SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Fisiología

Boletín Informativo de la SECF · Volumen 10 · nº 2 · diciembre 2008

• TITULARES

- **INFORMACIÓN SOBRE EL XXXV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS.**

  (Valencia, 2009).

- **LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER COMO CALCIOPATÍA.**

  Carlos Villalobos, Sara Sanz-Blasco y Lucía Núñez.

- **MODULATION OF INSULIN SECRETION MECHANISMS BY MALNUTRITION.**

  Camila Aparecida Machado de Oliveira and Everardo Magalhães Carneiro.

- **EL ÓXIDO NÍTRICO Y LA REGULACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULA BETA PANCREÁTICAS. UNA PROPUESTA DE MODIFICACIÓN DE PROTOCOLOS.**

  Gladys M. Cahuana, Francisco J. Bedoya, Juan R. Tejedo.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Presidente: Constancio González Martínez (constanc@ibgm.uva.es)
Presidente electo: Ginés Salido Ruiz (gsalido @unex.es)
Presidente Saliente: Rafael Alonso Solís (ralonso@ull.es)
Secretario: Antonio Alberola Aguilar (antonio.alberola@uv.es)
Tesorero: Lucía Núñez Llorente (nunez@ibgm.uva.es)
Vocal: Javier Cudeiro Mazaira (jcud@udc.es) /
Andrés Morales Calderón (andres.morales@ua.es)

Direcciones de contacto en **www.seccff.org** · D.L.:SE-321-2000

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES.

A. Remisión de originales.

La remisión de originales se hará exclusivamente por correo electrónico a la dirección del editor o de cualquiera de los miembros del comité editorial. Se puede utilizar cualquier procesador de texto, programa y formato gráfico, aunque es preferible remitir el manuscrito en formatos usuales. En todo caso deben indicarse en la carta de remisión los formatos empleados para texto, tablas, gráficos y fotografías. La utilización de formatos poco usuales retrasará la publicación. En caso de emplear algún sistema de compresión para fotografías o gráficos, debe comprobarse que la descompresión no deteriora la calidad de las imágenes. La carta de remisión debe incluirse en el cuerpo del mensaje electrónico y el original y las figuras en forma de archivos anexos. El texto del artículo debe adjuntarse como un único archivo, incluyendo la página con el título, el texto principal, bibliografía, etc. Cada tabla o figura debe remitirse en un anexo independiente, nombrando cada anexo con el nombre del primer autor y el número de tabla o figura que contenga (ejemplo: Cunqueiro-Fig.1).

B. COMPOSICIÓN DE LOS ORIGINALES.

1. Primera página.

Título, Autores, Filiación de los autores y Autor y dirección para correspondencia si procede (incluir números de teléfono y fax, y una dirección de correo electrónico).

2. Segunda página.

Sumario, si procede, en una extensión no superior a 200 palabras, en el mismo idioma que el resto del artículo.

· Editor ·
Ángel Nadal Navajas, Departamento de Fisiología e Instituto de Bioingeniería Universidad Miguel Hernández, Elx, Alicante 03202.
Teléfono: 965 222 002, Fax: 966 658 511, e-mail: nadal@umh.es

· Comité editorial ·
Fernando de Castro (Salamanca, fdecastro@usal.es), Mónica de la Fuente (Madrid, mondelaf@bio.ucm.es), Esther Fuentes (Elx, efuentes@umh.es), Cristina Ripoll (Elx, ripollcr@umh.es), José E. Sánchez-Criado (Córdoba, fi1sarcj@uco.es), Javier Salazar (Murcia, salazar@um.es), Carlos Villalobos (Valladolid, carlosv@ibgm.uva.es).

Diseño, Maquetación e Impresión: Limencop CEE · 966 658 487 · e-mail: d.grafico@limencop.com

3. Cuerpo del texto.

Los artículos no deberán sobrepasar las 2.500 palabras e irán en folios numerados. Deberán estar escritos en un estilo claro y con pretensión divulgativa, de forma que puedan ser entendidos por cualquier fisiólogo, independientemente de su área de especialización. El procedimiento más simple es tomar como ejemplo cualquier artículo publicado previamente en Fisiología. En caso de no disponer de ningún ejemplar, puede solicitarse a cualquiera de los miembros del comité editorial o a la Secretaría (andres.morales@ua.es) para ser incluido en la lista de distribución. Alternativamente, consultar los artículos de los números anteriores en *http://www.seccff.org.*

Los artículos podrán contener resultados ya publicados, siendo entonces responsabilidad exclusiva de los autores obtener los permisos correspondientes de las revistas o libros donde hayan sido publicados originalmente. Debido a la pretensión divulgativa, cada autor podrá organizar el texto en la forma que crea más oportuna, si bien se sugiere una división en secciones que facilite su lectura.

4. Otros.

a.Notas. (si las hubiere) y agradecimientos.

b.Bibliografía. Las referencias, muy seleccionadas, se insertarán en el cuerpo del texto entre paréntesis (ejemplo: Chacón y Mairena, 1999). La relación completa de referencias bibliográficas deberá incluirse al final del texto, por orden alfabético y cronológico, de acuerdo a los formatos más habituales. Ejemplo: Gómez J, Belmonte J (1910) Deciphering bullfighting. J Taurom 57: 200-235.

c.Pies de figuras. Deberán incluirse a continuación de la bibliografía y en páginas aparte.

d.Figuras. Su número no deberá ser superior a 2-3 por artículo, y el tamaño máximo aceptado será el de una hoja impresa (DIN-A4). En el caso de figuras previamente publicadas, si fuere necesario, deberá acompañarse autorización para su reproducción en Fisiología.

PALACIO DE CONGRESOS
VALENCIA

17 | 20
DE FEBRERO
2009

XXXV CONGRESO SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

MÁS INFORMACIÓN:
www.fisiologiavalencia2009.es

SECF
SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

LAS SESIONES PLENARIAS SERÁN IMPARTIDAS POR:

- Salvador Moncada
- José Jalife

LAS PONENCIAS INVITADAS SERÁN IMPARTIDAS POR:

- Adolfo Díez
- Alberto Martínez
- Ana Coto
- Ángel Nadal
- Ángel Nebreda
- Anne Negre-Salvayre
- Arcadi Gual-Sala
- Bernardo Moreno
- Brigitte M. Winklhofer-Roob
- Carlos Acuña
- Carlos Sánchez-Ferrer
- Coral Sanfeliu
- Corinne Spickett
- Daniel Closa
- Darío Acuña
- David M. Pollock
- Dolores Mediavilla-Aguado
- Enrique Echevarría-Orella
- Esa-Matti Lilius
- Francisco Barros
- Francisco José García
- Germán Torregrosa
- Giovanni Mann
- Giuseppe Poli
- Grzegorz Bartosz
- Ignacio Giménez
- Ignacio Lizasoain
- Irving H. Zucker
- Isabel de Dios
- Jaume Fernández Borrás
- Javier González
- Jesús A. F. Tresguerres
- Joan Albert Barberá
- Joey P. Graner
- Jorge Juan García-Seoane
- José Antonio López-Calbet
- José Castillo
- José Manuel García Verdugo
- José María Delgado
- José Miguel López-Novoa
- Josep Roca
- Juan Antonio Madrid
- Juan Iovanna
- Juan Lerma
- Leocadio Rodríguez-Mañas
- Lubica Horakova
- Luis Ángel Pardo
- Malcolm Jackson
- Manel Portero-Otín
- Manuel Tena
- Michael Sjöstron
- Miquel Izquierdo
- Moussa Youdim
- Mustafa Atalay
- Nesrin Kartal-Özer
- Neven Zarkovic
- Pedro Esbrit
- Peter Eckl
- Ricardo Rigual
- Salvador Martínez
- Tilman Grune
- Victoria Cachofeiro

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente: José Viña
Vicepresidente: Federico Pallardó
Director del Congreso: Juan Sastre
Secretarios: Juan Gambini, Carmen Gómez-Cabrera
Tesorera: Consuelo Borrás
Vocales: Julián Carretero, Luis Such-Miquel

COMITÉ CIENTÍFICO

Presidente: Antonio Alberola
Miembros: Carlos Acuña, Guillermo Álvarez de Toledo, Manuel Castillo, Mónica de la Fuente, Javier Miranda, Ángel Nadal, Ana Obeso, Reinald Pamplona, Joana M. Planas, Javier Salazar, Jesús A.F. Tresguerres

Secretaría Técnica:
VIAJES EL CORTE INGLÉS, S.A.
División de Congresos, Convenciones e Incentivos
Gran Vía Fernando El Católico n.º 3 bajo
Tel. (+34) 96 310 71 89 - Fax. (+34) 96 341 10 46
46008 VALENCIA
E-mail: fisiologiavalencia2009@viajeseci.es

En esta revisión se presenta la enfermedad de Alzheimer desde un aspecto novedoso: una disfunción de la homeostasis de calcio intracelular. En ella, se repasan los hallazgos que sustentan esta hipótesis, incluyendo el papel del Ca^{2+} en la toxicidad del péptido amiloide y en los efectos adversos de las mutaciones en presenilinas (PS) y otras proteínas relacionadas con la enfermedad.

Actualización

La enfermedad de Alzheimer como calciopatía

Carlos Villalobos*, Sara Sanz-Blasco y Lucía Núñez

El calcio intracelular es un segundo mensajero universal que juega un papel esencial en el control de muchas funciones neuronales como la secreción de neurotransmisores, la excitabilidad neuronal, la plasticidad sináptica y la muerte neuronal. Evidencias recientes indican que la alteración primaria de la enfermedad de Alzheimer (EA) sería la dishomeostasis del calcio intracelular, por lo que cabría considerar la enfermedad como una calciopatía: la calciopatía de Alzheimer. En esta revisión se repasan los hallazgos que sustentan esta hipótesis incluyendo el papel del Ca^{2+} en la toxicidad del péptido amiloide y en los efectos adversos de las mutaciones en presenilinas (PS) y otras proteínas relacionadas con formas familiares de la EA. Los resultados sugieren que la intervención sobre la dishomeostasis del Ca^{2+} intracelular podría tener un impacto en el desarrollo de nuevas terapias que modifiquen el hasta ahora inexorable curso de la enfermedad.

La enfermedad de Alzheimer (EA) cursa con una pérdida progresiva e irreversible de las funciones cognitivas del sistema nervioso central con muerte neuronal masiva y consecuencias dramáticas para el paciente, sus familiares y los sistemas de salud. El origen de la enfermedad es desconocido y aunque los tratamientos actuales retrasan en cierta medida los síntomas, no detienen el curso de la enfermedad, por lo que ésta es considerada incurable. Las características más importantes de la EA son la disfunción y pérdida neuronal progresiva en corteza e hipocampo con alteraciones mitocondriales y formación de depósitos extracelulares de péptidos amiloides (placas seniles) e intracelulares de proteína tau hiperfosforilada (ovillos neurofibrilares). La hipótesis amiloide defiende que el origen de la EA es la producción excesiva y agregación de productos anómalos de secreción (péptidos amiloides Aβ) de la proteína precursora APP. Se considera, por tanto, a la EA, una amilopatía. Otros defienden un papel más relevante para las alteraciones de tau y consideran la enfermedad una tautopatía. Diversos hallazgos recientes sugieren que la EA podría deberse a una alteración de la homeostasis del calcio intracelular, que sería previa a la producción de placas amiloides y las alteraciones en tau, lo que ha llevado a plantear la hipotesis del Ca^{2+} de la EA. En otras palabras, la consideración de la EA como una calciopatía (Marx, 2007; Stutzmann, 2007; Greeny y LaFerla, 2008).

Tanto en la EA más común o esporádica y de aparición tardía, como en la EA familiar, de aparición más temprana y relacionada fundamentalmente con mutaciones en las presenilinas PS1 y PS2 y la proteína precursora APP, se produce un exceso de producción de formas anómalas de Aβ: el péptido $A\beta_{1-42}$. No se conoce la función de la proteína APP ni de Ab pero, en la última década, diversos autores han demostrado que las formas anómalas de Aβ son tóxicas para las neuronas y que la toxicidad estaría relacionada con alteraciones de la homeostasis del calcio intracelular (Mattson y cols., 1993). Inicialmente se propuso que Aβ aumentaba la susceptibilidad a la neurotoxicidad inducida por glutamato. Casi al mismo tiempo, se propuso que Aβ se puede insertar en membranas biológicas y formar poros o canales iónicos permeables a Ca^{2+} y denominados canales amiloides (Arispe y cols, 1993; Arispe y cols., 2007). Otros autores han confirmado que Aβ induce incrementos de la concentración de Ca^{2+} citosólica ($[Ca^{2+}]_{cit}$) en neuronas. Sin embargo, la ruta de entrada de Ca^{2+} inducida por Aβ es un tema controvertido, habiéndose propuesto mecanismos adicionales como la permeabilización inespecífica de la membrana plasmática (Demuro y cols., 2005) o la activación de receptores tipo NMDA (Pellistri y cols., 2008). La microscopía de dos fotones ha permitido recientemente hacer estudios de imagen de calcio *in vivo* en ratones transgénicos modelos de Alzheimer familiar. Inesperadamente, se ha encontrado que muchas neuronas cercanas a las placas seniles muestran hiperexcitabilidad y un incremento de las oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ comparado con aquellas neuronas más alejadas de las placas. Esta hiperexcitabilidad conduce a la pérdida de compartimentalización de la señal de calcio, cambios morfológicos, disrupción de los circuitos neuronales y muerte celular (Kuchibhotla y cols., 2008; Busche y cols., 2008). Aβ no es una única forma química estable, sino que, igual que otros péptidos con tendencia a agregar, como α-sinucleína o las proteínas priónicas, puede presentar distintos estados de agregación incluyendo monómeros, pequeños oligóme-

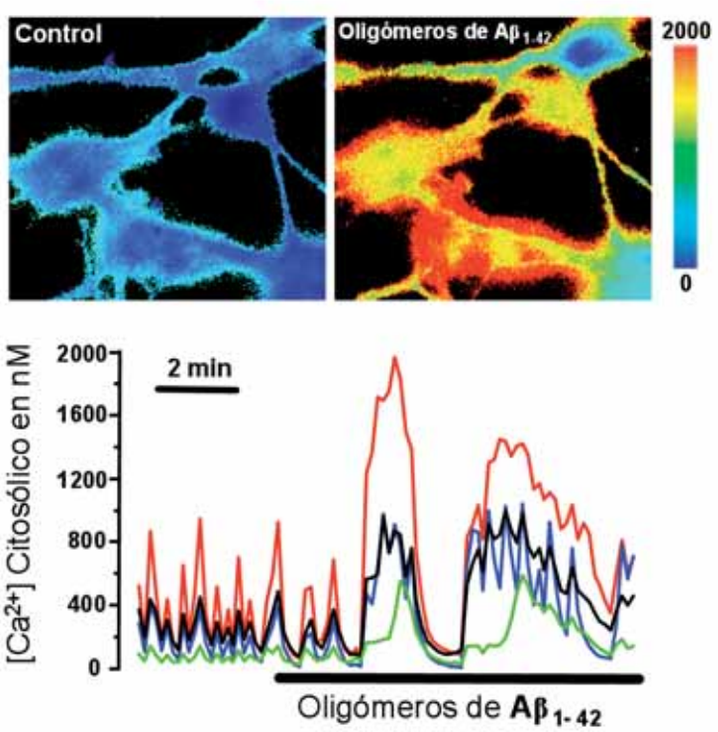

Figura 1. Los oligómeros de Aβ aumentan la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en neuronas de hipocampo. Los paneles superiores muestran un campo microscópico de neuronas de hipocampo cargadas con el colorante fluorescente fura2 antes (izquierda) y después (derecha) de la adición de oligómeros de Aβ (1μM). La $[Ca^{2+}]_{cit}$ aparece codificada en pseudocolor de acuerdo con la escala (en nM). El registro inferior muestra las $[Ca^{2+}]_{cit}$ de 4 neuronas a lo largo del tiempo. La adición de Aβ induce el incremento mantenido de la $[Ca^{2+}]_{cit}$.

ros solubles o las grandes fibrillas que forman las placas amiloides. Recientemente se ha propuesto que los mecanismos de neurotoxicidad de las distintas especies de Aβ podrían ser diferentes (Deshpande y cols, 2006). Aunque los resultados anteriores son muy reveladores, existe una gran controversia sobre cuál es el estado de agregación responsable de la enfermedad (monómeros, oligómeros o fibrillas), la ruta de entrada de Ca^{2+} y, fundamentalmente, el mecanismo por el que Aβ promueve la muerte neuronal.

Para intentar obtener respuestas a las anteriores preguntas, hemos comparado los efectos de los distintos estados de agregación de Aβ (oligómeros y fibrillas) sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular en cultivos primarios de neuronas de cerebelo, corteza e hipocampo de rata (Sanz-Blasco y cols., 2008). Nuestros resultados muestran que los oligómeros de Aβ, pero no las fibrillas, inducen un aumento mantenido y muchas veces irreversible de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ debido a la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Figura 1). Este incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ está restringido a las neuronas y no se observó en las células de la glía. Aunque el mecanismo de entrada de Ca^{2+} no está aclarado, nuestros resultados preliminares sugieren que podría deberse a la formación de canales amiloides y/o la activación de receptores tipo NMDA, aunque no a la permeabilización de la membrana plasmática (Sanz-Blasco y cols., datos no publicados). Además, observamos que el tratamiento con oligómeros de Aβ inducía una muerte neuronal apoptótica a las pocas horas. Para investigar el posible mecanismo de inducción de apoptosis, estudiamos los efectos de oligómeros y fibrillas sobre la concentración de Ca^{2+} mitocondrial ($[Ca^{2+}]_{mit}$). Para ello utilizamos la técnica de imagen de bioluminiscencia en neuronas que expresaban aecuorina dirigida a mitocondria (Núñez y cols., 2007). Encontramos que los oligómeros de Aβ, pero no las fibrillas, inducían la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial hasta niveles superiores a 1 mM. Esta sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} era seguida de la formación de especies reactivas de oxígeno, apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, liberación de citocromo c y apoptosis neuronal. Todos estos efectos se inhibían si se prevenía de un modo específico la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias (Sanz-Blasco y cols., 2008). Estos datos sugieren que la muerte neuronal inducida por oligómeros de Aβ está mediada por la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} y la activación de la ruta intrínseca de apoptosis (Figura 2). Aβ también podría inducir muerte neuronal por mecanismos adicionales. Por ejemplo, Aβ puede entrar en la célula y unirse a las mitocondrias, lo que podría inducir apoptosis o sensibilizar las mitocondrias a la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial (Du y cols., 2008; Starkovy y Beal, 2008). La depleción de ciclofilina D, un componente del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, inhibe estos efectos, resaltando la importancia de la mitocondria en la muerte celular inducida por Aβ.

Aparte de los oligómeros de Aβ, existen otros mecanismos relacionados con la EA y que podrían contribuir a la dishomeostasis del Ca^{2+} intracelular y a la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial inducida por Aβ. Por ejemplo, durante el envejecimiento y en formas esporádicas de la EA, se ha descrito una pérdida progresiva de proteínas tamponadoras de Ca^{2+}, especialmente calbindinaD, en regiones neurales afectadas en la EA (Palop y cols., 2003). Ciertamente, una pérdida del poder tamponador de Ca^{2+} podría poner a las mitocondrias en riesgo de sobrecarga de Ca^{2+} (Figura 2).

Por otro lado, en la mayoría de las formas familiares de la EA se producen mutaciones en la proteína precursora APP y, sobre

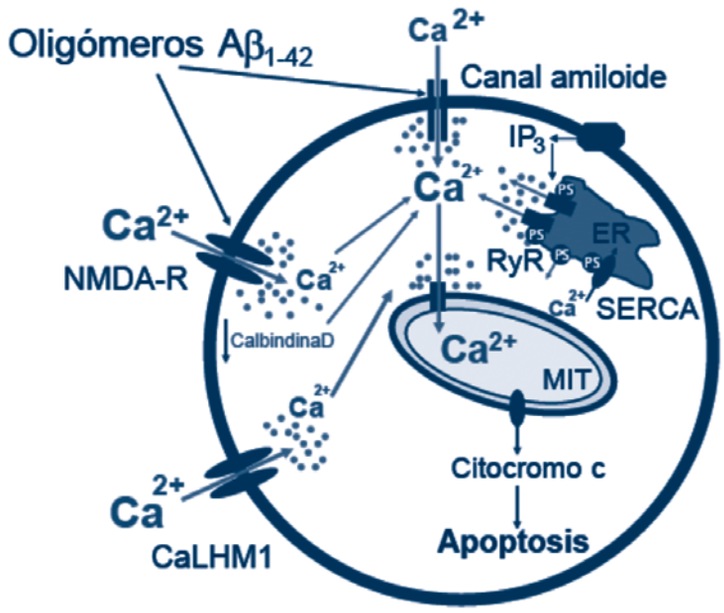

Figura 2. Dishomeostasis del calcio intracelular en la enfermedad de Alzheimer. En la EA, los oligómeros de Aβ inducen entrada de Ca^{2+} mediante la formación de canales amiloides y/o la activación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA. Ello es seguido de la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} que favorece la formación de especies reactivas de oxígeno, apertura del poro de permeabilidad transicional mitocondrial (PTPm), liberación de citocromo c y factores pro-apoptóticos que llevan a la apoptosis. Aβ también podría entrar en la célula e interaccionar con ciclofilina D, un componente del PTPm, y sensibilizar la mitocondria a la apoptosis. Otros procesos relacionados también podrían contribuir a la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+}. Por ejemplo, la depleción de calbindina D (un tampón endógeno de Ca^{2+}), la entrada de Ca^{2+} a través de canales CALMH1 o la excesiva liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico asociadas a mutaciones en presenilinas (PS) y debidas a modulación de receptores de IP_3 y rianodina o bombas de Ca^{2+} del RE tipo SERCA.

todo, en las presenilinas (PS) 1 y 2, que participan en el complejo secretasa que procesa APP. Estas mutaciones cursan con una liberación excesiva de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico (RE). El mecanismo de este efecto es muy controvertido y han sido propuestas diversas explicaciones. En primer lugar se propuso que las presenilinas, independientemente de su participación en el complejo γ secretasa, podrían actuar como canales tipo "leak" del RE. Aquellas mutaciones con pérdida de función llevarían a una sobrecarga de Ca^{2+} del RE y liberación excesiva tras la activación celular (Tu y cols., 2006; Nelson y cols., 2007). Este hallazgo es controvertido, pues otros autores han encontrado una depleción parcial del contenido de Ca^{2+} del RE (Zatti y cols., 2006). Otros autores han propuesto que las presenilinas podrían regular la actividad de canales de Ca^{2+} del RE como el receptor de IP_3 y el receptor de rianodina (Stutzman, 2007; Cheung y cols., 2008). Finalmente, se ha propuesto que las presenilinas podrían regular la actividad de las bombas de Ca^{2+} tipo SERCA que permiten el rellenado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} del RE (Green y cols., 2008). Sea cual fuere el mecanismo, el resultado de las mutaciones en PS sería la liberación excesiva de Ca^{2+} almacenado en el RE. Sin embargo, no se conoce cómo este efecto llevaría a la disfunción y muerte neuronal. Una posibilidad sería que la liberación excesiva de Ca^{2+} del RE podría favorecer la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} y, por tanto, la vía intrínseca de la muerte neuronal (Figura 2). Finalmente, se ha descubierto un nuevo canal de Ca^{2+} llamado CALHM1 con muchas similitudes con el receptor canal de NMDA y cuyos polimorfismos guardan relación con la EA (Dreses-Werringloer y cols., 2008).

En resumen, numerosas evidencias indican que procesos característicos de la EA esporádica, como el exceso de Aβ anómalos o el déficit de calbindinaD, pueden originar dishomeostasis de Ca^{2+} intracelular, un segundo mensajero clave en la actividad neuronal. Otros procesos activados en formas fami-

liares de la EA como la liberación excesiva de Ca^{2+} del RE pueden colaborar con Aβ y favorecer la aparición temprana de la enfermedad. La visión de la EA como una calciopatía está en proceso de desarrollo y aún quedan muchos puntos que deben aclararse. Entre ellos, el mecanismo de entrada de Ca^{2+} inducido por los oligómeros de Aβ y los sistemas de transporte de Ca^{2+} regulados primariamente por las presenilinas 1 y 2. En cualquier caso, parece claro que una posible alternativa futura en el tratamiento de esta terrible enfermedad sería la intervención sobre las alteraciones de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular.

Referencias

Arispe N, Rojas E, Pollard HB (1993) Alzheimer disease amyloid β protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethaminey aluminum. Proc Natl Acad Sci USA 15, 567-571.

Arispe N, Diaz JC, Simakova O (2007) Aβ ion channels. Prospects for treating Alzheimer's disease with Aβ channel blockers. Biochim Biophys Acta 1768, 1952-1965.

Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold KH, Haass C, Staufenbiel M, Konnerth A, Garaschuk O (2008) Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. Science 321, 1686-1689.

Cheung KH, Shineman D, Müller M, Cárdenas C, Mei L, Yang J, Tomita T, Iwatsubo T, Lee VM, Foskett JK (2008) Mechanism of Ca^{2+} disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating. Neuron 58, 871-883.

Demuro A, Mina E, Kayed R, Milton SC, Parker I, Glabe CG (2005) Calcium dysregulationy membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. J Biol Chem 280, 17294-17300.

Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J (2006) Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. J Neurosci 26, 6011-6018.

Dreses-Werringloer U, Lambert JC, Vingtdeux V, Zhao H, Vais H, Siebert A, Jain A, Koppel J, Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Pasquier F, Galimberti D, Scarpini E, Mann D, Lendon C, Campion D, Amouyel P, Davies P, Foskett JK, Campagne F, Marambaud P (2008) A polymorphism in CALHM1 influences Ca^{2+} homeostasis, Aβ levels, Alzheimer's disease risk. Cell 133, 1149-1161.

Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, Yan Y, Wang C, Zhang H, Molkentin JD, Gunn-Moore FJ, Vonsattel JP, Arancio O, Chen JX, Yan SD (2008) Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrialy neuronal perturbationy ameliorates learningy memory in Alzheimer's disease. Nat Med 14, 1097-1105.

Green KN, Demuro A, Akbari Y, Hitt BD, Smith IF, Parker I, LaFerla FM (2008) SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin regulates amyloid beta production. J Cell Biol 181, 1107-1116.

Green KN, LaFerla FM (2008) Linking calcium to Aβy Alzheimer's disease. Neuron 31, 190-194.

Kuchibhotla KV, Goldman ST, Lattarulo CR, Wu HY, Hyman BT, Bacskai BJ (2008) Aβ plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structuraly functional disruption of neuronal networks. Neuron 59, 214-225.

Marx J (2007) Alzheimer's disease. Fresh evidence points to an old suspect: calcium. Science 318, 384-385.

Mattson MP, Barger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, Rydel RE (1993) β-amyloid precursor protein metabolitesy loss of neuronal Ca^{2+} homeostasis in Alzheimer's disease. Trends Neurosci 16, 409-414.

Nelson O, Tu H, Lei T, Bentahir M, de Strooper B, Bezprozvanny I (2007) Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca^{2+} leak function of presenilin 1. J Clin Invest 117, 1230-1239.

Núñez L, Senovilla L, Sanz-Blasco SI, Chamero P, Alonso MT, Villalobos C, García-Sancho J (2007) Bioluminescence imaging of mitochondrial calcium in sympathetic neurons from adult rat dorsal root ganglion. J Physiol 580, 385-395.

Palop JJ, Jones B, Kekonius L, Chin J, Yu GQ, Raber J, Masliah E, Mucke L (2003) Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. Proc Natl Acad Sci USA 100, 9572-9577.

Pellistri F, Bucciantini M, Relini A, Nosi D, Gliozzi A, Robello M, Stefani M (2008) Nonspecific interaction of prefibrillar amyloid aggregates with glutamatergic receptors results in Ca^{2+} increase in primary neuronal cells. J Biol Chem 283, 29950-29960.

Sanz-Blasco S, Valero RA, Rodríguez-Crespo I, Villalobos C, Núñez L (2008) Mitochondrial Ca^{2+} overload underlies Aβ oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs. PLoS ONE Jul 23;3(7):e2718.

Starkov AA, Beal FM (2008) Portal to Alzheimer's disease. Nat Med 14, 1020-1021.

Stutzmann GE (2007) The pathogenesis of Alzheimers disease. Is it a lifelong "calciumopathy"β Neuroscientist 13, 546-559.

Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee SF, Hao YH, Serneels L, De Strooper B, Yu G, Bezprozvanny I (2006) Presenilins form ER Ca^{2+} leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. Cell 126, 981-993.

Zatti G, Burgo A, Giacomello M, Barbiero L, Ghidoni R, Sinigaglia G, Florean C, Bagnoli S, Binetti G, Sorbi S, Pizzo P, Fasolato C (2006) Presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease reduce endoplasmic reticulumy Golgi apparatus calcium levels. Cell Calcium 39, 539-550.

Carlos Villalobos*, Sara Sanz-Blasco y Lucía Núñez
Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), Universidad de Valladolid y Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
C/ Sanz y Forés s/n 47003 Valladolid
Tfno: 983 184821
carlosv@ibgm.uva.es

The knowledge of the mechanisms through which amino acids act on pancreatic β-cells to stimulate insulin secretion is of interest for clinical medicine, as it can reveal new targets for the development of drugs toward the treatment of endocrine diseases, particularly type 2 diabetes.

Modulation of insulin secretion mechanisms by malnutrition

Camila Aparecida Machado de Oliveira and Everardo Magalhães Carneiro

Abstract

Several abnormalities observed in malnourishment are similar to those seen in type 2 diabetes. Protein restriction at early stages of life reduces β-cell volume, number of insulin-containing granules, insulin content and release by pancreatic islets in response to glucose and other secretagogues. Amino acids are capable to directly modulate insulin secretion and/or contribute to the maintenance of β-cell function, resulting in an improvement of insulin release. The effects of malnutrition and the role of leucine and taurine on the mechanisms of insulin secretion are reviewed. Leucine supplementation increases insulin secretion by pancreatic islets in malnourished mice. This effect is at least in part due to the increase in the expression of proteins involved in the secretion process, and the activation of the PKB/Akt pathway seems to be involved. Mice supplemented with taurine have an increased insulin content and secretion, as well as increased expression of genes essential for β-cell functionality. The knowledge of the mechanisms through which amino acids act on pancreatic β-cells to stimulate insulin secretion is of interest for clinical medicine as it can reveal new targets for the development of drugs toward the treatment of endocrine diseases, in special type 2 diabetes.

Insulin Secretion

The endocrine pancreas is a unique gland, composed by four main types of cells distributed all over the exocrine portion. These cells are aggregated in "islets", called islets of Langerhans. The islets usually present an oval shape, and the arrangement of the endocrine cells inside this structure is similar in most mammalians (Kulkarni, 2004). Every islet consists

of a central agglomerate (nucleus) of β-cells surrounded by α and/or δ cells or by δ and PP cells. It is estimated that an adult human has approximately 2 million islets (2% of the total pancreas weight). In rodents, every islet is constituted by about 2,000 to 4,000 cells of which 70 to 80% are insulin-producing β-cells, 5% are somatostatin-producing δ-cells, and 15 to 20% are composed by the glucagon-containing α-cells or still, PP type cells which produce pancreatic polypeptide, depending on the location of the islet inside the pancreas (Orci, 1985).

A simplified view of the mechanisms of insulin secretion is shown in Figure 1. Glucose is the main stimulator of insulin secretion by pancreatic β-cells. The metabolism of this hexose inside these cells increases the ATP/ADP ratio, causing the closure of the ATP/ADP-sensitive K^+ channels (K_{ATP}). The resulting decrease in K^+ conductance causes membrane depolarization with subsequent Ca^{2+} influx through the voltage-activated Ca^{2+} channels and an increase in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$), triggering insulin exocytosis. (Koster et al., 2005). A secondary effect of increased $[Ca^{2+}]_i$ is the activation of the enzymes adenylyl cyclase and phospholipase C (PLC), generating cyclic AMP (cAMP), diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3). These messengers amplify the Ca^{2+} signal through Ca^{2+} release from intracellular stores and by promoting the phosphorylation of proteins that sensitize the secretory process (Flatt, 1996; Tengholm and Gylfe, 2008). The rise in $[Ca^{2+}]_I$ in response to nutrient secretagogues follows an oscillatory kinetic, which is coupled to pulsatile insulin release. Interestingly, pulsed intravenously administered insulin has been shown to induce greater hypoglycemic effect than continuous delivery and the disappearance of the oscillatory pattern of insulin secretion has been considered as an early indicator of diabetes in man (Henquin et al., 1998; Soria and Martin, 1998; Tengholm and Gylfe, 2008).

Several nutrients, neurotransmitters and peptic hormones may also modulate insulin secretion. Free fatty acids, keto acids and amino acids are among the nutrients that influence insulin release (Gao et al., 2003; Li et al., 2004; Um et al., 2004). The mechanisms by which amino acids enhance insulin secretion are varied. Certain amino acids, such as leucine and alanine, are expected to exhibit an elevated anaplerotic activity, promoting a marked increase in the content of trycarboxylic acid cycle intermediates. As a result, there is an increase of intracellular ATP/ADP ratio, which further stimulates insulin secretion by reducing the K^+ permeability in β-cells. The positively charged amino acid arginine directly depolarizes the plasma membrane in the presence of glucose, whereas other amino acids, which are co-transported with Na^+, can also depolarize the cell membrane as a consequence of Na^+ transport and thus induce insulin secretion by activating voltage-dependent calcium channel (Newsholme et al., 2006).

In addition to the effect on insulin secretion, chronic exposure to amino acids may influence gene and protein expression. Indeed, low protein diet after weaning induced several alterations in gene expression pattern in rats (Delghingaro-Augusto et al., 2007). We have recently found an increased expression of genes and proteins essential for the process of insulin secretion when control and malnourished mice were supplemented with either taurine or leucine, an effect that was associated with improved insulin secretion (Carneiro et al., 2008, Amaral et al., 2008).

Malnutrition and Insulin Secretion

The association between malnutrition and prevalence of diseases during infancy is well established (Pelletier, 1994).

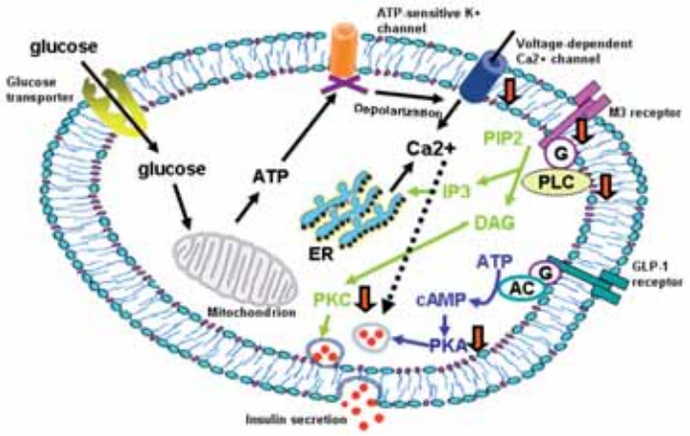

Figure 1. Simplified schematic view of the mechanisms of insulin secretion by pancreatic β-cell. The red arrows indicate proteins downregulated in malnourished animals, as discussed in the text. AC = adenylate cyclase; PIP2 = phosphatidyl-inositol-biphosphate; PLC = phospholipase C; IP3 = inositol-1,4,5 trisphosphate; DAG = diacyl glycerol; PI = phosphoinositides; PKC = protein kinase C; G = G-proteins; PKA = protein kinase A; cAMP = cyclic adenosine monophosphate; ER = endoplasmic reticulum; M3 receptor = type 3 muscarinic receptor; GLP-1 receptor = glucagon-like peptide 1 receptor.

Epidemiological studies have shown a strong relationship between low weight at birth and the plurimetabolic syndrome (Hales and Barker, 1992).

We have investigated the role of fetal and infant malnutrition in the development of the plurimetabolic syndrome in rodents during the intra-uterine period, lactation and/or after weaning periods, evaluating its effects on the mechanisms of insulin secretion and action at adulthood (Carneiro et al., 1995; Latorraca et al., 1998a,b; Ferreira et al., 2003; Ferreira et al., 2004).

Several of the abnormalities observed in pancreatic islets from malnourished animals are similar to those seen in type 2 diabetes. Protein restriction during gestation, lactation and/or after weaning periods promotes a series of alterations which result in hampered insulin secretion (Carneiro et al., 1995; Latorraca et al., 1998 a,b; Arantes et al., 2002; Ferreira et al., 2003; Ferreira et al., 2004; Delguingaro-Augusto et al., 2004). Rats fed a low protein diet during growing period after weaning exhibit a reduced insulin secretion (Fig. 2A and 2B), an effect that was accompanied by a reduced sensitivity to glucose. Such poor secretory capacity may be related to a defect in the ability of glucose to increase Ca^{2+} uptake and/or to reduce Ca^{2+} efflux from β-cells (Carneiro et al., 1995; de Mello MA et al., 2003). Leucine-induced insulin secretion is also reduced in low protein fed rats (Filiputti et al., 2008).

We have also found that pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation have lower serum insulin concentration and that insulin secretion by pancreatic islets is severely reduced in response to glucose (Latorraca et al., 1998; Arantes et al., 2002). At weaning, the islet area and the protein expression of the pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1) were also reduced in these animals (Arantes et al., 2002). PDX-1 is important in the development of pancreas, both in experimental animals and humans. It regulates a number of genes including GLUT2 and glucokinase, and its mutation is related to β-cell function abnormalities and development of diabetes in humans and mice (Macfarlane et al., 1999; Hansen et al., 2000, de León and Stanley, 2007).

Protein-energy restriction may also affect extra-pancreatic modulators of β-cell function, such as the autonomic nervous system (Leon-Quinto et al., 1998). Cholinergic agents act synergistically with glucose to stimulate insulin secretion by pancreatic β-cell. The binding of the cholinergic agonist to mus-

carinic (M3) receptors located in the β-cell plasma membrane leads to hydrolysis of phosphoinositides (PI) via phospholipase C (PLC) activation, through a G-protein coupled mechanism. PI hydrolysis result in the formation of 1,4,5 inositol triphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG). IP_3 releases calcium from intracellular stores and DAG activates protein kinase C (PKC), both stimulating insulin release (Ahrén, 2000). We have shown that pancreatic islets from rats fed a low-protein diet presented a reduced insulin secretory response to carbamylcholine (a M3 agonist) and phorbol 12-myristate 13-acetate (a PLC activator), probably due to the reduced expression of PLC and PKC protein expression in these rats (Ferreira et al., 2003).

Another important protein kinase for the process of insulin exocytosis is the cAMP-dependent protein kinase (PKA). PKA mediates most of the cAMP actions (Cooper, 2003). Its activation in β-cell is important for the signallings required for insulin secretion (Takahashi et al., 1997). Forskolin, an activator of adenylyl cyclase, potentiated insulin secretion in a much more pronounced way in control than in low-protein fed rats, an effect mediated, at least in part, by the reduced expression of both protein and gene expression of the catalytic subunit of PKA in pancreatic islets (Ferreira et al., 2004). PKA expression was also reduced in islets from pregnant rats fed a low protein diet (Milanski et al. 2005).

A decrease in both protein and gene expression of the s6k was observed in pancreatic islets of malnourished rats (Filliputi et al., 2008). This protein is a downstream target of mTOR, related to the protein translation process (Thomas and Hall, 1997). The general protein synthesis is reduced in this tissue, raising the possibility that it may be related with the reduced expression of proteins.

Protein restriction during the early stages of life, therefore, causes several alterations in pancreatic islets resulting in impaired insulin secretion in response to different stimulus. Among these alterations, a reduced expression of proteins and genes essential for the perfect functioning of the mechanism of insulin release seems to play a critical role in the development of this inadequate response to the secretagogues.

The Role of Amino Acids on β-Cell Function

In view of the potential role of amino acids in stimulating insulin secretion as well as maintenance of β-cell function, the knowledge of the mechanisms of amino acids action can reveal new targets for the development of drugs aimed to the treatment of endocrine diseases, in special type 2 diabetes. In this sense, our group has focused on investigating two amino acids, leucine, a strong regulator of protein synthesis, and taurine, which seems to modulate the intracellular Ca^{2+} concentration and stimulate insulin secretion, and their effects in pancreatic islets from normal and malnourished rodents.

Leucine

Leucine is an essential, branched-chain (BCAA) amino acid. It is necessary for protein and neurotransmitters synthesis and is also an important source of nitrogen for synthesis of nonessential amino acids. There is increasing evidence of the pivotal role of BCAAs in regulating the anabolic process involving both protein synthesis and degradation. They also have therapeutic potential due to the reported effects on sparing lean body mass during weight loss, wound healing promotion and muscle protein anabolism in muscle wasting with aging (Tom and Nair, 2006).

Leucine increases insulin secretion both in vivo and in vitro. The proposed mechanism by which L-leucine stimulates insulin release from pancreatic β-cells include increased mitochondrial metabolism by activation of the enzyme glutamate dehydrogenase (GDH), and increased ATP production, by transamination of leucine to α-ketoisocaproate and subsequent entry into the TCA cycle via acetyl-CoA, with subsequent KATP channel-dependent membrane depolarization (Newsholme et al., 2006).

In addition to its effects on insulin secretion, leucine is the most effective amino acid in activating the mTOR complex (Newsholme et al., 2006). The mTOR pathway is a key regulator of cell growth and proliferation (Dickson and Rhodes, 2004; Fatrai et al., 2006), and its activation is of particular importance in conditions of elevated demand for insulin, such as obesity and insulin resistance.

Even though the exact mechanism of mTOR activation by amino acids is not known, AMP dependent protein kinase (AMPK) inhibition might be involved (Gleason et al., 2007). AMPK is a central regulator of the energetic status of the cell. When activated by increased intracellular AMP concentration, it inhibits energy-consuming pathways and stimulates ATP-producing catabolic pathways (Rutter et al., 2003; Carling, 2004). Accordingly to Kimura et al. (2003) and Gleason et al. (2007), AMPK activation inhibits the activity of the s6k1. Importantly, even though there is no consensus about the effects of AMPK on insulin secretion (Rutter et al., 2003), da Silva Xavier et al. (2003) found that AMPK activation in β-cells inhibits glucose metabolism and drastically reduces calcium influx, resulting in decreased insulin secretion. Consequently, AMPK inhibition by amino acids such as leucine could be another way through which these nutrients increase insulin secretion.

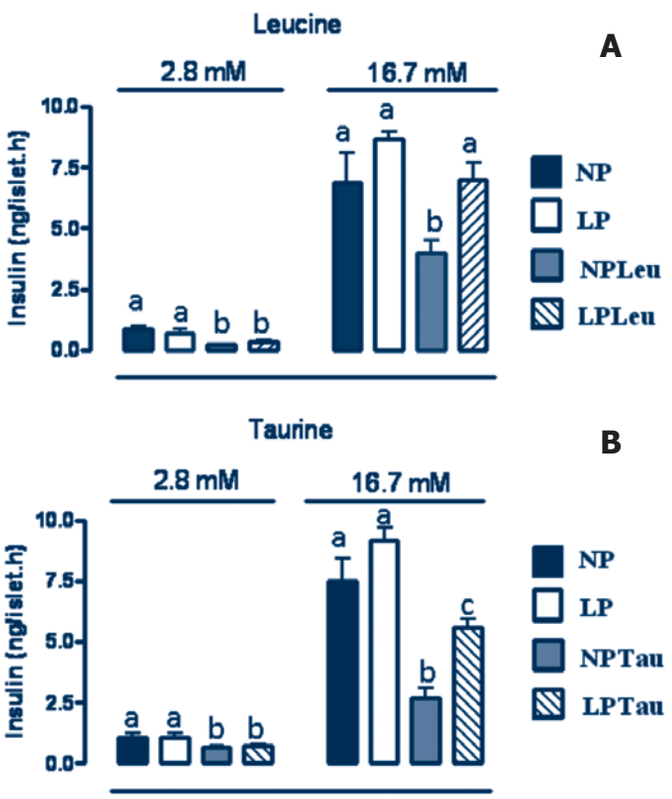

Figure 2. Insulin secretion from islets of rats fed a control (17% protein – NP groups) or low protein (6% protein – LP groups) diet and supplemented with leucine (A) or taurine (B). In (A), control and low protein fed-rats were supplemented with 1.5% leucine (NPLeu and LPLeu, respectively) into the drinking water for 30 days and in (B) with 2.5% taurine (NPTau and LPTau, respectively) into the drinking water for 90 days. Animals received their corresponding diet for 3 months, starting after weaning. The islets were incubated for 1 hour with 2.8 or 16.7 mM glucose. Results are expressed as mean + SE. n = 6. Two-way ANOVA, followed by Newman Keuls post hoc test. Means without a common letter differ, $p<0.05$.

We observed that leucine supplementation partially or completely restores the insulin secretion by the pancreatic islets in the undernourished mice (Fig. 2A) and, most importantly, it increases or even normalizes the expression of key proteins involved in the mechanism of insulin secretion, such as the muscarinic receptor M3, PKC, PKA and the β2 subunit of the L-type calcium channel, an effect that seems to be mediated by the PI3K pathway, since the expression of AKT and p-AKT is increased in these mice (Amaral et al., 2008, unpublished results).

Taurine

Taurine is a conditionally essential amino acid for human and non-human primates (Schuller-Levis and Park, 2003). It is found in meat, fish and milk, but may also be biosynthesized from methionine and cysteine. Taurine is involved in many important biological functions, including retina and nervous system development, Ca^{2+} modulation, membrane stabilization, reproduction, immunity and osmoregulation (Aerts and Van Assche, 2002).

Regarding to pancreas, taurine is found at high concentrations within pancreatic islets, compartmentalized inside glucagon and somatostatin-containing cells, suggesting that its release is necessary for an efficient modulation of insulin secretion (Bustamante et al., 2001). Previous studies have shown that taurine increases insulin secretion (Kaplan et al., 2004; Cherif et al., 1996, Cherif et al., 1998; Kalbe et al., 2005) and sensitivity (Nakaya et al., 2000; Tsuboyama-Kasaoka et al., 2006) in different experimental conditions. However, the exact mechanism of taurine action on glucose homeostasis as well as on endocrine pancreas, is not well established.

Taurine reduces the rate of apoptosis (Merezak et al., 2001) and acts on DNA synthesis, preventing abnormal development of the endocrine pancreas (Boujendar et al., 2003). Moreover, it has been shown that taurine increases glucose sensitivity of UCP2- overexpressing β-cells by enhancing mitochondrial metabolism (Han et al., 2004), by acting on the mechanism for Ca^{2+} sequestration into the mitochondrial matrix (Lee et al., 2004). Finally, taurine inhibits ATP-sensitive K^+ (KATP) channel activity in adult rat beta cells (Park et al., 2004). In addition, there is evidence that the hypoglycemic action of taurine is due to the potentiation of the effects of insulin (Lapson et al., 1983) and its interaction with the insulin receptor (Maturo and Kulakowski, 1988).

We have recently found that taurine supplementation increased insulin content in mice pancreatic islets, increased insulin secretion at stimulatory glucose concentrations besides increasing islet β-cell glucose sensitivity. Taurine also promoted a higher expression of the transcription factor of the islets of Langerhans (PDX-1) (Carneiro et al., 2008). We also observed an improved glucose tolerance in these animals, which appears to be due to the higher phosphorylation of both basal and insulin stimulated tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in skeletal muscle and liver (Carneiro et al., 2008).

At present, we are investigating the effects of taurine supplementation on the mechanisms of insulin secretion in rats fed a low protein diet after weaning. Our preliminary results have shown an improvement on insulin secretion at stimulatory glucose concentrations (Batista et al., 2008, unpublished results, Fig. 2B). In an animal model of fetal protein malnutrition, taurine supplementation normalized islet cell proliferation and insulin secretion in response to different secretagogues (Kalbe et al., 2005; Cherif et al., 1998). However, taurine failed to restore insulin secretion in vitro, indicating its importance during development for a normal fetal beta cell function (Kalbe et al., 2005; Cherif et al., 1998).

Conclusion

In summary, protein restriction during the early stages of life causes several alterations in pancreatic islets similar to the abnormalities observed in type 2 diabetes, resulting in impaired insulin secretion. Amino acids can directly stimulate insulin secretion by pancreatic β-cells as well as acting on protein synthesis and gene transcription. The amino acids leucine and taurine seem to have a potential as therapeutic tools in situations in which insulin secretion is not sufficient. Leucine supplementation partially or completely restores insulin secretion in undernourished mice. Taurine has been shown to increase insulin content and secretion, as well as to increase the expression of genes essential for β-cell functionality. The knowledge of the mechanisms through which amino acids act on pancreatic β-cells to stimulate insulin secretion is of interest for clinical medicine. It can reveal new targets for the development of drugs aimed at the treatment of endocrine diseases, in special diabetes.

References

Aerts L, Van Assche, FA (2002). Taurine and taurine-deficiency in the perinatal period. J Perinat Med 30:281-286.

Ahrén B (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion – implications for health and disease. Diabetologia 43:393–410.

Arantes VC, Teixeira VP, Reis MA, et al. (2002). Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. J Nutr 132:3030-3035.

Araujo EP, Amaral ME, Filiputti E, et al. (2004). Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduced expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. J Endocrinol 181:25-38.

Boujendar S, Arany E, Hill D, et al. (2003). Taurine supplementation of a low protein diet fed to rat dams normalizes the vascularization of the foetal endocrine pancreas. J Nut 133: 2820-25.

Bustamante J, Lobo MT, Alonso FJ, et al. (2001). An osmotic-sensitive taurine pool is localized in rat pancreatic islet cells containing glucagon and somatostatin. Am J Physiol Endocrinol Metab 281:E1275-E1285.

Carling D (2004). The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. TRENDS Biochem Sci 29:18-24.

Carneiro EM, Mello MAR, Gobatto CA et al. (1995). Low protein diet impairs glucose-induced insulin secretion from and ^{45}Ca uptake by pancreatic rat islets. J Nutr Biochem 6:314-318

Carneiro EM, Latorraca MQ, Araujo E (2008). Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. J Nutr Biochem (in press).

Cherif H, Reusen B, Dahri S, et al. (1996). Stimulatory effects of taurine on insulin secretion by foetal rat islets cultured in vitro. J Endocrinol 51: 501-06.

Cherif H, Reusens B, Ahn, MT, et al. (1998). Effects of taurine on the insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low-protein diet. J Endocrinol 159:341-348.

Cooper DMF (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. Biochem J 375:517–529.

da Silva Xavier G, Leclerc I, Varadi A et al. (2003). Role for AMP-activated protein kinase in glucose-stimulated insulin secretion and preproinsulin gene expression. Biochem J 371:761-744.

de León DD, Stanley CA (2007). Mechanisms of Disease: advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in neonates Nat Clin Pract Endocrinol Metab 3: 57–68.

de Mello MA, Luciano E, Carneiro E, et al. (2003). Glucose homeostasis in pregnant rats submitted to dietary protein restriction. Res Comm Mol Pathol Pharmacol 113-114:229-246.

Delguingaro-Augusto V, Ferreira F, Bordin S, et al. (2004). A low protein diet alters gene expression in rat pancreatic islets. J Nutr 134:321-327.

Dickson LM, Rhodes CJ (2004). Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? Am J Physiol Endocrinol Metab 287:E192-198.

Fatrai S, Elghazi L, Norman B, et al. (2006). Akt induces beta-cell proliferation by regulating cyclin D1, cyclin D2, and p21 levels and cyclin-dependent kinase-4 activity. Diabetes 55:318–325.

Flatt PR (1996). Hormonal and neural control of endocrine pancreatic function. In Textbook of Diabetes, pp. 9.1-9.7 [JCPaG Williams, editor]. Oxford: Blackwell.

Ferreira F, Filiputti E, Arantes VC, et al. (2003). Decreased cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinase c alpha expression. J Nutr 133:695-699.

Ferreira F, Barbosa HC, Stoppiglia LF, et al. (2004) Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKAalpha expression. J Nutr 134:63-67.

Filiputti E, Ferreira F, Souza KLA et al. (2008). Impaired insulin secretion and

decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. Life Science 82:542-548.

Gao Z, Young RA, Li G, et al. (2003). Distinguishing features of leucine and alpha-ketoisocaproate sensing in pancreatic beta-cells. Endocrinology 144:1949-1957.

Gleason CE, Lu D, Witters LA et al. (2007). The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic beta-cells. J Biol Chem 282:10341-10351.

Han J, Bae JH, Kim SY, et al. (2004). Taurine increases glucose sensitivity of UCP2-overexpressing β-cells by ameliorating mitochondrial metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab 287: E1008-18.

Hansen L, Urioste S, Petersen HV, et al. (2000). Missense mutations in the human insulin promoter factor-1 gene and their relation to maturity-onset diabetes of the young and late-onset type 2 diabetes mellitus in caucasians. J Clin Endocrinol Metab 85:1323-1326.

Hales CN, Barker DJ (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia 35:595-601.

Henquin JC, Jonas JC, Gilon P (1998). Functional significance of Ca^{2+} oscillations in pancreatic β cells. Diabetes Metab 24:30-36.

Kalbe L, Leunda A, Sparre T, et al. (2005) Nutritional regulation of proteases involved in fetal rat insulin secretion and islet cell proliferation. Brit J Nutr 93:309-316.

Kaplan B, Karabay G, Zagyapan RD, et al. (2004). Effect of taurine in glucose and taurine administration. Amino Acids 27:327-33.

Kimura N, Tokunaga C, Dalal S. et al. (2003). A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. Genes Cells 9:65-79.

Koster JC, Permutt MA, Nichols CG (2005). Diabetes and insulin secretion: the ATP-sensitive K+ channel (K ATP) connection. Diabetes 54:3065-3072.

Kulkarni RN (2004). The islet beta-cell. Int J Biochem Cell Biol 36:365-371.

Lapson WG, Kramer JH, Schaffer SW (1983). Potentiation of the actions of insulin by taurine. Can J Physiol Pharmaco 61: 457-63.

Latorraca MQ, Carneiro EM, Boschero AC, et al. (1998a). Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. Br J Nutr 80:291-297.

Latorraca MQ, Reis MA, Carneiro EM, et al. (1998b). Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. J Nutr 128:1643-1649.

Lee SH, Lee HY, Kim SY, et al. (2004). Enhancing effect of taurine on glucose response in UCP2-overexpressing beta cells. Diabetes Res Clin Pract 66:S69-S4.

Leon-Quinto T, Magnan C, Portha B (1998). Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. Endocrinology 139:3382-3389.

Li C, Buettger C, Kwagh J, et al. (2004). A signaling role of glutamine in insulin secretion. J Biol Chem 279:13393-13401.

Macfarlane WM, Frayling TM, Ellard S, et al. (1999) Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. J Clin Invest 104:R33-39.

Maturo J, Kulakowski EC (1988). Taurine binding to the purified insulin receptor. Biochem Pharmacol 37:755-60.

Merezak S, Hardikar AA, Yajnik CS, et al. (2001). Intrauterine low protein diet increases foetal beta-cell sensitivity to NO and IL-1 beta: the protective role of taurine. J Endocrinol 171: 299-08.

Milanski M, Arantes VC, Ferreira F, et al. (2005). Low-protein diets reduce PKAalpha expression in islets from pregnant rats. J Nutr 135:1873-1878.

Nakaya Y, Minami A, Harada N, et al. (2000). Taurine improves insulin sensitivity in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous type 2 diabetes. Am J Clin Nutr 71:54-8.

Newsholme P, Brennan L, Bender K (2006). Amino acid metabolism, b-cell function and diabetes. Diabetes 55:S39-S47.

Orci L (1985) The insulin factory: a tour of the plant surroundings and a visit to the assembly line. The Minkowski lecture 1973 revisited. Diabetologia 28:528-546.

Park EJ, Bae JH, Kim SY, et al. (2004). Inhibition of ATP-sensitive K+ channels by taurine through a benzamido-binding site on sulfonylurea receptor 1. Biochem Pharmacol 67:1089-96.

Pelletier DL (1994). The potentiating effects of malnutrition on child mortality: epidemiologic evidence and policy implications. Nutr Rev 52:409-415.

Rutter GA, da Silva Xavier G, Leclerc I (2003). Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homoeostasis. Biochem J 375:1-16.

Schuller-Levis GB, Park E (2003). Taurine: new implications for an old amino acid. FEMS Microbiol Lett 226: 195-02.

Soria B, Martin F (1998). Cytosolic calcium oscillations and insulin release in pancreatic islets of Langerhans. Diabetes Metab 24:37-40.

Takahashi N, Kadowaki T, Yazaki Y (1997). Multiple exocytotic pathways in pancreatic beta cells. J Cell Biol 138:55-64.

Tengholm, A., Gylfe, E.(2008) Oscillatory control of insulin secretion. Mol Cel Endocrinol (in press) doi:10.1016/j.mce.2008.07.009

Thomas G, Hall MN (1997). TOR signalling and control of cell growth. Curr Opinion Cell Biol 9:782-787.

Tom A, Nair KS (2006). Assessment of branched-chain amino acid status and potential for biomarkers. J Nutr 136:S324-S330.

Tsuboyama-Kasaoka M, Shozawa C, Sano K (2006). Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity. Endocrinology 147:3276-3284.

Um SH, Frigerio F, Watanabe M, et al. (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. Nature 431:200-205.

Camila Aparecida Machado de Oliveira and Everardo Magalhães Carneiro
Department of Physiology and Biophysics
Institute of Biology / P.O.Box 6109
University of Campinas - UNICAMP
13083-970, Campinas, SP, Brazil
Phone + 55 19 35216203

El óxido nítrico es una molécula muy reactiva que, dependiendo de su concentración, tiene dos tipos de efectos sobre la viabilidad y fisiología de las células. A bajas concentraciones, promueve señales de supervivencia. A altas concentraciones, promueve señales de muerte, principalmente mediadas por estrés nitrosativo. El presente trabajo discute ambos aspectos aplicados a la obtención y mantenimiento de las células beta pancreáticas como estrategia terapéutica contra la diabetes.

El Oxido Nítrico y la regulación de la supervivencia de las células beta pancreáticas. Una propuesta de modificación de protocolos

Gladys M. Cahuana, Francisco J. Bedoya, Juan R. Tejedo.

El Óxido Nítrico (NO) es una molécula di-atómica altamente reactiva que tiene actividad sobre los sistemas biológicos. Respecto a las células beta, es ampliamente conocido que tanto en la diabetes tipo 1 como en la diabetes tipo 2, la disminución de la masa de células beta pancreáticas es un factor importante en el desarrollo de la enfermedad. En esta disminución está comprometido el NO, producido principalmente como parte de una respuesta inflamatoria a través de la inducción de óxido nítrico sintasa 2 (NOS2). Por otro lado, también en estos tipos celulares ha sido descrito el papel protector del NO producido a través de la activación de la NOS3. Un conjunto de estrategias terapéuticas para hacer frente a la enfermedad es la posibilidad de suplir la disminución de la masa de células beta que desaparecen, ya sea a través de transplante de islotes a partir de donantes cadavéricos o de células productoras de insulina obtenidas a partir de células troncales. En el primer caso, los islotes utilizados son obtenidos mediante el protocolo de Edmonton. Este procedimiento ha mostrado ser

adecuado principalmente debido al uso de islotes a partir de más de un donante cadavérico y de una medicación inmunosupresora libre de esteroides. Sin embargo, presenta una serie de aspectos que disminuyen su eficiencia: sólo entre el 15 al 30 % de los islotes transplantados son funcionales. El método semiautomático de Ricordi, con ligeros cambios, sigue siendo el mejor método para la obtención de los islotes, a pesar de ser un método que implica un fuerte estrés mecánico y la exposición a proteasas, que como está demostrado, disminuyen la viabilidad de los islotes. Esta problemática hace necesario estudiar cambios en el sistema de manera que se incremente la eficiencia del método. Particularmente en nuestro laboratorio trabajamos con un sistema que incrementa la supervivencia de las células beta pancreáticas y de los islotes de roedores y humanos ante diversos tipos de estrés. De este modo, en los últimos años, hemos generado un cuerpo de evidencias acerca de que el NO, utilizado en bajas concentraciones, es un agente protector, y que utilizado a altas concentraciones, es un agente injuriante. En este artículo intentaremos resumir este cuerpo de evidencias y discutirlas respecto a la literatura científica actualizada.

Acerca del Óxido Nítrico y sus propiedades biológicas

El óxido nítrico es una molécula muy reactiva que, dependiendo de su concentración, tiene dos tipos de efectos sobre la viabilidad y fisiología de las células (Figura 1). A elevadas concentraciones produce estrés nitrosativo y promueve procesos que culminan en la muerte celular por apoptosis. Estos efectos están mediados por dos tipos de señales. Una es la activación de vías de señalización que regulan la expresión de proteínas pro-apoptóticas (Bernabé y cols., 2001), como ASK-1, JNK, p38 quinasa e incremento de p53 y Bax (Sarker y cols, 2003). El segundo tipo de señales está relacionada con cambios estructurales, como el incremento de modificaciones post-traduccionales que promueven la degradación de proteínas de actividad anti-apoptóticas (Bcl-2) inducida por el incremento de la lipooxidación y la carbonilación, entre otras (Cahuana y cols., 2003; 2004). Además, altas concentraciones de NO promueve la apoptosis de las células beta a través de la vía mitocondrial, incrementando la liberación de citocromo c y la activación de la caspasa 3 (Tejedo y cols., 1999).

A bajas concentraciones, el NO promueve la activación de diversas vías que están comprometidas con la supervivencia celular; este aspecto será tratado con mayor detalle más adelante.

El Oxido Nítrico como molécula de supervivencia

El óxido nítrico desempeña funciones relevantes para la fisiología de la célula. Los niveles de NO que facilitan este desempeño son cantidades moderadas (homeostáticas) dependiendo del tipo celular. En la célula beta pancreática, estas concentraciones son del orden de nanomolar y juega un papel regulador en su respuesta secretora. Además, es capaz de sustituir las funciones de diversos factores tróficos, de manera que se comporta como un potente factor contra la apoptosis producida por la ausencia de estos factores (Cahuana y cols., 2008). Nuestro grupo ha descrito que la suplementación exógena a partir de dadores de NO y la producción endógena de bajas concentraciones de NO, generada dentro de la célula por activación de las isoformas constitutivas, la oxido nítrico sintasa neuronal (NOS1) y la oxido nítrico sintasa endotelial (NOS3), protegen de la apoptosis inducida por la retirada de suero (Cahuana y cols., 2008; Tejedo y cols., 2001; Tejedo y cols., 2004). En este contexto, hemos descrito la capacidad que tiene el NO de activar un conjunto de vías de señalización, al que llamaremos la Vía de señalización del Óxido Nítrico. La vía del NO comprende la activación de la c-Src tirosina quinasa y del sistema de la sGC/PKG. La activación de c-Src por el NO es

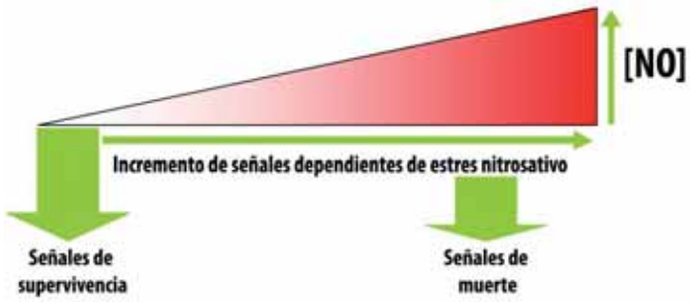

Figura 1. Doble efecto del NO dependiendo de su concentración. A bajas concentraciones, el oxido nítrico (NO), promueve señales de supervivencia. A altas concentraciones, promueve señales de muerte, principalmente mediadas por estrés nitrosativo. Es importante observar que las señales iniciadas a bajas concentraciones pueden estar activas a altas concentraciones; sin embargo, la intensidad del daño de las altas concentraciones es dominante.

un evento temprano en la señalización antiapoptótica que conduce a la activación del sistema PI3K/Akt/Bad (Tejedo y cols., 2001; Tejedo y cols., 2004). Además, hemos descrito la implicación de las proteínas sustrato del receptor de la insulina (IRSs) en la señalización protectora del NO en la célula. En dicha respuesta protectora participa la fosforilación de IRS-1 e IRS-2 (Cahuana y cols., 2008), que también son dependientes de la activación de c-Src (Figura 2).

En otros sistemas celulares, se ha descrito dianas adicionales del NO. En los linfocitos T, el NO activa la vía Ras/Raf1/ Elk-1 y Erk 1/2 (Alavi y cols., 2003). En este tipo celular, esta vía controla la proliferación celular, situación que sugiere un papel del NO en la regulación de la proliferación (Deora y cols., 2000). En células endoteliales, el factor de crecimiento vascular (VEGF) induce la activación de RAF-1 a través de la fosforilación de sus residuos de tirosina 340 y 341, en un proceso dependiente de c-Src y de PKG (Hood y Granger, 1998). El resultado de esta activación es una respuesta antiapoptótica en el caso de c-Src y proliferación en el caso de la PKG.

En las células beta pancreáticas, dado que el cultivo en ausencia de suero conduce a la muerte por apoptosis, es razonable proponer que la supervivencia y el crecimiento de la célula esté modulado por factores tróficos extracelulares. Se había descrito previamente que el IGF-1 era capaz de bloquear la respuesta apoptótica inducida por citoquinas inflamatorias en la célula (Casellas y cols., 2006; Hill y cols., 1999). Teniendo en cuenta estos antecedentes, iniciamos una serie de experimentos encaminados a estudiar el papel del NO en la señalización del sistema IGF-1/insulina. Nuestros resultados muestran que la retirada de suero provoca la muerte de las células por apoptosis. También observamos que la retirada de suero produce un descenso en los niveles de la proteína NOS3 y de la producción de NO. Estos efectos se cancelan sustancialmente tras la exposición de las células a insulina ó IGF-1. Además, los efectos protectores de la insulina/IGF-1 se cancelan en buena proporción con inhibidores de la NOS.

Al igual que en otros modelos, y de acuerdo con lo descrito por numerosos autores, nuestros resultados también muestran que la señalización por proteínas IRS está involucrada en las acciones antiapoptóticas de estos factores. Lo novedoso de nuestros resultados es que la activación por fosforilación de estas proteínas es un proceso parcialmente dependiente de la activación de Src y del NO. Al respecto de las proteínas IRS, nuestro grupo ha demostrado (Tejedo y cols., 2004) que la IRS-1 participa en la señalización del NO, y recientemente, (Cahuana y cols., 2008) hemos descrito que la IRS-2 forma parte de la señal antiapoptóticas inducida por el sistema IGF-1/insulina y por el NO. Por otro lado, en células RINm5F hemos encontrado que la proteína IRS-3 no participa en esta señalización.

Utilizando islotes humanos hemos observado que la activación de las proteínas IRS-1 e IRS-2 es dependiente del Sistema IGF-1/insulina, y que además son activadas por un dador exógeno de NO. Queda aún por determinar el papel de las diferentes IRS en células diferenciadas murinas y humanas. Por una parte, se ha descrito que la proteína IRS-2 juega un papel relevante en el control de la masa de células durante el desarrollo del páncreas en ratones (Burks y White, 2001). Por otro lado, el hallazgo de que la variante polimórfica Arg972 IRS-1, abundante en diabéticos tipo 2, causa apoptosis en islotes humanos in-vitro (Federici y cols., 2001), indica que esta IRS puede jugar un papel relevante en humanos. En este sentido, también son relevantes los estudios con una insulina modificada [LysB3, GluB29], que posee una acción protectora sobre la célula beta asociada con una unión más fuerte al receptor (Rakatzi y cols., 2003).

El Óxido Nítrico en el contexto de la extracción de islotes.

La diabetes es una enfermedad que afecta a entre el 2 al 5 % de la población mundial. El trasplante de islotes a partir de donantes cadavéricos bajo un régimen de inmuno-supresión libre de esteroides ha mostrado ser una terapia que funciona (Shapiro y cols., 2000) en los pacientes con Diabetes tipo 1. Uno de los cuellos de botella en el transplante de islotes es el alto número de islotes rechazados: sólo del 15 al 30 % de los islotes transplantados son funcionales (Merani y Shapiro, 2006; Soria y cols., 2007). En general, esta técnica necesita ser mejorada en: i) el procedimiento de obtención de los islotes; ii) el control de la supervivencia y muerte por apoptosis de los islotes; iii) en la protección de los islotes del ataque inmunológico y iv) la utilización de nuevos regímenes de inmunosupresión.

En este sentido, es posible mejorar los puntos i y ii modificando los procedimientos en uno o varios pasos que incluyan la suplementación del sistema con bajas concentraciones de NO. El rendimiento en la extracción de islotes depende básicamente de las características del donador y de los parámetros durante el procesamiento. La muerte cerebral del los donantes ya promueve una rápida reacción inflamatoria que predispone a los islotes al ataque inmunológico en el receptor después del transplante (Takada y cols., 2004): los islotes sintetizan el factor tisular (TF), que dispara la reacción trombótica después del transplante y también expresan la proteína quimioatractante de los macrófagos (MCP-1), que presenta una potente actividad quimiotáctica y está relacionada con el rechazo de los islotes después del transplante. La obtención de los islotes de donantes vivos sugiere mejores resultados; sin embargo, la experiencia al día de hoy es limitada (Soria y cols., 2007), de modo que aún el método de Ricordi es el mejor método de extracción. Este método comprende la extracción del órgano, transporte, perfusión, digestión y purificación de los islotes.

En la extracción del órgano se ha observado que la utilización del método de doble lamina entre el perfluorocarbono y la solución de Universidad de Wisconsin incrementa la calidad y el rendimiento de los islotes (Lakey y cols., 2002), aunque recientemente se ha descrito que puede disminuir la oxigenación en alrededor del 15 % del páncreas (Hering y cols., 2004). También se ha descrito que la solución de M-Kyoto, que contiene trehalosa como citoprotector y ulinistatina como inhibidor de tripsina, mejora significativamente la calidad de los islotes, comparado con el método de doble lamina (Noguchi y cols., 2006).

Durante la perfusión y la digestión es necesario optimizar la digestión enzimática por medio de la liberasa H1: el exceso a la exposición a la enzima puede producir la fragmentación del islote, apoptosis y la consecuente pérdida de capacidad de secretar insulina (Balamurugan y cols., 2005). Por otro lado, el método semiautomático en la cámara de Ricordi resulta en un fuerte estrés mecánico debido a la agitación.

La diferencia de densidad entre los islotes y el resto de tejido pancreático facilita la purificación de los islotes por centrifugación en una gradiente de densidad, utilizando el separador de células COBE 2991. Las características de los sistemas de gradientes influyen en la calidad y rendimiento de los islotes (Ichii y cols., 2005).

Con respecto al mantenimiento de los islotes, la posibilidad de incrementar su viabilidad mediante el cultivo ha sido explorada por muchos grupos (Soria y cols., 2007). Tres grupos de antecedentes han centrado nuestra atención. En primer lugar, se ha descrito que la utilización del FGF-2 en los cultivos de islotes da como resultado un control de la glicemia, un incremento de la calidad de los islotes y una mejor implantación y revascularización cuando se implantan baja la cápsula suprarrenal de ratones diabéticos (Rivas-Carrillo y cols., 2006). En segundo lugar, el hecho de que la suplementación de las soluciones de aislamiento de islotes con Nicotinamida mejora sustancialmente la obtención de islotes con alta calidad para usos clínicos (Ichii y cols., 2006). Y en tercer lugar, nuestra experiencia utilizando cultivos de islotes humanos y de rata muestran que bajas concentraciones de Óxido Nítrico los protegen de la apoptosis inducida por la retirada de suero. Adicionalmente, hemos demostrado que tanto el IGF-1 como

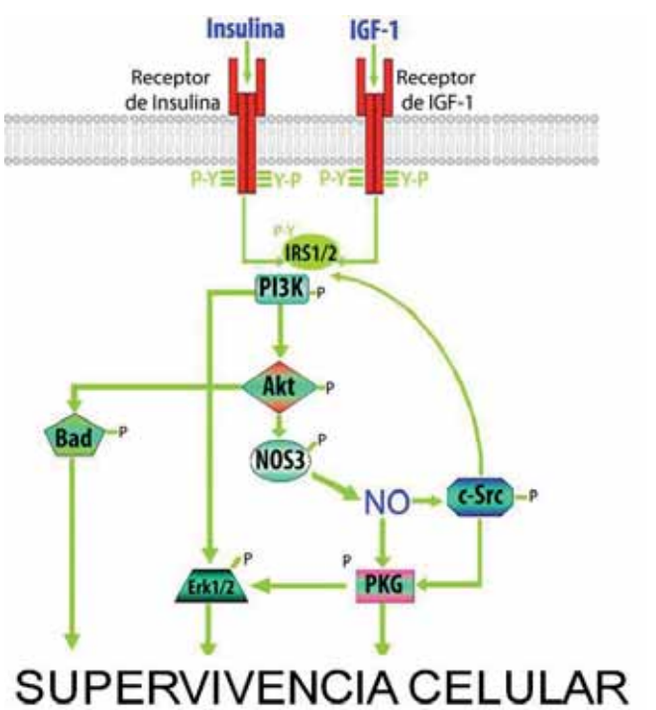

Figura 2. Vía de señalización del Óxido Nítrico implicada en la supervivencia celular de las células beta pancreáticas. Los factores de supervivencia Insulina e IGF-1, inician la activación de una vía que comienza con la fosforilación de sus respectivos receptores, que a su vez activan a las proteínas sustrato de receptores 1 y 2 (IRS 1 y 2). La fosforilación de las IRS 1/2 promueve la activación de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K), que a través de proteína quinasa B (PKB/Akt) y de la fosforilación de Bad protege de la muerte por apoptosis. La proteína Akt activada induce el incremento de la actividad de la óxido nítrico sintasa 3 (NOS3), que produce niveles bajos de óxido nítrico (NO). El NO, a su vez, puede incrementar la fosforilación de las proteínas IRS 1/2 a través de la activación de c-Src, dando lugar a la formación de un circuito de retroalimentación. Por otro lado, el NO puede activar a la proteína quinasa dependiente de GMP cíclico a través del incremento de cGMP o a través de la activación de la c-Src. La PKG, finalmente, activa a la Ekr 1/2, que también puede ser activada por una vía dependiente de PI3K; esta vía tiene también como efecto el incremento de la supervivencia celular.

la insulina promueven señales de supervivencia que son mediadas por el NO (Cahuana y cols., 2008; Tejedo y cols., 2001; Tejedo y cols., 2004).
Por otro lado, se ha observado que el NO protege a los hepatocitos de la apoptosis inducida por estrés oxidativo provocado por el ácido araquidónico, que se ve incrementado por la inhibición de las óxido nítrico sintasas (NOS) (Wu y Cederbaum, 2006). En esta misma línea de razonamiento, la preincubación de osteoblastos con bajas concentraciones de donadores de NO protege a estas células de la apoptosis inducida por altas concentraciones de NO, a través de mecanismos dependientes de la mitocondria y de la activación de vías de señalización (Chang, 2006; Tai, 2007;). Mecanismos adicionales de regulación de la expresión génica por el NO han sido propuestos como parte de la respuesta protectora (Kitiphongspattana, 2007; Liu, 2007).

Como hemos comentado anteriormente, una serie de vías de señalización dependientes de estrés oxidativo son activadas durante el proceso de obtención y mantenimiento de los islotes (Abdelli y cols., 2004), las mismas que se activan cuando los islotes son expuestos a citoquinas inflamatorias y a especies reactivas de oxigeno, incluyendo altas concentraciones de NO (Bernabe y cols., 2001; Cahuana y cols, 2003; Cahuana y cols., 2004). Es más, recientemente se ha descrito que durante el proceso de aislamiento de islotes se activa la ruta dependiente de JNK y ASK-1(Noguchi, 2007; Noguchi y cols., 2007). Con todos estos antecedentes, pensamos que es interesante estudiar el efecto de bajas concentraciones de NO en todos los pasos del método de aislamiento de islotes como un sistema promotor de sistemas de supervivencia, ya sea activando vías de señalización intracelular, como promoviendo la expresión de genes. Este razonamiento se fundamenta en tres ideas: 1) Se ha descrito que el Óxido Nítrico es un mediador de las señales extracelulares inducidas por factores de crecimiento tales como el IGF-1 y la insulina; 2) El Óxido Nítrico añadido en bajas concentraciones o mediante la sobre-expresión de las NOS constitutivas protege a las células de la muerte celular por apoptosis; y 3) La preincubación de otros modelos celulares con bajas concentraciones de NO protege de la apoptosis inducida por altas concentraciones de NO. De tal manera, es factible que la utilización de bajas concentraciones de NO durante los procesos de extracción de islotes mejore la calidad de los islotes a través de la promoción de procesos de protección celular.

Recientemente se ha descrito que el pre-tratamiento con bajas concentraciones de óxido nítrico (NO) protege a los osteoblastos de la apoptosis inducida por altas concentraciones de NO, aunque los mecanismos de esta acción aún no han sido descritos. Además, nuestro grupo ha demostrado que bajas concentraciones de NO protegen a las células productoras de insulina de la apoptosis inducida por la retirada de suero. Con estos antecedentes, pensamos que es interesante estudiar el uso de bajas concentraciones de NO en todas las fases del método de extracción. Nuestra hipótesis plantea que la utilización de bajas concentraciones de NO durante las fases de extracción de los islotes incrementa su viabilidad, funcionalidad y mejora su implantación en modelos animales. Resultados preliminares utilizando células INS-1E muestran que el pre-condicionamiento con bajas concentraciones de NO incrementa la expresión de la Hemo-oxigenasa 1 y de la Hsp-70, dos potentes sistemas de protección de muerte por estrés.
Takada y cols. (2004) plantean que la muerte cerebral de los donantes promueve una rápida reacción inflamatoria que predispone a los islotes al ataque inmunológico en el receptor después del transplante (Takada y cols., 2001). Este aspecto de la activación de señales inflamatorias es crucial para las células beta pancreáticas, ya que estas células presentan receptores para las citoquinas inflamatorias cuyo mecanismo de acción implica un incremento de la expresión de la NOS inducible, y por lo tanto, de la producción de altas concentraciones de NO. En este contexto, si un procedimiento promueve la activación de señales de protección antes de la muerte cerebral en los animales de experimentación, podría emplearse para discernir si este efecto puede ser contrarrestado utilizando la administración exógena de bajas concentraciones de NO en ratones.

Durante el procedimiento de extracción del páncreas se emplean diversas soluciones, tales como la utilizada en el método de doble lámina entre el perfluorocarbono y la solución de Universidad de Wisconsin (Lakey y cols., 2002), y la solución de M-Kyoto, que contiene trehalosa como citoprotector y ulinistatina como inhibidor de tripsina. Ambas mejoran significativamente la calidad de los islotes comparando con el método de doble lámina (Noguchi y cols., 2006), aunque ninguno de los dos sistemas permite la oxigenación completa del órgano (Hering y cols., 2004). Debido a ello, se siguen investigando otros sistemas, básicamente utilizando las dos soluciones indicadas suplementadas con factores de crecimiento como el FGF-2 (Rivas-Carrillo y cols., 2006), o con sustancias que promueven la proliferación celular, como la Nicotinamida (Ichii y cols., 2006). En todos estos ensayos se ha obtenido buenos resultados; sin embargo, su utilización en protocolos de aislamiento de islotes plantea dos problemas. El primero, relacionado con el alto coste de la obtención del FGF-2 y el segundo, con el poco conocimiento que se tiene de las acciones de la Nicotinamida en las células beta pancreáticas. Como planteamiento de futuro, y teniendo en cuenta lo descrito previamente sobre las acciones protectoras de bajas concentraciones de NO sobre líneas celulares productoras de insulina como la RINm5F y sobre islotes aislados a partir de páncreas humano y de rata (Cahuana y cols., 2008; Tejedo y cols., 2001; Tejedo y cols., 2004), sería razonable utilizar NO en todas las fases de aislamiento de los islotes.

Son muy novedosos los trabajos de Chang (2006) y Tai (2007) sobre la preincubación de osteoblastos con bajas concentraciones de donadores de NO, con la finalidad de promover señales de protección contra la apoptosis inducida por altas concentraciones de NO, principalmente relacionadas con la activación de señales inflamatoria. Sin embargo, Tai y cols. (2007) plantean que el efecto de la protección se da a través de la activación del la ruta de la JNK. Este aspecto es controvertido, porque en varios sistemas celulares la apoptosis inducida por distintos tipos de estrés es mediada por esta ruta. Es más, recientemente se ha publicado dos artículos donde se describe que durante el proceso de aislamiento de islotes se activa la ruta dependiente de JNK y ASK-1 (Noguchi, 2007; Noguchi y cols., 2007).

Nuestra experiencia referente a la activación de vías de señalización por NO, nos muestra que a altas concentraciones coexisten las vías de señalización protectoras y vías de señalización inductoras de muerte por apoptosis (Bernabe y cols, 2001; Cahuana y cols, 2003; Cahuana y cols, 2006; Sarker y cols., 2003). Las concentraciones utilizadas por Tai y cols. (2007) son de 0,3 y 2,0 mM como baja y alta concentración, respectivamente, por lo que es enteramente posible que JNK esté activada como parte de un programa de muerte a 0,3 mM de NO. En nuestras condiciones, ambos casos corresponden a altas concentraciones de NO. La individualización de estos dos sistemas debe ser realizada utilizando modelos de apoptosis como los publicados por nuestro grupo (Cahuana y cols., 2008; Tejedo y cols., 2001; Tejedo y cols., 2004).

Agradecimientos:
Este trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (SAF2007/60105), Junta de Andalucía (CTS576) e Instituto

de Salud Carlos III (TERCEL RD06/0010/0025) para FJ. Bedoya. Por el CIBERDEM para FJ. Bedoya, GM. Cahuana y JR. Tejedo. Por la Consejería de Salud-Fundación Progreso y Salud (PI-0095/2007) para JR. Tejedo.

Referencias

Abdelli, S., J. Ansite, R. Roduit, T. Borsello, I. Matsumoto, T. Sawada, N. Allaman-Pillet, H. Henry, J. S. Beckmann, B. J. Hering, and C. Bonny (2004). Intracellular stress signaling pathways activated during human islet preparation and following acute cytokine exposure. Diabetes 53:2815-2823.

Alavi, A., J. D. Hood, R. Frausto, D. G. Stupack, and D. A. Cheresh. (2003). Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli. Science (New York, N.Y) 301:94-96.

Balamurugan, A. N., J. He, F. Guo, D. B. Stolz, S. Bertera, X. Geng, X. Ge, M. Trucco, and R. Bottino (2005). Harmful delayed effects of exogenous isolation enzymes on isolated human islets: relevance to clinical transplantation. Am J Transplant 5:2671-2681.

Bernabe, J. C., J. R. Tejedo, P. Rincon, G. M. Cahuana, R. Ramirez, F. Sobrino, and F. J. Bedoya (2001). Sodium nitroprusside-induced mitochondrial apoptotic events in insulin-secreting RINm5F cells are associated with MAP kinases activation. Experimental Cell Res 269:222-229.

Burks, D. J., and M. F. White (2001). IRS proteins and beta-cell function. Diabetes 50 Suppl 1:S140-145.

Cahuana, G. M., J. R. Tejedo, J. Jimenez, R. Ramirez, F. Sobrino, and F. J. Bedoya (2003). Involvement of advanced lipooxidation end products (ALEs) and protein oxidation in the apoptotic actions of nitric oxide in insulin secreting RINm5F cells. Biochem Pharmacol 66:1963-1971.

Cahuana, G. M., J. R. Tejedo, J. Jimenez, R. Ramirez, F. Sobrino, and F. J. Bedoya (2004). Nitric oxide-induced carbonylation of Bcl-2, GAPDH and ANT precedes apoptotic events in insulin-secreting RINm5F cells. Exp Cell Res 293:22-30.

Cahuana, G. M., J.R. Tejedo, A. Hmadcha, R. Ramirez, A.L. Cuesta, B. Soria, F. Martín and F.J. Bedoya (2008). Nitric Oxide mediates the survival actions of IGF-1 and Insulin in Pancreatic B cells. Cellular signalling 20 301-310.

Casellas, A., A. Salavert, J. Agudo, E. Ayuso, V. Jimenez, M. Moya, S. Munoz, S. Franckhauser, and F. Bosch (2006). Expression of IGF-I in pancreatic islets prevents lymphocytic infiltration and protects mice from type 1 diabetes. Diabetes 55:3246-3255.

Chang, C. C., Y. S. Liao, Y. L. Lin, and R. M. Chen (2006). Nitric oxide protects osteoblasts from oxidative stress-induced apoptotic insults via a mitochondria-dependent mechanism. J Orthop Res 24:1917-1925.

Deora, A. A., D. P. Hajjar, and H. M. Lander (2000). Recruitment and activation of Raf-1 kinase by nitric oxide-activated Ras. Biochemistry 39:9901-9908.

Federici, M., M. L. Hribal, M. Ranalli, L. Marselli, O. Porzio, D. Lauro, P. Borboni, R. Lauro, P. Marchetti, G. Melino, and G. Sesti (2001). The common Arg972 polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes apoptosis of human pancreatic islets. FASEB J 15:22-24.

Hering, B. J., R. Kandaswamy, J. V. Harmon, J. D. Ansite, S. M. Clemmings, T. Sakai, S. Paraskevas, P. M. Eckman, J. Sageshima, M. Nakano, T. Sawada, I. Matsumoto, H. J. Zhang, D. E. Sutherland, and J. A. Bluestone (2004). Transplantation of cultured islets from two-layer preserved pancreases in type 1 diabetes with anti-CD3 antibody. Am J Transplant 4:390-401.

Hill, D. J., J. Petrik, E. Arany, T. J. McDonald, and T. L. Delovitch (1999). Insulin-like growth factors prevent cytokine-mediated cell death in isolated islets of Langerhans from pre-diabetic non-obese diabetic mice. J Endocrinol 161:153-165.

Hood, J., and H. J. Granger (1998). Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. J Biol Chem 273:23504-23508.

Ichii, H., A. Pileggi, R. D. Molano, D. A. Baidal, A. Khan, Y. Kuroda, L. Inverardi, J. A. Goss, R. Alejandro, and C. Ricordi (2005). Rescue purification maximizes the use of human islet preparations for transplantation. Am J Transplant 5:21-30.

Ichii, H., X. Wang, S. Messinger, A. Alvarez, C. Fraker, A. Khan, Y. Kuroda, L. Inverardi, J. A. Goss, R. Alejandro, and C. Ricordi (2006). Improved human islet isolation using nicotinamide. Am J Transplant 6:2060-2068.

Kitiphongspattana, K., T. A. Khan, K. Ishii-Schrade, M. W. Roe, L. H. Philipson, and H. R. Gaskins (2007). Protective role for nitric oxide during the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells. Am J Physiol 292:E1543-1554.

Lakey, J. R., T. Tsujimura, A. M. Shapiro, and Y. Kuroda (2002). Preservation of the human pancreas before islet isolation using a two-layer (UW solution-perfluorochemical) cold storage method. Transplantation 74:1809-1811.

Liu, X. M., K. J. Peyton, D. Ensenat, H. Wang, M. Hannink, J. Alam, and W. Durante (2007). Nitric oxide stimulates heme oxygenase-1 gene transcription via the Nrf2/ARE complex to promote vascular smooth muscle cell survival. Cardiovasc Res 75:381-389.

Merani, S., and A. M. Shapiro (2006) Current status of pancreatic islet transplantation. Clin Sci (Lond) 110:611-625.

Noguchi, H. (2007). Activation of c-Jun NH2-terminal kinase during islet isolation. Endocrine J 54:169-176.

Noguchi, H., M. Ueda, Y. Nakai, Y. Iwanaga, T. Okitsu, H. Nagata, Y. Yonekawa, N. Kobayashi, T. Nakamura, H. Wada, and S. Matsumoto. (2006). Modified two-layer preservation method (M-Kyoto/PFC) improves islet yields in islet isolation. Am J Transplant 6:496-504.

Noguchi, H., Y. Nakai, M. Ueda, Y. Masui, S. Futaki, N. Kobayashi, S. Hayashi, and S. Matsumoto (2007). Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) pathway during islet transplantation and prevention of islet graft loss by intraportal injection of JNK inhibitor. Diabetologia 50:612-619.

Rakatzi, I., G. Seipke, and J. Eckel (2003). [LysB3, GluB29] insulin: a novel insulin analog with enhanced beta-cell protective action. Biochem Biophys Res Commun 310:852-859.

Rivas-Carrillo, J. D., N. Navarro-Alvarez, A. Soto-Gutierrez, T. Okitsu, Y. Chen, Y. Tabata, H. Misawa, H. Noguchi, S. Matsumoto, N. Tanaka, and N. Kobayashi (2006). Amelioration of diabetes in mice after single-donor islet transplantation using the controlled release of gelatinized FGF-2. Cell transplant 15:939-944.

Sarker, K. P., K. K. Biswas, J. L. Rosales, K. Yamaji, T. Hashiguchi, K. Y. Lee, and I. Maruyama (2003). Ebselen inhibits NO-induced apoptosis of differentiated PC12 cells via inhibition of ASK1-p38 MAPK-p53 and JNK signaling and activation of p44/42 MAPK and Bcl-2. J Neurochem. 87:1345-1353.

Shapiro, A. M., J. R. Lakey, E. A. Ryan, G. S. Korbutt, E. Toth, G. L. Warnock, N. M. Kneteman, and R. V. Rajotte (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. The New England Journal of Medicine 343:230-238.

Soria, B., F.J. Bedoya and J.R. Tejedo (2007). Generation of islet from stem cells. Principles of tissue engieneering. Chapter 41. 3rd edition. Ed. by Lanza, Langer and Vacanti.

Tai, Y. T., Y. G. Cherng, C. C. Chang, Y. P. Hwang, J. T. Chen, and R. M. Chen. 2007. Pretreatment with low nitric oxide protects osteoblasts from high nitric oxide-induced apoptotic insults through regulation of c-Jun N-terminal kinase/c-Jun-mediated Bcl-2 gene expression and protein translocation. J Orthop Res 25:625-635.

Takada, M., H. Toyama, T. Tanaka, Y. Suzuki, and Y. Kuroda (2004). Augmentation of interleukin-10 in pancreatic islets after brain death. Transplant Proc 36:1534-1536.

Tejedo, J., J. C. Bernabe, R. Ramirez, F. Sobrino, and F. J. Bedoya (1999). NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria which precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells. FEBS lett. 459:238-243.

Tejedo, J. R., R. Ramirez, G. M. Cahuana, P. Rincon, F. Sobrino, and F. J. Bedoya (2001). Evidence for involvement of c-Src in the anti-apoptotic action of nitric oxide in serum-deprived RINm5F cells. Cel Signalling 13:809-817.

Tejedo, J. R., G. M. Cahuana, R. Ramirez, M. Esbert, J. Jimenez, F. Sobrino, and F. J. Bedoya (2004). nitric oxide triggers the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt survival pathway in insulin-producing RINm5F cells by arousing Src to activate insulin receptor substrate-1. Endocrinology 145:2319-2327.

Wu, D., and A. Cederbaum (2006). Nitric oxide donors prevent while the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME increases arachidonic acid plus CYP2E1-dependent toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 216:282-292.

Gladys M. Cahuana, Francisco J. Bedoya, Juan R. Tejedo
Laboratorio de Regeneración de la célula beta pancreática. Departamento de Terapia Celular y Medicina Regenerativa. Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER). Universidad Pablo de Olavide. Ciber de Diabetes Mellitus y enfermedades asociadas (CIBERDEM).

Correspondencia
J.R. Tejedo
Juan.tejedo@cabimer.es
Edificio CABIMER. Av. Américo Vespucio s/n. Parque Científico Tecnológico
Cartuja 93. 41092, Sevilla, España.

GRUPO TAPER
TECNOLOGÍA SANITARIA Y CIENTÍFICA

GRUPO TAPER, S.A. se funda en junio de 1989 mediante la agregación de seis empresas que contaban con una experiencia de más de 25 años en la distribución de productos sanitarios y científicos.

Desde el año 2004, las actividades de las compañías que formaban el Grupo (Endoscopia Médica, Pacisa y Giralt, La Casa del Médico y Dissa) han sido absorbidas e integradas en un única empresa denominada Grupo Taper, S.A. Dentro de la estrategia de expansión del grupo, ha extendido sus actividades a Portugal, mediante la adquisición de tres empresas, lo que sitúa a GRUPO TAPER, S.A. entre las primeras compañías de distribución de productos sanitarios y científicos de la península ibérica, con un equipo de más de 140 profesionales y unos fondos propios de 24 millones de Euros.

Avda. Industria, 49 • Edificio Fresno. 2ª pl. - Pol. Ind. • 28108 **ALCOBENDAS (Madrid)**
Teléfono: **916 596 520** - Fax: **916 610 084** / e-mail: informacion@grupotaper.com

www.GRUPOTAPER.com

ORCA-R2

'Rapid Readout' Digital Camera

The world-leader in scientific cameras introduces the new ORCA-R2 'Rapid Readout' Digital Camera. Building on the success of the market-leading ORCA-AG, the **ORCA-R2** utilises the same exclusive ER-150 progressive scan interline 1344 x 1024 pixel CCD and offers superior performance and quality with twice the frame rate in the same compact camera head.

The ORCA-R2 is the camera of choice for a wide range of applications such as fluorescence microscopy where a balance of speed, sensitivity and resolution are essential.

Features

- Rapid readout – 16.2 frames/s at full resolution
- High performance IEEE1394b interface
- Fully synchronised operation of two cameras
- Selectable 16-bit digitisation

Applications

- Fluorescence microscopy
- DNA and ploidy analysis
- Histology, pathology and cytology
- Fluorescence in-situ hybridisation studies
- Ion imaging

HAMAMATSU

PHOTON IS OUR BUSINESS

www.sales.hamamatsu.com

Freephone: Europe 00 800 800 800 88, USA 1-800 524 0504