación de la vía de las hexosaminas, debido a que la formación de la glucosamina-6-fosfato proviene exclusivamente de la fructosa-6-fosfato y la glutamina, mediante una reacción irreversible catalizada por la glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFA), enzima que regula la vía. La glucosamina-6-fosfato a través de tres reacciones subsecuentes, finalmente da origen a la UDP-N-acetilglucosamina y a la UDP-N-acetilgalactosamina, que se utilizan en la formación de las glicoproteínas y los proteoglicanos. El aumento del flujo a través de esta vía está relacionado con algunos efectos de la diabetes, contribuye en parte a la estimulación de la expresión de genes como los del TGF- α , TGF- β 1, y PAI-1. También participa en la inducción de resistencia a la insulina por lípidos o por hiperglucemia, y se ha sugerido que pueden causar modificaciones del sustrato del receptor de la insulina (IRS) y del transportador de glucosa 4 (GLUT-4) a nivel transcripcional, por adición de residuos de N-acetilglucosamina, los cuales evitan el proceso de fosforilación de IRS y por lo tanto se alteran eventos tempranos en la vía de señalización de la insulina; por otro lado, la glucosaminilación de GLUT-4 altera su afinidad por la glucosa, disminuye su actividad, su estabilidad y modifica su distribución celular, lo cual conduce a fallas en el transporte de glucosa. El enlace que se forma entre las proteínas y la N-acetilglucosamina es del tipo "O-glicosídico" (O-AcGlc). Es posible que a consecuencia de esta unión se alteren los eventos tempranos en la vía de señalización de la insulina, ya sea en forma global o en sitios específicos (Hawkins et al., 1997).

La resistencia de ciertos tejidos a responder a la acción de la insulina es una característica distintiva de ciertas patologías como la DT2. No obstante que los mecanismos

celulares y moleculares responsables de este fenómeno no son del todo entendidos, se ha asociado la activación de la vía de las hexosaminas con el desarrollo de resistencia a la insulina. Se han propuesto varias hipótesis para tratar de explicar el mecanismo por el cuál la activación de las hexosaminas induce resistencia a la insulina. Una de ellas gira en torno a la glucosamina como responsable de impedir la acción de la insulina al inhibir la fosforilación de IRS-1 (Díaz-Flores et al., 2004)

La hiperglucemia es el elemento clave fundamental que desencadena estos mecanismos, los cuales son capaces de inducir cambios en la estructura bioquímica tisular, provocando alteraciones en las características fisicoquímicas de estructuras básicas, que a su vez, están relacionadas con la aparición de complicaciones tardías, características de la enfermedad.

Alternando a la producción de ERO vía la respiración mitocondrial, se ha observado que la activación de la secreción de insulina dependiente de glucosa causa estrés oxidante en las células β pancreáticas. En presencia de glucosa, la relación entre las concentraciones intracelulares de ATP/ADP aumenta e induce el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}), lo que provoca la despolarización de la membrana plasmática, la entrada de Ca^{2+} extracelular y la activación de la exocitosis. También se ha observado que el incremento en las concentraciones de glucosa disminuye la concentración de ADP libre, ésta disminución en un intervalo fisiológico puede ser suficiente para cerrar los canales de K_{ATP} aún a concentraciones constantes de ATP. El decremento de ADP también puede disminuir la producción de ATP, lo que en su momento incrementa el potencial de membrana mitocondrial y la producción de ERO. Aparentemente esta respuesta es una propiedad exclusiva del

acoplamiento estímulo-secreción de las células β . De acuerdo con esta hipótesis, la activación de la secreción de insulina inducida por glucosa tiene una función dual: primero, aumenta la secreción de insulina y segundo, incrementa el estrés oxidante. Esto se traduce en que la tasa de secreción de insulina podría eventualmente tener efectos negativos sobre la propia producción de insulina. De lo anterior se puede concluir que al menos 3 estados durante la secreción de insulina (aumento del flujo glucolítico, disminución de ADP y aumento de Ca^{2+} intracelular) pueden exacerbar la formación de ERO, lo cual puede explicar por qué las células β son quizás las únicas que tienen un mayor riesgo de daño por estrés oxidante y apoptosis (Fridlyand y Philipson, 2004). Las células β pancreáticas son altamente sensibles al estrés oxidante (Marshak et al., 1999). Además se sabe que la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión peroxidasa, es 20 veces más baja en los islotes pancreáticos que en otros órganos como el hígado. Los islotes pancreáticos tienen capacidad antioxidante intrínseca muy baja en comparación con otros tejidos como hígado, riñón, músculo esquelético y adiposo. Grankvist et al., (1981) demostró que los islotes contiene cantidades relativamente pequeñas de superóxido dismutasa Cu/Zn, superóxido dismutasa Mn, catalasa y glutatión peroxidasa (GPx). Esto explica el porque los islotes pancreáticos, constituyen un tejido muy vulnerable al estrés oxidante (Robertson et al., 2004).

Si la secreción de insulina inducida por glucosa pudiera ser responsable del incremento en la producción de ERO en las células β , entonces existe la posibilidad de que la inhibición de este proceso sea utilizado por las células β , como una defensa contra el estrés oxidante. Por lo tanto, se espera que diferentes agentes desacoplantes seguramente disminuyan la producción de ERO, la relación ATP/ADP y como consecuencia la producción y secreción de

insulina.

Otra fuente de ERO la constituye el aumento en la tasa metabólica de los ácidos grasos libres, la cual incrementa el flujo de energía a través de la cadena transportadora de electrones y la producción de ERO en las células β . Los efectos adversos de la exposición crónica de las células β a concentraciones elevadas de ácidos grasos incluyen la disminución en la secreción de la insulina en respuesta a glucosa (Zhou y Grill, 1994), alteraciones en la expresión del gene de la insulina y un incremento en la muerte celular (Lupi et al., 2002). El mecanismo por el cual los ácidos grasos alteran las funciones de las células β , hasta ahora es casi desconocido. Recientemente se ha propuesto que en condiciones de hiperglucemia e hiperlipidemia, la acumulación de metabolitos derivados de la esterificación de ácidos grasos altera la función de la célula β . Este modelo se apoya en estudios realizados con islotes pancreáticos de rata en cultivo, bajo concentraciones elevadas de palmitato en los que se observó una disminución en la expresión del gene de la insulina, únicamente cuando las concentraciones de glucosa también se elevaron (Evans et al., 2003; Robertson et al., 2004).

2.3.- Alteraciones en la célula β por hiperglucemia

El exceso de glucosa circulante afecta el funcionamiento de la célula β pancreática, alterando sus rutas de transducción y por lo tanto su patrón de expresión génica. Estos eventos desembocan a largo plazo en la disfunción de la célula β que se manifiesta por defectos en la secreción de insulina y eliminación del tejido endócrino pancreático mediado por mecanismos apoptóticos (Roche, 2003). En estas circunstancias, en la que aparecen conjuntamente la

resistencia a la insulina en los tejidos diana y el fallo en el funcionamiento de las células β pancreáticas, es que la diabetes tipo 2 se hace evidente.

En condiciones normales, la célula β posee un sistema sensor, que le permite adaptar la cantidad de insulina secretada a los niveles circulantes de glucosa. Aunque la glucosa es el nutriente desencadenante de esta respuesta, los ácidos grasos y algunos aminoácidos también son capaces de regular la secreción de insulina.

La glucosa puede tener efectos deletéreos o benéficos sobre la célula β , dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición a esta condición; en otras palabras, si la célula está expuesta a hiperglucemia aguda (situación fisiológica) o crónica (situación patológica). En los casos de hiperglucemia crónica, la glucosa es capaz de modificar directa e indirectamente diversos programas génicos que desembocan en cambios fenotípicos. Así se ha observado en diversos modelos experimentales con animales y de células en cultivo, que las concentraciones elevadas de glucosa modifican la expresión del gene de la insulina (Kaneto et al., 1999) y del transportador de glucosa GLUT-2, e inducen la activación de la glucocinasa y de otras enzimas que participan en la glucólisis, anaplerosis y lipogénesis (Roche et al., 1997 y 1998). Además de estimular la expresión temprana de genes involucrados en la regulación del ciclo celular como c-myc, c-fos, c-jun entre otros (Susini et al., 1998). En estas circunstancias, la célula β comienza a expresar proteínas típicas de estadios primitivos de su desarrollo, como la hexocinasa I o la lactato deshidrogenasa-A (Grill y Björklund, 2001; Mandrup-Poulsen 2001). Todos estos cambios se acompañan de alteraciones metabólicas y funcionales como defectos en la secreción de insulina, depósitos de

glucógeno, aumento de glucólisis, así como de los procesos anapleróticos y lipogénicos (Roche 2003).

La disfunción de la célula β en la diabetes tipo 2, se caracteriza por una disminución gradual y progresiva que va desde una fase de poca respuesta al estímulo por glucosa para la secreción de insulina, hasta una segunda fase de hiperproinsulinemia, con un nivel de secreción de insulina fijo. Esta característica puede deberse a una disminución en la masa de células β y/o a defectos funcionales de las mismas (Kennedy et al., 2002).

Bajo condiciones normales, existe un balance entre la masa celular pancreática y los requerimientos de acción de la insulina. En la fase prediabética, la resistencia a la insulina periférica es compensada por un incremento en la masa celular, causado principalmente por el estado de hiperglucemia. Sin embargo, durante la hiperglucemia e hiperlipidemia, el aumento de la masa celular no es suficiente para compensar la resistencia a la insulina. De ahí que la pérdida del control en el crecimiento y/o muerte de las células β sea la clave en la patogénesis de la DT 2 (Rhodes 2005). La célula β cambia en masa y funcionalidad a través de la vida, en respuesta a variaciones en la demanda de insulina. La masa de células β está regulada por un balance entre el crecimiento (replicación y neogénesis) y la muerte (apoptosis). Así por ejemplo, durante la gestación la masa de las células β se incrementa hasta un 50% aunado a un aumento en la sensibilidad de la propia célula a la glucosa. La expansión de las células β también se ha observado en la rata Zucker fa/fa (obesa no diabética), con evidencias de hiperplasia e hipertrofia. La hipertrofia es un mecanismo compensatorio activado por el incremento en la demanda de insulina, lo cual probablemente ocurre en las células β que se

encuentran en un estado de envejecimiento, que no son capaces ya de dividirse; este evento involucra inhibidores de ciclinas, que interfieren con el progreso normal del ciclo celular. Sin embargo, cuando los mecanismos compensatorios de la célula β , para enfrentar la resistencia y/o la demanda de insulina se han agotado, la diabetes tipo 2 resulta inminente. Así se ha podido demostrar en estudios post mortem, que una reducción de hasta el 60% de la masa de células β se presenta en pacientes con DT2 (Weir et al., 2001).

Las manifestaciones tempranas de alteraciones en la función de la célula β incluyen una respuesta brusca y retrazada a la glucosa, irregularidades temporales en los pulsos y oscilaciones de secreción de insulina y pérdida del acoplamiento entre los pulsos de secreción de insulina y los niveles de glucosa. La diabetes también está asociada con alteraciones en la conversión de proinsulina a insulina, originando que, la concentración de pro insulina circulante sea mayor que la de insulina en personas con diabetes comparada con las sanas (Kennedy et al., 2002). Recientemente se ha propuesto que las aberraciones en la secreción de insulina podrían estar relacionadas al menos en parte con oscilaciones en las concentraciones de Ca^{2+} citosólico, en respuesta a la sobre estimulación de las células β . En un estudio realizado con islotes pancreáticos de humano en condiciones de hiperglucemia, se observó un aumento en las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} , el cual se mantuvo aún después de normalizar la glucosa (Grill y Björklund, 2001). El aumento persistente de Ca^{2+} puede tener efectos negativos sobre el metabolismo celular, como la disminución en el consumo de glucosa y del potencial de membrana mitocondrial, además de activar enzimas relacionadas con la inducción de muerte celular por apoptosis, lo que conduce a un deterioro funcional irreversible de la célula β (Duchen, 2004).

2.3.1.- Resistencia a la Insulina:

La DT2 generalmente resulta de resistencia a la acción de la insulina sobre la entrada de glucosa, alteraciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos en el tejido periférico y alteraciones en la secreción de la misma. Los defectos en la acción de la insulina normalmente preceden al desarrollo de la hiperglucemia y el incremento inicial en la secreción de insulina compensa el estado de resistencia a la insulina. Esto puede deberse a una mayor secreción de insulina por las células o como ha podido observarse en los roedores, a un incremento en la masa de células β , ya sea por replicación de células existentes o bien por neogénesis a partir de células precursoras en el epitelio ductual pancreático o por ambos; o bien por cambios en la supervivencia de las células β . Necesariamente las células β poseen una reserva compensatoria, de tal manera que la hiperplasia de los islotes y la hiperinsulinemia puedan mantener la homeostasis de la glucosa en casos extremos de resistencia a insulina (Bell y Polonsky, 2001). No obstante, el aumento de insulina no basta para normalizar la glucosa y el resultado es una hiperglucemia discreta tras la ingestión de carbohidratos en las primeras fases de la enfermedad; en las etapas finales de DT2, las células β son incapaces de producir suficiente insulina para evitar la hiperglucemia. El músculo esquelético y el hígado son los órganos diana para la acción de la insulina y son responsables de mantener la homeostasis de la glucosa y, por lo tanto, la transición al estado de resistencia a la insulina conduce a *muchas* de las alteraciones en el metabolismo de la glucosa en pacientes diabéticos. Así que una mejoría en la respuesta a la insulina reduce el riesgo de contraer DT2 (Lowell y Shulman, 2005).

Cualquier alteración metabólica que promueva la acumulación de ácidos grasos en el hígado y/o en músculo y/o cualquier defecto en la capacidad de estos órganos para metabolizar los ácidos grasos puede resultar en resistencia a la insulina (Lowell y Shulman, 2005). Por lo que se considera a la obesidad como la causa principal que desencadena el estado de resistencia a la insulina. Sin embargo, muchos individuos obesos con resistencia a insulina severa no desarrollan diabetes y en estos individuos, las células β pancreáticas se adaptan para responder a la demanda de insulina (Anello et al., 2002). Esta adaptación involucra la expansión de la masa celular, así como el mantenimiento de las células con respuesta normal a glucosa. Por el contrario, en individuos con DT2 las células β no secretan cantidades suficientes de insulina para compensar la demanda. Esta falla es causada por una expansión inadecuada de la masa de células β y/o a una respuesta ineficiente de las células existentes. Muchos estudios han demostrado que en las personas con DT2, las células β no son sensibles a glucosa y por ello no liberan cantidades adecuadas de insulina. La sensibilidad a glucosa requiere un metabolismo mitocondrial oxidante que produzca cantidades suficientes de ATP para activar el mecanismo de señalización necesario para la secreción adecuada de insulina. Aunque la secreción de insulina está regulada también por otros estímulos que funcionan fuera de esta vía, es claro que el metabolismo oxidante mitocondrial es central para la secreción de insulina (Lowell y Shulman, 2005). Dado el papel central de la mitocondria en la sensibilidad de la glucosa, es posible que, análogo a lo que se observa en células de músculo, la disminución en la función mitocondrial de las células β , predisponga a la disfunción de estas células y al desarrollo de DT2.

La disfunción en la célula β se considera una consecuencia de la exposición crónica a concentraciones elevadas de glucosa y de lípidos, características de resistencia a la insulina y obesidad. La obesidad es la causa más común de resistencia a la insulina en el humano. En sujetos obesos, los niveles de insulina típicamente aumentan para mantener la tolerancia a la glucosa normal. La hiperinsulinemia asociada con resistencia a insulina resulta de la combinación de un aumento en la secreción y una reducción en la tasa de consumo de insulina. Como resultado, más insulina se secreta por el aumento en el nivel de glucosa; lo que representa la extensión de la adaptación de las células β para mantener la tolerancia normal a la glucosa. La hipersecreción compensatoria de insulina en los estados de resistencia a la insulina se debe a expansión de la masa de células β y a las alteraciones en la expresión de enzimas claves para el metabolismo de la glucosa. Las ratas diabéticas Zucker no son capaces de incrementar la masa de células β y afrontar la resistencia a la insulina, debido a un aumento en la tasa de apoptosis (Roche 2003; Allen et al., 2005).

2.3.2.- Apoptosis de la célula β

Existen evidencias suficientes de la participación de la apoptosis en la eliminación de las células β pancreáticas durante los estados crónicos de la hiperglucemia (Donath et al., 1999; Evans et al., 2002). Durante los estados iniciales de la hiperglucemia hay una reducción en el número de células β pancreáticas, las células restantes incrementan su sensibilidad a la glucosa y aumentan la producción y secreción de insulina para prevenir la hiperglucemia en ayuno (Maechler et al., 1999). Posteriormente durante los estados crónicos

de la hiperglucemia, se agota la capacidad de respuesta de las células β y en un tiempo no muy largo mueren por apoptosis

El aumento compensatorio en la secreción de insulina en el estado de resistencia a la acción de la insulina, se debe a la expansión en la masa de células β y a las alteraciones en la expresión de enzimas clave para el metabolismo de glucosa. Las ratas obesas Zucker no incrementan adecuadamente la masa celular durante la resistencia a la insulina; esto aparentemente, no se debe a fallas en la proliferación, sino más bien a un aumento en la tasa de muerte de las células β , presumiblemente por apoptosis (Roche, 2003).

Recientemente se ha demostrado que la insulina regula vías de señalización importantes para la preservación de la función normal de las células β , lo que aumenta la posibilidad de que la resistencia a la insulina en las células β , se desarrolle al mismo tiempo que en músculo, tejido adiposo e hígado, lo que podría contribuir directamente a la disfunción de la célula β (Satiel et al., 2001). Los islotes muestran una reducción en la transcripción del gene de insulina, lo que puede deberse en parte, a una disminución en la acción de la hormona en este tejido, lo que indica que la activación del gene de insulina es un efecto importante de la insulina (Bell y Polonski, 2001).

En condiciones de hiperglucemia, las células β presentan un incremento en la expresión de genes y proteínas proapoptóticas como Bad, Bid y Bik (Donath, 1999; Mathis et al., 2001), aumento de la expresión de Fas y activación de caspasas 8 y 3, eventos que correlacionan con la fragmentación oligonucleosomal del DNA (Thomas, 2002). Otro estudio, realizado para evaluar los cambios en la expresión de genes de estrés, que acompañan la hipertrofia de las células β en ratas pancreatectomizadas durante 4 semanas, demostró un

aumento marcado en la expresión de genes antioxidantes como: hemooxigenasa 1, glutatión peroxidasa y el gene antiapoptótico A20, cambios sutiles en la expresión de la superóxido dismutasa y disminución de Bcl-2. Otros genes no mostraron ningún cambio (catalasa, proteínas de choque calórico 70 y p53), por lo que concluyen que la adaptación de las células β a la hiperglucemia incluye un aumento en la demanda de secreción de insulina y de la expresión de genes que protegen del estrés, lo que puede contribuir a la supervivencia de las células β hipertrofiadas (Laybutt 2002). Estos estudios apoyan la idea de que las vías de señalización que conducen a la apoptosis de la célula β , pueden estar localizadas en la mitocondria (Mathis, 2001).

El estrés oxidante generado en la mitocondria, durante la hiperglucemia a través de las vías antes mencionadas, se reconoce como un factor primordial que contribuye al desarrollo de varias de las complicaciones diabéticas, dado que el aumento de ERO es capaz de dañar muchos componentes celulares incluyendo el DNA y desencadenar la muerte celular. El tratamiento de ratones *db/db* diabéticos y no diabéticos con antioxidantes disminuye de manera importante la tasa de apoptosis en las células β (Kaneto et al., 1999; Donath et al., 1999; Maechler et al., 1999).

Las evidencias más convincentes sobre la participación de apoptosis en la eliminación de células β en DT2, se tienen con experimentos realizados en gerbos *Psammomys obesus*, los cuales no desarrollan la enfermedad de forma natural, pero sí por dieta. La enfermedad comienza con un estado de resistencia a la insulina que se caracteriza por tener hiperinsulinemia, que en algunos casos logra mantener la normoglucemia, pero normalmente termina en hipoinsulinemia y por lo tanto en hiperglucemia. Durante el desarrollo de la

hiperglucemia, se observa un incremento en la apoptosis, que culmina en daño severo en la arquitectura del islote. Este incremento en la muerte de la célula β puede resultar de la hiperglucemia, como sugieren los estudios *in vitro* de islotes de gerbos cultivados con concentraciones altas de glucosa (Donath et al., 1999).

Estudios realizados en ratas Zucker obesas diabéticas (*fa/fa*) demuestran que el contenido de ácidos grasos libres (AG) en los islotes es 100 veces más alto que en animales delgados y proponen que pueden estar involucrados en la tasa de apoptosis. El cultivo de islotes pancreáticos de rata Zucker prediabética con AG libres (1mmol/l), mostró un aumento de hasta 4 veces en el índice de apoptosis; mismo que se asoció con un incremento de ceramida. Por otro lado los AG libres también inducen un aumento en la expresión de la óxido nítrico sintasa (NOS) y de óxido nítrico (NO°), los cuales también son inductores de la muerte por apoptosis (Ceriello et al., 2002). La apoptosis de forma fisiológica también puede ser inducida por otras proteínas como p53, esta proteína es un regulador muy importante de la proliferación y muerte celular.

2.4.- La proteína p53

p53 pertenece a la familia de factores de transcripción formada por al menos dos miembros adicionales, p73 y p63. Aunque todos comparten una sustancial homología de secuencia, sus funciones y regulación son diferentes. El gene de p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p1.3) en humanos y está constituido por 11 exones, de los cuales el exón 1 contiene una secuencia no-codificante, en el exón 2 existen dos sitios putativos de

inicio de la transcripción y el exón 11 contiene el codón de terminación y una gran secuencia no codificante (Figura 8). Este gene da lugar a una proteína de 393 aminoácidos con tres dominios funcionales: un dominio amino-terminal (N-), implicado en la activación transcripcional (residuos 1-70) y donde se localiza una sub-región rica en aminoácidos que contiene 5 copias de la secuencia de PXXP (residuos 20-97); un dominio central que contiene la zona de unión al DNA específica de secuencia y constituye la región más conservada de la proteína (residuos 100-300), presentando una estructura de dos hojas beta y un átomo de zinc que estabiliza la estructura; y el dominio carboxilo-terminal (C-) que está constituido por una región flexible (residuos de 325-356) y un extremo básico (363-393). En estado de latencia de p53, la región C-terminal se pliega sobre el dominio central de la molécula y evita su unión al DNA (Linzer y Levine, 1979; Maclachlan et al., 1999).

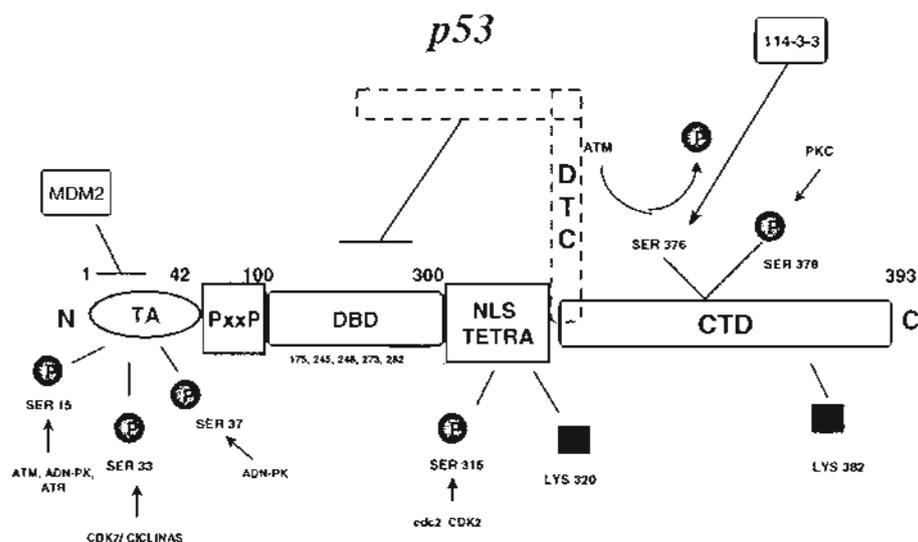


Figura 8. Estructura de P53. La proteína p53 comprende 393 aminoácidos con tres dominios funcionales, el dominio N-terminal que participa en la activación transcripcional (residuos del 1-70) y donde se localiza una sub-región rica en prolinas (PXXP), un dominio central de unión al DNA (DBD) (100 a 300 aa) y un dominio carboxilo terminal (C-), constituido por una región flexible (CTD) (325-356) y un extremo básico (363-393). En estado de latencia la región C-terminal se pliega sobre el dominio central de la molécula y evita su unión al DNA. TA: activación transcripcional; P: sitio de fosforilación; A: sitio de acetilación; NLS: sitio de tetramerización.

2.4.1.- Regulación de la expresión de p53

En condiciones fisiológicas, la proteína p53 se expresa de manera ubicua y se encuentra en forma latente llegando, en algunos tipos celulares, a niveles de expresión indetectables por técnicas inmunocitoquímicas o por “Western Blot”. Por ello se postuló que p53 no es esencial para un correcto funcionamiento de la célula. Los niveles de expresión, y con ello la actividad de p53, están regulados bajo un estricto control, resultando una proteína muy lábil con una vida media de pocos minutos (en algunos tipos celulares cercana a 15 minutos). La proteína p53 inactiva presenta una localización difusa a lo largo de toda la célula, en el citoplasma aparentemente se encuentra unida a otras proteínas como Parc, que impide su desplazamiento hacia el núcleo (Nikolaev, 2003).

Los niveles de la proteína p53 experimentan un aumento rápido en respuesta a diferentes estímulos entre los que destacan: el daño directo al DNA (rupturas de filamentos simples y dobles), la disminución de ribonucleótidos, la hipoxia, el choque térmico, la exposición a monóxido de nitrógeno y las radiaciones gamma y ultravioleta (Simbultan-Rosenthal et al., 1998). Este incremento se debe principalmente a mecanismos post-traduccionales, de forma que cambios en la transcripción desempeñan un papel menor, aunque no irrelevante. En células donde el genoma se encuentra seriamente dañado, resulta muy ventajoso el hecho de que no exista necesidad de transcripción *de novo* del mensajero para la proteína, sino que se vea incrementada su vida media por mecanismos post-traduccionales. Estas modificaciones post-traduccionales, como fosforilación, desfosforilación, acetilación, no sólo aumentan la vida media de la proteína sino que regulan su actividad biológica. Así, la fosforilación de residuos en las regiones amino y carboxi-terminal de p53 juega un papel decisivo en la función final de la proteína. La caseína cinasa I (ser6 y ser9) y II (ser392),

DNA-PK (ser15 y ser37), ATM (ser15), CDK-activadora cinasa (CAK; ser33), cdk2 y cdc2 (ser315), PKC (ser378) son parte de una lista de cinasas que poseen entre sus sustratos a p53 (Ito et al., 2004). La acetilación de algunos residuos de lisina (320 y 382) facilita la unión de p53 al DNA. Por otro lado, la estabilidad de la proteína p53 puede ser regulada dependiendo del estado redox y fármacos oxidantes o quelantes de metales alteran la conformación natural y de alguna manera disminuyen o neutralizan su capacidad de unirse al DNA.

Así mismo, p53 puede inhibir su propia síntesis uniéndose a su propio RNAm. La secuencia específica de unión al DNA, unida a la actividad de p53 constituye una retroalimentación negativa a través de la inhibición del dominio C-terminal. En situaciones de estrés hay un aumento en la unión de p53 al DNA, incrementando así su actividad bioquímica y biológica (Hupp et al., 1995; Merino y Gordon, 1998; Malanga et al., 1998).

2.4.2.- Degradación

La rápida disminución de los niveles de proteína p53 se lleva a cabo, en su mayor parte, a través de la vía de ubiquitina-proteosoma, aunque también intervienen otras enzimas proteolíticas como son las calpaínas. Tres son los sistemas que preparan a p53 para su ubiquitinación: i) la cinasa JNK que en respuesta a daño al DNA en la fase G0 del ciclo celular fosforila p53 en Thr 8; ii) el señalosoma COP9 (CSN) que fosforila la Thr155 y residuos cercanos, y iii) quizás el más importante, la proteína MDM2 (del inglés, murine double minute 2) que es la encargada de dirigir la translocación desde el núcleo al citoplasma (Bech-Otschir et al., 2001). El oncogene *mdm2* codifica una fosfoproteína de 90 KDa que actúa como una enzima E3 ubiquitina proteína ligasa, una de las enzimas involucradas en el marcaje de la

proteína p53, debido a su capacidad para interactuar con el extremo amino terminal de p53 (Figura 9) (Honda et al., 1997). La proteína mdm2 también participa en la estabilización de p53 en los procesos mediados por la proteína p19ARF. La proteína p19ARF secuestra a la proteína mdm2 en el nucleolo, impidiendo que acceda al nucleoplasma donde interactuaría con p53 y de esta manera p53 permanece activa durante más tiempo (Haupt et al., 1997). Aunque también se postula que p19ARF puede inhibir la actividad ubiquitina ligasa de mdm2 sin que sea necesaria la traslocación al nucleolo. La vida media de p53 se encuentra también modulada por el grado de fosforilación. Una disminución en la fosforilación incrementa el grado de degradación, como la que tiene lugar en la mutación de serina por alanina en la posición 15 y la fosforilación en el extremo N-terminal que interfiere en la interacción p53-mdm2 aumentando su estabilización (Siliciano et al., 1997).

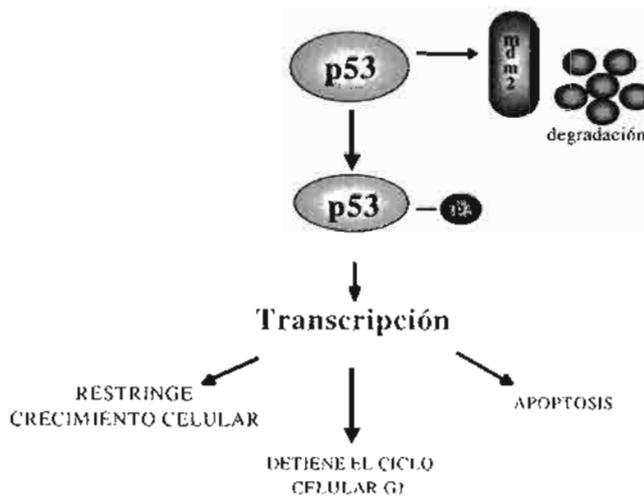


Figura 9. Diversas modificaciones de tipo postraduccionales son necesarias para la regulación de p53. Por ejemplo la fosforilación de algunos residuos se cree es necesaria para su activación y su interacción con mdm2 es esencial para su degradación.

2.4.3.- La proteína p53 en el ciclo celular.

Como se ha mencionado antes, la función de p53 es inhibir el crecimiento celular, ya sea promoviendo la detención del ciclo celular o la muerte.

La proteína p53 participa en el control del ciclo celular a nivel del punto G1/S evitando la entrada prematura en la fase S debido a que p53 actúa como un activador transcripcional de genes específicos como: p21, retinoblastoma, E2F, PCNA y GADD45 (Figura 10). Así mismo, p53 interviene en procesos de reparación del daño gracias a la modulación de la proteína PCNA (del inglés Proliferating Cell Nuclear Antigen) que denota replicación del

DNA. p53 inhibe la actividad de esta enzima por dos mecanismos, uno mediado por p21 que forma un complejo con PCNA y la inhibe o induciendo la sobreexpresión de GADD45. El GADD45 además de unirse a PCNA, regula la transcripción de la subunidad R2 de la ribonucleótido reductasa, enzima esencial para la síntesis y reparación del DNA, y de genes directamente implicados en la reparación de DNA; en concreto en la reparación por escisión de nucleótidos.

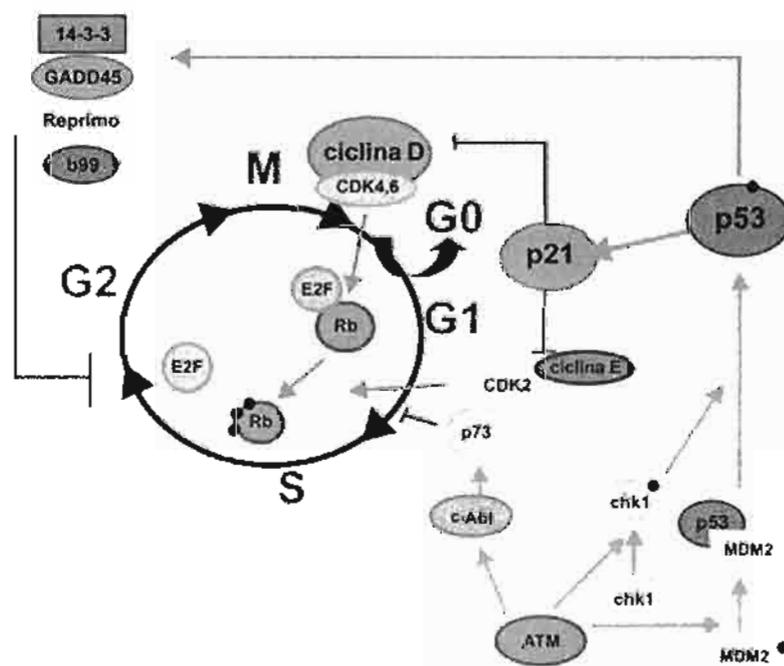


Figura 10. p53 y su participación en la regulación del ciclo celular. La proteína p53 activa varios procesos mediante su papel como factor de transcripción. El proceso más importante que conduce a la inhibición del ciclo celular en G1 está determinado por la activación de p21 (inhibidor del ciclo celular) que evita que las células continúen a través de G1. La activación de GADD45 está relacionada con el mantenimiento de la estabilidad del genoma.

2.4.4.- La proteína p53 y apoptosis

Cuando la célula es incapaz de subsanar el daño en el DNA, con la finalidad de evitar que dicho daño pase a las células hijas, p53 activa rutas de señalización que conducen a su muerte. Entre estas situaciones se encuentra el daño grave sobre el DNA, los factores de supervivencia celular limitados o un oncogen activado que obliga a la célula a realizar el ciclo replicativo. Los mecanismos por los que p53 induce muerte celular siguen siendo un enigma, y se ha postulado que p53 puede participar tanto de una forma directa como indirecta en dichos procesos, habiéndose descrito situaciones donde es necesario la transcripción de nuevos genes y otras donde no. Entre estos destacan miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl2, como bax, NOXA y PUMA y los denominados genéricamente como "p53 induced Genes" (PIGs), algunos de los cuales participan en procesos de oxidación celular y en la expresión de receptores de muerte, como CD95 (Fas/APO-1), DR5 o PIDD (Colman et al., 2000). La regulación de los procesos de apoptosis por p53 es muy fina y la activación transcripcional de estos genes de apoptosis regulados por unión de p53 en su región promotora no es idéntica para todos. Dependiendo del grado de activación de p53, éste es capaz de inducir unos u otros genes reguladores. Por ejemplo, la fosforilación de las serinas en las posiciones 6, 9, 15, 20 y 37, por cinasas como ATM, DNAPK o Chk2, en respuesta a daño celular, regula la expresión de genes asociados con la reparación o con la regulación del ciclo celular, mientras que la fosforilación de la ser46, por las cinasas p38aMAPK o HIPK2 contribuye a la activación de genes apoptóticos (Ito et al., 2004). P53 puede también regular los procesos de apoptosis a través de mecanismos independientes de transcripción (Shaw et al., 1992). En experimentos en los que se inhibe tanto la transcripción como la síntesis de proteínas, p53 puede inducir apoptosis (Caelles et al., 1994). Los mecanismos de regulación de p53 no transcripcionales se

han asociado a su capacidad de interacción con otras proteínas que pueden modificar su función. Entre éstas se encuentran proteínas virales como la del adenovirus Ad E1B 55kD, o del virus de la hepatitis HBV X, o la interacción con securina, proteína responsable de la correcta segregación cromosómica, todas ellas inhiben las funciones de p53. Pero no todas las proteínas que interaccionan con p53 inhiben su función, ASPP1 y ASPP2 (del inglés Apoptosis-Stimulating Protein for p53) interaccionan con p53 e intensifican específicamente su función inductora de apoptosis. Las ASPP intensifican la unión de p53 al DNA favoreciendo así su función de transactivación de genes proapoptóticos *in vivo* (Fernández-Gómez et al., 2004).

Estudios recientes indican que las especies reactivas de oxígeno son mediadores de la apoptosis dependiente de p53. Una serie de genes llamados PIGs (genes inducidos por p53), (Colman et al., 2000), con actividades oxido-reductoras, han sido identificados en células apoptóticas de carcinoma colorectal. El aislamiento de los genes PIGs sugiere fuertemente que el daño oxidante de la mitocondria es de gran importancia en el control de la muerte apoptótica inducida por p53 (Mebmer et al., 1994; Marchenko et al., 2000).

Adicionalmente, existen otras evidencias donde se apoya la participación de p53 en la apoptosis de manera independiente a su función como factor transcripcional. Los grupos de Marchenko et al., (2000) y de Schuler et al., (2000), por separado, investigaron la posibilidad de que, además de sus funciones como factor transcripcional, p53 pudiera participar como regulador de las funciones de los orgánulos celulares. Se observó que después del estrés causado por hipoxia o bien por daño en el DNA, la proteína p53 se traslada hasta la membrana externa mitocondrial al inicio de la apoptosis dependiente de p53, efecto que no se observó durante la apoptosis independiente de p53 y/o durante la detención del ciclo celular (Sansome

et al., 2001; Marchenko et al., 2001). La localización de p53 en la membrana mitocondrial y los cambios observados durante la inducción de la apoptosis por p53 son precedidos por la activación transcripcional de varias oxido-reductasas y la producción de ERO (Donahue et al., 2001). También la proteína p53 induce un incremento transitorio del potencial de membrana mitocondrial seguido de una disminución del mismo, este proceso no involucra la translocación de Bax ni la activación de Bid o la liberación de citocromo c (Li, 1999). Con estos trabajos se apoya el papel de la proteína p53 en la señalización mitocondrial que constituye un punto estratégico en la cascada de muerte (Marchenko et al., 2000; Schuler et al., 2000). La regulación del potencial de membrana mitocondrial y de la producción de ERO por este orgánulo, pueden constituir una vía importante para la apoptosis inducida por p53, por esta razón, se ha propuesto una vía de señalización directa de p53 que involucra a la mitocondria y que puede actuar de manera sinérgica con su actividad transcripcional y de esta manera amplificar su potencial apoptótico (Marchenko et al., 2000).

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El origen del estrés oxidante en las células β por hiperglucemia se atribuye principalmente a la reducción monoelectrónica del oxígeno molecular, por los electrones transportados en la cadena respiratoria mitocondrial, lo que resulta en la producción de especies reactivas de oxígeno (Sakai et al., 2003). Sumado a esto, el aumento de Ca^{2+} intracelular necesario para la exocitosis de la insulina también contribuye a la formación de ERO. Estas moléculas se proponen como responsables de la disfunción de las células β y de las alteraciones en la síntesis y secreción de insulina (Marshak et al., 1999), así como de la acumulación de metabolitos altamente reactivos capaces de unirse a proteínas y generar estrés oxidante (Nishikawa et al., 2000).

Diversos estudios han demostrado que la apoptosis de las células β pancreáticas ocurre como consecuencia de hiperglucemia crónica e hiperlipidemia, características de DT2; lo que sugiere que en esta enfermedad, la capacidad de adaptación de las células β pancreáticas para afrontar los estados de resistencia a la insulina, se encuentra disminuida. En contraste con la alteración en la secreción de insulina por hiperglucemia aguda transitoria, la exposición crónica a altos niveles de glucosa induce disfunción y apoptosis de las células β , fenómeno conocido como “glucotoxicidad”.

Las células β pancreáticas son muy sensibles al estrés oxidante (Grankvist, 1981). Estudios *in vitro* han demostrado que las ERO producidas a través de las reacciones de glicosilación no enzimática inducen apoptosis en las células β , y que el tratamiento con antioxidantes disminuye el índice de células muertas por hiperglucemia (Donath et al., 1999). Las ERO son capaces de dañar muchos componentes celulares incluyendo el DNA. Estas

alteraciones en el DNA resultan en la activación de los mecanismos que detienen el ciclo celular en puntos específicos, presumiblemente para dar tiempo a que el daño sea reparado. Entre las proteínas que se activan como consecuencia de daños en el DNA se encuentra p53, que regula la detención del crecimiento y/o la inducción de la muerte celular a través del mecanismo de apoptosis. Estudios recientes indican que las ERO son mediadores de la apoptosis dependiente de p53. Una serie de genes llamados PIGs (genes inducidos por p53), con funciones óxido-reductoras, han sido identificados en células apoptóticas de carcinoma colon-rectal (Polyak et al., 1999). Adicionalmente, la localización de p53 en la membrana mitocondrial externa (Burns y El-Deiry, 1999) y los cambios observados durante la inducción de la apoptosis por p53, son precedidos por la activación transcripcional de varias óxido-reductasas y por la producción de ERO en miocitos (Fiordaliso et al., 2001). Estos eventos permiten sugerir que el estrés oxidante, generado por el aumento de anión superóxido, por la cadena transportadora de electrones mitocondrial durante la hiperglucemia, es de gran importancia en la inducción de muerte apoptótica en células β y que la vía de inducción posiblemente involucre la activación y movilización de la proteína p53 hasta la mitocondria. Hasta ahora se sabe que la muerte de las células β ocurre a través del proceso de apoptosis. Sin embargo, los mecanismos precisos se desconocen. Por lo que las investigaciones encaminadas a esclarecer los mecanismos que regulan la muerte de las células β , así como la generación de conocimientos que nos ayuden a comprender la patogenia de la DT2 permitirá a su vez, proponer tratamientos alternativos dirigidos a bloquear las vías de señalización que conducen a la muerte de estas células.

4.- HIPOTESIS

La hiperglucemia produce alteraciones mitocondriales en las células de insulinoma y una elevada producción de especies reactivas de oxígeno que conducen a la muerte por apoptosis, vía activación de p53.

5.1.- OBJETIVO GENERAL

Demostrar que las células de insulinoma mueren por apoptosis, como consecuencia del aumento de especies reactivas de oxígeno mitocondriales inducido por hiperglucemia.

5.2.- OBJETIVOS PARTICULARES

Demostrar que la hiperglucemia induce apoptosis en las células de insulinoma.

Evaluar la producción de radicales libres de oxígeno mitocondriales inducidos por concentraciones altas de glucosa

Estudiar los cambios en la permeabilidad mitocondrial y la liberación de citocromo c en las células de insulinoma cultivadas con concentraciones altas de glucosa.

Determinar la localización de p53 en las células de insulinoma cultivadas en un medio con concentraciones altas de glucosa.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS.

Reactivos

El medio de cultivo RPMI 1640, la solución balanceada de Hank, tripsina, EDTA, carbonylcyanide-m-clorophenyl-hydrazone (CCCP) se obtuvieron de Sigma chemical Co. (St. Louis, MO); el suero fetal bovino, L-glutamina de GIBCO (Carlsbad, California); el JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide) de R&D systems (Minneapolis, MN); dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) de Molecular Probes Europe (Leiden, Netherlands); Anexin-V Fluos de Roche Applied Science (México, D.F.). Los anticuerpos anti p53 (pab 240) y anti citocromo c (H-104) de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California). Las membranas sequi-blot (PVDF) y los marcadores de peso molecular se obtuvieron de Bio-Rad (Hercules CA). Otros reactivos grado analítico se obtuvieron de E. Merck (Darm Stadt. Germany).

Cultivo celular

Las células RINm5F se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), inactivado por calor (30 min a 50° con agitación manual cada 5 min), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio; 20 µg gentamicina y 23.8 mM de bicarbonato de sodio en una atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. El cultivo se mantuvo a dos concentraciones de glucosa 11 y 30 mM. Como un control de osmolaridad se adicionó manitol a una concentración de 25 mM.

Cuando las células alcanzaron 75% de confluencia, se desprendieron con 5 ml de

tripsina al 0.025% - EDTA 2 mM y se recuperaron por centrifugación por 5 min a 250 x g a 4°C. El botón celular se resuspendió con RPMI 1640 suplementado y se tomó una alícuota para cuantificar el número de células y verificar su viabilidad, esto último se realizó mediante la prueba de exclusión de azul tripan. Esta técnica se basa en que las células muertas incorporan el colorante debido a cambios en la permeabilidad de su membrana citoplásmica. Posteriormente, se procedió a sembrar las células para aplicar los tratamientos. Con este propósito se colocaron 2.5×10^6 células en cada botella de 75 mm², con 10 ml de RPMI 1640 suplementado, al día siguiente se les cambió el medio y al segundo día se adicionaron los tratamientos, como se indica más adelante.

Determinación de la muerte celular por apoptosis

Citometría de Flujo

Las células se desprendieron con PBS-EDTA 2 mM, BSA 0.1%, se lavaron con PBS por centrifugación a 250 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en amortiguador de unión (Hepes 10 mM, pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 5mM), para tener una concentración celular de 1×10^6 células por mililitro. Se tomaron 100 µl de esta suspensión y se les adicionaron 20 µl de anexina V-Fluos (conjugada con isotiocinato de fluoresceína) (10 µg/ml) y 20 µl de ioduro de propidio (50 µg/ml). Las muestras se agitaron en vortex y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Posteriormente se adicionaron 400 µl del amortiguador de unión y se procedió al análisis en un citómetro de flujo FACSort (Becton Dickinson System, San José, CA). Se adquirieron y analizaron 10,000 células por cada tratamiento.

La emisión de la fluorescencia se midió a 515 nm excitando a 488 nm en el caso de anexina V-FITC (FL1) y midiendo la emisión a 610 nm para el ioduro de propidio (FL2). Los datos obtenidos se analizaron con el programa WinMDI versión 2.4 para citometría de flujo. Los resultados de fluorescencia se obtuvieron en una gráfica en la que se registró la FL2 en el eje de las "y" y la FL1 en el eje de las "x" en forma logarítmica. En esta gráfica se formaron 4 cuadrantes: inferior izquierdo (células que no ingresaron el fluorocromo), aquí se localizan las células vivas; inferior derecho (positivo para FL1 y negativo para FL2) aquí se localizan las células positivas a anexina V-FITC, e indican apoptosis; superior izquierdo (negativo para FL1 y positivo para FL2), en estas células ingresó IP e indica necrosis; y en el cuadrante superior derecho (positivo para FL1 y FL2), se encuentran las células que pueden encontrarse en un estadio tardío de apoptosis o bien de necrosis

Análisis del DNA

Para extraer el DNA se utilizó la técnica de Navarro y col. 1998., modificada para células en cultivo en nuestro laboratorio, el cual consistió en tratar a las células con un amortiguador de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM, 0.25% tritón X-100), posteriormente se hizo la extracción de los ácidos nucleicos con una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y la precipitación del DNA con etanol absoluto durante 20 horas a -20°C . Se calculó la concentración considerando la absorbencia a 260 nm. Posteriormente se analizó la integridad del DNA en un gel de agarosa al 1.2% en amortiguador de TBE (Tris 1M, ácido bórico 1M, EDTA 20 mM pH 8.3) a 45 volts durante 3 h, al finalizar se realizó la tinción con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En un analizador de imágenes (Gel

Doc 2000, Bio-Rad) se obtuvieron los patrones de corrimiento del DNA.

Control positivo de Apoptosis

Las células RINm5F se cultivaron durante una hora en medio RPMI 1649 con 5.5 mM de glucosa y 10% de SFB, al término de este tiempo, se les agregó estreptozotocina a una concentración de 5 y 10 mM en un amortiguador de citratos 0.1 M pH de 4.0, se incubaron por un período de 30 min, posteriormente se les cambio el medio por RPMI 1640 con glucosa normal (11 mM), y se incubaron toda la noche. Para la tinción y análisis, se siguió el procedimiento previamente descrito. Este control se utilizó tanto para el análisis por citometría de flujo como para la fragmentación oligonucleosomal del DNA.

Fracciones subcelulares

Las células (2×10^7) se resuspendieron en 400 μ l del siguiente amortiguador: Tri-HCl 10 mM pH 7.4; EDTA 0.5 mM, Sacarosa 250 mM, PMSF 0.1 mM, leupeptina 10 μ g/ml, pepstatina 5 μ g/ml, aprotinina 2 μ g/ml, con digitonina 10 μ g/ml, se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se homogenizaron con 10 golpes (homogenizador vidrio-teflón), se centrifugaron a 750 x g a 4°C, durante 10 min, el sobrenadante se centrifugó en las mismas condiciones, se recuperó y centrifugó nuevamente a 10,000 x g a 4°C, durante 15 min (Vrablic et al., 2001). La pastilla final (mitocondrias), se resuspendió en el mismo amortiguador pero sin digitonina y el sobrenadante se consideró como fracción citosólica; se tomó una alícuota de cada fracción para cuantificar proteínas por la técnica de Bradford (Bradford, 1976), Los lisados se congelaron a -70°C hasta el momento en que se realizó el "Western blot".

Glutamato deshidrogenasa

Esta enzima se encuentra exclusivamente en la mitocondria, por lo que la medición de su actividad se utilizó como un control para la determinación de la pureza de las fracciones subcelulares. Esta técnica se basa en la producción de NAD^+ . Se preparó directamente en la celdilla un amortiguador de reacción que contenía: imidazol 85 mM, α -cetoglutarato 13.6 mM, acetato de amonio 0.22 M, NADH 0.12 mM, EDTA 0.9 mM, ADP 1 mM, Tritón X-100 25 μl y se tomó la lectura a 340 nm, inmediatamente después se adicionaron 20 μl de homogeneizado total o de cada fracción y se incubó durante 3 minutos, y se volvió a tomar la lectura a los 0, 1 y 3 minutos (Bern y Bergmeyer, 1963). Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 64. La actividad enzimática se expresó como unidades por miligramo de proteína por minuto bajo las condiciones antes mencionadas.

“Western blot” para p53 y citocromo C

Las fracciones (40 μg proteína), se mezclaron con 2 volúmenes del amortiguador de carga (Tris 125 mM, SDS 2%, glicerol 10%, mercaptoetanol 11 mM, azul de bromofenol 0.002%, pH 6.9) se calentaron por 5 min a 95°C y resolvieron en PAGE-SDS al 10%, 1 h a 100 volts para citocromo c y 2.5 h a 100 volts para p53, posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF (0.8 mA/cm^2 , durante 2 h), en amortiguador Tris 25 mM, glicina 192 mM y 20% de metanol. El corrimiento y la transferencia de las proteínas se confirmó con rojo de Ponceau S al 0.1%. Posteriormente, la membrana se lavó dos veces con TBS-T (NaCl 140 mM, Tris 50 mM pH 7.2; Tween 20 al 0.1%), antes de bloquear los sitios de unión inespecíficos con leche libre de grasa al 5% en TBS-T durante 2 h a 20°C . Se incubó toda la

noche a 4°C con el anticuerpo anti p53 (1:1000, pAb 240) o anti citocromo c (1:2500, H-104) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), en BSA al 1% en TBS-T. La unión de los anticuerpos se detectó mediante la utilización de un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano (Schuler et al., 2000; Fiordaliso et al., 2001) y se reveló utilizando un estuche comercial de quimioluminiscencia (Perking Elmer Life Sciences, Boston USA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Localización subcelular de p53 por microscopía confocal

Para este procedimiento las células se cultivaron en cubre objetos, colocados en una caja de 6 pozos (25,000 células por pozo). Las células RINm5F se cultivaron en presencia de 11 ó 30 mM de glucosa y se analizaron a las 16, 24 y 48 horas. Después de los tratamientos, las células se lavaron con PBS y se fijaron durante 3 minutos con una mezcla de acetona/metanol 1:1, se realizó un lavado con PBS y se procedió a marcar las mitocondrias, para lo cual se utilizó la sonda fluorescente MitoFluor 589 (Molecular Probes), a una concentración de 200 nM en PBS. después de incubar en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente, las muestras se lavaron una vez con PBS y se incubaron por 3 horas más, en presencia del anticuerpo primario contra p53 (1:25 en BSA al 1% en PBS), en las mismas condiciones. Después de lavar las células con PBS, se adicionó el anticuerpo secundario (anti ratón conjugado con FITC, 1:100), en el mismo amortiguador por 3 horas adicionales en las condiciones anteriores. Al final de este procedimiento se añadieron 3 µl de vectashield (protector de fluorescencia) (Vector Laboratories), a cada muestra y se montaron en un porta objetos que se selló con barniz de uñas transparente y se procedió al análisis. Las

muestras se analizaron con un microscopio confocal Zeiss Axiovert 100 M provisto con un rayo laser de argón/helio/neón. La señal de los fluorocromos se capturó a una longitud de onda de 488/510 nm para la FITC y 568/590 nm para el MitoFluor. Para el análisis se utilizó una representación con pseudo-color. El análisis de los resultados se realizó con el programa LSM 5 Imagen Browser para microscopía confocal.

Detección de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Después del tratamiento con alta glucosa, las células RINm5F se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad con 3 ml de solución de Hank y 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCDHF-DA) 5 μ M. Este compuesto se interioriza en la célula y es liberado de los grupos acetato por la acción de esterasas intracelulares, formándose la 2',7' diclorodihidrofluoresceína (DCDHF). El DCDHF se oxida rápidamente en presencia de peróxido de hidrógeno y/o de otros radicales libres, formando el 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) el cual emite una señal de fluorescencia que se analizó en un fluorómetro con lector de placas Fluoroskan Ascent FL (Labsystems (exc 488 nm y 525 nm emisión) (Kiningham et al., 1999; Yamagishi et al., 2001). Treinta minutos antes de la adición de DCDHF-DA, las células se incubaron en presencia de los siguientes inhibidores: rotenona 5 μ M, cccp 0.1 μ M, (Du X-L et al., 2000; Yamagishi et al., 2001) y apocinina 10 μ M. (Meyer y Schmitt, 2000); por separado y posteriormente en diferentes combinaciones.

Potencial de membrana mitocondrial

Las células se cultivaron en cubre objetos, colocados en una caja de 6 pozos (25,000 células por pozo), en presencia de 11 ó 30 mM de glucosa y se analizaron a las 48 horas. Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial se midieron utilizando la sonda fluorescente JC-1 (5',5',6,6'-tetrametilbenzimidazolcarbocianina yoduro), una molécula catiónica capaz de cruzar la membrana plasmática e internalizarse en la mitocondria (Barbu et al., 2002). Para este propósito se utilizó un estuche de R&D (No. Catálogo TA700), siguiendo las instrucciones del proveedor para células en monocapa y se analizó inmediatamente por microscopía confocal utilizando los filtros de 525 nm (verde) y 590 nm (rojo) (Yamagishi et al., 2001). El análisis de los resultados se realizó con el programa LSM 5 Imagen Browser para microscopía confocal.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el paquete Sigma Stat v2.0 (Sigma-Aldrich Co., San Louis, Missouri, USA). Los resultados se expresan como promedios \pm DS. Se utilizó una prueba paramétrica de comparaciones múltiples (ANOVA). La comparación entre grupos se realizó con la prueba de Bonferroni.

7.- RESULTADOS

Efecto de la hiperglucemia sobre la supervivencia de las células RINm5F

Las células RINm5F se cultivaron en un medio que contenía 11 ó 30 mM de glucosa durante 30 minutos, 2, 4, 24 y 48 h y se midió el índice de apoptosis. La apoptosis se cuantificó por la fragmentación oligonucleosomal del DNA y por la exposición de fosfatidilserina para lo cual se utilizó anexina V-FITC. La anexina V es una proteína que en presencia de Ca^{2+} se une a los fosfolípidos y en particular a la fosfatidilserina (Shiratsuchi et al., 1998). La Figura 11 muestra la gráfica de puntos que se obtiene después del análisis en un citómetro de flujo, en el eje de las ordenadas se indica la intensidad de fluorescencia de IP (FL2) y en el de las abscisas la intensidad de fluorescencia emitida por anexina V-FITC.

Nuestros resultados demuestran que la exposición a 30 mM de glucosa (Figura 12) durante 48 h induce un aumento en el porcentaje de células positivas a anexina V, localizadas en el cuadrante B (ver material y métodos). Un porcentaje menor de células se observó en los cuadrantes superiores, (tanto C como D), que representan a las células con cambios importantes en la permeabilidad de sus membranas, motivo por el cual permiten la incorporación tanto de IP como de anexina-V-FITC, e indica que estas células murieron por el mecanismo de necrosis o bien que se encuentran en un estado de apoptosis tardía o necrosis secundaria. Los resultados mostraron una diferencia con un valor de significancia de $p < 0.001$ (Figura 13A), en el porcentaje de células positivas a anexina-V-FITC y negativas para IP, únicamente en las células cultivadas en condiciones de hiperglucemia durante 48 h con respecto al control (11 mM de glucosa) ($36 \pm 11.3\%$ y $7.53 \pm 0.056\%$ respectivamente). La

concentración alta de glucosa a tiempos tan cortos como 30 minutos, 2, 4 y hasta 24 h no indujo apoptosis en las células RINm5F.

Otro método para verificar el fenómeno de apoptosis, es el análisis de la integridad del DNA, mediante electroforesis en gel de agarosa. Durante la muerte por apoptosis se observa rompimiento internucleosomal del DNA con la formación de fragmentos oligonucleosomales de aproximadamente 200 pb. El análisis electroforético del DNA extraído de las células RINm5F (Fig 13B) cultivadas en condiciones de hiperglucemia mostró el patrón en escalera, clásico de apoptosis, a las 48 h. Esta característica no se observó a las 24 h ni en las células cultivadas con 11 mM de glucosa.

Separación de Fracciones:

La actividad de la enzima **glutamato deshidrogenasa** se utilizó como un control de pureza para la separación de las fracciones mitocondrial y citosólica. Esta enzima se localiza principalmente en la mitocondria y cataliza la incorporación del grupo amino a partir de amonio por aminación reductiva del α -cetoglutarato (un intermediario del ciclo de Krebs). La Figura 14 muestra el $X \pm DS$ de 10 experimentos con células cultivadas bajo condiciones normales. En el eje de las "Y" se gráfica la actividad enzimática en U/mg proteína y en el de las "X" la fracción celular. Se consideró estandarizada la técnica cuando la actividad de la enzima en la fracción citosólica no superó el 5%.

Localización subcelular de p53 y liberación de citocromo c

Recientemente se demostró que la mitocondria constituye un blanco para p53 durante la apoptosis inducida por esta proteína, se ha observado que p53 se localiza en la mitocondria y participa en la regulación de la permeabilidad mitocondrial de células tumorales (Mihara et al., 2003). En este estudio demostramos que en condiciones de hiperglucemia la proteína p53 se moviliza hasta la mitocondria. El análisis por “Western blot” reveló la presencia de esta proteína en la fracción mitocondrial y no en citosol de las células cultivadas en condiciones de hiperglucemia, no así en el control; así mismo se observó que cuando p53 se localiza en la fracción mitocondrial, también se presenta liberación de citocromo c hacia el citosol de estas mismas células (Figura 15).

Análisis por microscopía confocal

Con el propósito de corroborar la distribución intracelular de p53, realizamos un análisis con microscopía confocal de p53 después de marcar las mitocondrias con una sonda fluorescente en forma independiente al potencial de membrana (MitoFluor 589), por lo tanto facilita su identificación independientemente de la viabilidad celular (Figura 16). Las células RINm5F se cultivaron con 11 ó 30 mM de glucosa y se analizaron a las 16, 24 y 48 horas. La presencia de p53 en las mitocondrias fue clara a partir de las 24 horas de hiperglucemia y mostró un incremento a las 48 horas, este evento no se observó en las células cultivadas con 11 mM de glucosa.

Efecto de la hiperglucemia en la producción de ERO en las células RINm5F

Una vez que se establecieron las condiciones para la inducción de la apoptosis en las células RINm5F por hiperglucemia (glucosa 30mM), se procedió a medir la producción de especies reactivas de oxígeno, mediante la fluorescencia de la DCF a 530 nm. En la figura 17 A puede observarse un incremento significativo ($p < 0.001$), de hasta 2.5 veces en la generación de ERO. Con el propósito de determinar el origen de estos radicales, las células se incubaron en presencia de rotenona (inhibidor de la cadena de transporte de electrones), cccp (desacoplador de la fosforilación oxidativa, que abate el potencial electroquímico de protones mitocondrial) y apocinina (inhibe la NADPH-oxidasa), antes de adicionar la sonda. Los resultados mostraron que la adición de estos compuestos inhibe la producción de ERO aún en el grupo control 40% en promedio y hasta un 66% en el grupo tratado, sin embargo no se observaron diferencias en el grado de inhibición entre los tres compuestos por separado (control: 49, 44, y 40%; hiperglucemia 62, 66 y 66%, rotenona, cccp y apocinina, respectivamente) (Figura 17 B), así como tampoco pudo observarse un efecto sumatorio, cuando las células (control o expuestas a 30 mm de glucosa) se incubaron en presencia de una combinación de los inhibidores (rotenona+cccpc 59%, cccp+apocinina 62%, rotenona+apocinina 61%), excepto cuando la combinación fue rotenona+cccpc+apocinina (73%) (Figura 17 C).

Efecto de la hiperglucemia en el $\Delta\psi_m$ de las células RINm5F

Con el propósito de saber si la apoptosis por p53 involucra alteraciones a nivel de potencial de membrana mitocondrial, en las células RINm5F cultivadas con 30 mM de glucosa, el monitoreo de los cambios en el $\Delta\psi_m$ se realizó con JC-1. En las células vivas, JC-1 forma agregados conforme aumenta el potencial de membrana y la emisión de la fluorescencia (roja) se mide a 590 nm., por el contrario en las células muertas o que presentan alteraciones en el $\Delta\psi_m$ JC-1 emite una fluorescencia (verde) a 530 nm. Los cambios en la fluorescencia verde y roja de JC-1 son exclusivamente dependientes de los cambios en el potencial de membrana, por lo que ningún otro factor afecta el resultado (tamaño, forma o densidad de las mitocondrias). En las Figuras 18 A y 18 B podemos observar que la emisión de fluorescencia a 530 nm de JC-1 es mayor en las células cultivadas con 30 mM de glucosa que en las células control (11 mM de glucosa).

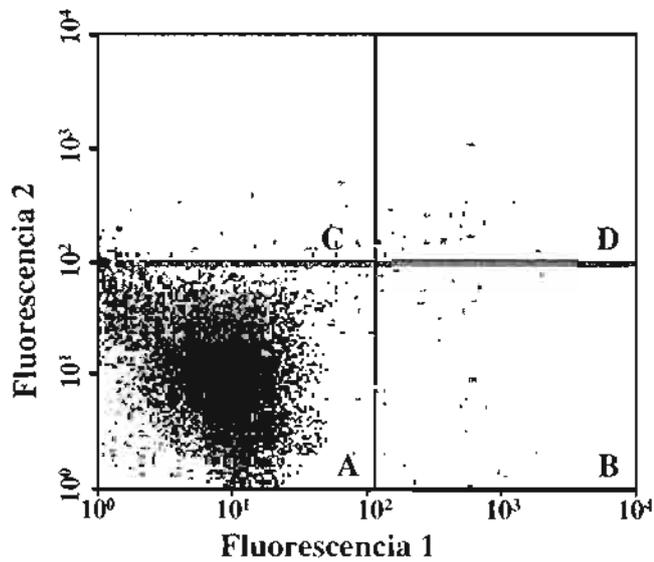


Figura 11. Análisis por citometría de flujo de la muerte celular. Se ejemplifica una gráfica de puntos empleada para el análisis de los datos que se obtuvieron por esta técnica de las células RINm5F marcadas con anexina V-FITC e IP. FL1 representa la fluorescencia emitida por anexina V-FITC y FL2 la fluorescencia emitida por IP.

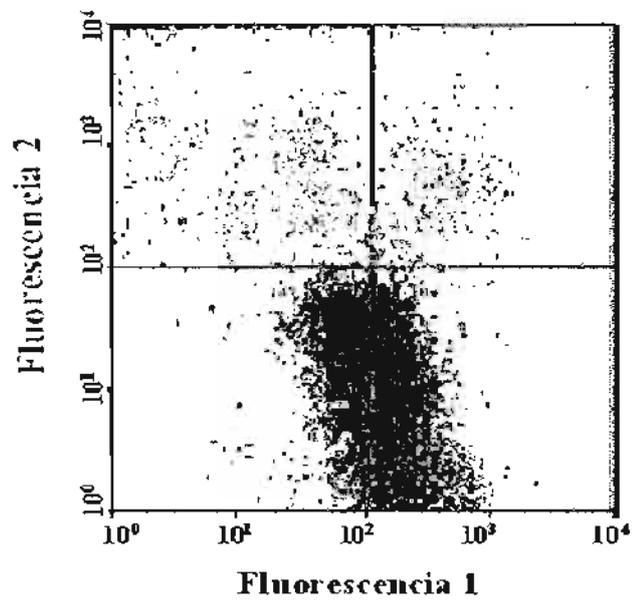


Figura 12. Apoptosis de las células RINm5F. El cultivo de las células RINm5F en condiciones de hiperglucemia induce apoptosis, demostrada por el aumento de células positivas a anexina V-FITC/negativas a IP. La gráfica que se muestra es representativa de 5 experimentos independientes

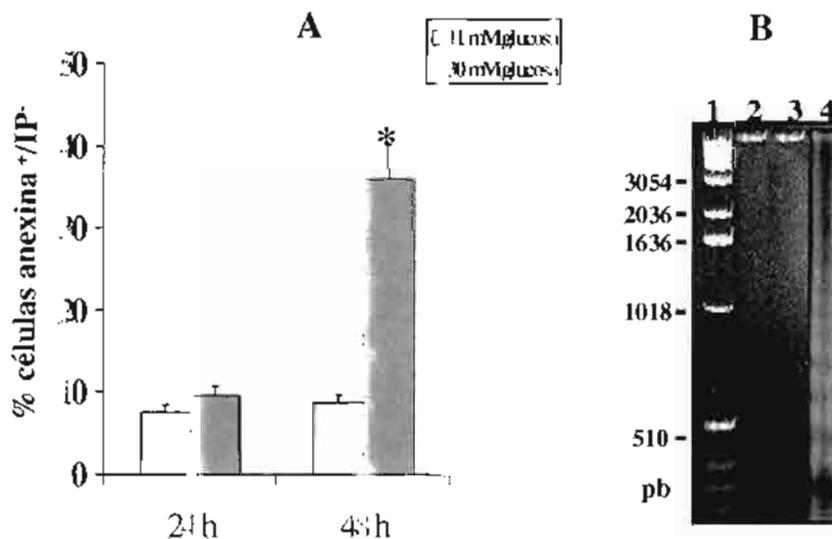


Figura 13. Inducción de apoptosis en células RINm5F por glucosa. A: Apoptosis de las células RINm5F cultivadas en condiciones de hiperglucemia durante 24 y 48 h. A: Porcentaje de células positivas a anexina V-ITC/negativas a IP. Se gráfica el promedio y la desviación estándar. * Indica la diferencia estadística con una $p < 0.001$ cuando se comparó con el control y con el tiempo de 24 h. **B:** Fragmentación oligonucleosomal del DNA de las células RINm5F por hiperglucemia. Línea 1, marcador de peso molecular. Línea 2: DNA de células RINm5F cultivadas con 11 mM de glucosa. Línea 3 y 4: DNA de células RINm5F cultivadas con 30 mM de glucosa por 24 y 48 h, respectivamente. Esta figura representa 5 experimentos independientes.

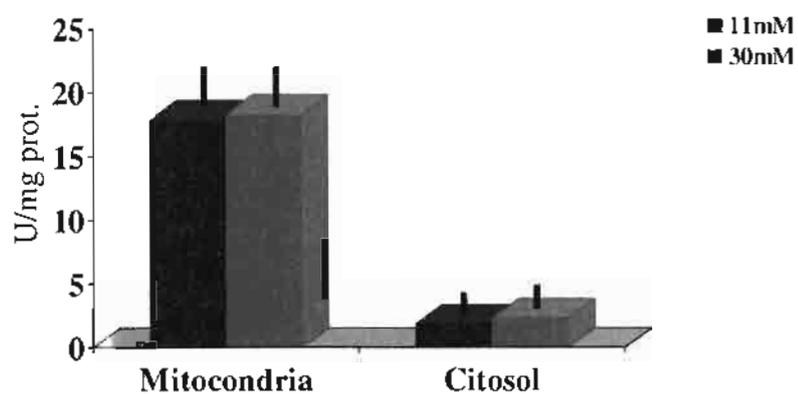


Figura 14. Actividad de glutamato deshidrogenasa en la fracción mitocondrial y citosólica de células RINm5F. La actividad se expresa en unidades por miligramo de proteína. Las barras representan la media y la desviación estándar de 5 experimentos independientes.

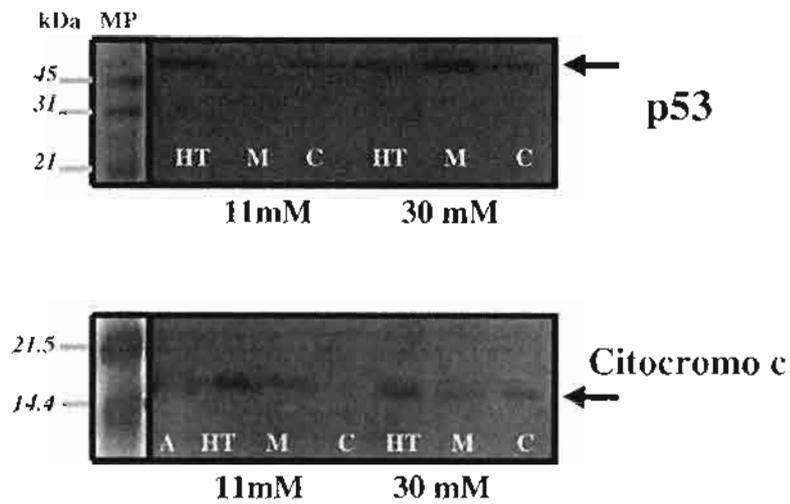


Figura 15. Análisis de p53 y citocromo c por “Western blot”. Identificación de p53 y citocromo c en homogeneizado total y en las fracciones mitocondrial y citosólica de las células RINm5F cultivadas con 11 ó 30 mM de glucosa. MP: estándar de peso molecular; HT: homogeneizado total; M: fracción mitocondrial; C: fracción citosólica; A: estándar de citocromo c. La imagen es representativa de 5 experimentos independientes.

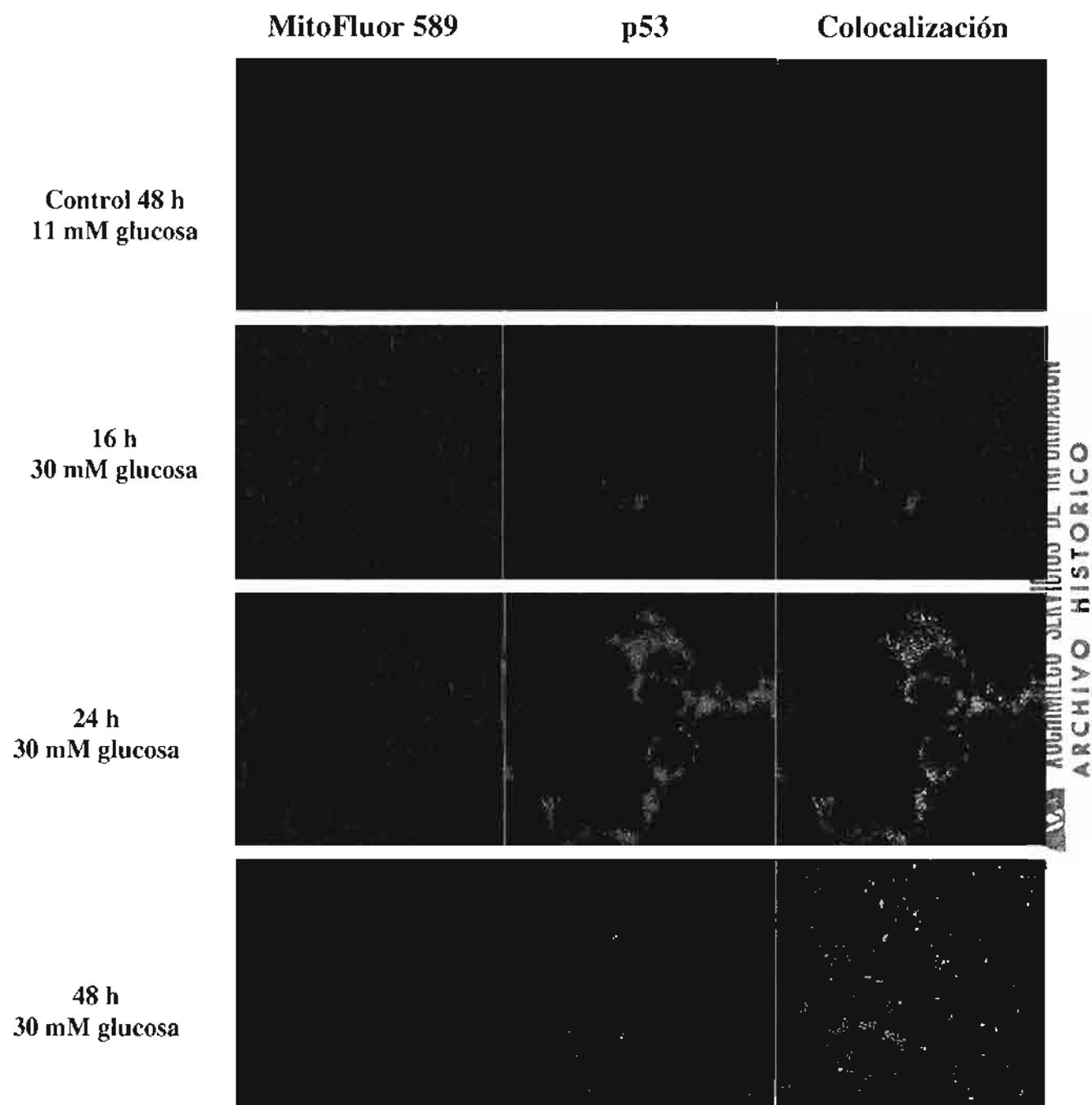


Figura 16. Localización de p53 por microscopía confocal. Distribución intracelular de p53 en las células RINm5F cultivadas con 30 mM de glucosa durante 16, 24 y 48 h, después de teñir las mitocondrias con MitoFluor 589. En rojo se muestra la tinción para mitocondrias, en verde para p53 y la co-localización de p53 en la mitocondria se muestra en amarillo.

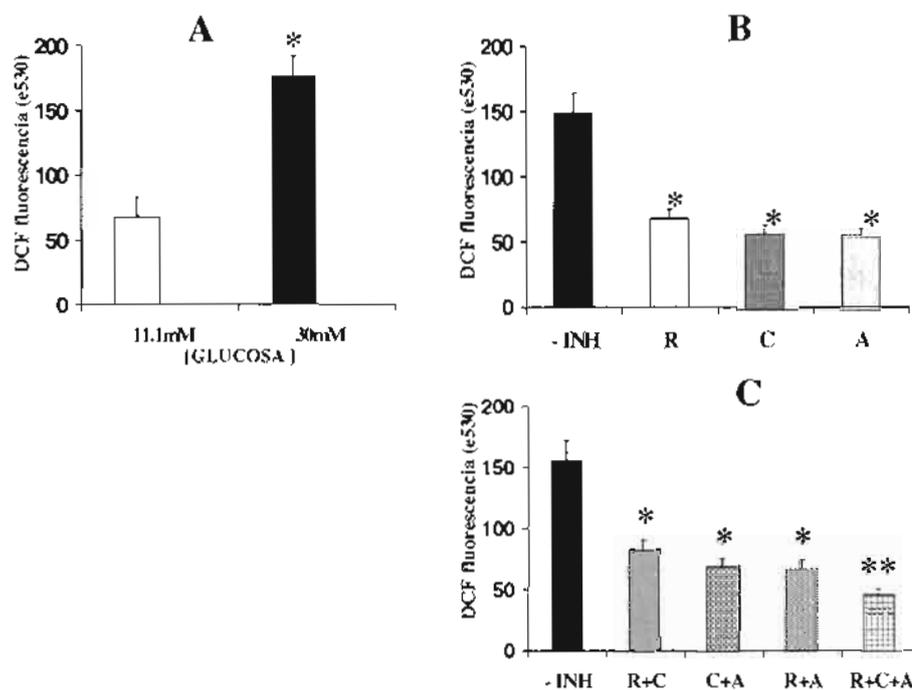


Figura 17. Efecto de la glucosa (11 ó 30 mM por 48 h), en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) de las células RINm5F. A: Producción de ERO de las células RINm5F inducida por alta glucosa. Los resultados se expresan como unidades de fluorescencia a 530 nm de la diclofluoresceína (DCF). Se graficó el promedio y la desviación estándar de 5 experimentos por separado. * Indica diferencia estadística con una $p < 0.001$. **B** y **C:** Producción de ERO en presencia de rotenona (R), CCCP (C) o apocinina (A) y en una combinación de los inhibidores, respectivamente. Estos resultados muestran el promedio y la desviación estándar de 5 experimentos. * Indica diferencia estadística con una $p < 0.001$ cuando se compara con inhibidor y sin inhibidor (-INH) y ** $p < 0.001$ cuando se realizó la comparación entre grupos.

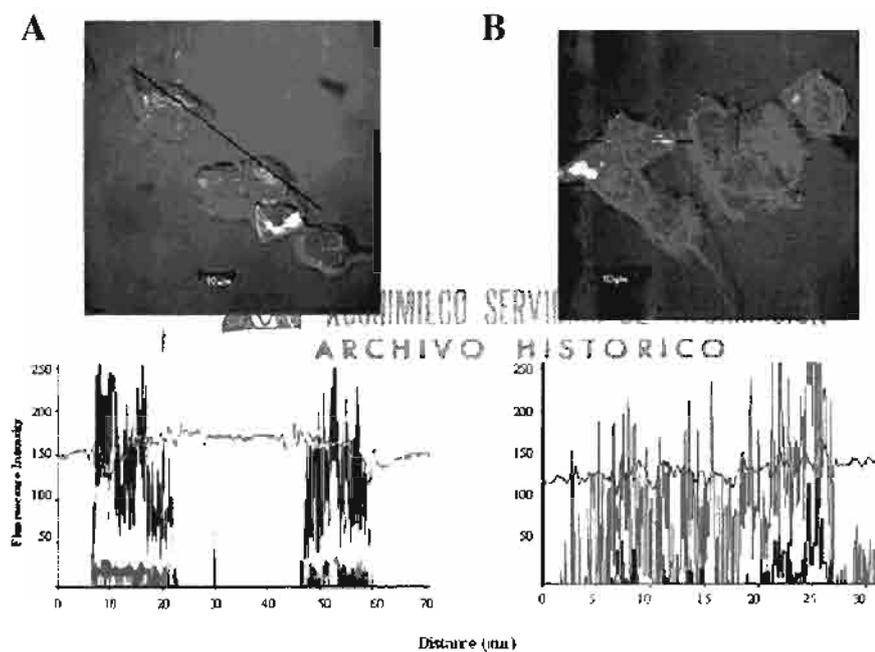


Figura 18. Efecto de la hiperglucemia en el $\Delta\psi_m$ de las células RIN: α 5F medido por cambios en la fluorescencia de JC-1. A: 11 mM de glucosa; B: 30 mM de glucosa. En las células vivas JC-1 forma agregados de color rojo y cuando el potencial aumenta y/o se colapsa JC-1 emite en el rango de fluorescencia verde. La figura es representativa de 5 experimentos independientes. El aumento es de 100x.

8.- DISCUSIÓN

Estudios recientes sugieren que el efecto de la hiperglucemia en la función de las células β depende del tiempo de exposición y del fondo genético de estas células. Aunque aún existe controversia sobre los efectos de la hiperglucemia en la proliferación y la apoptosis de las células β pancreáticas, hay suficientes evidencias en las que se ha observado que los estados de hiperglucemia crónica alteran la función de la célula β y conducen a la muerte (Roche, 2003). Sin embargo, falta mucho por conocer sobre los mecanismos moleculares involucrados en estos procesos debidos a glucotoxicidad.

La masa de células β está regulada por varios factores que incluyen el tamaño, la tasa de replicación y/o diferenciación y la tasa de apoptosis. La disminución de las células β pancreáticas durante los estados crónicos de hiperglucemia ocurre a través del mecanismo de apoptosis (Mandrup-Poulsen, 2001). El incremento en la tasa de apoptosis se ha demostrado en el humano y en modelos experimentales de diabetes y se le considera responsable de la reducción en la masa de células β en pacientes con DT2, tanto obesos como delgados (Butler et al., 2003). La disminución en la masa de células β pancreáticas también se ha observado en personas con alteraciones de la glucosa en ayuno, lo que sugiere que la apoptosis de la célula β puede ser un evento temprano en el desarrollo de DT2 (Giorgino et al., 2005). Sin embargo, el mecanismo preciso mediante el cual la hiperglucemia induce la muerte de las células β hasta ahora se desconoce. Las publicaciones más recientes sobre este tema, se han centrado alrededor del metabolismo mitocondrial debido a que representa la fuente principal de ERO que tienen una participación importante en el mecanismo de apoptosis (Gottlieb, 2000; Moll y

Zaika, 2001).

Un signo temprano de la muerte por apoptosis es que las células preservan la integridad de su membrana plasmática y muestran translocación o inversión de fosfatidilserina hacia la cara externa; este fosfolípido normalmente se encuentra confinado a la membrana interna. En nuestro estudio observamos que la incubación de las células RINm5F en un medio alto en glucosa (30mM), durante 16 y 24 h, no mostraron ningún cambio bioquímico ni morfológico asociado con apoptosis. Sólo hasta las 48 h de incubación se pudieron detectar cambios significativos característicos de apoptosis, como fueron la externalización de la fosfatidilserina evidenciado por la fluorescencia de anexina V-FITC y la fragmentación oligonucleosomal del DNA. Estas observaciones nos permiten concluir que la apoptosis fue el mecanismo principal por el cual murieron las células RINm5F cultivadas en concentraciones altas de glucosa. Previo a este tiempo no observamos células apoptóticas en el cultivo con 30 mM de glucosa.

En el proceso de apoptosis la mitocondria tiene un papel central en la fase de ejecución, debido a que almacena en su espacio intermembranal activadores y efectores de la muerte celular, como el citocromo c, entre otros. La permeabilización de la membrana externa está asociada con disfunción mitocondrial, colapso del potencial membranar ($\Delta\Psi_m$) y liberación de los factores pro apoptóticos (cit c, AIF, Smac/diablo). Además se observa la translocación de proteínas de señalización y moléculas efectoras entre el núcleo, el citoplasma y las mitocondrias, entre ellas Bax (Zong et al., 2001), AIF (Susini et al., 1999) y endonucleasa G (Wang, 2001). De particular interés resulta la movilización de proteínas

proapoptóticas hasta la mitocondria donde inducen disfunción de este organelo y en este grupo se encuentra p53 (Moll y Zaika 2001). Fiordaliso y col. (2001) propusieron que p53 participaba en la apoptosis de miocitos en presencia de glucosa alta. La *O*-glicosilación de p53 conduce a la acumulación de angiotensina II y a la apoptosis de miocitos vía activación de Bax. También se ha reportado que los blastocistos de ratones “knockout” para p53, cultivados con concentraciones altas de glucosa no presenta apoptosis, lo que sugiere que p53 es necesaria para la inducción de apoptosis por hiperglucemia (Allen 2005).

En este trabajo se muestra que en las células RINm5F la localización de p53 en la mitocondria se detectó por inmunofluorescencia *in situ*, a las 24 y 48 h en condiciones de alta glucosa. El análisis por microscopía confocal mostró una clara localización de p53 en la mitocondria a partir de las 24 h, misma que se incrementó de forma importante a las 48 h. La presencia de p53 en la mitocondria de las células RINm5F cultivadas con concentraciones altas de glucosa durante 24 h constituye un evento temprano, que antecede a la translocación de fosfatidilserina, uno de los primeros cambios en la membrana citoplasmática de las células que mueren por apoptosis. El aumento de p53 que se observó en la mitocondria a las 48 h coincidió con el incremento en el porcentaje de células apoptóticas, de acuerdo a todas las manifestaciones de este tipo de muerte: presencia de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana (positivas a anexina-V-FITC), cambios en el $\Delta\Psi_m$, liberación de citocromo c y fragmentación oligonucleosomal del DNA. Todos estos eventos no se observaron en las células control. Estudios previos, realizados por Mihara y col. (2003) en otro tipo celular, han demostrado que la liberación de citocromo c es un efecto directo de la translocación de p53

hasta la membrana externa de la mitocondria. Ellos utilizaron mitocondrias aisladas de hígado de rata, incubadas en presencia de p53 silvestre de ratón y observaron que el 90% del cit c se libera dentro de los primeros 30 min (Mihara et al., 2003). Con nuestros resultados demostramos que la hiperglucemia induce la muerte de las células β pancreáticas por el mecanismo de apoptosis, posiblemente a través de la movilización de la proteína p53 hasta la membrana mitocondrial y con disminución en el $\Delta\psi_m$.

El colapso del $\Delta\psi_m$, constituye un elemento clave para la liberación de los factores proapoptóticos mitocondriales (Gottlieb, 2000). La permeabilidad transicional de la mitocondria (MPT), que resulta de la apertura de un complejo multiproteico que forma un poro localizado sobre el sitio de contacto entre la membrana interna y externa de la mitocondria (Kroemer et al., 1998), participa de manera importante en los mecanismos de muerte celular; así por ejemplo, está asociado con el colapso del $\Delta\psi_m$ y con la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF) y de citocromo c, los cuales conducen a la activación de las caspasas (principalmente caspasa 3) y con ello a la fase degradativa de la apoptosis. La liberación de citocromo c y otras proteínas proapoptóticas, está regulada por la familia de proteínas de Bcl2 (Brady y Gil-Gómez, 1998). La proteína anti apoptótica Bcl-2 esta localizada principalmente en la membrana externa de la mitocondria donde puede inhibir la inserción u oligomerización de Bax (Mikhailov 2001) y con ello evitar la interrupción del $\Delta\psi_m$ (Shimizu et al., 1998) y la muerte celular (Kroemer et al., 1998; Barbu et al., 2002). Se sabe que varias vías de señalización para la apoptosis convergen en la activación de las proteínas proapoptóticas como Bax seguida por la translocación de esta molécula a la membrana externa

mitocondrial donde se oligomeriza e induce la apertura del poro y los cambios en la permeabilidad mitocondrial (Mikhailov, 2001). Entre los factores que inducen la permeabilidad transicional de la mitocondria se encuentran: las concentraciones elevadas de Ca^{2+} , el estrés oxidante y la disminución de ATP. Las alteraciones mitocondriales promueven un aumento en la producción de ERO y por ende un estado de estrés oxidante. En estas condiciones también aumentan las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y disminuye la producción de ATP y, como ya se mencionó, esta situación promueve la MPT y aumenta la susceptibilidad a la muerte (James y Murphy, 2002). La MPT puede estar regulada por otros factores como los niveles de ADP, pH de la matriz, $\Delta\psi_m$ y el estado energético mitocondrial. Las ERO también regulan la MPT ya que sus grupos tioles interactúan fácilmente con estas moléculas. El anión superóxido induce la liberación de citocromo c a través de la permeabilización de VDAC en la membrana mitocondrial externa. El estrés oxidante incrementa la posibilidad de apertura del poro al modular los grupos sulfhidrilos, los cuales gobiernan su apertura (Duchen, 2004). Aunque los cambios en la MPT constituye una vía para la liberación de proteínas especializadas, éstas también pueden salir por un mecanismo independiente que involucra la permeabilización de la membrana externa sin interrupción en la membrana interna (James y Murphy, 2002).

Se ha demostrado que muchas formas de apoptosis y de necrosis tienen una fase efectora común, la permeabilidad transicional mitocondrial, lo cual puede resultar de la apertura de un complejo multiproteico que forma un poro localizado sobre el sitio de contacto entre la membrana interna y externa de la mitocondria (Kroemer et al., 1998). El MPT esta

asociado con la interrupción de la potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Una reducción en el $\Delta\psi_m$ con o sin MPT, puede también observarse en respuesta a diversas moléculas incluyendo el óxido nítrico, peroxinitrito y otras ERO. Además de la interrupción del $\Delta\psi_m$, el MPT conduce al desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial con el cese en la producción de ATP, aumento en la producción de ERO y disminución de glutatión reducido; en un momento dado, algunos de estos eventos pueden promover la necrosis de la célula (Kroemer et al., 1998). Sin embargo, MPT está también asociado con la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF) y la liberación de citocromo c, los cuales conducen a la activación de las caspasas (caspasa 3) y con ello a la fase degradativa de la apoptosis.

La naturaleza exacta de las alteraciones inducidas por p53 a nivel mitocondrial en células tumorales se desconoce sin embargo, estudios realizados con este tipo de células han planteado la posibilidad de que p53 pudiera formar complejos con los miembros de la familia Bcl2. Estudios por "Western blot" revelaron la presencia de los complejos p53/Bcl2 y p53/BclxL (Mihara et al., 2003), con lo cual se inhibe Bcl2 y BclxL y se permite la acción de las proteínas proapoptóticas como Bax, daños sobre la membrana mitocondrial y liberación de citocromo c (Chipuk et al., 2004).

Se sabe que la apoptosis en respuesta a p53 es dependiente del incremento en la producción de ERO, las cuales alteran la permeabilidad mitocondrial y se permite la liberación de factores apoptogénicos (cit c, AIF, Smac/diablo) (Li et al., 1999; Chandra et al., 2000). Previamente se ha demostrado que el estrés oxidante induce la expresión de p53 (Chen et al.,

1998) y que esta proteína estimula la producción de ERO (Hussain et al., 2004) a través de la activación de genes asociados con el metabolismo de estos radicales (Polyak et al., 1999; Macip et al., 2003). Este hecho aumenta la posibilidad de que los eventos de óxido-reducción también puedan regular los niveles de p53. Así por ejemplo, se ha demostrado que la NADH quinona oxidoreductasa regula la estabilidad de p53 (Asher et al., 2001). Estos eventos sugieren que el daño oxidante mitocondrial es de gran importancia en la muerte celular inducida por p53. Bajo estas circunstancias p53 induce envejecimiento celular y la respuesta apoptótica se observa cuando hay una sobre producción de ERO, debida a algún estímulo adicional, que en el caso de las células β se pudiera deber a los estados crónicos de hiperglucemia (Bonini et al., 2004).

A nivel celular mucho se sabe sobre los efectos deletéreos de un ambiente con altas concentraciones de glucosa se conocen diversos mecanismos de señalización que contribuyen a los cambios en el fenotipo inducidos por glucosa, como la hipertrofia y las alteraciones funcionales, así como su papel como mediador de apoptosis en diversos tipos celulares. Una de las primeras respuestas celulares a la hiperglucemia es la producción de ERO y de especies reactivas de óxidos de nitrógeno (ERON). El mecanismo bioquímico de glucotoxicidad involucra un estado de estrés oxidante crónico y las células β pancreáticas son particularmente sensibles a sus efectos (Marshak et al., 1999; Robertson et al., 2003). Se ha demostrado con anterioridad que en varias estirpes celulares la hiperglucemia incrementa la producción de ERO en las células MIN, células de endotelio y plaquetas en cultivo, aún a tiempos tan cortos como 15 minutos (Nishikawa et al., 2000; Yamagishi et al., 2001; Brownlee, 2001; Sakai et

al., 2003). Nuestros resultados demuestran que la incubación de las células RINm5F bajo condiciones de hiperglucemia (30mM glucosa), por un período de 48 h, produce un aumento de hasta de 2.5 veces en la producción de ERO en comparación con el control. La determinación de las ERO en presencia de rotenona (inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial) y cccp (desacoplador de la fosforilación oxidativa) (Du X-L et al., 2000; Yamagishi et al., 2001), reveló que el estado de estrés oxidante que se genera por hiperglucemia se debe, al menos en parte, al aumento en la producción de anión superóxido por la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Se sabe también que la apocinina (inhibidor de NADPH oxidasa) reduce hasta en un 89% la producción de anión superóxido en el cultivo de células endoteliales bajo condiciones de hiperglucemia (Meyer y Schmitt, 2000). La producción de anión superóxido causada por hiperglucemia ocurre principalmente vía cadena transportadora de electrones mitocondriales. Una concentración de glucosa alta causa la interrupción de la cadena transportadora de electrones en el complejo III, que da como resultado una mayor reducción monoelectrónica del oxígeno molecular por la coenzima Q dando paso a la formación de anión superóxido. Esto quiere decir que el metabolismo de la glucosa, en condiciones de estrés como la hiperglucemia, conduce a un exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno y por lo tanto de estrés oxidante. En nuestro estudio observamos que la apocinina reduce también la generación de ERO, aunque este efecto no fue estadísticamente diferente con respecto a los inhibidores mitocondriales. Un efecto similar se observó cuando las ERO se cuantificaron en presencia de una combinación de los inhibidores el porcentaje de inhibición fue mayor siempre que estuvo presente la apocinina (rotenona + cccp + apocinina). Esto sugiere que la activación del sistema NADPH oxidasa contribuye de manera importante, junto con la mitocondria al estrés oxidante en

células RINm5F cultivadas con 30 mM de glucosa. Estos resultados concuerdan con los publicados por Oliveira y col. (2003) en los que refiere la presencia de este sistema en células β pancreáticas de rata y células HIT-T15 en cultivo así como su participación en la generación de H_2O_2 . El complejo NADPH oxidasa constituye la fuente principal de anión superóxido en células fagocíticas, el cual conduce a la formación de otras especies reactivas destinadas a la eliminación de los microorganismos. En las células no fagocíticas, el papel de la NADPH oxidasa permanece sin ser definido, aunque dada la importancia de los radicales libres en diversas vías de señalización bajo condiciones fisiológicas, como es el aumento en la movilización de Ca^{2+} , se ha propuesto su participación en el mecanismo de secreción de la insulina (Oliveira et al., 2003). Sin embargo, su sobreactivación puede contribuir al estado de estrés oxidante inducido por concentraciones elevadas de glucosa y por lo tanto a la disfunción de las células β pancreáticas (Inoguchi y Nawata, 2005).

9.- CONCLUSIONES:

1.- El cultivo de las células RINm5F en condiciones de alta glucosa durante 48 h induce la muerte por apoptosis, como se demuestra por la exposición de fosfatidilserina, fragmentación oligonucleosomal del DNA, cambios en el potencial de membrana mitocondrial y liberación de citocromo c.

2.- La apoptosis de las células RINm5F causada por concentraciones altas de glucosa correlaciona positivamente con la localización mitocondrial de p53 y los cambios en el potencial de membrana a las 48 h de cultivo.

3.- La migración de p53 a la mitocondria de las células RINm5F cultivadas con concentraciones altas de glucosa por 24 h, antecede a la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular.

En resumen, nuestros resultados demuestran por primera vez que la movilización de la proteína p53 desde el citosol hasta la mitocondria y los cambios asociados al potencial de membrana mitocondrial, forman parte del mecanismo de inducción de la apoptosis de las células RINm5F, durante el estado de estrés oxidante provocado por hiperglucemia

10.- BIBLIOGRAFÍA

Adams MJ., Cory S. (1998). The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Sci*; 281:1322-1325.

Allen AD., Yaqoob MM., Harwood MS. (2005). Mechanism of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J Nutr Biochem* En prensa.

American Diabetes Association. (2004). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 27, suppl 1: S5-S10.

Amore A., Cirina P., Conti G., Cerutti F., Bagheri N., Emancipator NS., Coppo R (2004). Amadori-configured albumin induces nitric oxide-dependent apoptosis of endothelial cells: a possible mechanism of diabetic vasculopathy. *Nephrology dialysis transplantation* 19:53-60.

Anello M., Bergamini E., Mosca F., Di Mario U., Del Prato S., Marchetti P. (2002). Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that β -cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 51:1437-1442.

Asher G., Lotem J., Cohen B., Sachs L., Shaul Y. (2001). Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *PNAS* 98: 1188-1193.

Ashcroft F., Rorsman P (2004). Type 2 diabetes mellitus: not quite exciting enough?. *Human Mol Gen* 13: R21-R31.

Augstein P., Elefanty AG., Allison J., Harrison LC. (1998). Apoptosis and beta-cell destruction in pancreatic islets of NOD mice with spontaneous and cyclophosphamide-accelerated diabetes. *Diabetologia* 41:1381-1388.

Barbu A., Welsh N., Saldeen J. (2002). Cytokine-induced apoptosis and necrosis are preceded by disruption of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in pancreatic RINm5F cells: prevention by Bcl-2. *Mol Cell Endocrinol* 190: 75-82.

Bech-Ostchir D., Kraft R., Huang X., Henklein P., Kapelari B., Pollman C., Dubiel W. (2001). COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J* 20:1630-1639.

Bell IG., Polonsky SK. (2001). Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function. *Nature* 414:788-791.

Bern E., Bergmeyer HU. (1963). Determination of glutamate dehydrogenase enzymatic activity. In: Bergmeyer HU. (ed), *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York, pp.384-388.

Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V., Di Lissa F. (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem*; 264: 687-701.

Best L., Thornally PJ. (1999). Trioses and related substances: tools for the study of pancreatic beta cell function. *Biochem Pharmacol* 57:583-588.

Bonini P., Cicconi S., Cardinales A., Vitale C., Serafino AL., Ciotti MT., Marlier NJ-L. (2004). Oxidative stress induced p53-mediated apoptosis in glia: p53 transcription-independent way to die. *J. Neurosc. Res.* 75: 83-95.

Bonner-Weir S. (2000). Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinol* 141:1926-1929.

Brownlee M. (1995). Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Ann Rev Med* 46: 223-234.

Brownlee M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-819.

Brownlee M. (2005). The pathology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes* 54:1615-1625.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brady HJ., Gil-Gómez G. (1998). Bax. The pro-apoptotic BCl2 family member, Bax. *Int J Biochem Cell Biol.* 30:647-650.

Burns FT., EL-Deiry SW. (1999). The p53 pathway and apoptosis. *J Cell Physiol.* 181: 231-239.

Butler EA., Janson J., Bonner-Weir S., Ritzel R., Rizza RA., Butler PC. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 102-110.

Caelles C., Helmborg A., Karin M. (1994). P53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370:220-223.

Cerami A., Viassara H., Brownlee M. (1987). Glucose and aging. *Sci Am* (may):82-88.

Cerami A., Ulrich P. (2000). Pharmaceutical intervention of advanced glycation end products. *Novartis Found Symp.* 235:202-212.

Ceriello A., Quagliaro L., D'Amico M., Filipo DC., Marfella R., Nappo F., Berrino L., Rossi F., Giugliano D. (2002). Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis

in perfused heart from rat. *Diabetes* 51: 1076-1082.

Cervantes-Laurean D., Jacobson EL., Jacobson MK. (1996). Glycation and glycooxidation of histones by ADP-ribose. *J Biol Chem* 271: 10461-10469.

Chandra J., Samali A., Orrenius S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 323-333.

Chen QM., Bartholomew JC., Campis J., Acosta M., Reagan JD., Ames BN. (1998). Molecular analysis of H₂O₂ induced senescent like growth arrest in normal human fibroblast: p53 and control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J.* 332, 43-50.

Chipuk JE., Kuwana L., Bouchier-Hayes L., Droin NM., Newmeyer DD., Schuler M., Green DR. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303:1010-1014.

Colman SM., Afshari AC., Barrett JC. (2000). Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutation Res.* 462, 179-188.

Didac M., Mandrup-Poulsen T. (1998). Apoptosis and the pathogenesis of IDMM. *Diabetes* 47: 1537-1543.

Díaz-Flores M., Baiza-Gutman LA., Ibáñez-Hernández MA., Pascoe-Lira D., Guzmán-Grenfell AM., Kumate-Rodríguez J. (2004). Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac Méd México* 140:437-447.

De Pierre JW., Ernster L. (1977). Enzyme topology of intracellular membranes. *Annu Rev Biochem*;46:201-62.

Donahue JR., Razmara M., Hoek BJ., Knudsen BT. (2001). Direct influence of the p53 tumor supresor on mitochondrial biogenesis and function. *FASEB J* 15, 635-644.

Donath YM., Gross JD., Cerasi KN. (1999). Hyperglycemia-induced β -cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 48, 738-744.

Duchen RM. (2004). Section III: Mitochondria, β -cell funtion, and type 2 diabetes. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 53 (Suppl. 1): S96-S102.

Du X-L., Edelstein D., Rossetti L., Fantus G.I., Goldberg H., Ziyadeh F., Wu J., Brownlee M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosilation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 12222-12226.

Evans JL., Goldfine DI., Maddux AB., Grodsky MG. (2002). Oxidative stress and stress-

activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Rev.* 23, 599-622

Evans JL., Goldfine DL., Maddux AB., Grodsky MG. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insuline resistance and β -cell dysfunction?. *Diabetes* 52:1-8..

Fernández-Gómez FJ., Gómez-Lázaro M., Jordan J. (2004). P53, nuestro guardián, celebra sus bodas de plata. *Actualidad en Farmacología y Terapéutica.* 2: 195-203.

Fiordaliso F., Leri A., Cesselli D., Limana F., Safai B., Nadal-Ginard B., Anversa P., Kajstura J. (2001). Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes* 50, 2363-2375.

Fridlyand LE, Philipson HL. (2004). Does the glucose-dependent insuline secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic β -cells?. *Diabetes*;53:1942-1918.

Giogino F., Laviola L., Leonardi A. (2005). Pathophysiology of type 2 diabetes: Rationale for different oral antidiabetic treatment strategies. *Diabetes Res Clin Pract* 68S1: S22-S29.

González FL., Castello RP., Gagliardino JJ., Rossi FCPJ. (2000). La glicosilación enzimática de proteínas. Mecanismos y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencias Biológicas*

Gottlieb AR. (2000). Mitochondria: execution central. *FEBS Letters* 482, 6-12.

Grankvist K., Marklund SL., Taljedal IB. (1981). CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J.* 199, 393-398.

Gray MW., Burger G., Lang BF. (1999). Mitochondrial evolution. *Science.*; 283(5407): 1476-1481.

Grill V., Björklund A. (2001). Overstimulation and β -cell function. *Diabetes* 50 (suppl. 1): S122-S124.

Halliwell B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344:721-724.

Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387: 296-299.

Hawkins M., Barzilai N., Liu R., Hu M., Chen W., Rossetti L. (1997). Role of the glucosamine pathway in fat-induced insuline resistance. *J Clin Invest.* 99:2173-2182.

Hicks JJ., Medina SR. (2001). Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. En: Bioquímica. Hicks JJ (Ed.) McGraw-Hill Interamericana. México. pp 411-433

Hengartner MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.

Honda R., Tanaka H., Yasuda H. (1997). Oncoprotein MDM2 is ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420:25-27.

Hupp TR., Sparks A., Lane DP. (1995). Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell* 83:237-245.

Hussain PS., Amstad P., He P., Robles A., Lupold S., Kaneko I., Ichimiya M., Sengupta S., Mechanic L., Okamura S., Hofseth JL., Moake M., Nagashima M., Forrester , SK., Harris, CC. (2004). P53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not Catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res.* 64, 2350-2356.

Inoguchi T., Nawata H. (2005). NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive β -cell dysfunction and metabolic syndrome. *Current Drug Targets* 6: 495-501.

Ito K., Nakazato T., Yamato K., Miyakawa Y., Yamada T., Hozumi N., Segawa K., Ikeda Y., Kizaki M. (2004). Induction of apoptosis in Leukemia cells by homovanillic acid derivate, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res.* 64, 1071-1078.

James MA., Murphy PM (2002). How mitochondrial damage affects cell function. *J. Biomed Sci.* 9: 475-487.

Jonas J-C., Sharma A., Hasenkamp W., Ilkova H., Patané G., Laybutt R., Bonner-Weir S., Weir CG. (1999). Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic β cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 274:14112-14121.

Kaneto H., Fuji J., Myint T., Y, Miyazawa N., Islam KN., Kawasaki Y., Suzuki K., Nakamura M., Tatsumi H., Yamasaki Y., Taniguchi N (1996). Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic β -cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J.* 320: 855-863.

Kaneto H., Kajimoto Y., Miyagawa J., Matsuoka T., Fujitani Y., Umayahara Y., Hanafusa T., Matsuzawa Y., Yamasaki Y., Hori M. (1999). Beneficial effects of antioxidants in diabetes. Possible proteccion of pancreatic B-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 48: 2398- 2406.

Kiningham KK., Oberley TD., Lin SM., Mattingly CA., Clair STKD. (1999). Overexpression of manganese superoxide dismutase protects against mitochondrial-initiated poly(ADP-ribose)polymerase-mediated cell death. *FASEB J* 13, 1601-

Kroemer G., Dallporta B., Resche-Rigon M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Ann Rev Physiol* 60:619-642.

Kennedy TR., Kauri ML., Dahlgren MG., Jung S-K. (2002). Metabolic oscillations in β -cells. *Diabetes* 51 (suppl 1): S152-S161.

Laybutt DR., Kaneto H., Hasenkamp W., Grey S., Jonas JC., Sgroi DC., Groff A., Ferran C., Bonner-Weir S., Sharma A., Weir GC (2002). Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes* 2002 51:413-423.

Lebovitz HE. (1999). Type 2 diabetes: An Overview. *Clin Chem* 45:1339-1345.

Li PF., Dietz R., Harsdorf VR. (1999). P53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *EMBO J* 18:6027-6036.

Linzer DH., Levine AJ. (1979). Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17:43-52.

Lowell BB, Shulman IG. (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*;307:384-387.

Lupi R., Dotta F., Marselli L., Del Guerra S., Masini M., Santagelo C., Patane G., Boggi U., Piro S., Anello M., Bergamini C., Mosca F., DiMario U., Del Prato S., Marchetti P. (2002). Prolonged exposure to free fatty acids has cytosolic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 51:1437-1442.

Maechler P., Wolheim BC. (2001). Mitochondrial function in normal and diabetic β -cell. *Nature* 414:807-812.

Maechler P., Jornot L., Wolheim BC. (1999). Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* 274, 27905-27913.

Macip S., Igarashi M., Berggren P., Yu J., Lee WS., Aaronson AS. (2003). Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol.* 23, 8576-8585.

Maclachlan KT., Meng DR., El-Deiry WS. (1999). "P53: Twenty years on" in trieste, Italy, May 20-22, 1999. *J Cell Physiol.* 181: 371-374.

Malanga M., Pleschke MJ., Kleczkowska EH., Althaus RF. (1998). Poly(ADP-ribose) binds to

specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. *J Biol Chem.* 273:11839-11843.

Mandrup-Poulsen T. (2001). β -cell apoptosis. *Diabetes* 50 (suppl. 1), S58-S63.

Marchenko DN., Zaika A., Moll MU. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. *J Biol Chem.* 275, 16202- 16212.

Marshak S., Leibowitz G., Bertuzzi F., Kaiser N., Gross JD., Cerasi E., Melloul D. (1999). Impaired β -cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes* 48, 1230-1236.

Mathis D., Vence L., Benoist C. (2001). Beta-cell death during progression to diabetes. *Nature* 414:792-798.

Mebmer KU., Ankarcona M., Nicotera P., Brüne B. (1994). P53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Letters* 355: 23-26.

Meglasson MD., Matschinsky FM. (1986). Pancreatic islet glucose metabolism and the regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev.* 2: 163-214.

Medina-Navarro R., Hicks JJ. (2001). Radicales libres de oxígeno: bioquímica inorgánica y biomedicina. En: Bioquímica. Hicks JJ (Ed.) McGraw-Hill Interamericana. México, , pp 779-792.

Merino JJ., Cordero CMI. (1998). Bases moleculares del proceso de muerte celular programada: implicaciones de la proteína supresora de tumores p53 y otras proteínas en el control del ciclo celular. *Mecanismos de acción apoptótica. Revisión. Invest Clin* 39: 323-358.

Meyer WJ., Schmitt EM (2000). A central role the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Letters* 472: 1-4.

Mihara M., Erster S., Zaika A., Oleski P., Chittenden T., Pancoska P., Moll MU. (2003). P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11, 577-590.

Min C., Kang E., YU SH., Shinn SH., Kim YS. (1999). Advanced glycation end products induce apoptosis and procoagulant activity in culture human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes Res Clin Prac* 46: 197-202.

Mikhailov V., Mikhailova M., Pulkrabek, D.J., Dong Z., Venkatachalam MA., Saikumar P. (2001). Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial membrane potential changes in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 276:18361-18374.

Moll MU., Zaika A. (2001). Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *Febs Lett* 493, 65-69.

Navarro P., Valverde MA., Benito M., Lorenzo M. (1998). Insuline/IGF-I rescues immortalized brown adipocytes from apoptosis down regulating BclxL expression, in a PI 3-kinase- and Map kinase-dependent manner. *Exp Cell Res.* 243, 213-221.

Nikolaev AY., Li M., Puskas N., Qin J., Gu W. (2003). Parc. A Cytoplasmic Anchor for p53. *Cell.*, 112:29-40.

Nishikawa T., Edelstein D., Du JX., Yamagishi S., Matsumura T., Kaneda Y., Yorek AM., Beebe D., Oates JP., Hemmes PH., Giardino I., Brownlee M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787-790.

Niwa T. (1999). 3-deoxyglucosone metabolism, analysis, biological activity, and clinical implication. *J. Chromatogr B Biomed Sci Appl* 731:23-26.

Oliveira HR., Verlengia R., Carvalho ROC., Britto GRL., Carpinelli RA. (2003). Pancreatic β -cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. *Diabetes* 52, 1457-1463.

Olson M., Kornblut S. (2001). Mitochondria in apoptosis and human disease. *Curr. Mol. Med.* 1:91-122.

Okitani A., Cho RK., Kato H. (1984). Polymerization of lysozyme and impairment of its aminoacid residues caused by reaction with glucose. *Agric Biol Chem* 48: 1801-1808

Ortega-Camarillo C., Guzmán-Grenfell AM., Hicks JJ. (1999). Oxidation of gonadotrophin (PMSG) by oxygen free radicals alters its structure and hormonal activity. *Mol Reprod Dev.* 52: 264-268.

Ortega-Camarillo C., Díaz-Flores M., Ávalos-Rodríguez A., Vergara-Onofre M., Rosales-Torres AM. (2001). La apoptosis y su importancia biomédica. *Gaceta Médica de México.* 2001; 137 (6):563-577.

Park JY., Takahara N., Gabriele A., Chou E., Naruse K., Sazuma K., Yamauchi T., Ha SW., Meier M., Rhodes CJ., King GL. (2000). Induction of endothelin-I expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes* 49:1239-1248.

Polyak K., Xia Y., Zweier LJ., Kinzler WK., Vogelstein B. (1999). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-3005

Robertson PR., Harmon J., Tran TOP., Poitout V. (2004). β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*;53 suppl. 1:S119-S124.

Roche E., Assimacopoulos-Jeannet F., Witters LA., Perruchoud B., Yaney G., Corkey B., Asfari M., Prentki M. (1997). Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in

a pancreatic β -cell line (INS-1). *J Biol Chem* .272:3091-3098

Roche E., Farfari S., Witters LA., Assimakopoulus-Jeannet F., Thumelin S., Brun T., Perruchoud B., Yaney G., Corkey B., (1998). Long-term exposure of β -INS cells to high glucose increases anaplerosis, lipogenesis and lipogenic gene expression. *Diabetes* 47:1086-1094.

Roche E. (2003). Diabetes tipo 2: gluco-lipo-toxicidad y disfunción de la célula β pancreática. *Ars Pharmaceutica*;44:313-332.

Rhodes JC. (2005). Type 2 Diabetes- a matter of β -cell life and death?. *Science* 307: 380-383.

Robertson PR., Harmon J., Tran OP., Tanaka Y., Takahashi H. (2003). Glucose toxicity in β -cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and glutathione connection. *Diabetes*. 52, 581-587.

Ryan JJ., Prochownick E., Gottlieb C., Apel IJ., Merino R., Nuñez G et al. (1994). C-myc and Bcl-2 modulan p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*;91:5878-5882.

Sakai K., Matsumoto K., Nishikawa T., Suefuji M., Shirotani T., Brownlee M., Araki E. (2003). Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic β cells. *Biochem Biophys Res Comm*. 300, 216-222.

Saltiel A., Kahn R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.

Sansome C., Zaika A., Marchenko ND., Moll UM. (2001). Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett*. 488: 110-115.

Siliciano JD., Canman CE., Taya T., Sagaguchi K., Apella E., Kastan MB. (1997). DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev*. 11:3471-3481.

Simbultan-Rosenthal CM., Rosenthal SD., Ding R., Bhatia K., Smulson EM. (1998). Prolongation of the p53 response to DNA strand breaks in cells depleted of PARP by antisense RNA expression. *Biochem Biophys Res Comm* 253: 864-868.

Shaw P., Bovey R., Tardy S., Sahli R., Sordat R., Costa J. (1992). Induction of apoptosis by wild type p53 in a human colon tumor derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89, 4495-4499.

Szewczyk A., Wojtczak L. (2002). Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Reviews* 54:101-127.

Shiratsuchi A., Osada S., Kanazawa S., Nakanishi Y. (1998). Essential role of phosphatidylserine externalization in apoptosing cell phagocytosis by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 246, 549-555.

Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W., Funahashi Y., Mignon A., Lacronique V., Matsuda H., Tsujimoto Y. (1998). Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *PNAS* 95: 1455-1459.

Schuler M., Bossy-Wetzel E., Goldstein C.J., Fitzgerald P., Green RD. (2000). p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome *c* release. *J Biol Chem.* 275, 7337-7342

Susini S., Roche E., Prentki M., Schlegel W. (1998). Glucose and glucocorticoid peptides synergize to induce *c-fos*, *c-jun*, *Jun B*, *Zif-268* and *nur-77* gene expression in pancreatic β (INS-1) cells. *FASEB J* 12: 1173-1182.

Susini S., Lorenzo HK., Zamzami N, Marzo I, Snow BE., Brothers GM., Mangion J., Jacotot E., Constantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett DR., Aebersold R., Siderovski DP., Penninger JM., Kroemer G., (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.

Taniguchi N., Kaneto H., Asahi M. (1998). Involvement of glycation and oxidative stress in diabetic macroangiopathy. *Diabetes care* 14: 68-72.

Tapia CR (1999). La diabetes: un problema de salud pública en México. *Revista Foro Silanes.*

Thomas HE., Durmiche R., Corbett JA., Kay TW. (2002). Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by overexpression of suppressor of cytokine signalling-1. *Diabetes* 50: 2744-2751.

Ulrich P., Cerami A. (2001). Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Progr Horm Res* 56:1-21.

Vrablic SA., Albrigh DC., Craciunescu NC., Salganik IR., Zeisel HS. (2001). Altered mitochondrial function and overgeneration of reactive oxygen species precede the induction of apoptosis by 1-O-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine in p53-defective hepatocytes. *FASEB J* 15, 1739-1744.

Wang X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Gen Dev* 15: 2922-2933.

Weir CG., Laybutt RD., Kaneto H., Bonner-Weir S., Sharma A. (2001). β -cell adaptation and compensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 50 (suppl. 1):S154-S159.

Webb CG., Akbar SM., Zhao C., Steiner FD. (2001). Expression profiling of pancreatic β -

cells. Glucose regulation of secretory and metabolic pathway genes. *Diabetes* 50 (supp 1): S135-S136.

West IC (2000). Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 17: 171-180.

Yamagishi SI., Edelstein D., Du LX., Brownlee M. (2001). Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 50, 1491-1494.

Yuan SY., Ustiniva EE., Wu MH., Tinsley JH., Xu W., Korompai FL., Taulman AC. (2000). Protein kinase C, activation contributes to microvascular barrier dysfunction in the heart at early stages of diabetes. *Circ. Res* 87:412-417.

Zentella M., Saldaña BY. (1996). Papel fisiológico de los radicales libres . *Bol Educ Bioq (México)* 152-161

Zimmet P., Alberti KGMM., Shaw J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787.

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

Zong WX., Lindsten T., Ross AJ., MacGregor GR., Thompson CB. (2001). BH3-only proteins that bind pro survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Gen dev* 15:1481-1486.

11.- DIFUSION DE RESULTADOS

Hyperglycemia induces apoptosis and p53 mobilization to mitochondria in RINm5F cells

C. Ortega-Camarillo,¹ A.M. Guzmán-Grenfell,² R. García-Macedo,³
 A.M. Rosales-Torres,⁴ A. Ávalos-Rodríguez,⁴ G. Durán-Reyes,³
 R. Medina-Navarro,³ M. Cruz,³ M. Díaz-Flores³ and J. Kumate³

¹Este trabajo es parte de la tesis para el grado: Doctor en Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma Metropolitana;
²Laboratorio de Bioquímica Inorgánica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México; ³Unidad de
 Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades, CMNS XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México;
⁴Bioquímica de la Reproducción, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana,
 Unidad Xochimilco, México

Received 21 April 2005; accepted 12 July 2005

Abstract

The mechanisms related to hyperglycemia-induced pancreatic β -cell apoptosis are poorly defined. Rat insulin-producing cells (RINm5F) cultured in high glucose concentrations (30 mM) showed increased apoptosis and protein p53 translocation to mitochondria. In addition, hyperglycemia induced both the disruption of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), and an increase in reactive oxygen species (ROS), as shown by fluorescence changes of JC-1 and dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCDHF-DA), respectively. The increased intracellular ROS by high glucose exposure was blunted by mitochondrial-function and NADPH-oxidase inhibitors. We postulate that the concomitant mobilization of p53 protein to the mitochondria and the subsequent changes on the $\Delta\psi_m$, lead to an important pancreatic β -cell apoptosis mechanism induced by oxidative stress caused by hyperglycemia. (Mol Cell Biochem xxx: 1–9, 2005)

Key words: apoptosis, p53, pancreatic β -cell, hyperglycemia, mitochondria, oxidative stress

Introduction

Cell proliferation and cell death by apoptosis are very complex and involve several pathways. In both processes, the p53 tumor suppressor gene plays an important role. Under stress, the activation of p53 protein works as a transcription factor, activating a series of genes such as p21 and Bax, and their concerted action results in cell cycle inhibition [1] or in apoptosis induction, respectively [2]. However, there is growing evidence about the induction of apoptosis by independent mechanisms of the transcriptional function of p53 [3]. These

studies support the idea that p53 can contribute to apoptosis in malignant cells by directly signaling the mitochondria [4, 5] and inducing cytochrome c release [6, 7].

It is likely that p53 regulates the function of the organelles within the cell. This function was confirmed with γ radiation that showed the mobilization of p53 heading towards the external mitochondrial membrane during apoptosis as a response to stress. Such mobilization is not seen when apoptosis is p53 independent and/or during cell cycle delay [4, 6]. Before p53 reaches the mitochondria and leads to changes during the induction of apoptosis, transcriptional activation

Address for offprints: C. Ortega-Camarillo, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Coordinación de Investigación en Salud, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, C.P. 06720, México D.F. México (E-mail: leimich@hotmail.com)

of several oxide-reductases and production of reactive oxygen species (ROS) takes place. [8]. Also, p53 induces a transient increase in mitochondrial membrane potential followed by a decrease [9]. Previous studies in thymocytes and leukemia cells treated with γ radiation [7, 10] and oxidative stress-induced apoptosis of glia cells [11], suggest that changes occur in the mitochondrial membrane potential and in the production of ROS by this organelle as an important factor for p53-induced apoptosis [9].

Enough evidence is available about the role of apoptosis in the loss of pancreatic β cells during chronic hyperglycemic states [12–14]. During the initial hyperglycemia the number of pancreatic β cells decreases. The remaining cells increase their glucose sensitivity and the production and secretion of insulin is also increased to prevent a hyperglycemic state while in starvation [15]. In addition, in a chronic state of hyperglycemia, the pancreatic β cells become exhausted, and after a while, death occurs by apoptotic mechanisms [12, 16]. In other instances, hyperglycemia induces ROS as well as an oxidative stress condition in several tissues. This is considered as a main feature in the development of several pathophysiological changes related to certain chronic complications of diabetes [17, 18]. Oxidative stress mainly affects pancreatic β cells [15], where catalase and peroxidase action is 20 times lower than in the liver [19]. According to these studies, it seems that the increase in ROS production is one of the earliest events in cases of glucose intolerance and it may be the cause of pancreatic β cell dysfunction, as well as the cause of changes in insulin synthesis and glucose-induced insulin secretion in type 2 diabetes [18]. Thus, we hypothesize that the p53 protein participates in changes at the mitochondrial level in pancreatic β cell death. The objective in this study was to investigate whether hyperglycemia induces apoptosis in RINm5F cells through an increase in ROS production, and if this phenomenon is associated with changes in mitochondrial potential and with the mobilization of p53 protein to the mitochondria.

Materials and methods

Reagents

The chemicals were obtained from the following sources: RPMI-1640 medium, Hank's balanced salt solution, trypsin, Na-EDTA, carbonyl cyanide-*m*-chlorophenyl-hydrazone (CCCP), rotenone, and apocinin from Sigma (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO); fetal bovine serum and L-glutamine from GIBCO (Carlsbad, CA). DePsiper™ kits (JC-1 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazol carbocyanine iodide) from R&D systems (Minneapolis, MN); dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCDHF-DA) from Molecular Probes Europe (Leiden, Netherlands);

Anexin-V Fluos staining kit from Roche Antibodies Applied Science (Mexico, D.F.), anti-p53 (pab 240) and anti-cytochrome *c* (H-104) antibodies from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California); chemiluminescence reagent from Perking Elmer Life Sciences (Boston, MA), sequei-blot-PVDF membrane and prestained and biotinylates standards from Bio-Rad (Hercules, CA). All other analytical grade chemicals were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Cell culture

RINm5F cells were grown in RPMI-1640 medium (11 mM glucose) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 23.8 mM sodium bicarbonate, 20 μ g/ml gentamycin, and 2 mM L-glutamine, in a 95% air, 5% CO₂ environment at 37 °C. Cells were harvested and sub-cultured for an additional 2 days in RPMI-1640 containing 30 mM glucose.

Apoptosis

Flow cytometry

Cells were harvested with 2 mM PBS-EDTA, washed in PBS-BSA 0.1%, and centrifuged at 200 $\times g$ for 5 min. The pellets were resuspended in 100 μ l of staining-solution: 20 μ l fluorescein isothiocyanate-labeled annexin-V (10 μ g/ml) and 20 μ l propidium iodide (PI) (50 μ g/ml) in 1 ml Hepes buffer (10 mM Hepes, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂), and incubated in the dark for 15 min at room temperature. About 400 μ l Hepes-buffer was added for flow cytometry analysis using a FACS Calibur instrument (Becton Dickinson System, San Jose, CA) with 488 nm excitation. Emitted light was split and collected at 530 nm band pass filter for fluorescein and 585 nm to PI. For each flow cytometer run, 10 000 cells were required. Data were analyzed using CELL.QUEST software (Becton Dickinson).

DNA fragmentation

Cells were washed twice with PBS, resuspended in lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 10 mM EDTA, 0.25% triton X-100) and stored at 4 °C for 15 min. Cell lysates were then centrifuged at 13, 000 $\times g$ at 4 °C for 30 min. The supernatants were collected and incubated in the presence of 100 μ g/ml RNase A and 240 μ g/ml proteinase K at 37 °C for 1 h. Crude DNA preparations were extracted with phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1), precipitated with 0.1 volume of 3 M sodium acetate and 2.5 volumes of 100% ethanol at –20 °C overnight and centrifuged at 14, 000 $\times g$ for 30 min. The DNA pellets were air-dried and resuspended

136 in TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) [20].
 137 The concentration of nucleic acid was determined by UV
 138 absorbance at 260 nm. The same amount of nucleic acids
 139 from each sample was found by electrophoresis on a 1.2%
 140 agarose gel and visualized by UV fluorescence after staining
 141 with ethidium bromide. Gel was visualized and photographed
 142 on an image analyzer Gel Doc 2000 using Quantity One 4.0.1
 143 software (Bio-Rad, Hercules, CA).

144 *Subcellular fractioning*

145 Cells (2×10^7) were resuspended in 400 μ l of buffer A
 146 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.5 mM Na-EDTA, 250 mM su-
 147 crose, 0.1 mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml pep-
 148 statin, 2 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml digitonin) and incubated
 149 for 5 min at room temperature and later homogenized in a
 150 glass Teflon homogenizer using 10 up-and-down strokes at
 151 500 rpm. The homogenate was centrifuged at $750 \times g$ for
 152 10 min at 4 °C. The supernatant was collected and subjected
 153 to centrifugation at $750 \times g$ for 10 min at 4 °C. The super-
 154 natant was transferred and centrifuged at $10,000 \times g$ for
 155 15 min at 4 °C [21]. The resulting mitochondrial pellet was
 156 resuspended in 50 μ l buffer A without digitonin. The super-
 157 natant was stored as the cytosolic fraction. Both fractions
 158 were stored frozen at -70 °C until analyzed. Protein concen-
 159 trations from both fractions were determined using the Brad-
 160 ford assay [22]. Cytosolic fractions were analyzed for glu-
 161 tamate dehydrogenase (GDH) enzymatic activity. Less than
 162 5% of the total cellular GDH activity (mitochondrial marker)
 163 was detected in cytosolic fraction [23].

164 *Western blot analysis of cytochrome c release* 165 *and p53 location*

166 The mitochondrial and cytosolic fractions or crude cell
 167 lysates were used for cytochrome c and p53 detection.
 168 These fractions (40 μ g) were separated on 10% SDS-PAGE.
 169 Biotinylated standards were used to determine molecular
 170 weights. The gels were electroblotted onto PVDF membranes
 171 (0.8 mA/cm², 2 h). p53 was detected with a mouse mono-
 172 clonal antibody at a 1:1000 dilution and secondary goat an-
 173 timouse horseradish peroxidase-labeled antibody (1:10 000).
 174 Cytochrome c was detected using rabbit polyclonal antibody
 175 at a 1:2500 dilution and secondary goat antirabbit horseradish
 176 peroxidase-labeled antibodies (1:10 000) [6, 24]. Bound anti-
 177 bodies were detected using an enhanced chemiluminescence
 178 kit (Perkin Elmer Life Sciences, Boston USA) following the
 179 manufacture's instructions.

180 *Confocal fluorescent imaging*

181 After the above-mentioned treatments, the cells were washed
 182 with PBS, fixed for 3 min in 1:1 ice-cold acetone/methanol,

washed with PBS, and labeled by adding the MitoFluor 183
 589 probe (200 nM in PBS, Molecular Probes). After in- 184
 cubating for 20 min at room temperature, the cells were 185
 washed once with PBS and incubated with primary anti- 186
 bodies against p53 (diluted 1:25 in 1% BSA-PBS) for 3 h 187
 at room temperature. After washing, the cells were exposed 188
 to secondary antibodies (antimouse IgG conjugated-FITC, 189
 diluted 1:100) in the same buffer for 3 h at room tem- 190
 perature in the dark. Fluorescent-labeled preparations were 191
 viewed under a Zeiss Axiovert 100M confocal scanning 192
 microscope supplemented with an argon/helium/neon laser. 193
 The excitation/emission wavelengths used were 488/510 nm 194
 for FITC, and 568/590 nm for MitoFluor dye. The ac- 195
 quisitions were recorded using pseudo-color representa- 196
 tion, with LSM 5 Image Browser Program for confocal 197
 microscopy. 198

199 *Measurement of ROS by DCFH-DA fluorescence*

200 ROS production was measured by fluorescence using 200
 the oxidation-sensitive fluorescent probe 2',7'- 201
 dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). 202
 DCFH-DA is a cell-permeant dye that, once inside the cell, 203
 is cleaved by intracellular esterase into its nonfluorescent 204
 form DCFH. This form, which is no longer membrane 205
 permeable, may be further oxidized by H₂O₂ or the hydroxyl 206
 radical, to its fluorescent form, DCF. Following exposure 207
 to hyperglycemia, RINm5F cells were washed with Hank's 208
 balanced salt solution (lacking phenol red) and then incu- 209
 bated in the dark with the fluorescent probe DCFH-DA 210
 (10 μ M in Krebs-Ringer bicarbonate buffer) for 30 min at 211
 37 °C and analyzed with a Fluoroskan Ascent FL (Lab- 212
 systems). Fluorescence emission from DCF (green) was 213
 detected at a wavelength of 530 nm [25, 26], in the presence 214
 or absence of 5 μ M rotenone, 0.1 μ M CCCP or 10 μ M 215
 apocinin [27]. 216

217 *Measurement of the mitochondrial membrane potential* 218 *($\Delta\Psi_m$) by JC-1 fluorescence*

219 The mitochondrial membrane potential was semiquanti- 219
 tatively determined using a DePsiper™ commercial kit. 220
 following the procedure recommended by the manufac- 221
 turer for staining monolayer cells. The fluorescent probe 222
 JC-1 is a lipophilic cation that selectively accumulates 223
 within the mitochondrial matrix either as a green (527 nm) 224
 fluorescent monomer at depolarized membrane poten- 225
 tials or as J-aggregates with orange-red (590 nm) fluo- 226
 rescence at hyperpolarized membrane potentials [28]. 227
 The samples were immediately analyzed under the con- 228
 focal microscopy Zeiss Axiovert 100M microscope, using 229
 488 nm excitation and 530 and over 580 nm emission 230
 wavelengths. 231

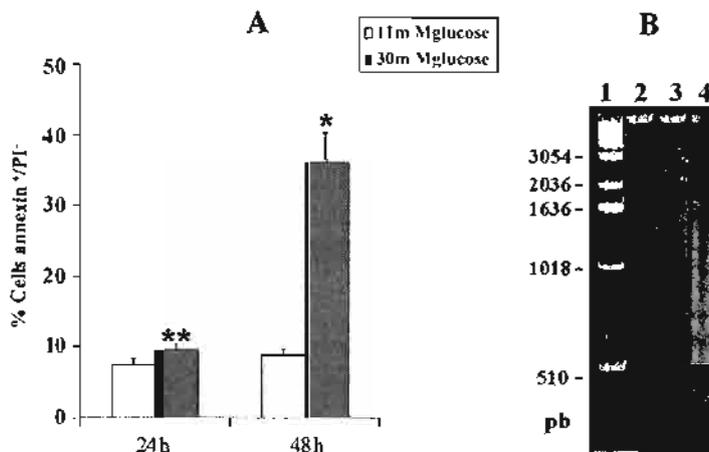


Fig. 1 Apoptosis of cultured RINm5F cells in the presence of glucose (11 or 30 mM) for 24 and 48 h, followed by staining with annexin-V-FITC (10 µg/ml) and PI (50 µg/ml) and analyzed by flow cytometry. (A) Rate of apoptotic cells or positive cells to annexin-V-FITC and negative to PI at 24 and 48 h. Results are a mean ± S.E.M. in five separate experiments. (*) indicates $p < 0.001$ and ** indicates $p < 0.005$ when compared to controls using one-way ANOVA and the Bonferroni test. (B) Agarose gel electrophoresis of DNA fragmentation in the RINm5F cells. Lane 1: molecular DNA weight markers. Lane 2: DNA obtained from RINm5F cells cultured in the presence of glucose (11 mM) for 48 h. Lane 3 and 4: DNA obtained from RINm5F cells in the presence of hyperglycemia (30 mM) for 24 and 48 h, respectively. This figure is representative of five independent experiments.

232 *Data analysis*

233 Data were evaluated using variance analysis for multiple comparisons with the Sigma Stat v2.0 package (Sigma-Aldrich Co., San Luis Missouri, USA). A p value < 0.05 was considered significantly different.

237 **Results**

238 *Effects of hyperglycemia on the survival of the RINm5F cells*

239 The RINm5F cells were cultured in a medium containing 240 11 or 30 mM glucose. Apoptosis was quantified measuring 241 exposure of phosphatidylserine and by oligonucleosomal 242 DNA fragmentation. Annexin V-FITC binds to phosphatidylserine in the presence of Ca^{2+} [29], which is exposed on the outer leaflet of the (intact) plasma membrane as an early marker of apoptosis. To exclude a possible contribution as a result of necrosis, we also treated cells with 247 PI, that labels the nuclei of nonintact (necrotic) cells. Increased staining with annexin V (or FL1 fluorescence) alone is indicative of apoptosis, whereas staining with both annexin V and PI is indicative of necrosis. Our results proved 251 that a 48 h hyperglycemia induces an increase in the positive cell rate to Annexin-V but negative to PI, with a statistically significant difference ($p < 0.001$) compared to controls 254 (11 mM glucose) ($36 \pm 11.3\%$ and $5.08 \pm 0.56\%$, respectively) (Fig. 1A). Gel electrophoresis of DNA extracted from 256 RINm5F cells (Fig. 1B) confirmed that endonucleolytic DNA

breakdown, a late event in apoptosis, was present with 48 h 257 hyperglycemia. 258

Since the RINm5F cells cultured during 24 h under hyperglycemia showed no significant difference ($p < 0.05$) as compared to controls concerning early apoptosis in annexin V assays, in subsequent experiments we show only the results after 48 h incubation. 262 263

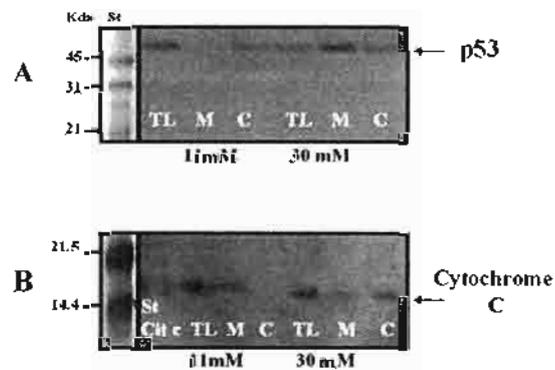


Fig. 2 Immunoblot detection of (A) p53 and (B) cytochrome c in mitochondrial, cytosolic fraction and total cell lysate of RINm5F cells cultured in the presence of glucose (11 or 30 mM) for 48 h. Subcellular fractioning was performed as described in the "Material and Methods" section. 40 µg protein were resolved on 10% SDS-PAGE, blotted, and detected using p53, and cytochrome c antibodies. St, molecular weight standard proteins, TL, total lysate, M, mitochondrial fraction, C, cytosolic fraction, Cyt C, cytochrome c standard. The immunoblots are representative of five independent experiments.

264 *Subcellular location of p53 and cytochrome c release*

265 Recent studies have shown that the mitochondria are targets
 266 for p53 during induction of apoptosis, p53 is translocated
 267 to the mitochondria and is involved in the regulation of mi-
 268 tochondrial permeability of tumor cells [7]. In this study,
 269 we show evidence that hyperglycemia induces the mobiliza-
 270 tion of p53 protein to the mitochondria. The analysis by
 271 WB detected the presence of this protein in the mitochon-
 272 drial and not in the cytosolic fraction of cells cultured during
 273 48 h under hyperglycemic conditions (Fig. 2A). Additionally,

hyperglycemia-induced mitochondrial permeability (Fig. 5) 274
 and led to cytochrome c release to the cytosol in the same 275
 cells (Fig. 2B). 276

*Confocal microscopy analysis of p53 intracellular 277
 distribution 278*

To further document the intracellular distribution of p53, we 279
 used confocal microscopy analysis of p53 after MitoFluor 280
 589 labeling of the mitochondria (Fig. 3). The RINm5F cells

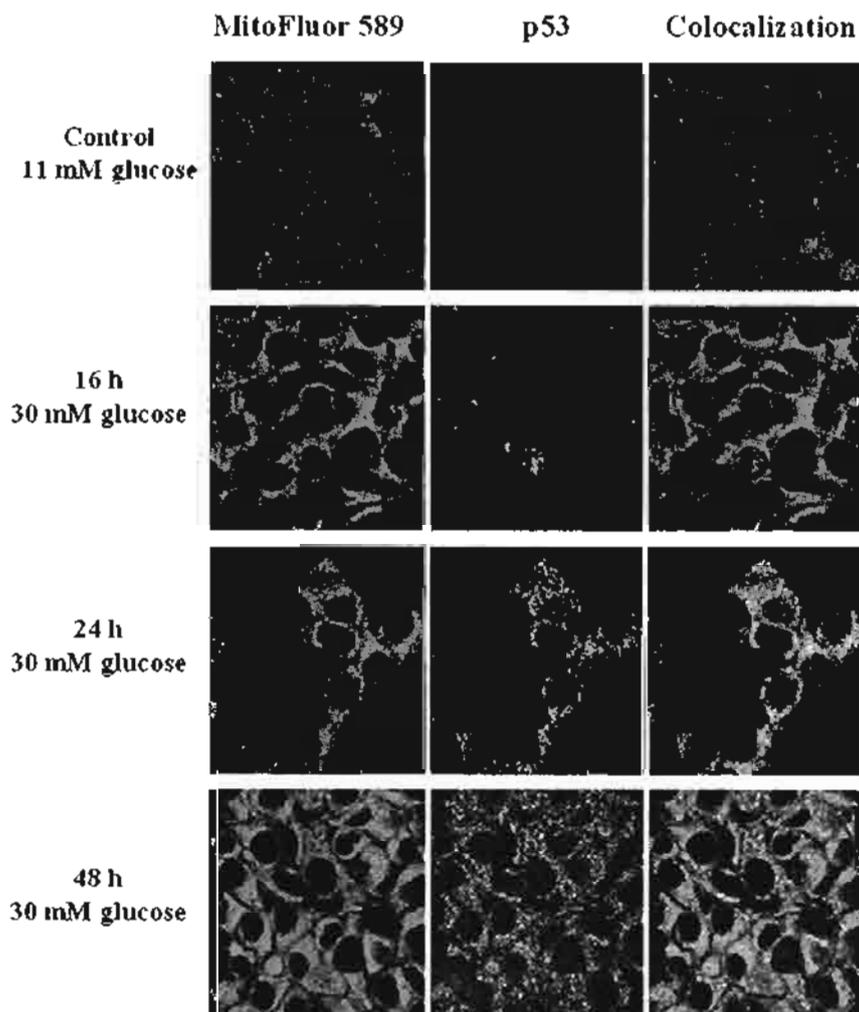


Fig. 3 Confocal microscopy analysis of p53 redistribution and mitochondrial staining of cultured RINm5F cells in the presence of glucose (11 or 30 mM) for 16, 24, and 48 h. In controls only the 48 h picture is shown since no changes were found at other times. MitoFluor 589 stained mitochondria are shown in the first column (red color). The second column shows p53 staining (green color) and the third column indicates when both are present (yellow color). The RINm5F cells showed p53 protein and mitochondria located together at 24 h and increasing in number after 48 h of hyperglycemia

281 were cultured with 11 or 30 mM glucose and analyzed at 16,
 282 24, and 48 h. Confocal microscopy analysis showed a clear
 283 mitochondrial location of p53 after hyperglycemia exposure
 284 for 24 h compared to control cells (11 mM glucose), with an
 285 evident increase at 48 h.

286 Effect of hyperglycemia on ROS production

287 RINm5F cells cultured under hyperglycemic conditions
 288 showed a 2.5-fold increase in ROS versus controls as mea-
 289 sured by DCF fluorescence (Fig. 4A). In order to determine
 290 the origin of these free radicals, the cells were treated with two
 291 mitochondrial inhibitors (Rotenone and CCCP), and with the
 292 NADPH oxidase inhibitor (apocinin), before adding the ROS
 293 fluorescent probe. The results showed that these inhibitors de-
 294 crease the ROS production, even in the control group with
 295 a 40% average inhibition (data not showed), while in the
 296 treated groups a 66% inhibition was achieved. However, no
 297 inhibition differences were found among the three inhibitors
 298 (49, 44 and 40% in control cells and 62, 66 and 66% in
 299 hyperglycemia cells treated with rotenone, CCCP and apocin-
 300 in, respectively) (Fig. 4B). No additional effect was found

when the cells were treated with the combination of inhibitors
 (Rotenone + CCCP 59%, CCCP + apocinin 62%, rotenone
 + apocinin 61%), except for rotenone + CCCP + apocinin
 (73%) (Fig. 4C).

Effect of hyperglycemia on the $\Delta\psi_m$ of RINm5F cells

To assess whether hyperglycemia-induced apoptosis involves
 changes in mitochondrial membrane potential, the RINm5F
 cells were cultured at high glucose concentrations and $\Delta\psi_m$
 was measured by JC-1 fluorescence (Fig. 5). In live cells, JC-
 1 forms aggregates and emits fluorescence at 590 nm (red),
 while dead cells with collapsed $\Delta\psi_m$, JC-1 emit fluorescence
 at 530 nm (green). Green fluorescence was greater in cells
 cultured with 30 mM glucose (Fig. 5B) compared to control
 cells (11 mM glucose) (Fig. 5A).

Discussion

The decrease in pancreatic β cells during chronic states of
 hyperglycemia occurs through apoptotic mechanisms [13].

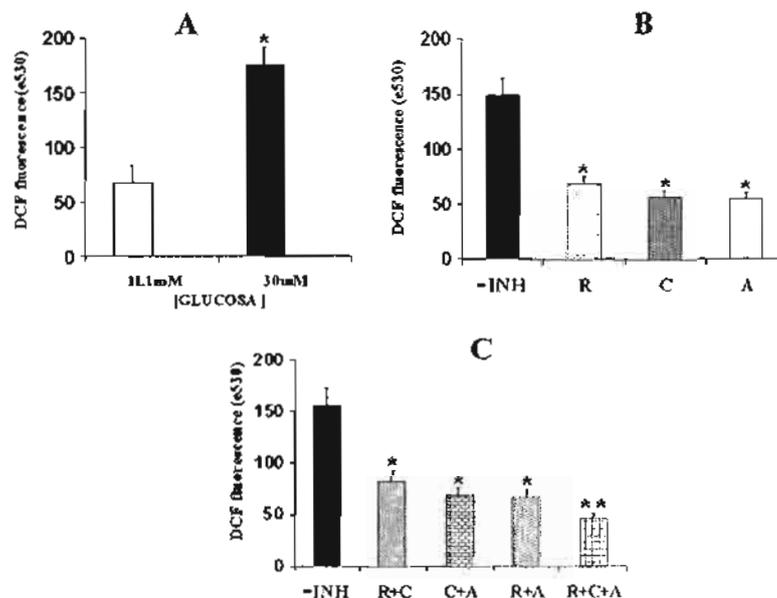


Fig. 4 Effects of glucose on intracellular ROS production in RINm5F cells. (A) The cells were incubated in RPMI containing 11 or 30 mM glucose for 48 h followed by staining with DCFH₂-DA, and the fluorescence was measured at 530 nm. Data are expressed as 530 nm fluorescence units. Results are mean \pm S.E.M. in five separate experiments. * indicates $p < 0.001$ when comparing 11 vs. 30 mM glucose using one-way ANOVA with the Bonferroni test. (B) RINm5F cells were incubated in RPMI containing 30 mM glucose for 48 h in the absence or presence of rotenone (R), CCCP (C), apocinin (A) (C) or with a combination of these inhibitors. Data are expressed as 530 nm fluorescence units of DCF. Results are a mean \pm S.E.M. in five separate experiments. * indicate $p < 0.001$ when comparing vs. with inhibitor and without inhibitor (-INH) and ** indicate $p < 0.001$ when comparing vs. between groups using one-way ANOVA with the Bonferroni test.

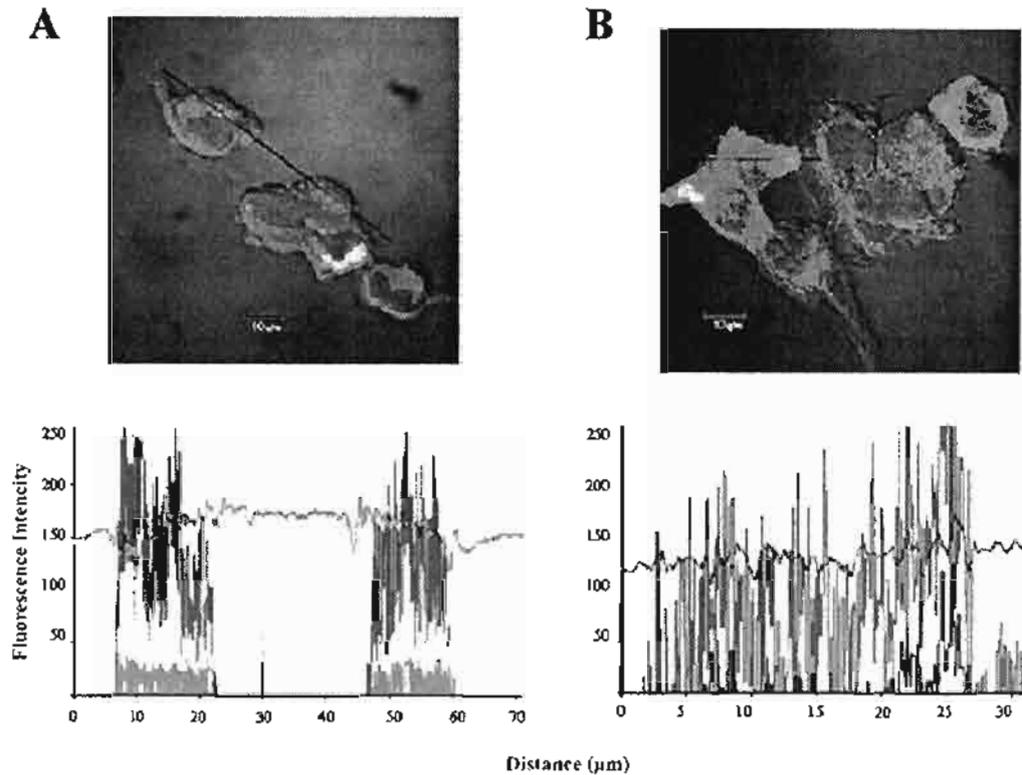


Fig. 5. Effect of hyperglycemia on $\Delta\psi_m$ in RINm5F cells. The cells were exposed for 48 h to (A) 11 or (B) 30 mM glucose, and the effect upon $\Delta\psi_m$ was determined by staining with 10 μ M JC-1 and confocal microscopy scan. In living cells, JC-1 forms more J-aggregates (red color) with increasing mitochondrial membrane potential, and in dead cells with collapsed $\Delta\psi_m$, JC-1 emits green fluorescence. The magnification is 100 \times . Figure is representative of five independent experiments.

317 However, the exact mechanism by which hyperglycemia induces β cell death is currently unknown. Recent studies on this topic have focused on mitochondrial metabolism as the main source for ROS and its role in apoptosis [30].

321 In our study, we found that RINm5F cells cultured in a high glucose medium (30 mM) for 16 h, had no biochemical nor morphological changes consistent with apoptosis. The externalization of phosphatidylserine and DNA oligonucleosomal fragmentation, characteristic events of apoptotic cell death, were seen at 48 h of hyperglycemia.

327 During the process of apoptosis, the mitochondria play a central role in the execution phase storing cell death-activators and effectors, which are released when membrane permeability changes, such as cytochrome c. During this process there is a translocation of signaling proteins and effector molecules between the nucleus, cytoplasm, and mitochondria. The mobilization of proapoptotic proteins towards the mitochondria promotes the dysfunction of this organelle [31]. It was surprising to see that during the apoptosis of RINm5F

336 cells cultured under hyperglycemic conditions for 24 and 48 h, the p53 protein moved towards the mitochondria. Endogenous p53 present in the mitochondria was identified by *in situ* immunofluorescence of whole cells after 24 and 48 h of hyperglycemia. Confocal analysis showed that a significant amount of p53 is found in the mitochondria at 24 h, with an important increase at 48 h. The mobilization of p53 to the mitochondria at 24 h of hyperglycemia in the RINm5F cells was an early event related to phosphatidyl serine translocation a well accepted early event of the apoptotic process. In addition, the p53 translocation at 48 h coincided with the decrease in $\Delta\psi_m$, cytochrome c release and nuclear DNA fragmentation.

349 Our results suggest that mitochondrial p53 is part of a death signaling pathway in RINm5F cells under hyperglycemic conditions. Previous studies conducted by Mihara *et al.* [7], in tumor cells have shown that the release of cytochrome c is a result of the p53 translocation towards the external mitochondrial membrane. They used rat liver isolated

355 mitochondria incubated in the presence of mouse p53, and
 356 found that 90% of cytochrome c was released within the first
 357 30 min. On the other hand, the collapse of $\Delta\Psi_m$ is a key el-
 358 ement for the release of proapoptotic mitochondrial factors
 359 [30]. Our results show that hyperglycemia induces apoptosis
 360 of pancreatic β cells, possibly through the mobilization of
 361 the p53 protein to the mitochondrial membrane and $\Delta\Psi_m$
 362 decrease.

363 The exact nature of the changes induced by p53 at the mito-
 364 chondrial level is unknown, although two possibilities have
 365 been hypothesized. One possibility is that the p53 protein
 366 produces aggregates with members of Bcl-2 family [7, 32].
 367 On the other hand, the apoptosis process in response to p53
 368 depends on an increase in ROS production which alters mi-
 369 tochondrial permeability and allows the release of apoptotic
 370 factors. It has been previously shown that oxidative stress
 371 induces p53 expression [33] and that this protein stimu-
 372 lates ROS production [34] through the activation of genes
 373 associated with the metabolism of these radicals [5, 35]. Un-
 374 der these circumstances, p53 induces cell aging and the apop-
 375 totic response is seen when there is an overproduction of ROS
 376 from an additional stimulus, which in the case of pancreatic
 377 β cells could be a chronic state of hyperglycemia. The bio-
 378 chemical mechanism behind glycototoxicity involves a state of
 379 chronic oxidative stress. Pancreatic β cells are particularly
 380 sensitive to its effects [15, 36]. It has been previously shown
 381 that in several cell lines, hyperglycemia increases the produc-
 382 tion of ROS, even within short periods such as 15 min [17,
 383 18, 37]. Our results show that the incubation of RINm5F cells
 384 under hyperglycemic conditions (30 mM glucose) for a 48 h
 385 period produces an important increase in ROS production, as
 386 much as 2.5 fold compared to controls. The inhibition of ROS
 387 production in the presence of rotenone and CCCP revealed
 388 that the oxidative stress generated by hyperglycemia is due, at
 389 least partly, to an increase in the production of the superoxide
 390 anion through the mitochondrial electron-transport chain [26,
 391 38]. It is also known that apocinin decreases about 89% su-
 392 peroxide anion production in endothelial cell cultures under
 393 hyperglycemic conditions [27]. In our study, we also found
 394 that apocinin decreases ROS production, although this effect
 395 was not statistically different from mitochondrial inhibitors.
 396 A similar effect was seen when ROS was quantified in the
 397 presence of a combination of inhibitors. This suggests that
 398 the activation of the NADPH oxidase system significantly
 399 contributes along with the mitochondria to oxidative stress in
 400 RINm5F cells cultured with 30 mM glucose. These results are
 401 consistent with those published by Oliviera *et al.* [39]. They
 402 showed the presence of NADPH oxidase system in rat pan-
 403 creatic β and HIT-T15 cells, and described its role in H_2O_2
 404 production. The role of NADPH oxidase in the pancreatic
 405 β cells is still undefined, although given the importance of
 406 the free radicals in several signaling pathways under physi-
 407 ological conditions, such as the mobilization of Ca^{2+} , some

authors have suggested it is involved in the insulin secretion
 mechanism [39].

Conclusion

Our results suggest, that the mobilization of p53 from the cy-
 toplasm to the mitochondria and the changes in mitochondrial
 membrane potential are involved in the apoptosis induction
 mechanism of the β cell during oxidative stress produced by
 hyperglycemia.

Acknowledgement

We thank to Universidad Autónoma Metropolitana (post-
 graduate section) and Consejo Nacional de Ciencia y Tec-
 nología (scholarship); Dr. José Moreno Rodríguez and Dr.
 Jorge Antonio Sosa Melgarejo for their technical assistance
 and for the facilities to use the flow cytometer and confocal
 microscope, respectively. This work was partially supported
 by FP-2003/328 Fondo para el Fomento de la Investigación,
 IMSS. We also thank to Janeth Rosales González; Gabriela
 Galicia Rojas and Alejandra Contreras for their technical
 assistance.

References

1. Burns TF, EL-Deiry WS. The p53 pathway and apoptosis. *J Cell Physiol* 181: 231–239, 1999. 428
2. Brady HJ, Gil-Gómez G. The pro-apoptotic BCL2 family member, Bax. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 647–650, 1998. 430
3. Sansome C, Zaika A, Marchenko ND, Moll UM. Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett* 488: 110–115, 2001. 432
4. Marchenko DN, Zaika A, Moll MU. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275: 16202–16212, 2000. 433
5. Macip S, Igarashi M, Berggren P, Yu J, Lee WS, Aaronson AS. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol* 23: 8576–8585, 2003. 434
6. Schuler M, Bossy-Wetzler E, Goldstein CJ, Fitzgerald P, Green DR. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem* 275: 7337–7342, 2000. 435
7. Mihara M, Erster S, Zaika A, Oleski P, Chittenden T, Pancoska P, Moll MU. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11: 577–590, 2003. 436
8. Donahue JR, Razmara M, Hoek BJ, Knudsen BT. Direct influence of the p53 tumor suppressor on mitochondrial biogenesis and function. *FASEB J* 15: 635–644, 2001. 437
9. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *EMBO J* 18: 6027–6036, 1999. 438
10. Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Segawa K, Ikeda Y, Kizaki M. Induction of apoptosis in Leukemia 439

- 456 cells by homovanillic acid derivate, capsaicin, through oxidative stress
457 implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive
458 oxygen species. *Cancer Res* 64: 1071–1078, 2004
- 459 11 Bonini P, Ciccom S, Cardinale A, Vitale C, Semino AL, Ciotti MT,
460 Marlier NJ-LL. Oxidative stress induced p53-mediated apoptosis in glia.
461 p53 transcription-independent way to die. *J. Neurosci Res* 75: 83–95,
462 2004
- 463 12 Donath YM, Gross JD, Cerasi KN. Hyperglycemia-induced β -cell apopto-
464 sis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of
465 diabetes. *Diabetes* 48: 738–744, 1999
- 466 13 Mandrup-Poulsen T: β -cell apoptosis. *Diabetes* 50 (suppl 1): S58–
467 S63, 2001
- 468 14 Evans JL, Goldfine DI, Maddux AB, Grodsky MG: Oxidative stress
469 and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type
470 2 diabetes. *Endocrine Rev* 23: 599–622, 2002
- 471 15 Marshak S, Leibowitz G, Bertzi F, Kaiser N, Gross JD, Cerasi E,
472 Melloul D: Impaired β -cell functions induced by chronic exposure of
473 cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes* 48: 1230–
474 1236, 1999
- 475 16 Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara
476 Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M: Beneficial effects
477 of antioxidants in diabetes. Possible protection of pancreatic B-cells
478 against glucose toxicity. *Diabetes* 48: 2398–2406, 1999
- 479 17 Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic com-
480 plications. *Nature* 414: 813–819, 2001
- 481 18 Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Shirota T, Brownlee
482 M, Araki E: Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion
483 by pancreatic β cells. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 216–222,
484 2003
- 485 19 Crankvist K, Marklund SL, Tajedal IB. Cu/Zn-superoxide dismutase,
486 Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pan-
487 creatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J* 199: 393–398,
488 1981
- 489 20 Navarro P, Valverde MA, Benito M, Lorenzo M: Insuline/IGF-1 rescues
490 immortalized brown adipocytes from apoptosis down regulating Bclxl
491 expression, in a PI 3-kinase- and Map kinase-dependent manner. *Exp*
492 *Cell Res* 243: 213–221, 1998
- 493 21 Vrablic SA, Albrighi DC, Craciunescu NC, Salganik IR, Zeisel HS.
494 Altered mitochondrial function and overgeneration of reactive oxygen
495 species precede the induction of apoptosis by 1-O-octadecyl-2-methyl-
496 rae-glycero-3-phosphocholine in p53-defective hepatocytes. *FASEB J*
497 15: 1739–1744, 2001
- 498 22 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of
499 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye
500 binding. *Anal Biochem* 72: 248–254, 1976
- 501 23 Bergmeyer HU. *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New
502 York, 1963, pp 384–388
- 503 24 Fioraliso I, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safin B, Nadal-Ginard B,
504 Anversa P, Kajstura J. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated
genes leading to myocyte cell death. *Diabetes* 50: 2363–2375, 2001
25. Kinningham KK, Oberley TD, Lin SM, Mattingly CA, Clair 505
STKD: Overexpression of manganese superoxide dismutase protects 506
against mitochondrial-initiated poly(ADP-ribose)polymerase-mediated 507
cell death. *FASEB J* 13: 1601–1610, 1999 508
26. Yamagishi SI, Edelstein D, Du LX, Brownlee M. Hyperglycemia 509
potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial su- 510
peroxide overproduction. *Diabetes* 50: 1491–1494, 2001 511
27. Meyer WJ, Schmitt EM: A central role of the endothelial NADPH ox- 512
idase in atherosclerosis. *FEBS Lett* 472: 1–4, 2000 513
28. Mathur A, Hong Y, Kemp BK, Barrientos AA, Erusalimsky JD: Evaluation 514
of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane 515
potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovas Res* 46: 126–138, 516
2000 517
29. Shiratsuchi A, Osada S, Kanazawa S, Nakanishi Y. Essential role of 518
phosphatidylserine externalization in apoptosing cell phagocytosis by 519
macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 549–555, 1998 520
30. Gottlieb AR: Mitochondria: execution central. *FEBS Lett* 482: 6–12, 521
2000 522
31. Moll MU, Zaika A: Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of 523
p53. *FEBS Lett* 493: 65–69, 2001 524
32. Chhpk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin MN, Newmeyer DD, 525
Schuler M, Green RD: Direct activation of Bax by p53 mediates mi- 526
tochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303: 527
1010–1014, 2004 528
33. Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, Ames 529
BN: Molecular analysis of H₂O₂ induced senescent like growth arrest 530
in normal human fibroblast: p53 and Rb control G1 arrest but not cell 531
replication. *Biochem J* 332: 43–50, 1998 532
34. Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, 533
Sengupta S, Mehane L, Okamura S, Hofseth IJ, Moake M, Nagashima 534
M, Forrester KS, Harris CC. p53-induced up-regulation of MnSOD and 535
GPx but not Catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer* 536
Res 64: 2350–2356, 2004 537
35. Polyak K, Xia Y, Zweier LJ, Kinzler WK, Vogelstein B. A model for 538
p53-induced apoptosis. *Nature* 389: 300–305, 1997 539
36. Robertson PR, Harmon J, Tran OP, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose tox- 540
icity in β -cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and glutathione 541
connection. *Diabetes* 52: 581–587, 2003 542
37. Nishikawa T, Edelstein D, Du X-L, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda 543
Y, Yorek MA, Beebe D, Oates JP, Hemmes HP, Giardino I, Brown- 544
lee M: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three 545
pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787–790, 2000 546
38. Du X-L, Edelstein D, Rossetti L, Pantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu 547
J, Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide over- 548
production activates the hexosamine pathway and induces plasminogen 549
activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc* 550
Natl Acad Sci USA 97: 12222–12226, 2000 551
39. Oliveira HR, Verlenga R, Carvalho ROC, Brito GRL, Carpinelli RA: 552
Pancreatic β -cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. *Diabetes* 553
52: 1457–1463, 2003 554

12. PREMIOS Y DISTINCIONES.

Como Proyecto:

PREMIOS BIENALES FUNSALUD 2003. Antonio López de Silanes Senior en promoción de proyectos de investigación en diabetes. Estímulo a investigadores jóvenes. con el proyecto: *ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA MITOCONDRIA Y LA PROTEÍNA P53 EN LA MUERTE DE LAS CÉLULAS DE INSULINOMA INDUCIDA POR CONCENTRACIONES ELEVADAS DE GLUCOSA.*

Como trabajo terminado:

SEGUNDO LUGAR en el área de investigación **BÁSICA.** Con el trabajo: *“PARTICIPACIÓN DE LA MITOCONDRIA Y LA PROTEÍNA P53 EN LA MUERTE DE LAS CÉLULAS DE INSULINOMA INDUCIDA POR CONCENTRACIONES ELEVADAS DE GLUCOSA”* en el **“XVI Premio Nacional de Investigación de la Fundación GlaxoSmithKline”.** Septiembre del 2005.