



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFECTO DE LA AMILINA Y EL ESTRÉS METABÓLICO  
SOBRE LA FUNCIONALIDAD Y VIABILIDAD DE CÉLULAS  $\beta$   
PANCREÁTICAS DE RATÓN

**GAIL ALFSEN TORMEN**

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

PROFESOR GUÍA: ILLANI ATWATER

FINANCIAMIENTO: Proyecto Fondecyt n° 1030611

**SANTIAGO, CHILE**  
2009



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFECTO DE LA AMILINA Y EL ESTRÉS METABÓLICO  
SOBRE LA FUNCIONALIDAD Y VIABILIDAD DE CÉLULAS  $\beta$   
PANCREÁTICAS DE RATÓN

**GAIL ALFSEN TORMEN**

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

NOTA FINAL: .....

PROFESOR GUÍA : DRA. ILLANI ATWATER

PROFESOR CONSEJERO: DR. EDUARDO KESSI

PROFESOR CONSEJERO: DR. HÉCTOR ADARMES

NOTA

7.0 (Siete)  
6.5 (Seis y medio)  
7.0 (Siete)

FIRMA

*[Handwritten signatures]*

SANTIAGO, CHILE  
2009

## INDICE

• Resumen	iv
• Abstract	v
• Introducción	1
• Revisión bibliográfica	3
• Hipótesis y Objetivos	18
• Materiales y Métodos	19
• Resultados y Discusión	23
• Conclusiones	32
• Bibliografía	33

## RESUMEN

La amilina es una hormona de 37 aminoácidos secretada desde las células  $\beta$  pancreáticas junto con la insulina en respuesta a la estimulación de la glucosa. Si bien, cumple varias funciones fisiológicas en nuestro organismo, durante el estrés metabólico asociado a etapas prediabéticas, la amilina empieza a agregarse formando fibrillas y depósitos amiloides, relacionados con pérdida de masa y función de las células  $\beta$ . Esta citotoxicidad estaría dada por la unión y la pérdida de integridad de la membrana plasmática que conduce a la formación de canales iónicos que desestabilizarían el ambiente intracelular.

Se estudió el efecto de amilina sobre la viabilidad y funcionalidad en células Min – 6, midiendo producción de insulina y porcentaje de toxicidad. Se postula que la inserción del péptido a la membrana se produciría en células dañadas producto del estrés. Se evidenció una alta toxicidad de amilina en todas las condiciones, con una potenciación de su efecto nocivo en células expuestas a un medio alto y bajo en glucosa y en presencia de un inhibidor del metabolismo celular. También, se observó un efecto protector del ión zinc que actuaría bloqueando los canales formados por amilina, reduciendo su toxicidad. No se encontraron condiciones adecuadas para medir secreción de insulina.

Se concluye que amilina se inserta en membranas de células  $\beta$  débiles, formando canales los cuales son bloqueados por  $Zn^{2+}$ , en forma parecida a la acción del péptido  $\beta$  amiloide en cerebro.

## ABSTRACT

Amylin is a 37 amino acid hormone secreted from the pancreatic  $\beta$  cells with insulin in response to glucose stimulation. Although amylin fulfills several physiological functions in our body, in a state of metabolic stress associated with a prediabetic state, the peptide forms amyloid fibrils and deposits causing loss of  $\beta$  cell mass and function. This cytotoxicity is caused by the interaction with, and disruption of, the plasma membrane, leading to the formation of ion channels that destabilizes the intracellular environment.

The effect of amylin on the functionality and viability of Min – 6 cells was studied by measuring insulin production rate and toxicity. It is proposed that the insertion of the peptide to the membrane occurs preferentially in damaged cells caused by stress. There was a strengthening of the deleterious effect of amylin in all the conditions, with an enhancement of its toxic effect on cells exposed to a both, low and high glucose, together with an inhibitor of cellular metabolism. It was also observed that there was a protective effect of zinc ions that would act by blocking the channels formed by amylin reducing its toxicity. There were not found adequate conditions to measure insulin secretion.

It is concluded that amylin is inserted into the membranes of weak  $\beta$  – cells and forms ion channels which are blocked by  $Zn^{2+}$ , similar to the action of  $\beta$  – amyloid in brain.

## INTRODUCCIÓN

Los depósitos amiloides son complejos de proteínas insolubles encontrados en tejidos específicos de un número de enfermedades conocidas como amiloidosis. Los péptidos citotóxicos que forman estos depósitos han sido implicados en la muerte celular asociada con la enfermedad de Alzheimer, la diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) y la encefalopatía espongiiforme, entre otras (Makin y Serpell, 2004; Quist *et al.*, 2005). Varios estudios han mostrado que los péptidos amiloides inducen la formación de canales catiónicos en la membrana celular, con el consiguiente influjo de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), provocando una pérdida de la homeostasis del calcio intracelular, lo que conduciría a muerte celular por apoptosis. Sin embargo, los mecanismos que controlan la formación de canales catiónicos son desconocidos (Bai *et al.*, 1999; Quist *et al.*, 2005). Datos preliminares del laboratorio de Neuroendocrinología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, indican que los péptidos amiloides forman canales preferencialmente en células que están en condiciones de estrés metabólico, debido a cambios en la distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática.

La amilina es un péptido amiloide que se ha encontrado en los islotes pancreáticos en el 90% de los pacientes con DM 2 a la autopsia, con una fuerte correlación entre el grado de depósito amiloide y la severidad de la enfermedad. Del total de individuos con diabetes mellitus, que según datos de la Organización Mundial de la Salud para el año 2000 tuvo una prevalencia de 171 millones de personas a nivel mundial y de 495 mil en Chile, el 90% desarrolla diabetes tipo 2, constituyendo una de las enfermedades de mayor impacto a nivel mundial, con un costo estimado por concepto de tratamientos y atención de complicaciones que alcanza los 100 billones de dólares anuales y, con una tendencia de ascenso en su incidencia condicionada por los cambios en el estilo de vida que conducen a sobreingesta, sedentarismo y obesidad, y por lo tanto, a un mayor número de

diabetes, estimando que para el año 2030 la cifra de personas afectadas alcanzaría los 366 millones de individuos (Bai *et al.*, 1999; WHO, 2000; Pallardo, 2001; Wild *et al.*, 2004; Brunton, 2008). Es de gran importancia, por lo tanto, entender los mecanismos involucrados en la patogénesis de la DM 2 y buscar nuevas terapias.

Existe una fuerte correlación entre la magnitud del depósito amiloide y el grado de pérdida de masa celular  $\beta$ , asociado con defectuosa secreción de insulina e incremento de la glicemia en ayunas. Estos antecedentes sugieren una relación cercana entre el depósito amiloide con el desarrollo y progresión de la DM2 (Marzban *et al.*, 2003; Hull *et al.*, 2004).

La realización de este proyecto pretende entregar herramientas que permitan entender los depósitos amiloides y su participación en la patogénesis de la DM 2, evaluando el efecto de la amilina sobre la viabilidad y función de una línea de células  $\beta$  pancreáticas, la cual será sometida a estrés metabólico, entendiendo por estrés, en este caso particular, una disminución de la capacidad energética de la célula al tener menor disponibilidad de ATP. Se espera evidenciar una relación entre el estado energético celular y los efectos de amilina sobre la secreción de insulina y la viabilidad, parámetros importantes ya que se relacionan directamente con la funcionalidad celular  $\beta$  y, por lo tanto, tienen impacto directo en la fisiopatología de la DM 2.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El páncreas es una glándula de gran tamaño compuesta por dos tipos principales de tejidos, los acinos, que secretan jugos digestivos al duodeno, y los islotes pancreáticos, que secretan principalmente insulina y glucagón directamente a la sangre. El páncreas humano tiene 1 a 2 millones de islotes pancreáticos, de tamaño variable, con un promedio de 0.3 mm de diámetro, dispuestos alrededor de pequeños capilares en los que sus células secretan sus hormonas. Los islotes contienen tres tipos principales de células, alfa, beta y delta. Las células  $\beta$ , que constituyen aproximadamente el 60% de todas las células, están situadas en el centro del islote y secretan insulina (Guyton y Hall, 2006).

La insulina fue aislada por primera vez del páncreas en 1922 e históricamente se ha relacionado con el “azúcar de la sangre” al ejercer poderosos efectos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono. Inicialmente se sintetiza como un polipéptido precursor con una única cadena de 86 aminoácidos. El procesamiento proteolítico posterior elimina el péptido señal amino terminal, generando la proinsulina, que por escisión de un fragmento interno da lugar a la insulina, la cual está compuesta por dos cadenas de aminoácidos, la cadena A de 21 aminoácidos y la B de 30 aminoácidos, conectadas entre sí por puentes disulfuro (Guyton y Hall, 2006; Powers, 2006).

La insulina es almacenada en los gránulos secretorios de las células  $\beta$  y es secretada a la sangre principalmente en respuesta a la estimulación por parte de la glucosa cuando es introducida a las células  $\beta$  por el transportador GLUT2. La glucosa es fosforilada por la glucoquinasa siguiendo la vía glicolítica y generando ATP, el que inhibe la actividad del canal de  $K^+$  sensible a ATP, induciendo la despolarización de la membrana de la célula  $\beta$ , lo que abre canales de calcio dependientes de voltaje, gatillando la exocitosis de la insulina. Las características

de secreción de insulina representan un patrón pulsátil de descarga aproximadamente cada 10 minutos superpuestas a oscilaciones de mayor amplitud de 80 a 150 minutos (Cartailler, 2004; Powers, 2006).

En sangre, circula prácticamente en su totalidad en forma libre, tiene una vida media plasmática de 6 minutos, y en su mayor parte se elimina de la circulación en 10 a 15 minutos. La insulina que no se une a los receptores de las células blanco es degradada por la enzima insulinasa, principalmente en el hígado, en menor medida en músculo y riñones, y muy poco en la mayoría de tejidos restantes (Cartailler, 2004; Guyton y Hall, 2006).

El receptor de insulina es una combinación de cuatro subunidades, dos subunidades alfa situadas en la parte externa de la membrana y dos subunidades  $\beta$  que atraviesan la membrana sobresaliendo hacia el citoplasma celular. La insulina se liga a las subunidades alfa lo que conduce a que las subunidades  $\beta$  se autofosforilen, convirtiéndose en una enzima activa, una proteinkinasa que causa la fosforilación de otras enzimas intracelulares (Guyton y Hall, 2006). Una de las vías que sigue la cascada de reacciones de fosforilación y desfosforilación es la activación de la quinasa de fosfatidilinositol – 3' (quinasa de PI – 3') que estimula la transposición de los transportadores de glucosa GLUT4 a la superficie celular para la captación de glucosa (Powers, 2006). Los efectos de la unión de la insulina a los receptores de membrana conducen en sólo segundos a que el 80% de las células del cuerpo se vuelvan permeables a la glucosa, especialmente en células musculares y adipocitos, con la excepción de la mayor parte de las neuronas del encéfalo (Guyton y Hall, 2006).

La insulina puede aumentar la tasa de transporte de glucosa al interior del músculo en reposo hasta 15 veces, pero la mayor parte de la glucosa absorbida es almacenada en el hígado promoviendo la síntesis de glucógeno. Si la cantidad de glucosa absorbida es mayor a la que se puede almacenar en forma de glucógeno, la insulina promueve la conversión de este exceso en ácidos grasos.

Inhibe también la gluconeogénesis, disminuyendo la cantidad y actividad de las enzimas hepáticas necesarias para ella, junto con reducir la liberación de aminoácidos por el músculo y otros tejidos extrahepáticos, con los que disminuye la disponibilidad de precursores. Por el contrario, en estado de ayuno, las concentraciones bajas de insulina incrementan la producción de glucosa al promover la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepáticas (Guyton y Hall, 2006; Powers, 2006).

Al nivel normal de glicemia en ayunas de 80 a 90 mg/dL la tasa de secreción de insulina es mínima, del orden de los 25 ng/min/kg de peso corporal, lo que solamente tiene una ligera actividad fisiológica. Si la glicemia se eleva repentinamente a un nivel de dos a tres veces el normal, se produce la secreción de insulina en un proceso bifásico. La primera fase de secreción produce un aumento de la concentración de insulina plasmática de casi 10 veces en 3 a 5 minutos que corresponde a la liberación inmediata de insulina preformada por las células  $\beta$ . Sin embargo, esta tasa no se mantiene, disminuyendo la secreción de insulina aproximadamente la mitad en otros 5 a 10 minutos. Luego de 15 minutos aproximadamente, se inicia la segunda fase de secreción de insulina, cuando los valores de glicemia se sitúan entre 400 y 600 mg/dL, que alcanza una nueva meseta en dos a tres horas, con una tasa de secreción de 10 a 25 veces sobre el nivel basal. Esta secreción se debe tanto a la liberación de más insulina preformada como a la activación del sistema enzimático que sintetiza y libera nueva insulina de las células. La interrupción de la secreción de insulina es igualmente rápida, produciéndose entre los 3 a 5 minutos siguientes de la reducción de la glicemia a los niveles de ayuno (Cartailler, 2004; Guyton y Hall, 2006).

Una falla en cualquiera de los componentes involucrados en la acción de la insulina, así como cualquier injuria sufrida por la célula  $\beta$ , conducen a un aumento de la glicemia.

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por hiperglicemia, lo que conduce a importantes lesiones debidas a complicaciones vasculares, como retinopatía, nefropatía, neuropatía, enfermedades cardíacas y apoplejía. Hay dos tipos principales de diabetes: la diabetes de tipo 1 producida por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$ , y caracterizada por ausencia en la producción de insulina, y la diabetes de tipo 2, debida a que el organismo no utiliza eficazmente la insulina (Powers, 2006; Brunton, 2008; WHO, 2008).

En la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está disminuida la capacidad de la insulina para actuar con eficacia sobre tejidos blanco periféricos y es el resultado de una combinación de susceptibilidad genética y obesidad. Esta enfermedad es caracterizada por tres alteraciones fisiopatológicas, resistencia periférica a la insulina, trastorno de la secreción de insulina y aumento de la producción hepática de glucosa. La resistencia a la insulina precede a los defectos de su secreción y la diabetes se desarrolla sólo si se torna inadecuada la secreción de insulina. En las fases tempranas del trastorno, la tolerancia a la glucosa parece normal, a pesar de la resistencia a la insulina, porque las células  $\beta$  pancreáticas compensan aumentando la producción de insulina, lo que es llamado adaptación del islote a la insulinoresistencia. A medida que avanza la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensadora, la adaptación se vuelve inadecuada, desarrollándose entonces el trastorno de tolerancia a la glucosa (TTG), caracterizado por grandes elevaciones de la glicemia postprandial. Cuando declina aun más la secreción de insulina y aumenta la producción hepática de glucosa, aparece la diabetes manifiesta con hiperglicemia en ayuno (Ahrén y Pacini, 2005; Powers, 2006; Brunton, 2008).

Actualmente la patogenia de la resistencia a la insulina se centra en un defecto de la señalización de la quinasa de PI-3, que reduce la transposición del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática. Puede contribuir a la patogénesis las concentraciones elevadas de glucosa y ácidos grasos libres, aspecto frecuente en obesidad, ya que pueden obstaculizar el empleo de glucosa

por el músculo esquelético, promover la producción hepática de glucosa y trastornar la función de la célula  $\beta$  (Marzban *et al.*, 2003; Robertson, 2004; Powers, 2006). Se ha observado que cuando la glicemia es mantenida en niveles de 280 mg/dL los pacientes empiezan a desarrollar resistencia a la insulina (Durruty y de los Ríos, 2001).

Finalmente, las células  $\beta$  fallan al producirse una sobrecarga en su función secretora, conduciendo a una disminución en la secreción de insulina y/o una reducción en la masa celular  $\beta$ , lo que se suma a la toxicidad inducida por la glucosa y los ácidos grasos libres (Marzban *et al.*, 2003; Powers, 2006).

Un número creciente de evidencia sugiere que el amiloide de amilina presente en los islotes pancreáticos tiene un importante rol en la disminución de la funcionalidad de las células  $\beta$ , en la pérdida de masa celular  $\beta$  y en el desarrollo de hiperglicemia en la DM 2 (Marzban *et al.*, 2003; Hull *et al.*, 2004; Höppener *et al.*, 2008).

La sustancia amiloide presente en los islotes está constituida mayormente por un péptido llamado “amilina” o “PPAI” (polipéptido amiloide de los islotes) en asociación con otros componentes, componente sérico amiloide P (SAP), apolipoproteína E (apo E) y heparan sulfato, factores que contribuyen a la estabilización de las fibrillas, los que se depositan preferentemente en el espacio extracelular. Se han hallado estas moléculas también en otros depósitos amiloides, como las placas seniles en la enfermedad de Alzheimer, sugiriendo que un mecanismo similar puede estar involucrado en la formación amiloide de diferentes estados patológicos (Hull *et al.*, 2004).

La amilina es una hormona neuroendocrina compuesta por 37 aminoácidos producida en las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos. La función fisiológica de la amilina todavía no está totalmente clara, pero sus acciones biológicas propuestas incluyen sensibilización de los tejidos a la insulina, supresión de la producción de

glucagón, reducción de los niveles de glucosa y de la producción hepática de glucosa postprandiales, reducción en el tiempo de vaciamiento gástrico, inducción de saciedad mediada a nivel central y regulación de la filtración renal. Concentraciones de amilina suprafisiológicas han mostrado inhibir tanto la secreción como la acción de la insulina (Young y Denaro, 1998; Bai *et al.*, 1999; Marzban *et al.*, 2003; Makin y Serpell, 2004; Hull *et al.*, 2004, Hoogwerf *et al.*, 2008).

La síntesis de amilina ocurre en paralelo a la de la insulina en las células  $\beta$  y se inicia, en ambos casos, a partir de un precursor: preproinsulina y preproPPAI. Al igual como ocurre con la insulina, los niveles de amilina se elevan en condiciones asociadas a resistencia a la insulina, como obesidad y preñez; del mismo modo, en estados de TTG y DM 2, la liberación de amilina esta disminuida en respuesta a una carga oral de glucosa (Hull *et al.*, 2004).

El precursor de amilina o preproPPAI es un péptido compuesto por 89 aminoácidos que contiene una señal amino terminal. Una vez que la señal es removida, se genera un péptido de 67 aminoácidos conocido como proPPAI el cual es procesado dentro de los gránulos secretores de la célula  $\beta$ . Como ocurre con la proinsulina, el procesamiento normal de la proPPAI depende de la división de 2 sitios de las regiones (amino) NH<sub>2</sub> – terminal y (carboxi) COOH – terminal mediadas por la acción de las enzimas prohormonas convertasas PC2 y PC3, respectivamente. La amilina madura es secretada desde las células  $\beta$  junto a la insulina, siendo los niveles de amilina, inmediatamente después de la liberación en respuesta a la estimulación por parte de los nutrientes, alrededor del 1% de los niveles de insulina, lo que reflejaría la proporción de estos dos péptidos existente dentro del gránulo secretor de la célula  $\beta$  (Marzban *et al.*, 2003; Hull *et al.*, 2004).

La secuencia aminoacídica de la amilina es capaz de formar fibras amiloides sólo en humanos, primates no humanos y gatos, debido a la presencia de una región amiloidogénica en la porción media de la amilina (aminoácidos en la

posición 24 – 28) (GAILS) que ha mostrado ser necesaria para la formación de laminas  $\beta$  – plegadas y así fibras amiloides (Marzban *et al.*, 2003; Makin y Serpell, 2004; Hull *et al.*, 2004; Khemtémourian *et al.*, 2008). En estas especies el depósito de fibras amiloides precede al aumento de la glicemia en ayunas, sugiriendo que la lesión amiloide en el islote ocurre tempranamente en la patogénesis de la DM 2 (Hull *et al.*, 2004).

La forma común de diabetes mellitus que se desarrolla espontáneamente en gatos es muy similar a la manifestación clínica y patológica de la DM 2 en humanos. El típico gato diabético es obeso y de mediana edad, sus niveles de insulina son bajos, pero detectables y se ha observado amiloidosis en los islotes pancreáticos en casi todos los ejemplares que presentan la patología (O’Brien, 2002).

Varios mecanismos han sido propuestos para la formación de amiloide en la DM 2. Se ha evidenciado en diversos modelos animales que el incremento en la producción y secreción de amilina asociado con el incremento en la demanda de insulina puede resultar en acumulación y agregación de amilina (Marzban *et al.*, 2003). Un estudio en el cual se indujo diabetes mellitus en gatos, demostró que al inducir hipersecreción de amilina se desarrolla siempre amiloidosis, en contraste con gatos a los cuales se les administro insulina, donde la secreción de amilina fue mínima (O’Brien, 2002). Pero el aumento en los niveles de secreción de amilina es insuficiente para la formación amiloide; así se ha descrito en ratones transgénicos con células  $\beta$  que expresan amilina humana (PPAIh), que desarrollan depósitos amiloides sólo si hay predisposición genética o factores ambientales asociados, como dieta alta en grasas u obesidad genética e hiperlipidemia, si están presentes también en adición a la expresión de la amilina humana. Estos descubrimientos sugieren que la expresión de PPAI es importante, pero no suficiente para la formación de amiloide en la DM 2 (Marzban *et al.*, 2003; Höppener *et al.*, 2008).

Una mutación de la amilina humana puede facilitar el proceso de agregación por una alteración indeseable en su estructura, si bien, no es requerida para el desarrollo de amiloidosis. Esta hipótesis se sostiene en el hallazgo de una mutación en la posición 20 (S20G) en la molécula de PPAI, descrita en un grupo de personas con DM 2 en Japón, asociada con un comienzo más temprano y una forma más severa de la enfermedad (O'Brien, 2002; Marzban *et al.*, 2003; Hull *et al.*, 2004).

Otro mecanismo potencial para la formación de amiloide en la DM 2 es un procesamiento defectuoso en la molécula precursora de amilina, proPPAI, que puede conducir a la célula  $\beta$  a una hipersecreción de formas no procesadas o parcialmente procesadas, las que pueden tener una alta tendencia a la agregación en comparación al PPAI maduro. Se ha propuesto que la secreción de formas no procesadas de proPPAI, con  $\text{NH}_2$  – terminales extendidos, contienen dominios de unión para heparan sulfato, formando un nido para la formación amiloide. Todavía es desconocido cómo el procesamiento de proPPAI es defectuoso en la DM 2. Hay que considerar el hecho de que el procesamiento de la proinsulina es defectuoso en esta enfermedad y que ambos ocurren en paralelo. Es aceptable que la hiperglicemia y/o la hiperlipidemia asociada con la DM 2, que inducen cambios pro-inflamatorios y pro-oxidativos, pueden contribuir a la formación amiloide insular indirectamente al alterar la actividad de PC2 y PC3, produciendo una secreción incrementada de proPPAI (Marzban *et al.*, 2003; Hull *et al.*, 2004, Brunton, 2008).

Cualquiera sea el mecanismo que desencadena el mal procesamiento proteico de la amilina, la formación del amiloide se inicia al producirse un cambio de conformación de la estructura secundaria de la proteína, desde su estructura normal de  $\alpha$  – hélice hacia la de lámina  $\beta$  – plegada, con lo que la proteína pierde solubilidad y constituye el núcleo de precipitación para la formación amiloide. Secreción desproporcionada de proPPAI incompletamente procesada y su siguiente unión al heparan sulfato de las membranas basales puede inducir

cambios conformacionales en la proamilina a favor de la formación de lámina  $\beta$  y la iniciación del depósito amiloide (Marzban *et al.*, 2003; Makin y Serpell, 2004; Hull *et al.*, 2004; Khemtémourian *et al.*, 2008).

Este cambio de conformación es un mecanismo de patogenicidad común entre los diferentes péptidos amiloides, si bien las proteínas que conforman estos depósitos no muestran similitud ya sea en su secuencia, plegado o función. El cambio de conformación en la amilina parece estar relacionado con la disfunción de la célula  $\beta$ , debido al incremento en la demanda secretora inducida por obesidad y/o insulina resistencia, junto a una dañada función celular  $\beta$  (Marzban *et al.*, 2003; Hull *et al.*, 2004). Tanto el pH como la concentración de calcio en el ambiente intracelular son estrechamente controlados para permitir el correcto procesamiento y maduración de la insulina y la amilina; la alteración de cualquiera de estos factores ha mostrado alterar la formación de las fibras de amilina, sugiriendo que el normal ambiente del gránulo secretor mantiene a la amilina soluble (Hull *et al.*, 2004).

Si bien varios estudios *in vitro* han demostrado que tanto la acumulación extracelular de amilina como la intracelular esta asociada con muerte celular  $\beta$ , los mecanismos por los cuales es producida todavía no son bien entendidos. La primera forma en que la amilina produce muerte celular es por apoptosis, mediante la interacción de las fibras amiloides con la membrana celular que conduciría a una activación de caspasas intracelulares específicas, las primeras mediadoras intracelulares de apoptosis (Marzban *et al.*, 2003). La acumulación externa de estos péptidos además induciría citotoxicidad por unión del péptido y disrupción de la membrana plasmática, la unión inicial a la membrana puede acelerar la formación amiloide al permitir la formación o estabilización de un núcleo, siendo las etapas iniciales de la formación amiloide de mayor toxicidad, ya que los ensamblajes prefibrilares solubles de amilina han mostrado ser la forma molecular más crítica en unión y disrupción de bicapas lipídicas de la membrana plasmática conduciendo a la formación de poros ión – permeables. Este es un

mecanismo no específico debido a la desestabilización del ambiente iónico intracelular y la generación de radicales libres (NADH oxidasa, glutatión reductasa), induciendo toxicidad, a la que la célula  $\beta$  no responde bien debido a la baja cantidad de enzimas antioxidantes (Hull *et al.*, 2004; Engel *et al.*, 2008; Höppener *et al.*, 2008; Khemtémourian *et al.*, 2008).

Los canales formados por la amilina son escasamente selectivos, y se ha demostrado que son permeables para  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ . El influjo no regulado de calcio a través de estos “canales amiloides” formados espontáneamente pueden proveer un mecanismo que explica la toxicidad responsable de inducir apoptosis (Kawahara *et al.*, 2000; Kourie y Shorthouse, 2000; Marzban *et al.*, 2003).

Se ha descrito en células neuronales expuestas a péptidos amiloides, una marcada elevación de los niveles de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), observándose variaciones en la respuesta según el péptido amiloide con el que fue tratada la célula, pero también diferencias entre células tratadas con el mismo péptido, lo que sugiere una susceptibilidad individual en la célula blanco, dependiendo de la composición lipídica y proteica de la membrana plasmática (Kawahara *et al.*, 2000).

En la formación de estos canales amiloides se propone el modelo de que los péptidos se insertan en la membrana en asociación con fosfolípidos negativos ya que tienen alta afinidad por ellos, debido a la presencia de residuos cargados positivamente (como lisina y arginina) localizados en la porción N – terminal de la amilina, los que le confieren una carga catiónica al péptido (Kourie y Henry, 2002; Khemtémourian *et al.*, 2008). Membranas artificiales que contenían un 40% de fosfolípidos negativos fueron aproximadamente seis veces más sensibles a la formación de canales por amilina que aquellas que sólo contenían un 20% (Kourie y Shorthouse, 2000). Al caracterizar la actividad formadora de canales del péptido  $\beta$  amiloide (A $\beta$ P) se evidenció que se comporta de manera similar tanto en

bicapas lipídicas artificiales como en membranas celulares (Kawahara *et al.*, 1997).

En células vivas la distribución de lípidos en la membrana es asimétrica. Los lípidos que contienen colinas, fosfatidilcolina (FC) y esfingomielinina (EM), se encuentran en la cara externa de la membrana plasmática. Por el contrario, los lípidos que contienen aminas, fosfatidiletanolamina (FE) y fosfatidilserina (FS), están localizados de preferencia en la cara citoplasmática. Esta asimetría es generada primero por la síntesis selectiva de lípidos en el retículo endoplásmico, siendo necesaria la acción de transportadores de lípidos que distribuyen a los fosfolípidos a través de la membrana. La mantención de esta asimetría es esencial para el normal funcionamiento de la membrana. Las cargas ácidas se mantienen en la cara interna de la membrana debido a la presencia de sitios de anclaje que actuarían secuestrando las FS. El transporte pasivo previene la difusión espontánea transmembrana, ya que toma entre horas a días y depende de la naturaleza del lípido y de la membrana. Sin embargo, la mayor contribución a mantener la asimetría se debe a la acción de proteínas transportadoras de lípidos ATP – dependientes, *Flipasas* y *Flopasas*. Las *Flipasas* transportan fosfolípidos negativos que han sido expuestos hacia la superficie celular hacia la cara citoplasmática y son altamente selectivas para FS (Daleke, 2003). Estas observaciones sugieren que un déficit energético a nivel celular y la consecuente disminución en la actividad de las *Flipasas*, podría ocasionar la exposición de fosfolípidos negativos al ambiente extracelular formándose el sitio de unión para el péptido. En apoyo de esta hipótesis, datos preliminares del Laboratorio Neuroendocrinología indican que el aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por el péptido amiloide A $\beta$ 40 es mayor en astrocitos expuestos a bajas concentraciones de glucosa.

La formación de estos canales amiloides puede ser bloqueada, ya sea previniendo la interacción inicial del péptido con la membrana o interactuando con el canal ya formado. Esto ocurre por la interacción de cationes bivalentes con la

membrana lipídica, lo que causa que la carga negativa de la membrana sea enmascarada. Una alta concentración iónica ha mostrado reducir la actividad formadora de canales de la amilina (Kourie y Shorthouse, 2000). Los canales son reversiblemente bloqueados por iones zinc ( $Zn^{2+}$ ), cobre ( $Cu^{2+}$ ) y trometamina (Tris), e irreversiblemente bloqueados por ión aluminio ( $Al^{3+}$ ). El rojo Congo inhibe la formación del canal, pero no puede bloquear canales ya insertos en la membrana. Uno de los primeros estudios que evaluaron la interacción entre el canal formado por A $\beta$ P y  $Zn^{2+}$  reveló que el  $Zn^{2+}$  se une a dominios específicos del canal, conduciendo a un bloqueo de este (Kawahara *et al.*, 1997). Se sugiere que el ión zinc puede bloquear el canal en una  $\beta$ -horquilla preformada que contiene tres histidinas (Kagan *et al.*, 2002). Al utilizar como bloqueadores de canales ión zinc y trometamina en la línea celular PC12, derivada de feocromocitoma de rata, tratada con A $\beta$ P se evidenciaron cambios en los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$ , deteniendo el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por A $\beta$ P y, produciendo una notable reducción del  $[Ca^{2+}]_i$  llegando a alcanzar concentraciones normales (Simakova y Arispe, 2006).

Más recientemente varios estudios han levantado controversias en relación a la interacción de estos iones con la membrana plasmática y a su rol como bloqueadores de canales, obteniéndose resultados variados que van desde la inhibición de la formación de canales a la promoción de la formación de laminas  $\beta$ , y por ende, a una mayor formación de amiloide. Si bien, Ward *et al.* en 2008 ha destacado al  $Cu^{2+}$  como un poderoso bloqueador de canales formados por amilina y al  $Zn^{2+}$  como favorecedor del proceso de agregación, se ha señalado en otros estudios tanto al  $Zn^{2+}$  como al  $Cu^{2+}$  como promotores de la enfermedad de Alzheimer a través de la participación en los procesos de agregación de A $\beta$ P y también con una participación directa al formar parte de la estructura del péptido, mientras que otros destacan que no se puede inferir con certeza el rol de estos iones, pudiendo tener un efecto parcialmente protector (Dong *et al.*, 2006; Exley, 2006; Meloni *et al.*, 2008; Tôugu *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2008).

La formación de canales es ahora un mecanismo de patogenicidad de los péptidos amiloides aceptado por un gran número de investigadores, por lo que es de gran importancia establecer los mecanismos que controlan la susceptibilidad celular frente a sus efectos dañinos, así como la identificación de bloqueadores.

La DM2 constituye hoy el mayor problema de salud pública a nivel mundial, los costos financieros y sociales atribuibles a la diabetes y sus complicaciones son sustanciales. Positivamente, un control eficiente de la glicemia ha mostrado reducir la incidencia y progresión de las complicaciones microvasculares asociadas a la diabetes. A pesar de ello, la mayoría de los pacientes no tienen un óptimo control de glicemia, debido a veces al costo de los tratamientos, los efectos secundarios asociados a la terapia, a que la adhesión a regímenes de tratamientos complejos suele ser escasa y a las terapias tradicionalmente utilizadas para reducir los niveles de glicemia, no logran un control efectivo a largo plazo (Green y Feinglos, 2008).

Se hacen necesarias nuevas terapias para el manejo de la DM2, el desarrollo de nuevos fármacos, como los que potencian la vía de las incretinas, y el uso de terapias combinadas, que resultan más efectivas que las monoterapias, ofrecen alternativas y pueden ser significativos en el futuro manejo de la diabetes (Brunton, 2008; Green y Feinglos, 2008).

La evidencia que une la agregación y citotoxicidad de la amilina con una disminución de la masa y función de la célula  $\beta$ , deja ver la importancia de desarrollar métodos para prevenir o disminuir la formación amiloide en el islote. La reducción de la secreción de amilina defectuosa en la DM2, a fin de reducir la formación fibrilar, puede ser un importante blanco de acción. Se recomienda evitar para ello el uso de fármacos secretagogos de la célula  $\beta$  como las sulfonilureas, y potenciar una disminución de la secreción mediante la administración de insulina y el uso de agentes antidiabéticos como la metformina, que actúa suprimiendo la producción hepática de glucosa y aumentando la sensibilidad a la insulina al

mejorar la utilización periférica de glucosa, y la tiazolidinediona, que es administrada para aumentar la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos (Barrueto y Maíz, 2001; Hull *et al.*, 2004, Brunton, 2008). Sin embargo, esto no es suficiente para prevenir el desarrollo de la formación amiloide.

El desarrollo de inhibidores de la formación fibrilar en el islote se encuentra en etapas muy tempranas, y están basados en el desarrollo de pequeñas moléculas como el rojo Congo, o la utilización de iones, que han mostrado inhibir el efecto citotóxico tanto de la amilina como de A $\beta$ P (Kourie y Shorthouse, 2000; Hull *et al.*, 2004). Un blanco promisorio es el desarrollo de inhibidores de la región 20 – 29 que es la que confiere la amiloidogenicidad a la molécula. Péptidos sintéticos que se unen a esta región han mostrado reducir la amiloidogénesis y los efectos citotóxicos de las fibras de amilina, pero no se ha establecido como estos péptidos son capaces de entrar a la célula (Hull *et al.*, 2004).

Puede ser terapéuticamente importante la administración de pramlintida, el análogo sintético de la amilina, ya que tiene efectos similares en la reducción de los niveles postprandiales de glucosa y glucagón, disminuyendo la producción endógena de glucosa en el hígado. También se puede administrar para regular la glicemia después de la ingesta de alimentos debido a que potencia una absorción más lenta de la glucosa, a través de un retraso en el vaciamiento gástrico (Young y Denaro, 1998; Hoogwerf *et al.*, 2008).

Todos estos acercamientos proveen un potencial para la reducción de la formación amiloide en la célula  $\beta$ . Si la lesión precede al diagnóstico, como se cree, el desafío será determinar cuales individuos pueden ser beneficiados por el uso de estas terapias en los estados tempranos de la enfermedad para prevenir la progresiva declinación de la función celular  $\beta$ , caracterizada por el desarrollo y progresión de hiperglicemia.

Se debe enfatizar, sin embargo, que el mayor factor de riesgo en el desarrollo de la DM2 es la obesidad; el incremento de las tasas de obesidad en individuos jóvenes ha permitido un inicio de DM2 a edad temprana, mientras que en el pasado era una enfermedad característica de individuos de edad media y avanzada. Debido a ello, el camino más importante para el apropiado manejo de la diabetes es el cambio en el estilo de vida, con la instauración de un régimen alimenticio apropiado y aumento de la actividad física, que permitan una reducción del peso corporal (Ahrén y Pacini, 2005; Brunton, 2008; Green y Feinglos, 2008).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis**

Las células  $\beta$  pancreáticas expuestas a condiciones que producen una disminución en su actividad metabólica, presentarían una mayor susceptibilidad al daño celular producido por la amilina a través de la formación de canales iónicos.

### **Objetivo General**

Determinar la sensibilidad frente a la amilina en células  $\beta$  pancreáticas, evaluando la relación entre actividad metabólica y sensibilidad celular a la citotoxicidad y la pérdida de función causadas por la amilina.

### **Objetivos Específicos**

1. Cuantificar la citotoxicidad de la amilina en células  $\beta$  pancreáticas cultivadas en distintas condiciones de glucosa y frente a un inhibidor del metabolismo.
2. Determinar el efecto de la amilina y del estrés metabólico sobre la función secretora de las células  $\beta$  pancreáticas.
3. Determinar el efecto protector del ión zinc (un inhibidor de canales formados por péptidos amiloides) en células  $\beta$  pancreáticas tratadas con amilina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivo Celular.** Se utilizó la línea celular MIN – 6 proveniente de células  $\beta$  pancreáticas de *Mus musculus* (ratón). Las células fueron cultivadas en el medio de cultivo recomendado DMEM (GIFCO) el que contiene 450 mg/L de glucosa, suplementado con 15% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina). El medio de cultivo fue cambiado cada 2 a 3 días. Se manejaron en incubación a 37°C con una concentración de 5% de CO<sub>2</sub>.

Una vez que se logró la confluencia, las células fueron disociadas llevándolas a incubación a 37°C por 5 minutos en una solución de tripsina al 0,2%, posteriormente fueron centrifugadas, resuspendidas y contadas en cámara de Neu Bauer, para subcultivar en placas Multiwell de 24 pocillos, obteniendo una densidad de 50.000 células por pocillo. Después del sembrado, las células fueron cultivadas por dos a tres días para posteriormente reemplazar el medio de cultivo a RPMI 1640 sin glucosa (Sigma – Aldrich) suplementado con 10% de SFB y 1% de antibiótico, con el objetivo de cumplir con las condiciones de cultivo propias de los experimentos, en que se debió trabajar con una concentración controlada de glucosa.

La fase experimental se dividió en dos grupos: células tratadas con amilina y células sin amilina. En cada grupo se establecieron 6 subgrupos:

- 2 g/L de glucosa (grupo control),
- 2 g/L de glucosa + Zn,
- 0 g/L de glucosa,
- 0 g/L de glucosa + Zn,
- 6 g/L de glucosa y,
- 2 g/L de glucosa + 10 $\mu$ M de DNP.

De este modo se trabajó con 12 grupos, las condiciones fueron mantenidas por 24 horas.

El Dinitrofenol (DNP) es un agente desacoplante a nivel mitocondrial, porque tiene la capacidad de desacoplar el flujo de los electrones de la síntesis de ATP al descargar la gradiente de protones, por lo que la energía de la transferencia de electrones no se puede usar para la síntesis de ATP.

**Químicos y Reactivos.** Se utilizó amilina (8 – 37) humana obtenida de BACHEM, a una concentración de 10 $\mu$ M por muestra, ZnCl<sub>2</sub> obtenido de Sigma a una concentración de 50 $\mu$ M por muestra.

**Experimentos de Secreción de Insulina.** Luego de 24 horas de cultivo en las condiciones experimentales, se retiró el medio y se adicionó una solución Krebs con 1 g/L de glucosa, realizando una preincubación por 30 minutos a 37°C. Para evaluar la secreción de insulina las células se sometieron a dos condiciones, una solución de baja concentración de glucosa (Krebs con 1g/L de glucosa) y una solución de alta concentración de glucosa (Krebs con 4g/L de glucosa).

Transcurrido el tiempo de preincubación se retiró la solución y se adicionó 1 mL de solución Krebs de baja glucosa, el cultivo fue llevado a incubación a 37°C por una hora. Cumplido el tiempo de incubación, se retiró la solución y se almacenó individualmente por muestra en tubos Ependorff. El procedimiento se repitió agregando 1 mL de solución Krebs de alta glucosa, volviendo a incubar durante una hora. Las muestras colectadas fueron congeladas a -20°C, para medir posteriormente concentración de insulina a través del test de ELISA (Mercodia).

El test de ELISA (Enzyme – Linked Immunosorbent Assay) es un método ampliamente usado para medir la concentración de una molécula en particular, en este caso la insulina, en un fluido. La insulina es detectada por anticuerpos

fabricados en contra de ella, constituyéndose en el antígeno. El anticuerpo se encuentra fijado en la superficie de la placa del test, al cual se une la insulina, para posteriormente adicionar una preparación de los mismos anticuerpos conjugados con una enzima, la cual genera un producto coloreado a partir de un sustrato sin color. De esta manera se crea un "sándwich" anticuerpo – antígeno – anticuerpo. Después de lavar cualquier conjugado no unido, se adiciona el sustrato, para posteriormente detener la reacción y medir la concentración del producto coloreado formado en un espectrofotómetro, en función de la longitud de onda. La intensidad del color es proporcional a la concentración de insulina, el antígeno, unida.

**Ensayos de Viabilidad Celular.** Se trabajó con los 12 grupos antes descritos, los cuales fueron expuestos a las condiciones especificadas de cultivo por 24 horas. Luego, se aplicó en cada muestra el kit Live/Dead (Molecular Probes) que evalúa la viabilidad y citotoxicidad celular. Consiste en un ensayo de fluorescencia de 2 colores, a través de la tinción de las células con una solución que contiene calceína AM y etidio homodímero-1 (EthD-1). La calceína AM no produce fluorescencia, es permeable a la membrana celular y es convertida por la estearasa a calceína, la cual es intensamente fluorescente y es mantenida dentro de las células vivas determinando un intenso color verde (Figura 1a). El EthD-1 se intercala en el ADN de aquellas células que han perdido su integridad de membrana, ya que no es capaz de atravesarla, tiñendo el núcleo de color rojo (Figura 1b). Para cuantificar la fluorescencia emitida se utilizó un microscopio de fluorescencia, el cual permite detectar señales de fluorescencia procedentes de células marcadas, las que posteriormente fueron contadas permitiéndonos determinar el número de células no viables en la muestra.

Para cuantificar la viabilidad celular, ésta es expresada en términos de toxicidad, que refleja el porcentaje de células muertas sobre el total de células de la muestra.

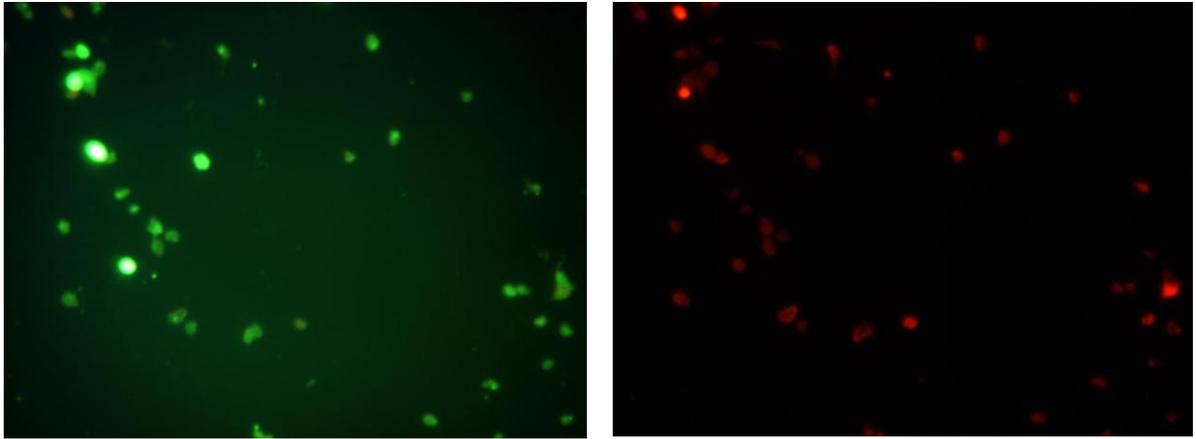


Figura 1a y 1b. En la figura de la izquierda (1a) se observan células teñidas con calceína, mientras que en la derecha (1b) se observan células teñidas con EthD-1.

**Análisis Estadístico.** Se realizaron 6 réplicas para cada condición experimental. Todos los resultados son presentados como media aritmética  $\pm$  error estándar (E.S.). Los datos fueron analizados inicialmente mediante Prueba de t entre pares equivalentes, es decir, entre condiciones con igual medio de cultivo pero dentro de los grupos con o sin amilina. Para establecer diferencias dentro de cada grupo (grupo con amilina y grupo sin amilina) se realizó un Análisis de Varianza o ANDEVA, posteriormente, para determinar el origen de las diferencias, los resultados fueron evaluados a través de la Prueba de Fisher.

Los análisis se realizaron por medio del software InfoStat®.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Experimentos de Secreción de Insulina.** Si bien, como se muestra en el gráfico de secreción (figura 2), se observan diferencias de secreción entre las distintas condiciones experimentales, y dentro de una misma condición se observan diferencias al medir secreción en 1 ó 4 g/L de glucosa, la realización de la prueba de t no estableció diferencias significativas entre pares equivalentes, es decir, entre condiciones tratadas con el mismo medio de cultivo, pero con o sin amilina, por lo que no se puede inferir el efecto de la amilina sobre la secreción de insulina en células MIN – 6 bajo las mismas condiciones experimentales. Sin embargo, lo más relevante es que se observa que la cantidad de insulina recolectada en el medio de secreción de 4 g/L de glucosa, es por lo general menor que la colectada a 1 g/L de glucosa, aunque se esperaría que los valores fueran de mayor magnitud. Esta situación se puede explicar debido a un desplazamiento de la curva de secreción de la insulina hacia la izquierda, lo que produce una liberación alta de insulina en la primera fase de secreción, estimulada por 1 g/L de glucosa. Si bien, en células *in vivo* la secreción de insulina debiera ser basal en la primera etapa del experimento, ya que la primera fase de la secreción es estimulada por 4 g/L de glucosa, el rango de respuesta puede diferir al trabajar con una línea celular, obteniéndose una sensibilidad mayor a la glucosa. Esto se puede explicar debido a que la glucosa entra directamente en contacto con la célula  $\beta$ , a diferencia del trabajo realizado en islotes pancreáticos, en que la glucosa debe difundir hacía el centro del islote que es donde se encuentran, preferentemente, las células  $\beta$  (Guyton y Hall, 2006). Este comportamiento no se observó, sin embargo, en las células tratadas con  $Zn^{2+}$  del grupo sin amilina, lo que sugiere que el ión zinc volvería a desplazar la curva de liberación de insulina hacía la derecha.

Las condiciones en que se observa una mayor producción de insulina en presencia de amilina se debe a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no regulado a la célula, lo que inicialmente induce una mayor secreción de insulina (Cartailler, 2004; Powers, 2006). Posteriormente, en las condiciones de mayor toxicidad en que se aprecia una cantidad mayor de insulina, pueden estar enmascarando una destrucción de la célula y la liberación de la insulina al medio colectado (figura 3).

Los resultados obtenidos del ANDEVA revelan diferencias significativas en el grupo de células en que se trabajó sin amilina ( $p=0,0228$ ). Mediante la prueba de Fisher se establecen que las diferencias se producen entre el grupo control y el grupo tratado con 6 g/L glucosa y, entre el grupo control y el grupo tratado con DNP, lo que evidencia un efecto de glucotoxicidad en el primer caso y en el segundo la toxicidad del DNP sobre el metabolismo celular. Según datos entregados por Yki – Jarvinen (1992), se empezarían a observar los primeros efectos de glucotoxicidad a los 280 mg/dL, y en esta condición se está trabajando con una concentración de 600 mg/dL (Durruty y García de los Ríos, 2001).

Sin embargo, entre las células sometidas a alta glucosa y las sometidas al DNP no se observan diferencias, infiriendo una toxicidad similar entre ambas condiciones.

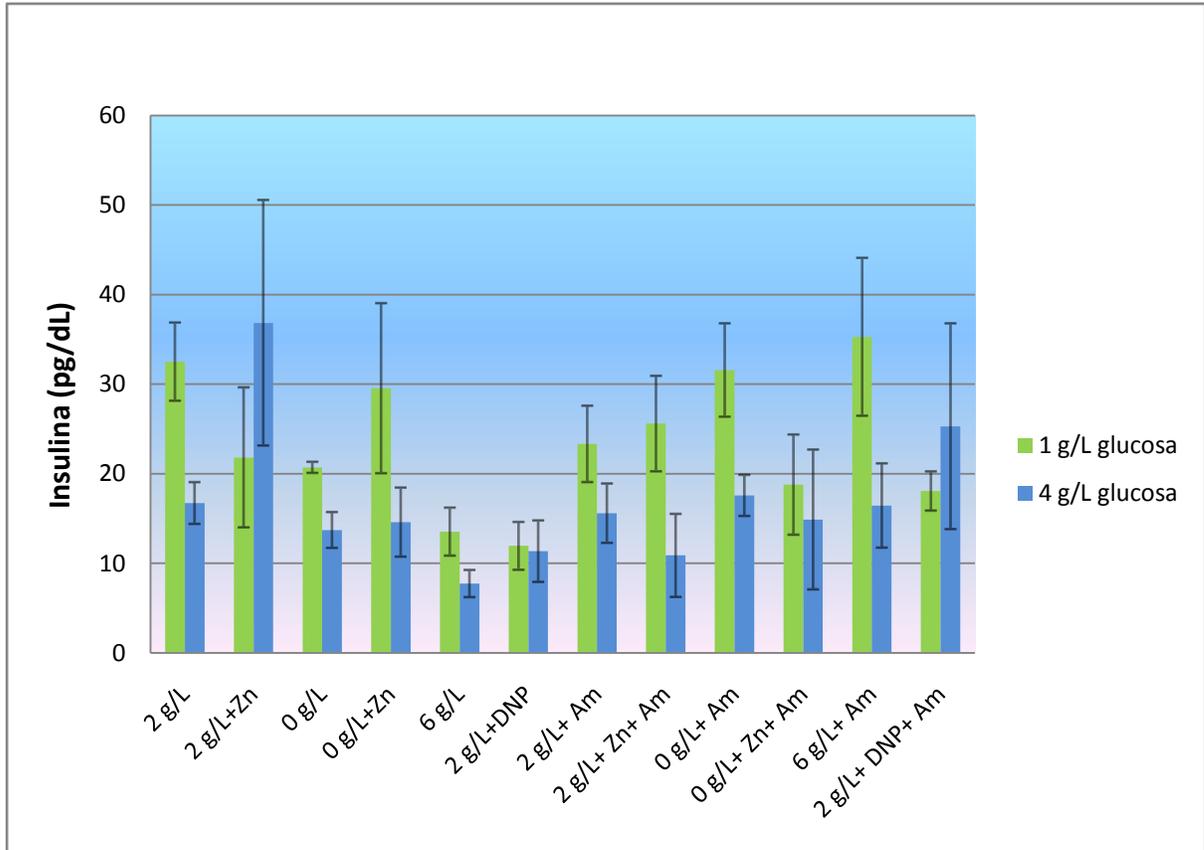


Figura 2. Secreción de insulina en células MIN – 6 cultivadas por 24 horas bajo distintas condiciones. Datos expresados como media aritmética  $\pm$  E.S.

(Medios de cultivo 2 g/L: grupo control, 2 g. glucosa/L; 2 g/L + Zn: 2 g. glucosa/L + 50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>; 0 g/L: sin glucosa; 0 g/L + Zn: 50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>; 6 g/L: 6 g. glucosa/L; 2 g/L + DNP: 2 g. glucosa/L + 10  $\mu$ M DNP; las condiciones posteriores corresponden a las ya descritas a las cuales se adicionaron 10  $\mu$ M de amilina).

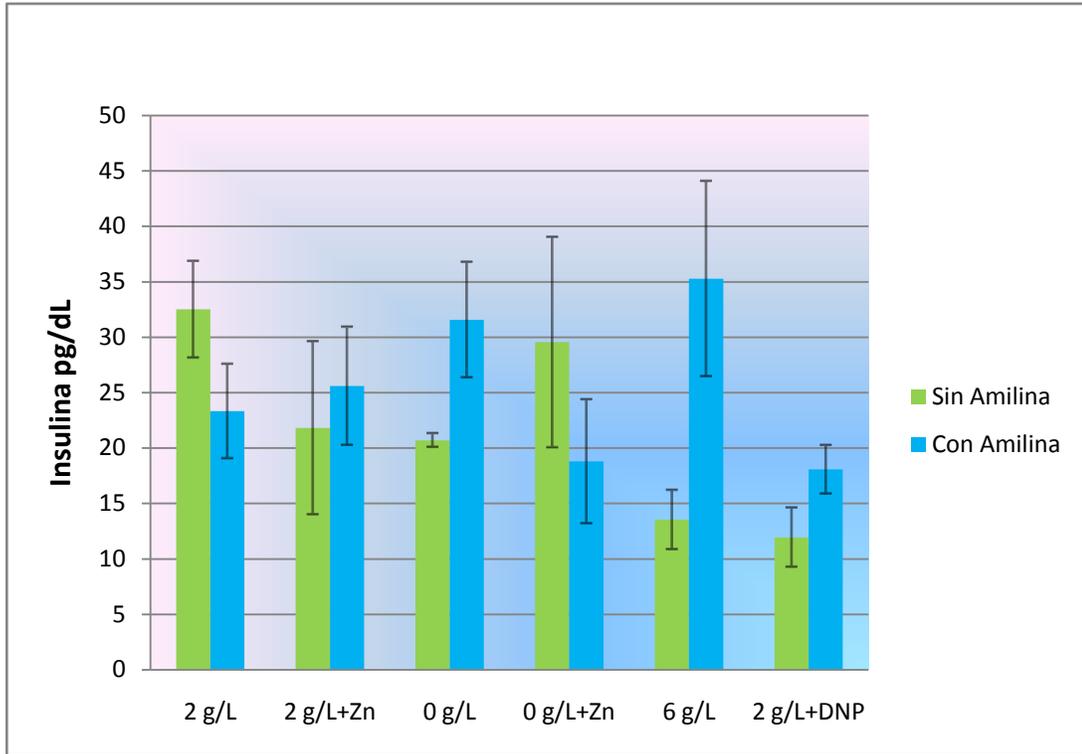


Figura 3. Secreción de insulina en células MIN – 6 estimulada por 1 g/L de glucosa, previamente cultivadas por 24 horas bajo distintas condiciones. Datos expresados como media aritmética  $\pm$  E.S.

**Ensayos de Viabilidad Celular.** La realización de prueba de t concluye que hay diferencias significativas entre los pares de 0 g/L glucosa ( $p=0,0159$ ) y de DNP ( $p=0,0028$ ).

Se observa en la condición de 0 g/L (figura 4 y 5) un aumento en la toxicidad en las células tratadas con amilina, lo que nos permite inferir que este medio de cultivo no suministra la cantidad de glucosa suficiente para el metabolismo celular normal, siendo células susceptibles a la acción de la amilina. Además, la misma condición suplementada con zinc, no muestra la toxicidad de su condición homóloga, sugiriendo un efecto protector de  $Zn^{2+}$  a nivel celular. Estos resultados estarían en concordancia por aquellos obtenidos por Kawahara *et al.* (1997), que describieron que el  $Zn^{2+}$  (en concentraciones entre 50 a 500  $\mu M$ ) puede bloquear canales formados por A $\beta$ P incorporados dentro de membranas neuronales uniéndose a dominios específicos, lo que conduce a atenuar la neurotoxicidad y, con los de Simakova y Arispe (2006), que utilizando concentraciones de 5  $\mu M$  de  $Zn^{2+}$  detuvieron el influjo de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por A $\beta$ P y produjeron una reducción de este hasta alcanzar valores cercanos a los normales. Sin embargo, se contraponen con los de Ward *et al.* (2008), en que se observaba que el  $Zn^{2+}$  a una concentración de 10  $\mu M$  promueve la formación amiloide en células  $\beta$  tratadas con amilina.

La toxicidad del DNP, si bien es alta por si sola, al adicionar amilina al medio de cultivo alcanza su máxima expresión, lo que nos permite determinar que un mayor daño a nivel celular potencia la acción nociva de la amilina.

El ANDEVA determina que hay diferencias significativas tanto en el grupo tratado sin amilina como en el grupo tratado con amilina ( $p<0,0001$  en ambos grupos). La realización de la prueba de Fisher establece que las diferencias se producen en el primer grupo entre la condición control (2 g/L glucosa) y las condiciones de 0 g/L glucosa + Zn, 6 g/L y, DNP. Esto evidencia, al igual que en

los experimentos de secreción, la toxicidad asociada a una alta concentración de glucosa, así como la asociada al DNP, en relación al grupo control.

En experimentos realizados por Walther *et al.* (1999) se estudia la toxicidad del  $ZnCl_2$ , a concentraciones entre 25 – 200  $\mu M$ , sobre una línea de células pulmonares, en que produce una notable reducción (de 60 a 80%) en el glutatión celular y una disminución de la síntesis de proteínas. Esto nos permite inferir que el ion zinc por sí mismo podría tener un efecto nocivo sobre el metabolismo celular, lo que se evidenció en la condición 0 g/L glucosa + Zn. Sin embargo, este resultado se contrapone al realizar el experimento con amilina, en donde se evidencia una disminución de la citotoxicidad inducida por la amilina en presencia del zinc. El zinc se ha descrito como inhibidor de muchas formas de apoptosis, actuando como antiinflamatorio en células endoteliales pulmonares. Estudios realizados por Tang *et al.* (2001), muestran que el Zn inhibe la apoptosis inducida por estrés oxidativo asociado a lipolisacáridos, pero potencia la necrosis inducida por estrés oxidativo asociado a *t* – butil hidroperóxido. Reportes otorgados por Wiseman *et al.* (2007) asocian un aumento del Zn intracelular con disrupción de la función mitocondrial e inducción de apoptosis mediada por estrés oxidativo agudo producida por peróxido de hidrogeno. Estos mecanismos de toxicidad están asociados a una pérdida de la homeostasis del zinc, asociada a una alta concentración de radicales libres, en que el zinc es liberado al medio intracelular gatillando apoptosis, mientras que unido a sus dominios proteicos la previene.

Las células tratadas con DNP difieren, en cuanto a toxicidad, de todas las demás condiciones.

Dentro del grupo tratado con amilina se establecen diferencias entre la condición control (2 g/L glucosa + amilina) y las condiciones de 0 g/L glucosa, 6 g/L glucosa y DNP, infiriendo que medios de cultivo bajos y altos en glucosa, y con un inhibidor del metabolismo, potencian la acción tóxica de la amilina, con la expresión de máxima de toxicidad en el caso del DNP.

Las diferencias entre la condición con 0 gr/L de glucosa versus su homóloga tratada con Zinc, nos permiten evidenciar el rol protector del Zinc frente a la acción de la amilina.

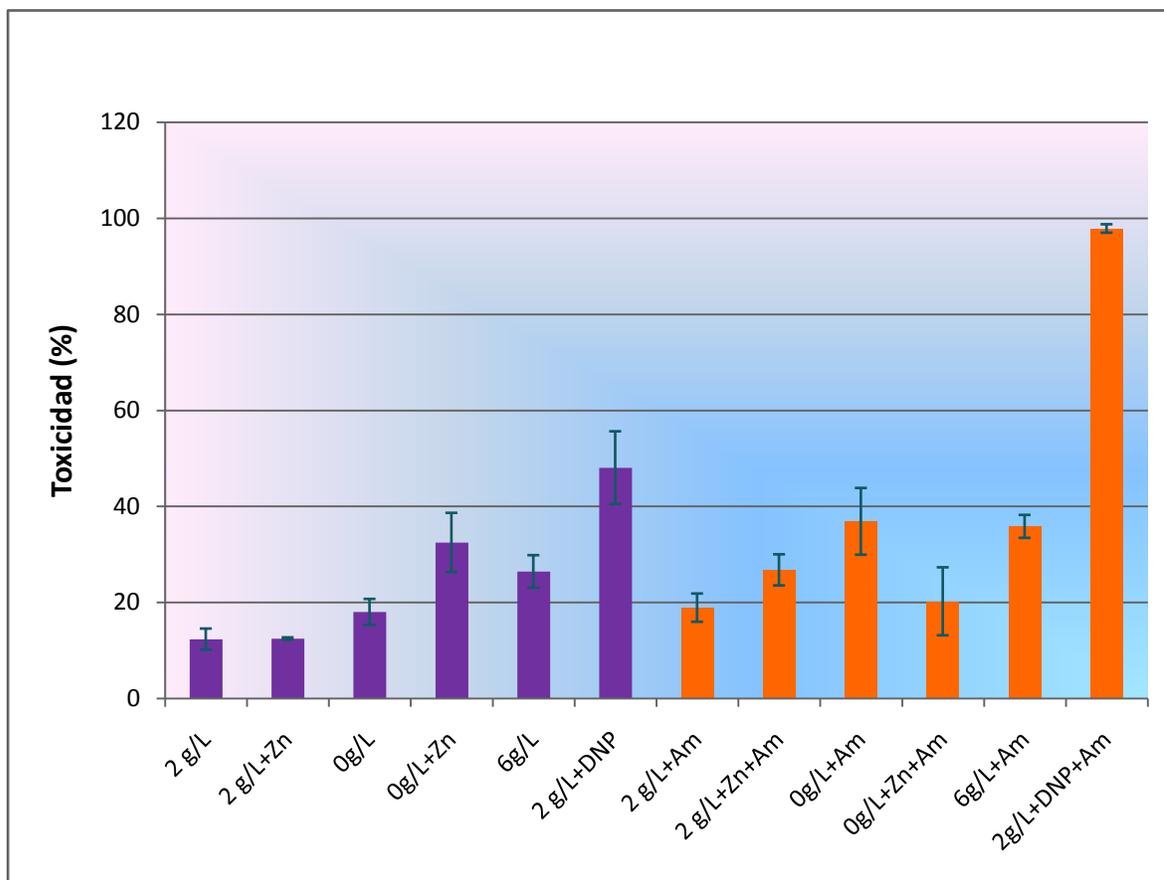


Figura 4. Toxicidad en células MIN – 6 incubadas por 24 horas en distintas condiciones. Datos expresados como media aritmética  $\pm$  E.S. (Medios de cultivo 2 g/L: grupo control, 2 g. glucosa/L; 2 g/L + Zn: 2 g. glucosa/L + 50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>; 0 g/L: sin glucosa; 0 g/L + Zn: 50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>; 6 g/L: 6 g. glucosa/L; 2 g/L + DNP: 2 g. glucosa/L + 10  $\mu$ M DNP; las condiciones posteriores corresponden a las ya descritas a las cuales se adicionaron 10  $\mu$ M de amilina).

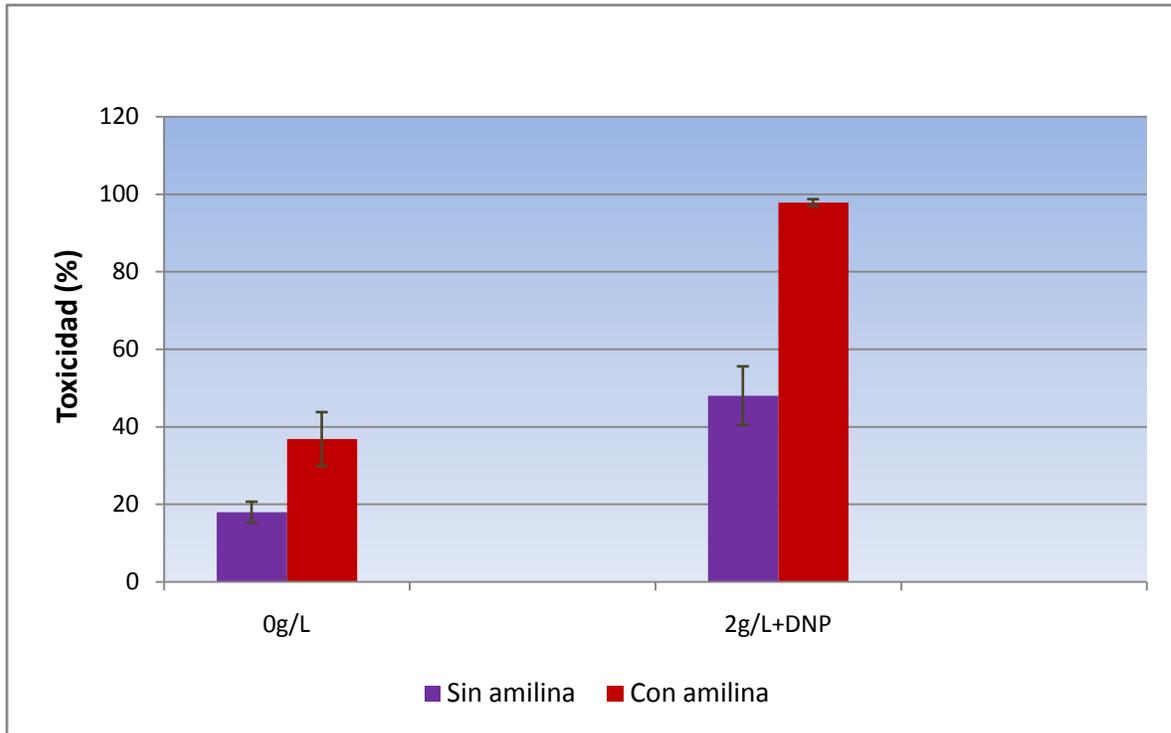


Figura 5. Toxicidad en células MIN – 6 incubadas por 24 horas en 0 g/L de glucosa y en 2 g/L de glucosa + DNP con y sin amilina. Datos expresados como media aritmética  $\pm$  E.S.

Analizando en conjunto los datos entregados por los experimentos de secreción de insulina y de toxicidad, se puede apreciar en las muestras tratadas sin amilina, que las condiciones de menor toxicidad (2 g/L glucosa y 2 g/L glucosa + Zn) son las que presentan mayor liberación de insulina, con excepción de la condición 0 g/L glucosa + Zn, en que se evidencia una alta toxicidad, lo que es indicativo de que la insulina colectada en esta muestra puede deberse a la liberada en el medio de cultivo por muerte celular. Del mismo modo, las condiciones de mayor toxicidad (6 g/L glucosa y DNP) muestran una menor producción de insulina.

Dentro de las muestras tratadas con amilina, se puede ver en el grupo control un aumento de la mortalidad celular acompañado por una disminución de

la secreción de insulina, sin embargo al análisis estadístico esta diferencia no es significativa, lo que nos indica que la amilina es relativamente inocua en células que se encuentran en un ambiente metabólico óptimo, lo mismo sucede al adicionar Zn a 2 g/L de glucosa. Sin embargo, al tratar las células con medios de cultivo “estresantes” aumenta la mortalidad celular (situación que es contrarrestada por el Zn en 0 g/L de glucosa), llegando a una toxicidad máxima con el DNP, la que es acompañada por índices muy bajos de secreción de insulina.

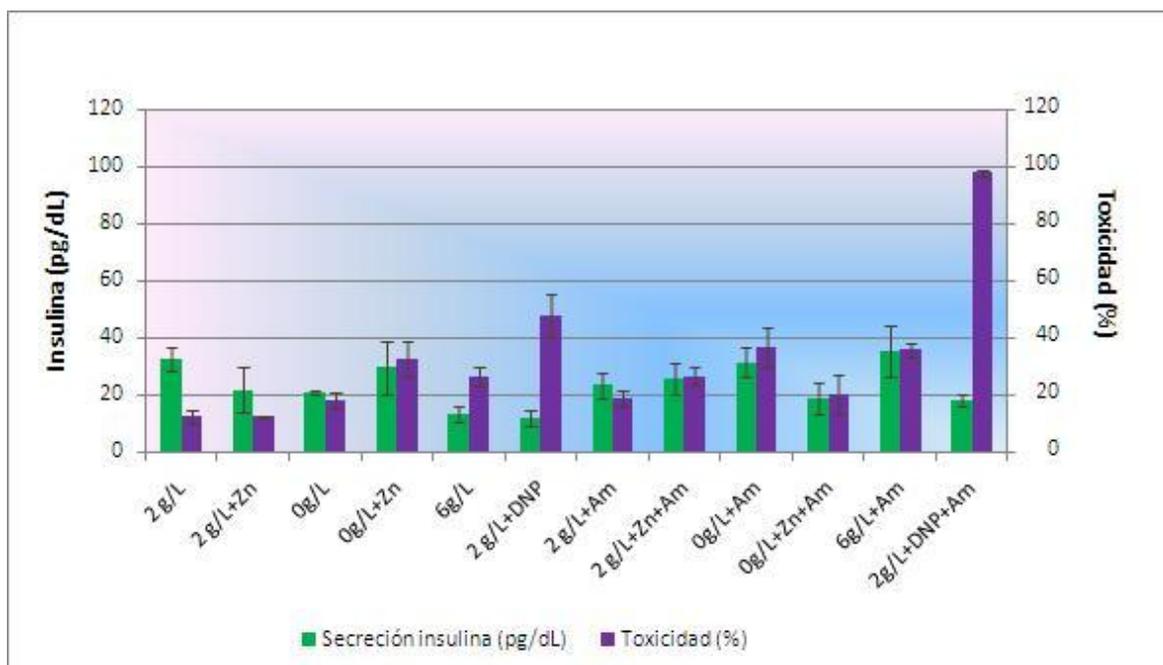


Figura 6. Toxicidad y secreción de insulina (1 g/L glucosa) en células MIN – 6 incubadas por 24 horas en distintas condiciones. Datos expresados como media aritmética ± E.S.

## CONCLUSIONES

No se puede inferir el efecto tóxico de la amilina ni el efecto protector del ión Zinc en los experimentos de secreción de insulina.

Concentraciones bajas y altas de glucosa están involucradas en una mayor toxicidad celular, lo que se exagera en la presencia de amilina.

El Zinc protege la viabilidad de las células que están sometidas a condiciones de estrés metabólico frente a la acción de la amilina.

Mientras mayor sea el estrés metabólico a que es sometida la célula, más se potencia el efecto nocivo de la amilina, lo que se evidencia en una mayor toxicidad a nivel celular.

## BIBLIOGRAFÍA

- **AHRÉN, B.; PACINI, G.** 2005. Islet adaptation to insulin resistance: mechanisms and implications for interventions. *Diabet Obes Metab.* 7: 2 – 8.
- **BAI, J.Z.; SAAFI, E.L.; ZHANG, S.; COOPER, G.J.** 1999. Role of  $Ca^{2+}$  in apoptosis evoked by human amylin in pancreatic islet  $\beta$ -cells. *Biochem J.* 343: 53 – 61.
- **BARRUETO, K.; MAIZ.** 2001. Tratamiento Farmacológico de la Diabetes Mellitus – 2. [en línea] <<http://escuela.med.puc.cl/publ/TemasMedicinaInterna/ttodiabetes.html>> [consulta: 27-06-2007]
- **BRUNTON, S.A.** The Changing Shape of Type 2 Diabetes. 2008. *Medscape J Med.* 10 (6): 143.
- **CARTAILLER, J.P.** 2004. Insulin: from secretion to action. [en línea] <<http://www.βcell.org/content/articles>> [consulta: 02-04-2007]
- **DALEKE, D.** 2003. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res.* 44: 233 – 239.
- **DONG, J.; SHOKES, J.E.; SCOTT, R.A.; LYNN, D.G.** 2006. Modulating amyloid self – assembly and fibril morphology with Zn (II). *J Am Chem Soc.* 128 (11): 3540 – 2.
- **DURRUTY, P.; GARCÍA DE LOS RÍOS, M.** 2001. Glucotoxicidad y lipotoxicidad: factores en la patogénesis y evolución de la diabetes tipo 2. *Rev Med Chile.* 129 (6).
- **ENGEL, M.F.; KHEMTÉMOURIAN, L.; KLEIJER, C.C.; MEELDIJK, H.J.; JACOBS, J.; VERKLEIJ, A.J.; DE KRUIJFF, B.; KILLIAN, A.; HÖPPENER, J.W.** 2008. Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105 (16): 6033 – 6038.

- **EXLEY, C.** 2006. Aluminium and iron, but neither copper nor zinc, are key to the precipitation of  $\beta$  – sheets of A $\beta$ <sub>42</sub> in senile plaque cores in Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis.* 10 (2 – 3): 173 – 177.
- **GREEN, J.; FEINGLOS, M.** New combination treatments in the management of diabetes: focus on sitagliptin – metformin. 2008. *Vasc Health Risk Manag.* 4 (4): 743 – 751.
- **GUYTON, A.C.; HALL, J.E.** 2006. Insulina, glucagón y diabetes mellitus. In: *Tratado de Fisiología Médica.* 11<sup>a</sup> ed. McGraw – Hill Interamericana. Madrid, España.
- **HOOGWERF, B.J.; DOSHI, K.B.; DIAB, D.** 2008. Pramlintide, the synthetic analogue of amylin: physiology, pathophysiology, and effects on glycemic control, body weight, and selected biomarkers of vascular risk. *Vasc Health Risk Manag.* 4 (2): 355 – 362.
- **HÖPPENER, J.W; JACOBS, H.M.; WIERUP, N.; SOTTHEWES, G.; SPRONG, M.; DE VOS, P.; BERGER, R.; SUNDLER, F.; AHRÉN, B.** 2008. Human Islet Amyloid Polypeptide Transgenic Mice: In Vivo and Ex Vivo Models for the Role of hIAPP in Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Diabetes Res.* 2008: 697035.
- **HULL, R.L.; WESTERMARK, G.T.; WESTERMARK, P.; KAHN, S.E.** 2004. Islet Amyloid: A Critical Entity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 89 (8): 3629 – 3643.
- **KAGAN, B.L.; HIRAKURA, Y.; AZIMOV, R.; AZIMOVA, R.; LIN, M.** 2002. The channel hypothesis of Alzheimer’s disease: current status. *Peptides.* 23: 1311 – 1315.
- **KAWAHARA, M.; ARISPE, N.; KURODA, Y.; ROJAS, E.** 1997. Alzheimer’s Disease Amyloid  $\beta$ -Protein Forms Zn<sup>2+</sup>-Sensitive, Cation-Selective Channels Across Excised Membrane Patches from Hypothalamic Neurons *Biophys J.* 73: 67 – 75.
- **KAWAHARA, M.; KURODA, Y.; ARISPE, N.; ROJAS, E.** 2000. Alzheimer’s  $\beta$ -Amyloid, Human Islet Amylin, and Prion Protein Fragment Evoke Intracellular Free Calcium Elevations by a Common Mechanism in a

Hypothalamic GnRH Neuronal Cell Line. *J Biol Chem.* 275 (19): 14077 – 14083.

- **KHEMTÉMOURIAN, L.; KILLIAN, J.A.; HÖPPENER, J.W.; ENGEL, M.F.** 2008. Recent Insights in Islet Amyloid Polypeptide – Induced Membrane Disruption and Its Role in  $\beta$  – Cell Death in Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Diabetes Res.* 2008: 421287.
- **KOURIE, J.I.; HENRY, C.L.** 2002. Ion channel formation and membrane-linked pathologies of misfolded hydrophobic proteins: the role of dangerous unchaperoned molecules. *Clin Exp Pharmac Physiol.* 29: 741 – 753.
- **KOURIE, J.I.; SHORTHOUSE, A.A.** 2000. Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 278: C1063 – C1087.
- **MAKIN, O.S.; SERPELL, L.C.** 2004. Structural Characterization of Islet Amyloid Polypeptide Fibrils. *J Mol Biol.* 335: 1279 – 1288.
- **MARZBAN, L.; PARK, K.; VERCHERE, CB.** 2003. Islet amyloid polypeptide and type 2 diabetes. *Exp Geront.* 38: 347 – 351.
- **MELONI, G.; SONOIS, V.; DELAINE, T.; GUILLOREAU, L.; GILLET, A.; TEISSIÉ, J.; FALLER, P.; VASÁK, M.** 2008. Metal swap between Zn7 – metallothionein – 3 and amyloid –  $\beta$  – Cu protects against amyloid –  $\beta$  toxicity. *Nat Chem Biol.* 4 (6): 366 – 372.
- **O´BRIEN, T.D.** 2002. Pathogenesis of feline diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol.* 197: 213 – 219.
- **PALLARDO, L.** 2001. Diabetes mellitus tipo 2. [en línea] <<http://www.medynet.com/elmedico/aula/tema14/diab.htm#7>> [consulta: 22-02-2006]
- **POWERS, A.C.** 2006. Diabetes mellitus. **In:** Kasper, D.L.; Braunwald, E.; Fauci, A.S.; Hauser, S.L.; Longo, D.L.; Jameson, J.L. *Harrison: Principios de Medicina Interna.* 16<sup>a</sup> ed. McGraw – Hill Interamericana. Madrid, España. 2 v.
- **QUIST, A.; DOUDEVSKI, I.; LIN, H.; AZIMOVA, R.; NG, D.; FRANGIONE, B.; KAGAN, B.; GHISO, J.; LAL, R.** 2005. Amyloid ion channels: A

common structural link for protein – misfolding disease. Proc Natl Acad Sci USA. 102 (30): 10427 – 10432.

- **ROBERTSON, R.P.** 2004. Chronic Oxidative Stress as a Central Mechanism for Glucose Toxicity in Pancreatic Islet  $\beta$  Cells in Diabetes. J Biol Chem. 279 (41): 42351 – 42354.
- **SIMAKOVA, O.; ARISPE, N.J.** 2006. Early and Late Cytotoxic Effects of External Application of the Alzheimer's A $\beta$  Result from the Initial Formation of A $\beta$  Ion Channels. Biochem. 45 (18): 5907 – 5915.
- **TANG, Z.; WASSERLOOS, K.; ST. CROIX, C.M.; PITT, B.R.** 2001. Role of zinc in pulmonary endothelial cell response to oxidative stress. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 281: 243 – 249.
- **TÔUGU, V.; KARAFIN, A.; PALUMAA, P.** 2008. Binding of zinc (II) and copper (II) to the full – length Alzheimer's amyloid –  $\beta$  peptide. J Neurochem. 104 (5): 1249 – 59.
- **YOUNG, A.; DENARO, M.** 1998. Roles of Amylin in Diabetes and in Regulation of Nutrient Load. Nutrition. 14 (6): 524 – 527.
- **WALTHER, U.I.; MÜCKTER, H.; FICHTL, B; FORTH, W.** 1999. Influence of glutathione on zinc-mediated cellular toxicity. [Biol Trace Elem Res.](#) 67 (2): 97 – 107.
- **WARD, B.; WALKER, K.; EXLEY C.** 2008. Copper (II) inhibits the formation of amylin amyloid in vitro. J Inorg Biochem. 102 (2): 371 – 375.
- **WHO.** 2008. Diabetes. [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>> [consulta: 13-01-2009]
- **WHO.** 2000. Prevalence of diabetes worldwide. [en línea] <[http://www.who.int/diabetes/facts/world\\_figures/en/index.html](http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index.html)> [consulta: 22-02-2006]
- **WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H.** 2004. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 27 (5): 1047 – 1053.
- **WISEMAN, D.A.; WELLS, S.M.; HUBBARD, M.; WELKER, J.E.; BLACK, S.M.** 2007. Alterations in zinc homeostasis underlie endothelial cell death

induced by oxidative stress from acute exposure to hydrogen peroxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 292: 165 – 177.