



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



INTERFERENCIA DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO  
SOBRE EL CONTROL COLINÉRGICO EN LA FUNCIÓN DE  
LAS CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS

**MARCO ANTONIO VALENCIA SOTO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Animales.

**PROFESOR GUÍA: DAVID MEARS**

SANTIAGO – CHILE  
2008



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**INTERFERENCIA DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO  
SOBRE EL CONTROL COLINÉRGICO EN LA FUNCIÓN DE  
LAS CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS**

**MARCO ANTONIO VALENCIA SOTO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Animales.

NOTA FINAL: .....**7,0**.....

NOTA

PROFESOR GUÍA : DAVID MEARS .....7,0.....

PROFESOR CONSEJERO : GUSTAVO FARIAS .....7,0.....

PROFESOR CONSEJERO : MARCO GALLEGUILLOS .....7,0.....

**SANTIAGO – CHILE  
2008**

## **ÍNDICE.**

<b>RESUMEN.</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>5</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.</b>	<b>7</b>
1. Diabetes Mellitus	7
2. Páncreas y las células beta pancreáticas	9
3. Secreción de Insulina: inducida por glucosa y vía Colinérgica	10
4. Estrés oxidativo	13
5. Sistema de Defensas Antioxidantes	15
5.1. Enzimas Antioxidantes	16
5.1.1. Superóxido Dismutasa (SOD)	16
5.1.2. Catalasa (CAT)	17
5.1.3. Glutación Peroxidasa (GSH-P <sub>x</sub> )	17
5.2. Moléculas o Sustancias Antioxidantes	18
6. Célula beta pancreática y especies reactivas de oxígeno (ROS)	19
<b>OBJETIVOS.</b>	<b>21</b>
1. Objetivo general	21
2. Objetivos específicos	21
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>22</b>
1. Lugar y período del estudio	22
2. Animales y Eutanasia	22
3. Aislamiento de islotes de Langerhans	22
4. Obtención de células β pancreáticas	24
5. Registro de los niveles de calcio intracelular	26
6. Secreción de insulina en islotes de Langerhans expuestos a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	27
7. Medición de la secreción de insulina	29
8. Análisis Estadístico	30

<b>RESULTADOS.</b>	<b>31</b>
1. Efectos del peróxido de hidrógeno en la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes de Langerhans	31
2. Efectos del peróxido de hidrógeno en la secreción de insulina estimulada por la vía colinérgica en islotes de Langerhans	34
3. Efectos del peróxido de hidrógeno sobre el calcio intracelular en las células beta pancreáticas	39
<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>43</b>
1. Efectos del peróxido de hidrógeno tanto en la secreción de insulina estimulada por glucosa y en los niveles de calcio intracelular	43
2. Efectos del peróxido de hidrógeno sobre la secreción de insulina y los niveles de calcio intracelular estimulados a través de la vía colinérgica	47
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>50</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>51</b>

## **AGRADECIMIENTOS.**

Realicé mi memoria de título en el laboratorio de Neuroendocrinología y Cirugía experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, donde fui acogido por un excelente grupo humano.

Deseo agradecer al doctor David Mears por acogerme en su laboratorio, por su disposición para ayudarme con los experimentos y en la redacción de esta memoria de título. También quiero agradecer a Illani Atwater por su colaboración con el enfoque en diversos resultados y sus posibles explicaciones. Un especial agradecimiento a Paola Llanos, por su excelente disposición, quien me guió desde principio a fin en esta memoria de título. También quisiera dar las gracias a Juan Carlos padre e hijo, por su amabilidad y camaradería. Y deseo agradecer a todos mis compañeros de laboratorio, por los buenos momentos pasados.

Finalmente deseo agradecer a mi familia por su apoyo y confianza en todo momento; mi madre, mi hermana Yovaninna por representar un pilar en la casa, y mi sobrino Daniel.

*Dedico esta memoria de título a mi madre Hilda Soto, por estar siempre presente, por los valores enseñados, y haberme ayudado a alcanzar uno de mis sueños más importantes en la vida, sinceramente muchas gracias madre.*

## RESUMEN.

La Diabetes Mellitus es una de las enfermedades crónicas no transmisibles más frecuentes del ser humano de cualquier edad. Se considera un problema de salud pública por su elevada morbilidad y mortalidad. La Diabetes Mellitus tipo 2 es la forma de presentación más común, representando un 85-90% de los casos totales, que se caracteriza por una resistencia insulínica en conjunto con una secreción insuficiente de insulina desde las células  $\beta$  pancreáticas. Se ha descrito que el estrés oxidativo en células  $\beta$  pancreáticas, dado por un aumento en especies reactivas de oxígeno (ROS), provoca alteraciones en estas células, con una disminución en la secreción de insulina, lo que contribuiría a la pérdida del control glicémico.

En este trabajo se evaluó el efecto del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), un compuesto químico que puede producir estrés oxidativo, sobre la secreción de insulina y el control de calcio intracelular en células  $\beta$  pancreáticas de rata, evaluando las respuestas a la glucosa y un agonista colinérgico. El  $H_2O_2$  presentó un efecto dual sobre la secreción de insulina: en condiciones basales de glucosa produjo un aumento en la secreción de insulina, mientras que disminuyó la secreción de insulina inducida por niveles estimuladores de glucosa (GSIS). Las mediciones de calcio indicaron que el aumento en la secreción basal de insulina se debe a un incremento de la concentración de calcio intracelular inducido por el  $H_2O_2$ . Se encontró que la aplicación del antioxidante N-acetil cisteína (NAC) protegió a las células beta pancreáticas contra los cambios en la función secretora en la presencia de  $H_2O_2$ . Sin embargo, NAC en si causó una pérdida parcial de la GSIS. Por otra parte, se

observó que el  $H_2O_2$  no aumentó la secreción basal de insulina cuando el agonista colinérgico, carbacol, estaba presente. Las mediciones de calcio realizadas en células  $\beta$  pancreáticas sugieren que frente a altas concentraciones de  $H_2O_2$  (100  $\mu M$ ), el estímulo con carbacol podría inducir una disminución de la concentración de calcio intracelular. En presencia de glucosa estimuladora, el  $H_2O_2$  inhibió la secreción de insulina inducida por carbacol a partir de los 25  $\mu M$  de  $H_2O_2$ , efecto que se correlacionó con una disminución tanto en la descarga del calcio almacenado como en el porcentaje de células que responden al estímulo colinérgico. Estos efectos podrían ser prevenidos con la aplicación del antioxidante NAC.

En conjunto, los datos demuestran que las especies reactivas del oxígeno presentan un rol importante y complejo en la función de las células  $\beta$  pancreáticas. Por una parte, la capacidad de NAC para interferir con la GSIS sugiere que las ROS son necesarias para responder adecuadamente a la glucosa. Por otro lado, un exceso de ROS produce un daño similar a la glucotoxicidad y una inhibición de la respuesta colinérgica, lo que podría afectar en forma negativa la respuesta secretora a nutrientes y señales neurohormonales, contribuyendo a la falla del control glicémico asociada con la Diabetes mellitus tipo 2.

Se sugiere la realización de nuevos experimentos conducentes a dilucidar los componentes de la vía colinérgica que se inhiben en presencia de altas concentraciones de  $H_2O_2$ .



## SUMMARY.

Diabetes Mellitus is one of the most frequent non-transmittable, chronic diseases of all time. It is considered a public health problem because of its high morbidity and mortality. Type 2 Diabetes Mellitus is the most common form of presentation, representing 85-90% of all cases, that it is characterized by insulin resistance together with insufficient insulin secretion by the pancreatic beta cells. It has been described that oxidative stress in pancreatic beta cells, due to an accumulation of reactive oxygen species (ROS), produces changes in these cells, with a decrease in insulin secretion that contributes to the loss of glycemic control.

This work evaluated the effect of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), a chemical compound that can produce oxidative stress, on insulin secretion and control of intracellular calcium in rat pancreatic beta cells, evaluating the responses to glucose and a cholinergic agonist.  $H_2O_2$  had a dual effect on insulin secretion: the agent augmented basal secretion, while it diminished glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). Calcium measurements indicated that the increase in basal secretion was due to an elevation of the intracellular calcium concentration in the presence of  $H_2O_2$ . Application of the antioxidant N-acetyl cysteine (NAC) protected the beta cells against the changes in secretory function produced by  $H_2O_2$ . However, NAC itself partially inhibited GSIS.

$H_2O_2$  did not augment basal secretion when the cholinergic agonist carbachol was present. Calcium measurements on pancreatic beta cells suggested that in the presence of high concentrations of  $H_2O_2$  (100  $\mu M$ ), stimulation by carbachol

could induce a decrease in the intracellular calcium concentration. In the presence of stimulatory glucose, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibited carbachol-induced insulin secretion starting at 25 μM, an effect that correlated with a reduction in both the discharge of stored calcium and the percentage of cells responding to cholinergic stimulation. These effects could be prevented by the application of the antioxidant NAC.

Together, the data demonstrate that reactive oxygen species play an important and complex role in pancreatic beta cell function. On one hand, the ability of NAC to interfere with GSIS suggests that ROS are necessary to respond adequately to glucose. On the other hand, an excess of ROS produces damage that resembles glucose toxicity and also inhibits the cholinergic response, which could negatively affect the secretory response to nutrients and neuro-hormonal signals, thereby contributing to the loss of glycemic control associated with type 2 diabetes mellitus.

The results motivate new experiments aimed at elucidating which components of the cholinergic pathway are inhibited by elevated levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## INTRODUCCIÓN.

La Diabetes Mellitus tipo 2 es una enfermedad que constituye hoy en día una verdadera epidemia en el mundo. Esta se caracteriza por una hiperglicemia y un desequilibrio del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. Se asocia a una deficiencia de las células  $\beta$  pancreáticas en la producción de insulina junto con una resistencia insulínica periférica. El principal regulador en inducir la estimulación de insulina es la glucosa. También se han descrito otras vías, como la vía parasimpática dado por el nervio vago. Esta vía es considerada de tipo colinérgica, debido a que actúa a través de acetilcolina activando a los receptores muscarínicos ubicados en la membrana plasmática de la célula  $\beta$  pancreática. Esto provoca la liberación de calcio desde depósitos intracelulares sensibles a  $IP_3$ , gatillando la exocitosis de gránulos secretores de insulina.

Se ha sugerido que el estrés oxidativo participa en el desarrollo y progresión de la diabetes y sus complicaciones, siendo la oxidación de la glucosa el principal promotor de radicales libres.

En cultivos neuronales se ha descrito que la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS en inglés por *Reactive Oxygen Species*), provoca daños en la transducción de señales colinérgicas a través de la inserción de péptidos  $\beta$  amiloides en la membrana plasmática. Por consiguiente, se investigará si la acumulación de ROS en células  $\beta$  pancreáticas podría provocar similares respuestas, afectando la secreción de insulina a través de la inhibición de la vía colinérgica en las células  $\beta$  pancreáticas.

En este presente estudio se pretende evaluar el efecto de las ROS sobre la secreción de insulina inducida por los estímulos de glucosa y carbacol a través de la vía colinérgica. Además del rol que juega el calcio intracelular en el proceso.

Los datos aportados en esta memoria de título, ayudarán a entender los mecanismos por el cual las especies reactivas de oxígeno afectarían el funcionamiento de las células  $\beta$  pancreáticas, alterando la secreción de insulina en Diabetes Mellitus tipo 2.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### 1. **Diabetes Mellitus.**

La Diabetes Mellitus es la enfermedad metabólica más importante y frecuente en personas, su trascendencia se debe a su variada morbilidad y a sus numerosas y serias repercusiones sistémicas, las que se han hecho cada vez más evidentes a medida que ha ido aumentando el promedio de vida de la población. Comprende una serie de desordenes clínicos y genéticamente heterogéneos asociados por perturbaciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, siendo el signo más común la hiperglicemia (García de los Ríos, 2003).

Es una enfermedad que afecta aproximadamente a 200 millones de personas en el mundo (Ricordi y Strom, 2004) lo que equivale a más del 5% de la población adulta (Kendall *et al.*, 2001), y afectando en promedio a 9 millones de individuos en América del Sur (Barceló *et al.*, 2003).

La Diabetes Mellitus es una enfermedad crónica que desarrolla a lo largo de su evolución una serie de complicaciones, tales como: retinopatías, neuropatías y nefropatías entre otras. Representa un número muy importante de consultas médicas, hospitalizaciones, pensiones de invalidez y muerte. Todo esto significa un alto costo social y económico para todos los países. En Estados Unidos las estimaciones del costo total se han incrementado de \$2,6 mil millones en 1996 a \$133 mil millones en 2002 (American Diabetes Association, 2003) y en Chile estos costos fueron de \$ 1000 millones en 1998 (White *et al.*, 2004).

La última clasificación de la Diabetes Mellitus fue propuesta en 1997 por un comité de expertos de la *American Diabetes Association* (ADA) y aceptada dos años más tarde por la Organización Mundial de la Salud (OMS), comprendiendo cuatro tipos (Cuadro 1), siendo la Diabetes Mellitus tipo 2 la más común en presentaciones de casos.

<p><b>I. Diabetes Mellitus Tipo 1</b></p> <p>A. Inmunomediada. B. Idiopática.</p> <p><b>II. Diabetes Mellitus Tipo 2</b></p> <p><b>III. Otro tipos específicos:</b></p> <p>A. Defectos genéticos en la función de la célula <math>\beta</math>. B. Defectos genéticos de la acción de la insulina. C. Enfermedades del páncreas exocrino. D. Endocrinopatías. E. Inducida por tóxicos o agentes químicos. F. Infecciones. G. Formas no comunes de diabetes inmunomediada. H. Otros síndromes genéticos asociados ocasionalmente con diabetes.</p> <p><b>IV. Diabetes Mellitus Gestacional</b></p>
---

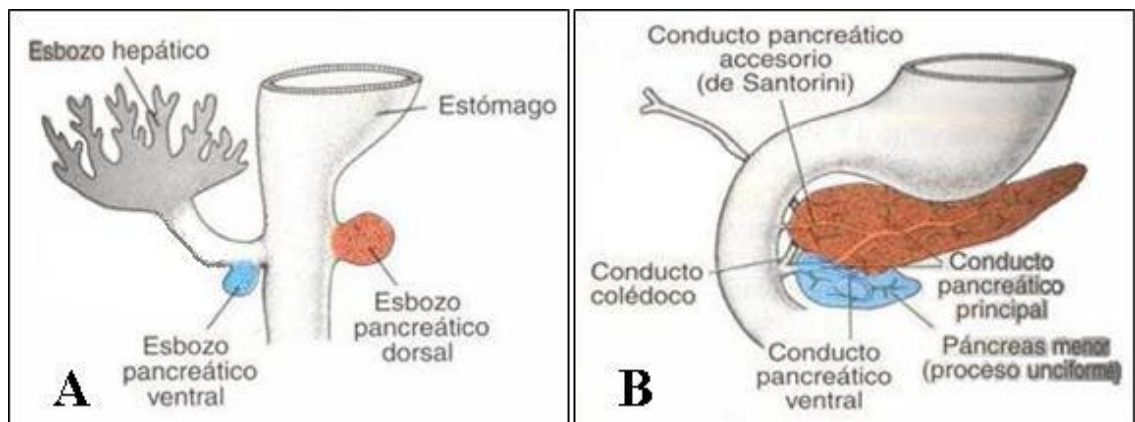
**Cuadro 1. Clasificación de la Diabetes Mellitus.** (Modificado de García de los Ríos, 2003).

La Diabetes Mellitus tipo 2 es la forma más frecuente de diabetes, afecta a un 85-90% de personas con diabetes a nivel mundial. Se define como un trastorno metabólico de etiología múltiple, altamente relacionado con la obesidad,

sedentarismo y edad, caracterizado por una hiperglicemia crónica, en la cual existe una insulino-resistencia, con un aumento de la mortalidad de las células  $\beta$  pancreáticas y cambios en su capacidad secretora provocando un déficit en la secreción de insulina (García de los Ríos, 2003).

## 2. Páncreas y las células beta pancreáticas.

La formación embriológica del páncreas (Figura 1) es a partir de dos esbozos pancreáticos (el dorsal y el ventral) que se originan del revestimiento endodérmico del duodeno. Al rotar el duodeno a la derecha en C el esbozo pancreático ventral queda debajo del esbozo pancreático dorsal. Los islotes de Langerhans se formarían posteriormente a partir del tejido pancreático parenquimatoso (Sadler, 2001).



**Figura 1. Formación embriológica del páncreas.** A; formaciones del páncreas a partir de 2 esbozos. B; Unión de ambos esbozos pancreáticos a partir de la rotación del duodeno. (Modificado de Sadler, 2001).

El páncreas está formado por dos tipos principales de tejidos, que presentan funciones distintas. Una porción acinar que tiene una función exocrina, cuyas enzimas participan en procesos de digestión y una porción endocrina que está formada por pequeños acúmulos celulares denominados islotes de Langerhans. Estos presentan un volumen que corresponde al 1-2% del tejido pancreático y producen hormonas que son liberadas directamente a la sangre (Herrera, 1993).

Los islotes de Langerhans están constituidos por un mosaico celular, que presenta unas 2000 células en promedio (Rutter, 2001), compuesto por cuatro tipos celulares distintos: las células  $\alpha$  (productoras de glucagón), las células  $\beta$  (productoras de insulina), las células  $\delta$  (productoras de somatostatina), y las células PP (productoras de polipéptido pancreático). Las células  $\beta$  representan el 70% de la masa pancreática endocrina con una distribución central en el islote de Langerhans, teniendo un papel fundamental en la disminución de los niveles de glucosa sanguínea (Herrera, 1993).

### **3. Secreción de Insulina: inducida por glucosa y vía Colinérgica.**

La secreción de insulina está dada por las células  $\beta$  del páncreas y es gatillada principalmente por aumentos en los niveles de glucosa extracelular (Figura 2 A). Esta ingresa al interior de la célula  $\beta$  a través de transportadores GLUT-2 y es fosforilada por la glucoquinasa en glucosa-6-fosfato, oxidándose en la glicólisis por una serie de enzimas que se encuentran en el citoplasma hasta la formación de piruvato. Este último ingresa a la mitocondria donde es oxidado y

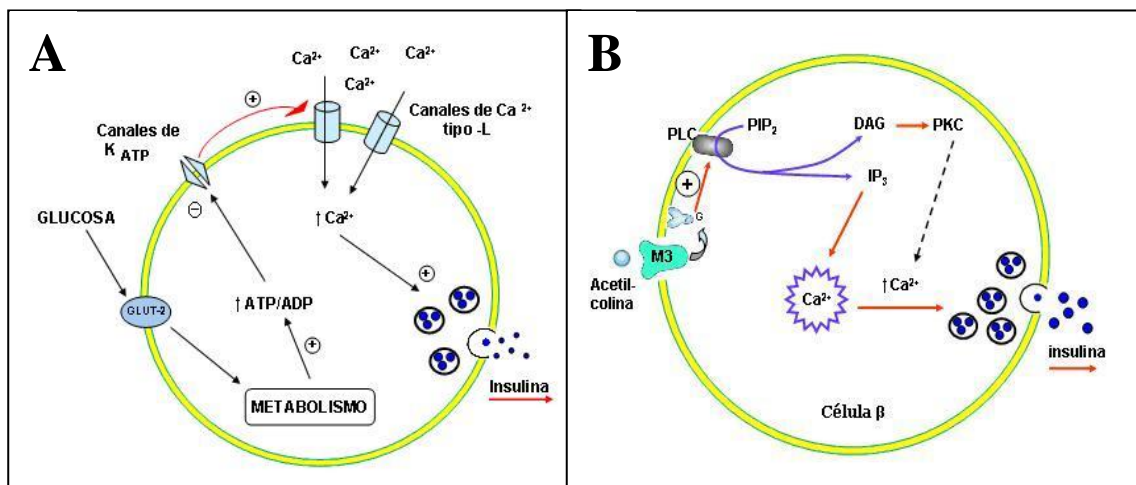


a través de una serie de reacciones enzimáticas producidas en el ciclo de Krebs, cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa llevan a la formación de ATP. Este proceso provoca un aumento en la razón de ATP/ADP, señal que gatilla el cierre de los canales de potasio ( $K_{ATP}$ ) provocando una despolarización de la membrana celular desde -70 mV a potenciales de membrana mayores de -50mV (Mears, 2004). La despolarización activa los canales de calcio dependiente de voltaje, los que a su vez se abren permitiendo la entrada de calcio a las células  $\beta$ , esto provoca aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular estimulando la exocitosis de gránulos secretorios contenedores de insulina (Atwater *et al.*, 1996; Rorsman *et al.*, 2000; Mears, 2004).

También hay otras vías de estímulo, como la vía del sistema nervioso parasimpático dado por el nervio vago en respuesta a la ingestión de comida (Powers, 2006). Estudios han demostrado que esta vía es importante para la secreción de insulina en la fase cefálica y absortiva, presentando un mal control de la glicemia cuando se inhibe la estimulación parasimpática, provocando una intolerancia a la glucosa (Gautam *et al.*, 2006). También se ha observado un aumento en la sensibilidad de las células  $\beta$  frente a la estimulación colinérgica en condiciones de resistencia insulínica (Ahrén y Pacini, 2005). Estos estudios motivan la investigación de los mecanismos por los cuales la acetilcolina estimula la secreción de insulina y sus posibles fallas en el proceso en la Diabetes Mellitus tipo 2.

Se sabe que la estimulación de la secreción de insulina a través del sistema parasimpático es principalmente colinérgica, a través del neurotransmisor

acetilcolina (Figura 2 B), que provoca un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como principal efecto en la secreción de insulina. La acetilcolina estimula a la célula  $\beta$  pancreática a través de receptores muscarínicos tipo 3 ( $\text{M}_3$ ), los cuales están acoplados a una proteína G (Ahrén, 2000). Esta estimulación lleva a una activación de la fosfolipasa  $\text{C}_\beta$ , provocando la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato ( $\text{PIP}_2$ ), formando diacilglicerol (DAG) y fosfatidilinositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). El DAG activa la proteína quinasa C (PKC), la cual cataliza la fosforilación de una serie de proteínas y aumenta la capacidad de calcio para liberar insulina. El  $\text{IP}_3$  actúa como segundo mensajero difundiendo hasta el retículo endoplasmático provocando la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular desde depósitos sensibles a  $\text{IP}_3$ , la cual es acompañada por una rápida estimulación de exocitosis y secreción de gránulos de insulina (Geneser, 2000). Es importante mencionar que la acetilcolina estimula la secreción de insulina sólo en presencia de glucosa estimuladora (Ahrén *et al.*, 1999).



**Figura 2. Mecanismos de secreción de insulina. A;** secreción de insulina inducida por glucosa. **B;** secreción de insulina vía colinérgica inducida por acetilcolina. (Modificado de Geneser, 2000).

#### **4. Estrés oxidativo.**

El estrés oxidativo se define como un desbalance entre la producción y degradación de las especies reactivas del oxígeno (ROS: anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) y del nitrógeno (RNS: NO y peroxinitrito) en comparación a los antioxidantes, favoreciendo un predominio de los radicales libres, estos son especies químicas que contienen uno o más electrones desapareados. Por lo cual, pueden ser especies de alta reactividad, que no tienen receptores específicos y que atacan o inestabilizan mediante acciones directas o indirectas, reversibles o irreversibles, sobre distintas biomoléculas (Gutteridge y Halliwell, 2000).

La importancia biológica de estas especies químicas estriba en que pueden alterar la estructura de las membranas celulares, producir daño en las proteínas intracelulares, oxidación de las lipoproteínas plasmáticas y aceleración del envejecimiento celular. Al tener electrones desapareados se traduce en un aumento de la reactividad de la sustancia, en relación a la especie no radicalaria que la genera (Rodrigo y Rivera, 2003).

Los radicales libres pueden formarse químicamente por la transferencia de un electrón, o bien por la ruptura homolítica de un enlace covalente de una molécula normal, lo que significa que cada fragmento de la molécula retiene uno de los electrones que formaban el par del enlace (Martinez, 2005).

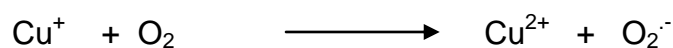
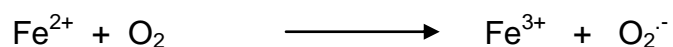
Durante el metabolismo aeróbico las células generan energía reduciendo al oxígeno molecular hasta la formación de agua. Esta reacción, que ocurre en la mitocondria catalizada por la citocromo c oxidasa, involucra la transferencia de cuatro electrones al oxígeno sin formación de intermediarios. Pero una pequeña

proporción del oxígeno (2-4%) puede aceptar un número menor de electrones, dando lugar a la formación de intermediarios de ROS. De esta manera, el oxígeno se puede reducir sucesivamente a anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) al incorporar un electrón, a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al aceptar 2 electrones y a radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) al aceptar 3 electrones, además, se encuentra el oxígeno singlete o singulete ( $^1O_2$ ), que puede generarse, por ejemplo, cuando los electrones han sido excitados por la luz. Cuando las ROS se encuentran en exceso, reaccionarán con diversas biomoléculas causando citotoxicidad y daño mutagénico (Gutteridge y Halliwell, 2000; Rodrigo y Rivera, 2003).

El ROS más común es el anión de superóxido, generado en células vivas por: xantina oxidasa, NADPH oxidasa, citocromo P450 microsomal y las enzimas mitocondriales de la cadena transportadora de electrones, entre otras.

El anión superóxido en sí no es una especie química particularmente nociva para las células, excepto cuando se encuentra protonado (radical perhidroxilo:  $HO_2^{\cdot}$ ), lo que sólo ocurre en la proporción del 1% a pH fisiológico. Sin embargo, el  $O_2^{\cdot-}$  puede ejercer acciones deletéreas derivadas de los productos que genera o consume en las reacciones químicas en que interviene (Rodrigo y Rivera, 2003).

Los iones metálicos de los elementos de transición, especialmente cuando se encuentran en el estado reducido, pueden sufrir una autoxidación a la vez que transforman a la molécula de oxígeno en anión superóxido:



El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) aunque no es un radical libre (pero se considera también una de las especies reactivas de oxígeno) puede generar un radical libre extremadamente reactivo, como es al radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) en presencia de iones metálicos como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$  ó  $\text{Mn}^{+2}$  a través de la reacción de Fenton.

Por otra parte, estos iones al estado reducido también pueden catalizar la reacción entre el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, conocida como la reacción de Haber-Weiss (Martinez, 2005).

## **5. Sistema de Defensas Antioxidantes.**

Los organismos disponen de sistemas de defensas antioxidantes que actúan para impedir o al menos atenuar los efectos deletéreos de los radicales libres sobre las biomoléculas. (Gutteridge y Halliwell, 2000). Se ha propuesto la siguiente definición para antioxidante: "aquella sustancia que se encuentra en pequeñas concentraciones comparada a un sustrato oxidable e inhibe o retarda significativamente la oxidación de dicho sustrato" (Halliwell y Gutteridge, 1995).

A partir de esta definición se considera que las defensas antioxidantes incluyen:

- a) Los agentes que remueven catalíticamente las especies reactivas.
- b) Las proteínas que minimizan la disponibilidad de prooxidantes como iones de fierro o cobre.
- c) Las proteínas que protegen biomoléculas por otros mecanismos.
- d) Agentes de bajo peso molecular que reducen las especies reactivas.

Posteriormente, este concepto fue aplicado a los antioxidantes aportados por la dieta, los que quedaron definidos como “sustancias presentes en los alimentos que disminuyen los efectos de las especies reactivas, tales como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno” (Rodrigo y Rivera, 2003).

Los sistemas de defensa antioxidante de los organismos animales incluidos el hombre se pueden clasificar en 2 categorías: enzimas y moléculas.

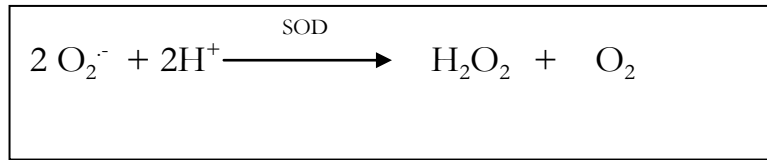
### **5.1. Enzimas Antioxidantes:**

Las enzimas antioxidantes (Superóxido Dismutasa, Catalasa, Glutati6n Peroxidasa), constituyen la primera línea o barrera de defensa contra los radicales libres y esta acción se lleva a cabo neutralizando a estas especies químicas a través de la conversi6n en otras de efecto menos dañino (Halliwell y Gutteridge, 1995).

#### **5.1.1. Superóxido Dismutasa (SOD).**

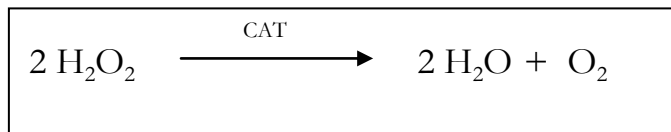
Esta enzima cataliza la dismutaci6n del anión superóxido (dismutaci6n es una reacci6n de destrucci6n de radicales libres en que a partir de éstos se forman especies no radicalarias). Así, reaccionan dos moléculas de anión superóxido

para formar peróxido de hidrógeno, el cual a su vez puede ser destruido por las actividades de catalasa o glutatión peroxidasa.



### 5.1.2. Catalasa (CAT).

La CAT es una enzima tetramérica de 60 kDa formada por cuatro subunidades idénticas. Es una de las enzimas conocidas más eficientes, tanto que no puede ser saturada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  a ninguna concentración, catalizando su conversión en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ .

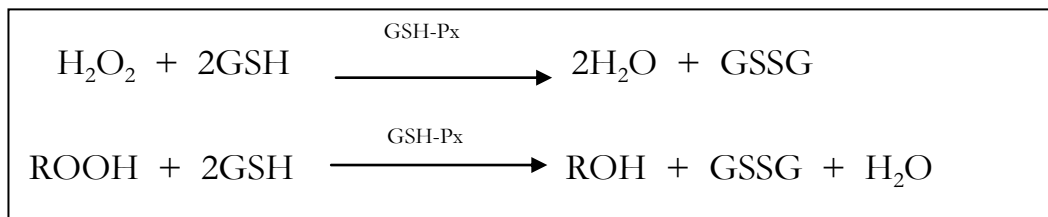


En animales, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se detoxifica mediante las actividades de la CAT y la GSH-Px. Aunque la CAT no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, como son por ejemplo las neuronas, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células (Cheeseman y Slater, 1993).

### 5.1.3. Glutatión Peroxidasa (GSH-Px).

Es una enzima formada por cuatro subunidades idénticas y cada una de ellas contiene un residuo de selenocisteína, que es esencial para su actividad enzimática. La GSH-Px comparte su sustrato con la CAT, pero además puede

reaccionar en forma efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) usando glutatión reducido y así contribuye a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo (Cheeseman y Slater, 1993).



## 5.2. Moléculas o Sustancias Antioxidantes.

La segunda barrera antioxidante es de tipo no enzimático, dada por compuestos antioxidantes que actúan a nivel celular y extracelular, que son responsables de la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos (plasma) y de la protección del daño oxidativo de las distintas partículas y macromoléculas circulantes. Las moléculas antioxidantes son vitaminas, minerales y otras sustancias de bajo peso molecular que inhiben la tasa de oxidación provocada por los radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 1995). Pueden aumentar su velocidad de ruptura, prevenir la participación de iones de metales de transición (quelación), inactivar y barrer ROS (*scavengers*) para proteger el organismo del deterioro celular, envejecimiento prematuro y cáncer (Cheeseman y Slater, 1993).

Las enzimas antioxidantes requieren metales como cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn) o selenio (Se) para su acción, éstos se conocen como metales antioxidantes. A diferencia de las enzimas antioxidantes, que no



se consumen, las sustancias antioxidantes se modifican al reaccionar con los radicales libres y deben reemplazarse. Algunos de origen endógeno, tales como glutatión, urato, ubiquinol y proteínas plasmáticas, deben ser reemplazados por síntesis. Si son de origen exógeno, (provenientes de la dieta) necesitan ser nuevamente ingeridos. Una molécula antioxidante al reaccionar con un radical libre se puede transformar en otro radical libre más estable y por lo tanto menos dañino para el organismo. Otra de las acciones de los antioxidantes consiste en formar complejos con los iones metálicos (acción quelante) impidiendo de esta manera que estos iones lleguen a favorecer la formación de radicales libres (Jaeschke, 1995).

Entre los compuestos más representativos de antioxidantes endógenos intracelulares se puede mencionar al glutatión reducido (GSH), la tioredoxina, la glutaredoxina, aminoácidos, melatonina y otros. Entre los antioxidantes exógenos se encuentran la vitamina E, ácido ascórbico (vitamina C), beta-caroteno (provitamina A), vitamina A, bilirrubina, ácido úrico, polifenoles, entre otros (Maritim *et al.*, 2003; Rodrigo y Rivera, 2003).

## **6. Célula beta pancreática y especies reactivas de oxígeno (ROS).**

Existe mucho interés en el posible rol de las ROS en la falla de la función secretora de las células  $\beta$  pancreáticas asociado a Diabetes Mellitus tipo 2. Ya que la mayoría de los estudios publicados están orientados hacia la viabilidad de estas células y no hacia su función, siendo uno de los objetivos a tratar en esta memoria de título.

Se ha observado que uno de los principales promotores de la formación de ROS en las células  $\beta$  es la glucosa a través de distintas vías (Robertson *et al.*, 2004). Concentraciones suprafisiológicas sobre los 5 mM de glucosa provocan glucotoxicidad induciendo una disfunción de la célula  $\beta$  pancreática. Sakai *et al.*, (2003) indicaron que con 15 minutos de exposición con 30 mM de glucosa ya se produce un aumento de ROS.

Se ha reportado que el islote pancreático presenta una baja capacidad antioxidante intrínseca comparada con otros tejidos tales como hígado, riñón, músculo esquelético y grasa. Esto es debido a que presenta una baja actividad de las enzimas Superóxido Dismutasa (Cu/Zn-SOD y Mn-SOD), Glutatió n Peroxidasa (GP<sub>x</sub>) y Catalasa (Grankvist *et al.*, 1981).

Un estudio realizado por Kelly *et al.*, (1996) en cultivos neuronales mostró una acumulación de ROS, tanto de peróxidos y radicales, a través de la inserción de péptidos  $\beta$  amiloides en la membrana plasmática, provocando un daño en la transducción de señales colinérgicas a través de los receptores muscarínicos, argumentando que esto podría deberse por alteraciones en el acoplamiento de la proteína G al receptor muscarínico, causando la interferencia con la generación de IP<sub>3</sub> desde PIP<sub>2</sub>.

El objetivo de esta memoria de título es evaluar si las ROS pueden interferir con la secreción de insulina vía neurotransmisor colinérgico.

Además, el aumento de las ROS podría ser muy perjudicial para la célula  $\beta$  pancreática, siendo más susceptible por la baja actividad antioxidante de sus enzimas induciendo apoptosis, disminución del ARNm insulínico y disminución de la secreción de insulina (Evans *et al.*, 2003).

## OBJETIVOS.

1. Objetivo general.
  - Evaluar el efecto de las ROS sobre la vía colinérgica y sus consecuencias sobre la secreción de insulina y los niveles de calcio en las células  $\beta$  pancreáticas de ratas.
  
2. Objetivos específicos.
  - Determinar los efectos del  $H_2O_2$  sobre la secreción de insulina inducida por la glucosa y carbacol, un agonista colinérgico, utilizando cultivos primarios de islotes de Langerhans de rata.
  
  - Evaluar la interferencia del  $H_2O_2$  sobre el aumento del  $Ca^{2+}$  libre intracelular inducido por la estimulación colinérgica en cultivos celulares primarios de ratas.
  
  - Evaluar la capacidad del antioxidante N-acetil cisteína (NAC) para proteger a las células  $\beta$  pancreáticas de los efectos del  $H_2O_2$  en la secreción de insulina estimulada por glucosa y carbacol.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **1. Lugar y período del estudio.**

La presente memoria de título se desarrolló en el Laboratorio Neuroendocrino, Programa de Genética Humana del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, entre septiembre de 2005 y diciembre de 2007.

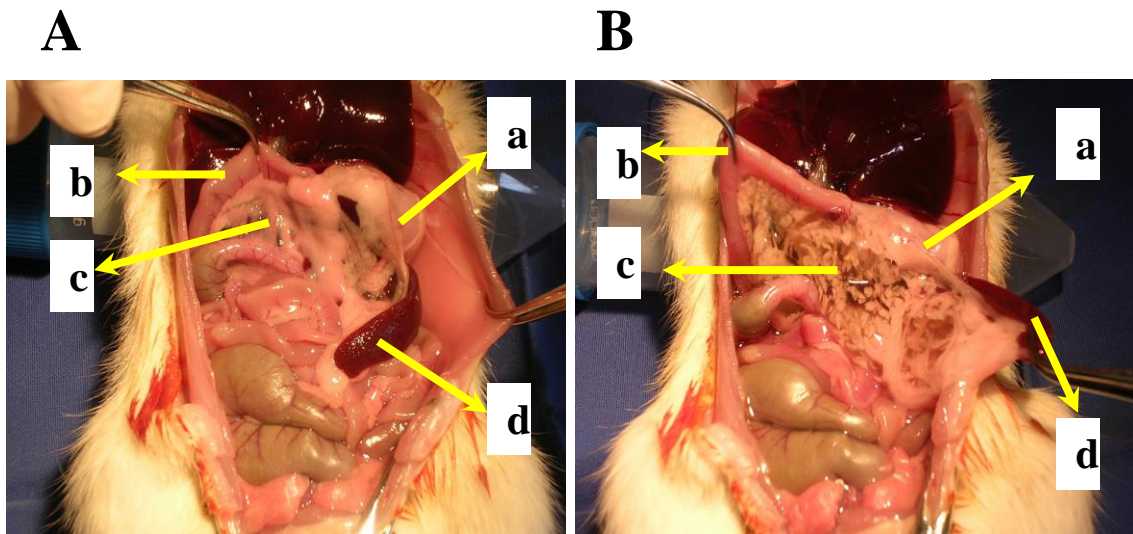
### **2. Animales y Eutanasia.**

Se utilizaron ratas macho (*Rattus rattus*) de dos meses de edad aproximadamente, de la cepa *Sprague-Dawley* de 250-300 g de peso obtenidos en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las ratas fueron eutanasiadas con 20-40 mg/Kg de tiopental al 2,5% vía intraperitoneal.

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de ética de la Facultad de Medicina para el proyecto Fondecyt # 1050571 del Dr. David Mears.

### **3. Aislamiento de islotes de Langerhans.**

Para obtener una mejor visualización del páncreas se realizó un abordaje ventral con exposición completa de la cavidad abdominal (Fig. 3). El páncreas fue extraído previa perfusión de una solución de Colagenasa V (Sigma-Aldrich® Cat # C0130) vía conducto pancreático y se llevó a incubación por 14 min en un baño a 37°C.



**Figura 3. Abordaje ventral de la cavidad abdominal de rata *Sprague-Dawley*. (A) muestra el páncreas sin collagenasa y (B) con collagenasa observándose una amplia distribución. a: estómago; b: duodeno; c: páncreas; d: bazo.**

Se inhibió la actividad enzimática con hielo por 2 min y luego con 3 lavados de una solución fría de Hank's (HBBS en mM: 125 NaCl, 5,36 KCl, 5 NaHCO<sub>3</sub>, 1,7 MgSO<sub>4</sub>, 1,2 CaCl<sub>2</sub>, 0,34 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,5 glucosa, 10 HEPES; pH 7,4) más 0,2 % de albúmina bovina.

Posteriormente se centrifugó por 5 min a 235 xg, luego se retiró el sobrenadante dejándose la pella. Adicionando 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 con 5,5 mM de glucosa y se resuspendió. Se colocó en un tubo que contenía 3 mL de Histopaque® 1077 (Sigma® Cat # 10771) para generar una gradiente de densidad y se centrifugó por 20 min a 350 xg obteniéndose una interfase donde se encontraban los islotes de Langerhans. Estos se sacaron con una micro pipeta y se llevaron a una placa (Fig. 4 A) con medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma –Aldrich® Cat # 1383-1L) suplementada con 10% de suero

fetal bovino, penicilina/estreptomicina y 5,5 mM de glucosa. Los islotes de Langerhans fueron mantenidos en una estufa de cultivo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta la experimentación.

#### **4. Obtención de células $\beta$ pancreáticas.**

Para las mediciones de la concentración de calcio intracelular, los islotes de Langerhans obtenidos se sometieron al siguiente proceso: Primero se aislaron en un tubo de 1,5 mL y se realizó una rápida centrifugación por 30 s a 235 xg obteniéndose una pella, mezclándose con 3 tipos de soluciones sucesivamente (A-B-C).

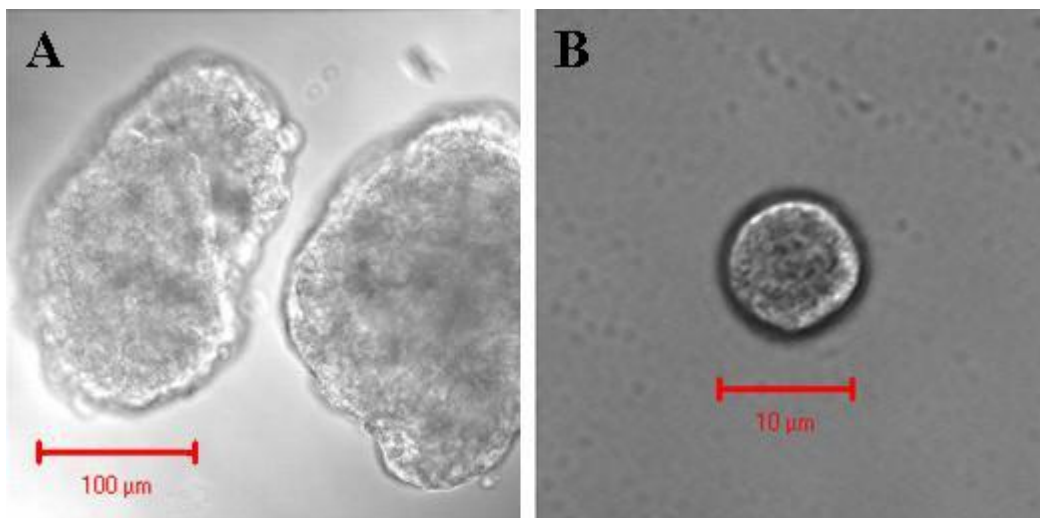
1. solución A; 10 mL EH-0-Ca (en mM: 124 NaCl, 10 HEPES, 5,4 KCl, 1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,8 MgSO<sub>4</sub>) + 20 mg glucosa + 12 mg NaHCO<sub>3</sub>, pH: 7,4.
2. solución B; 4,9 mL solución A + 100  $\mu$ L de EGTA (Ácido Etilen Glicol Tetra Acético) 50 mM.
3. solución C; 45 mg de dispasa (Boehringer-Mannheim® Cat #165859) + 2 mL solución B.

Se resuspendió la pella en 0,8 mL de solución A y se centrifugó por 30 s a 235 xg. Esto se repitió tres veces, luego se sacó el sobrenadante y se colocó 1 mL de solución B que contenía EGTA, centrifugándose por 30 s a 235 xg. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se colocó 0,5 mL de solución B, dejándolo 3 min en esta solución. Luego, se resuspendió 23 veces en una micro pipeta y se aplicó 0,8 mL de solución C que contenía dispasa. Se resuspendió 2 min en una micro pipeta e inmediatamente fueron colocados en un tubo más 10 mL de medio de cultivo RPMI 1640.

Luego se centrifugó por 8 min a 500 xg y se extrajo el sobrenadante, la pella se resuspendió en 10 mL de medio de cultivo RPMI volviéndose a centrifugar en idénticas condiciones. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se colocó 400  $\mu$ L de medio de cultivo RPMI obteniendo células disgregadas.

Se colocaron alícuotas de 40  $\mu$ L de las células sobre cubreobjetos de 15 mm de diámetro, previamente tratados con 40  $\mu$ g/mL de poli-L-lisina (Sigma® Cat # P-8920) para que se adhirieran al cubreobjeto.

Para chequear la dispersión de las células, estas se observaron bajo microscopio con una alícuota de células (Fig. 4 B). Se esperó 30 min y se colocó medio de cultivo RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina y con 11 mM de glucosa para el experimento. Las células fueron mantenidas en una estufa de cultivo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta el día siguiente para su experimentación.



**Figura 4. Imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal de Islotes de Langerhans (A) y células  $\beta$  pancreáticas (B).** (A) dos islotes de Langerhans con un tamaño de 100  $\mu$ m, aproximadamente; (B) una célula  $\beta$  pancreática con un tamaño de 10  $\mu$ m. Ampliación indicada por las barras en cada figura.

## 5. Registro de los niveles de calcio intracelular.

Para poder realizar los análisis de calcio intracelular en células  $\beta$  pancreáticas, estas fueron mantenidas en una estufa de cultivo a 37°C con medio RPMI 1640 más 11 mM de glucosa por 16-18 h en promedio. Las células  $\beta$  pancreáticas fueron cargadas durante 1 h con una sonda fluorescente mediante la aplicación de 2  $\mu$ M de fura 2-AM (Molecular Probes® Cat # F1221). Para los experimentos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma® Cat # 1009), ésta fue adicionada a distintas concentraciones con la sonda fluorescente por el mismo período de tiempo. No se aplicó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los grupos controles. Luego, las células fueron lavadas con solución Hank's y llevadas para análisis de registro en un microscopio de epifluorescencia de fase invertido (Olympus IX70). Se adicionó 200  $\mu$ M de Diazóxida (Sigma® Cat # D-9035), que es un agente que interactúa con los canales de potasio K<sub>ATP</sub> de la membrana plasmática de la célula  $\beta$  pancreática, provocando una hiperpolarización de la membrana celular, evitando la entrada de calcio al interior de la células desde el medio extracelular. Se excitó la sonda mediante luz U.V. a través de dos longitudes de onda (340 nm y 380 nm), generadas por una lámpara de xenón. Las células emitieron una fluorescencia a una longitud de onda de 500 nm, cuyos valores fueron registrados en un fotomultiplicador y guardados en un computador. Los datos fueron adquiridos a través del programa Ionwizard® 4,4 (Ionoptix® Corporation).

Los valores fueron convertidos a concentraciones de calcio intracelular a través de la fórmula:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d * (\text{R} - \text{R}_{\text{min}}) / (\text{R}_{\text{máx}} - \text{R}) * \text{Sf2} / \text{Sb2}$$



donde la  $K_d$  corresponde a la constante de disociación para la unión de fura 2 con calcio, asignándose generalmente un valor de 224 nM. R corresponde a la razón de las dos longitudes de onda, 340 nm y 380 nm, obtenidas a partir de los valores obtenidos de los experimentos. Los valores  $R_{máx}$  y  $R_{min}$  son las razones medidas bajo condiciones de saturación de los niveles de calcio y en ausencia de calcio respectivamente. Los valores  $S_{b2}$  y  $S_{f2}$  son proporcionales a la fluorescencia excitada por la longitud de onda 380 nm, nuevamente bajo condiciones saturadas de niveles de calcio (“b” se refiere al estado unido del calcio) y en ausencia de calcio (“f” se refiere a calcio libre).

Durante el registro se esperó dos minutos antes de la estimulación para obtener promedios de la concentración basal y luego la estimulación colinérgica fue realizada con 30  $\mu$ M de carbacol (Sigma® Cat # C-4382), un análogo sintético de la acetilcolina.

## **6. Secreción de insulina en islotes de Langerhans expuestos a $H_2O_2$ .**

Para la obtención de la secreción de insulina desde los islotes de Langerhans, éstos se dejaron en medio de cultivo con 5,5 mM de glucosa en una estufa de cultivo, por 16-18 h a 37°C. Se preparó Krebs concentrado 10 veces (1200 mM NaCl, 50 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ ) con 1 litro de agua milli-Q. Luego se preparó 100 mL de solución:

- Se colocó en una probeta 10 mL de solución de Krebs concentrado 10 veces.

- Se llenó con agua milli-Q hasta 95 mL en la probeta.
- Se burbujeó con CO<sub>2</sub> por 15 min mientras se seguía adicionando 2,6 mM CaCl<sub>2</sub> y 25 mM NaHCO<sub>3</sub> para 100 mL.
- Luego de los 15 min se sacó el CO<sub>2</sub>, se agregaron 5 mL de agua milli-Q para completar los 100 mL, se agregó 0,5 g de albúmina, y se llevó a un frasco, quedando un Krebs más albúmina a una concentración en mM de: 120 NaCl; 5 KCl; 1 MgCl<sub>2</sub>; 25 NaHCO<sub>2</sub>; y 0,5 % de albúmina).

Luego se realizó una pre-incubación, dejando los islotes de Langerhans en una placa de Petri de 10 cm con solución Krebs con 2,75 mM de glucosa. En los experimentos en que se utilizó N-acetil cisteína, NAC (Sigma® Cat # 616-91-1) como antioxidante, éste se agregó en placas Petri de 10 cm a una concentración de 10 mM durante la pre-incubación. Se dejaron los islotes de Langerhans en una estufa a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 1 h.

Luego se separaron los islotes en placas de 24 pocillos. 15 islotes fueron depositados en cada pocillo los cuales contenían 1 mL de solución Krebs a 2,75 y 27,7 mM de glucosa (basal y estimulado respectivamente), más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a distintas concentraciones y además, con o sin la aplicación de 30 µM de carbacol. A los grupos control no se aplicaron H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Se incubaron por 1 h en una estufa a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, tiempo en el cual las

células llevaron a cabo la secreción de insulina. Posteriormente el sobrenadante fue extraído dejándose en tubos de 1,5 mL y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la medición de la concentración de insulina a través de la técnica de ELISA.

## **7. Medición de la secreción de insulina.**

Para la medición de insulina en las muestras obtenidas desde la incubación de los islotes de Langerhans, se ocupó la técnica de ELISA (Mercodia® Cat # 10-1124-10), utilizando un kit específico para insulina de ratas. El principio de este procedimiento se caracteriza por presentar una fase sólida con dos sitios de unión para enzimas de inmunoensayo. Está basado en una técnica directa de *sandwich* en la cual dos anticuerpos monoclonales están dirigidos contra determinantes antigénicos en la molécula de insulina. Durante la incubación, la insulina de muestra reacciona con los anticuerpos anti-insulina conjugados en peroxidasa y anticuerpos anti-insulina que están recubriendo el pocillo del ensayo.

El anticuerpo marcado con la enzima no unida se elimina con lavados en forma repetida. La enzima conjugada unida se detecta por la reacción dada con el substrato cromogénico 3,3',5,5'-Tetra-metilbencidina (TMB). La reacción se detiene añadiendo ácido sulfúrico para dar un punto final colorimétrico que se lee por espectrofotometría a 450 nm de longitud de onda. El kit utiliza estándares de concentración conocidos que permiten realizar una curva de calibración. A partir de ésta se pudieron extrapolar los valores de las muestras a secreción de insulina en  $\mu\text{g/L}$ . El procedimiento constó de los siguientes pasos:

- Se colocó 25  $\mu\text{L}$  de los calibradores en los pocillos controles y 25  $\mu\text{L}$  de secreción de las muestra en los pocillos para experimentación.
- Se agregó 50  $\mu\text{L}$  de enzima conjugada a todas las muestras.
- Se incubó por 2 h en un agitador a temperatura ambiente.
- Se lavó 6 veces con 350  $\mu\text{L}$  de solución de lavado secándose posteriormente.
- Se agregó 200  $\mu\text{L}$  de TMB.
- Se incubó por 15 min.
- Se adicionó 50  $\mu\text{L}$  de solución de detención de la reacción (0,5 M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).
- Se midió a una absorbancia de 450 nm inmediatamente en un lector de ELISA, VERSAmax® Tunable Microplate Reader (Molecular Devices®).

## **8. Análisis Estadístico.**

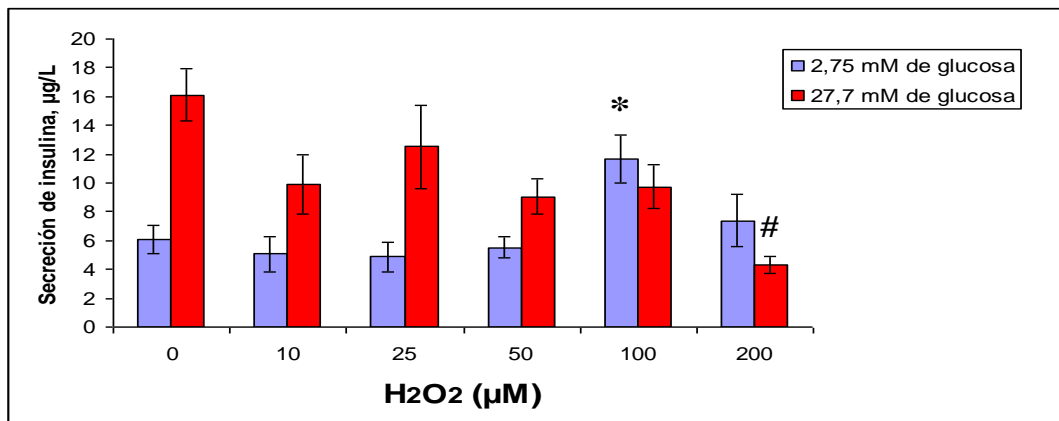
Para el análisis estadístico, los promedios fueron representados gráficamente +/- EEM (error estándar de la media). La significancia de las variables cuantitativas se estableció mediante el test de Student y las variables múltiples se analizaron mediante ANDEVA y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey a través del programa GraphPad Prism 4.

## RESULTADOS.

### 1. Efectos del peróxido de hidrógeno en la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes de Langerhans.

Para evaluar el efecto del  $H_2O_2$  sobre la secreción de insulina, se expusieron los islotes de Langerhans a distintas concentraciones de  $H_2O_2$ . Se realizaron curvas de concentración con glucosa basal (2,75 mM) y con glucosa estimuladora (27,7 mM) para inducir la secreción de insulina. Como se aprecia en la figura 5, 100  $\mu M$   $H_2O_2$  produjo un aumento significativo de la secreción de insulina a concentraciones basales de glucosa con respecto al control que no presentaba  $H_2O_2$  ( $p < 0,01$ ).

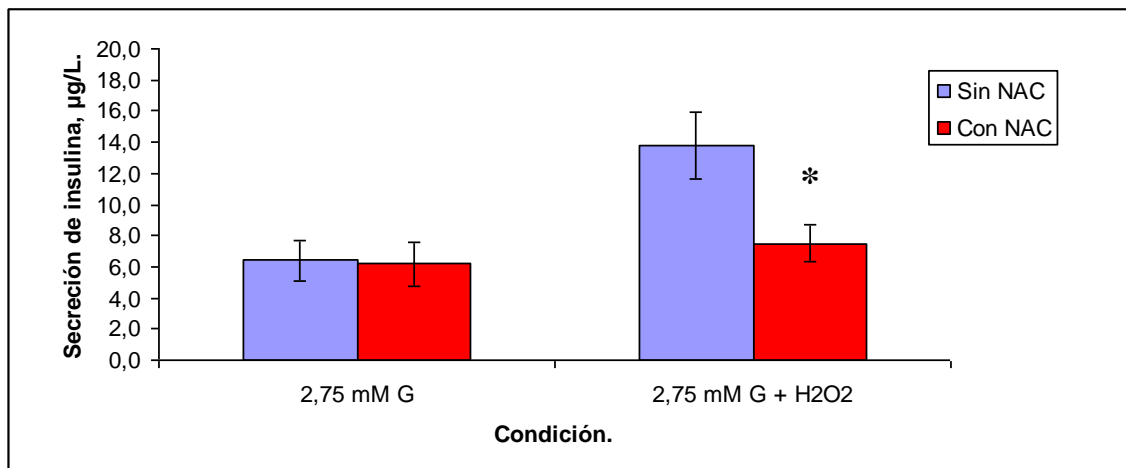
Con altas concentraciones de glucosa, se observó una tendencia a la inhibición de la secreción de insulina con todas las concentraciones de  $H_2O_2$  probadas, logrando ser significativo a los 200  $\mu M$  ( $p < 0,01$ ), (Fig. 5).



**Figura 5. Peróxido de hidrógeno aumenta la secreción de insulina basal e inhibe la secreción estimulada por glucosa.** El gráfico muestra el efecto del  $H_2O_2$  a diferentes concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 200  $\mu M$  (indicado debajo de las barras) sobre la secreción de insulina de islotes de Langerhans expuestos a concentraciones de glucosa basal, 2,75 mM (barras azules) y concentraciones de glucosa estimuladoras, 27,7mM (barras rojas).

Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar ( $n=6-24$ ); \*, #  $p < 0,01$  vs condiciones de glucosa basal y estimuladora respectivamente; ANDEVA seguido del *post-test* de *Tukey*.

Con la finalidad de revertir el efecto producido por el  $H_2O_2$ , grupos de islotes de Langerhans se preincubaron con un antioxidante (10 mM de NAC) a concentraciones basales y estimuladoras de glucosa. Como se aprecia en la figura 6, frente a concentraciones basales de glucosa, NAC produjo la reversión del efecto observado en presencia de  $100 \mu M$  de  $H_2O_2$ , con una disminución significativa en la secreción de insulina a niveles basales ( $p < 0,01$ ). Además, NAC en ausencia de  $H_2O_2$  no afectó la secreción de insulina a concentraciones basales de glucosa (Fig. 6).



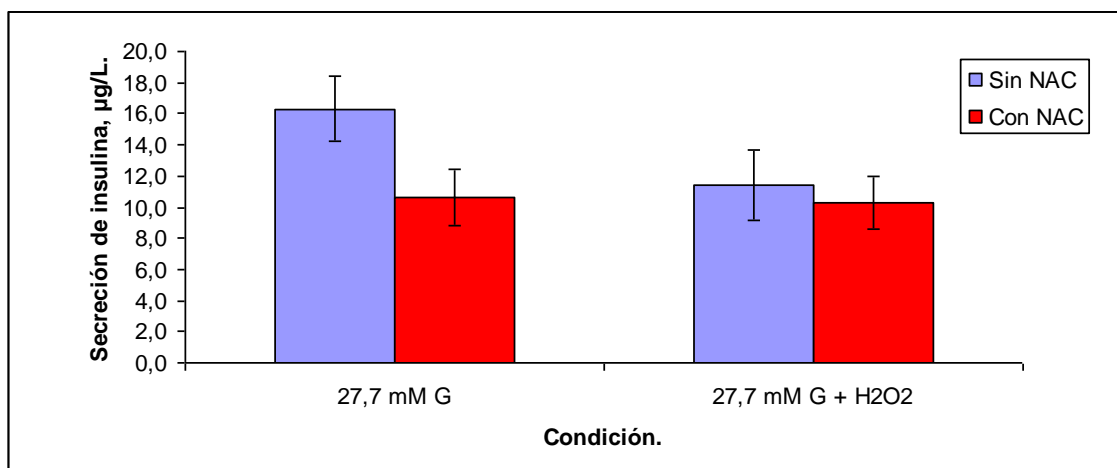
**Figura 6. El antioxidante, N-acetil cisteína (NAC), inhibe el aumento en la secreción de insulina inducida por  $H_2O_2$  en niveles de glucosa basal (2,75 mM G) en islotes de Langerhans de ratas.**

Sin NAC (barras azules), con 10 mM NAC (barras rojas); las barras izquierdas sin peróxido de hidrógeno, las barras derechas con  $100 \mu M$  de peróxido de hidrógeno.

Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar ( $n=10-17$ ); \*  $p < 0,01$ ; ANDEVA seguido del *post-test* de Tukey.

En la figura 7, se muestra el efecto de NAC durante la preincubación en islotes de Langerhans con glucosa estimuladora (27,7 mM) y  $100 \mu M$  de  $H_2O_2$  en la incubación. Se observó que NAC provocó una disminución parcial en la secreción de insulina con respecto a la condición control. Sin embargo, esta

disminución no fue significativa. Además, el  $H_2O_2$  tampoco produjo una disminución de la secreción de insulina cuando NAC estaba presente.



**Figura 7. El antioxidante N-acetil cisteína (NAC) y el peróxido de hidrógeno disminuyen parcialmente la secreción de insulina estimulada por glucosa (27,7 mM G) en islotes de Langerhans de ratas.** Sin NAC (barras azules), con 10 mM NAC (barras rojas); las barras izquierdas sin peróxido de hidrógeno, las barras derechas con 100  $\mu$ M de peróxido de hidrógeno. Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar (n= 11-17), con ANDEVA.

Para demostrar los efectos de  $H_2O_2$  y NAC sobre la capacidad de la glucosa para estimular la secreción de insulina en islotes de Langerhans, se calculó el “índice de estimulación”, utilizando los datos de las figuras números 6 y 7. Se define índice de estimulación como la razón entre la cantidad de insulina secretada en presencia de glucosa estimuladora con respecto a la glucosa basal. Donde valores igual a 1 indican que no hay estimulación; valores mayores a 1 indican que la estimulación con glucosa fue “n” veces mayor a la basal; y valores menores a 1 indican una inhibición de la secreción. Como se observa en la figura 8, en condiciones control (sin  $H_2O_2$  y sin NAC), la aplicación de glucosa estimuladora produjo una secreción de insulina de 2,5 veces mayor

a la basal. La aplicación de NAC disminuyó este aumento a 1,7 veces sobre la basal. Por otro lado, el índice de estimulación con  $H_2O_2$  fue menor a 1, indicando una pérdida de sensibilidad a la glucosa. La aplicación de NAC junto con  $H_2O_2$  revirtió el efecto del  $H_2O_2$  con una estimulación de 1,4 veces sobre la basal.

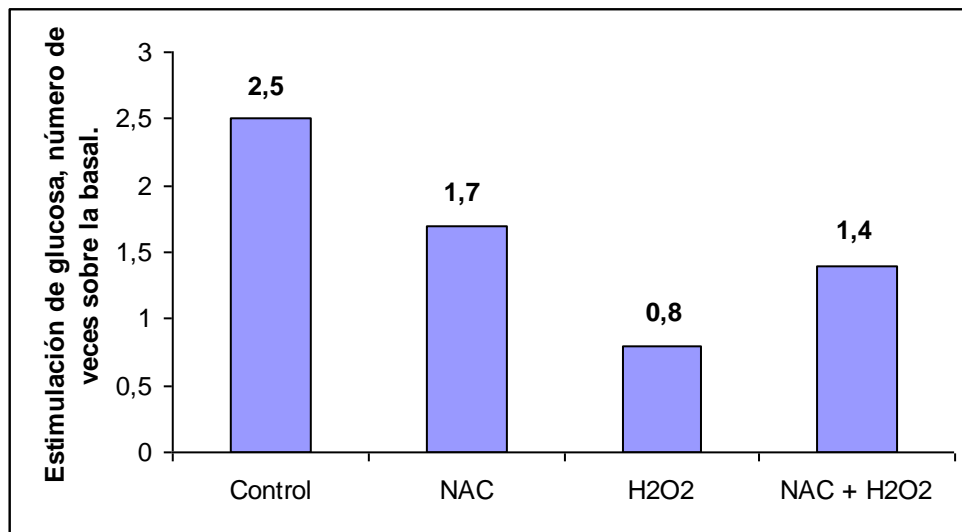


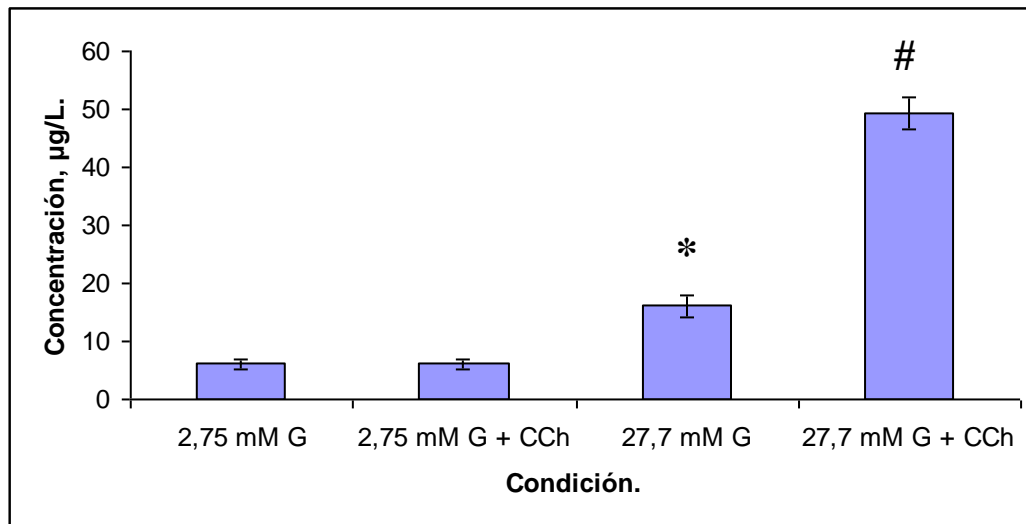
Figura 8. Índice de estimulación. Relación de la magnitud de la estimulación con 27,7 mM de glucosa, número de veces con respecto a la glucosa basal. Las condiciones experimentales están debajo de cada barra.

## 2. Efectos del peróxido de hidrógeno en la secreción de insulina estimulada por la vía colinérgica en islotes de Langerhans.

Para estudiar el efecto del  $H_2O_2$  en la vía colinérgica, se realizaron experimentos en islotes de Langerhans para ver los efectos a nivel de la secreción de insulina. Primero se evaluó la respuesta de la vía colinérgica frente a la aplicación de carbacol (CCh), a niveles basales y estimuladores de glucosa.



Como se observa en la figura 9, 30  $\mu$ M de carbacol con niveles de glucosa basal (2,75 mM) no produjo una respuesta en la secreción de insulina.



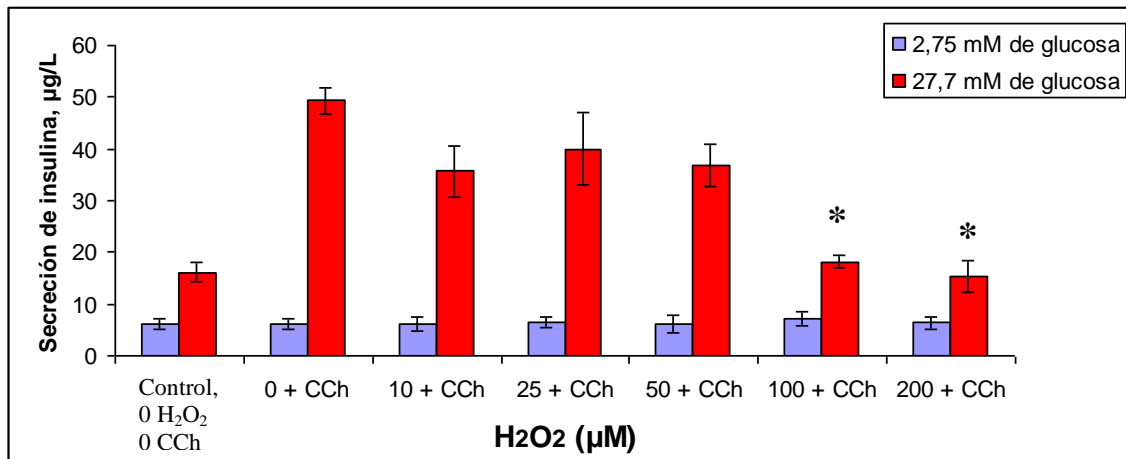
**Figura 9. El estímulo colinérgico aumenta la secreción de insulina inducida por glucosa en islotes de Langerhans.** Las condiciones experimentales están indicadas debajo de cada barra; secreción de insulina en glucosa (G) basal, 2,75 mM, sin o con 30  $\mu$ M carbacol (CCh), y en glucosa estimuladora, 27,7 mM.

Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar (n=22-24); \*  $p < 0,05$  vs condición de glucosa basal (2,75 mM G); #  $p < 0,001$  vs condición de glucosa estimuladora (27,7 mM G); ANDEVA seguido del *post-test* de Tukey.

Al aplicar 30  $\mu$ M de carbacol en presencia de 27,7 mM de glucosa, los islotes de Langerhans respondieron con un aumento de la secreción de insulina significativo con respecto a aquellos no estimulados colinérgicamente. ( $p < 0,001$ ), (Fig. 9).

Posteriormente, otro grupo de islotes de Langerhans, fueron expuestos a distintas concentraciones de  $H_2O_2$  en la incubación en presencia de una estimulación colinérgica. Como se observa en la figura 10, a concentraciones basales de glucosa (2,75 mM) y en presencia de 30  $\mu$ M de carbacol, las

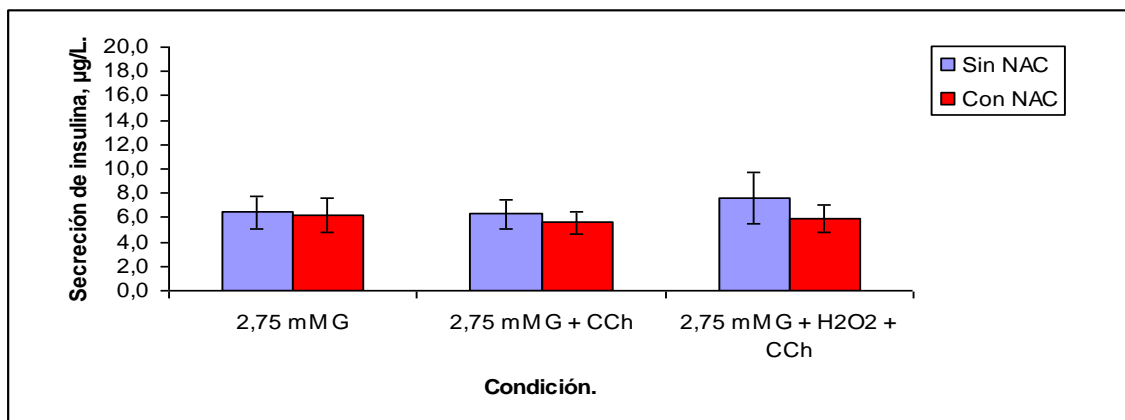
distintas concentraciones de  $H_2O_2$ : 10, 25, 50, 100 y 200  $\mu M$  no mostraron ningún efecto significativo en la secreción de insulina. Sin embargo, en concentraciones estimuladoras de glucosa (27,7 mM) y en presencia de 30  $\mu M$  de carbacol, se produjo un aumento en la secreción de insulina, la cual fue disminuyendo a medida que se aumentó la concentración de  $H_2O_2$  llegando a tener diferencias estadísticas de secreciones inhibitorias a partir de los 100  $\mu M$  de  $H_2O_2$  ( $p < 0,001$ ).



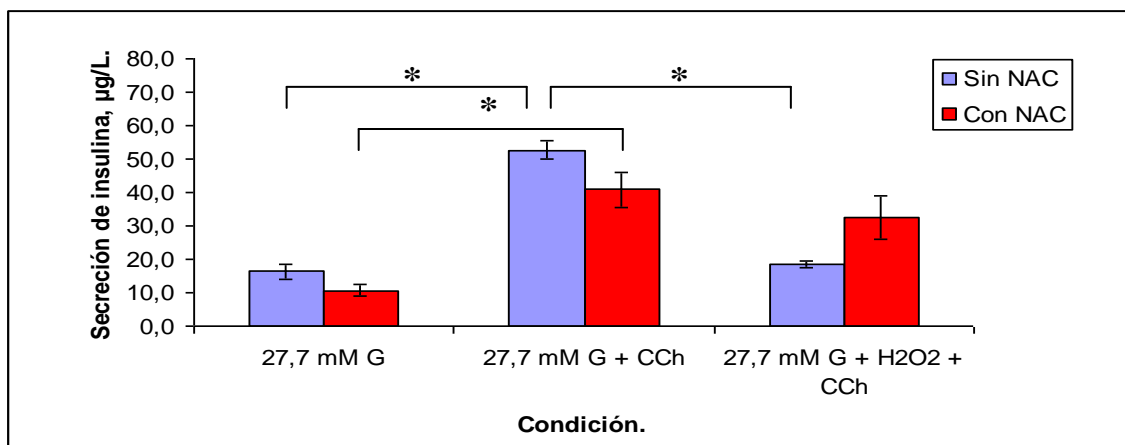
**Figura 10. Inhibición por peróxido de hidrogeno de la respuesta colinérgica en la secreción de insulina con glucosa estimuladora.** Barras azules, 2,75 mM de glucosa, barras rojas, 27,7 mM de glucosa, como indicado en la figura. Presencia de carbacol (CCh), 30  $\mu M$ , y la concentración de peróxido de hidrógeno en  $\mu M$  indicado debajo de las barras. Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar ( $n=6-24$ ); \*  $p < 0,001$  vs condición de glucosa estimuladora mas carbacol (0+CCh); ANDEVA seguido del *post-test* de Tukey.

Posteriormente, para observar el efecto de un antioxidante en islotes de Langerhans se aplicó 10 mM de NAC durante la preincubación, para evaluar que efecto produciría en ellos una vez expuestos a  $H_2O_2$ . Como se muestra en la figura 11, con niveles basales de glucosa en presencia de NAC en la preincubación, 100  $\mu M$  de  $H_2O_2$  durante 1 h no alteró la secreción basal de insulina con respecto a los controles que no presentaban NAC. Sin embargo,

con niveles de glucosa estimuladora de la secreción de insulina (27,7 mM) en presencia de NAC y 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la aplicación de 30  $\mu$ M de carbacol aumentó los niveles de secreción de insulina comparado con el control (Fig. 12).

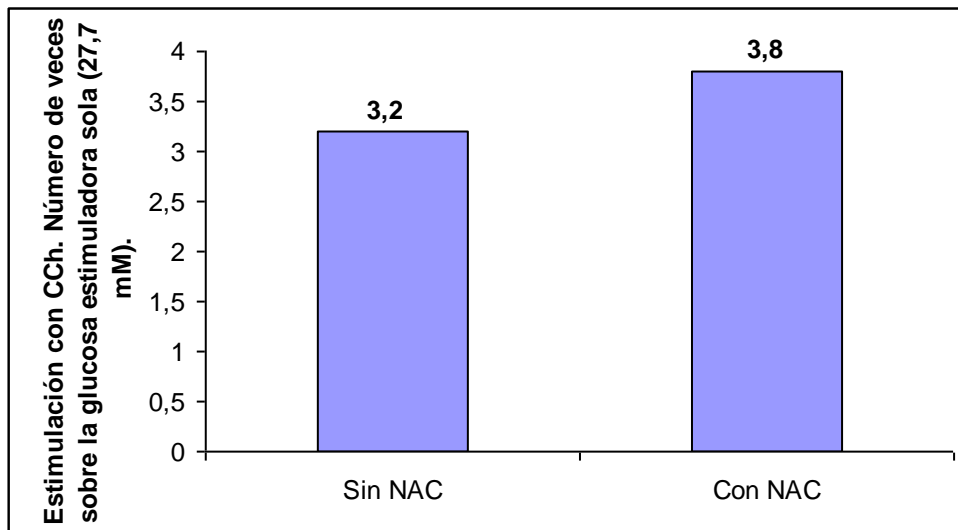


**Figura 11. El antioxidante N-acetil cisteína (NAC) no presenta efecto en la secreción de insulina en presencia de glucosa basal, con carbacol y peróxido de hidrogeno en islotes de Langerhans de ratas.** Sin NAC (barras azules), con 10 mM NAC (barras rojas); las barras dobles de la izquierda solo con glucosa (G) basal (2,75 mM), barras dobles centrales con 30  $\mu$ M de carbacol (CCh), barras dobles de la derecha con 30  $\mu$ M de carbacol mas 100  $\mu$ M de peróxido de hidrógeno. Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar (n= 10-17), con ANDEVA.



**Figura 12. El antioxidante N-acetil cisteína (NAC) junto con carbacol y 27,7 mM de glucosa estimulan la secreción de insulina inhibida por peróxido de hidrogeno en islotes de Langerhans de ratas.** Sin NAC (barras azules), con 10 mM NAC (barras rojas); las barras dobles de la izquierda presentan solo glucosa (G) estimuladora (27,7 mM), barras dobles centrales con 30  $\mu$ M de carbacol (CCh), barras dobles de la derecha con 30  $\mu$ M de carbacol mas 100  $\mu$ M de peróxido de hidrógeno. Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar (n=11-17); \* p < 0,001; ANDEVA seguido del *post-test* de Tukey.

Para evaluar el efecto de NAC sobre la acción del CCh en presencia de glucosa, se utilizaron los datos de la figura 12 para calcular el “**índice de estimulación para CCh**”, definido en este caso como la razón entre la secreción de insulina en presencia y ausencia de CCh. El índice fue calculado en ausencia o presencia de NAC respectivamente, observándose en la figura 13 que NAC no influyó en la sensibilidad de los islotes a la estimulación colinérgica.



**Figura 13. Índice de estimulación para CCh.** Relación de la magnitud de la estimulación con carbacol sobre islotes de Langerhans que presentan glucosa estimuladora (27,7 mM). Las condiciones experimentales están debajo de cada barra.

### **3. Efectos del peróxido de hidrógeno sobre el calcio intracelular en las células beta pancreáticas.**

Para el registro de los niveles de calcio intracelular se ocuparon células  $\beta$  pancreáticas disgregadas desde islotes de Langerhans, expuestas a concentraciones crecientes de  $H_2O_2$ : 10, 25, 50 y 100  $\mu M$ . Se evaluó la capacidad de CCh para estimular un aumento rápido y transitorio del calcio intracelular, el cual se debe a la liberación de calcio desde depósitos intracelulares, principalmente desde el retículo endoplasmático (Gilon y Henquin, 2001). Registros representativos de estos efectos se resumen en la figura 14.

Los experimentos mostraron que al aumentar las concentraciones de  $H_2O_2$  durante la incubación (Fig. 15), la administración de 30  $\mu M$  de carbacol produjo una menor liberación de calcio desde los depósitos intracelulares. Esto fue cuantificado midiendo el máximo aumento de la descarga de calcio después de la aplicación de carbacol. Esta inhibición en el aumento de calcio intracelular se hizo significativo a partir de los 25  $\mu M$  de  $H_2O_2$  ( $p < 0,05$ ).

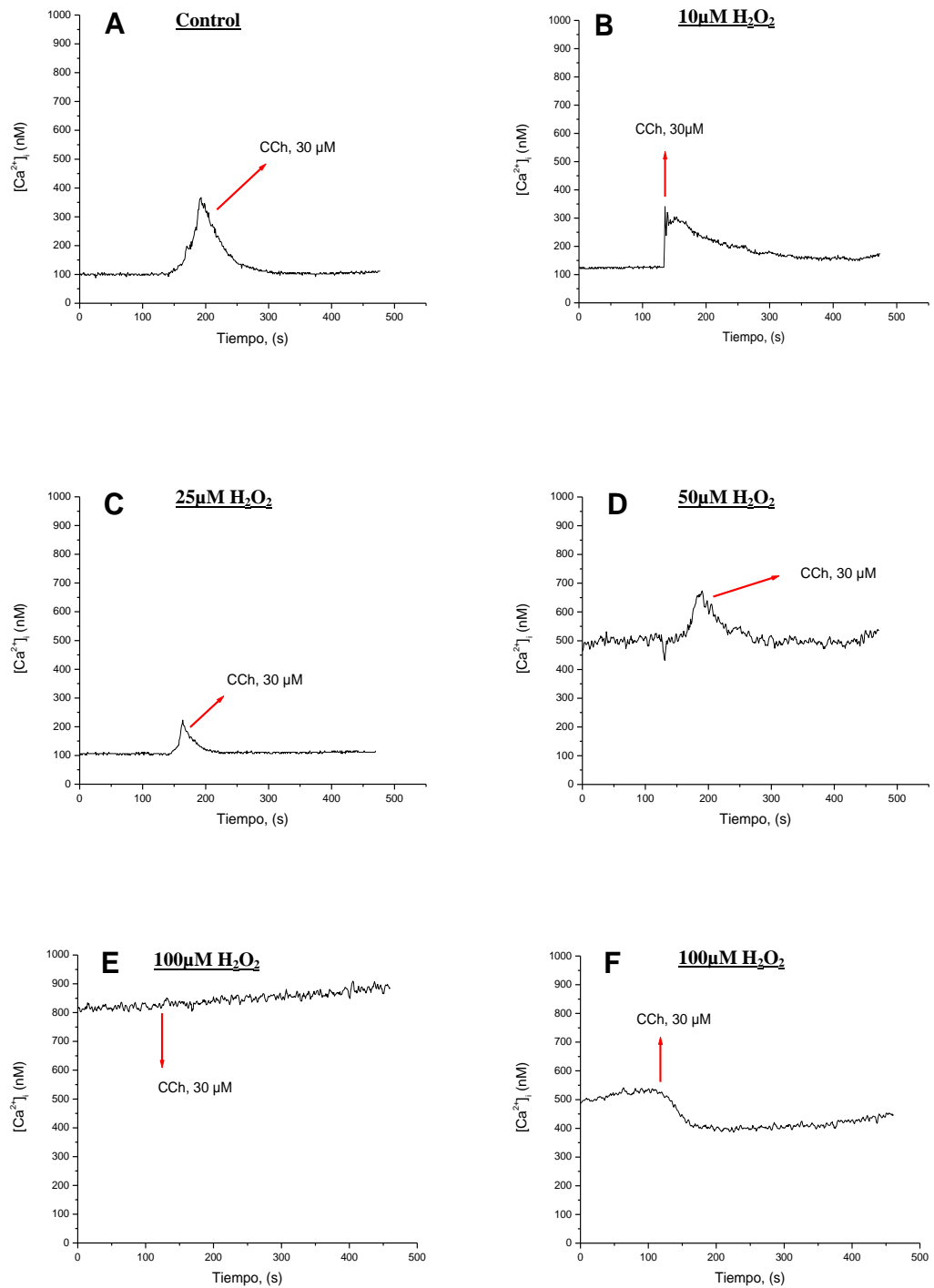
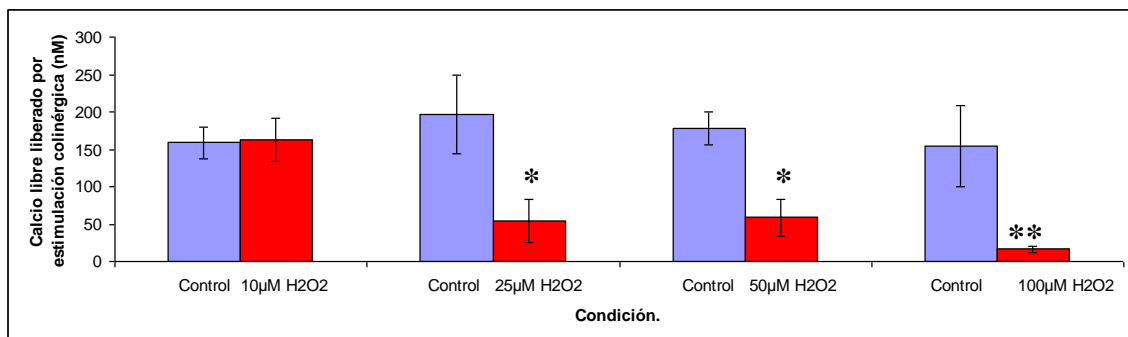
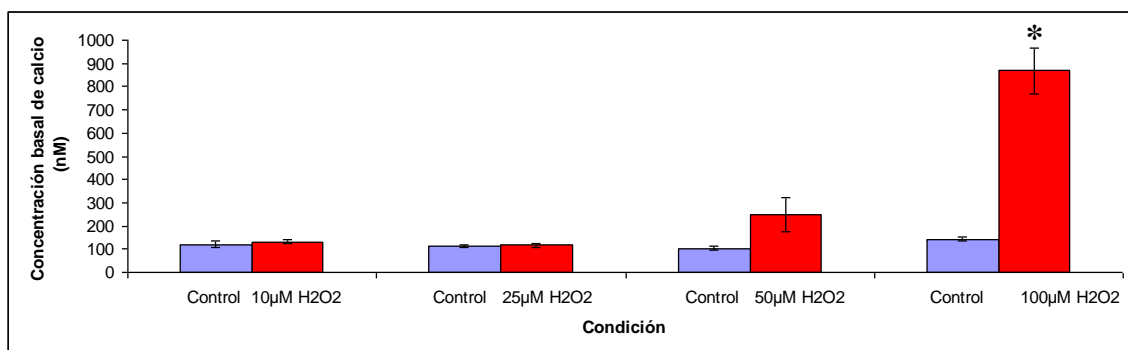


Figura 14. registros de curvas representativas de calcio intracelular incubadas con peróxido de hidrógeno durante 1 h a diferentes concentraciones de 10, 25, 50 y 100  $\mu$ M (B-F) y estimuladas con 30  $\mu$ M de carbacol (Cch) en células  $\beta$  pancreáticas.



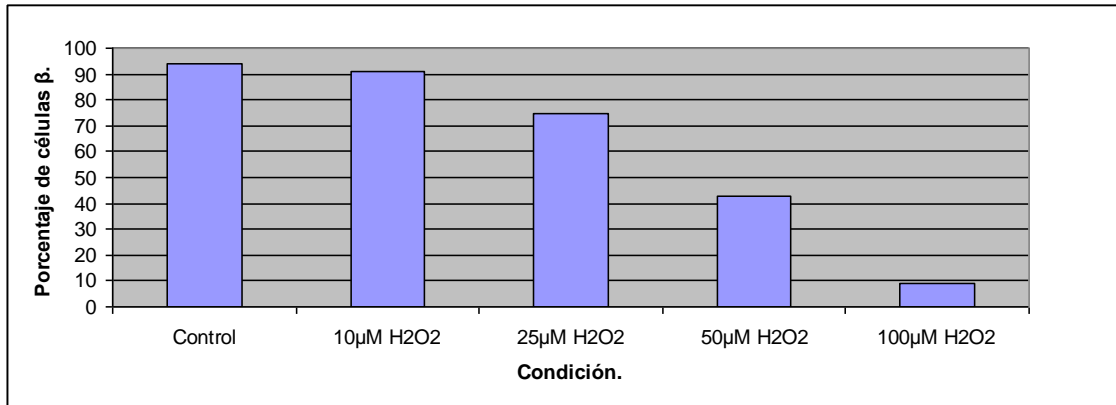
**Figura 15. Peróxido de hidrógeno incubado por 1 h en células  $\beta$  pancreáticas disminuye la descarga de calcio desde depósitos intracelulares al aplicar 30  $\mu$ M de carbachol.** Las barras izquierdas (azules) representan controles sin peróxido de hidrógeno; las barras derechas (rojas) con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones de 10, 25, 50 y 100  $\mu$ M. Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar (n=6-11); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; *t test*.

Además, el tratamiento con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produjo un aumento de los niveles basales de calcio intracelular a partir de los 50  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> llegando a tener una diferencia significativa con la aplicación de 100  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ), ilustrándose en las figuras 14 y 16.



**Figura 16. Peróxido de hidrógeno incubado por 1 h aumenta los niveles de calcio basal en células  $\beta$  pancreáticas de ratas.** Las barras izquierdas (azules) representan controles sin peróxido de hidrógeno; las barras derechas (rojas) con peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones de 10, 25, 50 y 100  $\mu$ M. Los resultados están expresados como promedio  $\pm$  error estándar (n=6-11); \*  $p < 0,05$ ; *t test*.

Por otra parte, el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyó el porcentaje de células que respondieron al estímulo de 30 μM de carbacol (Fig. 17).



**Figura 17.** Peróxido de hidrógeno incubado por 1 h disminuye el porcentaje de células β pancreáticas que responden al estímulo colinérgico con un aumento del calcio intracelular al aplicar 30 μM de carbacol.



## DISCUSIÓN.

Actualmente en el estudio de la diabetes existe mucho interés en las ROS, ya que el estrés oxidativo podría tener un rol en la falla de las células  $\beta$  pancreáticas como ocurre en la Diabetes mellitus tipo 2. La mayoría de la investigación hasta la fecha ha sido dirigida al rol de las ROS en la pérdida de la masa de las células  $\beta$  pancreáticas, o sea, en la viabilidad celular. Existen pocos estudios sobre las ROS y la función de la célula  $\beta$  pancreáticas, los cuales se dirigen principalmente a los efectos en la respuesta secretora a la glucosa. Este trabajo complementa y extiende los estudios preexistentes, ya que, además de investigar los efectos de las ROS sobre la respuesta a glucosa, se han obtenido datos sobre las ROS y la vía colinérgica, siendo esta vía muy importante para el control de la secreción de insulina en situaciones fisiológicas. Por otra parte, estudios realizados por Pi *et al.*, (2007) sugieren que las ROS en concentraciones fisiológicas actúan como mensajeros secundarios para la secreción de insulina, idea que también concuerdan con los datos presentados en esta memoria de título.

### 1. Efectos del peróxido de hidrógeno tanto en la secreción de insulina estimulada por glucosa y en los niveles de calcio intracelular.

Los datos de la figura 5 indican que el  $H_2O_2$  altera la actividad secretora de las células  $\beta$  pancreáticas. Esta alteración consiste en un aumento de la secreción basal y la pérdida de la **secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS)**. Esta es una indicación clásica del daño a las células  $\beta$  pancreáticas, tal como se observa en fenómenos de glucotoxicidad (que corresponde a los

efectos adversos que produce la hiperglicemia crónica sobre estructuras celulares y sus funciones) y/o lipotoxicidad, en la que se produce una inhibición de la secreción de insulina por el aumento crónico de los ácidos grasos libres (Durruty y García de los Ríos, 2001; Poitut y Robertson, 2002). Con niveles de glucosa basal Maechler *et al.*, (1999) obtuvieron un fenómeno semejante con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en líneas celulares de insulinomas de ratas (INS-1). Podemos inferir que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  daña a las células  $\beta$  pancreáticas a las concentraciones y tiempo de exposición utilizado. Conforme con la idea que una producción excesiva de ROS (por ejemplo en condiciones de hiperglicemia crónica) contribuye a la pérdida de la función de la célula  $\beta$  (Robertson y Harmon, 2007). Las mediciones de calcio obtenidas indican que el aumento en la secreción basal inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede deberse a un aumento de la concentración de calcio intracelular (Fig. 16). El calcio es el principal gatillador para la exocitosis de los gránulos de insulina, por lo cual, es esperable observar que el aumento de calcio producido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  desde 50  $\mu\text{M}$  estimule un aumento en la secreción basal. Estos datos coinciden con Nakazaki *et al.*, (2000) quienes han observado el mismo fenómeno, mostrando que 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumentó la concentración del calcio intracelular en células  $\beta$  pancreáticas de ratas en un medio extracelular sin calcio.

Con respecto a la pérdida de la GSIS que observamos, no se realizaron experimentos con calcio para explicarla. Sin embargo, es importante mencionar que la glucosa estimula la secreción de insulina a través de dos vías distintas: una que produce el aumento del calcio intracelular que gatilla directamente la exocitosis de los gránulos de insulina, y la otra que corresponde a la vía

“**amplificadora**” o también llamada “***K<sub>ATP</sub>-independent***”, en el cual la glucosa produce señales que aumentan la capacidad de calcio para estimular la exocitosis (Komatsu *et al.*, 1998; Sato y Henquin, 1998). El efecto de la segunda vía sólo se ve cuando la concentración de calcio intracelular está elevada gracias a la primera vía. Al asumir que el calcio intracelular está elevado en las células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es probable que las ROS estén interfiriendo con la vía amplificadora. No se conoce un mecanismo específico, pero pensamos que es sensible al daño por el estrés oxidativo.

Posteriormente se ocupó el antioxidante NAC. Este ha sido ampliamente utilizado como un antioxidante tanto *in vivo* como *in vitro* (Atkuri *et al.*, 2007). Este compuesto está constituido por una cisteína unida a un grupo acetilo permitiendo una menor reactividad del grupo tiol, comparada con el tiol que presenta la cisteína, haciéndola menos tóxica y menos susceptible a la oxidación (Atkuri *et al.*, 2007).

Al comparar el índice de estimulación por glucosa en presencia y ausencia de NAC (Fig. 8), se observó que el antioxidante disminuyó parcialmente la GSIS.

Este resultado concuerda con Pi *et al.*, (2007) y apoya la idea en donde concluyen que las ROS producidas en respuesta a glucosa sirven como señales fisiológicas para la GSIS. Sin embargo, todavía no se sabe específicamente donde las ROS podrían estar actuando en la vía de la GSIS.

A pesar del efecto inhibitorio de NAC sobre la GSIS, se logró demostrar que el antioxidante bloquea los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la secreción de insulina. Primero, como se ve en la figura 6, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no producía un aumento de secreción basal cuando NAC estaba presente. Además, NAC ocasionó la

recuperación parcial de la sensibilidad de los islotes a la glucosa en presencia de  $H_2O_2$ , aumentando el índice de estimulación a un nivel similar al índice en que sólo presenta NAC.

Los resultados indican que el daño a la función de la célula  $\beta$  pancreática producido por  $H_2O_2$  se debe a un efecto oxidante y no a un mecanismo secundario, ya que un antioxidante es capaz de revertir el daño. Estos resultados son importantes desde el punto de vista de la diabetes, puesto que indican que la administración de antioxidantes podría servir para recuperar la función de las células  $\beta$  pancreáticas o para prevenir la pérdida de función causada por las ROS.

La disminución del efecto del  $H_2O_2$  sobre la secreción de insulina podría ser explicado por un mayor aporte de cisteína que es un aminoácido limitante para la formación de glutatión reducido (GSH), el cual corresponde a un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína. Dentro de sus funciones se encuentra el mantener el balance redox en la célula y la protege del estrés oxidativo, actúa como coenzima, participa en procesos de detoxificación, regula la formación y el mantenimiento de la forma activa de las enzimas. Además, es importante para la reacción catalizada por la enzima Glutatión peroxidasa, permitiendo la detoxificación del  $H_2O_2$  a través de la oxidación del GSH (Martínez *et al.*, 2006).

En conjunto, los resultados de secreción con diferentes niveles de glucosa y  $H_2O_2$  indican que las ROS participan fisiológicamente en la vía de la GSIS, pero la presencia de un exceso de ROS produce una deficiencia en la función

secretora. Los antioxidantes pueden proteger contra el daño oxidativo, con la precaución de que pueden comprometer la vía de la GSIS normal.

## **2. Efectos del peróxido de hidrógeno sobre la secreción de insulina y los niveles de calcio intracelular estimulados a través de la vía colinérgica.**

Se evaluó el efecto de 30  $\mu\text{M}$  de carbacol, un análogo sintético de la acetilcolina, en la secreción de insulina estimulada por la vía colinérgica con niveles basales y estimuladores de glucosa en islotes de Langerhans. Se observó que carbacol solo afectó la secreción de insulina en presencia de concentraciones de glucosa estimuladora. Estos efectos realizados por carbacol representan una respuesta clásica de las células  $\beta$  pancreáticas a los agonistas muscarínicos (Ahrén *et al.*, 1999; Gilon y Henquin, 2001).

Posteriormente, al evaluar el efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a distintas concentraciones sobre la vía colinérgica con la aplicación de 30  $\mu\text{M}$  de carbacol, se observó que el oxidante no logró aumentar la secreción basal cuando el carbacol estaba presente, pero sí inhibió la secreción producida por carbacol en conjunto con 27,7 mM de glucosa. No se sabe porque el  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumentó la secreción basal en condiciones controles sin carbacol, pero no en presencia de carbacol. Una posible explicación podría ser que carbacol estimule una disminución de calcio en un porcentaje de las células en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ya que los datos con calcio en células  $\beta$  pancreáticas mostraron que una incubación con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y al ser estimuladas con carbacol, un 36% de las células mostraron una disminución de la concentración de calcio intracelular (Fig. 14 F).

La observación más importante fue que el  $H_2O_2$  inhibió el efecto colinérgico en presencia de glucosa. Las mediciones de calcio indicaron que la disminución de la secreción de insulina corresponde a una capacidad reducida para liberar calcio desde depósitos intracelulares (Figs. 15 y 17). Lo más probable que esta disminución pueda deberse a que altas concentraciones de  $H_2O_2$  podrían afectar los pasos iniciales de la vía colinérgica, ya sea en el receptor muscarínico o en la producción de  $IP_3$  o en la sensibilidad del receptor de  $IP_3$ . Además, altas concentraciones de  $H_2O_2$  podrían provocar un daño oxidativo en las proteínas y de esta forma interferir con su funcionamiento (Rodrigo y Rivera, 2003).

Sin embargo, no podemos eliminar la posibilidad que el  $H_2O_2$  afecte el retículo endoplasmático directamente, disminuyendo el nivel de calcio almacenado de manera que la activación de los receptores de  $IP_3$  no produzca un aumento significativo de calcio intracelular.

También se ha investigado el estrés oxidativo en otros tipos de tejidos, tales como, células musculares cardíacas de ratas y células musculares de vejiga en cerdos, entre otros (Peters *et al.*, 2001; Jongh *et al.*, 2007). Donde concluyen que el estrés oxidativo afecta la contractibilidad muscular, principalmente por daños en los receptores muscarínicos afectando la cascada de señales intracelulares frente a una estimulación colinérgica.

Por lo tanto, los resultados indican que, además de interferir con la capacidad de las células  $\beta$  pancreáticas para responder a la glucosa, el  $H_2O_2$  también inhibe la respuesta a otra señal importante, la acetilcolina.

La aplicación de NAC bloqueó el efecto del  $H_2O_2$  sobre la vía colinérgica (Fig.12), indicando que dicho efecto del  $H_2O_2$  se debe al estrés oxidativo.

Es importante destacar que NAC no inhibe el aumento relativo producido por CCh, ya que al ver el índice de estimulación por CCh en 27,7 mM de glucosa, se obtienen los valores de 3,8 con NAC y 3,2 sin NAC (Fig.13). Esta observación indica que, si bien un exceso de ROS causa trastornos en la vía colinérgica de secreción de insulina, las ROS no tienen un rol fisiológico importante en esta vía, en este aspecto la vía colinérgica difiere de la vía de GSIS.

Para concluir, los datos demuestran que las ROS tienen un rol importante y complejo en la función de las células  $\beta$  pancreáticas. Por una parte, experimentos de secreción de insulina con NAC indican que las ROS son necesarias para responder de manera óptima a la glucosa, en concordancia con Pi *et al.*, (2007). Por otra, un exceso de ROS produce un daño parecido a la glucotoxicidad que incluye un aumento de la secreción basal, la pérdida de la GSIS y también una inhibición de la respuesta colinérgica. Los resultados son importantes porque sugieren que el estrés oxidativo asociado con la resistencia insulínica afecta más que la viabilidad celular. Además, afecta en forma negativa la respuesta secretora a nutrientes y señales neuro-hormonales, lo que podría contribuir a la falla del control glicémico asociado con la Diabetes mellitus tipo 2. Los antioxidantes podrían proteger contra este daño, pero tienen que ser utilizados a una concentración apropiada para no inhibir la GSIS.

## CONCLUSIONES.

- Las ROS participan como señales fisiológicas en la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS), pero no en la vía colinérgica.
- El exceso de ROS produce un aumento en la secreción basal de insulina y una pérdida de la secreción estimulada por glucosa.
- El aumento en la secreción basal de insulina en presencia de  $H_2O_2$  se debe a un aumento en la concentración de calcio intracelular.
- La inhibición de la vía colinérgica por  $H_2O_2$  es a través de la inhibición de la descarga de calcio intracelular.
- El efecto del  $H_2O_2$  es de aumentar el estrés oxidativo, ya que estos efectos fueron revertidos con NAC.



## BIBLIOGRAFÍA.

1. **AHRÉN, B.; SAUERBERG, P.; THOMSEN, C.** 1999. Increased insulin secretion and normalization of glucose tolerance by cholinergic agonism in high fat-fed mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 277: 93-102.
2. **AHRÉN, B.** 2000. Autonomic regulation of islet hormone secretion- Implications for health and disease. *Diabetologia.* 43: 393-410.
3. **AHRÉN, B.; PACINI, G.** 2005. Islet adaptation to insulin resistance: mechanisms and implications for intervention. *Diabetes Obes. Metab.* 7(1): 2-8.
4. **AMERICAN DIABETES ASSOCIATION.** 2003. Economic Cost of Diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care.* 26(3): 917-932.
5. **ATKURI, K.R.; MANTOVANI, J.J.; HERZENBERG, L.A.; HERZENBERG, L.A.** 2007. *N*-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7(4): 355-359.
6. **ATWATER, I.; MEARS, D.; ROJAS, E.** 1996. Electrophysiology of the Pancreatic  $\beta$ -Cell. **In:** LeRoith, D.; Taylor, S.I.; Olefsky, J.M. (Eds.). *Diabetes Mellitus - A Fundamental and Clinical Text.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, United States of America. pp. 78-102.
7. **BARCELÓ, A.; AEDO, C.; RAJPATHAK, S.; ROBLES, S.** 2003. The cost of Diabetes in Latin America and the Caribbean. *Bull. World Health Organ.* 81(1): 19-28.
8. **CHEESEMAN, K.H.; SLATER, T.F.** 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Brit. Med. Bull.* 49: 481-493.

9. **DURRUTY, P.; GARCÍA DE LOS RÍOS, M.** 2001. Glucotoxicidad lipotóxica: factores en la patogénesis y evolución de la diabetes tipo 2. *Rev. Méd. Chile.* 129(6): 671-679.
10. **EVANS, J.L.; GOLDFINE, I.D.; MADDUX, B.A.; GRODSKY, G.M.** 2003. Are oxidative Stress-Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance  $\beta$ -cell Dysfunction ?. *Diabetes.* 52: 1-8.
11. **GARCÍA DE LOS RÍOS, M.** 2003. Clasificación, Diagnóstico y Pesquisa de la Diabetes Mellitus, Epidemiología de la Diabetes Mellitus. **In:** Diabetes Mellitus. 2ª ed. Fundación de Investigación y perfeccionamiento médico. Santiago, Chile. pp. 23-41.
12. **GAUTAM, D.; HAN, J.; HAMDAN, F.; JEON, J.; LI, J.; CUI, Y.; MEARS, D.; LU, H.; DENG, C.; HEARD, T.; WESS, J.** 2006. A critical role for  $\beta$  cell  $M_3$  muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis *in vivo*. *Cell Metab.* 3(6): 449-461.
13. **GENESER, F.** 2000. Glándulas y secreción. **In:** Histología. 3ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 177-196.
14. **GILON, P.; HENQUIN, J.** 2001. Mechanisms and Physiological Significance of the Cholinergic Control of Pancreatic  $\beta$ -Cell Function. *Endocr. Rev.* 22(5): 565-604.
15. **GRANKVIST, K.; MARKLUND, S.L.; TALJEDAL, I.B.** 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.

16. **GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B.** 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899: 136-147.
17. **HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.** 1995. The definition and measurement of antioxidants and biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 125-125.
18. **HERRERA, E.** 1993. Hormonas pancreáticas y gastrointestinales. **In:** *Elementos de Bioquímica.* McGraw-Hill Interamericana. México DF, México. pp. 927-959.
19. **JAESCHKE, H.** 1995. Mechanism of oxidant Stress-induced acute tissue injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 209: 104-111.
20. **JONGH, R.; HAENEN, G.; VAN KOEVERINGE, G.; DAMBROS, M.; MEY, J.; VAN KERREBROECK.** 2007. Oxidative Stress Reduces the Muscarinic Receptor function in the Urinary Bladder. *Neurourol. Urodyn.* 26(2): 302-308.
21. **KELLY, J.F.; FURUKAWA, K.; BARGER, S.W.; RENGEM, M.R.; MARK, R.J.; BLANC, E.M.; ROTH, G.S.; MATTSON, M.P.** 1996. Amyloid  $\beta$ -peptide disrupts carbachol-induced muscarinic cholinergic signal transduction in cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 6753-6758.
22. **KENDALL, W.; COLLINS, B.; OPARA, E.** 2001. Islet cell transplantation for the treatment of Diabetes Mellitus. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 1 (1): 109-119.

23. **KOMATSU, M.; NODA, M.; SHARP, G.** 1998. Nutrient Augmentation of  $\text{Ca}^{2+}$  -Independent Pathways in Stimulus-Coupling to Insulin Secretion Can Be Distinguished by Their Guanosine Triphosphate Requirements: Studies on Rat Pancreatic Islet. *Endocrinology*. 139(3): 1172-1183.
24. **MAECHLER, P.; JORNOT, L.; WOLLHEIM, C.** 1999. Hydrogen Peroxide Alters Mitochondrial Activation and Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cells. *J. Biol. Chem.* 274(39): 27905-27913.
25. **MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B.** 2003. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17(1): 24-38.
26. **MARTINEZ, G.** 2005. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev. Cubana Farm.* 39(3): 1-11.
27. **MARTINEZ, M.; BARRADO, D.; ZUBILLAGA, M.; HAGER, A.; PAOLI, T.; BOCCIO, J.** 2006. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 40(1): 45-54.
28. **MEARS, D.** 2004. Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J. Membr. Biol.* 200(2): 57-66.
29. **NAKAZAKI, M.; KAKEI, M.; YAEKURA, K.; KORIYAMA, N.; MORIMITSU, S.; ICHINARI, K.; YADA, T.; TEI, C.** 2000. Diverse Effects of Hydrogen Peroxide on Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  Homeostasis in Rat Pancreatic  $\beta$ -cells. *Cell Struct. Funct.* 25: 187-193.

30. **PETERS, S.; SAND, C.; BATINK, H.; PFAFFENDORF, M.; VAN ZWIETEN, H.** 2001. Reactive oxygen species potentiate the negative inotropic effect of cardiac M<sub>2</sub>-muscarinic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 364: 166-171.
31. **PI, J.; BAI, Y.; ZHANG, Q.; WONG, V.; FLOERING, L.M.; DANIEL, K.; REECE, J.M.; DEENEY, J.T.; ANDERSEN, M.E.; CORKEY, B.E.; COLLINS, S.** 2007. Reactive Oxygen Species as a Signal in Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes.* 56(7): 1783-1791.
32. **POITOUT, V.; ROBERTSON, R.** 2002. Minireview: Secondary  $\beta$ -Cell Failure in Type 2 Diabetes-A Convergence of Glucotoxicity and Lipotoxicity. *Endocrinology.* 143(2): 339-342.
33. **POWERS, A.C.** 2006. Diabetes Mellitus. In: Kasper, D.L.; Braunwald, E.; Fauci, A.S.; Hauser, S.L.; Longo, D.L.; Jameson, J.L. (Eds.). *Harrison Principios de Medicina Interna.* 16<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Interamericana. México DF, México. pp. 2367-2397.
34. **RICORDI, C.; STROM, T.** 2004. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenge. *Nature.* 4: 259-268.
35. **ROBERTSON, R.P.; HARMON, J.; TRAN, P.O.; POITOUT, V.** 2004.  $\beta$ -Cell Glucose Toxicity, Lipotoxicity, and Chronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 53: 119-124.
36. **ROBERTSON, R.P.; HARMON, J.S.** 2007. Pancreatic islet  $\beta$ -Cell and oxidative stress: The importance of glutathione peroxidase. *FEBS Letters.* 581(19): 3743-3748.

37. **RODRIGO, R.; RIVERA, G.** 2003. Papel del estrés oxidativo y de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles. Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile. pp. 1-35.
38. **RORSMAN, P.; ELIASSON, L.; RENSTRÖM, E.; GROMADA, J.; BARG, S.; GÖPEL, S.** 2000. The cell physiology of biphasic insulin secretion. *News Physiol. Sci.* 15: 72-77.
39. **RUTTER, G.A.** 2001. Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet  $\beta$ -cell: recent advances. *Mol. Aspects Med.* 22: 247-284.
40. **SADLER, T.W.** 2001. Aparato digestivo. In: Langman Embriología médica con orientación clínica. 8ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 262-293.
41. **SAKAI, K.; MATSUMOTO, K.; NISHIKAWA, T.; SUEFUJI, M.; NAKAMARU, K.; HIRASHIMA, Y.; KAWASHIMA, J.; SHIROTANI, T.; ICHINOSE, K.; BROWNLEE, M.** 2003. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem. Biophys. Res. Común.* 300: 216-222.
42. **SATO, Y.; HENQUIN, J.** 1998. The  $K^+$ -ATP Channel-Independent Pathway of Regulation of Insulin Secretion by Glucose: In Search of the Underlying Mechanism. *Diabetes.* 47(11): 1713-1721.
43. **WHITE, F.; VEGA, J.; AEDO, C.; JADUE, L.; ROBLES, S.; SALAZAR, R.; DELGADO, I.** 2004. El costo de la diabetes en América. In: Simposio sobre economía y diabetes. Sao Paulo, Brasil. 27 septiembre. Organización Pan Americana de la Salud. pp. 1-3.