

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**“EL ARSÉNICO COMO FACTOR DE RIESGO  
EN LA INDUCCIÓN DE DIABETES TIPO 2”**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO  
DE DOCTORA EN CIENCIAS  
P R E S E N T A  
LIBB ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR**



**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET**

**MÉXICO, D.F**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

***Gracias***



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS



**ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ**

Director General de la  
Administración Escolar  
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informo que el 24 de octubre de 2007, el Comité Académico del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, con base en el artículo 31 del nuevo Reglamento General de Estudios de Posgrado (aprobado el 29 de septiembre de 2006) asignó jurado para el examen de Doctorado en Ciencias, que sustentará la Lic. en I.B.B. **ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR**, con no. de cuenta 99601164 quien presenta la tesis: " El arsénico como factor de riesgo en la inducción de diabetes tipo 2", dirigida por la Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet.

Integran el jurado:

|             |                                      |
|-------------|--------------------------------------|
| Presidente: | Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo     |
| Secretario: | Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet |
| Vocal:      | Dra. María Teresa Tusié Luna         |
| Vocal:      | Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz    |
| Vocal:      | Dr. Guillermo Benito Robles Díaz     |

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

*"Por mi raza hablará el espíritu"*

Cd., Universitaria, D.F., 24 de octubre de 2007.

**COORDINADOR**

**DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Esta tesis fue dirigida por la

Dra. Patricia Ostrosky Shejet

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

con la co-tutoría de:

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Mariano E. Cebrián García

Sección externa de Toxicología, CINVESTAV

El trabajo *in vitro* fue realizado con la participación de:

Estudiante de pregrado Anna Lilia Burns Elías  
Facultad de Medicina, UNAM

Dra. Ana María Salazar Martínez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Agradezco el apoyo técnico de:  
Q.F.B. Monserrat Sordo Cedeño  
Biol. Ma. Carmen Sánchez Soto

El estudio piloto de la Comarca Lagunera se llevó a cabo con la colaboración de:

Med. Cir. Laura Lizett Cruz Pedraza  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Coahuila  
Unidad Torreón

Dr. Arturo Cebrián García  
Departamento de Posgrado de la  
Universidad Autónoma de Durango  
Unidad Gómez Palacio

Dra. Lizbeth López Carillo  
M. Raúl Ulises Hernández Ramírez  
Centro de Investigación en Salud Poblacional  
Instituto Nacional de Salud Pública

Dra. Susana Bassol  
Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma de Coahuila  
Unidad Torreón

Dr. Walter Klimecki  
Department of Pharmacology and Toxicology,  
University of Arizona

Dr. A. Jay Gandolfi  
Michael J. Kopplin.  
Department of Pharmacology and Toxicology  
Analytical Section of the  
Hazard Identification Core  
University of Arizona

El estudio de linfocitos humanos se realizó en colaboración con:

Dr. Rogelio Zacarías Castillo  
Med. Cir. Juan Andrés Méndez García, Erick Ochoa Heim y Fernando Ulises Lara González  
Departamento de Medicina Interna, Hospital General Dr. Manuel Gea González, SSA

El trabajo fue realizado gracias al patrocinio de:

Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACYT)

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA)

Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM (DGEP)

U.S.-Mexico Binational Center for Environmental Sciences and Toxicology

| <b>ÍNDICE</b>                                                                                          | <b>Pag.</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| RESUMEN                                                                                                | 9           |
| ABSTRACT                                                                                               | 11          |
| INTRODUCCIÓN                                                                                           | 13          |
| <b>A) Regulación fisiológica de la glucosa</b>                                                         | 13          |
| A.1) El páncreas                                                                                       | 13          |
| A.1.1) La célula $\beta$                                                                               | 15          |
| A.1.2) Síntesis de insulina                                                                            | 16          |
| A.1.3) Acoplamiento entre el estímulo con glucosa y la secreción de insulina                           | 17          |
| A.1.4) Maquinaria de secreción                                                                         | 19          |
| A.2) Tejido periférico y acción de la insulina                                                         | 20          |
| A.2.1) Vía de señalización dependiente de PI-3-K                                                       | 21          |
| A.2.2) Señalización de inulina por microdominios lipídicos                                             | 22          |
| A.2.3) Cascadas de fosforilación (MAPK)                                                                | 22          |
| <b>B) Diabetes Mellitus</b>                                                                            | 23          |
| B.1) Clasificación de diabetes mellitus                                                                | 23          |
| B.2) Epidemiología de la diabetes mellitus                                                             | 25          |
| B.3) Genética de la diabetes tipo 2                                                                    | 26          |
| <b>C) Participación de las calpaínas en la homeostasis de glucosa</b>                                  | 28          |
| C.1) Estructura y función de las calpaínas                                                             | 28          |
| C.2) Calpaínas y diabetes tipo 2; calpaína-10                                                          | 29          |
| C.2.1) Estudios genéticos y de asociación                                                              | 29          |
| C.2.2) Estudios fisiológicos                                                                           | 33          |
| C.2.2.1) Secreción de insulina                                                                         | 33          |
| C.2.2.2) Acción de la insulina – captura de glucosa                                                    | 34          |
| <b>D) El arsénico</b>                                                                                  | 37          |
| D.1) Propiedades fisicoquímicas                                                                        | 37          |
| D.2 Fuentes, vías y lugares de exposición                                                              | 38          |
| D.3) Efectos biológicos; biotransformación, relación con enfermedades y mecanismos generales de acción | 40          |
| <b>E) Asociación de diabetes con exposición al arsénico</b>                                            | 43          |
| E.1) Estudios epidemiológicos                                                                          | 43          |
| E.2) Estudios <i>in vitro</i>                                                                          | 45          |
| E.3) Estudios en animales                                                                              | 47          |
| <b>F) El metabolismo de la glucosa y la diabetes evaluado en los leucocitos</b>                        | 51          |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA                                                                             | 54          |
| RELEVANCIA E IMPACTO                                                                                   | 55          |



|                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| HIPÓTESIS                                                                                                                                                         | 56 |
| OBJETIVO GENERAL                                                                                                                                                  | 57 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS                                                                                                                                             | 57 |
| DISEÑO EXPERIMENTAL                                                                                                                                               | 58 |
| METODOLOGÍA                                                                                                                                                       | 59 |
| A) Cultivos Celulares                                                                                                                                             | 59 |
| A.1) Obtención de las células $\beta$ pancreáticas de rata adulta                                                                                                 | 59 |
| A.2) Línea celular de insulinoma de rata RINm5F                                                                                                                   | 59 |
| A.3) Linfocitos humanos                                                                                                                                           | 60 |
| B) Preparación y tratamientos con arsenito de sodio                                                                                                               | 60 |
| C) Evaluación de citotoxicidad                                                                                                                                    | 60 |
| C.1) Índice de viabilidad celular                                                                                                                                 | 60 |
| C.2) Sobrevida celular                                                                                                                                            | 61 |
| D) Ensayo de Elisa (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)                                                                                                            | 61 |
| D.1) Determinación de la secreción de insulina                                                                                                                    | 61 |
| D.2) Proteólisis de SNAP-25                                                                                                                                       | 61 |
| E) RNAm de insulina, calpaína-10 y GAPDH por RT-PCR semicuantitativo<br>y calpaína-10 y GAPDH por RT-PCR en tiempo real                                           | 62 |
| E.1) Extracción y cuantificación de RNA total                                                                                                                     | 62 |
| E.2) Síntesis de cDNA por la reacción de transcriptasa reversa                                                                                                    | 63 |
| E.3) Reacción de PCR                                                                                                                                              | 63 |
| E.4) Electroforesis y semicuantificación                                                                                                                          | 64 |
| E.5 Reacción de PCR en tiempo real (linfocitos humanos) y cuantificación relativa                                                                                 | 64 |
| F) Detección de la expresión de las proteínas insulina, calpaína-10, SNAP-25<br>y actina por medio de la técnica de Western blot en condiciones desnaturalizantes | 65 |
| F.1) Extracción y cuantificación de la proteína                                                                                                                   | 65 |
| F.2) Electroforesis, transferencia y bloqueo                                                                                                                      | 66 |
| F.3) Inmunodetección                                                                                                                                              | 66 |
| F.4) Revelado y semicuantificación                                                                                                                                | 66 |
| G) Calcio intracelular libre                                                                                                                                      | 67 |
| H) Actividad de calpaínas                                                                                                                                         | 67 |
| I) Análisis del ciclo celular por citofluorometría de flujo                                                                                                       | 68 |

|                                                                                                                |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| J) Índice Mitótico y de Replicación                                                                            | 68     |
| K) Estudios en humanos                                                                                         | 69     |
| K.1) Estudio Piloto en la Comarca Lagunera                                                                     | 69     |
| K.1.1) Diseño y estrategia experimental                                                                        | 69     |
| K.1.2) Determinación de la concentración de glucosa, insulina,<br>glucagon y perfil lipídico en suero en ayuno | 70     |
| K.1.3) Determinación de la concentración de arsénico en orina y agua de bebida                                 | 70     |
| K.1.4) Funcionalidad de células $\beta$ y sensibilidad a la insulina (%)                                       | 71     |
| K.1.5) Polimorfismos en el gen de calpaína-10                                                                  | 72     |
| K.1.5.1) Extracción de DNA                                                                                     | 72     |
| K.1.5.2) Determinación de los polimorfismos                                                                    | 72     |
| K.2) Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, SSA                                                           | 72     |
| N) Análisis Estadísticos                                                                                       | 73     |
| <br>RESULTADOS                                                                                                 | <br>75 |
| <br><b><u>Células <math>\beta</math> pancreáticas <i>in vitro</i></u></b>                                      | <br>75 |
| <br><b>A) Cultivos primarios de células <math>\beta</math> de rata adulta</b>                                  | <br>75 |
| A.1) Índice de viabilidad celular                                                                              | 75     |
| A.2) Secreción de insulina basal y estimulada por glucosa                                                      | 76     |
| A.3) Expresión de RNAm de insulina                                                                             | 78     |
| <br><b>B) Línea celular de insulinoma de rata RINm5F</b>                                                       | <br>79 |
| B.1) Índice de viabilidad celular                                                                              | 79     |
| B.2) Sobrevida celular                                                                                         | 82     |
| B.3) Secreción de insulina basal y estimulada por glucosa                                                      | 83     |
| B.4) Síntesis de insulina                                                                                      | 84     |
| B.4.1) Expresión de RNAm de insulina                                                                           | 84     |
| B.4.2) Expresión intracelular de la proteína insulina                                                          | 85     |
| B.5) Cambios en la concentración de calcio intracelular                                                        | 86     |
| B.6) Actividad de calpaínas                                                                                    | 87     |
| B.7) Expresión de RNAm de calpaína-10                                                                          | 88     |
| B.8) Expresión de la proteína calpaína-10                                                                      | 89     |

|                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| B.9) Proteólisis parcial de SNAP-25                                                                                                                 | 90  |
| B.10) Ciclo celular                                                                                                                                 | 91  |
| B.11) Índice mitótico e índice de replicación                                                                                                       | 93  |
| <b><u>Estudios en Humanos</u></b>                                                                                                                   | 94  |
| <b>C) Estudio Piloto en la Comarca Lagunera; donadores con y sin diabetes tipo 2 ambos con distintos grados de exposición a arsénico inorgánico</b> | 94  |
| C.1) Características clínicas de los donadores diabéticos y de los donadores no diabéticos                                                          | 94  |
| C.2) Exposición y metabolismo de arsénico                                                                                                           | 96  |
| C.3) Características genéticas de la población estudiada                                                                                            | 98  |
| C.4) Funcionalidad de las células $\beta$ pancreáticas en función de la concentración de arsénico total excretado en orina                          | 100 |
| C.5) Estratificación de la funcionalidad de células $\beta$ por genotipo de calpaína-10                                                             | 102 |
| C.6) Sensibilidad a la insulina en función de la concentración de arsénico total excretado en orina                                                 | 105 |
| <b><i>D) Determinación de la funcionalidad del linfocito humano como modelo de estudio para el análisis de calpaínas en la diabetes tipo 2</i></b>  | 106 |
| D.1) Características clínicas de los donadores control y de los donadores diabéticos                                                                | 106 |
| D.2) Expresión de calpaína-10 en linfocitos humanos                                                                                                 | 107 |
| D.2.1) RNAm de calpaína-10                                                                                                                          | 107 |
| D.2.2) Proteína calpaína-10                                                                                                                         | 107 |
| D.3) Actividad de calpaínas en linfocitos humanos                                                                                                   | 110 |
| DISCUSIÓN                                                                                                                                           | 111 |
| CONCLUSIONES                                                                                                                                        | 131 |
| PERSPECTIVAS                                                                                                                                        | 133 |
| REFERENCIAS                                                                                                                                         | 135 |

**I)** Díaz-Villaseñor Andrea, Sánchez-Soto Ma. Carmen, Cebrián Mariano E., Ostrosky-Wegman Patricia, Hiriart Marcia. Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic beta-cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 Jul 1;214(1):30-4

**II)** Díaz-Villaseñor Andrea, Burns Anna L., Salazar Ana María, Sordo Monserrat, Hiriart Marcia, Cebrián Mariano E., Ostrosky-Wegman Patricia. Arsenite reduces insulin secretion in rat pancreatic  $\beta$ -cells by decreasing the calcium-dependent calpain-10 proteolysis of SNAP-25. Aceptado para publicación en *Toxicology and Applied Pharmacology*. DOI: doi: 10.1016/j.taap.2008.05.018

**III)** Díaz-Villaseñor Andrea, Burns Anna L., Hiriart Marcia, Cebrián Mariano E., Ostrosky-Wegman Patricia. Arsenic-induced alteration in the expression of genes related to type 2 diabetes mellitus. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007 Dec 1;225(2):123-33.

**IV)** Díaz-Villaseñor Andrea, Hiriart Marcia, Cebrián Mariano E., Zacarías-Castillo Rogelio, Ostrosky-Wegman Patricia. The activity of calpains in lymphocytes is glucose-dependent and is decreased in diabetic patients. *Blood Cells Mol Dis.* 2008 May-Jun;40(3):414-9.

| <b>Índice de Figuras</b>                                                                                                                                                                 | <b>Pag.</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Figura 1.</b> Esquema de islotes pancreáticos de rata y de humano                                                                                                                     | 14          |
| <b>Figura 2.</b> Síntesis y procesamiento de la insulina                                                                                                                                 | 17          |
| <b>Figura 3.</b> Cinética bifásica de secreción de insulina en respuesta a glucosa                                                                                                       | 18          |
| <b>Figura 4.</b> Acoplamiento entre el estímulo con glucosa y la secreción de insulina en la célula $\beta$ -pancreática                                                                 | 20          |
| <b>Figura 5.</b> Haplotipo de alto riesgo para diabetes tipo 2 en el gen de la calpaína-10                                                                                               | 30          |
| <b>Figura 6.</b> Fuentes naturales y antropogénicas de exposición a arsénico.                                                                                                            | 39          |
| <b>Figura 7.</b> Metabolismo del arsénico inorgánico                                                                                                                                     | 42          |
| <b>Figura 8</b> Modelo matemático del % de funcionalidad de las células $\beta$ y la sensibilidad a la insulina en función de las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno (HOMA2) | 71          |
| <br><b><i>Cultivos primarios de células <math>\beta</math> de rata</i></b>                                                                                                               |             |
| <b>Figura 9.</b> Índice de viabilidad celular                                                                                                                                            | 75          |
| <b>Figura 10.</b> Secreción de insulina en concentración basal y estimulante de glucosa (5.6 y 15.6 mM, respectivamente)                                                                 | 77          |
| <b>Figura 11.</b> RNAm de insulina                                                                                                                                                       | 78          |
| <br><b><i>Línea celular de insulinoma de rata RINm5F</i></b>                                                                                                                             |             |
| <b>Figura 12.</b> Índice de viabilidad celular                                                                                                                                           | 79          |
| <b>Figura 13.</b> Morfología celular                                                                                                                                                     | 80          |
| <b>Figura 14.</b> Densidad celular                                                                                                                                                       | 80          |
| <b>Figura 15.</b> Sobrevida celular                                                                                                                                                      | 82          |
| <b>Figura 16.</b> Secreción de insulina en concentración basal y estimulante de glucosa (5.6 y 15.6 mM, respectivamente)                                                                 | 83          |
| <b>Figura 17.</b> RNAm de insulina                                                                                                                                                       | 84          |
| <b>Figura 18.</b> Proteína insulina intracelular                                                                                                                                         | 85          |
| <b>Figura 19.</b> Calcio intracelular libre                                                                                                                                              | 86          |
| <b>Figura 20.</b> Actividad de calpaínas                                                                                                                                                 | 87          |
| <b>Figura 21.</b> Expresión de RNAm de calpaína-10                                                                                                                                       | 88          |
| <b>Figura 22.</b> Expresión de proteína calpaína-10                                                                                                                                      | 89          |
| <b>Figura 23.</b> Proteólisis parcial de SNAP-25                                                                                                                                         | 90          |
| <b>Figura 24.</b> Ciclo celular                                                                                                                                                          | 91          |

|                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 25.</b> Índice mitótico y de replicación                                                                                                                                              | 93  |
| <br>                                                                                                                                                                                            |     |
| <b><i>Donadores de la Comarca Lagunera</i></b>                                                                                                                                                  |     |
| <b>Figura 26.</b> Relación entre el consumo de arsénico por día y la concentración de arsénico excretado en la orina                                                                            | 96  |
| <b>Figura 27.</b> Regresión lineal de la concentración de arsénico total en la orina ( $\mu\text{g/l}$ ) y la funcionalidad de células $\beta$ (%) en individuos no diabéticos                  | 101 |
| <b>Figura 28.</b> Regresión de decaimiento exponencial de la concentración de arsénico total en la orina ( $\mu\text{g/l}$ ) y la funcionalidad de células $\beta$ (%) en individuos diabéticos | 101 |
| <b>Figura 29.</b> Porcentaje de funcionalidad de células $\beta$ en función del genotipo para los polimorfismos SNP 43 y 44 del gen de la calpaína-10                                           | 103 |
| <b>Figura 30.</b> Regresión lineal de la concentración de arsénico total en la orina ( $\mu\text{g/l}$ ) y la sensibilidad a la insulina                                                        | 105 |
| <br>                                                                                                                                                                                            |     |
| <b><i>Linfocitos humanos</i></b>                                                                                                                                                                |     |
| <b>Figura 31.</b> Expresión del RNAm de calpaína-10 en linfocitos                                                                                                                               | 107 |
| <b>Figura 32.</b> Expresión de las isoformas de calpaína-10 en linfocitos                                                                                                                       | 109 |
| <b>Figura 33.</b> Actividad de calpaínas en linfocitos                                                                                                                                          | 110 |

| <b>Índice de Tablas</b>                                                                                                                      | <b>Pag.</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Tabla 1.</b> Estatus diabético en base a la concentración de glucosa en sangre                                                            | 23          |
| <b>Tabla 2.</b> Especies de arsénico importantes por su toxicidad                                                                            | 38          |
| <b>Tabla 3.</b> Estudios epidemiológicos que asocian la exposición crónica a arsénico con diabetes mellitus.                                 | 49          |
| <b>Tabla 4.</b> Anticuerpos y condiciones utilizadas para la inmunodetección.                                                                | 66          |
| <b>Tabla 5.</b> Características clínicas, bioquímicas, de inferencia y antropométricas de los donadores de la Comarca Lagunera               | 95          |
| <b>Tabla 6.</b> Concentraciones de arsénico en el agua de bebida y en las orinas de los donadores de la Comarca Lagunera                     | 97          |
| <b>Tabla 7.</b> Genotipo y frecuencias alélicas para polimorfismos en el gen de la calpaína-10 de los donadores de la Comarca Lagunera       | 98          |
| <b>Tabla 8.</b> Asociación entre los polimorfismos SNP 43 y 44 del gen de la calpaína-10 y el porcentaje de funcionalidad de células $\beta$ | 104         |
| <b>Tabla 9.</b> Características clínicas, de laboratorio y antropométricas de los donadores del Hospital General Gea González                | 106         |
| <b>Tabla 10.</b> Predicción del peso molecular de las isoformas de calpaína-10                                                               | 108         |

## RESUMEN

Una de las principales vías de exposición al arsénico inorgánico, debido a fuentes naturales y a actividades antropogénicas, es a través del agua de bebida. La exposición al arsénico se considera un problema de salud pública en muchos países, incluyendo México y de manera consistente se ha observado un incremento en la prevalencia y en la incidencia de diabetes tipo 2 en personas que viven en lugares con niveles altos de exposición al arsénico en países como Taiwán, Bangladesh y México.

La diabetes tipo 2 es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por hiperglucemia debido a defectos en la captación de glucosa dependiente de insulina, así como por defectos en la secreción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas. Los factores de riesgo conocidos para la enfermedad incluyen historia familiar, la edad, el sexo, la obesidad, la inactividad física, la dieta, el consumo de cigarro, el estrés y probablemente la exposición elevada al arsénico.

Dentro de los mecanismos potenciales por los que el arsénico pudiera incrementar el riesgo a la enfermedad, el más estudiado ha sido la inhibición de la incorporación de glucosa dependiente de insulina *in vitro*. Sin embargo, debido a que la alteración en la secreción de insulina juega un papel primario en el establecimiento de la enfermedad, uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si el arsenito de sodio produce disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas de rata *in vitro*, usando como modelos de estudio cultivos primarios y una línea celular.

La exposición a dosis bajas de arsenito de sodio (1-2  $\mu\text{M}$ ) durante un periodo de 72 h, disminuye la secreción de insulina *in vitro* de manera dosis respuesta, sin afectar sustancial y significativamente la viabilidad de las células. De tal forma, el arsenito ocasiona que las células  $\beta$  pierdan su sensibilidad a la glucosa extracelular y por lo tanto secreten cantidades similares de insulina, independientemente si la concentración de glucosa extracelular es basal (5.6 mM) o estimulante (15.6 mM).

Dicha disminución en la secreción de insulina no se debe a un decremento en la biosíntesis de la hormona, si no por una baja en las oscilaciones de la concentración del calcio intracelular libre, entre la condición basal y estimulante de glucosa. Esta estabilidad en las concentraciones de calcio produce un decremento en la proteólisis parcial de la proteína SNAP-25, llevada a cabo por la proteasa de cisteína dependiente de calcio, calpaína-10. Ya que ambas proteínas forman parte de la maquinaria de secreción de la insulina y se requieren para que los gránulos



de insulina se fusionen con la membrana celular, la disminución en la proteólisis de SNAP-25 explicaría la reducción en la secreción de la hormona.

Dosis de 5  $\mu$ M de arsenito reducen la expresión del gen de insulina acompañada de un descenso en la viabilidad celular, en el caso de la línea celular RINm5F con esta dosis se observan cambios morfológicos. A partir de 2  $\mu$ M ocurre un arresto celular en la fase G2/M en un porcentaje de las células, mientras que en el resto de las células el índice mitótico y el índice de replicación disminuyen.

Un segundo objetivo del trabajo fue estudiar a una población humana expuesta de manera natural a distintas concentraciones de arsénico inorgánico a través del agua de bebida. Se determinó que la funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas de sujetos con diabetes tipo 2, evaluado a través del modelo de HOMA (Homeostasis Model Assessment), se asocia de manera significativa con la concentración de arsénico total excretado en la orina, siguiendo un patrón de decaimiento exponencial. En el caso de los sujetos sin la enfermedad, a pesar de que la asociación no fue estadísticamente significativa, se observa una tendencia inversa y lineal entre la concentración de arsénico excretado en la orina y la funcionalidad de las células  $\beta$ . Por el contrario, la sensibilidad a la insulina no mostró relación con la excreción de arsénico total en la orina en ninguno de los dos grupos de individuos analizados (sujetos con y sin diabetes tipo 2). Dos polimorfismos de riesgo para diabetes tipo 2 en el gen de calpaína-10 tuvieron influencia sobre la funcionalidad de las células  $\beta$  en sujetos no diabéticos. Los alelos de riesgo (SNP 43 G/G y SNP 44 C/T) mostraron un menor porcentaje de funcionalidad de dichas células. En el caso del SNP 44, la asociación fue independiente de los otros factores analizados (edad, sexo, IMC y exposición al arsénico).

En conjunto estos resultados aportan evidencia de que el arsénico es un factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes tipo 2, siendo uno de sus mecanismos de acción la disfuncionalidad de las células  $\beta$ , particularmente reduciendo la secreción de insulina.

Finalmente, debido a que el estudio directo de células  $\beta$  de humanos es en la mayoría de los casos imposible, el trabajo también aporta evidencia de que el linfocito humano muestra potencial para ser utilizado como modelo celular en el estudio de la diabetes tipo 2, en particular mediante el estudio enzimático de las calpaínas. La actividad de las calpaínas en los linfocitos de un grupo de donadores diabéticos a comparación de un grupo control fue menos sensible a la concentración extracelular de glucosa, sin diferencias en la expresión de calpaína-10.

## ABSTRACT

A very important exposure via to inorganic arsenic, due to natural and anthropogenic sources, is through drinking water. Arsenic exposure is considered a public health problem in many countries, including Mexico and an increase in the prevalence and incidence of type 2 diabetes has been consistently observed among residents of high arsenic exposure areas in countries like Taiwan, Bangladesh and Mexico.

Type 2 diabetes is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia, resulting from defects in insulin-dependent glucose uptake, as well as defects in insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells. Known risk factors include family history, age, sex, obesity, physical inactivity, diet, smoking, stress and probably high arsenic exposure.

Among the potential mechanisms by which arsenic could increase the risk for type 2 diabetes, the most studied one has been the inhibition of insulin-dependent glucose uptake *in vitro*. However, since the alteration of the secretion of insulin plays a primary role in the onset of the disease, one of the aims of this work was to determine if sodium arsenite produces dysfunction of rat pancreatic  $\beta$ -cells *in vitro*, using primary cultures and a cell line as study models.

The exposure to low arsenite doses (1-2  $\mu$ M) for a 72 hour period, decreases insulin secretion *in vitro* in a dose-dependent manner, without affecting substantially and significantly cell viability. In such manner, arsenite causes  $\beta$ -cells to lose their sensitivity to extracellular glucose and therefore secrete similar amounts of insulin regardless if the extracellular glucose concentration is basal (5.6 mM) or stimulating (15.6 mM).

This reduction in the secretion of insulin is not due to a decrease in the biosynthesis of the hormone, but through the diminishing of free intracellular calcium concentrations between the basal and the stimulating glucose conditions. Such stability in the concentrations of calcium produces a reduction in the calcium-dependent calpain-10 partial proteolysis of SNAP-25 protein. Since both proteins are part of the machinery secretion of insulin and are needed to fuse insulin granules with the membrane to produce exocytosis, the reduction in the proteolysis of SNAP-25 could explain the decrease in the secretion of insulin.

A dose of 5  $\mu$ M arsenite reduces insulin gene expression in conjunction with a descent in cell viability, and this same dose produces morphological changes in the cell line RINm5F. Starting

with a dose of 2  $\mu$ M an arrest in G2/M cell phase occurs in a percentage of cells, whereas in the rest of the cells the mitotic and replication indexes decrease.

A second goal of the work was to study a human population exposed naturally to different inorganic arsenic concentrations through drinking water. It was determined that the functionality of pancreatic  $\beta$ -cells of subjects with type 2 diabetes, evaluated through the HOMA (Homeostasis Model Assessment) model, is significantly associated with the concentration of total arsenic excreted through urine, following a pattern of exponential decay. Even though the association was not statistically significant in the subjects without the disease, a lineal inverse trend is observed between the arsenic excreted in urine and the functionality of  $\beta$ -cells. On the contrary, insulin sensitivity did not show any relationship with the urine excretion of total arsenic in neither of the two groups analyzed (subject with and without type 2 diabetes).

Two risk polymorphisms for type 2 diabetes in the calpain-10 gene showed to have an influence over  $\beta$ -cell functionality in non diabetic subjects. The risk alleles (SNP 43 G/G and SNP 44 C/T) showed lower percentage of cell functionality. For SNP 44, the association was independent of the other analyzed factors (age, sex, BMI and arsenic exposure).

These results together provide evidence that arsenic is a risk factor for the development of type 2 diabetes, being one of its action mechanisms  $\beta$ -cell dysfunction, particularly reducing insulin secretion.

Finally, since the direct study of human  $\beta$ -cells is in most of the cases impossible, this work also provides evidence that human lymphocytes have the potential to be utilized as a cellular model in the understanding of type 2 diabetes, particularly through the enzymatic study of calpains. The activity of calpains in the lymphocytes of a group of diabetic donors was less sensitive to the extracellular glucose concentration than the control group, without differences in the expression of calpain-10.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La exposición al arsénico inorgánico es un problema de salud pública a nivel mundial. Estudios epidemiológicos postulan al arsénico como un factor de riesgo para desarrollar diabetes tipo 2, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo. La diabetes tipo 2 es una enfermedad compleja ya que existen factores de riesgo tanto genéticos como ambientales que pueden interactuar entre sí, aumentando el riesgo como consecuencia. Por ser un grupo de enfermedades metabólicas con una etiología desconocida, un estudio integral de la enfermedad brinda información más completa. De tal manera que el trabajo cuenta con una fase *in vitro* y con una *in vivo*. En la primera de ellas, se estudió el efecto del arsenito en células  $\beta$  de páncreas de rata. En la segunda fase se realizó un estudio piloto en humanos para evaluar el porcentaje de funcionalidad de las células  $\beta$ , el cual se puede inferir a partir de las concentraciones de glucosa y de insulina en ayuno, (a través del modelo de HOMA2) en sujetos con y sin diabetes tipo 2, ambos con distintos grados de exposición al arsénico a través del agua de bebida.

La falla de las células  $\beta$  es un paso importante en el desarrollo de la diabetes tipo 2, por lo que es de interés conocer si los efectos del arsenito en las células  $\beta$  pancreáticas de rata pudieran demostrar su capacidad diabetogénica en una fase *in vitro*. Cabe mencionar que los efectos del arsénico sobre las células  $\beta$  con dosis bajas y por lo tanto con resultados biológicamente relevantes, no se han evaluado propia y directamente. En la actualidad la mayoría de la información existente se encuentra enfocada a tejido periférico.

Debido a que es importante conocer si la exposición al arsénico inorgánico altera la funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas en humanos, en el estudio piloto realizado en humanos se evaluó la asociación entre la exposición al arsénico inorgánico de manera natural y la funcionalidad de dichas células, tomando además en cuenta la influencia de polimorfismos en un gen de susceptibilidad para diabetes tipo 2, calpaína-10, proteína que participa de manera fisiológica en la secreción de insulina.

Si bien, es posible inferir el grado de funcionalidad de las células  $\beta$ , la obtención y estudio de este tipo de células en humanos resulta complicado o prácticamente imposible, por lo que se plantea el uso del linfocito como modelo de estudio.

## **INTRODUCCIÓN**

### **A) Regulación fisiológica de la glucosa**

En sujetos sanos los niveles de glucosa en sangre se mantienen en un estrecho rango (4 – 8 mM ó 70-140 mg/dl) a pesar de las variaciones considerables en la disponibilidad de la glucosa. La glucosa es el estímulo primario para la secreción de la insulina por las células  $\beta$  del páncreas, la cual es una célula endocrina altamente diferenciada que sintetiza y secreta insulina. La insulina es la hormona circulante con mayor capacidad para disminuir las concentraciones de glucosa en sangre contrarrestando los efectos de hormonas hiperglucemiantes como el glucagon, la epinefrina, el cortisol y la hormona de crecimiento. La insulina promueve la utilización de los nutrientes por el tejido periférico; algunas de sus funciones son aumentar la entrada de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos en las células blanco, promover la síntesis de glucógeno, proteínas y lípidos, e inhibir la lipólisis, la gluconeogénesis y la degradación de proteínas y glucógeno [2, 3].

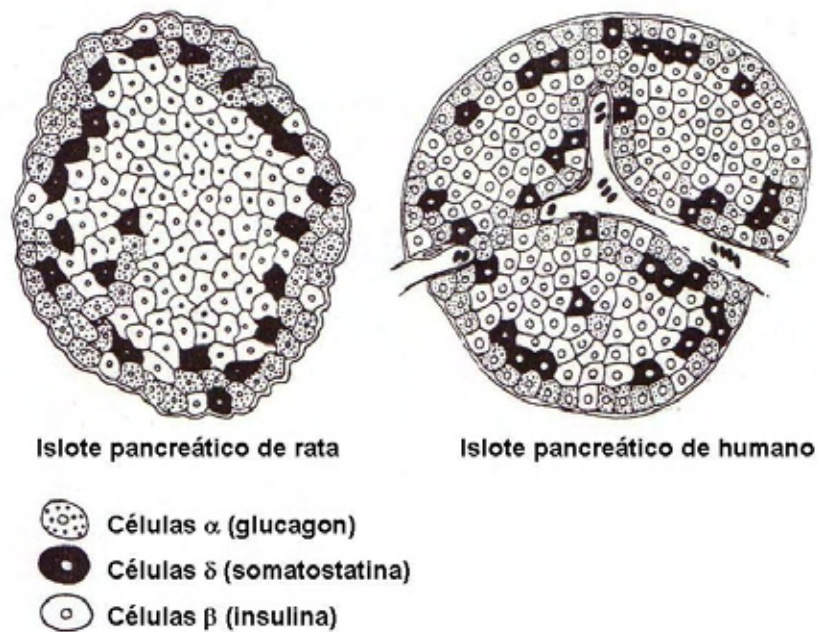
El principal efecto biológico del glucagon es aumentar la síntesis y movilización de la glucosa en el hígado. Su secreción es estimulada por niveles bajos de glucosa en sangre, aminoácidos y una variedad de hormonas y neuropéptidos, mientras que la insulina, la somatostatina y los ácidos grasos reducen la secreción de esta hormona [4].

#### **A.1) El páncreas**

El páncreas es una glándula mixta formada por dos tipos de tejido, el exocrino y el endocrino. Las glándulas exocrinas a través de un sistema de ramificación de ductos secretan enzimas digestivas y bicarbonato hacia el lumen intestinal para completar la digestión de los carbohidratos, las proteínas y las grasas. Las glándulas endocrinas, llamadas islotes de Langerhans secretan hormonas hacia el torrente sanguíneo [5].

Morfológicamente el páncreas se divide en pequeños lóbulos visibles. Cada lóbulo representa una subdivisión del parénquima drenado por un solo ducto intralobular. Grupos de lóbulos separados por tejido conectivo son drenados por ductos interlobulares mayores. Estos ductos interlobulares desembocan hacia el ducto principal que conecta la glándula entera con el lumen

del tracto gastrointestinal. Dentro de los lóbulos residen las funcionales y estructuralmente microscópicas unidades secretoras de la glándula. Cada unidad secretora se encuentra compuesta por un acino y un pequeño ducto intercalado. El acino representa un conjunto de 15 a 100 células acinares que sintetizan y secretan proteínas hacia el lumen de la estructura epitelial. Las células acinares secretan aproximadamente 20 zimógenos (precursores de enzimas inactivas) y enzimas digestivas. De tal manera que la secreción final del tejido exocrino del páncreas representa la combinación de productos de las células acinares y ductales [6].



**Figura 1. Esquema de islotos pancreáticos de rata y de humano. Adaptado de Hadley, 2000 [7].**

Los islotos pancreáticos se encuentran distribuidos entre el tejido acinar y solamente ocupan el 2 % del parénquima. El páncreas humano bajo condiciones normales contiene entre 500,000 y  $1 \times 10^6$  de islotos. Los islotos pueden ser ovalados o esféricos y miden de diámetro de 50 a 300  $\mu\text{m}$ . Los islotos contienen al menos 4 tipos de células secretoras: las  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y F más varios elementos vasculares y neurales. Las células  $\alpha$  secretan principalmente glucagon, las  $\beta$  secretan insulina, péptido C y amilina, las células  $\delta$  somatostatina y las F secretan polipéptido

pancreático. En la rata y en menor proporción en los humanos, las células  $\beta$  se localizan principalmente en el centro y en menor proporción en la periferia del islote, mientras que las células  $\alpha$  y  $\delta$  son más abundantes en la periferia (Figura 1). Dentro de los islotes las células  $\beta$  son las más abundantes (cerca del 70 %) [5, 8].

Existe una estrecha regulación en la síntesis y en la secreción de las hormonas, producto de la comunicación humoral, la comunicación célula-célula y/o la comunicación neural que existe dentro del islote. En cuanto al tipo de comunicación humoral, el flujo sanguíneo dentro del islote ocurre del centro hacia la periferia, de tal manera que las hormonas secretadas por las células que están dentro del islote pueden influenciar a otras dentro del mismo. La comunicación célula-célula ocurre debido a las uniones comunicantes y estrechas que conectan a las células del islote entre sí. Finalmente, otro tipo de regulación de la secreción endocrina ocurre debido a que los islotes se encuentran inervados por el sistema nervioso autónomo, por el simpático y por el parasimpático [5, 8].

#### **A.1.1) La célula $\beta$**

Las células  $\beta$  son capaces de sensor cambios diminutos en la concentración de glucosa en sangre, responder a esos cambios mediante la liberación inmediata de insulina y modular la velocidad de la biosíntesis de insulina dependiendo de las necesidades secretoras. La fina modulación de las células  $\beta$  se logra mediante la regulación coordinada de la biosíntesis y la exocitosis de la insulina por los nutrientes, hormonas y el sistema nervioso autónomo [2].

Múltiples señales de diferente origen garantizan la función apropiada de las células  $\beta$ , tanto en condiciones basales como en condiciones de estimulación por glucosa. Estas señales incluyen factores humorales (hormonas, vitaminas, nutrientes, iones etc), estimulación nerviosa y comunicación celular autocrina y paracrina. De hecho, existe evidencia suficiente de que la insulina ejerce una acción positiva sobre la célula  $\beta$ , en cuanto a flujo de iones, la sobrevivencia de la célula y la transcripción, traducción y secreción de la insulina [9, 10].

### A.1.2) Síntesis de insulina

La insulina se sintetiza sólo en las células  $\beta$  del páncreas. Está codificada por un solo gen localizado en el brazo corto del cromosoma 11. La síntesis de insulina, así como su secreción, se estimulan principalmente cuando las células  $\beta$  se exponen a glucosa. La transcripción del gen de insulina y su posterior procesamiento resultan en la producción de un RNAm que codifica para la preproinsulina [5].

Partiendo del extremo 5', el RNAm codifica para una secuencia señal, seguida de los dominios B, C y A del péptido (Figura 2). Durante la síntesis de la preprohormona, la secuencia señal, de aproximadamente 24 aminoácidos, se separa del péptido naciente a medida que entra al retículo endoplásmico, dando lugar a la proinsulina la cual ya sólo contiene a los dominios B, C y A. A medida que la proinsulina se va empacando en el trans-Golgi para formar los gránulos secretores, endoproteasas comienzan lentamente a proteolisar parcialmente la molécula de proinsulina, separando al péptido C formado por 31 aminoácidos. La molécula madura de insulina queda formada por dos cadenas peptídicas, A y B compuestas por 21 y 30 aminoácidos respectivamente, las cuales se encuentran unidas entre sí por puentes disulfuro. Adicionalmente, hay un puente disulfuro intracatenario en la cadena A (Figura 2). Al término, la vesícula secretora contiene insulina asociada a zinc, péptido C y proinsulina, los cuales son liberados al torrente sanguíneo cuando la glucosa estimula a la célula  $\beta$  [5].

Una vez que a insulina se ha sintetizado, se almacena en ~ 10, 000 vesículas secretoras o gránulos, los cuales se encuentran listos para ser liberados al torrente sanguíneo mediante el proceso de exocitosis. Las células  $\beta$  son eléctricamente activas y responden a cambios en la concentración de glucosa generando potenciales de acción, los cuales se ha visto de manera reciente que coinciden con la liberación pulsátil de insulina [4, 11].

La exocitosis ocurre a una velocidad de 500 gránulos/s, lo cual representa sólo el 5 % de la población de gránulos secretores. Sin embargo, esta velocidad sólo se puede mantener por períodos cortos (5 milisegundos) y decae rápido con estimulaciones repetidas [12]. Ante una estimulación por un aumento abrupto y sostenido en la concentración de glucosa, la secreción de la insulina ocurre siguiendo un curso de tiempo bifásico (Figura 3) [11].



### A.1.3) Acoplamiento entre el estímulo con glucosa y la secreción de insulina

La primera fase de la secreción de insulina se caracteriza por un aumento rápido y transitorio de la secreción de insulina en respuesta a un estímulo con glucosa. Si la concentración de glucosa persiste alta durante varios minutos, la primera fase es seguida de un nuevo ascenso gradual y sostenido de la secreción, conocida como segunda fase. La primera fase de la secreción, la cual refleja la habilidad de las células  $\beta$  para responder a la glucosa de manera rápida, es importante para una homeostasis óptima de la misma (Figura 3) [8, 13]. De hecho, el curso bifásico de la secreción de insulina se ha atribuido a la existencia de los distintos tipos de reservorios de gránulos de insulina o bien a la cinética de las señales producidas por la glucosa [13, 14].

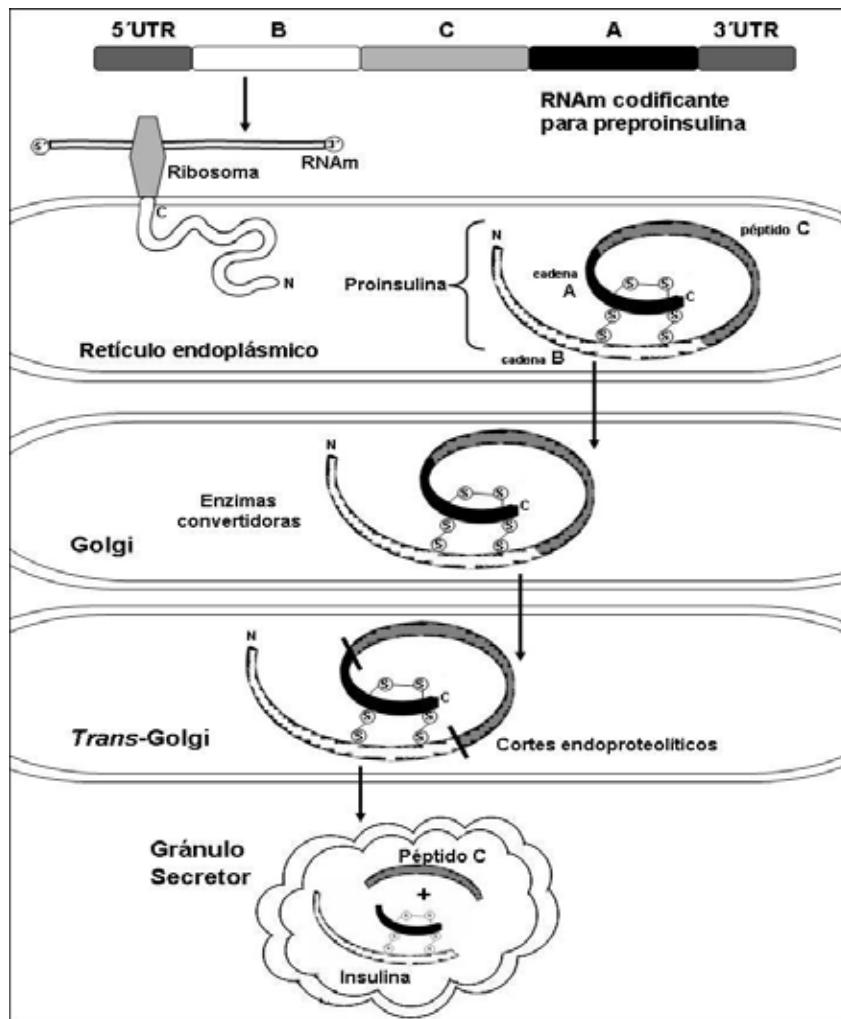
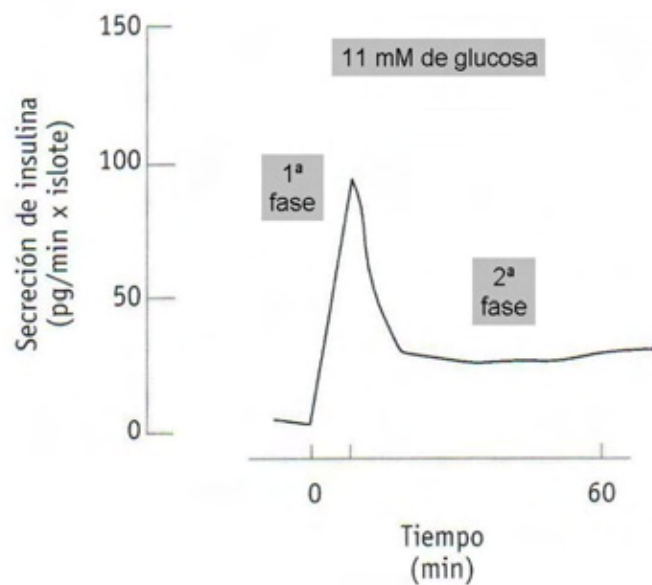


Figura 2. Síntesis y procesamiento de la insulina. Adaptado de Barrett, 2005 [5].

En el acoplamiento entre la estimulación con glucosa y la secreción de insulina, la glucosa entra a la célula  $\beta$  por difusión facilitada utilizando el transportador de glucosa GLUT2. El metabolismo intracelular de la glucosa que incluye la glucólisis, el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa, genera ATP. El aumento en la relación ATP/ADP produce el cierre de canales de potasio sensibles a ATP (KATP) presentes en la membrana plasmática. Debido a que estos canales son los responsables de mantener el potencial de reposo alrededor de -70 mV, su cierre permite que la membrana se despolarice gradualmente hasta que se alcanza el nivel de voltaje al cual se aumenta la probabilidad de apertura de los canales de sodio y de calcio tipo T. La entrada de sodio y calcio aumenta la despolarización de la membrana y esto promueve que se alcance el voltaje necesario para aumentar la probabilidad de apertura de los canales de calcio tipo L.



**Figura 3. Cinética bifásica de secreción de insulina en respuesta a glucosa. Tomado de Hiriart, 2002 y Rorsman, 2000 [8, 11].**

El incremento del calcio intracelular, junto con la fosforilación de la casaca de calcio-calmodulina, permiten finalmente que los gránulos que contienen la insulina se fusionen con la membrana plasmática, dando lugar a la exocitosis (Figura 4) [4, 12-16].

Un número de factores adicionales pudieran también controlar la actividad eléctrica de la célula  $\beta$ , tales como los canales de  $Cl^-$  y canales catiónicos no selectivos y bombas electrogénicas

tales como la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  [14]. Otros posibles candidatos moduladores de los eventos requeridos para dar lugar a la secreción de insulina además del ATP, incluyen al NAD(P)H / NAD(P)<sup>+</sup> y a las cadenas largas de acyl CoA [14].

#### **A.1.4) Maquinaria de secreción**

La fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática se encuentra controlada por el calcio y por una red de complejas interacciones de proteína-proteína y proteína-lípidos en donde se incluyen a las proteínas SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors) localizadas en el gránulo (v-SNARE; sinaptobrevina-2 y sinaptotagmina) y en la membrana (t-SNARE; syntaxina-1A y SNAP-25) [4, 14]. De hecho, como sensores de calcio se han propuesto a la sinaptotagmina y/o a la proteasa de cisteína calpaína-10 [17-19].

La fusión entre el gránulo y la membrana ocurre rápido ante un aumento en el flujo de calcio, sin embargo se requiere que el gránulo se encuentre situado en la vecindad inmediata a la membrana plasmática.

Los gránulos de insulina existen dentro de la célula  $\beta$  en varios tipos funcionales de pozas, que incluyen la poza de reserva intracelular (90 % de los gránulos), la poza morfológicamente anclada (~ 10 %) y la poza fácilmente liberada (0.3-2.2 %), la cual se encuentra químicamente preparada para la exocitosis, y se puede depletar en menos de un segundo en presencia de calcio. El tamaño de la poza fácilmente liberada es un determinante mayor para la magnitud de la respuesta secretora inicial.

Mientras que el alistamiento de los gránulos previamente anclados a la membrana da lugar al relleno de la poza fácilmente liberada en algunos minutos y es dependiente de ATP, calcio y temperatura, los gránulos de la poza de reserva intracelular tienen que ser movilizados hacia la proximidad de la membrana [4, 14].

De tal manera que el componente temprano y rápido de la secreción (primera fase) corresponde a la liberación dependiente de calcio de los gránulos previamente preparados y anclados, mientras que el componente sostenido de la secreción (segunda fase) refleja la translocación de los nuevos gránulos de reserva al sitio de anclaje y su acoplamiento con la maquinaria de secreción promovida solamente por secretagogos metabolizables [4, 14].

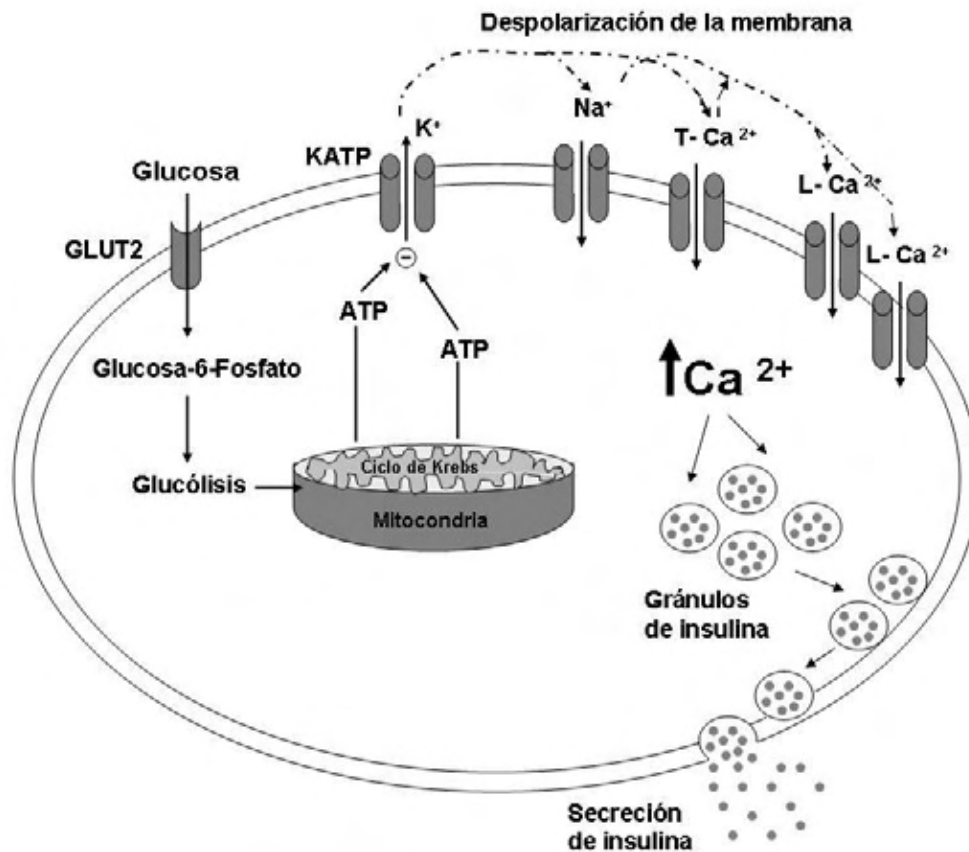


Figura 4. Acoplamiento entre el estímulo con glucosa y la secreción de insulina en la célula  $\beta$  pancreática.

## A.2) Tejido periférico y acción de la insulina

Una vez que la insulina ha sido secretada hacia la sangre portal, viaja primero hacia el hígado, donde más de la mitad se remueve de la circulación. El resto de la insulina estimula procesos en otros órganos, siendo el primer paso, la unión con su receptor cinasa de tirosina [5]. La insulina incrementa la captación de glucosa en músculo y en adipocitos, e inhibe la producción de glucosa hepática. Estimula el crecimiento y diferenciación celular y promueve el almacenaje de substratos en adipocitos, hígado y músculo estimulando lipogénesis, síntesis de glucógeno y proteína e inhibiendo lipólisis, glucogenolisis y degradación de proteína [3]. Hasta un 75 % de la captación de glucosa dependiente de insulina ocurre en el músculo esquelético, mientras que el tejido adiposo contribuye de una manera pequeña pero crucial para la regulación del

metabolismo. A pesar de que la insulina no estimula la captación de glucosa en hígado, bloquea la glucogenolisis y la gluconeogénesis y estimula la síntesis de glucógeno [3].

El receptor a la insulina es un heterotetrámero, con dos cadenas  $\alpha$  y dos  $\beta$  idénticas unidas por puentes disulfuro. El dominio intracelular de las cadenas  $\beta$  posee actividad de cinasa de tirosina, la cual aumenta considerablemente cuando la insulina se une a las cadenas  $\alpha$  extracelulares del receptor [5, 20].

El primer paso por el cual la insulina aumenta el almacenamiento o utilización de energía, involucra el transporte regulado de glucosa hacia las células a través del transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT4. La insulina aumenta la captura de glucosa principalmente enriqueciendo la concentración del transportador GLUT4 en la membrana. La localización celular de GLUT4 se encuentra gobernada por un proceso de reciclaje que involucra endocitosis, clasificación de vesículas especializadas, anclaje, fusión de la vesícula y exocitosis, proceso que se encuentra estrictamente regulado [20].

Una vez que el receptor a la insulina se encuentra activado, fosforila residuos de tirosina en substratos intracelulares que incluyen la familia de los substratos del receptor de insulina (IRS1 - 4), IRS5/DOK4, IRS/DOK5, Gab-1, Cb1, APS, isoformas de Shc y miembros de la familia de proteínas reguladoras de señales SIRP. Una vez fosforiladas, dichos substratos interactúan con una serie de moléculas efectoras o adaptadoras con dominios homólogos a SH2 que reconocen específicamente a diferentes motivos de tirosinas fosforiladas. De todos estos substratos, los que se encuentran mejor caracterizados son las proteínas de la familia IRS [20].

La estimulación de la captación de glucosa por insulina se encuentra mediada de manera dependiente e independiente por la vía de señalización de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI-3-K). Se conocen tres vías de señalización por las cuales la insulina ejerce su acción; a través de la vía PI-3-K, por la vía de CAP/Cb1 con microdominios lipídicos, y mediante la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) [3].

#### **A.2.1) Vía de señalización dependiente de PI-3-K**

Una vez que las proteínas IRS se han fosforilado por el receptor de insulina, interactúan con la subunidad regulatoria de PI-3-K (p85), activando y reclutando la enzima hacia la membrana. La enzima genera el producto lipídico fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), el cual regula la

localización y actividad de varias proteínas, como la cinasa de serina/treonina PDK-1, la cual a su vez fosforila y activa a PKB/Akt, PKC, entre otras para finalmente estimular la translocación de GLUT4 de las vesículas hacia la membrana plasmática [3, 20, 21].

### **A.2.2) Señalización de insulina por microdominios lipídicos**

Varios estudios han mostrado que una vía separada de señalización de insulina se localiza en microdominios lipídicos, las cuales son regiones especializadas de la membrana plasmática enriquecidas con colesterol, esfingolípidos, glicolípidos y con proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI). La activación del receptor de insulina en estos subdominios plasmáticos estimula la fosforilación en residuos de tirosina de los proto-oncogenes c-Cb1 y Cb1-b. Una vez que el complejo Cb1 junto con su proteína adaptadora CAP ha sido fosforilado, se transloca hacia los microdominios lipídicos en donde se comienzan a reclutar una serie de proteínas, entre las que destacan C3G, CRKII y TC10, para cooperar en la translocación de GLUT4 [3, 20].

### **A.2.3) Cascadas de fosforilación (MAPK)**

Como es el caso de los factores de crecimiento, la insulina estimula la vía de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la cual involucra la fosforilación de las proteínas IRS/Shc, las cuales interactúan con la proteína adaptadora Grb2, reclutando a la proteína intercambiadora de nucleótidos SOS, para la siguiente activación de Ras. Una vez que Ras se ha activado, actúa como un switch molecular estimulando la cascada de cinasas de serina a través de la activación secuencial de Raf, MEK y ERK. ERK activado se transloca al núcleo donde cataliza fosforilaciones en distintos factores de transcripción, lo cual da lugar a un programa transcripcional que promueve la diferenciación y/o la proliferación celular [3].

## B) Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus es un grupo heterogéneo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia (niveles altos de glucosa en sangre) debido a defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina [22].

Está considerada como una enfermedad compleja ya que su desarrollo se encuentra influenciado por factores genéticos y ambientales, particularmente el estilo de vida que incluye el tipo de dieta, la inactividad física, la obesidad, el fumar, etc [23, 24].

Varios procesos patológicos ocurren en el desarrollo de la diabetes y varían desde la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas, con niveles de insulina deficientes como consecuencia, hasta anomalías que resultan en resistencia a la acción de la insulina.

Una deficiente acción de la insulina resulta por una inadecuada secreción de la hormona y/o por una respuesta a la insulina disminuida en alguno de los sitios de la vía de acción de la hormona. Es frecuente que ambas características coexistan en el mismo paciente, y comúnmente no es claro cuál de las dos es la causa primaria de la hiperglucemia. Los síntomas de una marcada hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, en ocasiones polifagia y visión borrosa [22].

La clasificación de la enfermedad en base a los valores de glucosa en sangre establecidos por la “American Diabetes Association” (ADA) se muestran en la Tabla 1.

**Tabla1.- Estatus diabético en base a la concentración de glucosa en sangre.**

|                     | Concentraciones de glucosa en sangre en mg/dl (mmol/l)  |                                                                |
|---------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
|                     | <i>Ayuno (sin ingesta calórica de 8 h por lo menos)</i> | <i>2 h después de ingerir 75 g de glucosa disuelta en agua</i> |
| <b>Normal</b>       | < 100 (5.6)                                             | < 140 (7.8)                                                    |
| <b>Pre-diabetes</b> | 100-125 (5.6 – 5.9)                                     | 140-199 (7.8-11.1)                                             |
| <b>Diabetes</b>     | $\geq$ 126 (7.0)                                        | $\geq$ 200 (11.1)                                              |

### B.1) Clasificación de diabetes mellitus

La ADA clasifica a la diabetes en cuatro categorías etiopatogénicas; diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, otros tipos de diabetes y diabetes gestacional. La gran mayoría de los casos clínicos se

clasifican en diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2 (5-10 % y 90-95 % de todos los casos, respectivamente) [22].

En la **diabetes tipo 1**, antes conocida como juvenil o dependiente de insulina, la causa es una deficiencia absoluta de insulina debido a una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas. La cetoacidosis (acidificación de la sangre por la formación de cuerpos cetónicos debido a la utilización de lípidos como fuente de energía) puede ser una de las primeras manifestaciones clínicas. Debido a la deficiencia absoluta de insulina, la administración exógena de la hormona es indispensable para sobrevivir [22].

En la **diabetes tipo 2**, previamente referida como diabetes del adulto o como no dependiente de insulina, las causas se extienden desde una predominante resistencia a la insulina con una deficiencia relativa de insulina, hasta un defecto predominante en la secreción de la insulina con resistencia a la misma. En este tipo de diabetes, antes de que la enfermedad sea detectada, el grado de hiperglucemia puede ser suficiente para causar cambios funcionales y patológicos en varios órganos blanco, sin que ocurran síntomas clínicos por un periodo prolongado de tiempo [22, 25].

El grado de hiperglucemia puede cambiar en función del tiempo dependiendo del avance en el proceso de la enfermedad. El proceso de la enfermedad puede estar presente pero no progresar lo suficiente como para desarrollar los síntomas. Antes del establecimiento de la enfermedad, el individuo puede presentar niveles elevados de glucosa en ayuno y/o intolerancia a la glucosa (ambos estados pre-diabéticos) [22].

A pesar de que las personas que padecen diabetes tipo 2 presentan niveles de insulina que parecen normales o elevados, se piensa que la secreción de insulina es deficiente ya que es insuficiente para compensar la resistencia a la insulina y así mantener los niveles de glucosa en sangre dentro de rango [22]. Incluso en estadios tempranos de la enfermedad, el patrón normal de liberación de insulina se encuentra alterado, de tal modo que el pico rápido y transitorio en respuesta a glucosa (primera fase de la secreción) no existe, mientras que un componente lento pero sostenido permanece (segunda fase de la secreción) [4]. Mientras los niveles de insulina son inadecuadamente bajos en pacientes con diabetes tipo 2, se ha observado que los niveles de glucagon son elevados, condición que agrava más la enfermedad [26-28].



En la diabetes tipo 2, la mayoría de los paciente son obesos y la obesidad como tal causa cierto grado de resistencia a la insulina. Los pacientes que no son obesos, bajo el criterio tradicional de IMC, tienen un elevado porcentaje de grasa distribuido principalmente en la zona abdominal. El riesgo a desarrollar diabetes tipo 2 incrementa con la edad, la obesidad y la falta de actividad física y normalmente se asocia con una fuerte predisposición genética [22].

El tratamiento para la diabetes tipo 2, por ser una enfermedad multifactorial y heterogénea, consiste en una dieta adecuada, actividad física, tratamientos hipoglucemiantes que disminuyan la resistencia a la insulina o aumenten la secreción de la misma, y en casos extremos insulina exógena [29].

Los “**otros tipos de diabetes**” a su vez se subdividen en 8 categorías que incluyen: A) defectos monogénéticos que afectan la función de la célula  $\beta$  (MODYs), B) defectos genéticos en la acción de la insulina, C) enfermedades del páncreas exocrino, D) endocrinopatías, E) inducidas por químicos o fármacos, F) por infecciones, G) formas raras de diabetes mediada por el sistema inmune y H) otros síndromes genéticos asociados en ocasiones con diabetes [22].

Finalmente, la **diabetes gestacional** se define como cualquier intolerancia a la glucosa que aparezca o se identifique por primera vez durante el embarazo, ocurriendo principalmente en el tercer trimestre [22].

## **B.2) Epidemiología de la diabetes mellitus**

La Organización Mundial de la Salud estimó que a nivel mundial los casos de diabetes en el año 2000 ascendían a 150-171 millones y estimó que para el 2010, 2025 y 2030, el número de personas con la enfermedad sería de 220, 300 y 366 millones, respectivamente [30, 31].

Para el año 2000 se calculó que el número de diabéticos en América era de 35 millones, cifra que se incrementará a 64 millones para el 2025 [32]. El número de adultos con diabetes en los Estados Unidos incrementó en un 49 % entre 1991 y 2000. Para el 2002 se estimó que sólo en Estados Unidos existían 16-17 millones de personas con esta condición y un número igual de personas pre-diabéticas. Incluso, la incidencia de diabetes tipo 2 ha aumentado en niños y en adultos jóvenes [24]. Para cada caso diagnosticado en países de primer mundo se piensa que existe un caso sin diagnosticar y 8 casos en países de tercer mundo [23].

En México, las cifras de prevalencia varían de acuerdo con la fuente debido al nivel de atención, la población de referencia, el tipo de diagnóstico, los criterios de clasificación, etc. En la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC-1992) se informó una prevalencia general de diabetes de 8.2 % en los adultos entre 20 y 69 años [33]. La Encuesta Nacional de Salud II (ENSA-II, 1994) indicó una prevalencia de diabetes mellitus de 9 % para la población de 60 años y más [34]. Por otro lado, la Encuesta Nacional de Salud 2000 (ENSA-2000) registró una prevalencia general de diabetes de 7.5 % en la población mayor de 20 años. De los individuos con diabetes, 77.3 % ya conocía el diagnóstico y 22.7 % fue identificado durante su participación en la encuesta. La prevalencia fue ligeramente mayor en las mujeres que en los hombres y varió con la edad de los individuos, sin embargo se sabe que una proporción importante de los casos inició la enfermedad antes de los 40 años, característica descrita previamente en poblaciones con prevalencias altas de diabetes tipo 2. Por último, a partir de esta encuesta se sabe que la enfermedad es más frecuente en algunos estados de la zona norte de la República Mexicana, entre los que destacan Coahuila y Durango [35].

Datos más recientes obtenidos a partir de la Encuesta Nacional en Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006), muestran que la prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en los adultos a nivel nacional fue de 7 %, siendo mayor en las mujeres (7.3 %) que en los hombres (6.5 %). En el grupo de 50 a 59 años, dicha proporción llegó a 13.5 %, 14.2 % en mujeres y 12.7 % en hombres. En el grupo de 60 a 69 años, la prevalencia fue de 19.2 %, 21.3 % en mujeres y 16.8 % en hombres. Sin embargo, la prevalencia general de diabetes encontrada por ENSANUT 2006 (que incluye los nuevos casos diagnosticados a partir de la encuesta) será publicada una vez que se cuente con el análisis de laboratorio de los sueros obtenidos durante el levantamiento [36].

A pesar de las diferencias en la prevalencia de diabetes estimada para México, cabe resaltar que en nuestro país según las estadísticas del 2005 del Sistema Nacional de Información en Salud, la diabetes para ambos sexos es la primera causa de muerte general en edad productiva (15 a 64 años) y en edad posproductiva ( $\geq 65$  años) [37].

### **B.3) Genética de la diabetes tipo 2**

Una de las características de las enfermedades complejas, como es el caso de la diabetes tipo 2, es que además de que son influenciadas tanto por componentes genéticos como por componentes ambientales, estos factores no participan de manera aislada, sino que interactúan entre sí, produciendo diversos efectos. De tal modo que la diabetes tipo 2 es el resultado de la

contribución e interacción de muchos genes entre sí con factores ambientales [38]. Un dato importante es que la concordancia en el diagnóstico de diabetes tipo 2 en gemelos monocigotos es del 100 %, mientras que para gemelos dicigotos es sólo del 20 % [23].

Estudios genéticos han identificado alrededor de 50 genes involucrados en la diabetes tipo 2, los cuales participan en una variedad de vías bioquímicas, regulatorias y de transducción, muchas involucradas con los fenotipos que se asocian a la enfermedad [38]. Algunos de los genes candidatos de susceptibilidad para diabetes tipo 2 más estudiados en cuanto a su relación con diabetes incluyen a los factores de transcripción HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$ , HNF1 $\beta$ , IPF1, NeuroD1, PPAR $\gamma$ , FOXc2 y TCF7L2; la enzima glucocinasa; el receptor a la insulina y a sulfonilureas ABCC8; las hormonas reistina y adiponectina; la proteasa calpaína-10; el transportador mitocondrial UCP2; y proteínas involucradas en la señalización de insulina, entre otros [24]. Mientras que mutaciones en los genes de HNF4 $\alpha$ , glucocinasa, HNF1 $\alpha$ , IPF-1, HNF1 $\beta$ , NeuroD1 son los responsables de los diferentes tipos de diabetes monogénicas denominadas MODY (1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente) [22, 25].

Un caso interesante y particular de genes candidatos de susceptibilidad para diabetes tipo 2, es el gen de la calpaína-10 el cual fue descubierto por análisis de ligamiento genético y clonación posicional [39, 40], sin embargo el hallazgo ha sido controversial [41]. En particular se encuentra el caso de México en donde los polimorfismos de susceptibilidad que originalmente se habían descrito en individuos mexico-americanos, no fueron los mismos que para población mexicana reclutada en la Ciudad de México y en Veracruz [42]. Esta población mexico-americana con residencia en Starr County, Texas, a pesar de ser relativamente homogénea, es una mezcla con contribuciones a la poza genética contemporánea de americanos nativos (31 %), españoles (61 %), y de ancestros africanos (8 %) [40]. Una vez que el gen de calpaína-10 fue ligado a la enfermedad por clonación posicional, se iniciaron los estudios acerca de su participación en la homeostasis de la glucosa y su papel en la diabetes (ver capítulo “C” *Participación de las calpaínas en la homeostasis de glucosa*).

## **C) Participación de las calpaínas en la homeostasis de la glucosa**

### **C.1) Estructura y función de las calpaínas**

Las calpaínas son una familia compuesta por 16 genes que codifican para las proteasas de cisteína no lisosomales dependientes de calcio con expresión ubicua (calpaínas 1, 2, 5, 7, 10, 13, y 15) o tejido-específico (calpaínas 3, 6, 8, 9, 11 y 12). Se conoce que las calpaínas 1 y 2 requieren de una subunidad pequeña de 28 kD (calpaína 4), la cual posee actividad regulatoria. En base a la estructura de las dos calpaínas más estudiadas, 1 y 2 (también conocidas como  $\mu$  y  $m$ , respectivamente por su diferente sensibilidad al calcio), las calpaínas se dividen en típicas y en atípicas [43-45].

Las calpaínas (subunidad grande de ~ 80 kD) poseen una estructura organizada en cuatro dominios designados I, II, III y IV ó T, a excepción de la subunidad pequeña la cual sólo está formada por dos dominios, V y VI. El dominio I, el cual forma el amino terminal, se autocataliza durante la activación inicial de la enzima. En el dominio II se encuentra el sitio activo de la enzima el cual se subdivide en IIa y IIb en ausencia de calcio. Se postula que el cambio conformacional inducido por el calcio une a los subdominios para formar el sitio activo de la enzima. El dominio III es un sitio de unión a calcio y fosfolípidos y funciona como una región de unión entre el sitio catalítico y el dominio IV ó el T. El dominio IV de la subunidad grande y el dominio VI de la subunidad pequeña contienen sitios de unión a calcio semejantes a los de la calmodulina en cinco motivos "EF-hand" (una unidad EF-hand consiste en dos  $\alpha$ -hélices conectadas por un lazo pequeño con unión a calcio). El dominio T, encontrado en las calpaínas atípicas, carece de estos motivos, sin embargo se ha observado que la actividad de estas calpaínas también depende de calcio. Por último, el dominio V de la subunidad pequeña, hidrofóbica y rica en glicinas, comprende la región amino-terminal [43-46].

En base a las calpaínas 1 y 2, se sabe que la función general de estas enzimas es catalizar rompimientos endoproteolíticos de proteínas específicas que intervienen en la remodelación del citoesqueleto, regulación del ciclo celular, transducción de señales, diferenciación y motilidad celular, apoptosis, necrosis, desarrollo embrionario, transmisión sináptica y tráfico vesicular [45].

## **C.2) Calpaínas y diabetes tipo 2; calpaína-10**

Algunas condiciones patológicas se han asociado con alteraciones en el sistema de las calpaínas, como es el caso de la diabetes tipo 2, las distrofias musculares de Duchenne y de Becker, Alzheimer, la formación de cataratas, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, isquemia cardíaca y cerebral, hipertensión, disfunción hepática, desórdenes obsesivos-compulsivos, varios síndromes plaquetarios y ciertos tipos de cáncer [45]. En cuanto a diabetes se refiere, ciertos miembros de la familia de las calpaínas se han relacionado con ella directa o indirectamente (calpaínas-1, 2, 3, 5 y 10) [43].

### **C.2.1) Estudios genéticos y de asociación**

La calpaína-10 se clasifica como atípica por carecer del dominio IV, tiene 8 isoformas por splicing (proceso de corte y empalme para dar lugar al RNAm) alternativo denominadas calpaína-10a - 10h y se considera ubicua ya que el RNA y/o la proteína se han identificado en cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo, páncreas, placenta, estómago, y retina [40, 46]. Las isoformas "a" y "f" parecen ser las de mayor expresión en músculo esquelético [47]. En ratas se le ha localizado intracelularmente en citoplasma, en núcleo ante una elevación del calcio intracelular, en membrana citoplasmática y en mitocondria [18, 46, 48].

Teniendo previamente identificado el locus de susceptibilidad para la diabetes tipo 2 en la región cromosómica D2S125-D2S140 en el cromosoma 2q37.3 [39], la primera relación que existió entre la diabetes tipo 2 y las calpaínas fue por medio de estudios de clonación posicional en población mexicano-americana, ubicando al gen que codifica para la calpaína-10 así como cierta combinación de polimorfismos heredados en conjunto (haplotipo). El haplotipo de alto riesgo (2.8 veces mayor) identificado para dicha población fue denominado 112/121 en base a los alelos para cada uno de los tres polimorfismos que lo componen en el siguiente orden; SNP 43 (G→A), SNP 19 (2 →3 repeticiones de 32 pb), SNP 63 (C→ T) [40] (Figura 5). Este haplotipo confiere un aumento en el riesgo a desarrollar diabetes tipo 2 de 2.55 y 4.97 veces en poblaciones finlandesa y alemana, respectivamente [40]. Para otras poblaciones como la mexicana, los polimorfismos asociados al incremento en el riesgo han sido el SNP 44 (T→ C) y el SNP 110 (A→ G; T504A), los cuales se encuentran en desequilibrio de ligamiento y por tal no se sabe cuál de los dos es el responsable directo [42].

A partir de dichos estudios, la asociación entre los polimorfismos en el gen de la calpaína-10 y los fenotipos relacionados y/o involucrados con la diabetes tipo 2 se han evaluado en distintas poblaciones, encontrando una variedad de resultados, tanto positivos como negativos [43].

**Haplotipo de alto riesgo para diabetes tipo 2: 121/112**

|        | SNP43 | SNP19              | SNP63 |
|--------|-------|--------------------|-------|
|        | G (1) | 3 repeticiones (2) | C (1) |
| alelos | G (1) | 2 repeticiones (1) | T (2) |

|         | Polimorfismos |                      |       |
|---------|---------------|----------------------|-------|
|         | SNP43         | SNP19                | SNP63 |
| Alelo 1 | G             | 2 repeticiones 32 pb | C     |
| Alelo 2 | A             | 3 repeticiones 32 pb | T     |

**Figura 5. Haplotipo de alto riesgo para diabetes tipo 2 en el gen de la calpaína-10.**

Estudios llevados a cabo en población británica [49], polaca [50], europea [51], finlandesa [52] y del sur de India [53], sugieren una asociación positiva entre las variaciones genéticas de calpaína-10 y diabetes tipo 2.

Diferentes fenotipos que acompañan o anteceden al desarrollo de diabetes tipo 2 también se han asociado con las variaciones en el gen de la calpaína-10. Estudios en sujetos británicos no diabéticos con el haplotipo de alto riesgo (112/121) presentan niveles elevados de glucosa en sangre en ayuno y 2 horas después de la curva de tolerancia a la glucosa, así como una respuesta disminuida en la secreción de insulina [54]. Por otro lado se ha observado que el SNP 44 modifica el patrón normal de la curva de glucosa obtenida a partir de la prueba oral de tolerancia a la glucosa en Caucásicos [55].

Los Indios Pima poseen una alta prevalencia de diabetes tipo 2. Un estudio con individuos de este grupo étnico, no diabéticos y homocigotos para el alelo G del SNP 43, presentaron resistencia a la insulina y niveles reducidos de RNAm de calpaína-10 en músculo esquelético en comparación con aquellos individuos que poseen el alelo A [56]. En apoyo a dicho resultado, posteriormente se publicó que individuos daneses homocigotos para el alelo G del SNP 43

también expresan niveles menores de RNAm de calpaína-10 en músculo esquelético de manera basal y después del clamp de insulina [57].

Sorprendentemente, sujetos alemanes no diabéticos homocigotos para el alelo G del SNP 43 mostraron mayores índices de secreción de insulina y procesamiento de la proinsulina, de tal manera que los autores sugieren que estos resultados pudieran ser indicativos de hipersecreción primaria, lo cual ha mostrado ser un predictor independiente de la diabetes tipo 2 [58]. Un estudio en británicos caucásicos normoglucémicos demostró asociación entre el genotipo G/G del SNP 43 y una función microvascular anormal, la cual se ha propuesto que juega un papel central en la resistencia a la insulina [59].

Los polimorfismos en el gen de calpaína-10 también se han asociado con un aumento en el índice de masa corporal como indicador de obesidad [60], con niveles elevados de colesterol [61], así como con niveles elevados de ácidos grasos libres y resistencia a la insulina [52]. A pesar de que en población sueca no se mostró asociación entre aquellos individuos homocigotos para el alelo G del SNP 43 y la obesidad, dichos individuos sí presentaron niveles elevados de triglicéridos y reducción en el RNAm de calpaína-10 en tejido graso subcutáneo [57].

En células adiposas humanas, el genotipo G/G del SNP 43 de calpaína-10 mostró incrementar la lipogénesis basal y estimulada por insulina [62], mientras que el SNP 19 disminuyó la actividad lipolítica del receptor- $\beta$ 3 adrenérgico en sujetos obesos [63].

Aún más, se ha demostrado que el haplotipo de alto riesgo en el gen de calpaína-10 muestra una asociación con el síndrome de ovario poliquístico y una predisposición a desarrollar diabetes tipo 2 en pacientes con dicho síndrome [64, 65].

A pesar de todos los hallazgos mencionados, en poblaciones como la alemana [66], 2002} la danesa [67] la escandinava [68], la japonesa [61, 69], la finlandesa [70] y de Samoa [71], también se han reportado trabajos en donde las variaciones genéticas de calpaína-10 no incrementan el riesgo a desarrollar diabetes o síndrome de ovario poliquístico [72].

Una serie de factores, tanto estadísticos como genéticos, influyen en los resultados obtenidos de asociación afectando así la reproducibilidad de los datos, por lo que se han generado una serie de meta-análisis de los resultados previamente publicados. Un primer meta-análisis apoya la asociación del alelo C del SNP 44 en el gen de la calpaína-10 y la susceptibilidad a la diabetes tipo 2 [73]. Un estudio posterior revela que bajo un modelo dominante o aditivo no existe evidencia estadísticamente significativa para sustentar una asociación entre el genotipo

del SNP 43 del gen de calpaína-10 y una susceptibilidad a la diabetes, sin embargo bajo un modelo recesivo, individuos homocigotos para el alelo G del SNP 43 tienen un mayor riesgo (19 %) de desarrollar diabetes tipo 2 [41]. Otro estudio sugiere que un incremento en el riesgo a desarrollar diabetes tipo 2 se asocia tanto con el SNP 43 como con el SNP 44 [74].

Aún existen varias hipótesis de cómo los polimorfismos en el gen de la calpaína-10, que se han asociado con diabetes tipo 2 o con algún fenotipo relacionado, afectan la expresión o actividad de la proteína, tomando en cuenta que la mayoría de ellos se encuentran en intrones. Un primer acercamiento se realizó *in vitro* en la línea celular HepG2 a través de ensayos de expresión con el gen reportero de la luciferasa utilizando las secuencias del intrón 3 del gen de la calpaína-10 como parte del promotor. Los resultados mostraron que los SNP 43 y 44 regulan la expresión del gen. El alelo G del SNP 43 presenta 1.6 veces más expresión que el alelo A, modulándose por el SNP 44, ya que con el alelo T para este segundo polimorfismo la actividad es mayor que con el alelo C [40].

Posteriormente, estudios *in vivo* han mostrado resultados contradictorios; Daneses [57] e Indios Pima [56] homocigotos para el alelo G del SNP 43, presentan en músculo esquelético niveles reducidos del mensajero. Para el caso de los Indios Pima, la causa que se atribuyó a esta disminución fue una reducción en la iniciación de la transcripción y/o en la estabilidad del pre-RNAm, más no una alteración en el splicing [47]. Recientemente, se realizó un estudio similar utilizando leucocitos, en el que aquellos individuos diabéticos con el alelo G para el SNP 43 mostraron expresar el transcrito de calpaína-10 4.6 veces más que los portadores del alelo A. Los autores proponen que los niveles reducidos de RNAm en presencia del alelo A podrían deberse a un procesamiento defectuoso del pre-RNAm [75].

Finalmente, una región en el cromosoma 15 tiene un locus que ha mostrado tener interacción con el gen de la calpaína-10, incrementando la susceptibilidad a diabetes tipo 2 en población mexico-americana [76]. Uno de los genes que se localiza en dicha región cromosómica es el de la calpaína-3, el cual se expresa de manera abundante en músculo. Se ha observado que niveles bajos de expresión de calpaína-3 en músculo esquelético, se asocian con reducción en la oxidación de carbohidratos y niveles elevados de glucosa e insulina en sangre, así como incremento en el contenido de grasa, especialmente abdominal [77].



## **C.2.2) Estudios fisiológicos**

A partir de los estudios genéticos de asociación, una variedad de trabajos han tratado de identificar el papel de las calpaínas, en particular de la calpaína-10, en la regulación de la glucosa. Hasta el momento se sabe que las calpaínas efectivamente participan a nivel de la secreción de insulina por el páncreas, así como en la captura de glucosa en tejido adiposo y muscular. En ambos escenarios, se sabe que se encuentran involucradas en el proceso de tráfico vesicular. En el caso de las células  $\beta$  pancreáticas en la exocitosis de la insulina y en el caso del tejido periférico en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la superficie membranal, principalmente [78].

### **C.2.2.1) Secreción de insulina**

Varios estudios han demostrado la participación de las calpaínas en la secreción de insulina, particularmente la calpaína-10 [18] y la 1 (también conocida como  $\mu$ ) [79]. En la mayoría de los trabajos se han utilizado una variedad de inhibidores observando un incremento [80] o una disminución [81, 82] en la secreción de insulina.

En islotes pancreáticos de rata expuestos *in vitro* por 4 horas a inhibidores de calpaínas con distintos mecanismos de acción, la secreción de insulina en respuesta a glucosa aumenta un 40 %. Este aumento no se asocia a cambios intracelulares de calcio, ni a un aumento en el metabolismo de la glucosa [80]. Sin embargo, al prolongar el tiempo de exposición de los inhibidores de calpaínas (de 4 a 24 y 48 horas), la secreción de insulina en respuesta a glucosa y/o KCl disminuye, tanto en islotes pancreáticos [81] como en células  $\beta$  en cultivo primario [82].

En los islotes pancreáticos expuestos *in vitro* a distintos inhibidores por 24 y 48 horas, la secreción de insulina estimulada por glucosa disminuye 67 y 87 %, respectivamente de manera reversible. Después de 48 horas de exposición, el metabolismo de la glucosa y los cambios en calcio intracelular en respuesta a glucosa disminuyen considerablemente. Los autores postulan que el defecto en la secreción de insulina producido por los inhibidores de calpaínas por 48 horas, se debe a un defecto en el metabolismo mitocondrial, ya que la secreción de insulina también se ve disminuida en respuesta al ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico, el cual sirve como sustrato del metabolismo mitocondrial [81].

De manera análoga, en cultivos primarios de células  $\beta$  expuestas a inhibidores de calpaínas por 24 horas, se observa una disminución reversible en la secreción de insulina estimulada por glucosa o KCl, sin afectar la síntesis de insulina pero alterando la concentración de calcio intracelular en respuesta a glucosa. La expansión de las células sobre la matriz disminuye ante la inhibición de las calpaínas, pero sin que la adhesión celular se vea afectada [82].

Otra función en la que se encuentran involucradas las calpaínas en las células  $\beta$  pancreáticas es en la reorganización de la actina durante la secreción de insulina estimulada por glucosa. Se ha observado que ante un estímulo con una alta concentración de glucosa, ocurre un aumento en la actividad de las calpaínas y específicamente un aumento en la expresión de calpaína-10, siendo la isoforma de 54 kD la que se asocia con la actina del citoesqueleto [83].

Un trabajo más detallado muestra que la calpaína-10, en particular la isoforma de 54 kDa, forma parte del complejo proteico de la maquinaria de secreción de las células  $\beta$ , y que en respuesta a un aumento en la concentración del calcio intracelular, proteolisa parcialmente a la proteína SNAP-25, hecho que produce la fusión del gránulo de insulina con la membrana celular [18]. De tal modo que se postula que al igual que la sinaptotagmina, la calpaína-10 puede funcionar como un sensor de calcio para desencadenar el rearreglo de las proteínas que conforman la maquinaria de secreción (SNARE) con el fin de llevar a cabo la fusión del gránulo de insulina con la membrana, para dar lugar a la exocitosis de la insulina [19].

Independientemente de la secreción de insulina, la calpaína-10 en los islotes del páncreas también se ha visto involucrada en la apoptosis. La activación del receptor a rianodina-canal de calcio (RyR2) parece jugar un papel importante en la sobrevivencia de las células  $\beta$  *in vitro*, suprimiendo la vía de señalización de apoptosis mediada por calpaína-10 [84].

### **C.2.2.2) Acción de la insulina – captura de glucosa**

Hasta el momento existen varios trabajos que apoyan la participación de las calpaínas, particularmente la 10, en el proceso de captación de glucosa mediada por insulina, sin embargo el mecanismo detallado por el cual sucede, aún se desconoce.

Años antes de que se asociara mediante estudios genéticos las calpaínas con la diabetes tipo 2, un estudio en adipocitos mostró que una función de las calpaínas es degradar al sustrato del receptor de la insulina-1 (IRS-1) [85]. Tanto quelantes de calcio, como inhibidores de proteasas de tioles, inhibidores de calpaínas, y la calpastatina (el inhibidor endógeno de las

calpaínas), impiden la degradación de IRS-1 inducido por una exposición prolongada a la insulina. Aún más, los autores muestran que al inhibir las calpaínas en extractos celulares, la degradación de IRS-1 también disminuye significativamente [85].

Posteriormente se mostró que la exposición de músculo esquelético y adipocitos a inhibidores de calpaínas disminuye el transporte de glucosa mediado por insulina (60 – 80 %) así como la síntesis de glucógeno en músculo en respuesta a insulina (70 %) [80].

La sobreexpresión de la calpastatina en el músculo esquelético de ratones transgénicos, da lugar a la acumulación intracelular de GLUT4 sin aumentos del transportador en la superficie membranal o sin aumentos en el metabolismo de la glucosa. Los autores también reportan que con la sobreexpresión de la calpastatina, la expresión de PKB disminuye aproximadamente en un 60 % y que GLUT4 se degrada por la calpaína-2 [86].

Un estudio más detallado muestra que en adipocitos, la inhibición de la actividad de las calpaínas resulta en una disminución del 60 % en la captación de glucosa en respuesta a insulina, previniendo la translocación de las vesículas que contienen a GLUT4 hacia la membrana, sin alterar el contenido proteico del transportador [87]. Si bien la inhibición no afecta las primeras acciones de la insulina por la vía de PI-3-K, sí previene la reorganización de la actina, la cual se requiere para la translocación de GLUT4. La inhibición específica de la calpaína-10 por expresión antisentido, reduce dicha translocación en respuesta a la insulina, así como la reorganización de la actina [87].

En miotubos de humano en cultivo, la captura de glucosa estimulada por insulina también disminuye significativamente con la presencia de inhibidores de calpaínas, sin alterar la síntesis de glucógeno estimulada por insulina [88]. De hecho, la inhibición específica de la calpaína-10 por RNAi en miotubos humanos en cultivo, reduce de manera significativa la entrada de glucosa dependiente de insulina, sin alterar la síntesis de glucógeno ni la fosforilación de PKB [89], lo que permite suponer, como se ha propuesto, que el nivel al que actúa la calpaína-10 es facilitando la translocación de GLUT4 hacia la membrana.

Datos *in vivo* revelan que la inducción de resistencia a la insulina por ayuno prolongado en humanos no diabéticos y su reversión por ingesta de alimento alto en carbohidratos, produce en músculo esquelético cambios en la expresión de GLUT4 (40 %) sin cambios de expresión en calpaína-10 ni en calpaína-3 [90], siendo que esta última se expresa en menor proporción en músculo esquelético de pacientes con fenotipos relacionados con diabetes tipo 2 [77].

Por último, la inhibición de las calpaínas-1 y 2 a nivel hepático, reduce la síntesis de glucógeno estimulada por insulina, sin alterar la vía de señalización de PI-3-K/Akt [91].

Independientemente de la participación de las calpaínas en la acción de la insulina a nivel metabólico, también se ha observado que durante la fase temprana de la diferenciación de los adipocitos se requiere la actividad de las calpaínas. Se ha visto que las calpaínas se encuentran involucradas en la activación transcripcional del gen C/EBP $\alpha$ , (CCAAT-enhancer binding protein-alpha) el cual activa a su vez a genes determinantes para llevar a cabo el proceso requerido para la diferenciación terminal de los adipocitos [92]. También se ha documentado que durante la fase de expansión mitótica, las calpaínas degradan a p27 (un inhibidor de las ciclinas dependiente de cinasas), permitiendo así la re-entrada de las células al ciclo celular y a la mitosis como consecuencia [93].

El sistema de las calpaínas también participa en la regulación de la diferenciación de las células mesenquimales primarias adultas hacia adipocitos (las cuales no requiere de la expansión mitótica clonal) alterando la expresión de los factores de transcripción C/EBP- $\alpha$ , PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferative-activated receptor gamma), el receptor de la insulina  $\alpha$ , substratos del receptor de insulina (IRS) y GLUT4, entre otros [94].

## **D) El arsénico**

El arsénico (As) es un elemento natural distribuido extensamente en la corteza de la Tierra. Su concentración en la superficie de la tierra es de 1500 a 2000 ppb ó  $\mu\text{g/l}$  (equivalente a 20-27  $\mu\text{M}$ ), siendo principalmente inorgánico, sin embargo su distribución en el mundo no es uniforme [95]. En el ambiente, el arsénico se combina con oxígeno, cloro, y azufre para formar compuestos inorgánicos de arsénico. Por el contrario, en animales y en plantas el arsénico se combina con el carbón y el hidrógeno para formar compuestos orgánicos de arsénico.

A pesar de su distribución natural, el arsénico es un elemento tóxico que causa preocupación, estando clasificado como un carcinógeno humano [96]. La Agencia para Substancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR por sus siglas en ingles: Agency for Toxic Substances and Disease Registry), cataloga al arsénico dentro de las 10 substancias más dañinas, situándola de hecho en la posición número 1 [97].

En Estados Unidos desde el año 2001, la Agencia para la Protección del Ambiente (EPA por sus siglas en ingles: Environmental Protection Agency) propuso la reducción de la concentración máxima permitida de arsénico en el agua de 50 a 10  $\mu\text{g/l}$  (de 0.676 a 0.135  $\mu\text{M}$ ) [98], y hasta principios del 2006 se cumplió la fecha límite para lograr el estándar de concentración de arsénico [99].

Para México el límite máximo permisible hasta el año 2000 era de 50  $\mu\text{g/l}$  (NOM 127SSA1-1994), pero con la modificación de la norma, el límite permisible de arsénico se fue reduciendo anualmente 5  $\mu\text{g/l}$ , de tal manera que para el 2005 era de 25  $\mu\text{g/l}$ . Cabe añadir que existe una nueva propuesta aún no aprobada en donde se sugiere un límite máximo permisible de 10  $\mu\text{g/l}$  de arsénico en el agua para uso y consumo de humanos (PROY-NOM-SSAA1-250-2007).

### **D.1) Propiedades fisicoquímicas**

El arsénico es un elemento natural que pertenece al Grupo VA de la tabla periódica, su número atómico es 33 y su peso atómico es 74.9. Los estados de oxidación en los que normalmente se encuentra en la naturaleza son -3, +3, 0 y +5. Los compuestos de arsénico se catalogan en inorgánicos u orgánicos, dependiendo de la ausencia o presencia de enlaces arsénico-carbono [100].

El arsénico se clasifica como un metaloide, ya que posee propiedades químicas y físicas tanto de los metales como de los no metales. En los estados de oxidación +3 y +5 el arsénico forma

fundamentalmente arsenitos (As+3) y arsenatos (As+5), respectivamente. Uno de los aspectos fisicoquímicos relevantes en su actividad biológica es la reactividad del As+3 como un metal iónico suave, el cual forma enlaces fuertes con grupos funcionales como los tiolatos de residuos de cisteínas y los nitrógenos del imidazol de los residuos de histidina [101].

En la Tabla 2 se muestran las especies de arsénico más relevantes en cuanto a toxicidad se refiere [102].

**Tabla 2. Especies de arsénico importantes por su toxicidad**

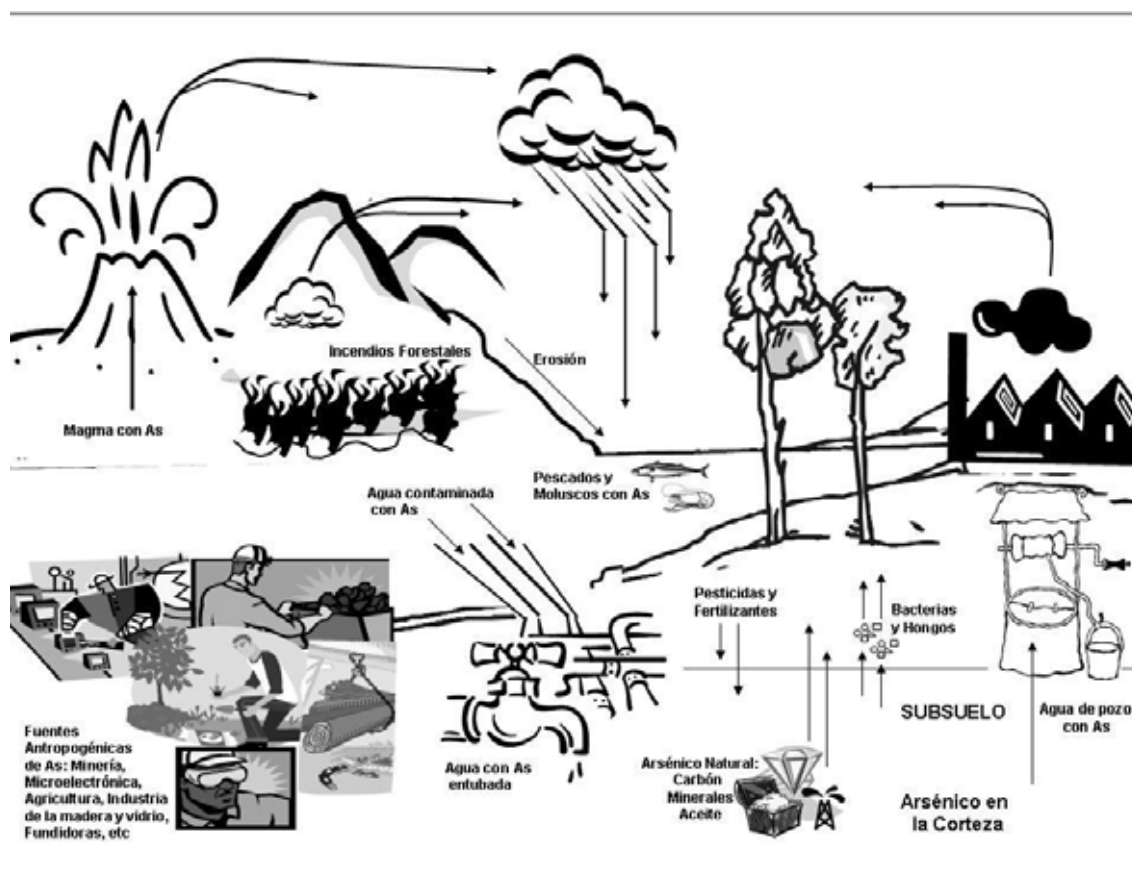
| Fórmula                                    | Nombre                            | Tipo de Compuesto | Estado de Oxidación |
|--------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|
| As(OH) <sub>3</sub>                        | Ácido arsenioso (arsenito)        | Inorgánico        | +3                  |
| H <sub>3</sub> AsO <sub>4</sub>            | Ácido arsénico (arsenato)         | Inorgánico        | +5                  |
| As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>             | Trióxido de arsénico              | Inorgánico        | +3                  |
| CH <sub>3</sub> -As(O)(OH) <sub>2</sub>    | Ácido monometilarsónico (MMAsV)   | Orgánico          | +5                  |
| CH <sub>3</sub> -A(OH) <sub>2</sub>        | Ácido monometilarsonoso (MMAsIII) | Orgánico          | +3                  |
| (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -As(O)(OH) | Ácido dimetilarsínico (DMAsV)     | Orgánico          | +5                  |
| (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -A(OH)     | Ácido dimetilarsinoso (DMAsIII)   | Orgánico          | +3                  |

## D.2) Fuentes, vías y lugares de exposición

Las fuentes de exposición al arsénico pueden ser tanto naturales como antropogénicas. El arsénico ocurre naturalmente en el suelo, en rocas y en minerales y es liberado al aire, agua y suelos como resultado de la actividad volcánica y la erosión de los depósitos naturales. Las actividades antropogénicas causantes de liberación de arsénico al medio ambiente incluyen la manufactura de insecticidas, herbicidas, desecantes de algodón, preservativos de madera, aditivos de aleaciones, vidrio, cerámica y semiconductores [103] (Figura 6).

La toxicidad por arsénico en humanos se asocia predominantemente con la exposición a arsénico inorgánico. La forma más común de los compuestos de arsénico inorgánico en el aire es el trióxido de arsénico, mientras que en agua, suelo y/o comida son principalmente los arsenatos y en menor cantidad los arsenitos [100], sin embargo, los compuestos de arsénico trivalentes son más tóxicos que los pentavalentes [104].

La principal vía de exposición al arsénico es la oral, la cual ocurre principalmente a través de agua contaminada y en menor proporción a través de la comida. Los moluscos y algunos pescados presentan concentraciones de arsénico elevadas principalmente en forma de arsenobetaina [103]. La inhalación de compuestos con arsénico puede ocurrir en ocupaciones como la agricultura, industria de la madera, vidrio y microelectrónica, en minería y en fundidoras, mientras que la quema de combustible fósiles puede afectar a la población en general [105] (Figura 6).



**Figura 6. Fuentes naturales y antropogénicas de exposición a arsénico.**

Adaptado de NAS, 1977 [106].

La contaminación del agua de bebida con arsénico se considera un problema mundial de salud pública. En países como Taiwán, Bangladesh, China, Japón, Finlandia, India, Cambodia, Nepal, Mongolia, Nueva Zelanda, Vietnam, Filipinas, Argentina, Chile, Estados Unidos y México se conoce que existe dicha exposición [95, 107, 108]. En diversas regiones de México se han

encontrado concentraciones elevadas de arsénico en el agua subterránea, siendo el caso más severo el de La Comarca Lagunera, en los estados de Coahuila [109-113] y Durango [113]. Otras regiones en donde se han detectado concentraciones altas de arsénico en el agua son en los estados de San Luis Potosí [114, 115], Sonora [116, 117], Morelos, Chihuahua, Puebla, Nuevo León, Michoacán [108, 118], la península de Baja California [119], Hidalgo [120], Jalisco [121], Guanajuato, Zacatecas [122, 123], Guerrero, Coahuila y Pachuca [124].

En México, varios de los acuíferos (norias, pozos y manantiales) contaminados con arsénico inorgánico son utilizados como fuentes de abastecimiento. En estas regiones, la mayoría del agua potable parte de un depósito en el cual se mezclan flujos de agua no contaminada con agua proveniente de depósitos filtrantes con diversos gastos y grados de contaminación con arsénico. Sin embargo, en localidades más rurales el agua aún se obtiene directamente de norias y pozos contaminados [122]. Aún cuando en algunas regiones la fuente de abastecimiento ya no contiene concentraciones de arsénico que superen la norma mexicana, en las tuberías de hierro colado y acero galvanizado con antigüedad hasta de 50 años ocurre desprendimiento de arsénico, el cual se incrustó por el previo uso de pozos con grandes cantidades de arsénico como fuente de abastecimiento de agua. Dichos desprendimientos ocasionan que el agua en las tomas domiciliarias sigan estando contaminadas con arsénico [125].

En la medicina, diferentes sales de arsénico también han sido utilizadas. En 1909 se sintetizó el primer agente quimioterapéutico llamado Salvarsan (“salvación por arsénico”) el cual fue utilizado como tratamiento para la sífilis. Posteriormente se desarrollaron otros compuestos de arsénico contra parásitos como trichomona vaginalis, tripanosomiasis y disentería amebiana. Actualmente en algunos países aún se utiliza el arsénico como tratamiento para tripanosomiasis, sin embargo para Estados Unidos y Canadá su uso no está permitido. En 2006, la FDA (Food and Drug Administration) en E.U. aprobó el uso del trióxido de arsénico como tratamiento contra la leucemia promielocítica aguda refractaria [95].

### **D.3) Efectos biológicos; biotransformación, relación con enfermedades y mecanismos generales de acción.**

El arsénico puede ser absorbido por inhalación, ingestión o por penetración en la piel o en las mucosas. Cerca del 70 al 90 % del arsénico inorgánico ingerido se absorbe fácilmente por el



tracto gastrointestinal para posteriormente ser distribuido a varios órganos y ser se excretados a través de la orina durante los primeros días o en el lapso de una semana máximo; los efectos observados a largo plazo resultan de una exposición continua [100]. Las células acumulan arsénico utilizando el sistema de transporte del fosfato [100], por acuagliceroporinas [101] o bien a través del transportador de glucosa GLUT1, este último demostrado en levadura y en ovocitos de *Xenopus Laevis* [126].

La inhalación de niveles altos de arsénico inorgánico puede producir dolor de garganta e irritación de los pulmones, mientras que la ingestión de niveles muy altos de arsénico puede ser fatal. La exposición a niveles más bajos puede producir náusea y vómitos, disminución del número de glóbulos rojos y blancos, ritmo cardíaco anormal, fragilidad capilar y una sensación de hormigueo en las manos y en los pies. La ingestión o inhalación prolongada de niveles bajos de arsénico inorgánico puede producir obscurecimiento de la piel y la aparición de pequeños callos o verrugas en la palma de las manos, en la planta de los pies y en el torso. El contacto de la piel con arsénico inorgánico puede producir enrojecimiento e hinchazón [127].

Efectos más severos de exposición crónica al arsénico inorgánico se han asociado con enfermedades crónicas-degenerativas, tales como cáncer de piel, vejiga, pulmón, riñón e hígado; enfermedades vasculares periféricas, neurológicas, cardiovasculares y diabetes mellitus [98, 128].

El metabolismo del arsénico juega un papel importante en sus efectos tóxicos. Muchos mamíferos tienen la capacidad de metilar el arsénico inorgánico, sin embargo existen variaciones en la velocidad y en el grado de metilación entre las especies e incluso entre poblaciones humanas. El arsénico inorgánico se metaboliza por procesos secuenciales que involucran una reducción de dos electrones del arsénico pentavalente al trivalente, seguido de una metilación oxidativa para generar el arsénico orgánico pentavalente. Esta reducción puede ocurrir de manera no enzimática en presencia de un grupo tiol como el glutatión. Sin embargo, se conoce que en el hígado humano existen enzimas reductasas (arsenato, MMA y DMA reductasas). La metilación del arsénico es enzimática llevada a cabo por metiltransferasas en presencia de S-adenosilmetiotina (SAM) como grupo donador [104, 105, 129] (Figura 7).

Uno de los mecanismos más aceptados por el cual el arsénico lleva a cabo su toxicidad, es induciendo una deficiencia en la respiración celular por medio de la inhibición de varias enzimas mitocondriales y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. La toxicidad del arsénico resulta también por interactuar con los grupos sulfhidrilos de las proteínas y de las enzimas y

por la sustitución del fósforo en varias reacciones bioquímicas [100]. Se ha propuesto que el arsénico también es capaz de alterar las corrientes de calcio y los niveles de calcio intracelular libre [130, 131].

En la inducción de toxicidad por arsénico, principalmente en relación con cáncer, además del reemplazo de nitrógeno y fósforo y la afinidad por grupos sulfhidrílos, de manera general se han propuesto varios modos de acción como por ejemplo, anomalías cromosómicas, alteraciones en la reparación del DNA y en el patrón de metilación, estrés oxidativo, ubiquitinación de proteínas clave, respuesta inflamatoria, y modificaciones en la proliferación celular, en la expresión de varios genes, así como en vías de transducción de señales [104, 105, 109, 129, 132, 133].

Para el caso de la diabetes, los mecanismos que se han propuesto en base a lo conocido, son el reemplazo de nitrógeno y fósforo, la afinidad por grupos sulfhidrílos y la modificación en la expresión de varios genes [133, 134].

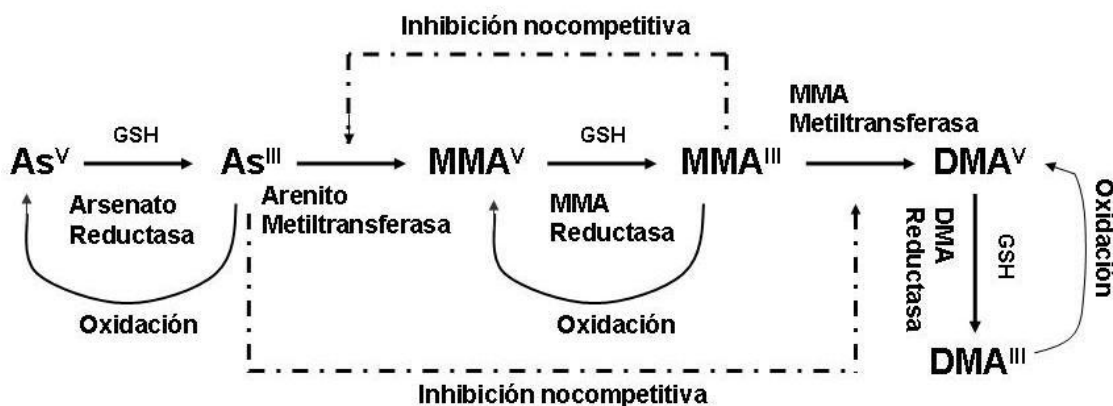


Figura 7. Metabolismo del arsénico inorgánico.  $As^V$ : arsenato,  $As^{III}$ : arsenito,  $MMA^V$ : ácido monometilarsónico,  $MMA^{III}$ : ácido monometilarsonoso,  $DMA^V$ : ácido dimetilarsínico,  $DMA^{III}$ : ácido dimetilarsinoso, GSH: glutati6n. Adaptado de Clewell, 2007 [129].

## **E) Asociación de diabetes con exposición al arsénico**

Los mecanismos de patogénesis de la diabetes inducida por arsénico se desconocen, sin embargo, la evidencia que apunta a que el arsénico inorgánico aumenta el riesgo a desarrollar diabetes tipo 2, es cada vez más amplia. Los trabajos que evalúan dicha asociación incluyen estudios epidemiológicos en distintas partes del mundo, así como estudios experimentales, tanto en animales (especialmente en roedores) como en modelos *in vitro* (siendo los más relevantes en adipocitos de ratón). En los tres tipos de estudios, existen trabajos en donde el objetivo principal no es asociar y/o evaluar el efecto del arsénico en relación a la diabetes. De tal manera que varios de los estudios son poco útiles ya que las dosis y tiempos de exposición son lejanos a lo que ocurre en la realidad.

Los trabajos acerca del mecanismo por el cual el arsénico favorece al desarrollo de diabetes tipo 2 aún son escasos. Se han propuesto algunos mecanismos generales, los cuales incluyen la sustitución del arsenato por el fosfato, la reacción del arsenito con los grupo sulfhidrilos, el estrés oxidativo, la alteración en el transporte y metabolismo de la glucosa, así como la alteración en la producción de energía y en la expresión de genes [133, 134]. Algunos trabajos experimentales poseen evidencia de que el arsénico favorece al desarrollo de diabetes tipo 2 actuando a nivel pancreático como también en el tejido adiposo [135-137].

### **E.1) Estudios epidemiológicos**

Se han publicado alrededor de 20 estudios epidemiológicos que indican que la exposición a arsénico inorgánico contribuye al desarrollo de diabetes tipo 2. Siete de los estudios se han llevado a cabo en regiones de Taiwán, Bangladesh y México con altas concentraciones de arsénico, nueve estudios en gente ocupacionalmente expuesta, y los cuatro restantes en otras poblaciones de España, Estados Unidos y Reino Unido con baja y moderada exposición al arsénico. El diagnóstico de diabetes en las poblaciones expuestas a arsénico inorgánico se basa, dependiendo del estudio, en mediciones de glucosa en sangre en ayuno, glucosuria (glucosa en orina), hemoglobina glucosilada, pruebas orales de tolerancia a la glucosa, historias clínicas de la enfermedad o mortalidad asociada a diabetes. Cabe recalcar que en ninguno de los estudios se ha evaluado la resistencia a la insulina como tal.

La primera asociación formal que se reportó entre la exposición al arsénico inorgánico a través del agua de bebida y un aumento en el riesgo a desarrollar diabetes fue en Taiwán en 1994

[138]. Los autores encontraron un incremento del doble en la prevalencia de diabetes entre los individuos residentes de áreas endémicas para arsénico comparado con los residentes de áreas no endémicas. Igualmente se encontró una dosis-respuesta significativa entre la exposición acumulada de arsénico y la prevalencia de diabetes [138]. La relación entre diabetes y el consumo de agua contaminada con altas concentraciones de arsénico ha sido confirmada por estudios transversales en Bangladesh [139, 140], en México [112] y por un estudio prospectivo en Taiwán [141], entre otros [142, 143]. En el estudio realizado en Taiwán durante 4 años, se reportó que la incidencia (en años-persona) de diabetes mellitus tipo 2 según la edad fue de dos a cinco veces mayor en pueblos expuestos a arsénico a través del agua de bebida, que en los pueblos sin exposición. Según los datos clínicos de los pacientes, ninguno de los casos incidentes desarrolló cetoacidosis, ninguno requirió de insulina exógena como tratamiento y el sobrepeso y la obesidad ( $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) constituyó un factor de riesgo importante. Debido a estos hallazgos, a partir de este estudio fue que se asoció la exposición a arsénico con diabetes tipo 2 particularmente [141].

Otros estudios han examinado la asociación entre la exposición ocupacional al arsénico inorgánico y la ocurrencia de los síntomas que son consistentes con diabetes [144-152]. Estos estudios en su mayoría fueron retrospectivos y como criterio de diagnóstico de la enfermedad se utilizaron los certificados de defunción. Sin embargo, cabe recalcar que en aquellos estudios publicados antes de 1994, la evaluación de diabetes sólo fue unas más de otras varias enfermedades estudiadas.

En la Tabla 3 se muestran las características y los resultados más relevantes de los 20 estudios epidemiológicos que asocian exposición al arsénico inorgánico con diabetes.

Aún se discute si realmente existe una fuerte asociación epidemiológica entre la exposición al arsénico y la incidencia de diabetes [1, 153, 154]. Algunos de los estudios epidemiológicos presentan serias deficiencias en la evaluación de la exposición a arsénico, en el método que fue utilizado para diagnosticar diabetes y/o en la falta de datos de dosis-respuesta. Incluso, Navas-Acien et al mencionan que los problemas metodológicos limitan la interpretación causal de la fuerte asociación encontrada entre la exposición a arsénico inorgánico y diabetes en Taiwán y Bangladesh, concluyendo que la evidencia epidemiológica es escasa e inadecuada para establecer causalidad [1]. Si bien un incremento en la prevalencia de diabetes se ha observado consistentemente entre los residentes de áreas con altos niveles de exposición a arsénico, los hallazgos en los estudio ocupacionales o en áreas con bajos niveles de exposición a arsénico

son inconsistentes, lo cual pudiera ser debido a un problema metodológico [154]. Longnecker & Daniel, postulan que si la exposición a arsénico aumenta el riesgo a desarrollar diabetes, sólo ocurrirá en aquellos que consumen agua con una concentración de arsénico  $\geq$  a 100  $\mu\text{g/l}$  [153].

## **E.2) Estudios *in vitro***

El efecto del arsénico *in vitro* sobre la homeostasis de la glucosa en la mayoría de los casos se ha evaluado de manera indirecta. De manera escasa existen algunos estudios en células  $\beta$ /islotos pancreáticos, mientras que el efecto sobre la captación de glucosa por tejido periférico y diferenciación de adipocitos ha sido más evaluado.

Los estudios realizados en células pancreáticas se han enfocado al efecto metabólico glucolítico y mitocondrial y a un factor de transcripción de la insulina, llamado PDX-1.

La secreción de insulina *in vitro* de islotos pancreáticos provenientes de animales expuestos *in vivo* a arsénico trivalente a través del agua de bebida, fue similar entre la concentración basal y estimulante de glucosa. Sin embargo, cabe señalar que en este estudio el arsénico se utilizó como control positivo de estrés oxidativo asociado a la respiración mitocondrial y con el objetivo de esclarecer su mecanismo de toxicidad [155].

En otro estudio, con el fin de evaluar el papel del ATP derivado de la glucólisis en la liberación de insulina estimulada por glucosa, se desacopló la reacción catalizada por la fosfoglicerato cinasa de la producción de ATP con una dosis tóxica de arsenato (5 mM) en islotos pancreáticos de ratones ob/ob, provocando una disminución en la secreción de insulina estimulada [156].

Por otro lado, la proteína codificada por el gen 1 de la familia homeobox duodenal y pancreático (PDX-1) es un factor de transcripción que se requiere para el desarrollo del páncreas y se ha reportado que influye en la expresión de un número de genes en las células  $\beta$ , incluyendo aquellos genes que codifican para insulina, polipéptido amiloide, glucocinasa, y el transportador de glucosa GLUT2 [157]. Estudios en los que el arsénico fue utilizado como control positivo de estrés celular, muestran que una exposición de 30 minutos a 1 mM de arsenito estimula la unión de PDX-1 al DNA en islotos pancreáticos humanos y promueve la transcripción dependiente de PDX-1 en la línea celular de células  $\beta$ , MIN6 [158]. La misma dosis de arsenito también estimula la translocación de PDX-1 del citoplasma hacia al nucleoplasma en las células  $\beta$  pancreáticas de humano [159, 160].

Los datos relacionados con la captación de glucosa por tejido periférico en presencia de arsénico son confusos, ya que existen datos contradictorios. Sin embargo, resulta importante mencionar que de todos los estudios realizados, en sólo dos de ellos el objetivo fue identificar mecanismos de acción por los que el arsénico pudiera incrementar el riesgo a producir diabetes. En el resto de los trabajos, el uso de los compuestos de arsénico fue principalmente como control positivo de estrés celular.

En distintos modelos celulares (adipocitos de ratón, células adrenales bovinas, miocitos de rata y células de riñón de hamster) tratados con un amplio rango de dosis de arsenito (0.75 – 750 ppm, equivalentes a 0.01-10  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos ó 2 horas, se observa un incremento en la captación basal de glucosa y en algunos casos también se ha documentado un aumento de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 en membrana [161-167].

En otro reporte en donde se evaluó tanto la captura basal de glucosa como la estimulada en adipocitos de ratón, el dato correspondiente a la incorporación basal (hasta con 0.5 mM) concuerda con los estudios previos, sin embargo la captación de glucosa estimulada por insulina en presencia de arsenito (0.5 mM) por 30 minutos, se reduce significativamente [168]. Contrario a todos los resultados previos, en células caninas de riñón tratadas con arsenito (0.1 – 1.5 mM) por 1 hora, la captura basal de glucosa disminuye a manera de dosis-respuesta [169].

Los únicos dos trabajos reportados hasta el momento que tienen como objetivo establecer mecanismos de acción por el cual el arsénico aumenta el riesgo a producir diabetes alterando un tejido dependiente de insulina, están realizados en adipocitos de ratón [136, 137]. Concentraciones subtóxicas de arsenito y compuestos trivalentes de arsénico orgánico mono y di metilado, inhiben la captación de glucosa estimulada por insulina en forma dosis-respuesta, mientras que los compuestos pentavalentes de arsénico inorgánico y monometilado no tienen ningún efecto sobre la captura de glucosa basal y estimulada por insulina. De hecho, la concentración del transportador de glucosa sensible a insulina GLUT4, disminuye en la superficie membranal en presencia de los compuestos de arsénico trivalentes (arsenito 50  $\mu\text{M}$ , óxido de metilarsina 2  $\mu\text{M}$  y iododimetilarsina 5  $\mu\text{M}$ ) por 4 horas. Uno de los mecanismos propuestos es que los compuestos trivalentes de arsénico suprimen la expresión y la fosforilación de la proteína cinasa B (PKB/Akt), alterando así la vía de señalización que promueve la movilización de GLUT4 [136]. Incluso se sabe que la fosforilación de PKB (Thr308 y Ser473) en presencia de compuestos de arsénico se suprime, ya que la actividad de las cinasas responsables de llevar a cabo dicha fosforilación, PDK-1 y PDK-2 putativa, se inhibe en

presencia de compuestos trivalentes de arsénico por 4 h (arsenito 50  $\mu\text{M}$  y ácido metilarsonoso 2  $\mu\text{M}$ , respectivamente) [137].

Además de la alteración en la captación de glucosa y en la señalización que ocurre una vez que la insulina se ha unido a su receptor, otro mecanismo por el cual los compuestos de arsénico pudieran alterar al tejido periférico, en particular a los adipocitos, sería afectando su diferenciación celular (adipogénesis).

El arsenito a una concentración no citotóxica (0.25, 0.5 y 6  $\mu\text{M}$ ) por un periodo de exposición crónico ó subcrónico (2 meses ó 3 días, respectivamente) es capaz de inhibir el proceso de diferenciación de pre-adipocitos, independientemente de la presencia o remoción del arsenito durante la inducción de la diferenciación con insulina y dexametasona. El arsenito además de inhibir la acumulación de lípidos, también revierte parcialmente la diferenciación. Se postula que dicha inhibición y reversión de la diferenciación es causada por la alteración en la expresión de genes involucrados en la adipogénesis, tales como PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferative - activated receptor gamma), AP2 (adipocytes selective fatty acid-binding protein), la cual es inducida por PPAR $\gamma$  y el factor de transcripción C/EBP $\alpha$  (CCAAT-enhancer binding protein  $\alpha$ ) el cual actúa en conjunto con PPAR $\gamma$  para inducir la expresión de la mayoría de los genes específicos para adipocitos [170-172].

### **E.3) Estudios en animales**

Los posibles mecanismos de acción evaluados *in vitro*, por los cuales el arsénico inorgánico se podría considerar diabetogénico, aún no se han validado con estudios *in vivo*.

Los hallazgos relacionados con la homeostasis de la glucosa y la exposición a distintos compuesto de arsénico resultan confusos y hasta contradictorios. Existe evidencia de que el arsénico es capaz de inducir hiperglucemia, no alterar los niveles plasmáticos de glucosa, o bien inducir hipoglucemia. Se ha observado que distintos compuestos de arsénico producen hiperglucemia en ayuno [135, 173], hiperglucemia secundaria transitoria [174] o retraso en la disminución en la concentración de glucosa en sangre tras una prueba de tolerancia a la glucosa [155, 175]. En otros reportes la concentración de glucosa en sangre no se ha visto afectada después de una exposición a arsénico [176, 177], o bien se reporta una disminución en la concentración de glucosa [178-181].

Como ya se ha mencionado, una de las limitantes para esclarecer el escenario y que confunde la interpretación de los datos es que los estudios prácticamente no son comparables por razones que incluyen: el tipo de compuesto de arsénico utilizado, la especie de animal estudiado (cabras y distintas cepas de ratas y ratones) dosis (0.025 – 100 mg/l) y los tiempos de exposición (1-10 semanas).

A pesar de todos estos trabajos publicados, sólo en dos de ellos la exposición de los animales al arsénico fue con el objetivo de conocer si este es en realidad un diabetógeno, así como la identificación de posibles mecanismos de acción. En el resto de los estudios, el empleo del arsénico fue utilizado como control positivo de inhibición enzimática, de estrés oxidativo, y/o para elucidar mecanismos de toxicidad, entre otros, lo cual explica el porqué de las variaciones en los diseños experimentales.

En relación con los dos estudios más relevantes, se observó que ratas expuestas oralmente a arsénico por 90 días (arsenito a 1.7 mg/kg) presentaron hiperglucemia, hiperinsulinemia y baja sensibilidad a la insulina (resistencia a la insulina). En el páncreas de la ratas expuestas, se detectó mayor concentración de compuestos de arsénico, principalmente metabolitos di y tri metilados, así como niveles elevados de glutatión y lipoperoxidación, indicativos de estrés y daño oxidativo, respectivamente [135].

Por otro lado, en ratones expuestos a 600  $\mu$ M de arsenito en agua de bebida por 8 semanas, los niveles de glucosa en ayuno no se alteraron por dicha exposición, sin embargo los ratones expuestos a arsenito mostraron una curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal alterada. El aumento de la glucosa en sangre a los 15-30 minutos de haberla inyectado fue significativamente mayor que en el grupo control y permaneció significativamente elevada hasta por una hora a partir de la administración. En tejidos blanco de la diabetes tipo 2 (hígado, páncreas, tejido adiposo y músculo) se detectaron niveles variables de arsénico y sus metabolitos, siendo el dimetilarsénico el más abundante [175].



**Tabla 3. Estudios epidemiológicos que asocian la exposición crónica a arsénico con diabetes mellitus. Adaptada de Navas-Acien, 2006 [1]**

| Diseño                                                           | País           | Tipo de Participantes | Diagnóstico de Diabetes                  | Casos/ Controles | Hombres (%) | Rango de edad (años) | Evaluación de exposición a As        | Niveles de As, expuestos vs referencia          | Riesgo de Diabetes (95% IC) | Tipo de ajuste                 | Referencia      |
|------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------|------------------------------------------|------------------|-------------|----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------|
| <b>Población General, exposición elevada a arsénico</b>          |                |                       |                                          |                  |             |                      |                                      |                                                 |                             |                                |                 |
| T                                                                | Taiwán         | de AEE a As           | POTG, autoreporte                        | 86/805           | 43          | 30 - 69              | IEA en agua de beber de la aldea     | >15 vs 0 ppm-año                                | 10.1 (1.3-77.9)             | edad, sexo, IMC, AF            | [138]           |
| T                                                                | Bangladesh     | de AEB y AEE a As     | POTG, autoreporte, glucosuria, síntomas* | 46/971           | 59          | 30 – 60 +            | vivir en AEE a As, queratosis        | queratosis vs no queratosis                     | 5.9 (2.9-11.6)              | edad, sexo, IMC                | [139]           |
| T                                                                | Bangladesh     | de AEE a As           | glucosuria                               | 263/1,332        | 61          | 30 – 60 +            | IEA en agua de beber                 | > 10 vs 0 ppm-año                               | 2.1 (1.1-4.2)               | edad, sexo                     | [140]           |
| CR                                                               | Taiwán         | defunción: 1971-1994  | certificado de defunción                 | 531 defunciones  | 35          | todas las edades     | vivir en AEE a As                    | AEE vs no AEE de As                             | 1.46 (1.28-1.67)            | edad, sexo                     | [142]           |
| CP                                                               | Taiwán         | de AEE a As           | POTG                                     | 41/405           | 50          | media 47             | IEA en agua de beber de la aldea     | >17 vs <17 ppm-año                              | 2.1 (1.1-4.2)               | edad, sexo, IMC                | [141]           |
| T                                                                | Taiwán         | BDSMN                 | ICD-9 250 ICD-9 A181                     | 27,543 / 678,791 | 43          | 25 – 65 +            | vivir en AEE a As                    | AEE vs no AEE de As                             | 2.69 (2.65-2.73)            | edad, sexo                     | [143]           |
| CC                                                               | México         | de AEE a As           | glucosa en ayuno, historial médico       | 200/200          | 31.5        | 30 - 87              | niveles urinarios                    | > 104 vs < 104 µg/g de As en orina / creatinina | 2.84 (1.64-4.92)            | edad, sexo, IMC, Ht, HFD, trig | [112]           |
| <b>Población General, exposición baja a moderada de arsénico</b> |                |                       |                                          |                  |             |                      |                                      |                                                 |                             |                                |                 |
| CC                                                               | Reino Unido    | Hospitalizados        | NR                                       | 87/30            | 65          | 18-78                | niveles plasmáticos                  | percentil 75 vs 25                              | 1.09 (0.79-1.49)            | crudo                          | [182]           |
| CC                                                               | España         | Hospitalizados        | NR                                       | 38/49            | 39          | NR                   | niveles urinarios                    | percentil 75 vs 25                              | 0.87 (0.5-1.53)             | crudo                          | [183]           |
| CR                                                               | Estados Unidos | Mormones              | certificado de defunción                 | 55/4,003         | 52          | <50 – 80 +           | IEA en agua de beber de la comunidad | > 4 vs < 1 ppm-año                              | 0.65 (0.34-1.24)            | edad, Sexo                     | [184]           |
| CC                                                               | Estados Unidos | con pozos privados    | autoreporte                              | 67/1118          | NR          | media 62             | agua de beber del sujeto             | > 10 vs < 2 ppb                                 | 1.02 (0.49-2.15)            | edad, sexo, IMC, fumar         | [98]            |
|                                                                  |                |                       |                                          |                  |             |                      |                                      |                                                 |                             |                                | <b>Continúa</b> |

**Continuación Tabla 3. Estudios epidemiológicos que asocian la exposición crónica a arsénico con diabetes mellitus.**

| Diseño                                                      | País           | Tipo de Participantes                        | Diagnóstico de Diabetes                    | Casos/ Controles | Hombres (%) | Rango de edad (años)           | Evaluación de exposición a As | Niveles de As, expuestos vs referencia | Riesgo de Diabetes (95% IC) | Tipo de ajuste      | Referencia |
|-------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------|-------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------|---------------------|------------|
| <b>Población Ocupacional, exposición elevada a arsénico</b> |                |                                              |                                            |                  |             |                                |                               |                                        |                             |                     |            |
| CR                                                          | Estados Unidos | trabajadores de pesticidas                   | certificado de defunción                   | 2 defunciones    | 75          | < 20 - 40 + al ser contratados | Puesto                        | trabajadores vs población general      | 0.47 (0.12-1.88)            | edad, sexo, periodo | [144]      |
| CR                                                          | Estados Unidos | fundidores de cobre                          | certificado de defunción                   | 12 defunciones   | 100         | < 20 – 69 al ser contratados   | Puesto                        | trabajadores vs población general      | 0.85 (0.48-1.49)            | edad                | [145]      |
| T                                                           | Suecia         | fundidores de cobre, otros                   | autoreporte                                | 4/85             | 100         | media 37                       | Puesto                        | trabajadores vs otros trabajadores     | 9.61 (0.53-173)             | crudo               | [146]      |
| CC                                                          | Suecia         | fundidores de cobre                          | historial médico, certificado de defunción | 12/31            | 100         | 30 - 74 al morir               | niveles en el aire            | ~ 5 vs 0 mg/m <sup>3</sup>             | 3.3 (0.5-30)                | edad                | [147]      |
| CC                                                          | Suecia         | trabajadores de vidrio                       | certificado de defunción                   | 240/2,216        | 100         | 45 – 75 +                      | Puesto                        | trabajadores vs otros trabajadores     | 1.4 (0.9-2.1)               | edad                | [148]      |
| T                                                           | Dinamarca      | taxidermistas, trabajadores de madera, otros | HbA1c                                      | 5/59             | 87          | media 37                       | Puesto                        | trabajadores vs población general      | 4.43 (0.47-42)              | edad                | [149]      |
| CR                                                          | Italia         | trabajadores de vidrio                       | certificado de defunción                   | 3 defunciones    | 100         | <40 -65 +                      | Puesto                        | trabajadores vs población general      | 0.34 (0.09-0.88)            | edad                | [150]      |
| CR                                                          | Estados Unidos | fundidores de cobre                          | certificado de defunción                   | 54 defunciones   | 100         | <20 – 30 + al ser contratados  | Puesto                        | trabajadores vs población general      | 0.83 (0.63-1.08)            | edad                | [151]      |
| CR                                                          | Estados Unidos | niños a < 4 Km de fundidoras de cobre        | certificado de defunción                   | 16/3,116         | 58          | < 14                           | años de residencia            | ≥ 10 vs < 1 año                        | 1.6 (0.36-1.16)             | crudo               | [152]      |

AEB: áreas con exposición baja, AEE: áreas con exposición elevada (400-1000 ppb ó µg/l equivalentes a 5.4-13.5 µM), AF: actividad física, As: arsénico, BDSMN: Base de datos del seguro médico nacional, CC: caso-control, CP: Cohorte Prospectiva, CR: Cohorte retrospectiva, HbA1c: hemoglobina glucosilada, HFD: Historia familiar de diabetes, Ht: hipertensión, IC: intervalo de confianza, ICD-9: Clasificación Internacional de enfermedades 9ª revisión, IEA: índice de exposición acumulada (  $\sum$  niveles de arsénico en agua de beber  $\times$  tiempo de exposición  $\times$  (i indica aldeas específicas) ), IMC: índice de masa corporal, NR: no reportado, POTG: prueba oral de tolerancia a la glucosa, ppb: partes por billón (µg/l), ppm: partes por millón (mg/l), Riesgo de Diabetes: evaluado a través de razón de Momios (OR) para los estudios transversales y de riesgo relativo (RR) para los estudios prospectivos, T: Transversal, trig: triglicéridos, \* basado en los criterios de OMS.

## **F) El metabolismo de la glucosa y la diabetes evaluado en los leucocitos**

Los leucocitos, también conocidos como glóbulos blancos, se encuentran principalmente en la sangre involucrados especialmente en la función inmunológica. Existen diferentes tipos de leucocitos, los polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y los mononucleares (linfocitos y monocitos). Si bien no son un órgano blanco de la insulina en cuanto al metabolismo de la glucosa y a su homeostasis en sangre (como son los adipocitos, el músculo y/o el hígado), sí se han llegado a utilizar.

La mayoría de las células de mamíferos, incluyendo a los leucocitos, dependen del suministro continuo de glucosa como su fuente principal para la generación de ATP. Debido a la hidrofobicidad de la glucosa, esta no puede atravesar la bicapa lípida por lo que se requiere de proteínas acarreadoras específicas para facilitar su difusión a través de un gradiente de concentración. A estas proteínas se les conoce con el nombre de GLUTs.

En tejidos y células humanas, se han descrito 14 isoformas de los transportadores de glucosa: GLUT1-GLUT12, GLUT14 y el transportador de mioinositol (HMIT) y cada uno de ellos presenta diferente especificidad por substratos, propiedades cinéticas así como diferente perfil de expresión entre los tejidos. Las características moleculares y en secuencia que comparten los miembros de la familia son: 1) la presencia de 12 dominios transmembranales en hélice, 2) 7 residuos conservados de glicina en las hélices, 3) varios residuos ácidos y básicos en la superficie intracelular de los transportadores y 4) dos residuos conservados de triptófano y dos de tirosina [185].

En base a la homología en la secuencia y en elementos característicos, la familia de Gluts se divide en 3 subfamilias: en la clase I, la cual se encuentra compuesta por GLUT1-GLUT4, la clase II correspondiente a los transportadores de fructuosa GLUT 5, 7, 9 y 11 y la clase III, en donde se encuentran clasificados los transportadores GLUT 6, 8, 10, 12 y HMIT1. Por último, debido a que GLUT 14 comparte una organización similar con GLUT3 (incluso se piensa que resultó de una duplicación), estaría clasificado dentro de la clase 1 [186].

Los transportadores de glucosa se expresan y se regulan de manera diferencial entre los distintos tipos de células que conforman los leucocitos. De manera general, los leucocitos humanos expresan los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT3, GLUT4, GLUT5 y GLUT6 [187-190]. La presencia de GLUT3 y GLUT4 en la membrana celular en monocitos y linfocitos-B aumenta con la insulina. En un estado de activación (como es el caso de una infección) la

expresión en membrana de los transportadores GLUT1, GLUT3 y GLUT4 incrementa en los monocitos y en los linfocitos B y T, mientras que en las células polimorfonucleares sólo aumenta la expresión de GLUT1 y GLUT3 [187]. Existen reportes que muestran que los monocitos expresan más GLUT3 y menos GLUT1 en comparación con los linfocitos y que bajo un estado de activación sólo los niveles celulares de GLUT1 en monocitos aumentan. GLUT5 solamente fue detectada en monocitos a nivel de proteína y en linfocitos se detectó sólo la presencia del RNAm [188].

Incluso, existe un reporte en la literatura que muestra que a diferencia de GLUT1 y GLUT3, el transportador de glucosa GLUT4 sólo se expresa en los linfocitos de personas diabéticas, más no en individuos sanos [190].

Para el caso de GLUT6, el RNAm se expresa de manera predominante en leucocitos periféricos, sin embargo no se ha demostrado la presencia de la proteína [185].

Por otro lado también se sabe que los monocitos y los linfocitos expresan el receptor a la insulina y cuentan con los mecanismos de internalización del receptor del metabolismo de la insulina [191-195]. La captación de glucosa *in vitro* por células mononucleares ocurre de manera basal y dependiente de insulina [196, 197]. En linfoblastos transformados, la entrada de glucosa basal y dependiente de insulina es menor en sujetos con hipertensión arterial. Incluso, existe una correlación inversa entre la incorporación de glucosa dependiente de insulina *in vitro* en los linfocitos de los sujetos y la resistencia a la insulina que presentan los sujetos *in vivo* [197].

La cepa de rata Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) a las 18 semanas de edad desarrolla de manera espontánea hiperglucemia y obesidad presentando las características clínicas y patológicas de la diabetes tipo 2 [198, 199]. Se sabe que esta cepa presenta un cambio de base en el gen que codifica para la calpaína-10, ocasionando la substitución no conservativa de un aminoácido (S195G) en el dominio catalítico de la proteína. Dicho cambio en la secuencia del gen se ha sugerido que pudiera ser importante para la función de la proteína y para la susceptibilidad a desarrollar diabetes tipo 2 [200]. Un hallazgo interesante es que las ratas OLETF expresan niveles reducidos de RNAm de calpaína-10 antes y después de desarrollar la enfermedad en tejidos blanco de la insulina y en leucocitos periféricos [201].

En esta misma cepa de ratas, se ha observado que la alteración en la expresión de otros genes asociados a diabetes tipo 2, se altera tanto en hígado como en leucocitos [202, 203].

En la literatura existen otros ejemplos de enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa que presentan bajos niveles de actividad en los linfocitos de personas diabéticas, obesos y/o resistentes a la insulina, en comparación con sujetos sanos. Dichas enzimas incluyen a la piruvato deshidrogenasa (PDH) [204], enzima clave en la oxidación de la glucosa, a la piruvato deshidrogenasa fosfatasa [205], la cual desfosforila y activa a la PDH, la 6-fosfofructocinasa [206], una de las enzimas más importantes reguladoras de la glucólisis y por último la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa [207], la cual es el punto de ramificación entre la vía glucolítica y la vía de biosíntesis de triglicéridos.

De manera análoga al músculo de ratón, en linfocitos de humanos obesos e hiperleptinémicos en comparación con individuos delgados, la fosforilación basal del sustrato del receptor a la insulina 1 (IRS1) es mayor. Durante el clamp hiperinsulinémico-euglicémico, el incremento en la fosforilación de IRS1 observada en los linfocitos de los sujetos delgados no ocurre en sujetos obesos [208].

Las células mononucleares también se han utilizado como modelo de las complicaciones diabéticas. Se sabe que el estrés oxidativo incrementado, activa como consecuencia al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual se ha asociado con el desarrollo de complicaciones diabéticas tardías. En linfocitos/monocitos aislados de pacientes con diabetes, la activación de NF- $\kappa$ B dependiente del estrés oxidativo correlaciona con el grado de nefropatía diabética [209].

En conjunto, todos estos estudios sugieren que las alteraciones enzimáticas presentes en los linfocitos de los sujetos diabéticos reflejan o pueden ser utilizadas como marcadores de la diabetes tipo 2.

## RELEVANCIA E IMPACTO

A nivel mundial, en el año 2000 existían 150-170 millones de personas con diabetes tipo 2 y se espera que para el año 2030 esta cifra se duplique, aunado a un incremento en la incidencia en niños y adolescentes.

En México, cerca del 10 % de la población padece la enfermedad y se ha planteado la existencia de aproximadamente 16 millones de personas expuestas a elevadas concentraciones de arsénico inorgánico a través del agua de bebida (Comunicación personal; Dirección de Salud Ambiental, SSA).

Ambas condiciones representan en ciertos países como el nuestro, un problema de salud pública, en donde los costos directos e indirectos llegan a ser elevados.

Por lo tanto, resulta importante conocer si la ingesta de arsénico es un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes, así como un posible mecanismo de acción. Después de la obesidad, la exposición al arsénico podría representar el factor de riesgo prevenible más frecuente para el desarrollo de diabetes tipo 2.

## HIPÓTESIS

I) Debido a que uno de los procesos necesarios para el desarrollo de la diabetes tipo 2 es la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas, uno de los mecanismos por el cual el arsénico podría aumentar el riesgo a desarrollar la enfermedad es produciendo una inadecuada secreción de insulina. En base a los efectos conocidos del arsénico, las alteraciones podrían ocurrir en la síntesis y/o en la secreción de la insulina. A nivel de secreción, el arsénico podría alterar las concentraciones de calcio intracelular y/o componentes de la maquinaria de secreción como calpaína-10 y/o SNAP25.

II) El grado de funcionalidad de las células  $\beta$  del páncreas en humanos dependerá del grado de exposición al arsénico, y de la presencia de polimorfismos de susceptibilidad para diabetes tipo 2 en el gen de la calpaína-10.

III) Tomando en cuenta que el estudio del tejido humano relacionado directamente con la homeostasis de la glucosa, en particular el páncreas, es prácticamente imposible, el uso del linfocito humano se propone como modelo para estudiar ciertas diferencias moleculares relacionadas con la diabetes presentes en gente con y sin dicha enfermedad.

## **OBJETIVO GENERAL**

Conocer si el arsénico es un factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes tipo 2 alterando la funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas.

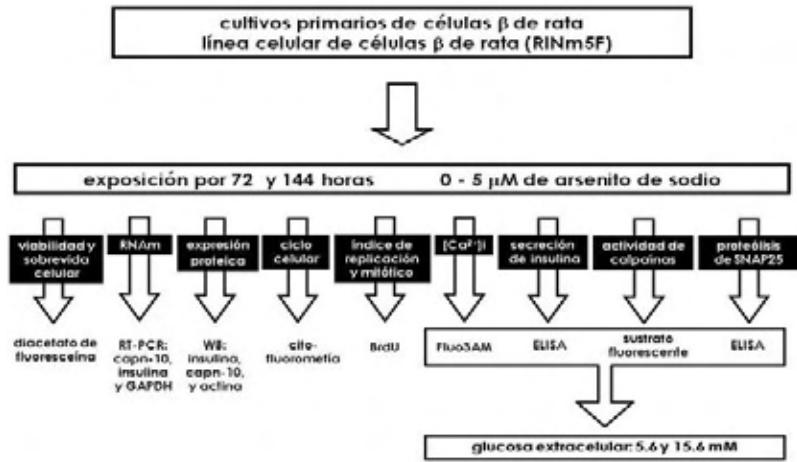
## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I) Determinar si la exposición subcrónica a arsenito de sodio *in vitro* afecta la funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas de rata, así como su mecanismo de acción.
  
- II) Evaluar en un grupo de sujetos sanos y en un grupo de sujetos con diabetes tipo 2 si el grado de exposición al arsénico se asocia con el nivel de funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas, y determinar si se asocia con la presencia de polimorfismos de susceptibilidad para diabetes tipo 2 en el gen de la calpaína-10.
  
- III) Determinar la utilidad del linfocito humano como modelo de estudio para la diabetes tipo 2 por medio del análisis de las calpaínas.

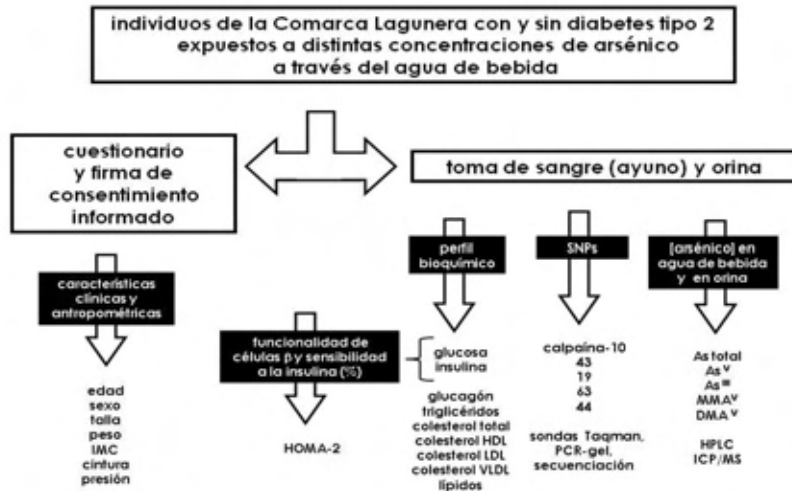


## DISEÑO EXPERIMENTAL

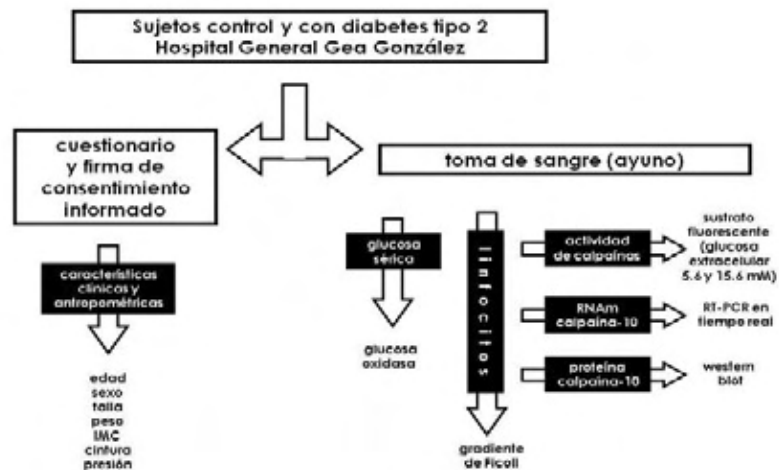
### I) Estudio *in vitro* en células $\beta$ pancreáticas de rata



### II) Estudio piloto con individuos de la Comarca Lagunera



### III) Modelo en linfocitos de individuos de Hospital Gea González



## **METODOLOGÍA**

### **A) Cultivos Celulares**

#### **A.1) Obtención de las células $\beta$ pancreáticas de rata adulta [210]**

Los páncreas se obtienen de ratas Wistar macho adultas jóvenes (250-280 g) anestesiadas (pentobarbital 40 mg/kg); se cierra el conducto de Wirsung, se canula el conducto pancreático y se inyectan de 5 a 10 ml de solución Hanks suplementada con gentamicina 5  $\mu$ g/ml y 0.1 % de albúmina sérica bovina (HBSA). El páncreas insuflado se diseca, se limpia y se corta en pedazos pequeños.

Para obtener el tejido endocrino, el páncreas se digiere con colagenasa tipo IV (CGS 0.1 mg/ml) durante 12 minutos en agitación a 37°C.

Los islotes pancreáticos se separan del tejido acinar mediante centrifugación (2000 rpm durante 10 minutos) en gradiente de Ficoll (27, 23, 20 y 11 % en HSBA). Posteriormente los islotes se recolectan y se lavan tres veces con HBSA.

Las células del islote se disocian mecánicamente en una solución con tripsina libre de calcio durante 10 minutos a 37°C en un baño con agitación constante y rápida. Las células aisladas se cultivan por 13 horas aproximadamente en medio RPMI-1640 suplementado (11.6 mmol/l de glucosa, 100 unidades/ml de penicilina G, 100 mg/ml de estreptomicina, 0.25 mg/ml de anfotericina B y 2 mM de L-glutamina) y 10 % de suero bovino fetal (SBF) en cajas bacteriológicas para promover el pegado de los fibroblastos y para una recuperación post aislamiento.

Las células se siembran en cajas de cultivo de pozos en las siguientes condiciones: para ensayos de viabilidad  $6.2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y  $2.6 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> para los experimentos de secreción de insulina y RNAm, en medio RPMI-1640 suplementado y con 1 % de SBF. Para los últimos dos ensayos, las células se siembran en pozos tratados previamente con poli-L-lisina. Los cultivos se mantienen a 37 °C en una incubadora humidificada (5 % CO<sub>2</sub>).

#### **A.2) Línea celular de insulinoma de rata RINm5F**

(Donada por la Dra. Cristina Fernández)

Las células se crecen en medio RPMI-1640 suplementado y 10 % de SBF. Se siembran  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se cultivan toda la noche. El medio se reemplaza por la mañana siguiente por medio RPMI-1640 suplementado y con 1 % de SBF. Los cultivos se mantienen a 37 °C en una incubadora humidificada (5 % CO<sub>2</sub>).

### **A.3) Linfocitos humanos**

Los linfocitos se aíslan de sangre entera tomada de los sujetos seleccionados, mediante un gradiente de densidad de Ficoll – Histopaque-1077 (Sigma) (1:1.5), centrifugando las células a 1600 rpm por 25 minutos, seguido de un lavado con PBS. El número de linfocitos se cuenta mediante citofluorometría (GUAVA) con reactivo ViaCount (GuavaTechnologies).

### **B) Preparación y tratamientos con arsenito de sodio**

Se prepara una solución estéril acuosa de arsenito de sodio 1M y por diluciones seriadas se obtienen las concentraciones necesarias. Una vez reemplazado el medio de los cultivos (1 % de SBF), las células se tratan con arsenito de sodio 0 - 10  $\mu$ M por 72 y 144 h para los cultivos primarios de células  $\beta$  aisladas y de 0 - 5  $\mu$ M por 72 horas para la línea celular. El medio de cultivo y el arsenito de sodio se reemplazan a la mitad del tratamiento.

### **C) Evaluación de citotoxicidad**

La viabilidad celular se evalúa al término de los tratamientos con arsenito de sodio por un ensayo mediado por el fluorocromo diacetato de fluoresceína (FDA) el cual valora tanto la integridad membranal como la actividad metabólica. Las células viables incorporan el FDA el cual rápidamente se hidroliza por la acetil esterasa al compuesto fluorescente fluoresceína el cual se retiene dentro de la célula. Las células no viables al no tener actividad de esterasa ya no fluorescen [211].

#### **C.1) Índice de viabilidad celular**

En este caso aparte del FDA también se utiliza bromuro de etidio (BrEt) el cual entra a las células que presentan membranas dañadas, tiñendo así el DNA; de tal manera que al microscopio de fluorescencia las células vivas aparecen verdes y los núcleos teñidos de rojo indican células muertas [212].

Después de la exposición al arsenito de sodio, las células se colectan por tripsinización y se mezclan 1:1 (v/v) con la solución de FDA/BrEt (0.0317  $\mu$ g/ $\mu$ l / 0.0079  $\mu$ g/ $\mu$ l) y se analizan las células en un microscopio de fluorescencia BX60 Olympus (Ex: 530-550 nm, Em: 590 nm). Los experimentos se realizan por duplicado, se cuentan por condición experimental cerca de 200 células y se obtiene el porcentaje del número de células vivas.

## **C.2) Sobrevida celular**

Una vez transcurridas las 72 h de exposición de las células RINm5F al arsenito de sodio, sin despegar las células se lavan una vez con PBS para quitar restos celulares y se añade la solución de FDA. La viabilidad se cuantifica por fluorescencia relativa en un fluorómetro de placa Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Vantaa Finland) (Ex: 485 nm, Em: 538 nm) por duplicado. Las unidades de fluorescencia relativa de las condiciones control corresponden al 100 % de la viabilidad, a partir del cual se obtiene el % de células vivas para las condiciones experimentales.

## **D) Ensayo de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)**

### **D.1) Determinación de la secreción de insulina**

Después de la exposición al arsenito de sodio por 72 y/o 144 horas, las células se cambian a medio Hanks' (Sigma) bajo en glucosa (5.6 mM) por 30 minutos. Después de este período, las células se someten a medio Hanks' bajo o alto en glucosa (5.6 y 15.6 mM, respectivamente) por una hora. Se recolectan los sobrenadantes y se centrifugan para remover debris celular y las células se lisan para la cuantificación de proteína. Tanto el medio con la insulina como el contenido proteico total se congelan a -70°C hasta su respectiva cuantificación. La concentración de insulina secretada se evalúa a través del método de ELISA (1-2-3 ultra-sensitive rat insulin ELISA kit, Alpco Diagnostics), utilizando una curva de estándares con concentración conocida (0 – 5.5 ng/ml).

La proteína total se cuantifica por el método de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad) para los cultivos primarios, mientras que para las células RINm5F la proteína se cuantifica con el método de Lowry (DC Protein Assay, BioRad). En ambos casos se utilizó albúmina sérica bovina (Bio-Rad) como estándar de concentración para la curva de referencia. Los datos de insulina primero se normalizan con la concentración respectiva de proteína total y después con respecto al control en 5.6 mM de glucosa.

### **D.2) Proteólisis de SNAP-25**

Después de la exposición al arsenito de sodio por 72 horas, las células se incuban en medio Krebs Ringer (KRB) (NaCl 125, KCl 4.7, NaHCO<sub>3</sub> 25, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, y HEPES 10 mM, pH7.4) con concentración baja de glucosa (5.6 mM) por 30 minutos. Después de este período, las células se someten por 30 minutos ó 2 horas en medio KRB bajo o alto en

glucosa (5.6 y 15.6 mM, respectivamente). Posteriormente de las células se extrae la proteína total y se cuantifica (ver sección F.1 de métodos).

La inmunodetección se lleva a cabo por la técnica de ELISA siguiendo el protocolo general de BD Bioscience [213]. En placas de poliestireno de 96 pozos de alta afinidad, se incuba toda la noche 4 µg/ml del anticuerpo de captura anti-SNAP25 COOH (Santa Cruz sc-7538) en solución de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 8.2 a 4°C. Después de bloquear los sitios no específicos de unión con albúmina sérica bovina (BSA), se incuban por 4 horas las muestras de proteína total (75 ó 100 µg/ml) así como los estándares de proteína total de células RINm5F sin estimulación para la generación de la curva de validación de linealidad (50 – 200 µg/ml) [214]. Toda la noche se incuba 2 µg/ml del segundo anticuerpo anti- SNAP25 NH<sub>2</sub> (BD 610366), seguido de 5 lavados con PBS-Tween20® al 0.05 % y de la incubación por 1 hora de 2 µg/ml del anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con la enzima peroxidasa. Posteriormente a otra serie de lavados, se incuba el substrato 3,3',5'5-tetrametilbenzidina (TMB) por 30 minutos en oscuridad y se detiene la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. La absorbancia de la reacción colorimétrica se lee a 450 nm con la corrección de referencia a 540 nm.

Debido a que el segundo anticuerpo utilizado reconoce la fracción del amino terminal de la proteína SNAP-25, la cual se pierde una vez que ha sido proteolizado, la señal obtenida corresponde a la porción de SNAP-25 que no fue procesado [18].

Para reportar la fracción de SNAP-25 procesado, el valor de absorbancia de cada muestra se le resta al valor máximo obtenido.

## **E) RNAm de insulina, calpaína-10 y GAPDH por RT-PCR semicuantitativo y calpaína-10 y GAPDH por RT-PCR en tiempo real**

### **E.1) Extracción y cuantificación de RNA total**

Las células se lisan y se extrae el RNA con reactivo TRizol (Gibco), siguiendo el protocolo sugerido por la compañía. De manera breve, para lisar las células se agrega 1 ml de Trizol vortexeando extensamente. Posteriormente se añade cloroformo frío y se centrifuga a 12,000 g durante 15 minutos a 4°C. Se extrae la fase acuosa y se precipita el RNA total con isopropanol (1:1 vol/vol) incubando 10 minutos a 4°C seguido de un centrifugado a 12,000 g por 10 minutos a 4°C. A continuación el botón de RNA se lava con etanol frío al 75 % y se centrifuga a 7,000 g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente se decanta el etanol dejando evaporar el sobrante y el botón se resuspende en 10 µl de agua tratada con DEPC.

El RNA de los cultivos primarios de células  $\beta$  y de la línea celular se cuantifican por espectrofotometría a 260/280 nm, en donde una unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 40  $\mu\text{g/ml}$  de RNA aproximadamente [215].

La cuantificación del RNA de linfocitos humanos se lleva a cabo por medio de fluorometría en placa (96 pozos) (Fluoroskan Ascent; Thermo Electron Corporation, Vantaa Finland) (Ex:485 nm, Em:538 nm) utilizando el kit Quanty-iT RiboGreen RNA Assay (Invitrogen) con concentraciones conocidas de RNA ribosomal (0-1000 ng/ml) como estándares.

### **E.2) Síntesis de cDNA por medio de la reacción de transcriptasa reversa**

A partir de 66 ng de RNA total se lleva a cabo la síntesis de cDNA a través de la reacción de la transcriptasa reversa M-MLV con oligo-d(T)<sub>12-18</sub> (para los cultivos primarios con reactivos Applied biosystems [GeneAmp RNA PCR Kit] y con reactivos Invitrogen para las células RINm5F y los linfocitos).

### **E.3) Reacción de PCR** (cultivos primarios de células $\beta$ y la línea celular)

A continuación se muestra para cada uno de los genes de interés analizados, la secuencia de los oligonucleótidos así como las temperaturas y el número de ciclos utilizados, respectivamente. Con \* se marcan las condiciones que se utilizaron para las células  $\beta$  de cultivos primarios con el termociclador MasterCycle gradient (Eppendorf). El resto de las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Cabe señalar que dichas modificaciones se realizaron para evitar que las reacciones alcanzaran la meseta.

#### **Insulina [10]**

sentido: 5'-AAGAGCCATCAGCAAGC-3'

antisentido: 5'-GAGCAGATGCTGGTGCAGC-3'

95°C 5 min

95°C 60\*/30 seg  
56°C 90\*/30 seg  
72°C 60\*/30 seg

} x 15\*/20

72°C 10 min

4°C  $\infty$

\* Células  $\beta$  de cultivo primario, termociclador MasterCycle gradient (Eppendorf)

### **Calpaína-10 [46]**

sentido: 5'-GAAGGGGAGCCCAGGGGCGCCGAAGATG-3'

antisentido: 5'-GCAGTGTGCTGTAGGGTGATACGGATG -3'

95°C 5 min

95°C 30 seg  
60°C 30 seg  
72°C 30 seg

} x 35

72°C 10 min

4°C ∞

### **GAPDH [10]**

sentido: 5'-GCCCCCATGTTTGTGAT-3'

antisentido: 5'-GCCCCAGCATCAAAGGT-3'

95°C 5 min

95°C 60\*/30 seg  
56°C 90\*/30 seg  
72°C 60\*/30 seg

} x 20

72°C 10 min

4°C ∞

\* Células β de cultivo primario, termociclador MasterCycle gradient (Eppendorf)

### **E.4) Electroforesis y semicuantificación**

Los productos amplificados se someten a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con solución de BrEt (0.5 µg/ml). La semicuantificación de los productos de PCR se determina por densitometría óptica y se analiza con el software Quantity One Versión 4.1.1 (Bio-Rad). Los valores obtenidos del RNAm de insulina o de calpaín-10 se dividen entre los valores de GAPDH como gen de expresión constitutiva.

### **E.5 Reacción de PCR en tiempo real (linfocitos humanos) y cuantificación relativa**

Las reacciones duplex (amplificación de ambos genes en el mismo pozo) se llevan a cabo por triplicado para cada donador (controles y diabéticos) con 25 ng, en un equipo ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) en placas de 96 pozos utilizando: TaqMan Universal PCR Master Mix y oligos/sondas Taqman para ensayos de expresión para calpain-

10/FAM (isoformas A, B, C, D, E, F y H) (Hs00225048\_m1) y GAPDH/VIC humano (Applied Biosystems).

El análisis de la cuantificación relativa se obtiene usando el valor del  $C_T$  (threshold cycle) el cual se refiere al número de ciclo en el cual la fluorescencia (y por lo tanto el cDNA) se incrementa de manera exponencial. La expresión para el análisis estadístico fue calculada por el método comparativo del  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  [216, 217]. Para cada muestra se obtuvo el promedio de los triplicados del  $\Delta C_T$  (calpaína-10  $C_T$  - GAPDH  $C_T$ ).

*Muestras del Hospital General Dr. Manuel Gea González:* Para determinar la expresión del RNAm al comparar los grupos, el promedio del  $\Delta C_T$  de todos los sujetos control se resta al valor de  $\Delta C_T$  de cada sujeto diabético para así generar el valor del  $\Delta\Delta C_T$ . El  $\Delta\Delta C_T$  de cada donador sano es de cero y el  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  de este grupo es de 1.

Antes de llevar a cabo la cuantificación, se realizó un análisis para determinar el uso de GAPDH como control endógeno de expresión en las muestras analizadas. La eficiencia de amplificación de los productos de PCR para calpaína-10 y para GAPDH, se confirmó en una serie de estudios de validación, en reacciones sencillas y duplex, obteniendo un valor absoluto de la pendiente del log de la cantidad utilizada vs  $\Delta C_T < 0.1$ . En estos mismos ensayos de validación, el rango dinámico de las concentraciones de templado también se determinó. Finalmente, no existió diferencia en los valores del  $\Delta C_T$  entre las reacciones sencillas y las duplex.

## **F) Detección de la expresión de las proteínas insulina, calpaína-10, SNAP-25 y actina por medio de la técnica de Western blot en condiciones desnaturizantes**

### **F.1) Extracción y cuantificación de la proteína**

La proteína se extrae con buffer de lisis Ripa en presencia de inhibidores de proteasas (N-P40 1 %, desoxicolato de sodio 0.5 %, SDS 0.1 % EDTA 1 mM, azida de sodio 1 mM, Aprotinina 72.6 ng/ $\mu$ l, PMSF 319  $\mu$ g/ $\mu$ l, ortovanadato de sodio 3.2 mM y NaF 30 mM, disuelto en PBS) durante 45 minutos a 4°C. El homogenizado se centrifuga a 14000 rpm por 15 minutos a 4 °C [132]. La porción del sobrenadante se recupera y la concentración de proteína total se cuantifica por el método de Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad), utilizando albúmina sérica bovina (Bio-Rad) como estándar de concentración para la curva de referencia.



## F.2) Electroforesis, transferencia y bloqueo

Para detectar la expresión de las proteínas se calientan 20 µg de proteína total a 85°C por 5 minutos en solución amortiguadora de muestra para corrimiento (Tris 63 mM pH 6.8, glycerol 10.5 %, SDS 2 %, azul de bromofenol 0.05 % y 2-mercaptoetanol 5 %). Posteriormente las proteínas se separan en geles desnaturalizantes de bisacrilamida (15 % para insulina y SNAP-25 y 10 % para calpaína-10) y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. El bloqueo de la membrana se lleva a cabo con leche baja en grasa (Santa-Cruz) al 1.5 %. Posteriormente, la membrana se lava con TBS al 0.1 % de Tween20®.

## F.3) Inmunodetección

El inmunoblot se incuba con los anticuerpos primarios y secundarios de interés, diluidos en leche baja en grasa al 1 % (Tabla 4). Entre la incubación con el anticuerpo primario y el secundario, se hacen 2 lavados con TBS al 0.1 % de Tween20® y uno con TBS. Posteriormente, se lleva a cabo la inmunodetección de actina como proteína constitutiva y de control de cargado en la misma membrana.

**Tabla 4. Anticuerpos y condiciones utilizadas para la inmunodetección.**

| Proteína    | Anticuerpo primario (dilución)                          | Tiempo y temperatura de incubación | Anticuerpo secundario (dilución)                             | Tiempo y temperatura de incubación |
|-------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| insulina    | anti-insulina, aa 25-110 Santa Cruz H-86 (1:1000)       | toda la noche<br>4 °C              | anti-IgG conejo conjugado con peroxidasa Santa Cruz (1:3333) | 1 hora<br>37 ° C                   |
| calpaína-10 | anti-calpaína-10 d. catalítico, Cederlanes Lab (1:5000) | toda la noche<br>4 °C              | anti-IgG conejo conjugado con peroxidasa Santa Cruz (1:3333) | 1 hora<br>37 ° C                   |
| SNAP-25     | anti-SNAP25 NH2-terminal BD Bioscience (1:1000)         | toda la noche<br>4 °C              | anti-IgG ratón conjugado con peroxidasa Santa Cruz (1:3333)  | 1 hora<br>37 ° C                   |
| actina      | anti-actina Santa Cruz (1: 500)                         | 1 hora<br>37 ° C                   | anti-IgG cabra conjugado con peroxidasa Santa Cruz (1:2000)  | 1 hora<br>37 ° C                   |

## F.4) Revelado y semicuantificación

Las bandas se detectan por medio de quimioluminiscencia con los reactivos ECL (Amersham). La semicuantificación de las bandas se determina por densitometría óptica y se analizan con el software Quantity One versión 4.1.1 (Bio-Rad). Los valores obtenidos de las proteínas de

insulina, calpaín-10, ó SNAP-25 se dividen entre los valores de actina como gen de expresión constitutiva.

### **G) Calcio intracelular libre [218]**

Después de las 72 horas de exposición al arsenito, las células se incuban por media hora en solución KRB 5.6 mM de glucosa al 0.1 % de albúmina, más media hora de incubación con el indicador de calcio Fluo3AM/Pluronic F-127 (1:1, 4  $\mu$ M final:10 % final, respectivamente) en oscuridad y otra media hora en solución KRB suplementada para quitar el exceso del indicador. En placas negras de 96 pozos, se siembran  $1 \times 10^5$  células/pozo por triplicado para la condición basal y por triplicado para la condición estimulante de glucosa (5.6 y 15.6 mM respectivamente).

Posteriormente en fluorómetro de placa (Fluoroskan Ascent; Thermo Electron Corporation, Vantaa Finland) (Ex: 485 nm / Em: 538 nm) se lee la fluorescencia basal por 10 minutos ( $F_{\text{basal}}$ ). A un grupo de triplicados se les añade la glucosa como estímulo para alcanzar una concentración final en el medio de 15.6 mM y se lee la fluorescencia por otros 10 minutos ( $F$ ). Se añade Igepal 1 % para obtener la fluorescencia máxima ( $F_{\text{max}}$ ) y después EGTA 0.5 M para obtener la fluorescencia mínima ( $F_{\text{min}}$ ). En cada uno de estos dos casos las células se incuban por un periodo de 2 minutos seguidos de las lecturas de fluorescencia en intervalos de 10 segundos por un minuto y cuarenta segundos en total. Todas las reacciones se llevan a cabo a 37°C y por medio de la siguiente fórmula se obtiene la concentración de calcio intracelular libre.

$$[\text{Ca}^{2+} \text{ intracelular libre}] = F_{\text{basal}} - (K_d \times ((F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)))$$

$K_d = 390 \text{ nM}$  para Fluo3

### **H) Actividad de calpaínas**

Una vez que las células RINm5F se exponen al arsenito de sodio por 72 horas, se cambian a medio KRB bajo en glucosa (5.6 mM) por 30 minutos. Las células se recuperan, se lavan y resuspenden junto con el sustrato específico para calpaínas Boc-Lec-Met-CMAC (10  $\mu$ M) (Molecular Diagnostics) en medio KRB en concentración basal y estimulante de glucosa (5.6 y 15.6 mM, respectivamente). Para el caso de los linfocitos, una vez que fueron aislados de

sangre se resuspenden en solución KRB en presencia del sustrato bajo las mismas condiciones que las células RINm5F.

Por medio de fluorometría en placa (Fluoroskan Ascent; Thermo Electron Corporation, Vantaa Finland) se monitorea la cinética de fluorescencia del sustrato proteolisado en 100 mil células (Ex:355 nm, Em: 460 nm) cada minuto por 1 hora modificado de [80, 81]. A partir de los datos de unidades arbitrarias de fluorescencia recabadas durante la cinética se obtiene la pendiente (minuto 40-60).

### **I) Análisis del ciclo celular por citofluorometría de flujo**

Después de las 72 horas de exposición al arsenito de sodio, las células se recuperan por tripzinización, se lavan y se fijan con etanol frío al 75 %. Posteriormente, se tratan con RNasa y se tiñen con ioduro de propidio (ioduro de propidio 0.025 mg/ml, Tritón X-100 1:1000 v/v y RNasa 0.2 mg/ml, en PBS) por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad [219]. El ciclo celular se analiza por citofluorometría de flujo (Guava PCA System). La integración del área bajo la curva para cada una de las fases del histograma se realiza por medio del software MultiCycle (Phoenix flow systems).

### **J) Índice Mitótico y de Replicación**

Durante las 72 horas de exposición al arsenito de sodio, las células se incuban con 5-bromo-2-deoxiuridina ( $3.24 \times 10^{-5}$  M) y a las 48 horas de exposición se añade el colcemid (0.16  $\mu$ g/ml) para inhibir la citocinesis. Una vez transcurridas las 72 horas, las células se incuban (37 °C 5 % CO<sub>2</sub>) por 30 minutos en solución hipotónica (KCl 0.075 M) para romper membranas celulares. Posteriormente, se fijan con metanol/ácido acético (3:1) y se elaboran las laminillas.

Para la tinción, las laminillas se incuban en Hoescht ( $1 \times 10^{-3}$  mg/ml) por 30 minutos, seguidas de exposición a luz negra (105 min) para su fijación y posterior tinción con Azul de metileno al 2 %. Para determinar el índice mitótico se divide el número de metafases encontradas en 2,000 núcleos. El índice de replicación se obtiene contando el número de divisiones celulares en base al patrón de incorporación del Hoescht [220] en 100-200 metafases, y se calcula mediante la siguiente fórmula [221]:

$$IR = \frac{(1 \times \text{metafases en } 1^{\text{era}} \text{ división}) + (2 \times \text{metafases en } 2^{\text{nda}} \text{ división}) + (3 \times \text{metafases en } 3^{\text{era}} \text{ división})}{\text{Total de metafases analizadas}}$$

## **K) Estudios en humanos**

### **K.1) Estudio Piloto en la Comarca Lagunera**

#### **K.1.1) Diseño y estrategia experimental**

Los casos (individuos con diabetes tipo 2 previamente diagnosticados según los criterios de la ADA) [22] y los controles (sujetos sin la enfermedad) ambos grupos con distintos grados de exposición, fueron reclutados de las siguientes localidades pertenecientes a los municipios de Matamoros y Francisco I. Madero del estado de Coahuila: Granada, Hidalgo, Porvenir, Purísima y San Salvador.

Los donadores fueron seleccionados de una base de datos de la región, previamente elaborada [112]. El número de la muestra fue por conveniencia y los criterios de selección de los donadores fueron hombres y mujeres de 35-65 años, con 10 ó más años de residencia en la zona de estudio, pareados por edad, sexo, comunidad y concentración de arsénico total en la orina cuantificado previamente en el estudio anterior [112].

El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. A cada individuo se le informó sobre el procedimiento a seguir firmando así una carta de consentimiento informado y se le aplicó un cuestionario. Los donadores con tratamiento con insulina o con alguna enfermedad concomitante (como cáncer, hipertensión y hepatitis) fueron excluidos del estudio. De cada donador se obtuvieron los siguientes valores antropométricos, clínicos y de laboratorio, estos últimos con un ayuno mínimo de 8 horas: edad, sexo, talla, peso, circunferencia de cintura, tensión arterial, glucosa, colesterol total, LDL, HDL, triglicéridos, lípidos, insulina y glucagon en sangre y las concentraciones de arsénico total en el agua que beben, así como el arsénico total y sus especies en orina. El índice de masa corporal (IMC) y la presión arterial media (PAM) se calculan con las siguientes formulas, respectivamente:

$IMC = \text{peso}/\text{talla}^2 \text{ (kg/m}^2\text{)}$  y  $PAM = p. \text{ diastólica} + 1/3 (p. \text{ sistólica} - p. \text{ diastólica}) \text{ (mmHg)}$

El trabajo de selección de los donadores y el trabajo de campo (visita a los donadores y toma de muestra) previamente descrito, fue realizado por la Médico Cirujana Laura Cruz, con ayuda del Dr. Arturo Cebrián.

### **K.1.2) Determinación de la concentración de glucosa, insulina, glucagon y perfil lipídico en suero en ayuno**

Las concentraciones de glucosa, lípidos totales, triglicéridos, colesterol total, y colesterol -LDL y -HDL en suero fueron realizadas por el laboratorio de la Dra. Susana Bassol en el departamento de Biología de la Reproducción en la Universidad Autónoma de Torreón. Las determinaciones fueron realizadas a través de kits comerciales (Randox Laboratorios LTD), utilizando un espectrofotómetro Junior modelo 35 (Perkin Elmer), mientras que las concentraciones de insulina en sangre se determinaron por la prueba de ELISA (Monobind, Inc) con un equipo Dynatech MR5000.

Las concentraciones de glucagon fueron determinadas por el laboratorio químico Interlab (Torreón, Coahuila).

El día que las muestras de sangre y de orina fueron tomadas, se realizó una medición de glucosa con glucómetro (Accu-Chek, Roche) como incentivo para los donadores. Posteriormente los resultados de laboratorio (glucosa, colesterol total, LDL, HDL, triglicéridos, lípidos) fueron entregados a los donadores.

### **K.1.3) Determinación de la concentración de arsénico en orina y agua de bebida**

Las orinas y las aguas de bebida fueron recolectadas en frascos de polipropileno y almacenadas a -80°C hasta su análisis en “The Analytical Section of the Hazard Identification Core” (Dr. Jay Gandolfi) de la Universidad de Arizona (Tucson, Az) por Michael Kopplin. La separación de las especies de arsénico en orina ( $As^V$ ,  $As^{III}$ ,  $MMA^V$ ,  $DMA^V$  y arsenobetaína) se llevó a cabo por HPLC fase reversa. Las concentraciones de arsénico inorgánico ( $\mu g/l$  ó  $ppb$ ) en el agua de bebida proporcionada por los donadores y las concentraciones de arsénico total y de sus especies en la orina de los mismos fueron analizadas por el método de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP/MS) [222].

Las proporciones de cada especie en orina se obtienen dividiendo la concentración de cada una de las especie ( $As^V$ ,  $As^{III}$ ,  $MMA^V$ ,  $DMA^V$ ) entre la concentración total del arsénico en la orina, por 100.

El cálculo de la eficiencia del metabolismo del arsénico (Figura 7) se obtiene a partir de las siguientes fórmulas [110]:

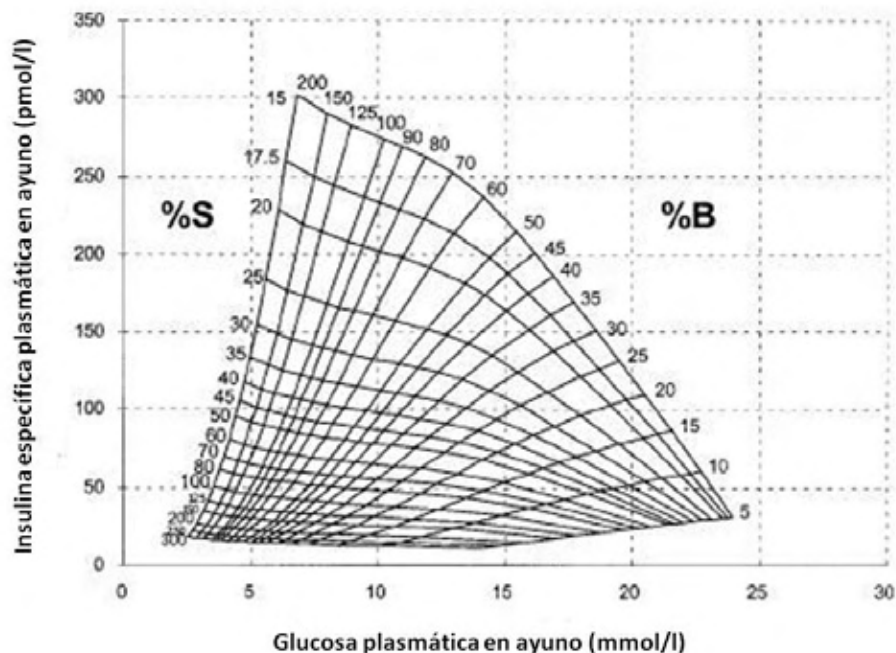
$$\text{Primera metilación} = MMA^V / (As^V + As^{III})$$

$$\text{Segunda metilación} = DMA^V / MMA^V$$

$$\text{Metilación total} = (MMA^V + DMA^V) / (As^V + As^{III})$$

#### K.1.4) Funcionalidad de células $\beta$ y sensibilidad a la insulina (%)

Los valores del porcentaje de funcionalidad de las células  $\beta$  y el porcentaje de sensibilidad a la insulina, se obtienen mediante los valores de glucosa e insulina en ayuno utilizando el software HOMA2 (homeostatic model assesment) Calculador V2.2 realizado por la Universidad de Oxford (<http://www.dtu.ox.ac.uk>) El modelo de HOMA2 es un modelo estructural computacional del sistema de retroalimentación de la glucosa-insulina en un estado estable (ayuno por la noche). El modelo consiste en un número de ecuaciones empíricas no lineares las cuales describen las funciones de los órganos y los tejidos involucrados en la regulación de la glucosa, y permite inferir el porcentaje de funcionalidad de las células  $\beta$  (%B), en particular la secreción de insulina, y el porcentaje de sensibilidad a la insulina (%S) (Figura 8). La exactitud y la precisión de este método se han comparado con los métodos de pinzamiento euglicémico-hiperinsulinémico y con la curva de tolerancia a la glucosa, con altos grados de correlación, incluso en pacientes que toman secretagogos [223-226].



**Figura 8.** Modelo matemático del porcentaje de funcionalidad de las células  $\beta$  y la sensibilidad a la insulina en función de las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno (HOMA2) Adaptada de Wallace et al, 2004 [225]

## **K.1.5) Polimorfismos en el gen de calpaína-10**

### **K.1.5.1) Extracción de DNA**

El DNA se extrae utilizando el kit “QIAamp DNA MINI kit” (Quiagen). Un ml de sangre fresca se centrifuga a 2500 g por 10 minutos a temperatura ambiente. De las 3 fases que se forman (plasma, fracción leucocitaria y eritrocitos) se toma la fase intermedia la cual se encuentra enriquecida de células nucleares, a partir de la cual se extrae el DNA siguiendo el protocolo provisto.

### **K.1.5.2) Determinación de los polimorfismos**

Los polimorfismos se analizaron por el laboratorio del Dr. Walter Klimecki en la Universidad de Arizona (Tucson, Az). Los SNPs 43 (nucleótido 4852, G/A) y 44 (nucleótido 4841, T/C) se determinaron por el método de sonda Taqman (Applied Biosystems), el polimorfismo Indel 19 (nucleótido 5415, 2/3 repeticiones de 32 pb) por amplificación de productos por PCR y corrimiento en gel de agarosa para la determinación de los tamaño de los productos [52] y el SNP 63 (nucleótido 16378, C/T) por secuenciación directa.

El haplotipo para los SNPs 43-19-63 se reconstruyó por medio del programa PHASE versión 2.1.1 [227, 228].

## **K.2) Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, SSA**

Los casos (individuos con diabetes tipo 2 previamente diagnosticados según los criterios de la ADA) [22] y los controles fueron reclutados del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” de la Secretaria de Salud. El comité de ética del Hospital aprobó el protocolo de investigación. Todos los individuos firmaron una carta de consentimiento informado y se les aplicó un breve cuestionario. Donadores con tratamiento con insulina o con alguna enfermedad concomitante (como cáncer y hepatitis) fueron excluidos del estudio. De cada donador se obtuvieron valores clínicos, de laboratorio y antropométricos (edad, sexo, talla, peso, circunferencia de cintura, tensión arterial y glucosa en sangre). El índice de masa corporal (IMC) y la presión arterial media (PAM) se calculan con las formulas previamente mencionadas.

Se obtuvo sangre total periférica de los donadores en ayuno (8 horas mínimo) y la determinación de la glucosa en sangre se llevó a cabo en el mismo Hospital centrifugando las muestras de sangre a 3000 rpm por 10 minutos para la obtención del suero. La concentración de glucosa se determina por el método de la glucosa oxidasa utilizando un autoanalizador Synchron LX20 (Beckman Coulter).

## **N) Análisis Estadísticos**

Los datos experimentales de las células  $\beta$  y de los linfocitos se expresan como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). Los datos clínicos de los donadores del Hospital Gea González se expresan como la media  $\pm$  DE, mientras que para el estudio piloto en la Comarca Lagunera se muestra la media, DE, mediana, y los percentiles 25 y 75.

En cada una de las figuras se muestra el número de experimentos independientes realizados (n) así como la prueba estadística utilizada (Statview 4.57 para los cultivos primarios de células  $\beta$ , GraphPad Prism 4 para la línea celular y linfocitos humanos y STATA 9.2 y GraphPad Prism 5 para los donadores de la Comarca Lagunera).

Para la fase *in vitro* y el estudio en humanos del Hospital Gea González, la normalidad de los datos se verificó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y en caso de obtención de un valor de  $p < 0.05$  se utilizó una prueba estadística no paramétrica (GraphPad Prism 4, Analyse-it, Excel).

El análisis estadístico de la fase *in vitro* se realizó mediante la prueba de análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). Posteriormente, se aplicó en la mayoría de los casos la prueba post hoc de Bonferroni, comparando únicamente las condiciones biológicamente relevantes. Cuando alguna de las variables presentó una distribución no normal, se aplicó la prueba no paramétrica análoga a la ANOVA denominada Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post hoc de Dunn.

El análisis del estudio piloto de la Comarca Lagunera se realizó utilizando el programa STATA 9.2 con la ayuda y colaboración del M. Raúl Ulises Hernández Ramírez y la Dra. Lizbeth López Carillo del Centro de Investigación en Salud Poblacional del Instituto Nacional de Salud Pública (Cuernavaca, Morelos). La normalidad de las variables dependientes se verificó por la prueba de sesgo y curtosis (STATA 9.2) con la verificación de la prueba de Kolmogorov-Smirnov (GraphPad Prism 5). La comparación entre los dos grupos de estudio para los parámetros antropométricos, clínicos, de laboratorio, así como para las concentraciones de arsénico en agua de bebida y en orina, se realizan mediante la prueba de t no pareada, usando en algunos casos la corrección de Welch debido a diferencias en las varianzas, o bien por la prueba no paramétrica de Mann Whitney para valores no normales (GraphPad Prism 5). Para cada grupo de donadores se analiza la frecuencia de los polimorfismos y se calcula el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p \chi^2$ , STATA 9.2).

Los análisis univariados de regresión lineal y no lineal (dependiendo del tipo de distribución de los datos) se llevaron a cabo para conocer la relación existente entre: el consumo y la excreción de arsénico; la excreción de arsénico en orina y la funcionalidad de células  $\beta$ ; la excreción de



orina y la sensibilidad a la insulina; y la funcionalidad de células  $\beta$  y el genotipo en calpaína-10 (con la creación de variables ficticias para cada genotipo). Varias de las asociaciones se evaluaron con análisis multivariados tomando en cuenta covariables que pudieran influir (edad, sexo e IMC) (GraphPad Prism 5 & STATA 9.2).

En todos los casos un valor de p menor a 0.05 de dos colas es considerado estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

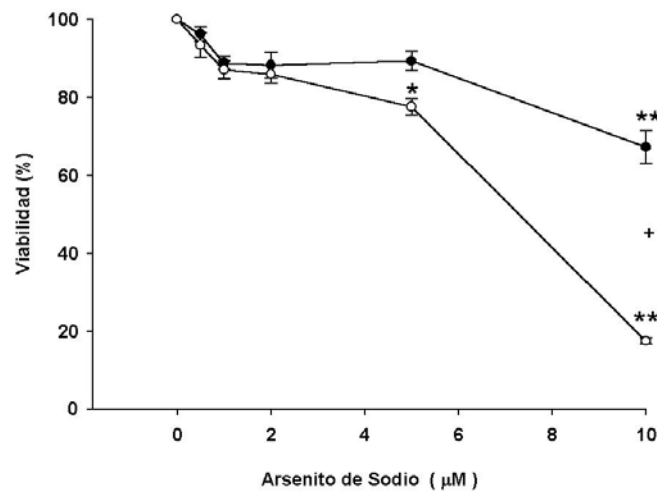
### Células $\beta$ pancreáticas

#### *A) Cultivos primarios de células $\beta$ de rata adulta. Anexo I [229]*

##### **A.1) Índice de viabilidad celular**

En la Figura 9 se muestra el índice de viabilidad de las células  $\beta$ , expuestas a diferentes dosis de arsenito de sodio (0, 0.5, 1, 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) durante 72 y 144 horas. Dosis  $\leq$  a 5  $\mu\text{M}$  por 72 horas no redujeron la viabilidad celular de manera significativa, mientras que con dosis mayores (10  $\mu\text{M}$ ) la viabilidad disminuye hasta un 67 %. Con una exposición de 144 horas, la viabilidad disminuye a 77 % en presencia de 5  $\mu\text{M}$ , seguida de una considerable caída a 17 % con la dosis de 10  $\mu\text{M}$ . Los efectos en la viabilidad celular entre los dos tiempos de exposición (72 y 144 horas) con esta última dosis fue estadísticamente significativa.

Considerando los efectos en la viabilidad, el resto de los experimentos en los cultivos primarios de células  $\beta$  se llevaron a cabo utilizando las dosis de arsenito de 1 y 5  $\mu\text{M}$ .



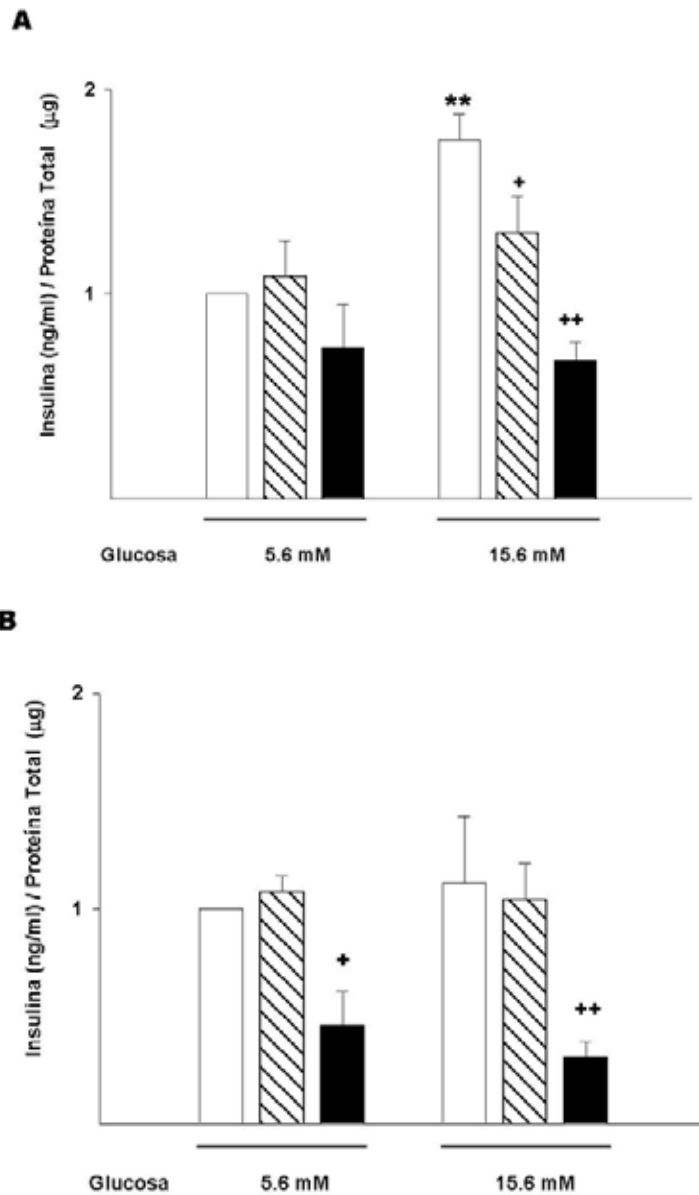
**Figura 9. Índice de viabilidad celular.** Cultivos primarios de células  $\beta$  pancreáticas de rata expuestas a arsenito de sodio (0, 0.5, 1, 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas (círculos negros) y por 144 horas (círculos blancos). Media  $\pm$  SEM, n = 3 por duplicado, normalizado a las condiciones control (100 %), ANOVA-Scheffé, \* p < 0.01, \*\* p < 0.001 vs cada control, respectivamente y + p < 0.001 entre los dos periodos.

## **A.2) Secreción de insulina basal y estimulada por glucosa**

Una vez que las células fueron expuestas a arsenito de sodio (1 y 5  $\mu\text{M}$ ) por 72 y 144 horas, se evaluó la secreción de insulina por una hora en concentración basal y estimulante de glucosa (5.6 mM y 15.6 mM, respectivamente). Como se muestra en la Figura 10A, la secreción basal de insulina no se modifica por la exposición previa al arsenito durante 72 horas, sin embargo, la secreción estimulada por glucosa disminuyó de manera dependiente de la dosis. Con 1  $\mu\text{M}$  disminuye un 26 % mientras que con 5  $\mu\text{M}$  se reduce un 62 %. De tal modo que las células expuestas a arsenito pierden su capacidad para distinguir entre diferentes concentraciones de glucosa extracelular, secretando así la misma cantidad de insulina independientemente del estímulo con glucosa.

Después de 144 horas en cultivo, las células control secretan cantidades similares de insulina en respuesta a las dos concentraciones de glucosa. Los efectos con 1  $\mu\text{M}$  de arsenito tanto en secreción basal como estimulada por glucosa no se modifican con el aumento en el tiempo de exposición, sin embargo cuando las células son cultivadas con 5  $\mu\text{M}$  durante 144 horas, tanto la secreción basal como la estimulada disminuyen significativamente (54 y 72 %) a comparación de sus controles respectivos (Figura 10B).

Con una extensión de tiempo en el tratamiento (de 72 a 144 horas), la secreción basal de insulina en células expuestas a 5  $\mu\text{M}$  de arsenito se reduce un 38 %, mientras que la reducción en la secreción de insulina estimulada por glucosa es de 54 %.

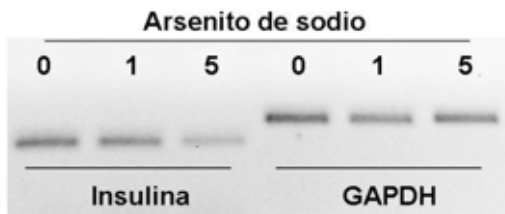


**Figura 10. Secreción de insulina en concentración basal y estimulante de glucosa (5.6 y 15.6 mM, respectivamente).** Cultivos primarios de células  $\beta$  pancreáticas de rata expuestas a arsenito de sodio: control (barra blanca), 1  $\mu$ M (barra rayada) y 5  $\mu$ M (barra negra) por 72 horas (panel A) y por 144 horas (panel B). Media  $\pm$  SEM, n = 5 ó 4 (72 y 144, respectivamente), normalizado a las condiciones control en 5.6 mM de glucosa (1 ng/ml de inulina /  $\mu$ g de proteína total), ANOVA-Fisher, + p < 0.05, ++ p < 0.01 vs cada control respectivamente ó \*\* p < 0.01 entre diferente concentración de glucosa para cada tratamiento de arsenito.

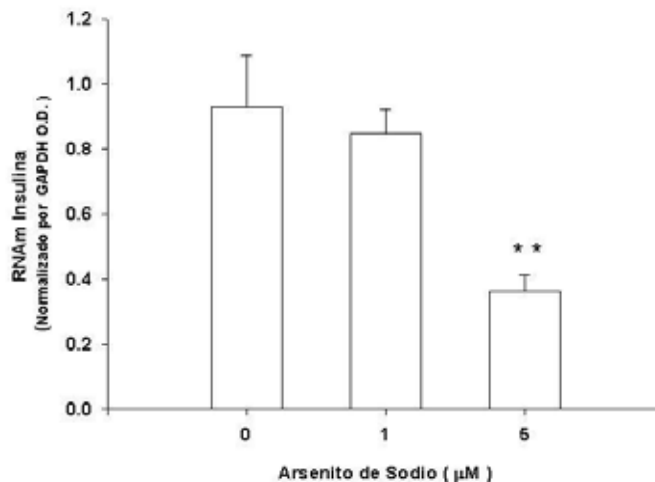
### A.3) Expresión de RNAm de insulina

Con el objetivo de determinar si la reducción en la secreción de insulina se debe a una disminución en la síntesis de la hormona, se evaluó la expresión del RNAm de insulina. En la Figura 11 se muestra que sólo la concentración de 5  $\mu\text{M}$  disminuye un 61 % el RNAm de insulina, mientras que con 1  $\mu\text{M}$  no se observan cambios. De tal manera que los datos sugieren que con 1  $\mu\text{M}$ , el efecto del arsenito sobre la secreción no se puede atribuir a una disminución en la síntesis de la hormona.

A)



B)



**Figura 11. RNAm de insulina.** Cultivos primarios de células  $\beta$  pancreáticas de rata expuestas a arsenito de sodio (0, 1 y 5  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. A) Experimento representativo de los productos de RT-PCR de insulina y de GAPDH. B) Cuantificación densitométrica del RNAm de insulina normalizado por el gen de expresión endógena GAPDH. Media  $\pm$  SEM, n = 4, ANOVA- Scheffé, \*\* p < 0.01

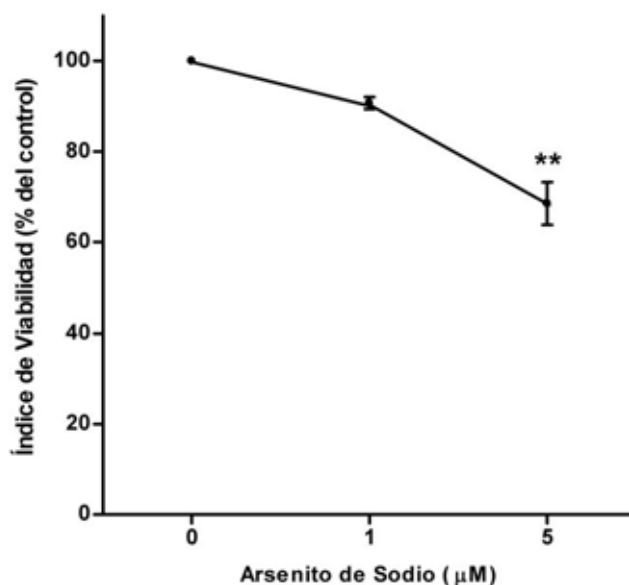
Los siguientes experimentos para caracterizar los efectos del arsenito sobre las células  $\beta$  se hicieron en una línea celular de insulinoma de rata ya que una de las limitantes de los cultivos primarios de células  $\beta$  es el bajo número de células que se obtienen de los islotes pancreáticos de rata.

## B) Línea celular de insulinoma de rata *RINm5F* Anexo II [230]

La línea celular de insulinoma de rata, *RINm5F*, se expuso al arsenito de sodio durante 72 horas, observándose los siguientes resultados.

### B.1) Índice de viabilidad celular

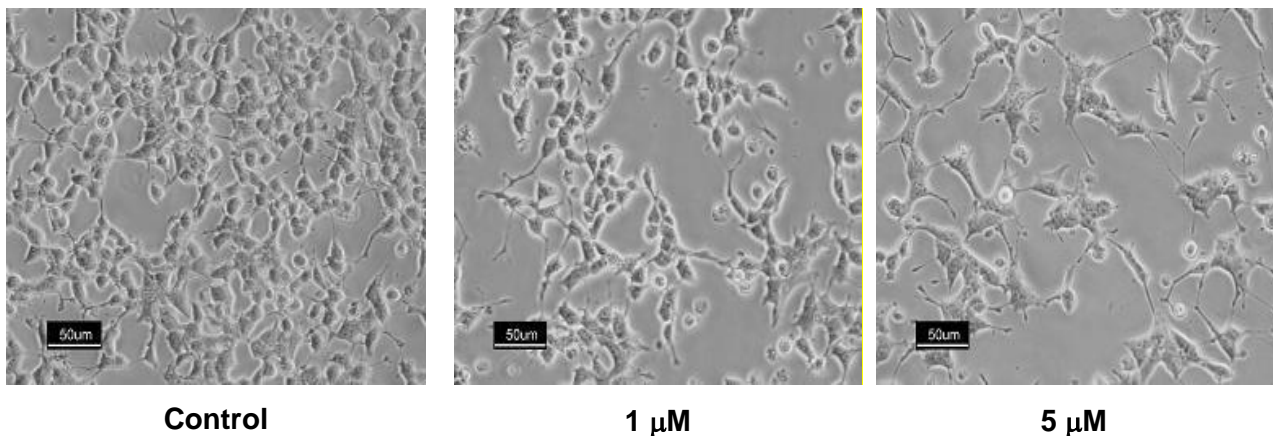
Las dosis utilizadas para determinar el índice de viabilidad celular se establecieron con base en los resultados globales obtenidos de los cultivos primarios (1 y 5  $\mu\text{M}$ ). Como se muestra en la Figura 12, la disminución al 67 % en el índice de viabilidad con la dosis de 5  $\mu\text{M}$  fue estadísticamente significativa.



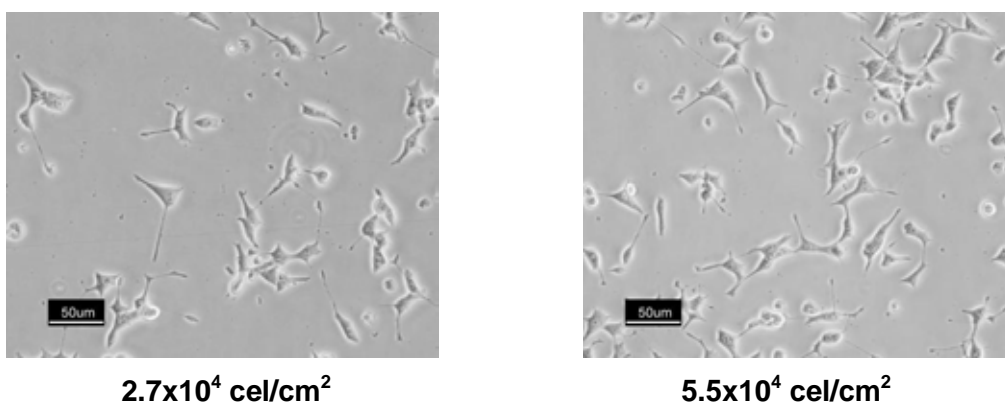
**Figura 12. Índice de viabilidad celular.** Células *RINm5F* expuestas a arsenito de sodio (0, 1 y 5  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. Media  $\pm$  SEM, n = 4, normalizado a las condiciones control (100 %), ANOVA-Bonferroni, \*\*  $p < 0.001$

Al apreciar las células al microscopio una vez expuestas a dicha dosis de arsenito, el porcentaje de confluencia observado no correspondía con los datos obtenidos por medio del índice de viabilidad celular. Al parecer el porcentaje de células vivas con la dosis de 5  $\mu\text{M}$ , era mucho menor al 67 %. Incluso es importante mencionar que las células presentaban cambios en la morfología, haciéndose más planas y alargadas y con aumento en el número de procesos

similares a las neuritas (Figura 13). Con el fin de esclarecer si estos cambios en la morfología se debían a la exposición al arsenito o bien simplemente a la baja densidad celular alcanzada, se realizaron cultivos con baja densidad celular, igualando la confluencia observada con la dosis de 5  $\mu\text{M}$  ( $2.7 \times 10^4$  y  $5.5 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ ). Como se observa en la Figura 14, en ausencia de arsenito, aún con un número bajo de células, la morfología no se ve alterada como ocurre en presencia del arsenito.



**Figura 13. Morfología celular.** Células RINm5F expuestas a arsenito de sodio (0, 1 y 5  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. Microscopio Nikon Eclipse TE2000-U. Software ACT-1 versión 2. Sensibilidad normal, alta resolución, 12 seg, lente 20X. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .



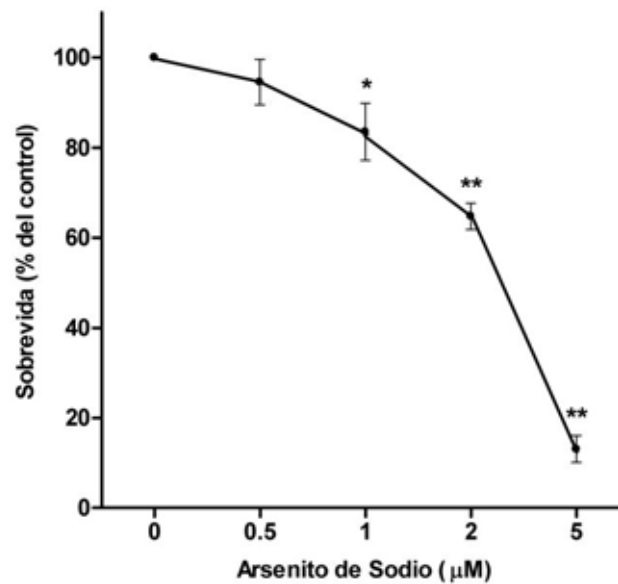
**Figura 14. Densidad celular.** Células RINm5F. Densidad celular de  $2.7 \times 10^4$  y  $5.5 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ . Microscopio Nikon Eclipse TE2000-U. Software ACT-1 versión 2. Sensibilidad normal, alta resolución, 12 seg, lente 20X. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

La discrepancia entre la confluencia observada al microscopio y los datos obtenidos al evaluar el índice de viabilidad celular, podrían ser el resultado de una cuestión técnica. Con tiempos prolongados de exposición, el número de células muertas se puede subestimar, ya que los restos celulares de aquellas células que murieron al inicio o mediados del tratamiento, desaparecen al término de este. Si bien, el método utilizado para evaluar la viabilidad refleja el índice de células vivas/muertas de una muestra tomada (las células muertas que se evalúan sólo son aquellas que aún no han desaparecido), no toma en cuenta el número total de células vivas para ser comparadas contra el control. Por tales motivos, se realizó una modificación a la técnica con el objetivo de evaluar la sobrevivencia tomando en cuenta el total de las células vivas y comparándolas contra el control (ver la metodología).



## B.2) Sobrevida celular

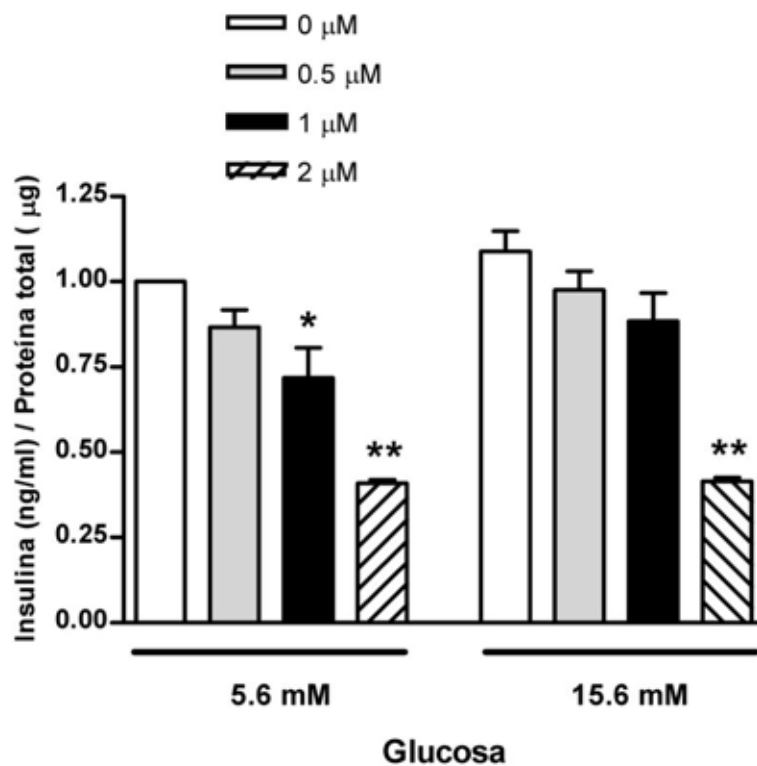
En la Figura 15 se muestran los resultados de sobrevida después de 72 horas de exposición a distintas concentraciones de arsenito de sodio (0, 0.5, 1, 2 y 5  $\mu\text{M}$ ). En este caso a partir de 1  $\mu\text{M}$  la disminución fue estadísticamente significativa, con un porcentaje de células vivas de 83, 64 y 13 % con las dosis de 1, 2 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Los resultados obtenidos con la modificación de la técnica concuerdan mejor con las observaciones al microscopio. A partir de estos resultados se decidió que la dosis de 5  $\mu\text{M}$ , por ser altamente citotóxica, sólo se utilizaría para aquellos experimentos relacionados con proliferación (ver ciclo celular e índices mitóticos y de replicación), mientras que para los experimentos relacionados con el mecanismo de secreción de insulina las dosis utilizadas serán las de 0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ .



**Figura 15. Sobrevida celular.** Células RINm5F expuestas a arsenito de sodio (0, 0.5, 1, 2 y 5  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. Media  $\pm$  SEM, n = 5, normalizado a las condiciones control (100 %), ANOVA-Bonferroni, \* p < 0.05, \*\* p < 0.001

### B.3) Secreción de insulina basal y estimulada por glucosa

Al igual que en los cultivos primarios de células  $\beta$ , con 72 horas de exposición al arsenito la secreción de insulina después de dicho tratamiento se altera. Tal y como ocurrió con las células  $\beta$  cultivadas por 144 horas, en condiciones control la secreción de insulina en ambas concentraciones de glucosa fue similar, sin embargo el arsenito disminuye dicha secreción. En la concentración de 5.6 mM de glucosa extracelular, las dosis de 1 y 2  $\mu\text{M}$  de arsenito de sodio reducen la secreción de la hormona estadísticamente, mientras que en la concentración estimulante de glucosa (15.6 mM), sólo se observa el efecto con la dosis de 2  $\mu\text{M}$  (Figura 16).



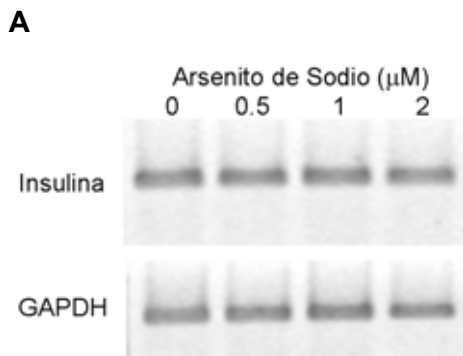
**Figura 16. Secreción de insulina en concentración basal y estimulante de glucosa (5.6 y 15.6 mM, respectivamente).** Células RINm5F expuestas a arsenito de sodio por 72 horas: control (barra blanca), 0.5  $\mu\text{M}$  (barra gris), 1  $\mu\text{M}$  (barra negra) y 2  $\mu\text{M}$  (barra rayada). Secreción en concentración basal y estimulante de glucosa (5.6 y 15.6 mM, respectivamente). Media  $\pm$  SEM, n = 4, normalizado a las condiciones control en 5.6 mM de glucosa (1 ng/ml de inulina /  $\mu\text{g}$  de proteína total), ANOVA-Bonferroni, \* p < 0.05, \*\* p < 0.001 vs cada control (sin arsenito), respectivamente.

## B.4) Síntesis de Insulina

Nuevamente, con el objetivo de saber si el efecto del arsenito sobre la secreción de insulina se debe a cambios en la síntesis de la hormona, se evaluó el contenido de RNAm como el contenido proteico intracelular de insulina.

### B.4.1) Expresión del RNAm de insulina

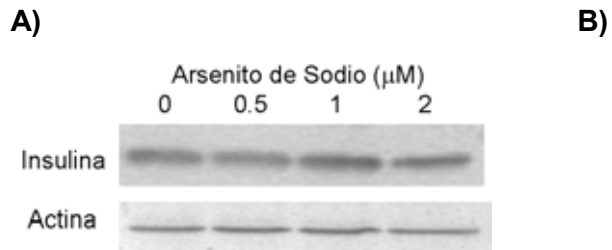
Como se muestra en la Figura 17, el contenido del RNAm de insulina en la línea celular no se modifica por la exposición al arsenito por 72 horas.



**Figura 17. RNAm de insulina.** Células RINm5F expuestas a arsenito de sodio (0, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. A) Experimento representativo de los productos de RT-PCR de insulina y de GAPDH. B) Cuantificación densitométrica del RNAm de insulina normalizado por el gen de expresión endógena GAPDH. Media  $\pm$  SEM, n = 4, normalizado a las condiciones del control (1 D.O.), ANOVA-Bonferroni.

#### B.4.2) Expresión intracelular de la proteína insulina

Al igual que con el RNAm, el arsenito no altera el contenido de insulina intracelular, como se observa en la Figura 18.

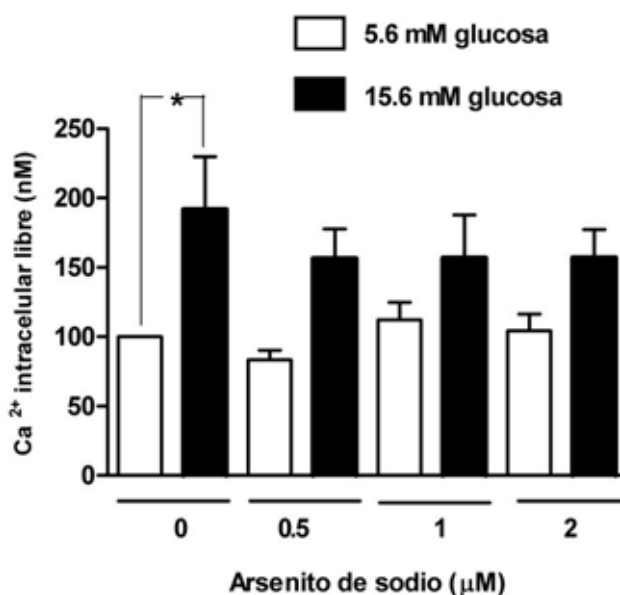


**Figura 18. Proteína insulina intracelular.** Células RINm5F expuestas a arsenito de sodio (0, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. A) Experimento representativo de Western blot de insulina y actina. B) Cuantificación densitométrica de la proteína insulina normalizado por la proteína de expresión endógena actina. Media  $\pm$  SEM, n = 4, ANOVA-Bonferroni.

### B.5) Cambios en la concentración de calcio intracelular

Dado que ciertas concentraciones de arsenito disminuyen la secreción de insulina, y esta reducción no se atribuye a alteraciones en la síntesis de la hormona (tanto a nivel de RNA como de proteína), el siguiente paso fue evaluar parámetros involucrados en el acoplamiento entre la estimulación con glucosa y la secreción de insulina. Uno de los eventos cruciales de dicho acoplamiento es el aumento en la concentración de calcio intracelular. De hecho, se ha reportado previamente que el arsénico altera la concentración de calcio intracelular libre en linfocitos estimulados y sin estimular [131] así como las corrientes de calcio cardíacas [130].

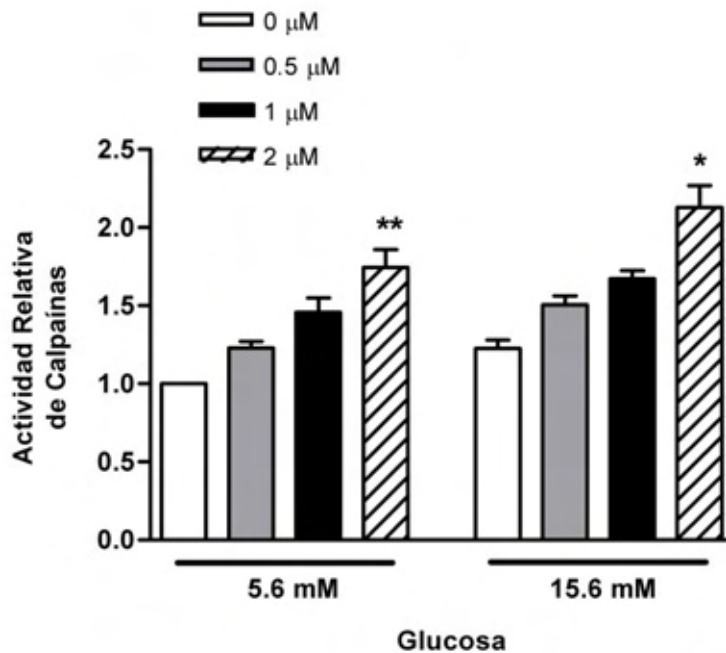
Una vez transcurrida la exposición a arsenito, ante un estímulo con glucosa (5.6 mM como control y 15.6 mM como condición estimulante) se evaluó la concentración de calcio intracelular libre. Como se observa en la Figura 19, solamente en las condiciones control (0  $\mu$ M de arsenito) la concentración del ion libre es estadísticamente diferente entre la concentración basal y la estimulante de glucosa extracelular. Este hallazgo se puede traducir a que el arsenito ocasiona que la concentración de calcio intracelular no oscile lo suficiente ante los cambios en la concentración de glucosa extracelular.



**Figura 19. Calcio intracelular libre.** Células RINm5F expuestas a arsenito de sodio (0, 0.5, 1 y 2  $\mu$ M) por 72 horas. [Ca<sup>2+</sup> intracelular libre] en 5.6 mM de glucosa (barras blancas) y en 15.6 mM de glucosa (barras negras). Media  $\pm$  SEM, n = 4, normalizado a las condiciones control en 5.6 mM de glucosa (100 nM) ANOVA-Bonferroni, \* p < 0.05.

### B.6) Actividad de calpaínas

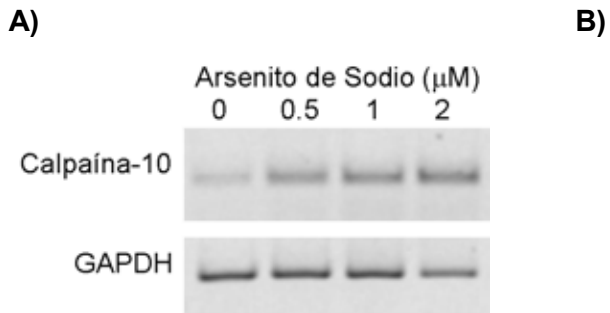
Ante la elevación de calcio, una de las consecuencias propuestas para que se secrete la insulina es la activación de las calpaínas. Al evaluar la actividad de estas proteasas en concentración extracelular de glucosa basal (5.6 mM) y estimulante (15.6 mM) después de 72 horas de exposición a arsenito, se observa que en ambas condiciones de glucosa, sólo la dosis de 2  $\mu$ M aumenta la actividad de las enzimas con respecto a su control respectivamente (Figura 20). Cabe mencionar que si bien el sustrato utilizado es específico para las calpaínas (y no para otro tipo de proteasas) no distingue entre los diferentes miembros que conforman a la familia.



**Figura 20. Actividad de calpaínas.** Células RINm5F expuestas a arsenito de sodio por 72 horas: control (barra blanca), 0.5  $\mu$ M (barra gris), 1  $\mu$ M (barra negra) y 2  $\mu$ M (barra rayada). Actividad de calpaínas en concentración basal y estimulante de glucosa (5.6 y 15.6 mM, respectivamente). Media  $\pm$  SEM, n = 4, normalizado a las condiciones control en 5.6 mM de glucosa (1 u.a.), Kruskal-Wallis-Dunn, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 vs cada control respectivamente.

### B.7) Expresión de RNAm de calpaína-10

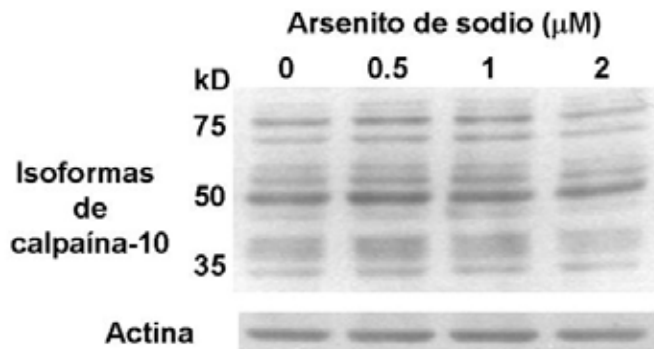
Una vez estudiados los efectos del arsenito sobre la actividad general de calpaínas, se evaluó la expresión del mensajero de calpaína-10, ya que como se mencionó con anterioridad, de la familia de las calpaínas es la que se ha visto particularmente involucrada en la secreción de insulina. Como se observa en la Figura 21, sólo la dosis de 2  $\mu\text{M}$ , al igual que en la actividad, aumenta la expresión del gen.



**Figura 21. Expresión de RNAm de calpaína-10.** Células RINm5F expuestas a arsenito de sodio (0, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. A) Experimento representativo de los productos de RT-PCR de calpaína-10 y de GAPDH. B) Cuantificación densitométrica del RNAm de insulina normalizado por el gen de expresión endógena GAPDH. Media  $\pm$  SEM, n = 4, Kruskal-Wallis-Dunn,\*\* p < 0.01 vs control.

### B.8) Expresión de la proteína calpaína-10

Al evaluar la expresión de la proteína calpaína-10 por medio de Western Blot, se identificaron varias bandas de distinto peso molecular, las cuales se piensa que corresponden a las isoformas que presenta la calpaína-10 por medio de splicing alternativo, siendo la de mayor expresión una cercana a los 50 KDa. El arsenito de sodio no alteró de manera significativa la expresión de la proteína, aunque existe una ligera tendencia de disminuir la expresión de algunas de las isoformas con la dosis de 2  $\mu\text{M}$  (Figura 22).



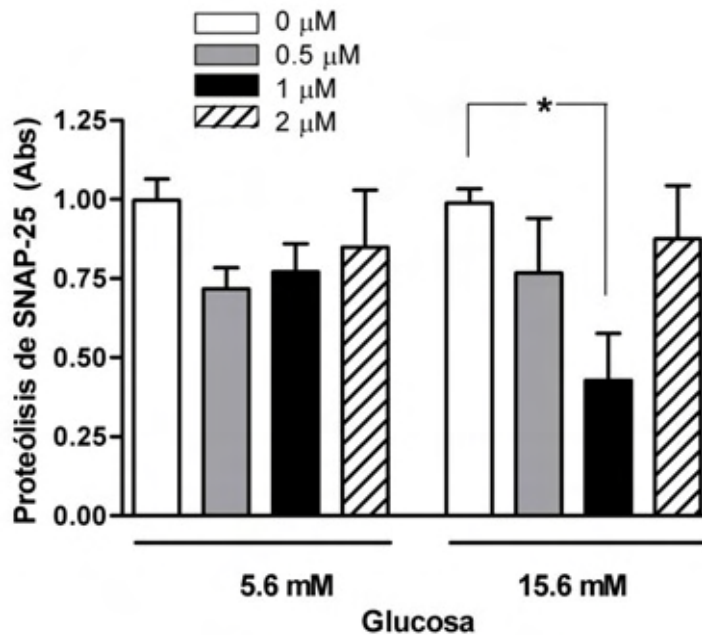
**Figura 22. Expresión de proteína calpaína-10.** Células RINm5F expuestas a arsenito de sodio (0, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. Experimento representativo de Western blot de calpaína-10 y actina.



### B.9) Proteólisis parcial de SNAP-25

Una manera de evaluar de manera indirecta la actividad de calpaína-10 es mediante la proteólisis parcial de SNAP-25 en la región amino terminal durante la secreción de insulina, como previamente se ha reportado utilizando la técnica de Western Blot. Sin embargo, por medio de este método resultó difícil apreciar los cambios, por lo que se utilizó el método de ELISA bajo el mismo principio.

En la Figura 23 se aprecia que al estimular a las células con glucosa (15.6 mM) por 2 horas después de la exposición a arsenito (1  $\mu$ M), ocurre un decremento en la proteólisis de SNAP-25. Tal y como ocurrió con la secreción de insulina, en condiciones control la proteólisis de SNAP-25 en ambas concentraciones de glucosa fue similar. Contrariamente, una estimulación con glucosa por un periodo de 30 minutos después de las 72 horas de exposición al arsenito no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, aunque cabe mencionar que la tendencia de los resultados fue la misma que con las 2 horas de estimulación con glucosa.



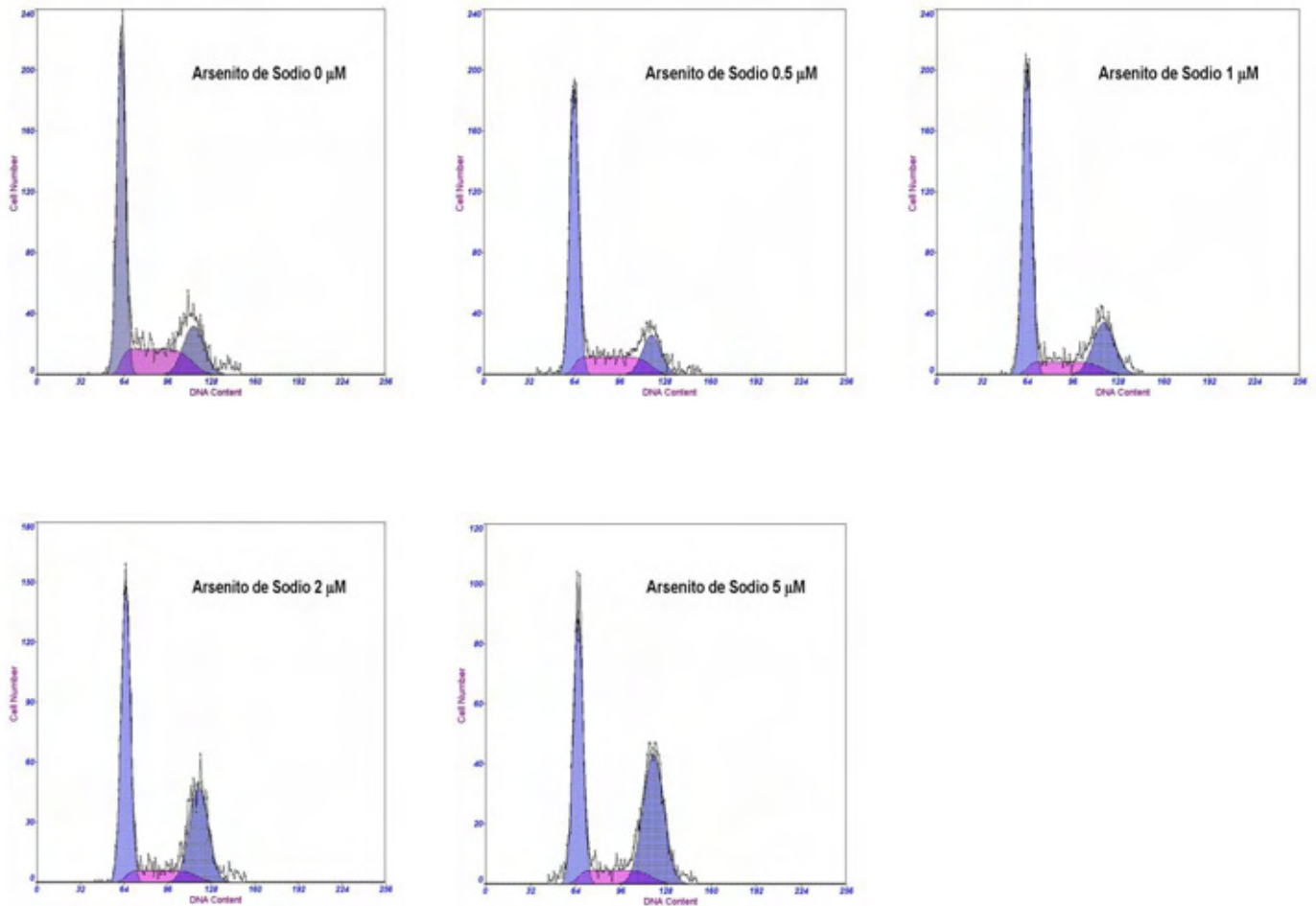
**Figura 23. Proteólisis parcial de SNAP-25.** Células RINm5F expuestas a arsenito de sodio por 72 horas: control (barra blanca), 0.5  $\mu$ M (barra gris), 1  $\mu$ M (barra negra) y 2  $\mu$ M (barra rayada). Proteólisis de SNAP-25 en concentración basal y estimulante de glucosa (5.6 y 15.6 mM, respectivamente). Media  $\pm$  SEM, n = 4, ANOVA-Bonferroni, \* p < 0.05.

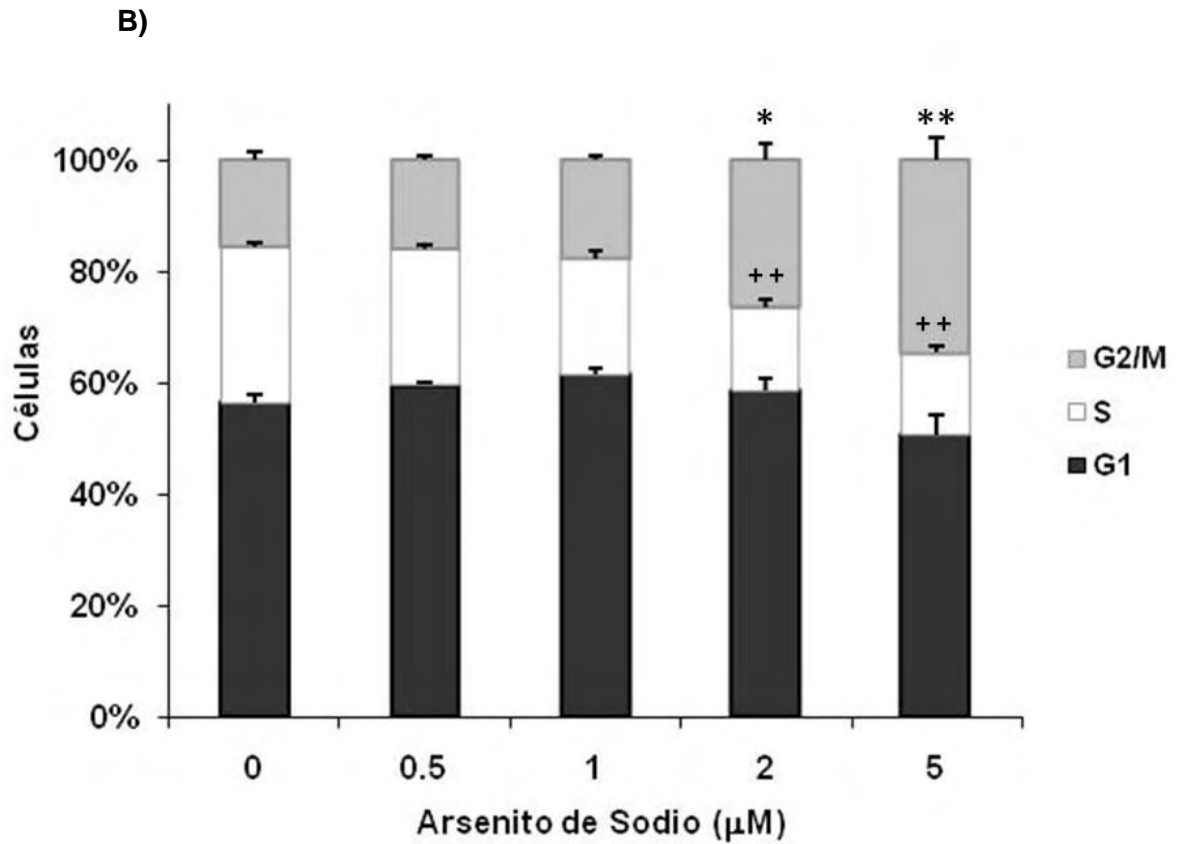
## B.10) Ciclo celular

En base a datos en la literatura que muestran que el arsenito es capaz de alterar la diferenciación de los adipocitos y considerando en conjunto los resultados obtenidos tanto en los experimentos de viabilidad y sobrevivencia, como en la observación morfológica, se decidió estudiar los efectos del arsenito sobre el ciclo celular. Como se muestra en la Figura 24A, el número de células en la fase G2/M aumenta a manera de dosis respuesta, mientras que el número de células en la fase S disminuye.

Al cuantificar los datos obtenidos en los histogramas, se observa que el porcentaje de células en la fase G2/M del ciclo celular aumenta significativamente con las dosis de 2 y 5  $\mu\text{M}$ , mientras que el % de células en la fase S disminuye con las mismas dosis de arsenito (Figura 24B). Estos resultados se pueden interpretar como un arresto celular en el punto de monitoreo de G2/M.

A)

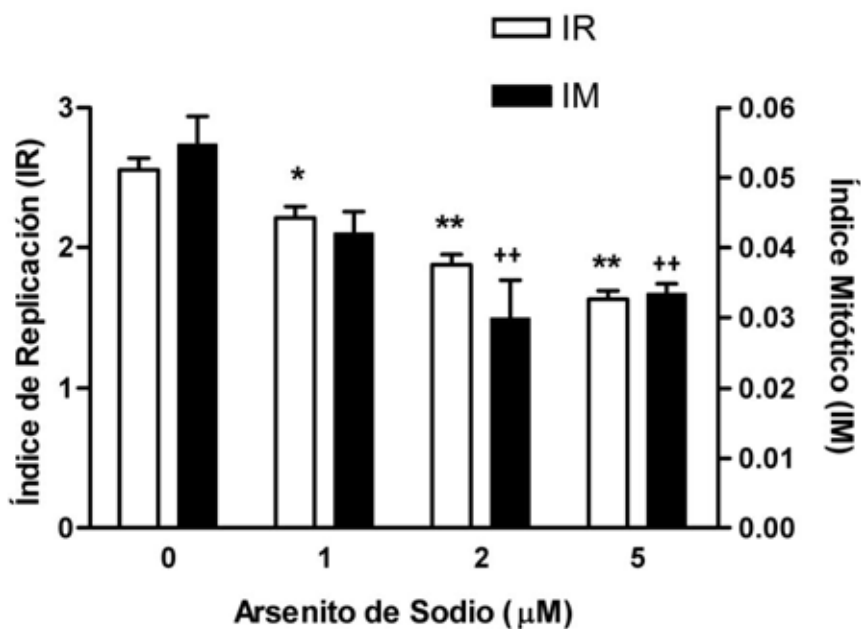




**Figura 24. Ciclo celular.** Células RINm5F expuestas a arsenito de sodio (0, 0.5, 1, 2 y 5  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. A) Histogramas representativos de cada concentración. B) Porcentaje de células en fase G1 (barras negras), fase S (barras blancas), fase G2/M (barras grises). Media  $\pm$  SEM, n = 4, ANOVA-Bonferroni, \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.001$  vs el control para la fase G2/M, ++  $p < 0.001$  vs el control para la fase S.

### B.11) Índice mitótico e índice de replicación

Con el fin de complementar los datos de ciclo celular, se analizó el índice mitótico, el cual indica la proporción de células en división y el índice de replicación que representa el número de divisiones celulares y por lo tanto la velocidad de proliferación celular. Como se muestra en la Figura 25, el índice de replicación disminuye a partir de la dosis de 1  $\mu\text{M}$ , mientras que el índice mitótico disminuye a partir de 2  $\mu\text{M}$ . Es decir, desde 1  $\mu\text{M}$  la velocidad con que proliferan las células empieza a disminuir y a partir de 2  $\mu\text{M}$  el número de células en división disminuye.



**Figura 25. Índice mitótico y de replicación.** Células RINm5F expuestas a arsenito de sodio (0, 1, 2 y 5  $\mu\text{M}$ ) por 72 horas. Índice de replicación (IR; barras blancas), índice mitótico (IM; barras negras). Media  $\pm$  SEM, n = 5, ANOVA-Bonferroni, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 vs control de IR, ++ p < 0.01 vs control de IM.

## **Estudios en Humanos**

### **C) Estudio Piloto en la Comarca Lagunera; donadores con y sin diabetes tipo 2 ambos con distintos grados de exposición a arsénico inorgánico**

Se recolectaron en total 78 muestras, de las cuales 6 de ellas se eliminaron ya que dichos individuos no se encontraban en ayuno mínimo de 8 horas en el momento de la toma de muestra y se identificaron 4 casos nuevos de diabetes. De tal manera que el análisis se llevó a cabo con 32 muestras de donadores no diabéticos y con 40 muestras de donadores diabéticos. En algunas variables existen datos faltantes: talla (1), IMC (1), cintura (10), presión arterial (4), muestras de agua de bebida (2) y muestras de orina (2). A pesar de que la insulina se cuantificó en todas las muestras, en 4 de ellas no fue posible obtener el porcentaje de funcionalidad de células  $\beta$  pancreáticas ni el porcentaje de sensibilidad a la insulina ya que los valores de insulina se encuentran fuera del rango utilizados por el software HOMA Calculador V2.2 (2.9 – 57.6 mmol/l).

#### **C.1) Características clínicas de los donadores diabéticos y de los donadores no diabéticos.**

Los valores clínicos, bioquímicos y antropométricos de los donadores de la Comarca Lagunera se muestran en la Tabla 5.

La única característica que fue estadísticamente diferente entre el grupo de sujetos no diabéticos y el grupo de sujetos diabéticos fue la concentración de glucosa sérica en ayuno ( $94.53 \pm 11.82$  vs  $192.10 \pm 74.05$  mg/dl,  $p < 0.0001$ ), siendo mayor en el grupo de donadores diabéticos. De tal manera que ambos grupos presentan características bioquímicas y antropométricas similares. Analizando los datos de manera individual, se observa que de los 32 individuos no diabéticos, 8 presentan síndrome metabólico (25 %), mientras que 21 de los 40 (52.5 %) donadores diabéticos padecen el síndrome. El síndrome metabólico [30] se define como la presencia de al menos una de las siguientes condiciones: diabetes, resistencia a la inulina, o intolerancia a la glucosa junto con 2 de las siguientes características: hipertensión ( $\geq 140/90$  mmHg), hipertrigliceridemia ( $> 150$  mg/dl), colesterol HDL bajo ( $< 35$  y  $46$  mg/dl en hombres y mujeres, respectivamente).

Diez de los donadores con diabetes tipo 2 no toman ningún medicamento hipoglucemiante, uno toma tolbutamida, 2 toman metformina, 15 toman glibenclamida y el tratamiento para 12 de ellos es combinado de metformina con glibenclamida.

Tabla 5. Características clínicas, bioquímicas, de inferencia y antropométricas de los donadores de la Comarca Lagunera.

|                       |                      | No Diabéticos (n=32) |        |         |        |        | Diabéticos (n=40) |        |         |        |        | p                 | Valor de referencia |
|-----------------------|----------------------|----------------------|--------|---------|--------|--------|-------------------|--------|---------|--------|--------|-------------------|---------------------|
|                       |                      | Media                | DE     | Mediana | p25    | p75    | Media             | DE     | Mediana | p25    | p75    |                   |                     |
| Edad                  | (años)               | 52.56                | 9.37   | 53.00   | 44.25  | 61.50  | 51.85             | 8.77   | 50.00   | 45.00  | 59.75  | 0.7406            |                     |
| Sexo                  | (Fem n, %)           | 21                   | 65.63  |         |        |        | 26                | 65.00  |         |        |        | 0.9559            |                     |
| Peso                  | (kg)                 | 76.87                | 13.47  | 75.80   | 68.90  | 88.25  | 75.33             | 12.65  | 74.80   | 66.00  | 85.50  | 0.6202            |                     |
| Talla                 | (m)                  | 1.59                 | 0.08   | 1.58    | 1.54   | 1.65   | 1.59              | 0.10   | 1.55    | 1.52   | 1.67   | 0.9326            |                     |
| IMC                   | (kg/m <sup>2</sup> ) | 30.58                | 5.89   | 29.65   | 26.05  | 34.18  | 29.91             | 4.26   | 29.00   | 27.30  | 32.50  | 0.581             | obesidad > 30       |
| Cintura               | (cm)                 | 102.60               | 12.26  | 105.00  | 93.50  | 112.00 | 103.60            | 10.43  | 103.00  | 96.75  | 112.00 | 0.7102            | ≤ 98 (H) ≤ 84 (M)   |
| PAM                   | (mm Hg)              | 96.83                | 11.57  | 98.34   | 86.67  | 104.20 | 96.01             | 10.47  | 94.17   | 89.17  | 100.40 | 0.759             | 93.3 (120/80)       |
| Glucosa*              | (mg/dl)              | 94.53                | 11.82  | 94.00   | 86.00  | 104.30 | 192.10            | 74.05  | 190.50  | 124.80 | 251.30 | <b>&lt;0.0001</b> | 70- 110             |
| Colesterol total*     | (mg/dl)              | 200.10               | 56.75  | 193.00  | 154.00 | 231.50 | 198.50            | 40.69  | 198.50  | 167.30 | 217.30 | 0.8941            | < 200               |
| Colesterol-LDL**      | (mg/dl)              | 64.19                | 43.09  | 58.50   | 33.00  | 85.75  | 61.69             | 26.79  | 62.00   | 47.00  | 69.38  | 0.9819            | < 130               |
| Colesterol-HDL**      | (mg/dl)              | 61.15                | 43.44  | 50.00   | 39.68  | 63.00  | 48.29             | 15.11  | 46.50   | 37.10  | 58.25  | 0.2887            | H >35, M >45        |
| Triglicéridos**       | (mg/dl)              | 211.00               | 237.40 | 138.50  | 95.25  | 217.30 | 199.70            | 145.90 | 167.00  | 119.80 | 195.80 | 0.3498            | < 150               |
| Lípidos**             | (g/l)                | 5.59                 | 2.69   | 5.05    | 4.20   | 6.68   | 5.76              | 1.58   | 5.80    | 4.50   | 6.58   | 0.2765            | 4 – 10              |
| Glucagon**            | (pg/ml)              | 77.98                | 176.60 | 41.35   | 35.43  | 64.02  | 56.14             | 28.74  | 51.00   | 35.70  | 65.05  | 0.2275            | 59 -177             |
| Insulina**            | (μU/ml)              | 16.46                | 15.68  | 11.80   | 6.45   | 23.45  | 15.31             | 8.00   | 14.45   | 8.90   | 19.08  | 0.2971            | 6 – 35              |
| Tiempo de diagnóstico | (años)               |                      |        |         |        |        | 6.77              | 4.44   |         |        |        |                   |                     |

IMC: índice de masa corporal, PAM: presión arterial media. El análisis estadístico de las variables se obtuvo mediante la prueba de t no pareada con la corrección de Welch para algunas variables debido a diferencias en las varianzas entre ambos grupos (\*) o por la prueba de Mann Whitney debido a falta de normalidad en los datos (\*\*). La variable de sexo se compara con la prueba de  $\chi^2$ . (GraphPad Prism 5.0).

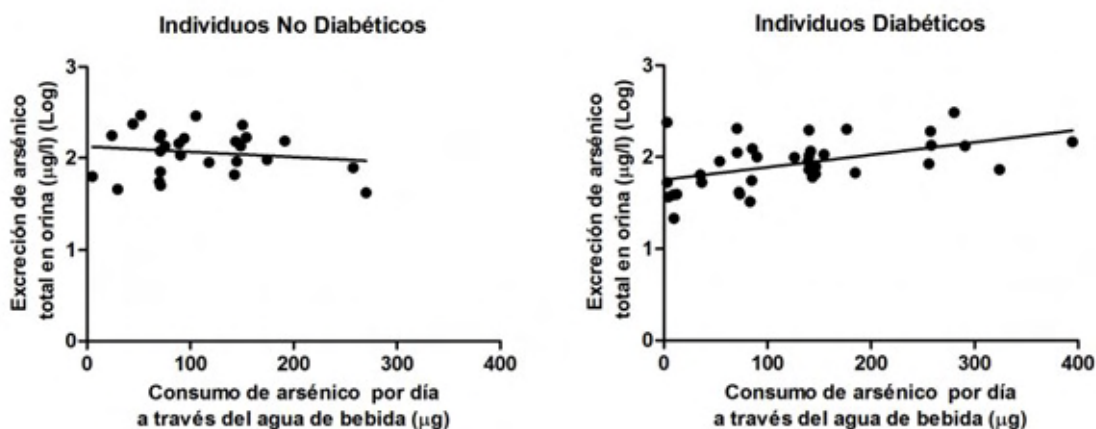
Los valores de glucosa, perfil de lípidos, insulina y glucagon corresponden a las concentraciones en plasma con un ayuno mínimo de 8 horas.

## C.2) Exposición y metabolismo de arsénico

Como se muestra en la Tabla 6, ambos grupos de estudio se encuentran expuestos a concentraciones semejantes de arsénico inorgánico a través del agua de bebida ( $\mu\text{g}/\text{día}$ ). El gradiente de exposición al arsénico en el agua para el grupo de donadores no diabéticos fue de 4.009 a 145.3 ppb ( $\mu\text{g}/\text{l}$ ), y para el grupo de donadores con diabetes fue de 2.795 a 131.5 ppb. Cabe mencionar que sólo 9 muestras tuvieron niveles menores a los permisibles según la Norma Oficial Mexicana (25 ppb).

A pesar de las similitudes en las concentraciones de arsénico ingerido entre ambos grupos, la concentración de arsénico total excretado en la orina de los donadores no diabéticos fue estadísticamente mayor que en los donadores diabéticos. Sin embargo, la proporción de los metabolitos en función de la concentración total de arsénico, no mostró diferencias. En cuanto al metabolismo del arsénico se refiere, los individuos no diabéticos llevan a cabo la primera metilación ( $\text{MMA}^{\text{V}}/\text{Asi}$ ) de manera más eficiente.

En los individuos con diabetes, existe una correlación positiva entre la concentración de arsénico ingerida por día y la concentración de arsénico total excretado en orina, sin embargo no fue así para los individuos no diabéticos (Figura 26). Cabe mencionar que los valores de la correlación para los individuos diabéticos son similares a los reportados en un estudio llevado a cabo en Sonora ( $r=0.496$ ,  $p=0.0007$ ) [117].



**Figura 26.** Relación entre el consumo de arsénico por día y la concentración de arsénico excretado en la orina en A) individuos no diabéticos ( $r=-0.1538$   $p=0.4437$ ) y en B) individuos diabéticos ( $r=0.4994$   $p=0.0019$ ). Los valores de arsénico total en la orina de los individuos diabéticos fueron transformado por logaritmo debido a una distribución no normal (GraphPad Prism 5).

Tabla 6. Concentraciones de arsénico en el agua de bebida y en la orina de los donadores de la Comarca Lagunera.

|                                                            |                     | No diabéticos (n=32) |       |         |       |        | Diabéticos (n=40) |       |         |       |        | p             |
|------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------|-------|---------|-------|--------|-------------------|-------|---------|-------|--------|---------------|
|                                                            |                     | Media                | DE    | Mediana | p25   | p75    | Media             | DE    | Mediana | p25   | p75    |               |
| Consumo de agua de red por día                             | (l)                 | 1.35                 | 0.60  | 1.25    | 0.88  | 2.00   | 1.84              | 0.92  | 2.00    | 1.19  | 2.50   | <b>0.0349</b> |
| Arsénico en agua de bebida                                 | ( $\mu\text{g/l}$ ) | 78.38                | 29.35 | 72.21   | 60.85 | 95.11  | 66.68             | 36.12 | 71.89   | 48.78 | 93.39  | 0.2521        |
| Consumo de arsénico por día                                | ( $\mu\text{g}$ )   | 108.60               | 65.24 | 90.57   | 70.16 | 148.80 | 125.90            | 99.04 | 132.70  | 49.55 | 160.10 | 0.8158        |
| Arsénico total en orina                                    | ( $\mu\text{g/l}$ ) | 133.40               | 67.00 | 135.20  | 81.04 | 168.50 | 100.90            | 65.21 | 86.92   | 52.99 | 133.10 | <b>0.0218</b> |
| <b>Proporciones relativas en orina</b>                     |                     |                      |       |         |       |        |                   |       |         |       |        |               |
| % Arsenobetaina                                            |                     | 4.04                 | 17.87 | 0.21    | 0.10  | 0.82   | 3.10              | 8.01  | 0.35    | 0.13  | 1.60   | 0.2777        |
| % As <sup>i</sup>                                          |                     | 11.52                | 9.19  | 10.44   | 6.36  | 13.30  | 9.80              | 3.63  | 9.86    | 6.71  | 12.20  | 0.5998        |
| % As <sup>v</sup>                                          |                     | 3.28                 | 2.09  | 3.21    | 1.57  | 4.19   | 3.47              | 2.66  | 2.76    | 1.61  | 4.62   | 0.9472        |
| % As <sup>iii</sup>                                        |                     | 8.24                 | 7.96  | 6.87    | 4.64  | 9.27   | 6.41              | 2.79  | 6.25    | 5.17  | 7.97   | 0.3798        |
| % MMA <sup>v</sup>                                         |                     | 10.17                | 4.23  | 9.29    | 6.69  | 13.33  | 8.58              | 3.36  | 7.63    | 6.19  | 11.79  | 0.0685        |
| % DMA <sup>v</sup>                                         |                     | 54.08                | 10.72 | 55.10   | 50.40 | 61.55  | 51.61             | 15.34 | 53.22   | 42.30 | 59.84  | 0.4757        |
| <b>Metilación de los metabolitos</b>                       |                     |                      |       |         |       |        |                   |       |         |       |        |               |
| Primera: MMA <sup>v</sup> /As <sup>i</sup>                 |                     | 1.07                 | 0.38  | 1.02    | 0.88  | 1.42   | 0.99              | 0.68  | 0.82    | 0.65  | 1.13   | <b>0.0358</b> |
| Segunda: DMA <sup>v</sup> /MMA <sup>v</sup>                |                     | 6.28                 | 2.68  | 5.97    | 3.71  | 8.52   | 7.21              | 4.20  | 7.36    | 4.48  | 8.37   | 0.4612        |
| Total: DMA <sup>v</sup> +MMA <sup>v</sup> /As <sup>i</sup> |                     | 7.73                 | 4.36  | 5.95    | 4.85  | 9.21   | 7.16              | 3.87  | 5.92    | 4.65  | 9.64   | 0.7002        |

El dato del consumo de agua se obtuvo a través del cuestionario. A partir de este y de la concentración de arsénico en el agua de bebida, se obtuvo el consumo de arsénico por día. Las proporciones relativas para cada metabolito evaluado se calcularon con la concentración de cada metabolito y la concentración total de arsénico en la orina. El análisis estadístico de las variables se obtuvo mediante la prueba de Mann Whitney por ser no normales (GraphPad Prism 5.0).



### C.3) Características genéticas de la población estudiada

Las frecuencias alélicas de los polimorfismos de riesgo para diabetes tipo 2 para población méxico-americana y mestizo-mexicana (SNP 43, 19, 63 y 44) se evaluaron en ambos grupos de donadores (con y sin diabetes) como se muestra en la Tabla 7. Todos los polimorfismos, en ambos grupos de individuos, se encuentran en equilibrio de Hardey-Weinberg y las frecuencias fueron similares a las reportadas para la población mexicana [42].

**Tabla 7. Genotipo y frecuencias alélicas para polimorfismos en el gen de la calpaína-10 de los donadores de la Comarca Lagunera.**

| Polimorfismo    | Genotipo                      | No diabéticos         |        | Diabéticos            |        |  |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|--|
|                 |                               | $E_{HW}$ $p$          |        | $E_{HW}$ $p$          |        |  |
| SNP 44          | T/T                           | 24                    |        | 33                    |        |  |
|                 | T/C                           | 8                     |        | 7                     |        |  |
|                 | C/C                           | 0                     |        | 0                     |        |  |
|                 | <b>Frecuencia alélica (n)</b> | <b>T:</b> 0.875 (56)  |        | <b>T:</b> 0.913 (73)  |        |  |
|                 |                               | <b>C:</b> 0.125 (8)   | 1      | <b>C:</b> 0.088 (7)   | 1      |  |
| SNP 43          | G/G                           | 16                    |        | 17                    |        |  |
|                 | G/A                           | 13                    |        | 17                    |        |  |
|                 | A/A                           | 3                     |        | 6                     |        |  |
|                 | <b>Frecuencia alélica (n)</b> | <b>G:</b> 0.703 (45)  |        | <b>G:</b> 0.638 (51)  |        |  |
|                 |                               | <b>A:</b> 0.297 (19)  | 1      | <b>A:</b> 0.363 (29)  | 0.7316 |  |
| INDEL<br>SNP 19 | 3R/3R                         | 15                    |        | 15                    |        |  |
|                 | 3R/2R                         | 12                    |        | 17                    |        |  |
|                 | 2R/2R                         | 5                     |        | 8                     |        |  |
|                 | <b>Frecuencia alélica (n)</b> | <b>3R:</b> 0.656 (42) |        | <b>3R:</b> 0.588 (47) |        |  |
|                 |                               | <b>2R:</b> 0.344 (22) | 0.4313 | <b>2R:</b> 0.413 (33) | 0.5145 |  |
| SNP 63          | C/C                           | 22                    |        | 25                    |        |  |
|                 | C/T                           | 9                     |        | 12                    |        |  |
|                 | T/T                           | 1                     |        | 3                     |        |  |
|                 | <b>Frecuencia alélica (n)</b> | <b>C:</b> 0.828 (53)  |        | <b>C:</b> 0.775 (62)  |        |  |
|                 |                               | <b>T:</b> 0.172 (11)  | 1      | <b>T:</b> 0.225 (18)  | 0.3738 |  |

La  $p$  para el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $E_{HW}$ ) se obtuvo mediante la prueba específica  $\chi^2$  (STATA 9.2)

Al reconstituir el haplotipo para los SNPs 43, 19 y 63, sólo dos de las muestras presentaron el haplotipo de riesgo para diabetes tipo 2 112/121 (Figura 5) reportado para poblaciones como la México-americana [40]. Cabe mencionar que los donadores con dicho haplotipo pertenecen al grupo de diabéticos. Como se observa en la Tabla 7, ninguno de los donadores presentó el genotipo C/C para el SNP 44.

Debido a la baja frecuencia del haplotipo de riesgo 112/121, la estratificación por polimorfismos (como se muestra más adelante) se realizó únicamente para el SNP 44 y para el SNP 43. Previamente ha mostrado que el SNP 44 es de riesgo para diabetes tipo 2 en población mexicana y modifica el patrón normal de la curva de tolerancia a la glucosa. La estratificación también se llevó a cabo con el SNP 43, ya que de los tres polimorfismos que componen el haplotipo de riesgo es el que más se ha asociado con fenotipos involucrados en la diabetes tipo 2.

#### **C.4) Funcionalidad de las células $\beta$ pancreáticas en función de la concentración de arsénico total excretado en orina.**

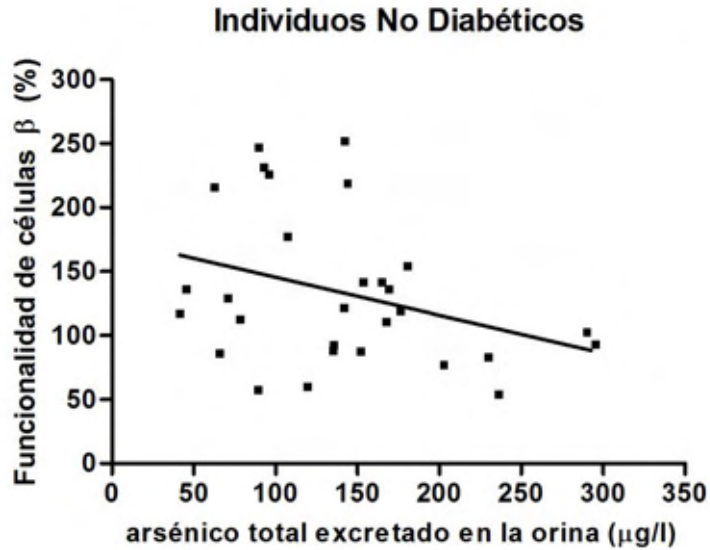
El porcentaje de funcionalidad de las células  $\beta$  entre los individuos diabéticos y los no diabéticos fue estadísticamente diferente ( $p < 0.0001$ , t-student). La media  $\pm$  DE de los diabéticos fue de  $53.96 \pm 38.46$  mientras que de los individuos sin diabetes fue de  $133.3 \pm 58.85$ . Un dato interesante es que varios de los donadores no diabéticos ( $n=19$ ) presentaron niveles superiores al 100 %. Estos individuos podrían ser pre-diabéticos, aunque sin relación aparente con el síndrome metabólico. Mientras que en el grupo de los diabéticos sólo 6 de ellos presentaron una funcionalidad mayor al 100 %.

En los individuos no diabéticos no se mostró relación estadísticamente significativa entre la funcionalidad de células  $\beta$  y la concentración de arsénico excretada, sin embargo cabe mencionar que existe una ligera tendencia inversamente proporcional, con valor de pendiente de  $-0.2972$  ( $p= 0.0762$ ,  $r^2= 0.119$ ). Dicho valor obtenido a partir de una regresión lineal se puede interpretar que por cada  $\mu\text{g/l}$  de arsénico excretado, el porcentaje de funcionalidad disminuye 0.29 % (Figura 27), sin embargo no fue estadísticamente significativa.

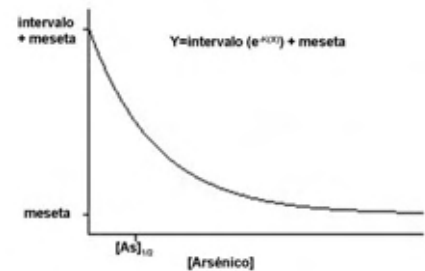
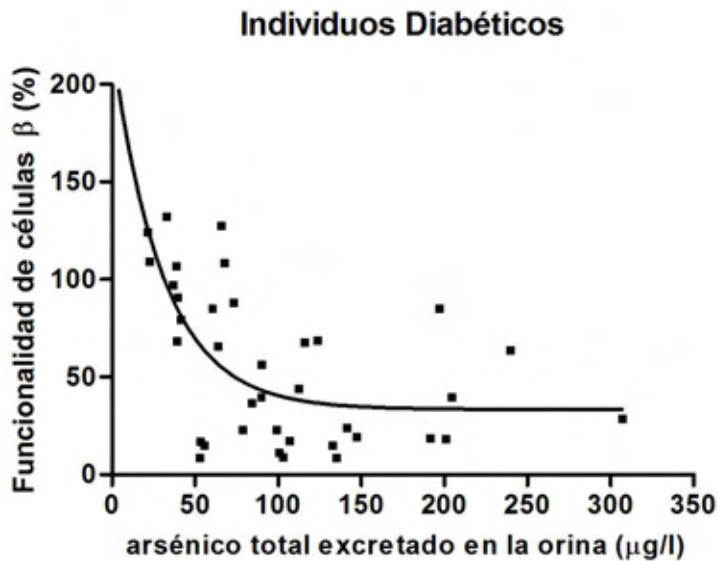
En el caso de los diabéticos se llevó a cabo una regresión no lineal de tipo exponencial en decaimiento debido a la distribución que presentan los datos (Figura 28). La interpretación de los datos, según la línea ajustada sugiere que el decaimiento desde 187 % al 33.5 % de funcionalidad de células  $\beta$  ocurre de manera constante con una tasa de 0.03276. Una vez que se ha alcanzado la meseta (33.5 % de funcionalidad de las células  $\beta$ ), un aumento en la concentración de arsénico excretado no disminuye más dicha funcionalidad.

Finalmente, también se puede concluir a partir de la gráfica que en individuos diabéticos la concentración de arsénico total en la orina que se requiere para disminuir el 50 % de la funcionalidad de las células beta es de  $21.16 \mu\text{g/l}$ .

Al ajustar la asociación de concentración de arsénico en la orina con la funcionalidad de las células  $\beta$  por edad, sexo, e IMC en un modelo de regresión lineal multivariado, en ninguno de los dos grupos de individuos los datos se modificaron significativamente.



**Figura 27.** Regresión lineal de la concentración de arsénico total excretado en la orina (μg/l) y la funcionalidad de células β (%) en individuos no diabéticos. Pendiente=  $-0.2972 \pm 0.1612$ ,  $p=0.0762$ ,  $r^2=0.119$ .



X es la concentración de arsénico. Y es la respuesta, en este caso la funcionalidad de las células β. Y empieza en el valor de “intervalo + meseta” y decae hasta la meseta con una concentración constante de K. La concentración media del decaimiento es de  $0.6932/K$ . El intervalo y la meseta se expresan en las mismas unidades que el eje de la Y (GraphPad 5).

**Figura 28.** Regresión de decaimiento exponencial de la concentración de arsénico total excretado en la orina (μg/l) y la funcionalidad de células β (%) en individuos diabéticos. Intervalo = 187, K = 0.03276, meseta = 33.48, concentración media = 21.16,  $r^2=0.4119$ .

### **C.5) Estratificación de la funcionalidad de células $\beta$ por genotipo de calpaína-10.**

Dado que las calpaínas, en particular la 10, participan en la secreción de insulina por las células  $\beta$  y ciertos polimorfismos se han asociado con la enfermedad, los valores de la funcionalidad de dichas células se estratificaron por los alelos para el SNP 43 y el SNP 44.

Para el caso del SNP 43, el grupo de individuos no diabéticos con el genotipo G/G mostró un porcentaje de funcionalidad de células  $\beta$  estadísticamente menor que aquellos con los genotipos G/A ó A/A; el genotipo G/G es el que se encuentra asociado con la diabetes en ciertas poblaciones y con distintos fenotipos relacionados a dicha enfermedad (Figura 29A).

En cuanto al SNP 44, los individuos no diabéticos con el genotipo T/T presentaron un porcentaje de funcionalidad de células  $\beta$  estadísticamente mayor que aquellos individuos con el genotipo T/C (no se encontraron individuos C/C). Para este caso el genotipo de riesgo para la enfermedad es el heterocigoto (Figura 29C).

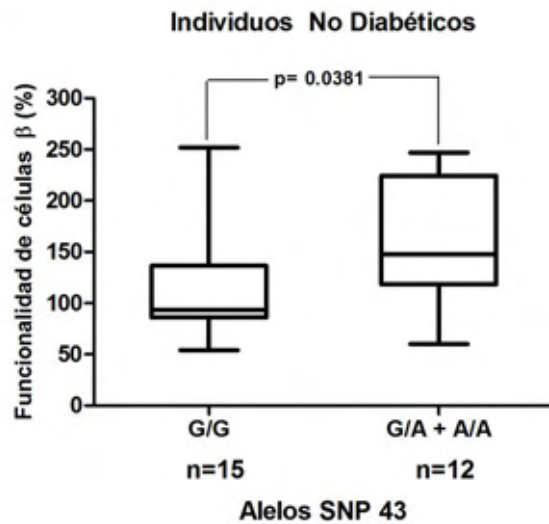
Para los individuos con diabetes con ninguno de los dos polimorfismos se encontró diferencias según el genotipo (Figura 29B, 29D).

La influencia del genotipo en calpaína-10 sobre la funcionalidad de las células  $\beta$  tomando en cuenta la exposición al arsénico y variables como la edad, sexo e IMC se evaluó por medio de regresiones lineales generando variables ficticias del genotipo. Como se muestra en la Tabla 8, en individuos no diabéticos los que presentan un genotipo A/A para el SNP 43 tienen 77 % más de funcionalidad que los de genotipo G/A de manera significativa, sin embargo al ajustar por las variables que representan un posible factor con influencia en dicho porcentaje de funcionalidad, la significancia estadística desaparece.

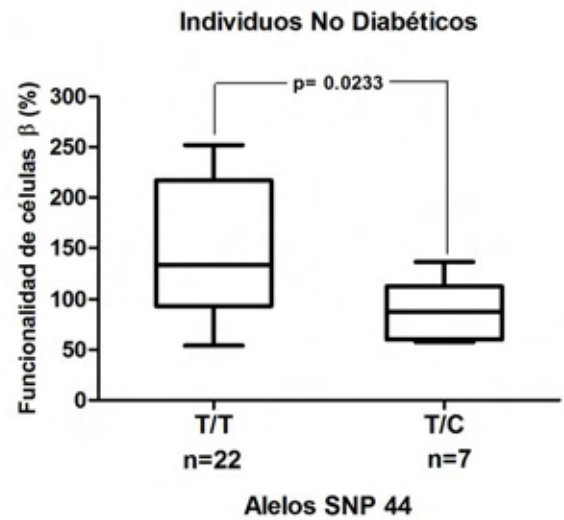
En el caso del SNP 44 en individuos no diabéticos, la asociación muestra que los sujetos con genotipo C/T presentan un 54 % menor de funcionalidad en las células  $\beta$  a comparación de los individuos con el genotipo T/T, igual de manera significativa. En este caso el ajuste por la exposición al arsénico, la edad, el sexo y por el IMC no altera los resultados.

Ninguno de los dos polimorfismos mostró asociación con la funcionalidad de las células  $\beta$  en los donadores diabéticos.

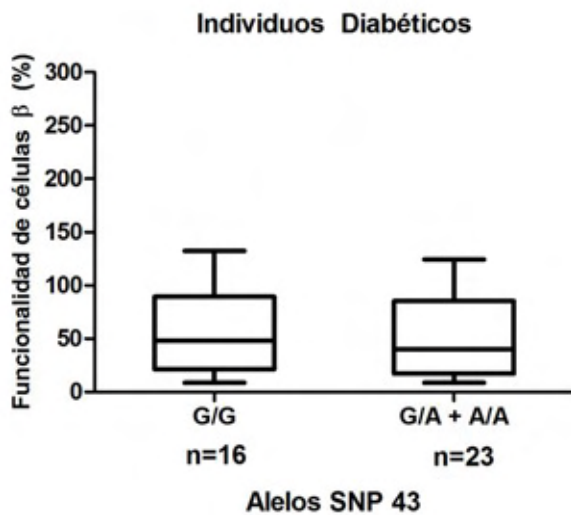
A)



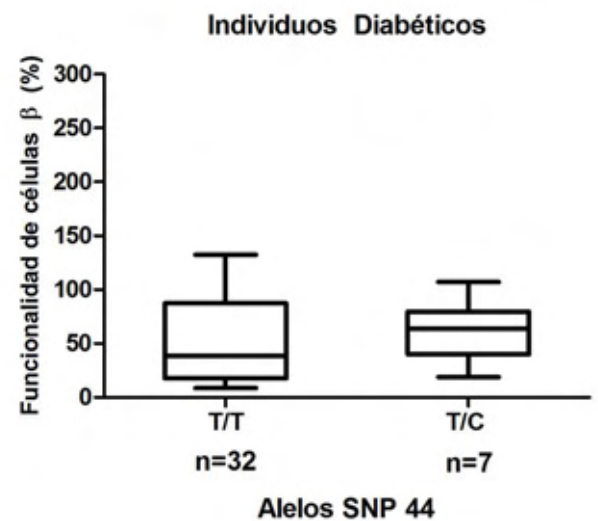
C)



B)



D)



**Figura 29.** Porcentaje de funcionalidad de células  $\beta$  en función del genotipo para los polimorfismos SNP 43 y 44 del gen de la calpaína-10. Prueba de Mann Whitney. A) No diabéticos, SNP 43, n=15 y 12, p=0.0381, B) diabéticos, SNP 43, n=16 y 23, p=0.5299, C) No diabéticos, SNP 44, n=22 y 7, p=0.0233 y D) diabéticos, SNP 44, n=32 y 7 p=0.4531 (GraphPad Prism 5).

Tabla 8. Asociación entre los polimorfismos SNP 43 y del gen de la calpaína-10 y el porcentaje de funcionalidad de células  $\beta$  en sujetos diabéticos y no diabéticos.

| SNP 43                        | Funcionalidad de las células beta (%) |       |              |              |                |                       |       |              |       |                |
|-------------------------------|---------------------------------------|-------|--------------|--------------|----------------|-----------------------|-------|--------------|-------|----------------|
|                               | Individuos No Diabéticos              |       |              |              |                | Individuos Diabéticos |       |              |       |                |
|                               | de G/G a G/A                          |       | de G/A a A/A |              |                | de G/G a G/A          |       | de G/A a A/A |       |                |
| Ajustado por                  | pendiente                             | P     | Pendiente    | p            | r <sup>2</sup> | pendiente             | p     | pendiente    | P     | r <sup>2</sup> |
| Crudo                         | 29.35                                 | 0.200 | 77.95        | <b>0.034</b> | 0.1779         | -3.64                 | 0.796 | -5.23        | 0.787 | 0.0029         |
| Arsénico total en orina       | 25.67                                 | 0.256 | 67.09        | 0.067        | 0.2374         | -3.10                 | 0.820 | -3.06        | 0.868 | 0.1956         |
| Arsénico total en orina, Edad | 25.19                                 | 0.269 | 67.64        | 0.087        | 0.2375         | -2.77                 | 0.843 | -2.59        | 0.891 | 0.1965         |
| Arsénico total en orina, Sexo | 30.17                                 | 0.195 | 61.54        | 0.097        | 0.2656         | -3.15                 | 0.820 | -3.16        | 0.866 | 0.1958         |
| Arsénico total en orina, IMC  | 27.98                                 | 0.191 | 53.97        | 0.121        | 0.2461         | -0.98                 | 0.942 | 19.28        | 0.674 | 0.2562         |

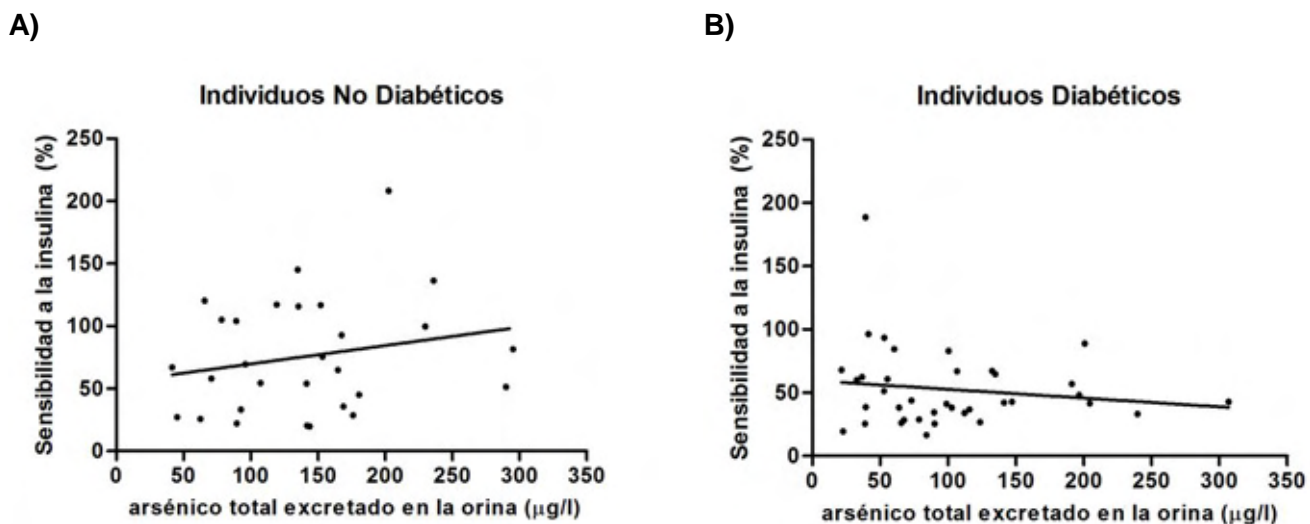
| SNP 44                        | Funcionalidad de las células beta (%) |              |                |                       |       |                |
|-------------------------------|---------------------------------------|--------------|----------------|-----------------------|-------|----------------|
|                               | Individuos No Diabéticos              |              |                | Individuos Diabéticos |       |                |
|                               | de T/T a C/T                          |              |                | de T/T a C/T          |       |                |
| Ajustado por                  | pendiente                             | P            | r <sup>2</sup> | pendiente             | P     | r <sup>2</sup> |
| Crudo                         | -54.89                                | <b>0.029</b> | 0.1649         | 11.24                 | 0.498 | 0.0125         |
| Arsénico total en orina       | -56.02                                | <b>0.019</b> | 0.2836         | 16.88                 | 0.304 | 0.2192         |
| Arsénico total en orina, Edad | -55.15                                | <b>0.024</b> | 0.2892         | 16.69                 | 0.317 | 0.2198         |
| Arsénico total en orina, Sexo | -57.93                                | <b>0.015</b> | 0.3280         | 16.85                 | 0.312 | 0.2193         |
| Arsénico total en orina, IMC  | -47.76                                | <b>0.037</b> | 0.3786         | 17.37                 | 0.288 | 0.278          |

Regresión lineal simple (crudo) y múltiple (ajuste por concentración de arsénico total en la orina, edad, sexo e IMC).

### C.6) Sensibilidad a la insulina en función de la concentración de arsénico total excretado en orina.

El porcentaje de la sensibilidad a la insulina (recíproco de la resistencia a la insulina) entre los individuos diabéticos y los no diabéticos fue estadísticamente diferente ( $p=0.0310$ , Mann Whitney). La media  $\pm$  DE de los diabéticos fue de  $52.22 \pm 30.78$  mientras que de los individuos sin diabetes fue de  $75.7 \pm 45.57$ .

A diferencia de la funcionalidad de las células  $\beta$ , la sensibilidad a la insulina (y por ende la resistencia a la misma) no mostró asociación con la excreción de arsénico total en orina (Figura 30).



**Figura 30.** Regresión lineal de la concentración de arsénico total excretado en la orina ( $\mu\text{g/l}$ ) y la sensibilidad a la insulina en individuos no diabéticos (A) (pendiente=  $0.1468 \pm 0.1294$ ,  $p=0.2665$ ,  $r^2= 0.04551$ ) y en individuos diabéticos (B) (pendiente=  $-0.06925 \pm 0.07946$ ,  $p= 0.3894$ ,  $r^2= 0.02124$ ) (GraphPad Prism 5).

Los alelos de los polimorfismos en el gen de calpaína-10, tampoco mostraron diferencias entre ellos.



**D) Determinación de la funcionalidad del linfocito humano como modelo de estudio para el análisis de calpaínas en la diabetes tipo 2 Anexo IV [231]**

**D.1) Características clínicas de los donadores control y de los donadores diabéticos, Hospital General “Dr. Manuel Gea González”.**

Los valores clínicos, de laboratorio y antropométricos de los donadores se muestran en la Tabla 9. La única característica que fue estadísticamente diferente entre el grupo de sujetos control y el grupo de sujetos diabéticos fue la concentración de glucosa sérica en ayuno ( $92.4 \pm 5.41$  vs  $190 \pm 77.5$  mg/dl,  $p=0.002$ ), siendo mayor en los diabéticos.

**Tabla 9. Características clínicas, de laboratorio y antropométricas de los donadores del Hospital General Gea González .**

|                                           | <b>Controles (n=9)</b> | <b>Diabéticos (n=11)</b> | <b>p</b> |
|-------------------------------------------|------------------------|--------------------------|----------|
| <b>Sexo (masculino/femenino)</b>          | 0.8                    | 0.375                    | 0.6424   |
| <b>Edad (años)</b>                        | $42.8 \pm 5.45$        | $47.4 \pm 5.63$          | 0.0825   |
| <b>Peso (kg)</b>                          | $77.7 \pm 13.4$        | $70.9 \pm 15.1$          | 0.3085   |
| <b>Talla (m)</b>                          | $1.61 \pm 0.09$        | $1.56 \pm 0.119$         | 0.2902   |
| <b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>             | $29.7 \pm 4.13$        | $28.9 \pm 4.4$           | 0.6707   |
| <b>Cintura (cm)</b>                       | $95.2 \pm 8.23$        | $95.3 \pm 6.93$          | 0.9699   |
| <b>Glucosa en sangre en ayuno (mg/dl)</b> | $92.4 \pm 5.41$        | $190 \pm 77.5$           | 0.002 *  |
| <b>PAM (mm Hg)</b>                        | $89.6 \pm 6.38$        | $94.2 \pm 11.2$          | 0.2790   |
| <b>Familiares con DM 2 (n)</b>            | 3                      | 9                        | 0.0648   |

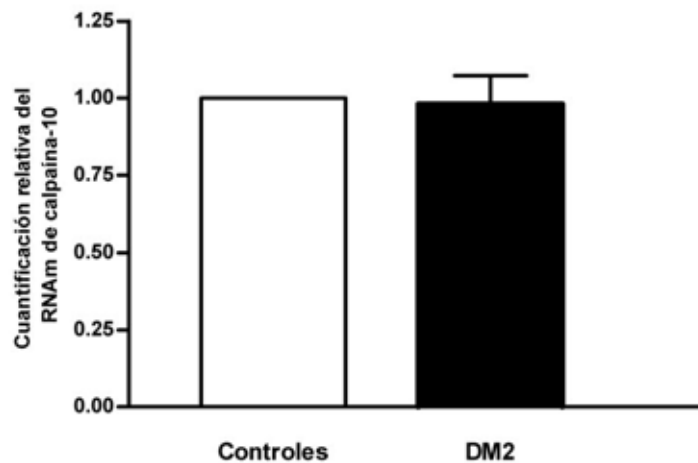
Excepto por las variables de sexo y de familiares con diabetes tipo 2 (DM 2), los cuales se encuentran expresados como la relación de masculino/femenino y el número de parientes, respectivamente, el resto de las variables representan la media  $\pm$  SD. IMC: índice de masa corporal, PAM: presión arterial media. El análisis estadístico de las variables se obtuvo mediante la prueba de t no pareada, excepto para el valor de la concentración de la glucosa la cual se corrigió posteriormente con la prueba de Welch debido a diferencias significativas en la varianza. Las variables del sexo y de familiares con DM 2 se compararon con la prueba exacta de Fisher  $\chi^2$ , (GraphPad Prism 4.0). El símbolo (\*) denota diferencias estadísticas significativas.

## D.2) Expresión de calpaína-10 en linfocitos humanos

Debido a que la calpaína-10 es uno de los miembros de la familia de las calpaínas que se relaciona genética y patofisiológicamente con la diabetes [40, 78], con el fin de identificar si el grupo de individuos control y el grupo de individuos diabéticos expresan en linfocitos diferentes niveles de esta, se evaluó su expresión a nivel de RNAm y de proteína.

### D.2.1) RNAm de calpaína-10

La expresión del RNAm de calpaína-10 fue similar entre los linfocitos de los controles y de los diabéticos (Figura 31).



**Figura 31. Expresión del RNAm de calpaína-10 en linfocitos.** Controles (barra blanca), diabéticos (barra negra). Los datos se normalizaron con respecto a los valores de los donadores control y representan la media  $\pm$  SEM. Prueba de t de una muestra (one-sample t test) con valor hipotético de 1.

### D.2.2) Proteína calpaína-10

Los blots de proteína muestran cuatro bandas que varían de 75 a 50 kDa (Figura 32A), mostrando algunas de las 8 isoformas de la calpaína-10 que se producen por splicing alternativo [40]. Con el fin de determinar las isoformas correspondientes a las bandas observadas, el peso molecular de cada isoforma se calculó utilizando un programa de predicción “*Sequence Manipulation Suite / Protein Molecular Weight*” [232] en base a la

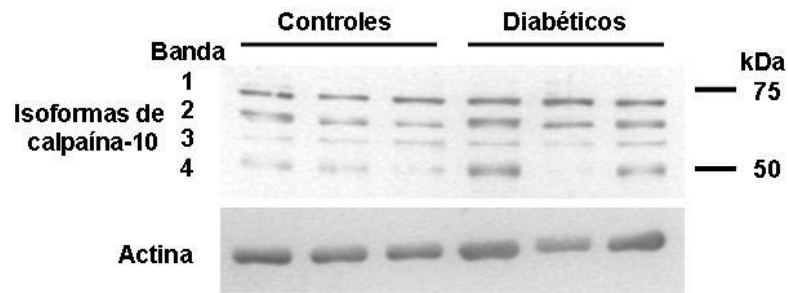
secuencia de aminoácidos reportada (Tabla 10). Las cuatro bandas de calpaína-10 identificadas en las muestras podrían corresponder a las isoformas a, b, c, d y/o e; sin embargo no se pudieron definir con exactitud debido a la similitud de los pesos moleculares entre cada isoforma.

Entre los linfocitos de los controles y de los diabéticos no se observaron diferencias significativas en ninguna de las isoformas de la proteína calpaína-10 (Figura 32B), sin embargo existe una ligera tendencia de los diabéticos a expresar mayor cantidad de cada una de las cuatro isoformas detectadas. Incluso, se observan diferencias en la intensidad de las bandas entre individuos de un mismo grupo, particularmente con la banda número 4 (la más cercana a la banda del marcador de peso molecular de 50 kDa) (Figura 32A).

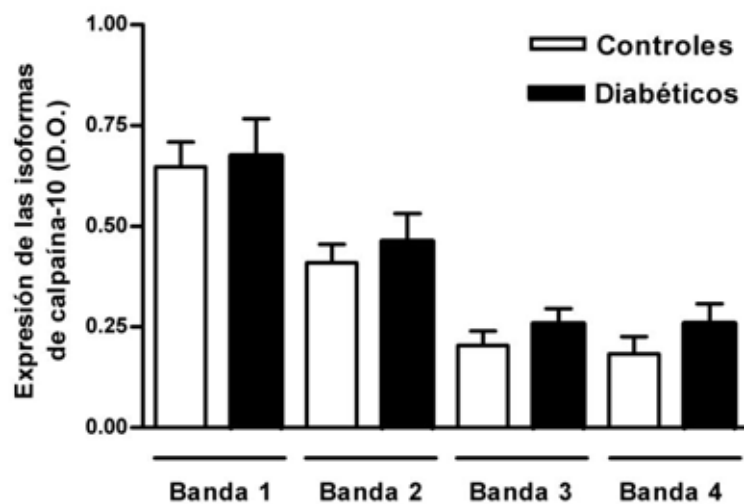
**Tabla 10. Predicción del peso molecular de las isoformas de calpaína-10**

| <b>Isoforma</b> | <b>Ref Sec</b> | <b># de amino ácidos</b> | <b>kDa</b> |
|-----------------|----------------|--------------------------|------------|
| calpaína-10a    | AF089088       | 672                      | 74.95      |
| calpaína -10b   | AF089090       | 544                      | 60.67      |
| calpaína -10c   | AF089091       | 517                      | 58.00      |
| calpaína -10d   | AF089092       | 513                      | 57.83      |
| calpaína -10e   | AF089093       | 444                      | 50.00      |
| calpaína -10f   | AF089094       | 274                      | 29.46      |
| calpaína -10g   | AF089095       | 139                      | 15.59      |
| calpaína -10h   | AF089096       | 138                      | 15.26      |

A)



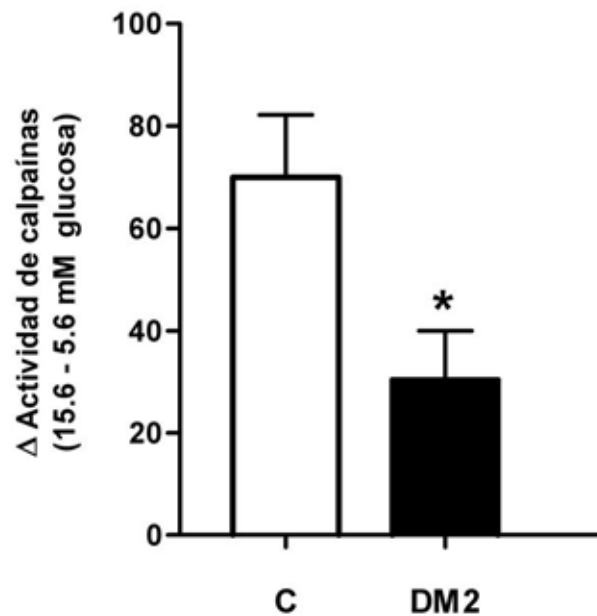
B)



**Figura 32. Expresión de las isoformas de calpaína-10 en linfocitos.** A) Patrón de expresión de las isoformas de calpaína-10 de donadores representativos. B) Cuantificación densitométrica de las cuatro bandas normalizadas respectivamente por actina. Controles (barras blancas), diabéticos (barras negras). Los datos representan la media  $\pm$  SEM. Prueba de t no pareada.

### D.3) Actividad de calpaínas en linfocitos humanos

Debido a que la expresión de la calpaína-10 entre los dos grupos analizados fue similar, se evaluó la actividad general de calpaínas. La diferencia en dicha actividad, evaluada entre la concentración basal y estimulante de glucosa extracelular (5.6 y 15.6 mM, respectivamente) es significativamente mayor en los linfocitos del grupo control que en los linfocitos del grupo de diabéticos (Figura 33). Los linfocitos del grupo control son más sensibles a la concentración extracelular de glucosa, respondiendo con una diferencia mayor entre ambas concentraciones de glucosa en la actividad de calpaínas, mientras que los linfocitos del grupo de los diabéticos respondieron menos a la concentración extracelular de glucosa.



**Figura 33. Actividad de calpaínas en linfocitos.** Linfocitos de individuos control (barra blanca) y de individuos diabéticos (barra negra). Los datos corresponden a la diferencia entre las dos concentraciones de glucosa del medio en el cual fue evaluada la actividad de las calpaínas (actividad en 15.6 mM – actividad en 5.6 mM) y representan la media  $\pm$  SEM. Prueba de t no pareada, el símbolo denota diferencias estadísticas \*  $p < 0.05$ .

## DISCUSIÓN

Diversos estudios epidemiológicos indican que la exposición al arsénico inorgánico incrementa el riesgo a desarrollar diabetes tipo 2 sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre se encuentra poco estudiado. La mayoría de los estudios están enfocados a la resistencia a la insulina en tejido periférico.

Los resultados *in vitro* aquí presentados muestran plausibilidad biológica sobre el hecho propuesto de manera epidemiológica de que el arsénico es un factor de riesgo para diabetes tipo 2. Uno de los mecanismo de acción demostrados en este trabajo es que el arsenito disminuye la secreción de insulina *in vitro* en células  $\beta$  pancreáticas de rata. Se plantea que esto sucede a través de la alteración en la concentración de calcio intracelular libre, ocasionando como consecuencia que la proteólisis de la proteína SNAP-25 por medio de calpaína-10, las cuales componen la maquinaria de secreción, disminuya.

El estudio piloto realizado en humanos sugiere que el arsénico se asocia con la disfuncionalidad de las células  $\beta$  del páncreas, apoyando así la idea establecida con los experimentos *in vitro* de que uno de los mecanismos de acción del arsénico como factor de riesgo para diabetes tipo 2 es la alteración en la secreción de insulina. Esta parte del trabajo también aporta evidencia de que la funcionalidad de las células  $\beta$  se encuentra influenciado por dos polimorfismos de susceptibilidad para diabetes tipo 2 localizados en el gen de la calpaína-10, de los cuales uno de ellos (SNP 43) no mostró ser independiente de la exposición al arsénico.

Debido a que es extremadamente complicado trabajar con células  $\beta$  de humano, se plantea el uso del linfocito humano como modelo de estudio, para evaluar la actividad de las calpaínas.

En la mayoría de los trabajos publicados, las concentraciones de las diferentes sales de arsénico utilizadas suelen ser elevadas y por lo tanto biológicamente irrelevantes, tomando en cuenta que la concentración de arsénico en la sangre de gente expuesta varía de 0.1 a 1  $\mu\text{M}$  [103, 233-235]. En la fase *in vitro* de este trabajo las células se expusieron a arsenito durante 72 y 144 horas.

Hasta el momento se desconoce si el efecto del arsenito sobre la secreción de insulina es reversible. Si bien, dicho hallazgo supondría que una vez eliminada la exposición al arsénico en dichas poblaciones, la hiperglucemia disminuiría, tal como es el caso de los glucocorticoides o en la diabetes gestacional en algunas personas [22]. El hecho de que el arsenito probablemente también afecte la resistencia a la insulina, como se ha postulado en algunos trabajos *in vitro* [136, 137], disminuye las probabilidades de ser un evento transitorio, dependiente del estado de

exposición actual. Los datos en la literatura, tanto de trabajos epidemiológicos como de experimentales, apuntan a que la exposición al arsénico es un factor de riesgo más que un inductor único. De tal manera que si la exposición al arsénico, junto con otros factores de riesgo, contribuyó a la aparición de la diabetes tipo 2, aunque el sujeto no se exponga más al arsénico la enfermedad no debería de desaparecer. Sin embargo, un experimento interesante sería evaluar la secreción de insulina en células  $\beta$  que después de haber estado expuestas al arsenito hayan tenido un período sin exposición. Estos resultados ayudarían a contestar si la eliminación de la exposición al arsénico en una persona ya con la enfermedad establecida, disminuye la intensidad de la hiperglucemia.

Como se muestra en este trabajo, uno de los efectos del arsenito es provocar disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas, siendo el hallazgo más relevante la alteración en la secreción de insulina. Con el arsenito, las células  $\beta$  pierden su sensibilidad a las concentraciones extracelulares de glucosa y por lo tanto secretan concentraciones similares de insulina, independientemente si la concentración de glucosa extracelular es basal (5.6 mM) o estimulante (15.6 mM).

La pérdida en la sensibilidad a la concentración extracelular de glucosa ocasionada por el arsenito en las células  $\beta$ , se debe a que el metaloide induce una alteración en ciertos eventos necesarios para secretar insulina de manera estimulada. Dichos eventos sirven para sensar los cambios en la concentración extracelular de glucosa. Uno de ellos es la concentración de calcio intracelular, la cual se acrecienta como respuesta a un aumento, primero extracelular y después intracelular, de la glucosa. De tal manera que una vez que el arsenito alteró varios de estos sucesos que en su conjunto sensan la concentración de glucosa, la célula es incapaz de secretar insulina en función de esta, secretando cantidades similares de la hormona en condiciones basales y estimulantes de glucosa.

En condiciones control (sin arsenito) los cultivos primarios de células  $\beta$  y la línea celular de insulinoma RINm5F incubadas por 144 y 72 horas respectivamente, pierden esta sensibilidad a la glucosa extracelular. Vidaltamayo et al ya habían observado este fenómeno en cultivos primarios de células  $\beta$  después de 5 a 7 días en incubación. Los autores mencionan que la respuesta secretoria a altas concentraciones de glucosa disminuye en función del tiempo en cultivo, pronunciándose en presencia de 1 % de suero en el medio [236]. Otra posible explicación al fenómeno, es que después de cierto tiempo de incubación en un medio alto en glucosa (el RPMI-1640 contiene 11.6 mM de glucosa) y sin fluctuaciones en la concentración de

glucosa, se pierda la capacidad de las células  $\beta$  de secretar insulina en función de la concentración de glucosa extracelular. Si bien es cierto que la mayoría de las líneas celulares de células  $\beta$  no responden muy bien a glucosa, se han utilizado de manera extensa para la caracterización de varios eventos pancreáticos.

Los islotes humanos expuestos crónicamente a altas concentraciones de glucosa (16.7 mM) *in vitro*, pierden su capacidad de secretar insulina en función de la concentración de glucosa extracelular, presentando menor contenido de insulina intracelular y menor expresión del receptor a la insulina, en comparación con islotes que fueron incubados en concentraciones bajas de glucosa (5.5 mM) [237]. En la actualidad la hipótesis de que la hiperglucemia por sí misma puede ser responsable o bien, contribuir a la disfunción de la célula  $\beta$  ha recibido bastante atención. Al respecto existen términos como desensibilización por glucosa, en la cual el defecto en la secreción de insulina es reversible, así como efectos irreversibles ocasionados por toxicidad a la glucosa [2]. Incluso, se ha observado que altas concentraciones de glucosa causan apoptosis en islotes pancreáticos de humano en cultivo y en líneas celulares como las RINm5F [238, 239].

Las células  $\beta$  de ratón cultivadas durante 72 horas en una concentración alta de glucosa (15 mM) presentan una actividad reducida de los canales de  $K^+$  sensibles a ATP (-30 %), incremento en las corrientes de calcio, así como en la concentración de calcio intracelular (+160 %), mayor exocitosis (monitoreada por medidas de capacitancia, +100 %) y mayor contenido de insulina (+230 %), en comparación con aquellas células que fueron cultivadas en 4.5 mM de glucosa. Sin embargo, al retarlas con 20 mM de glucosa después del cultivo, las células que estuvieron en medio alto en glucosa por un periodo de 72 horas, secretan un 20 % menos de insulina [240].

De igual modo, la secreción de insulina en la línea celular RIN también depende de la concentración de glucosa en la cual se crezca y de los pases de las células (16-25 pases temprano; 45-55 pases tardíos) [237]. Incluso, hay que considerar que las células RINm5F al ser un insulinoma, presentan una respuesta alterada a la estimulación con glucosa [241].

A pesar de que en ambos escenarios (cultivos primarios incubados por 144 horas y células RINm5F incubadas por 72 horas) los resultados de las condiciones control no fueron los ideales, el arsenito fue capaz de disminuir la secreción de insulina.



En base a los resultados obtenidos, se plantea que el mecanismo por el cual el arsenito altera la secreción de insulina es dependiente de la dosis. Con dosis de 5  $\mu\text{M}$ , la síntesis de la hormona se ve reducida, y como consecuencia también la secreción. Sin embargo, dosis menores no alteran la síntesis de la insulina pero sí la secreción de la hormona. Por tal motivo, se trató de conocer si el arsenito es capaz de alterar eventos importantes que ocurren en el acoplamiento entre el estímulo con la glucosa y la secreción de insulina.

La línea celular fue más sensible a los efectos del arsenito que los cultivos primarios, lo cual se aprecia claramente en los resultados de viabilidad, en donde la dosis de 5  $\mu\text{M}$  no es citotóxica para los cultivos primarios de células  $\beta$ , pero sí lo es para las células RINm5F. Esta diferencia en la sensibilidad incluyen los cambios en la morfología celular, tales como los alargamientos similares a las neuritas.

Se ha documentado que los cultivos primarios de células  $\beta$  y las células RINm5F bajo ciertos estímulos (factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento para fibroblastos y cAMP) desarrollan dichos cambios morfológicos similares a las neuritas por la alteración en el ensamblaje y en la estabilización de los microtúbulos [236, 242].

Una interesante explicación a la distinta sensibilidad entre los dos tipos celulares, podría ser su estado proliferativo. Mientras la línea celular RINm5F está en constante división, los cultivos primarios de células  $\beta$  permanecen en G0 sin dividirse. Datos *in vitro* como *in vivo* muestran que el arsenito y el arsénico inorgánico respectivamente, tienen un efecto sobre ciertas fase del ciclo celular, alterando especialmente la progresión de la fase S [243, 244]. De tal manera que los cultivos primarios podrían presentar cierto tipo de resistencia citotóxica al arsenito. El propio hecho de que las células RINm5F sean una línea celular provenientes de un insulinoma podría explicar la diferente sensibilidad. Incluso, al conjuntar los resultados de índice de viabilidad, sobrevivida, ciclo celular, e índice mitótico y de replicación, tal pareciera que en las células RINm5F, el arsenito (2 y 5  $\mu\text{M}$ ) impide principalmente que las células que se sembraron al inicio del experimento se dividan para alcanzar el 80-90 % de confluencia observado en las células control. A pesar de que sí existe muerte celular en dichas células tratadas con arsenito, el bajo número de células al final del tratamiento se puede atribuir en mayor grado a un efecto sobre la proliferación celular. Datos que apoyan esta idea es que en presencia de arsenito 2 y 5  $\mu\text{M}$  el número de células en la fase G2/M del ciclo celular incrementa, sugiriendo un arresto, mientras que en las células que siguen ciclando, el índice mitótico y de replicación disminuyen.

Dado que los cultivos primarios de células  $\beta$  en condiciones control perdieron su sensibilidad a la glucosa tras 144 horas de cultivo y que la línea celular presenta una baja sensibilidad a la glucosa *per se*, las células RINm5F no fueron tratadas durante 144 horas como sucedió con los cultivos primarios.

A pesar de que el arsénico es considerado un carcinógeno humano [96] el trióxido de arsénico a su vez se utiliza como tratamiento para algunos tipo de cáncer [245], es decir se considera un tóxico con efectos paradójicos [246]. Otro ejemplo de sus efectos paradójicos (por la dosis principalmente) es justamente referente a diabetes. Alrededor de 1900 en Europa antes del descubrimiento de la insulina, de acuerdo a la literatura científica y a las patentes de la industria farmacológica, el arsénico, junto con otras sustancias, era utilizado como tratamiento para la diabetes, sin embargo no tuvo mucho éxito por la hepatotoxicidad que causaba [247].

Tomando en cuenta que las células RINm5F son un insulinoma, los datos de este trabajo podrían sugerir al arsenito de sodio como tratamiento para cáncer de páncreas endocrino, ya que por un lado disminuye la proliferación celular, evitando el crecimiento del tumor, y por otro disminuye la secreción de insulina, evitando los episodios de hipoglucemia en dicho individuos.

Uno de los eventos cruciales para que las células  $\beta$  pancreáticas secreten insulina en respuesta a la glucosa, es un aumento en la concentración de calcio intracelular. El hecho de que en la condición control (sin arsenito) la diferencia en la concentración de calcio intracelular libre sea estadísticamente diferente, sugiere que el defecto que tienen las células RINm5F *per se* para secretar mayor cantidad de insulina en respuesta a glucosa, ocurre en los eventos posteriores a la elevación del calcio. En la literatura existen reportes que muestran que las células RINm5F efectivamente responden a KCl y a ATP con aumentos en la concentración de calcio intracelular [248, 249]. Incluso, en el trabajo aquí presentado se muestra que la actividad de las calpaínas en las dos concentraciones de glucosa, independientemente del efecto del arsenito, siempre fue similar. Las concentraciones de calcio intracelular libre se vieron afectadas por el arsenito, ya que desde la primera dosis utilizada (0.5  $\mu$ M) la significancia estadística encontrada en el control entre las dos concentraciones de glucosa extracelulares en las cuales se llevó a cabo el ensayo, se perdió. De manera escasa en la literatura ya se ha propuesto que el arsénico (et trióxido de arsénico como el arsenito de sodio) es capaz de alterar las corrientes de calcio y los niveles de calcio intracelular libre [130, 131].

En cuanto a las calpaínas se refiere, en ciertos trabajos se ha documentado que el tratamiento con inhibidores de calpaínas en células  $\beta$  o en islotes pancreáticos, altera la concentración de

calcio intracelular en respuesta a glucosa [81, 82], lo que sugiere que una de las funciones de las calpaínas es modular los cambios necesarios en la concentración de calcio intracelular para dar lugar a la fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática. De manera recíproca, la alteración en la concentración de calcio de seguro afecta el cambio conformacional, el cual se propone es dependiente de calcio, que debe de ocurrir para que se unan los subdominios que dan lugar al sitio activo de las calpaínas [43].

Se sabe que las células  $\beta$  además de expresar la calpaína-10 [18], expresan igualmente la calpaína-1 y la 2 (también conocidas como calpaína- $\mu$  y calpaína-m, respectivamente) [19, 83], estando la calpaína-1 involucrada también en la secreción de insulina [79]. Dicha calpaína ha sido detectada en los islotes pancreáticos, específicamente en las células  $\beta$ , mientras que en el tejido exocrino el resultado ha sido negativo para ambas calpaínas [250].

Por tales motivos la actividad enzimática de las calpaínas evaluada en las células  $\beta$ , no corresponde únicamente a la calpaína-10, si no también a la 1 y a la 2 y tal vez a otros miembros de la familia de las calpaínas de las cuales aún se desconoce su expresión en dicho tipo celular. A pesar de lo anterior, un dato que llama la atención es que la dosis de arsenito a la cual comienza a aumentar la actividad de las calpaínas (2  $\mu$ M) es con la que comienza también la inducción del RNAm de calpaína-10.

Las calpaínas participan en diversos procesos celulares. Varios de los cuales se alteraron en presencia de arsenito, tales como la regulación del ciclo celular, el tráfico vesicular y la posible diferenciación celular. Adicionalmente al cambio observado en la actividad de calpaínas en presencia de arsenito, los procesos celulares que se alteraron también sugieren que las calpaínas pueden ser un blanco directo del arsenito.

Una de las proteínas que forma parte del complejo de secreción de las células  $\beta$  es SNAP-25. En la literatura se propone que el aumento en la concentración de calcio activa a la calpaína-10, en particular a la isoforma de aproximadamente 54 kDa, para que esta proteolise de manera parcial a SNAP-25 en la región amino terminal y así ocurra el rearreglo proteico necesario para llevar a cabo el proceso de exocitosis de la insulina [18].

Con el arsenito, la diferencia en la concentración de calcio libre intracelular entre la concentración basal y estimulante de glucosa extracelular se pierde. En base a los resultados de calcio era de esperarse que la actividad de las calpaínas, al ser dependiente de calcio, disminuyera, sin embargo, la tendencia fue de aumento en ambas condiciones de glucosa. Una posible explicación al fenómeno, es que al perderse la regulación en las fluctuaciones de calcio en función de la glucosa extracelular, la actividad general de las calpaínas aumente (a partir de

la dosis de 2  $\mu$ M) como mecanismo compensatorio. De tal manera, la pérdida en la diferencia en la concentración de calcio inducida por el arsenito, se debe tanto a un ligero aumento en las condiciones basal (5.6 mM) como a una ligera disminución en las condiciones estimulantes (15.6 mM), que en su conjunto dan como resultado una concentración de calcio libre intracelular más estables y que a partir de cierta dosis de arsenito, se activan de manera constante las calpaínas en general. Otra posible explicación a ese aumento en la actividad de las calpaínas con la dosis de 2  $\mu$ M de arsenito es que se deba al aumento en la transcripción de calpaína-10.

Con el fin de evaluar de manera indirecta la actividad de calpaína-10 en particular, se analizó la proteólisis de SNAP-25 tras las 72 horas de exposición al arsenito en las células RINm5F. En condiciones control (sin arsenito), los resultados apoyan la idea de que el defecto en la células RINm5F para secretar insulina en función de la glucosa extracelular, se localiza una vez que ocurre el aumento en la concentración de calcio, ya que la cantidad de SNAP-25 proteolisado en ambas concentraciones de glucosa fue similar. Dicho defecto podría ocurrir justo en los sensores de calcio propuestos, ya sea en la sinaptotagmina o en la calpaína-10 [19]. Tras una exposición a arsenito, la proteólisis de SNAP-25 en condiciones estimulantes de glucosa disminuye, hecho que pudiera explicar los efectos en la secreción de insulina. Cabe hacer mención que si bien el arsenito disminuye la proteólisis de SNAP-25 en glucosa estimulante con un patrón tipo dosis-respuesta, con la dosis de 2  $\mu$ M el efecto se invierte, es decir la proteólisis de SNAP-25 aumenta alcanzado valores semejantes a los de la condición control. Este aumento en la proteólisis de SNAP-25 con la dosis de 2  $\mu$ M de arsenito de sodio en presencia de glucosa estimulante podría deberse al aumento que ocurre en la expresión de calpaína-10 y en la actividad de las calpaínas.

Integrando los hallazgos relacionados con la secreción de insulina, las concentraciones de calcio intracelular libre y la proteólisis de SNAP-25 en presencia de dosis bajas de arsenito de sodio, se propone que uno de los mecanismos por el cual el arsenito disminuye la secreción de insulina es alterando la vía que involucra un aumento de calcio intracelular seguida de la activación de calpaína-10 para proteolisar a SNAP-25 y producir el rearreglo conformacional en las proteínas de la maquinaria de secreción.

Aún más, la isoforma de calpaína-10 que más se expresa en las células RINm5F (la de 50 kDa) podría corresponder a la isoforma que se encuentra involucrada específicamente en la secreción de insulina reportada por Marshall et al [18] a pesar de la ligera discrepancia en el peso molecular entre ambas isoforma (50 vs 54 kDa, respectivamente). De hecho, es probable que en realidad ambas correspondan a la misma isoforma, ya que la manera en que Marshall et

al la postularon fue en base a marcadores de peso molecular para Western blot (una banda entre 66 y 45 kDa), y los pesos moleculares estimados según la secuencia de aminoácidos para humanos son de 74.95, 60.67, 58, 57.83, 50, 29.46, 15.59 y 15.26 kDa [231].

La sinaptotagmina se considera el sensor de calcio para varias células endocrinas excitables. Específicamente en la célula  $\beta$  se han reportado 5 de las 15 isoformas conocidas (III, V, VII, VIII y IX) [14] sin embargo, existen trabajos que muestran que la expresión de sinaptotagmina en las células  $\beta$  en comparación a otras células endocrina/excitables, como las de la glándula pituitaria, es mínima [19]. Este hecho brinda cierta evidencia de que las células  $\beta$  deben contar con otros sensores de calcio con mayor expresión, siendo la calpaína-10 un buen candidato.

Las células  $\beta$  tienen diversos puntos de monitoreo para sensar la concentración de glucosa y así secretar la una cantidad adecuada de insulina. Dichos puntos se pueden dividir de manera funcional en eventos próximos y en eventos distales. Los eventos próximos incluyen la estimulación con glucosa, la entrada de glucosa a la célula  $\beta$  pancreática, la glucólisis, así como la entrada al metabolismo mitocondrial. Posteriormente de manera secuencial, se encuentran los eventos distales, que incluyen la generación de las señales mitocondriales que dan lugar a la excitabilidad de la membrana, la señalización con calcio, el reclutamiento de gránulos y la exocitosis, para finalmente en conjunto dar lugar a la secreción de insulina [14].

Si bien en el trabajo se demuestran los efectos del arsenito en la célula  $\beta$  pancreática sobre algunos de los eventos distales que ocurren para que la insulina sea secretada, el arsenito también podría alterar los eventos próximos. Dos potentes mecanismos de acción son la inhibición de la entrada de glucosa a la célula  $\beta$  y la inhibición de la glucólisis y/o ciclo de Krebs, ya que por un lado uno de los transportadores de compuestos de arsénico en levadura in en ovocitos de *Xenopus laevis* es el transportador de glucosa GLUT1 [126] mientras que por el otro lado se sabe que el arsénico es capaz de inhibir a varias enzimas mitocondriales y desacoplar la fosforilación oxidativa [100].

Tal pareciera que los mecanismos por los cuales el arsenito altera la secreción basal de insulina no corresponden a los que influyen en la secreción estimulada (i.e. la proteólisis de SNAP-25 en secreción basal no se altera por arsénico), incluso se sabe que entre la primera y la segunda fase de la secreción de insulina estimulada con glucosa existen diferencias en los mecanismos de acción [251]. Sin embargo, para determinar con exactitud dichos mecanismos del arsenito se requieren más experimentos.

Otro de los eventos que el arsenito podría afectar para alterar la secreción de insulina y que no fue evaluado en este trabajo, es el proceso de remodelación de microtúbulos y de actina que tiene que ocurrir para permitir la liberación de la hormona. El movimiento de las vesículas con insulina dentro del citoplasma ocurre a través de los microtúbulos de manera dependiente de ATP, por lo que la disrupción de la red de microtúbulos altera el movimiento de los gránulos, así como la respuesta exocitótica inicial, como es el relleno de la poza fácilmente liberada. Adicionalmente, cerca de la membrana plasmática los gránulos de insulina se transportan a lo largo de la red cortical de actina, también en una manera dependiente de ATP y con la participación de las calpaínas, las cuales se encuentran involucradas en esta reorganización de la actina, en particular una isoforma de la calpaína-10 [14, 83].

Datos escasos en la literatura muestran que en efecto diferentes compuestos de arsénico tiene la capacidad de perturbar el ensamblaje de los microtúbulos así como alterar la reorganización de la actina. En fibroblastos, la exposición al arsenito resulta en una retracción celular y en la pérdida de los filamentos gruesos de actina, pero mantiene numerosos microfilamentos delgados, distribuidos en una manera desorganizada, mientras que la organización de los microtúbulos permanece relativamente mal distribuida. Sin embargo, con dosis  $\geq$  a 20  $\mu\text{M}$ , se ocasiona una pérdida severa de microtúbulos, mientras que las fibras de actina delgadas y gruesas sobrantes forman madejas en el área perinuclear [252]. En macrófagos el trióxido de arsénico reorganiza la actina del citoesqueleto retrayendo las extensiones periféricas de actina formando un anillo cortical [253]. En fibroblastos humanos el arsenito (10  $\mu\text{M}$ ) aumenta significativamente la frecuencia de alteraciones en la morfología de los microtúbulos [254]. Finalmente, en linfocitos humanos el arsenito a dosis muy bajas (0.001-0.1  $\mu\text{M}$ ) interrumpe la formación del huso mitótico e interactúa con los microtúbulos, ya que inhibe su ensamblaje e induce la despolimerización de la tubulina [255].

Se sabe que una de las funciones de la insulina es estimular el crecimiento y a la diferenciación celular [3] y se conoce que el arsenito tiene la capacidad de alterar parámetros relacionados con la proliferación y diferenciación celular en distintos tipos de células, incluyendo los adipocitos [170, 256, 257]. Los efectos observados en la células  $\beta$  en referencia a la proliferación celular en presencia de arsenito (arresto del ciclo celular y disminución en el índice mitótico y de replicación), podrían deberse tanto por un efecto del arsenito así como por la disminución en la secreción de insulina inducida por él mismo.

Los efectos directos sobre la proliferación celular inducidos por el arsenito en las células  $\beta$  podrían ocurrir a través de la vía del factor de transcripción p53, el cual se sabe que se induce

por arsenito [132] y a su vez participa en los puntos de monitoreo del ciclo celular [258]. Otra de las vías por las que el arsenito podría causar el arresto en el ciclo celular sería a través de una alteración en los microtúbulos, lo cual se sabe que sucede [252, 254, 255].

Independientemente de estas vías, hay que mencionar que en las células  $\beta$  existe una regulación autocrina para la secreción de insulina, la supervivencia y la proliferación celular [9, 10, 259]. Esta auto-regulación implica que la disminución en la secreción de insulina ocasionada por arsenito, como se muestra en el trabajo, lleve como consecuencia a problemas en la proliferación celular. Se ha observado que la insulina es capaz de estimular la proliferación en células  $\beta$  a través de la cinasa RAs-1 [259].

Se conoce a fondo que el factor de transcripción homeobox-1 duodenal pancreático de roedor (PDX-1) se requiere para el desarrollo del páncreas y se ha reportado que influye en la expresión de distintos genes en las células  $\beta$ , incluyendo aquellos que codifican para la insulina, el péptido amiloide pancreático, la glucocinasa y el transportador de glucosa GLUT2 [157]. Estudios en donde el arsenito ha sido utilizado como control positivo para la inducción de estrés celular, muestran que la exposición de 30 minutos a 1 mM de arsenito estimula la unión de PDX-1 al DNA en islotes humanos, mientras que en la línea celular de células  $\beta$  MIN6 se promueve la transcripción dependiente de PDX-1 [158]. La misma dosis de arsenito también estimula la translocación de PDX-1 del citoplasma hacia el nucleoplasma en células  $\beta$  humanas [159, 160]. Estos resultados podrían sugerir que el arsenito incrementa la transcripción de insulina actuando a través de la activación de PDX-1, sin embargo, es contrario a los datos obtenidos en este trabajo, en donde ocurre un decremento en el RNAm de insulina en células  $\beta$  pancreáticas aisladas tratadas con arsenito. Estas discrepancias se pueden deber a la duración del tratamiento (30 minutos vs 72 horas), o bien a la concentración utilizada (1 mM vs 5  $\mu$ M). Si bien en el trabajo se muestra que la expresión de insulina se ve disminuida con ciertas dosis de arsenito, la expresión de otros genes seguramente también se altera contribuyendo al fenotipo [134].

Con respecto a las dosis, se sabe que los efectos del arsénico son paradójicos [246]. La alteración de distintos procesos biológicos por arsénico depende de la dosis utilizada debido al efecto de hormesis observado con el arsénico (con bajas dosis se obtiene el efecto contrario al que se tiene con dosis más elevadas). Un ejemplo de este metaloide con efecto opuesto dependiente de la dosis es la transcripción de p53. La expresión de esta proteína, la cual se encuentra involucrada en procesos del ciclo celular y apoptosis, disminuye con dosis bajas de arsénico inorgánico (0.01  $\mu$ M) y aumenta con dosis mayores (0.1  $\mu$ M) [129].

A pesar de la evidencia de que el arsénico altera parámetros relacionados con la homeostasis de la glucosa *in vitro*, los datos *in vivo* son controversiales. En ciertos modelos animales se ha observado el desarrollo de hiperglucemia por exposición *in vivo* al arsenito [135, 174, 175]. Izquierdo-Vega et al reportan que tras una exposición a arsenito de 1.7 mg/kg cada 12 horas durante 90 días, las ratas además de desarrollar hiperglucemia, también presentan resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (en ayuno), acompañado de una falta de tinción inmunohistoquímica para insulina en los islotes pancreáticos [135]. Sin embargo, existen trabajos como el de Cobo et al [155] en donde la concentración de insulina en plasma de ratas en ayuno expuestas a arsenito a través del agua de bebida con incrementos graduales en la dosis por 8 semanas (comienzo con 89  $\mu\text{M}$  hasta un término de 1,640  $\mu\text{M}$ ) no se ve alterada. Al evaluar la secreción de insulina *in vitro* de los islotes de esos mismos animales tras las 8 semanas de exposición, la cantidad de insulina secretada en la concentración basal de glucosa (2.8 mM) aumentó, alcanzando niveles similares a los secretados en la concentración estimulante de glucosa (16.7 mM) [155]. En otro modelo con ratones, 8 semanas de exposición a arsenito (675  $\mu\text{M}$ ) a través del agua de bebida produjo una intolerancia a la glucosa [175].

Sin embargo, hay que considerar que la concentración de arsenito que se necesita para producir síntomas asociados a la exposición a arsénico en ratones, incluyendo los de diabetes, es de un orden de magnitud mayor que en humanos [175]. De tal manera que se ha propuesto que los ratones son menos susceptibles que los humanos a los efectos diabetogénicos por la exposición crónica al arsénico inorgánico. Por ejemplo, los ratones metabolizan y depuran los metabolitos del arsénico inorgánico de los tejidos de manera más eficiente que los humanos y por lo tanto en ratones se requiere de dosis más elevadas y tiempos de exposición más prolongados para producir los síntomas de toxicidad encontrados en humanos [175].

Los resultados obtenidos en el estudio piloto de humanos expuestos a distintas concentraciones de arsénico inorgánico a través del agua de bebida, muestran que la funcionalidad de las células  $\beta$ , en particular la capacidad para secretar insulina en un estado estable (ayuno), se asocia de manera inversa con el grado de exposición al arsénico. Por el contrario, dicha exposición no se vio relacionada con la sensibilidad a la insulina.

Datos recientes en la literatura apoyan la idea de que el arsénico produce disfunción de las células  $\beta$ . Uno de los efectos observados en una línea celular de células  $\beta$  de hamster (HIT-T15) tras una exposición aguda al arsénico (4 horas) con una dosis de 5  $\mu\text{M}$ , es la disminución en la



secreción de insulina. Datos *in vivo* del mismo autor muestran que ratones expuestos a 135  $\mu\text{M}$  de trióxido de arsénico por 5 y 7 semanas presentan concentraciones menores de insulina en plasma [260]. Yen et al proponen que un aumento en el estrés oxidativo y en la apoptosis, así como una disminución en el contenido de ATP y lesiones patológicas pancreáticas podrían ser los responsables de la disfunción de las células  $\beta$  [260].

A pesar de que es evidente la disfunción de las células  $\beta$  en los pacientes con diabetes tipo 2, aún se debate si esta característica es una anomalía temprana o si por el contrario ocurre de manera tardía en el historial natural de la diabetes tipo 2. Con los avances en el entendimiento de la regulación de la secreción de insulina, tal parece que la función de las células  $\beta$  disminuye tempranamente en el proceso de desarrollo de la enfermedad y decae progresivamente a medida que la tolerancia a la glucosa se deteriora [261].

La disfunción de las células  $\beta$  en los diabéticos tipo 2 se caracteriza por la pérdida de la primera fase de la secreción en respuesta a glucosa. Este defecto en la secreción es específico para glucosa, ya que los pacientes conservan la habilidad para secretar insulina en respuesta a otros secretagogos. Otras características de la secreción de insulina que se alteran en las personas que padecen diabetes tipo 2 son el patrón diurno de la secreción de insulina, la relación proinsulina/insulina y la potenciación de glucosa con otros secretagogos de insulina [2].

En la ausencia de defectos en la función de las células  $\beta$ , los individuos pueden compensar la resistencia a la insulina indefinidamente con una apropiada hiperinsulinemia. Sin embargo, la pérdida de función de las células  $\beta$  eventualmente lleva a la hiperglucemia en ayuno y posprandial que caracterizan a la diabetes tipo 2 [262]. Aún más, en base a datos experimentales obtenidos en humanos, se postula que el estado prediabético se caracteriza por un deterioro lineal similar entre la sensibilidad a la insulina periférica y hepática y la funcionalidad de las células  $\beta$ , con modificaciones en esta relación por las variantes en el gen de calpaína-10 [263].

La parte del estudio en humanos realizado en la Comarca Lagunera muestra una asociación inversa y exponencial entre la exposición al arsénico inorgánico y la funcionalidad de las células  $\beta$  sólo en los sujetos diabéticos, mientras que en los donadores sin diabetes sólo se aprecia una disminución lineal no significativa (aunque pudiera ser un efecto de un tamaño de muestra menor 32 vs 40 individuos). La interpretación de estos datos sugieren que el arsénico pudiera

actuar como factor de riesgo para la diabetes tipo 2, como lo indican los estudios epidemiológicos, y que su mecanismo de acción favorece más a la disfuncionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas que al mecanismo de resistencia a la insulina, aunque no hay que olvidar que en la literatura existen trabajos que demuestran *in vitro* la capacidad de diferentes compuestos de arsénico para afectar la captura de glucosa dependiente de insulina en adipocitos de ratón [136, 137].

De tal manera que si una persona no padece la enfermedad pero se encuentra expuesta a concentraciones de arsénico inorgánico considerables, existirá una tendencia a sufrir defectos en la secreción de insulina y por ende una mayor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Sin embargo, una vez que la ha desarrollado por la coexistencia de diversos factores de riesgo, el grado de exposición afectará de manera significativa la secreción de insulina, exacerbando la enfermedad.

En la actualidad se reconocen muchos factores que se encuentran involucrados en la etiología de la diabetes tipo 2 como la genética, la edad, la obesidad, la dieta, el sexo, el estilo de vida sedentario, el estado socio-económico, la hipertensión y el estrés. De manera reciente se ha encontrado una asociación entre el consumo del tabaco y la incidencia de diabetes tipo 2, sugiriendo que el humo del tabaco pudiera tener un efecto tóxico directo sobre el páncreas. También se ha encontrado asociación con la pancreatitis crónica y con el cáncer pancreático. Por otro lado, cada día hay más pruebas de que el metabolismo de varios elementos traza se altera en la diabetes y que estos nutrientes podrían tener funciones específicas en la patogénesis y progresión de la enfermedad. Una fuente de exposición al arsénico considerable es el consumo del tabaco, ya sea de forma activa o pasiva [264]. Si bien el fumar se considera un factor de riesgo importante para la diabetes tipo 2, los mecanismos aún no se encuentran bien establecidos, sin embargo, el arsénico podría ser en parte responsable [265].

A excepción de la concentración de glucosa en plasma, la cual en la mayoría de los donadores diabéticos no se encuentra bien controlada a pesar de la ingesta de medicamentos hipoglucemínicos que los donadores refieren, ambos grupos del estudio piloto realizado en la región de la Comarca Lagunera presentaron valores clínicos y antropométricos muy similares, sin embargo, cabe mencionar que algunos de los sujetos no diabéticos padecen síndrome metabólico y la mayoría presentan valores limítrofes. Este hecho se pudiera deber a la propia exposición al arsénico. Previamente se ha descrito un aumento en la prevalencia del síndrome

metabólico en personas en Taiwán expuestas a arsénico con una asociación lineal con aumento en la concentración de glucosa, lípidos y presión arterial específicamente [266].

En la literatura existen datos contradictorios al respecto. En un estudio llevado a cabo en Bangladesh, en donde la prevalencia para diabetes tipo 2 fue 2.8 veces mayor en las comunidades con exposición a arsénico que en las comunidades controles evaluadas, los individuos expuestos a arsénico presentaron actividad significativamente elevada de la fosfatasa alcalina, niveles menores de creatinina en suero con niveles elevados de proteína total, así como niveles significativamente menores de colesterol total, -HDL y -LDL, con cambios menores en los triglicéridos [267]. Sin embargo, en los resultados del estudio piloto llevado a cabo en la Comarca Lagunera no se encontró asociación entre la exposición al arsénico y el perfil lipídico.

A pesar de que la insulina actúa de manera primaria para disminuir los niveles de glucosa en plasma, el glucagón contrarresta los efectos de la insulina (promueve la captura de glucosa y la síntesis de glucógeno) estimulando la glucogenólisis y la gluconeogénesis y por ende induce la hiperglucemia. De tal manera que el glucagón, el cual es secretado por las células  $\alpha$  del páncreas, también es esencial para mantener los niveles de glucosa en rangos normales [268]. Estudios clínicos han mostrado que una inapropiada elevación en los niveles de glucagón en suero (hiperglucagonemia) se asocia comúnmente con el establecimiento y con la progresión de la diabetes tipo 2 [26-28, 225]. Incluso se ha reportado que tras una exposición a arsenito de 1.7 mg/kg cada 12 horas durante 90 días en ratas, los niveles de glucagón se reducen ligeramente de manera significativa [135]. En este estudio piloto llevado a cabo en la Comarca Lagunera, se observa que los sujetos diabéticos presentan una tendencia disminuida en la concentración de glucagón en ayuno, sin embargo, estadísticamente no fue significativa.

Por otro lado, la concentración de arsénico en el agua de bebida de los donadores analizados no fue tan alta como se esperaba. Previamente en dicha región se habían reportado valores que alcanzaban hasta los 400  $\mu\text{g/l}$  [108], y fue de llamar la atención que sólo 9 muestras estuvieron por debajo de la Norma Oficial Mexicana (25  $\mu\text{g/l}$ ). Como se mostró en los resultados, a pesar de que ambos grupos se encuentran expuestos a una concentración similar de arsénico en el agua de bebida, parece que la excreción en los diabéticos es menor. Dos posibles explicaciones a este hecho podrían deberse a que los individuos no diabéticos metabolizan de manera más eficiente el arsénico. La relación de los metabolitos muestra que la razón del  $\text{MMA}^{\text{V}}/\text{Asi}$ , la cual representa la primera metilación, es significativamente mayor en

dichos individuos. Otra posible explicación podría deberse a un daño renal en los diabéticos, sin embargo, como los niveles de creatinina en orina no se midieron se desconoce el dato a ciencia cierta. No obstante, por el tiempo de diagnóstico que reportan los individuos y sin síntomas clínicos de nefropatía, un daño renal en ellos no es aparente, aunque hay que considerar que muy probablemente el diagnóstico de la enfermedad no se hizo al momento del inicio de la enfermedad.

A pesar de que es una práctica común ajustar los niveles de arsénico en orina por los niveles urinarios de creatinina con el fin de normalizar los valores entre los individuos en función de la funcionalidad renal, existen dos grandes inconvenientes que en lugar de normalizar el dato, lo altera aún más. Para medir la creatinina en orina, lo ideal es recolectar durante 24 horas la orina de los individuos, sin embargo, para estudios de este tipo se vuelve complicado. De tal manera que en la gran mayoría de los trabajos se mide la creatinina de una sola micción, la cual es por lo general la primera del día. La segunda y más grave complicación de ajustar la excreción de arsénico por creatinina, es que existe una asociación entre las concentraciones de los metabolitos de arsénico en la orina y los valores de creatinina, ya que ambos sufren reacciones de metilación dependientes de SAM (el grupo donador de metilos) durante su respectivo metabolismo [269]. De tal manera que en presencia de arsénico, los valores de creatinina en orina no representan adecuadamente el funcionamiento renal.

La manera en que se calculó la cantidad de arsénico consumido por día, fue a través de la concentración de arsénico en el agua de bebida multiplicada por el consumo de agua que los sujetos reportaron en el cuestionario. Es probable que el reporte sobre el consumo de agua en los donadores diabéticos sea más exacto que en los sujetos control, debido a la conciencia que tienen sobre sus hábitos, tomando en cuenta que la polidipsia es uno de los síntomas de la enfermedad. De tal manera que la falta de correlación entre el arsénico consumido por día y el excretado en la orina en los sujetos no diabéticos pudiera explicarse por el sesgo del recuerdo en la cantidad de agua ingerida por día.

En caso de que el dato de consumo de agua sea certero en los donadores no diabéticos, la explicación podría deberse a que los diabéticos al tomar más agua tengan una mayor eficiencia de eliminación renal.

Otra posible explicación podría ser que la asociación entre el consumo y la excreción de arsénico tenga un umbral y que este no haya sido alcanzado en los sujetos sin diabetes. Como se observa en los resultados, el consumo de arsénico por día fue mayor en los diabéticos, aunque sin alcanzar una diferencia significativa. Sin embargo, en el estudio llevado a cabo en

Sonora [117] en el cual se observa una correlación similar a la encontrada en este trabajo en los sujetos diabéticos, el consumo promedio calculado de arsénico por día es incluso menor al de estos sujetos (14-65  $\mu\text{g}/\text{día}$  dependiendo de la localidad vs 125 y 108  $\mu\text{g}/\text{día}$  en diabéticos y no diabéticos, respectivamente).

Finalmente, en este estudio piloto, se observa que los genotipos de riesgo para dos polimorfismos localizados en el gen de la calpaína-10, previamente asociados con diabetes tipo 2 y/o con diversos fenotipos involucrados con dicha enfermedad, (G/G para el SNP 43 y C/T para el SNP 44) se asocian con una disminución en la funcionalidad de las células  $\beta$ , sólo en los individuos sin la enfermedad.

El ajuste por la exposición al arsénico en el análisis de regresión, muestra que para el SNP 44 (genotipo C/T), dicha asociación es independiente de la exposición al arsénico, la edad, el sexo y el IMC. Por el contrario, en el caso del genotipo G/G del SNP 43 dichas covariables sí afectan la asociación.

El hecho de que se encuentre dicha asociación sólo en los individuos sin la enfermedad, se puede deber a que la funcionalidad de las células  $\beta$  en los donadores diabéticos se encuentra deteriorada por los factores de riesgo que causaron la enfermedad e incluso por la misma enfermedad, particularmente por la glucotoxicidad, minimizando la influencia que tienen por sí mismos tales polimorfismos.

En la actualidad la American Diabetes Association no considera al arsénico como factor de riesgo para desarrollar diabetes tipo 2. Incluso, en la clasificación dentro de los “otros tipos de diabetes”, existe una subcategoría llamada “inducida por químicos o fármacos”, en la cual el arsénico tampoco figura aún. Los datos mostrados proporcionan evidencia de que el arsénico actúa como un factor de riesgo más que como un inductor directo de la enfermedad.

Sin embargo, a pesar de que en la actualidad la exposición al arsénico inorgánico no es reconocido, de manera general como un factor de riesgo, después de la obesidad, dicha exposición podría ser el factor ambiental prevenible más importante, tomando en cuenta la cantidad de personas que se encuentran expuestas.

En este estudio piloto existen muchas variables que no fueron controladas y que por lo tanto el análisis multivariado fue mínimo, aunado a que el número de muestras analizadas no fue muy grande. Para un mejor estudio, en el que se pudiera evaluar causalidad entre la diabetes tipo 2 con la exposición al arsénico y su relación con la presencia de polimorfismos de susceptibilidad

en el gen de la calpaína-10 mediante la razón de Momios (OR), se deberían de estudiar individuos con y sin exposición al arsénico, en lugar de un gradiente de exposición con una mayor tendencia a niveles elevados de arsénico. De esta manera, al tener 4 grupos de estudio (sujetos sanos y diabéticos con y sin exposición al arsénico) se podría determinar si aquellos individuos con los polimorfismos de susceptibilidad y con exposición al arsénico tienen mayor riesgo a desarrollar diabetes. Incrementar el número de sujetos evaluados así como controlar más y mejor otros factores de riesgo, aumentarían el poder de la prueba.

Apenas hace unos 3 años se dio a conocer la creación de la primera línea celular humana de células  $\beta$  (NAKT-15) [270], sin embargo, aún no está comercialmente disponible. Por otro lado, la obtención de células  $\beta$  de humano es extremadamente compleja siendo en muchos casos hasta imposible. Con el fin de estudiar los mecanismos del arsénico y los mecanismos propios de la enfermedad en humanos, se planteó el uso del linfocito humano como modelo de estudio, el cual es de fácil acceso con un mínimo de invasión.

Los linfocitos expresan distintas proteínas que se encuentran involucradas en la homeostasis de la glucosa, como el receptor a la insulina [191], entre otros. Una de las proteínas recientemente relacionada con la diabetes es la calpaína-10. Como se puede apreciar en el trabajo, los linfocitos humanos expresan la calpaína-10 a nivel de RNAm así como varias de las isoformas de la proteína.

La expresión de calpaína-10 en los linfocitos de los donadores controles y con diabetes tipo 2 fue similar, sin embargo, la diferencia en la actividad de las calpaínas entre las dos concentraciones extracelulares de glucosa en las que se midió la actividad enzimática fue mayor en los linfocitos de los donadores control. Cabe mencionar que los linfocitos de uno de los individuos diabéticos evaluados, presentaron niveles normales del RNAm de calpaína-10, expresión nula de dicha proteína pero actividad enzimática general de calpaínas muy baja.

De tal manera que la actividad de las calpaínas en los linfocitos de los donadores diabéticos fue menos sensible a la concentración extracelular de glucosa. Estas diferencias en la sensibilidad no se vieron reflejadas en el RNAm ni en la proteína de calpaína-10. Dos posibles explicaciones son: 1) La actividad medida no es específica para calpaína-10 ya que el substrato utilizado en el ensayo detecta la actividad global de las calpaínas. De hecho se sabe que otros miembros de la familia, como la calpaína 1 y 2, se expresan en linfocitos [271, 272]. 2) Debido a que en los linfocitos de ambos grupos (controles y diabéticos) se expresan niveles similares de calpaína-10, la regulación podría estar dada a nivel enzimático y no a nivel de expresión, y de ahí las

diferencias. Esto apoyaría el hallazgo de que la glucosa en efecto modula la actividad de las calpaínas como se ha reportado [83]. La exposición sostenida a altas concentraciones de glucosa da lugar a defectos en la sensibilidad a la misma, así que la regulación en la actividad de calpaínas en individuos con periodos de elevación continua en las concentraciones de glucosa en sangre, pudiera ser la causa de la alteración en la actividad de las calpaínas. Aún más, los polimorfismos en el gen de calpaína-10 también pudieran participar en la diferencia en la actividad enzimática.

Los resultados también sugieren que los linfocitos tienen la capacidad para distinguir diferencias en la concentración de glucosa extracelular, así como lo hacen las células  $\beta$  pancreáticas con el fin de secretar concentraciones adecuadas de insulina. Sin embargo, los linfocitos no expresan el transportador de glucosa GLUT2 como las células  $\beta$ . Los tipos de transportadores que expresan los leucocitos en cambio son GLUT1, 3, 4, 5, y 6 [185, 187, 188]. Existen otras enzimas reportadas en la literatura que se encuentran involucradas en el metabolismo de la glucosa y que presentan menor actividad en los linfocitos de personas con diabetes tipo 2, obesidad y/o resistencia a la insulina.

Una de las funciones de las calpaínas es participar en el tráfico vesicular y en la fusión membranal. En el caso de los adipocitos, las calpaínas se encuentran involucradas en la fusión de la membrana con los gránulos que contienen el transportador de glucosa GLUT4. En las células  $\beta$  del páncreas se ha observado que las calpaínas participan en la fusión de los gránulos de insulina con la membrana, proceso que involucra la proteólisis parcial de SNAP-25 por dichas proteasas. En el caso de los linfocitos la función de las calpaínas se encuentra poco estudiada, sin embargo podría esperarse que también participaran de manera similar, dado el hecho que la mayoría de las células del tejido inmunológico secretan proteínas por medio de exocitosis regulada [273].

La exocitosis regulada ocurre de manera general a través de una vía la cual consta de dos pasos: la interacción de vesículas con la membrana plasmática y la posterior fusión entre ambas de manera dependiente de calcio. El contacto físico entre la vesícula y la membrana ocurre por la interacción entre las proteínas SNARE [273].

Por ejemplo, la secreción de inmunoglobulinas (Igs) por los linfocitos B es dependiente de la proteína t-SNARE (con ubicación membranal) SNAP-23 [274]. La proteína SNAP-23 es un homólogo de SNAP-25 (59 % de identidad) con expresión ubicua y al igual que SNAP-25

también interacciona con la proteína t-SNARE sintaxina-1 y con la proteína v-SNARE (con expresión en vesícula) VAMP-1 [273]. Distintas células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y los mastocitos expresan SNAP-25 a nivel de RNAm y/o proteína, mientras que todos estos tipos celulares y las plaquetas expresan SNAP-23 [273, 275]. Tanto en los linfocitos T ayudadores como en los citotóxicos, varios miembros de las proteínas SNARE se encuentran involucrados en la secreción de citocinas [275, 276].

En muchas células hematopoyéticas la estimulación acoplada a receptores lleva a un incremento en los niveles del calcio intracelular a través de moléculas de señalización asociadas a receptores y por medio de cinasas de tirosina. El incremento en el calcio intracelular, puede reclutar y activar como consecuencia a la proteína cinasa C (PKC) y a las sinaptotagminas, entre otras, promoviendo el rearrreglo conformacional de las proteínas SNARE que componen la maquinaria de secreción para permitir de esta manera la fusión del gránulo con la membrana [277].

De tal manera que en un estado de activación, como es el caso de una infección, los linfocitos sobreexpresan ciertos transportadores de glucosa en la membrana [187], permitiendo mayor entrada de glucosa a la células, la cual a su vez generará más energía en forma de ATP como consecuencia de la glucólisis, ciclo de Krebs y de la fosforilación oxidativa. Este mismo estado de activación promoverá, de manera dependiente e independiente de la elevación del calcio intracelular [277], la secreción de citocinas y de anticuerpos, proceso que involucra a las proteínas SNARE y muy probablemente a las calpaínas.

Los resultados de esta última parte del trabajo apoyan la idea de que el defecto enzimático que ocurre en la diabetes tipo 2, no sólo sucede en aquellos órganos relacionados directamente con la homeostasis de la glucosa (páncreas, hígado, tejido adiposo, y músculo), sino que también puede ocurrir en otro tipo de células, como los linfocitos.

Las calpaínas en particular, son un caso interesante debido a que participan en la genética y en la patogénesis de la diabetes tipo 2 y el hecho de que se puedan estudiar en células que no requieren de métodos invasivos para su obtención, abre un amplio campo en el entendimiento de la diabetes.

A pesar de toda la información que brindan los datos presentados en este trabajo, se requieren de más estudios tanto *in vivo* como *in vitro* que complementen los mecanismos de acción



propuestos por los cuales el arsénico es un factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes tipo 2 . De igual manera, una mayor caracterización de las calpaínas en los linfocitos y con un número mayor de individuos ayudarían a establecer al linfocito como un modelo para el estudio de la participación de las calpaínas en la diabetes tipo 2.

## CONCLUSIONES

El arsenito de sodio produce disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas de rata *in vitro*, siendo los efectos dependientes de la dosis.

La exposición a dosis bajas de arsenito de sodio (1-2  $\mu\text{M}$ ) por un periodo de 72 horas disminuye a manera de dosis respuesta la secreción de insulina, sin afectar de forma sustancial y significativa la viabilidad de las células  $\beta$  de rata, lo que ocasiona que las células pierdan su sensibilidad a la concentración extracelular de glucosa.

Dicha disminución en la secreción de insulina no se debe a un decremento en la biosíntesis de la hormona, sino que ocurre por una baja en las oscilaciones de la concentración del calcio intracelular libre entre la condición basal y estimulante de glucosa (5.6 y 15.6 mM, respectivamente).

La reducción en las concentraciones del calcio intracelular libre entre las dos concentraciones extracelulares de glucosa ocasionadas por el arsenito de sodio, producen un decremento en la proteólisis parcial de la proteína SNAP25, llevada a cabo por las proteasa de cisteína dependiente de calcio, calpaína-10. La disminución en la proteólisis de SNAP25 explicaría la reducción en la secreción de insulina, ya que ambas proteínas forman parte de la maquinaria de secreción.

Dosis mayores de arsenito de sodio (5  $\mu\text{M}$ ) reducen la expresión del gen de insulina acompañado de un descenso en la viabilidad celular. En el caso de la línea celular RINm5F con esta dosis se observan cambios morfológicos y a partir de 2  $\mu\text{M}$  ocurre un arresto celular en la fase G2/M y como consecuencia una disminución en el índice mitótico y de replicación.

El porcentaje de funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas de sujetos con diabetes tipo 2 se asocia de manera significativa con la concentración de arsénico total excretado en la orina como marcador de exposición a dicho metaloide. A mayor exposición al arsénico, la funcionalidad de las células  $\beta$  disminuye, siguiendo un patrón de decaimiento exponencial. En el caso de los sujetos sin la enfermedad, a pesar de que la asociación no fue estadísticamente significativa, se observa una tendencia inversa y lineal entre la concentración de arsénico excretado en la orina y la funcionalidad de las células  $\beta$ .

Por el contrario, la sensibilidad a la insulina no mostró relación con la excreción de arsénico total en la orina en ninguno de los dos grupos de individuos analizados (sujetos con y sin diabetes tipo 2).

Sujetos no diabéticos con los genotipos de riesgo en los SNPs asociados con la diabetes tipo 2 en el gen de calpaína-10 (SNP 43 G/G y SNP 44 C/T) mostraron un menor porcentaje de funcionalidad de las células  $\beta$ . La asociación del genotipo del SNP 43 con dicha funcionalidad celular desapareció al ajustar por otros factores de riesgo, incluyendo la exposición al arsénico. Por el contrario para el SNP 44 la asociación fue independiente de los otros factores analizados (edad, sexo, IMC y exposición al arsénico).

En conjunto estos resultados aportan evidencia de que el arsénico es un factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes tipo 2, siendo uno de sus mecanismos de acción la disfuncionalidad de las células  $\beta$ , particularmente reduciendo la secreción de insulina. Los resultados *in vitro* muestran plausibilidad biológica sobre el mecanismo por el cual el arsenito disminuye la secreción de insulina, lo cual brinda elementos que explican la evidencia epidemiológica. El estudio piloto realizado en humanos, por su parte, apoya la idea establecida con los experimentos *in vitro*.

El linfocito humano muestra potencial para ser utilizado como modelo celular en el estudio de las calpaínas en la diabetes tipo 2, en particular mediante el análisis enzimático.

La actividad de las calpaínas en los linfocitos de los donadores diabéticos fue menos sensible a la concentración extracelular de glucosa, sin diferencias en la expresión de calpaína-10.

## PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en nuestro grupo abren un gran campo de estudio en el entendimiento del mecanismo pancreático por el cual el arsénico actúa como factor de riesgo para la diabetes tipo 2, tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*, no obstante, aún quedan preguntas importantes por contestar.

Sería de gran relevancia estudiar si el efecto del arsenito sobre la secreción de insulina es reversible, así como conocer si el arsenito además de alterar algunos de los eventos distales que ocurren para que la insulina sea secretada (cambios en la concentración de calcio intracelular libre, proteólisis y activación de proteínas que componen la maquinaria de secreción), también altera eventos próximos del acoplamiento entre la estimulación con glucosa y la secreción de insulina (entrada de glucosa a la célula, glucólisis, ciclo de Krebs) . En base a los efectos conocidos del arsenito, habría que determinar en primer lugar si el arsenito a dosis bajas impide la entrada de glucosa a las células.

Otro de los eventos que sería interesante determinar es si la disminución en la secreción de insulina por arsenito también es una consecuencia de la interferencia del proceso de remodelación de los microtúbulos y de actina presentes en las células  $\beta$  que ocurren para permitir la liberación de la hormona.

Mientras que la línea celular RINm5F no es muy sensible a la glucosa extracelular y sería complicado la obtención del número de células  $\beta$  de rata aisladas que se requiere para llevar a cabo la mayoría de los experimentos que fueron realizados en las células RINm5F, así como los aquí propuestos, sería interesante corroborar los resultados en otras líneas celulares de roedor, tales como las MIN6 y/o las BRIN-BD11.

La actividad enzimática de las calpaínas evaluada tanto en las células  $\beta$  de rata como en los linfocitos humanos seguramente no corresponde únicamente a la calpaína-10, sino también a la calpaínas 1 y 2 y probablemente a otros miembros de la familia de las calpaínas de los cuales aún se desconoce su expresión en estas células. De tal forma que una manera de enriquecer los datos obtenidos, sería mediante la inhibición específica de la calpaína-10 con RNA de interferencia.

El linfocito humano muestra tener potencial para ser utilizado como modelo celular para el estudio de la diabetes, en particular a través de las calpaínas, sin embargo, la muestra de individuos analizada fue muy pequeña. De tal manera que ampliar el número de sujetos ayudaría a validar al linfocito como modelo para el estudio de ciertos marcadores diabetogénicos, como las calpaínas.

Finalmente esta validación del linfocito, permitiría también estudiar a sujetos expuestos naturalmente a concentraciones elevadas de arsénico, ya que las calpaínas además de estar involucradas en la secreción de insulina y en la captura de glucosa dependiente de insulina, también parecen ser afectadas por el arsenito.

Un estudio de epidemiología molecular con un grupo de sujetos sanos y con diabetes tipo 2 con y sin exposición al arsénico respectivamente brindaría información interesante.

## Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic $\beta$ -cells

Andrea Díaz-Villaseñor<sup>a</sup>, M. Carmen Sánchez-Soto<sup>b</sup>, Mariano E. Cebrián<sup>c</sup>,  
Patricia Ostrosky-Wegman<sup>a</sup>, Marcia Hiriart<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

<sup>b</sup> Department of Biophysics, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, A.P. 70-253 Coyoacán, México D.F. 04510, México

<sup>c</sup> Section of Environmental Toxicology, CINVESTAV, IPN, Mexico City, México

Received 2 September 2005; revised 22 November 2005; accepted 28 November 2005

Available online 18 January 2006

### Abstract

Human studies have shown that chronic inorganic arsenic (iAs) exposure is associated with a high prevalence and incidence of type 2 diabetes. However, the mechanism(s) underlying this effect are not well understood, and practically, there is no information available on the effects of arsenic on pancreatic  $\beta$ -cells functions. Thus, since insulin secreted by the pancreas plays a crucial role in maintaining glucose homeostasis, our aim was to determine if sodium arsenite impairs insulin secretion and mRNA expression in single adult rat pancreatic  $\beta$ -cells.

Cells were treated with 0.5, 1, 2, 5 and 10  $\mu$ M sodium arsenite and incubated for 72 and 144 h. The highest dose tested (10  $\mu$ M) decreased  $\beta$ -cell viability, by 33% and 83%, respectively.

Insulin secretion and mRNA expression were evaluated in the presence of 1 and 5  $\mu$ M sodium arsenite. Basal insulin secretion, in 5.6 mM glucose, was not significantly affected by 1 or 5  $\mu$ M treatment for 72 h, but basal secretion was reduced when cells were exposed to 5  $\mu$ M sodium arsenite for 144 h. On the other hand, insulin secretion in response to 15.6 mM glucose decreased with sodium arsenite in a dose-dependent manner in such a way that cells were no longer able to distinguish between different glucose concentrations. We also showed a significant decrease in insulin mRNA expression of cells exposed to 5  $\mu$ M sodium arsenite during 72 h.

Our data suggest that arsenic may contribute to the development of diabetes mellitus by impairing pancreatic  $\beta$ -cell functions, particularly insulin synthesis and secretion.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Insulin; Diabetes; Sodium arsenite; Beta-cell function

### Introduction

Drinking water contaminated with inorganic arsenic (iAs) is a public health problem in many countries (Cebrián et al., 1994; Yoshida et al., 2004). The presence of this metalloid in the environment is due to natural or anthropogenic sources. Oral exposures occur through drinking contaminated water, seafood, and soil, whereas inhalation of arsenic compounds can occur when exposed to burning fossil fuels or in mining, smelting, microelectronics, and agriculture (Goering et al., 1999) related

occupations. Arsenic has been classified as a human carcinogen, increasing the risk of skin, lung, bladder, liver, and kidney tumors (International Agency for Research on Cancer, 1987; Goering et al., 1999). In addition to its carcinogenic effects, chronic iAs exposure has been associated to peripheral vascular diseases, nonmalignant skin lesions, hypertension, cardiovascular diseases, neurological effects, and diabetes mellitus (Carter et al., 2003).

Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells and/or insulin action, also known as insulin resistance. In type 2 diabetes (previously referred to as non-insulin-dependent diabetes mellitus—NIDDM), both

\* Corresponding author. Fax: +52 55 56225607.

E-mail address: [mhiriart@ifc.unam.mx](mailto:mhiriart@ifc.unam.mx) (M. Hiriart).

characteristics frequently coexist, and it is often unclear which abnormality, if either alone, is the primary cause of the hyperglycemia (American Diabetes Association, 2005). The signal transduction pathway needed for the coupling of glucose metabolism to insulin release in  $\beta$ -cells begins with the entrance of glucose by non-insulin-dependent transporters (GLUT2) followed by glycolysis that in turn elevates the ATP/ADP ratio. This increase in the ratio leads to the closure of the ATP-sensitive potassium channel (responsible of maintaining the resting potential of the membrane), and consequently, the cell membrane is depolarized, increasing the opening probability of the voltage-dependent calcium channels. Calcium flux through the channels finally triggers exocytosis of insulin (Maechler and Wollheim, 2001).

The relationship between iAs exposure and diabetes has been reported in environmental and occupationally exposed subjects. Cross-sectional studies carried out in the blackfoot disease area of Taiwan indicated that arsenic exposure from drinking artesian well water is associated with the prevalence and incidence of diabetes mellitus in a dose-responsive pattern (Lai et al., 1994; Tseng et al., 2000a). In a 4-year prospective study also carried out in Taiwan, the incidence of type 2 diabetes was two to five times higher in people exposed to iAs in drinking water than in non-exposed subjects (Tseng et al., 2000b).

In Bangladesh, the prevalence of diabetes among arsenic-exposed subjects suffering keratosis was about five times higher than in less exposed subjects (Rahman et al., 1998). The association was further supported by case-control studies carried out in Sweden of death records of copper smelters and glass workers, which revealed a trend of increasing diabetes with increasing inhalation arsenic exposure (Rahman and Axelson, 1995; Rahman et al., 1996). Among the potential mechanisms by which arsenic induces diabetes mellitus comprehensively reviewed by Tseng (2004), the inhibition of insulin-dependent glucose uptake by peripheral tissues induced by trivalent arsenicals has received wide attention as a possible mechanism for arsenic-induced type 2 diabetes (Walton et al., 2004). However, since  $\beta$ -cell dysfunction also plays an important role in the onset of type 2 diabetes, the aim of this work was to determine if sodium arsenite impairs mRNA expression and insulin secretion in response to glucose in isolated rat pancreatic  $\beta$ -cells.

## Materials and methods

Reagents were obtained from the following sources: collagenase type IV from Worthington (Freehold, NJ); bovine serum albumin, Hank's balanced salt solution, HEPES, trypsin, Ficoll type 400, trypan blue, L-glutamine, poly-L-lysine, fluorescein diacetate (FDA), ethidium bromide, sodium arsenite and glucose from Sigma (St. Louis, MO); fetal bovine serum (FBS) from Equitech-Bio (Ingram, TX); RPMI-1640 salts, agarose, TRIzol reagent and antibiotic solution from Life Technologies (Grand Island, NY); ultra-sensitive rat insulin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit from Alpco Diagnostics (Windham, NH), Bradford Protein Assay from Bio-Rad (Hercules, CA) and GeneAmp RNA PCR Kit from Applied biosystems (Foster, CA).

**Pancreatic  $\beta$ -cell culture.** Animal care was performed in accordance with the Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology. Young adult male

Wistar rats (250–280 g) were obtained from the local animal facility, maintained in a 14-h light:dark cycle (0600–2000)/10 h, and allowed free access to standard laboratory rat diet and tap water. Animals were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg), pancreas was excised, and animals were later killed by cervical dislocation. Four to 6 animals in each experiment were used to obtain  $\beta$ -cells. Pancreatic  $\beta$ -cells were obtained with collagenase digestion, Ficoll gradient centrifugation, and mechanical dissociation in calcium-free solution, as previously described (Rosenbaum et al., 2001). Single cells were cultured in RPMI-1640-supplemented medium (11.6 mmol/l glucose, 100 units/ml penicillin G, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 0.25  $\mu$ g/ml amphotericin B, 2 mM L-glutamine) with 10% of FBS for 13 h approximately to recover from the isolation procedures and were maintained at 37 °C, in a humidified incubator (5% CO<sub>2</sub>). Islets cells were seeded in tissue culture dishes in the following conditions:  $6.2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> for viability assays and  $2.6 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> for secretion and mRNA experiments in RPMI-1640-supplemented medium with 1% FBS. For secretion and mRNA assays, the wells were previously treated with poly-L-lysine.

**Sodium arsenite treatments.** For viability determination, cells were exposed to 0.5, 1, 2, 5, and 10  $\mu$ M sodium arsenite and incubated for 72 or 144 h. For further experiments, cells were treated with 1 and 5  $\mu$ M of sodium arsenite.

**Cell viability.** Cell viability was determined by a fluorochrome-mediated viability assay (Hartmann and Speit, 1996). Briefly, after arsenic exposure cells were collected by trypsinization, mixed 1:1 (v/v) with an FDA/ethidium bromide solution and analyzed on a fluorescence BX60 Olympus microscope Ex 485–550 nm, Em 538–590 nm (UMNG filter). The experiments were done by duplicate, and nearly 200 cells were counted per experimental condition.

**Insulin secretion assay and quantification.** After 72 and 144 h of arsenic exposure, the cells were switched to low glucose medium (5.6 mmol/l) for 30 min. Cells were challenged to secrete insulin in 5.6 or 15.6 mmol/l glucose for 1 h. Supernatants were collected, centrifuged, and frozen at –70 °C until used. Cells were lysed and frozen at –70 °C until protein quantification. Released insulin was measured by ELISA following the protocols indicated by the manufacturer.

**Semi-quantitative RT-PCR.** Cells were lysed in the culture dishes, and total RNA was extracted using TRIzol. RT-PCR was performed according to the protocol recommended by the supplier. Briefly, cDNA synthesis was carried out with 66 ng of total RNA. Insulin and GAPDH housekeeping gene amplification was carried out for 15 and 20 cycles, respectively. The oligonucleotides used to prime the amplification of the cDNA templates were reported elsewhere (Navarro-Tableros et al., 2004). The annealing temperature was 56 °C, and the amplified products were visualized by ethidium bromide staining on a 1.5% agarose gel electrophoresis. Quantification of the RT-PCR products was determined by optical densitometry and analyzed using the Quantity One 4.1.1 software (Bio-Rad).

**Statistical analysis.** All data are reported as means  $\pm$  SE of independent experiments carried out in different cultures, as is indicated in each figure (*n*). The statistical significance for viability assays was obtained with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Scheffé posttest and for insulin secretion and mRNA experiments, statistical significance was evaluated by ANOVA followed by Fisher's posttest (Statview 4.57; Cary, NC).  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### *Viability of single pancreatic $\beta$ -cells after sodium arsenite exposure*

Viability of single  $\beta$ -cells exposed to increasing sodium arsenite concentrations (0–10  $\mu$ M) during 72 and 144 h is shown in Fig. 1. Arsenite doses  $\leq 5$   $\mu$ M for 72 h did not

significantly reduce cell viability, whereas the highest dose tested (10  $\mu$ M) decreased  $\beta$ -cell viability to 67%. Viability of cells exposed at doses  $\leq 2$   $\mu$ M for 144 h was not significantly different from that at 72 h (91 and 93%, respectively). However at 144 h, a decrease to 77% was observed with 5  $\mu$ M followed by a considerable reduction to 17% with 10  $\mu$ M. This last dose also statistically differs between the two time exposures.

#### Sodium arsenite decreases insulin secretion

Insulin secretion was evaluated after treating  $\beta$ -cells with 1 and 5  $\mu$ M sodium arsenite during 72 and 144 h. After 72 or 144 h in culture with sodium arsenite, cells were challenged with 5.6 and 15.6 mmol/l glucose for 1 h. Fig. 2A shows that basal insulin secretion (5.6 mmol/l glucose) was not significantly modified by the 72 h treatment, whereas glucose-stimulated insulin secretion (15.6 mmol/l) decreased in a dose-dependent manner by 26 and 62% after treatment with 1  $\mu$ M or 5  $\mu$ M sodium arsenite, respectively. Moreover, arsenite-treated cells were no longer able to distinguish between the two concentrations of glucose, since insulin release in both glucose concentrations was similar.

After 144 h in culture, control cells secreted similar amounts of insulin in response to different glucose concentrations, as previously observed (Vidaltamayo et al., 1996). The effects of 1  $\mu$ M sodium arsenite on basal and stimulated insulin secretion were not significantly enhanced by the longer treatment. However, when cells were cultured with 5  $\mu$ M sodium arsenite during 144 h, basal and stimulated insulin secretion decreased by 54 and 72%, respectively (Fig. 2B). Exposure of  $\beta$ -cells to 5  $\mu$ M sodium arsenite for 72 h did not alter basal insulin secretion, but exposure for 144 h substantially reduced the hormone release. When the treatment was

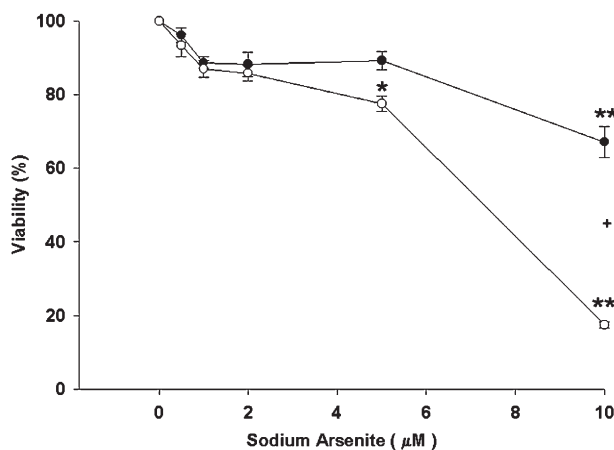


Fig. 1. Effects of sodium arsenite on rat pancreatic  $\beta$ -cell viability. Cells treated for 72 h (black circles) and 144 h (white circles) with 0.5, 1, 2, 5, and 10  $\mu$ M sodium arsenite. Data represent the mean  $\pm$  SE,  $n = 3$  by duplicate, values were normalized to control cells. Symbols denote statistically significant differences with respect to control cells in each exposure time: \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$  and between the two periods  $^{\dagger}P < 0.001$ .

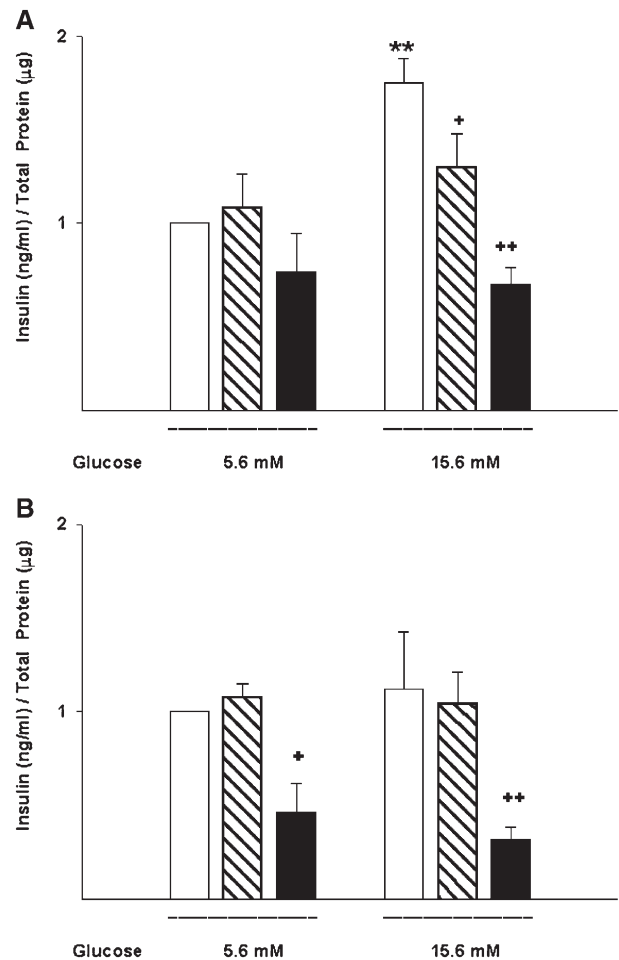


Fig. 2. Sodium arsenite decreases insulin secretion. Rat pancreatic  $\beta$ -cells were cultured under control conditions (white bars), 1  $\mu$ M sodium arsenite (striped bars) or 5  $\mu$ M sodium arsenite (black bars) for 72 h (A) or 144 h (B). Data represent the mean  $\pm$  SE,  $n = 5$  or 4 (72 and 144 h, respectively). Data were normalized to values of control cells in 5.6 mmol/l glucose. Symbols denote statistically significant differences: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  with respect to control cells in each glucose concentration or \*\* $P < 0.01$  between each arsenite treatment.

extended from 72 to 144 h, basal insulin secretion by cells treated with 5  $\mu$ M sodium arsenite was reduced by 38%, whereas glucose stimulated insulin secretion was decreased by 54% (Figs. 2A and B).

#### Effects of sodium arsenite on insulin mRNA levels

Insulin mRNA levels were decreased by 61% in cells treated with 5  $\mu$ M sodium arsenite for 72 h, whereas no significant effects were observed after treatment with 1  $\mu$ M (Figs. 3A and B). Due to the impairment of insulin secretion at 144 h, insulin mRNA levels were not measured.

#### Discussion

The main finding of this study is that sodium arsenite produces  $\beta$ -cell dysfunction. Islet cells treated with low concentrations of sodium arsenite secreted less insulin, an effect



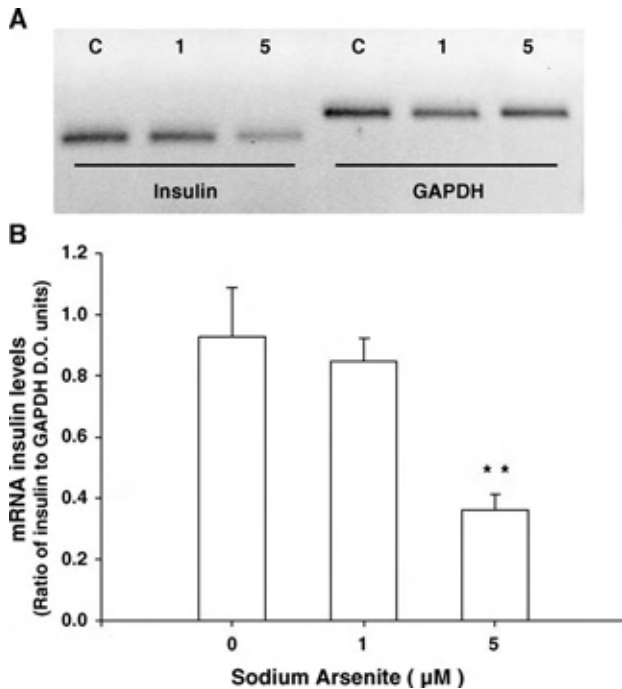


Fig. 3. Insulin mRNA levels in rat pancreatic  $\beta$ -cells treated with sodium arsenite for 72 h. Representative experiment of RT-PCR insulin and GAPDH products from  $\beta$ -cells cultured in control conditions (C), 1  $\mu$ M sodium arsenite (1) or 5  $\mu$ M sodium arsenite (5) (A). Densitometric quantification of mRNA insulin normalized to the housekeeping gene GAPDH (B). Data are the mean  $\pm$  SE,  $n = 4$ . Symbols denote statistically significant differences  $**P < 0.01$  with respect to control cells.

partially explained by decreases in insulin mRNA expression. Moreover, arsenite-treated cells lost their capability to distinguish between two different extracellular glucose concentrations, secreting similar amounts of insulin when exposed to 5.6 mM (basal) or 15.6 mM glucose.

Cell viability was not significantly reduced in the presence of  $\leq 5 \mu$ M sodium arsenite during 72 h, but 10  $\mu$ M reduced viability by nearly 33%. To explore  $\beta$ -cell function and insulin expression, 1 and 5  $\mu$ M sodium arsenite were used.

Treatment of  $\beta$ -cells with 1  $\mu$ M arsenite reduced stimulated insulin secretion, impairing their ability to secrete more insulin in response to higher glucose concentrations. Similar secretory effects were observed with 5  $\mu$ M arsenite, however, in this case, insulin mRNA levels were also diminished. One  $\mu$ M sodium arsenite could be disrupting the ability of  $\beta$ -cells to sense glucose, the transduction signals needed to couple the stimulus with secretion, the secretion machinery itself, and/or the transcription of genes involved in all these processes without interfering with the insulin gene directly.

The reduction in insulin secretion in response to basal and stimulated glucose concentrations observed at 144 h with 5  $\mu$ M arsenite could be explained by a decrease in viability, however, only a 23% reduction was observed. Given that mRNA was affected from 72 h of exposure, another possible explanation could be at this level. We did not further characterized insulin mRNA at 144 h because we found that even control cells did not distinguished between the different glucose concentrations. In our condition, islet

cells were functionally impaired when cultured for 144 h, thus not being an appropriate model to assess subtoxic effects.

Several studies have shown that iAs modifies gene expression patterns (Rea et al., 2003; Cui et al., 2004), including genes involved in maintaining glucose homeostasis. Arsenite (0.3–3.0  $\mu$ M) has been shown to affect the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), the rate-limiting enzyme in the gluconeogenesis pathway (Kaltreider et al., 2001). Arsenite treatment (6  $\mu$ M) was also shown to decrease the transcription factor PPAR $\gamma$  expression, which is required for adipogenesis (Wauson et al., 2002), and also played an important role in the control of insulin sensitivity and glucose homeostasis (Barroso et al., 1999). Here, we demonstrate that the insulin gene, whose regulation and expression is crucial for insulin secretion and type 2 diabetes development, is also an arsenite target.

One crucial feature of type 1 diabetes is the nearly total  $\beta$ -cell destruction leading to an absolute lack of insulin. In contrast, in type 2 diabetes, the decrease in  $\beta$ -cell mass is partial (Butler et al., 2003), insulin resistance might exist, and insulin deficiency is relative (American Diabetes Association, 2005). Since blood arsenic values observed in exposed human individuals are in the range of 0.6 to 1  $\mu$ M (Vahter, 1998; Wu et al., 2003), our data suggest that chronic exposure to arsenic could alter  $\beta$ -pancreatic functions, like insulin secretion.

Other cells, mainly adipocytes, had been used to evaluate arsenic diabetogenic effects such as glucose uptake; nevertheless, the data are still controversial (Bazuine et al., 2003; Walton et al., 2004).

Thus, the effects of arsenic both altering pancreatic  $\beta$ -cell function and glucose uptake in peripheral tissues, which resemble type 2 diabetes, suggest that these mechanisms play an important role in the increased incidence of type 2 diabetes observed in populations chronically exposed to iAs. Further studies on the insulin secretion and resistance in exposed individuals are needed. Moreover, type 2 diabetes is currently one of the main threats to human health worldwide, and its incidence is increasing even in children and adolescents (Zimmet et al., 2001). After obesity, arsenic may represent one of the most important preventable risk factors for the development of this disease.

## Acknowledgments

This work was partially supported by CONACyT (No. 44773-M) and DGAPA (UNAM).

## References

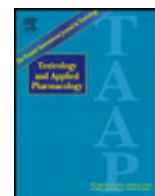
- American Diabetes Association, 2005. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 28 (Suppl. 1), S37–S42.
- Barroso, I., Gurnell, M., Crowley, V.E., Agostini, M., Schwabe, J.W., Soos, M.A., Maslen, G.L., Williams, T.D., Lewis, H., Schafer, A.J., Chatterjee, V.K., O'Rahilly, S., 1999. Dominant negative mutations in human PPAR $\gamma$  associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402, 880–883.
- Bazuine, M., Ouwens, D.M., Gomes de Mesquita, D.S., Maassen, J.A., 2003. Arsenite stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes involves both Glut4 translocation and p38 MAPK activity. *Eur. J. Biochem.* 270, 3891–3903.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., Butler, P.C.,

2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102–110.
- Carter, D.E., Aposhian, H.V., Gandolfi, A.J., 2003. The metabolism of inorganic arsenic oxides, gallium arsenide, and arsine: a toxicochemical review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 193, 309–334.
- Cebrian, M.E., Albores, A., García-Vargas, G., Del Razo, L.M., Ostrosky-Wegman, P., 1994. Chronic arsenic poisoning in humans: the case of Mexico. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Arsenic in the Environment, Part II: Human Health and Ecosystem Effects*. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 93–107.
- Cui, X., Li, S., Shraim, A., Kobayashi, Y., Hayakawa, T., Kanno, S., Yamamoto, M., Hirano, S., 2004. Subchronic exposure to arsenic through drinking water alters expression of cancer-related genes in rat liver. *Toxicol. Pathol.* 32, 64–72.
- Goering, P.L., Aposhian, H.V., Mass, M.J., Cebrian, M., Beck, B.D., Waalkes, M.P., 1999. The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicol. Sci.* 49, 5–14.
- Hartmann, A., Speit, G., 1996. Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 27, 98–104.
- International Agency for Research on Cancer, 1987. Overall evaluations of carcinogenicity: an update of IARC Monographs. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 1–42, 173–259.
- Kaltreider, R.C., Davis, A.M., Lariviere, J.P., Hamilton, J.W., 2001. Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. *Environ. Health Perspect.* 109, 245–251.
- Lai, M.S., Hsueh, Y.M., Chen, C.J., Shyu, M.P., Chen, S.Y., Kuo, T.L., Wu, M.M., Tai, T.Y., 1994. Ingested inorganic arsenic and prevalence of diabetes mellitus. *Am. J. Epidemiol.* 139, 484–492.
- Maechler, P., Wollheim, C.B., 2001. Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* 414, 807–812.
- Navarro-Tableros, V., Sanchez-Soto, M.C., Garcia, S., Hiriart, M., 2004. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 53, 2018–2023.
- Rahman, M., Axelson, O., 1995. Diabetes mellitus and arsenic exposure: a second look at case-control data from a Swedish copper smelter. *Occup. Environ. Med.* 52, 773–774.
- Rahman, M., Wingren, G., Axelson, O., 1996. Diabetes mellitus among Swedish art glass workers—an effect of arsenic exposure? *Scand. J. Work Environ. Health* 22, 146–149.
- Rahman, M., Tondel, M., Ahmad, S.A., Axelson, O., 1998. Diabetes mellitus associated with arsenic exposure in Bangladesh. *Am. J. Epidemiol.* 148, 198–203.
- Rea, M.A., Gregg, J.P., Qin, Q., Phillips, M.A., Rice, R.H., 2003. Global alteration of gene expression in human keratinocytes by inorganic arsenic. *Carcinogenesis* 24, 747–756.
- Rosenbaum, T., Sanchez-Soto, M.C., Hiriart, M., 2001. Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 50, 1755–1762.
- Tseng, C.H., 2004. The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 197, 67–83.
- Tseng, C.H., Chong, C.K., Heng, L.T., Tseng, C.P., Tai, T.Y., 2000a. The incidence of type 2 diabetes mellitus in Taiwan. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 50 (Suppl 2), S61–S64.
- Tseng, C.H., Tai, T.Y., Chong, C.K., Tseng, C.P., Lai, M.S., Lin, B.J., Chiou, H.Y., Hsueh, Y.M., Hsu, K.H., Chen, C.J., 2000b. Long-term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort study in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. *Environ. Health Perspect.* 108, 847–851.
- Vahter, M.E., 1998. Arsenic. In: Clarkson, T.W., Friberg, L., Nordberg, G.F., Sager, P.R. (Eds.), *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Plenum Press, New York, pp. 303–321.
- Vidaltamayo, R., Sánchez-Soto, M.C., Rosenbaum, T., Martínez-Merlos, T., Hiriart, M., 1996. Neuron-like phenotypic changes in pancreatic beta-cells induced by NGF, FGF and dbcAMP. *Endocrine* 4, 19–26.
- Walton, F.S., Harmon, A.W., Paul, D.S., Drobna, Z., Patel, Y.M., Styblo, M., 2004. Inhibition of insulin-dependent glucose uptake by trivalent arsenicals: possible mechanism of arsenic-induced diabetes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 424–433.
- Wauson, E.M., Langan, A.S., Vorce, R.L., 2002. Sodium arsenite inhibits and reverses expression of adipogenic and fat cell-specific genes during in vitro adipogenesis. *Toxicol. Sci.* 65, 211–219.
- Wu, M.M., Chiou, H.Y., Ho, I.C., Chen, C.J., Lee, T.C., 2003. Gene expression of inflammatory molecules in circulating lymphocytes from arsenic-exposed human subjects. *Environ. Health Perspect.* 111, 1429–1438.
- Yoshida, T., Yamauchi, H., Fan Sun, G., 2004. Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 243–252.
- Zimmer, P., Alberti, K.G., Shaw, J., 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782–787.



Contents lists available at ScienceDirect

## Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ytaap](http://www.elsevier.com/locate/ytaap)

# Arsenite reduces insulin secretion in rat pancreatic $\beta$ -cells by decreasing the calcium-dependent calpain-10 proteolysis of SNAP25

Andrea Díaz-Villaseñor<sup>a</sup>, Anna L. Burns<sup>a,b</sup>, Ana María Salazar<sup>a</sup>, Monserrat Sordo<sup>a</sup>, Marcia Hiriart<sup>c</sup>, Mariano E. Cebrián<sup>d</sup>, Patricia Ostrosky-Wegman<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>b</sup> Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>c</sup> Department of Biophysics, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>d</sup> Section of Environmental Toxicology, CINVESTAV, IPN, Mexico

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 11 March 2008

Revised 15 May 2008

Accepted 17 May 2008

Available online xxxxx

### Keywords:

Arsenic

Calcium

Calpains

Insulin

Type 2 diabetes

SNAP-25

## ABSTRACT

An increase in the prevalence of type 2 diabetes has been consistently observed among residents of high arsenic exposure areas. We have previously shown that in rat pancreatic  $\beta$ -cells, low arsenite doses impair the secretion of insulin without altering its synthesis. To further study the mechanism by which arsenite reduces insulin secretion, we evaluated the effects of arsenite on the calcium-calpain pathway that triggers insulin exocytosis in RINm5F cells. Cell cycle and proliferation analysis were also performed to complement the characterization. Free  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations needed for glucose-stimulated insulin secretion were abated in the presence of subchronic low arsenite doses (0.5–2  $\mu$ M). The global activity of calpains increased with 2  $\mu$ M arsenite. However, during the secretion of insulin stimulated with glucose (15.6 mM), 1  $\mu$ M arsenite decreased the activity of calpain-10, measured as SNAP-25 proteolysis. Both proteins are needed to fuse insulin granules with the membrane to produce insulin exocytosis. Arsenite also induced a slowdown in the  $\beta$  cell line proliferation in a dose-dependent manner, reflected by a reduction of dividing cells and in their arrest in G2/M. Data obtained showed that one of the mechanisms by which arsenite impairs insulin secretion is by decreasing the oscillations of free  $[Ca^{2+}]_i$ , thus reducing calcium-dependent calpain-10 partial proteolysis of SNAP-25. The effects in cell division and proliferation observed with arsenite exposure can be an indirect consequence of the decrease in insulin secretion.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Arsenic exposure occurs in millions of people worldwide through the drinking of contaminated water, whereas a lower proportion of individuals are occupationally exposed (Jones, 2007). An increase in the prevalence of type 2 diabetes has been observed consistently among residents of high inorganic arsenic exposure areas in countries like Bangladesh, Taiwan and Mexico (Lai et al., 1994; Rahman et al., 1998; Rahman, 1999; Tsai et al., 1999; Tseng et al., 2000; Wang et al., 2003; Coronado-González et al., 2007). Few experimental studies have been carried out and two mammal models have been developed with the purpose of finding the mechanisms of arsenic-induced diabetes (Izquierdo-Vega et al., 2006; Paul et al., 2007).

Experimental studies focusing in analyzing insulin sensitivity in peripheral tissue (mainly adipocytes) showed that subtoxic arsenite concentrations, as well as organic mono and dimethylated trivalent arsenicals, inhibited insulin-stimulated glucose uptake in a dose-

dependent manner. This effect is due to a decreased translocation of the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 to cellular membranes (Walton et al., 2004). Other studies have focused on the inhibition of adipogenesis by arsenic through the alteration of fat-cell specific genes (Trouba et al., 2000; Wauson et al., 2002).

In pancreas, it has been shown that arsenic causes stress and oxidative damage (Izquierdo-Vega et al., 2006) as well as alterations in insulin secretion (Díaz-Villaseñor et al., 2006).

We have previously shown that arsenite treatment impairs insulin transcription and secretion in rat pancreatic  $\beta$ -cells. Insulin gene transcription is reduced with arsenite doses  $\geq 5$   $\mu$ M, whereas the glucose-stimulated secretion of the hormone is decreased in a dose-dependent manner starting at 1  $\mu$ M arsenite. Base-line insulin secretion (at 5.6 mM glucose) is diminished only at higher arsenite doses (5  $\mu$ M). These data suggest that at lower doses, arsenite may interfere with the cells' ability to sense glucose, the transduction signals needed to couple the glucose stimulus with secretion or with the secretion machinery itself, also referred as the proximal and distal events (MacDonald et al., 2005), but not with hormone synthesis.

Calpains (calcium-dependent cysteine proteases) are involved in type 2 diabetes pathogenesis, participating in the secretion and action

\* Corresponding author. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Circuito Escolar, Cd. Universitaria, Coyoacan 04510 México, DF, Mexico. Fax: +52 55 56 22 31 57. E-mail address: [ostrosky@servidor.unam.mx](mailto:ostrosky@servidor.unam.mx) (P. Ostrosky-Wegman).

of insulin (Turner, 2007). In pancreatic  $\beta$ -cells they regulate exocytosis at different levels (Ort et al., 2001; Sreenan et al., 2001; Zhou et al., 2003; Marshall et al., 2005; Parnaud et al., 2005). In particular, it has been postulated that one calpain-10 isoform is a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor that functions to trigger exocytosis by the partial proteolysis of a member of the secretory machinery, SNAP-25 (Marshall et al., 2005).

To understand the mechanism by which subchronic low arsenite doses decrease insulin secretion in  $\beta$ -cells, the present study focuses on analyzing the calcium-calpain pathway coupled to a secretory granule fusion machinery protein and on the effects upon cell cycle and proliferation.

## Materials and methods

Reagents were obtained from the following sources: trypsin, trypan blue, L-glutamine, sodium arsenite, ethidium bromide, fluorescein diacetate, Igepal, EGTA, Hepes, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdUrd), propidium iodide and Aprotinin from Sigma; glucose and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  from Merck; RNase from Qiagen; fetal bovine serum (FBS) from Equitech-Bio; RPMI-1640 salts, agarose, TRIZOL, bovine albumin fraction V (BSA-V), colcemid and antibiotic/antimycotic solution from Life Technologies; ultra-sensitive rat insulin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit from Alpco Diagnostics; Lowry DC Protein Assay, Triton X-100, Tween®-20 from Bio-Rad; bovine serum albumin (BSA) from Santa Cruz Biotechnology; oligo-d(T)<sub>1248</sub>, M-MLV reverse transcriptase, Fluo3-AM and Pluronic F-127 from Invitrogen; CMAC-t-BOC-Leu-Met substrate from Molecular Probes; NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , KCl,  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{NaHCO}_3$  from J.T. Baker. Antibodies used were as follows: rabbit anti-calpain10 (CL1Calpain10) from Cedarlane, mouse anti-SNAP25 N-terminus from BD Biosciences (610366), rabbit anti-insulin (sc-9168), goat anti-SNAP25 C-terminus (sc-7538), goat anti-actin, anti-rabbit IgG-HRP and anti-mouse IgG-HRP from Santa Cruz Biotechnology.

**Cell culture.** RINm5F rat pancreatic  $\beta$ -cell line was cultured in RPMI-1640-supplemented medium (11.6 mM glucose, 100 units/ml penicillin G, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  amphotericin B, 2 mM L-glutamine) with 10% FBS (v/v), in a humidified incubator (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ). For experiments,  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> were seeded in this media overnight.

**Arsenite treatment.** Culture media was switched to RPMI-1640-supplemented medium with 1% FBS plus sodium arsenite (0, 0.5, 1, 2 and 5  $\mu\text{M}$ ). The sodium arsenite treatment was maintained for 72 h and replaced with fresh media and arsenite at the middle of the exposure (36 h approximately), reaching a final cell confluence of approximately 90%.

**Measure of cell survival.** After the 72 h of arsenite exposure, cell survival was determined by a fluorochrome-mediated viability assay with some modifications (Hartmann and Speit, 1996; Díaz-Villaseñor et al., 2006). Briefly, after washing the cells with PBS to eliminate dead cells and cellular debris the fluorescein diacetate solution was added (0.0317 mg/ml) and cells were incubated for 5 min in the dark. The viability was quantified per triplicate in a microplate fluorometer Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Vantaa Finland) (Ex: 485 nm, Em: 538 nm). The units of relative fluorescence of the control conditions correspond to 100% of the viability and from it the percentage of living cells for each experimental condition was obtained.

**Insulin secretion assay and quantification.** After 72 h of arsenite exposure, cells were switched to low glucose (5.6 mM) Krebs-Ringer Buffer (KRB) at pH 7.4 (125 mM NaCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 4.7 mM KCl, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  and 10 mM Hepes) for 30 min. Afterwards, cells were challenged to secrete insulin in 5.6 or 15.6 mM glucose for 1 h. Supernatants were collected, centrifuged, and frozen at -70 °C until used. Cells were lysed and frozen at -70 °C until protein quantification (DC Protein Assay). Released insulin was measured by ELISA insulin kit following the protocol indicated by the manufacturer.

**Semi-quantitative RT-PCR.** Cells were harvested after 72 h of exposure to arsenite by trypsinization and lysed for total RNA extraction using TRIZOL according to the protocol recommended by the supplier. Briefly, cDNA synthesis was carried out at 38 °C during 1 h with oligo-d(T)<sub>1248</sub>, M-MLV reverse transcriptase enzyme and with 300 ng of total RNA.

Calpain-10, insulin and GAPDH housekeeping gene amplifications were carried out with 66 ng for 35, 20 and 20 cycles to avoid the plateau phase of the reaction, with annealing temperatures of 60, 56 and 56 °C, respectively. The oligonucleotides used to prime the amplification of the cDNA templates were reported elsewhere (Ma et al., 2001; Navarro-Tableros et al., 2004). The amplified products were visualized by ethidium bromide staining on a 1.5% agarose gel electrophoresis. Quantification of the RT-PCR products was determined by optical densitometry and analyzed using the Quantity One 4.1.1 software (Bio-Rad).

**Western blotting.** Total protein extraction, quantification and immunoblots were realized according to Díaz-Villaseñor et al. (2007). Briefly, 20  $\mu\text{g}$  of total protein were loaded on 10 or 15% polyacrilamide gels (for calpain-10 an insulin, respectively), separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, blocked and incubated with primary antibodies overnight at 4 °C (calpain-10 1:5000 and insulin

1:1000). Afterwards, the blots were incubated with anti-rabbit IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase (1:3333). The blots were developed by the enhanced 140 chemiluminescence (ECL) method (Amersham) and exposed to an X-ray film. For data 141 normalization, membranes were incubated with anti-actin antibody diluted 1:1000. 142 Semi-quantification of the bands was carried out by optical densitometry and analyzed 143 using the Quantity One 4.1.1 software (Bio-Rad). 144

**Intracellular free calcium concentration assay.** Subsequent to the 72 h of arsenite 145 exposure, free  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was evaluated according to an AfCS procedure protocol with some 146 modifications (AfCS, 2002). Briefly, cells were incubated for 30 min (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ) in low 147 glucose KRB (5.6 mM) with 0.1% BSA-V followed by an extra half an hour incubation in the 148 dark with the same solution supplemented with the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive fluorescent dye, Fluo3- 149 AM and Pluronic F-127 (1:1) at a final concentration of 4  $\mu\text{M}$  and 10%, respectively. After 150 this period, cells were incubated in the KRB solution for 30 min to wash free extracellular 151 dye and  $1 \times 10^5$  cells were seeded per well in a 96-well black-plate per triplicate for each 152 glucose condition (5.6 and 15.6 mM). The free  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was quantified by fluorometry at 153 37 °C (Ex: 485 nm, Em: 538 nm) (Fluoroskan Ascent, Thermo Electron Corporation) in the 154 following manner: the basal fluorescence ( $F_{\text{basal}}$ ) was read for 10 min. Afterwards, glucose 155 was added to a group of triplicates to reach in the medium a final concentration of 15.6 mM 156 and fluorescence ( $F$ ) was read again for 10 min. To obtain the total fluorescence of dye at 157 saturating  $\text{Ca}^{2+}$ , 1% Igepal was added to release dye from the cells to measure maximum 158 fluorescence ( $F_{\text{max}}$ ). Finally, to obtain total fluorescence of dye in the absence of free  $\text{Ca}^{2+}$ , 0. 159 5 M EGTA was added to chelate it, so minimum fluorescence ( $F_{\text{min}}$ ) measurements could be 160 obtained. For these two cases, after the addition of the solutions, cells were incubated for 161 2 min and the fluorescence was obtained for 10 measurements at 10 s intervals, 162 respectively. The next formula was used to evaluate free  $[\text{Ca}^{2+}]_i = F_{\text{basal}} - (K_d \times (F - F_{\text{min}}) /$  163  $(F_{\text{max}} - F))$  where the  $K_d$  for Fluo-3 is assumed to be 390 nM. 164

**Calpain activity assay.** Calpain activity was measured according to Sreenan et al. 165 (2001) with some modifications. After 72 h of arsenite exposure, cells were incubated 166 for 30 min (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ) in low glucose KRB (5.6 mM). Then, cells were collected and 167 switched to low or high glucose KRB (5.6 and 15.6 mM, respectively) in the presence of 168 10  $\mu\text{M}$  calpain substrate CMAC-t-BOC-Leu-Met and  $1 \times 10^5$  cells were seeded per well in 169 a 96-well plate (per triplicate for each glucose condition). The activity of calpains was 170 quantified each minute by fluorometry at 37 °C (Ex: 355 nm, Em: 460 nm) (Fluoroskan 171 Ascent, Thermo Electron Corporation). The enzyme activity value was obtained from 172 the kinetic, analyzing the 40-60 min linear slope (Díaz-Villaseñor et al., 2007). 173

**SNAP-25 proteolysis assay and semi-quantification.** Subsequent to the 72 h of arsenite 174 exposure, cells were incubated for 30 min (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ) in low glucose KRB (5.6 mM). 175 After this period, cells were switched to low or high glucose KRB (5.6 and 15.6 mM, 176 respectively) for 2 h (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ). Total protein was extracted from cells by protein lysis 177 buffer with protease inhibitors (Salazar et al., 1997) and quantified by the Lowry method 178 (DC Protein Assay). Proteolysis of SNAP-25 was analyzed by ELISA (BD Biosciences 179 Pharmingen, 2000) following the fact that one of the antibodies used recognized only the 180 N-terminal epitope that is lost after the cleavage of the protein (Marshall et al., 2005). 181

Briefly, the capture anti-SNAP25-COOH antibody (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was incubated over- 182 night at 4 °C in 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  at pH 8.2 in enhanced protein-binding ELISA plates. After 183 blocking non-specific binding sites with BSA, total protein of the samples (75 or 100  $\mu\text{g}/$  184 ml) as well as total protein standards of RINm5F cells without glucose stimulation to 185 generate the linearity validation curve (50-200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), were incubated for 4 h (Halim 186 et al., 2005). Secondary antibody anti-SNAP25-NH<sub>2</sub> (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was incubated overnight 187 at 4 °C, followed by 5 washes with 0.05% PBS-Tween®20 and the incubation of anti-IgG 188 mouse antibody conjugated with peroxidase for 1 h. After 30 min of incubation with the 189 substrate TMB in the dark, the reaction was stopped with 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . The absorbance of 190 the colorimetric reaction was read in a microplate reader at 450 nm with a reference 191 correction at 540 nm. To obtain the fraction of SNAP25 proteolysed, the value of 192 absorbance of each sample was subtracted to the maximum value reached in the assay. 193

**Cell cycle analysis.** After 72 h of culture, cells were collected by trypsinization, fixed 194 (cold 75% ethanol) and permeated and stained (0.025 mg/ml propidium iodide, Triton 195 X-100 1:1000 v/v and 0.2 mg/ml RNase in PBS) for 30 min in the dark (Gillis et al., 2003). 196 The cell cycle was analyzed by flux cytometry (GUAVA PCA system, GUAVA 197 Technologies). The integration of the area under the curve for each of the phases of the 198 histogram was realized with the MultiCycle software (Phoenix flow systems). 199

**Mitotic and replication indexes.** During the 72 h of arsenite exposure, the medium was 200 also supplemented with BrdUrd ( $3.24 \times 10^{-5}$  M) and at the 48 h of culture, colcemid 201 (0.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was added for the inhibition of cytokinesis. Once passed the 72 h of culture, 202 cells were incubated for 30 min (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ) in hypotonic solution (0.075 M KCl) to 203 break cellular membranes. After fixation (methanol/acetic acid 3:1) cells were dropped 204 onto slides and stained according to the fluorescence plus Giemsa method to differentiate 205 sister chromatids (Perry and Wolff, 1974). Microscopic analysis was performed to 206 determine the mitotic index (MI) scoring the number of metaphases in 2000 cells. The 207 proportion of first ( $M_1$ ), second ( $M_2$ ) and third or more ( $M_3$ ) mitotic divisions in 100-200 208 metaphases was evaluated to determine the replication index (RI) according to the 209 formula  $RI = (M_1 + 2M_2 + 3M_3) / \text{total analyzed metaphases}$  (Rojas et al., 1993). 210

**Statistical analysis.** All data are reported as means  $\pm$  SEM of independently carried 211 experiments, as indicated in each figure (n). The statistical significance was obtained 212

213 with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-test, except for  
 214 the calpain activity assay and for the expression of mRNA calpain-10 that were  
 215 evaluated by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test due to  
 216 non-normality of data evaluated by the Kolmogorov-Smirnov method (GraphPad Prism  
 217 4 and Analyse-it, Excel).  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

## 218 Results

### 219 Cell survival and morphology

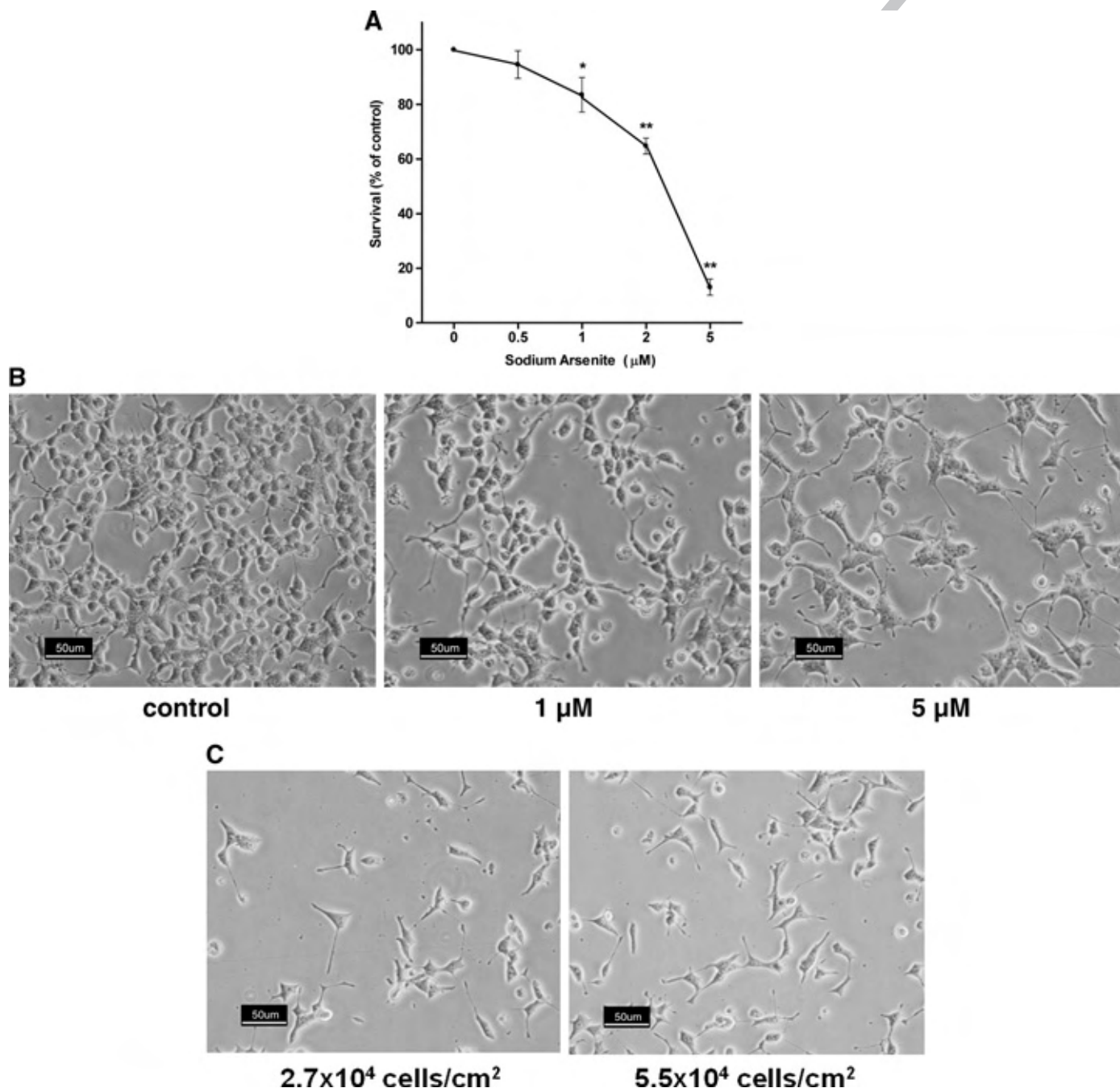
220 The viability of cells exposed to different arsenite concentrations (0.5–  
 221 5  $\mu\text{M}$ ) during 72 h decreased in a dose-response manner with statistical  
 222 significance starting at  $\geq 1 \mu\text{M}$  (Fig. 1A). The dose of 5  $\mu\text{M}$  was highly  
 223 cytotoxic and produced cellular morphological changes; the cells became  
 224 larger and flat with neurite-like processes (Fig. 1B). To make sure that

225 these changes were not a consequence of the low density reached at the  
 226 end of the treatment (5  $\mu\text{M}$ ), cells were cultured at low cellular densities  
 227 ( $2.7$  and  $5.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and no significant morphological changes  
 228 were observed (Fig. 1C). Conversely, the other doses did not produce  
 229 morphological changes and cell survival was maintained around 80%.

Based on these data, the experiments were done only with 0.5, 1  
 230 and 2  $\mu\text{M}$  arsenite, except for the experiments related with cell cycle  
 231 and proliferation in which the dose of 5  $\mu\text{M}$  was included. 232

### 233 Insulin secretion

234 Arsenite treatment alters insulin secretion in the RINm5F cell line, 234  
 235 similar to what was observed in the primary  $\beta$ -cell culture (Díaz-  
 236 Villaseñor et al., 2006). Basal secretion (at 5.6 mM glucose) was 236



**Fig. 1.** Cell survival and cellular morphology. A) RINm5F cells exposed to 0, 0.5, 1, 2 and 5  $\mu\text{M}$  arsenite for 72 h. Data represent mean  $\pm$  SEM,  $n=5$  by triplicate, values were normalized to control cells (100%). Symbols denote statistically significant differences: \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.001$  with respect to control cells. RINm5F cells exposed to 0, 1, and 5  $\mu\text{M}$  arsenite for 72 h (B) and at different cellular density ( $2.7$  and  $5.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) (C). Nikon Eclipse TE2000-U microscope, ACT-1 software, version 2. Normal sensitivity, high resolution, 12 seg, lens 20X, bar, 50  $\mu\text{m}$ .

237 reduced with 1 and 2  $\mu\text{M}$  arsenite, whereas the glucose-stimulated  
 238 secretion (at 15.6 mM) was decreased in a statistically significant  
 239 manner only with 2  $\mu\text{M}$  arsenite (Fig. 2).

#### 240 Insulin synthesis

241 To exclude the possibility that insulin secretion was reduced by an  
 242 effect on its rate of synthesis, as it has been observed in primary  $\beta$ -cell  
 243 cultures with doses of 5  $\mu\text{M}$  arsenite, the expression of insulin mRNA  
 244 and intracellular protein was evaluated. As it is shown in Fig. 3, none of  
 245 the doses produced any detectable change neither at the mRNA nor at  
 246 the protein level. These results support the idea that low arsenite  
 247 doses alter some mechanisms downstream to insulin synthesis to  
 248 induce a decrease in secretion.

#### 249 Free intracellular calcium

250 One of the most important events that couples glucose stimulus  
 251 with insulin secretion is an increase in intracellular calcium concentra-  
 252 tion ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (MacDonald et al., 2005). In fact, it has been reported  
 253 previously that arsenic alters the concentration of free  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in  
 254 lymphocytes with or without stimulation (Goytia-Acevedo et al., 2003)  
 255 as well as cardiac calcium currents (Ficker et al., 2004). In RINm5F cells  
 256 previously exposed to arsenite, free  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was evaluated under  
 257 glucose stimulation (5.6 mM as a basal and 15.6 mM as a stimulatory  
 258 concentration). Only in control cells,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was statistically different  
 259 between basal and stimulating glucose concentrations; whereas in  
 260 arsenite treated cells, this difference was lost (Fig. 4). This finding  
 261 suggests that arsenite abates free  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations in response to  
 262 changes in glucose extracellular concentration.

#### 263 Activity of calpains

264 During glucose insulin secretion coupling,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation  
 265 activates calpains, particularly calpain-10 that is involved, among  
 266 other events, in the secretory granule fusion process (Marshall et al.,  
 267 2005). After 72 h of arsenite exposure, the activity of these cysteine  
 268 proteases was evaluated in extracellular basal and stimulating glucose  
 269 concentrations (5.6 and 15.6 mM, respectively). Total calpain activity  
 270 was increased by 2  $\mu\text{M}$  arsenite in both glucose conditions (Fig. 5).

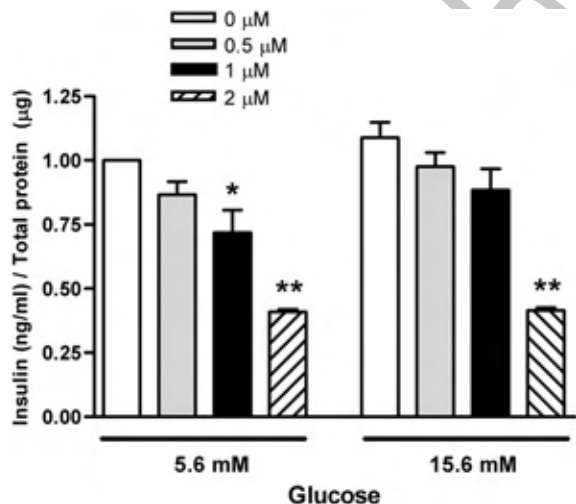


Fig. 2. Basal (5.6 mM) and glucose-stimulated (15.6 mM) insulin secretion. RINm5F cells exposed to arsenite for 72 h: control (white bars), 0.5  $\mu\text{M}$  (gray bars), 1  $\mu\text{M}$  (black bars) and 2  $\mu\text{M}$  (striped bars). Insulin secretion evaluated in 5.6 and 15.6 mM glucose. Data represent mean  $\pm$  SEM,  $n=4$ , data were normalized to values of control cells in 5.6 mM glucose. Symbols denote statistically significant differences: \* $p<0.05$  and \*\* $p<0.001$  with respect to control cells in each glucose concentration.

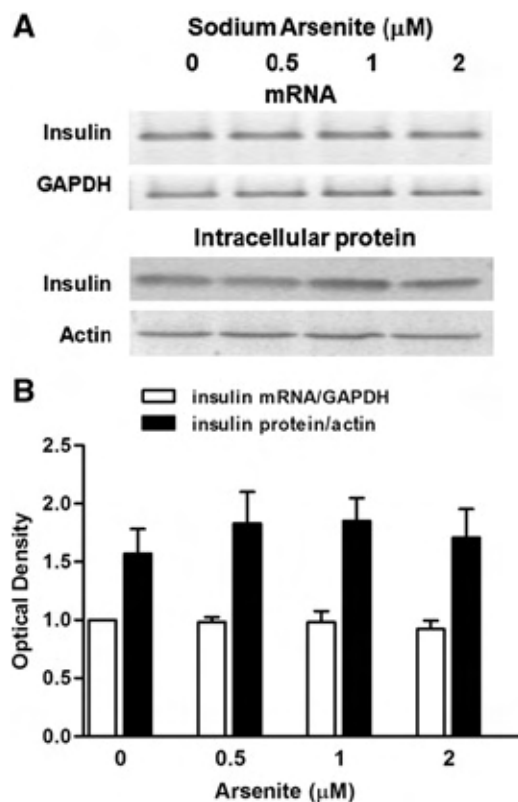


Fig. 3. mRNA and intracellular protein expression of insulin. RINm5F cells exposed to 0, 0.5, 1 and 2  $\mu\text{M}$  arsenite for 72 h. A) Representative experiment of RT-PCR insulin and GAPDH products and of Western blot for insulin and actin. B) Densitometric quantification of insulin mRNA (values normalized to the housekeeping genes GAPDH and actin, respectively). Data represent mean  $\pm$  SEM,  $n=4$ .

#### 271 Calpain-10 expression

272 Once we evaluated the effect of arsenite over the general activity of  
 273 calpains, the expression of calpain-10 mRNA in the presence of  
 274 arsenite was analyzed. As it is shown in Fig. 6, an increase occurred  
 275 only with the highest dose tested (2  $\mu\text{M}$ ). At the protein level, we were  
 276 not able to identify changes among the different arsenite treatments.  
 277 Nevertheless, we detected diverse isoforms of calpain-10, that are

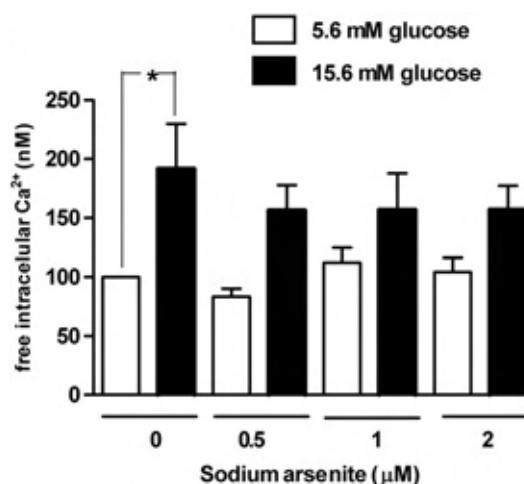
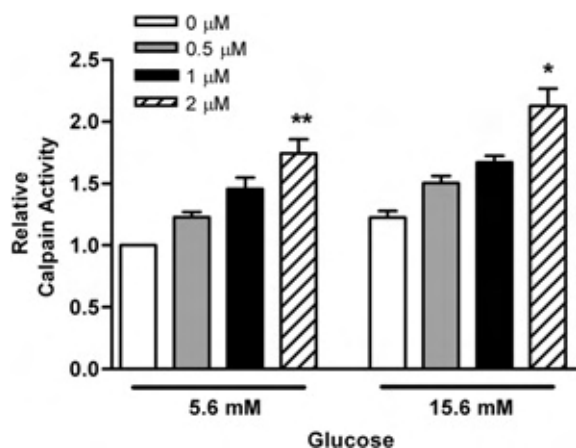
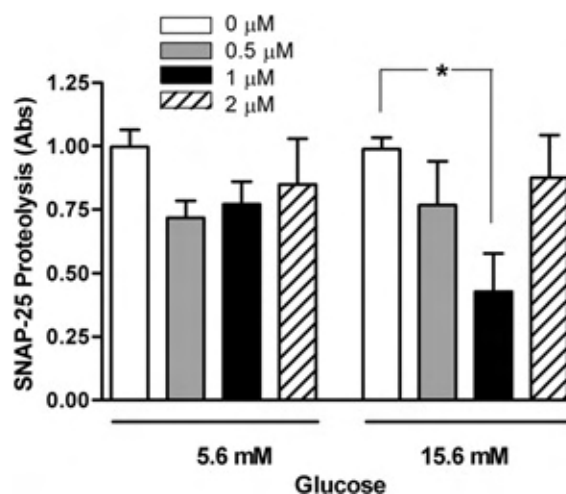


Fig. 4. Basal (5.6 mM) and glucose-stimulated (15.6 mM) free  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . RINm5F cells exposed to 0, 0.5, 1 and 2  $\mu\text{M}$  arsenite for 72 h. Free  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  evaluated in 5.6 and 15.6 mM extracellular glucose (white and black bars, respectively). Data represent mean  $\pm$  SEM,  $n=4$ , data were normalized to values of control cells in 5.6 mM glucose. Symbol denotes statistically significant differences: \* $p<0.05$ .



**Fig. 5.** Basal (5.6 mM) and glucose-stimulated (15.6 mM) activity of calpains. RINm5F cells exposed to arsenite for 72 h: control (white bars), 0.5  $\mu\text{M}$  (gray bars), 1  $\mu\text{M}$  (black bars) and 2  $\mu\text{M}$  (striped bars). Calpain activity evaluated in 5.6 and 15.6 mM glucose. Data represent mean  $\pm$  SEM,  $n=4$ , data were normalized to values of control cells in 5.6 mM glucose (1 a.u.). Symbols denote statistically significant differences: \* $p<0.05$  and \*\* $p<0.01$  with respect to control cells in each glucose concentration.



**Fig. 7.** Basal (5.6 mM) and glucose-stimulated (15.6 mM) SNAP-25 partial proteolysis. RINm5F cells exposed to arsenite for 72 h: control (white bars), 0.5  $\mu\text{M}$  (gray bars), 1  $\mu\text{M}$  (black bars) and 2  $\mu\text{M}$  (striped bars). Partial proteolysis of SNAP-25 evaluated in 5.6 and 15.6 mM glucose. Data represent mean  $\pm$  SEM,  $n=4$ . Symbol denotes statistically significant differences: \* $p<0.05$

278 known to be produced by alternative splicing (Horikawa et al., 2000).  
279 The isoform that showed the highest levels of expression was the one  
280 of approximately 50 kDa (Fig. 6).

#### 281 SNAP-25 partial proteolysis

282 One of the physiological substrates of calpain-10 in pancreatic  $\beta$ -  
283 cells is SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa), which is

one of the proteins present in the insulin secretion machinery. Recently, 284  
it has been demonstrated that SNAP-25 undergoes  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent 285  
partial proteolysis (at the N-terminus) during insulin exocytosis and 286  
that this proteolysis can be suppressed by calpain protease inhibitors 287  
(Marshall et al., 2005). Therefore, an indirect manner to evaluate 288  
calpain-10 activity is through SNAP-25 proteolysis during insulin 289  
secretion. A significant decrease in SNAP-25 partial proteolysis, in 290  
response to glucose (15.6 mM) for 2 h, occurred in RINm5F cells after 291  
72 h of 1  $\mu\text{M}$  arsenite exposure (Fig. 7). On the contrary, when the cells 292  
were stimulated with glucose only for 30 min (instead of 2 h), results 293  
showed the same tendency but they did not reach statistical 294  
significance between arsenite treatments (data not shown). 295

#### 296 Cell cycle

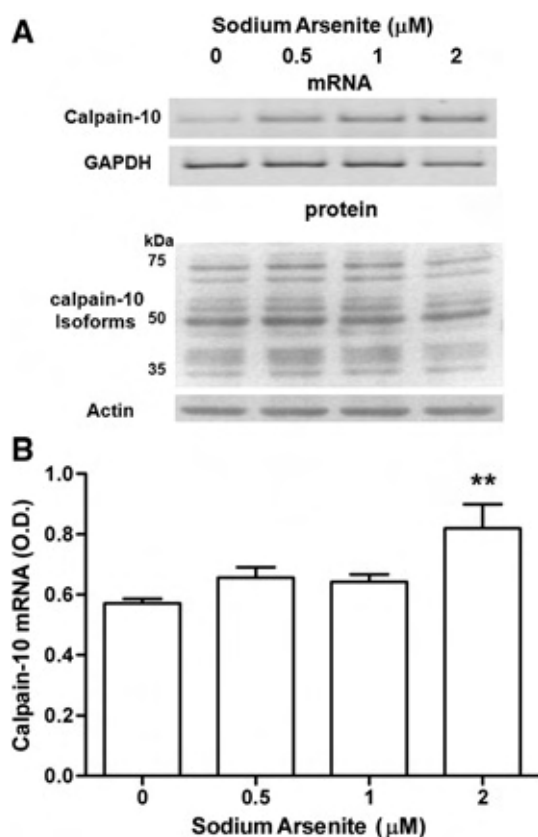
The results of cell survival and the changes in cell morphology lead 297  
us to evaluate the effect of arsenite on cell cycle. The proportion of 298  
cells in G2/M phase increased in a dose-dependent manner, whereas 299  
the cells in S phase decreased simultaneously (Fig. 8A). Quantification 300  
of the histogram data showed that the percentage of cells in G2/M 301  
phase increased significantly with 2 and 5  $\mu\text{M}$  arsenite, while the 302  
percentage in S phase was reduced at the same doses (Fig. 8B). These 303  
results can be interpreted as an arrest in the G2/M checkpoint. 304

#### 305 Mitotic and replication indexes

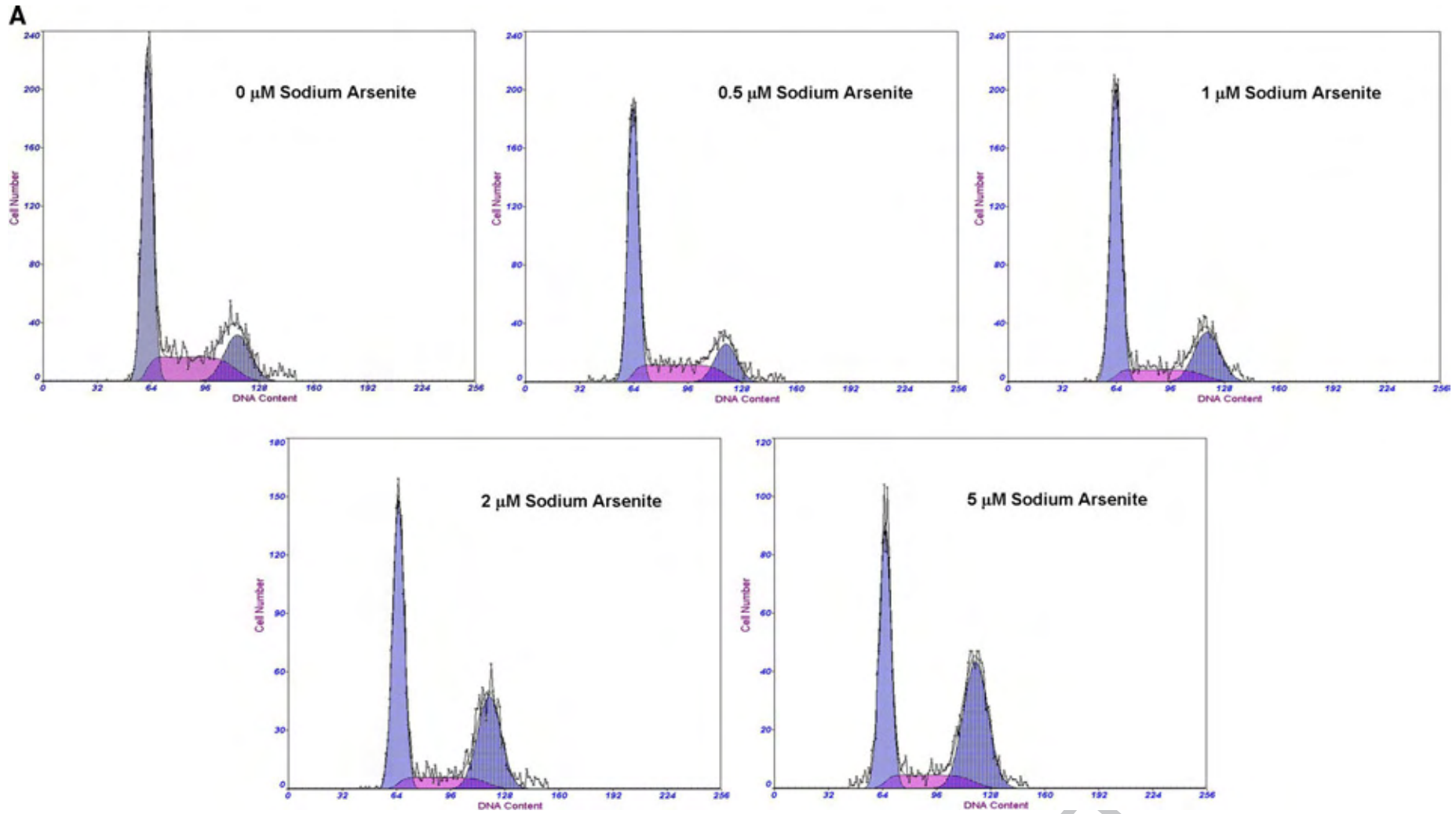
For a better understanding of the cell cycle results, we measured 306  
the mitotic index (MI), which indicates the proportion of cells in 307  
division, and the replication index (RI), that represents the number of 308  
cellular divisions and therefore the rate of cellular proliferation. As 309  
shown in Fig. 9, both indexes declined in a dose-dependent manner in 310  
response to arsenite. In particular, the effect on the RI was statistically 311  
significant starting at the dose of 1  $\mu\text{M}$  arsenite, while the effect on MI 312  
was first significant at 2  $\mu\text{M}$  arsenite. Our result suggests that the rate 313  
at which cells proliferate began to decrease starting at 1  $\mu\text{M}$  arsenite; 314  
from 2  $\mu\text{M}$  arsenite on, this slowdown in proliferation was reflected in 315  
the diminishing number of cells in division due to G2/M arrest. 316

#### 317 Discussion

RINm5F pancreatic  $\beta$ -cell line resulted to be more sensitive to the 318  
cytotoxic effects of arsenite than the  $\beta$ -cell primary cultures (Díaz- 319  
Villaseñor et al., 2006). In the isolated  $\beta$ -cells, the dose of 5  $\mu\text{M}$  was not 320



**Fig. 6.** Calpain-10 mRNA and protein expression. RINm5F cells exposed to 0, 0.5, 1 and 2  $\mu\text{M}$  arsenite for 72 h. A) Representative experiment of RT-PCR calpain-10 and GAPDH products and of Western blot for calpain-10 and actin. B) Densitometric quantification of calpain-10 mRNA normalized to the housekeeping gene GAPDH. Data represent mean  $\pm$  SEM,  $n=4$ . Symbol denotes statistically significant differences: \*\* $p<0.01$  with respect to control cells.



**Fig. 8.** Cell cycle analysis. RINm5F cells exposed to 0, 0.5, 1, 2 and 5  $\mu\text{M}$  arsenite for 72 h. A) Representative histograms of each arsenite concentration. B) Percentage of cells in G0 phase (black bars), S phase (white bars) and G2/M phase (gray bars). Data represent mean  $\pm$  SEM,  $n=4$ . Symbols denote statistically significant differences: \* $p<0.01$  and \*\* $p<0.001$  with respect to control conditions for G2/M phase and \*\* $p<0.001$  with respect to control conditions for S phase.



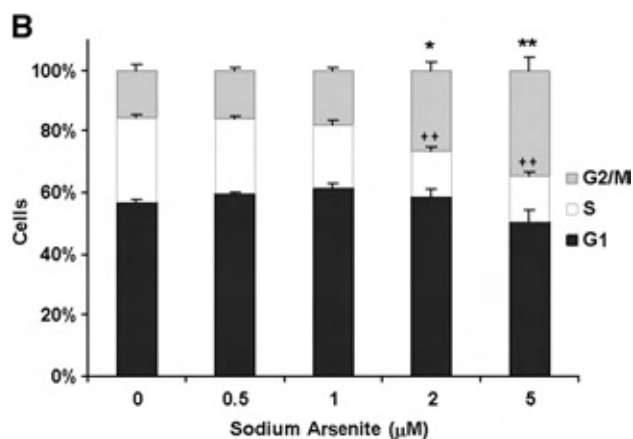


Fig. 8 (continued).

highly cytotoxic and did not produce morphological changes, as occurred in the present study with the cell line. On the other hand, glucose-stimulated secretion of insulin in RINm5F cells was not altered with a dose of 1 μM arsenite, whereas in primary cultures this dose was able to decrease it (Díaz-Villaseñor et al., 2006). The distinct sensitivity to arsenite between the two types of β-cells can be the result of their proliferation state. While RINm5F cells are constantly in cell division, the primary cultures of isolated β-cells are maintained in G0 without cycling. *In vitro* and *in vivo* data showed that arsenic has an effect upon certain phases of the cell cycle (Gonsebatt et al., 1994; Lehmann and McCabe, 2007).

We had previously demonstrated that after an exposure to arsenite (1 and 5 μM) for a period of 72 h in primary cultures of isolated rat pancreatic β-cells, glucose-stimulated insulin secretion decreased in a significant manner (Díaz-Villaseñor et al., 2006).

These new results indicate that in RINm5F pancreatic β-cell line, the impairment of insulin secretion by arsenic exposure is produced through the decrease in  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations, which in consequence reduces calcium-dependent calpain-10 partial proteolysis of SNAP-25.

Although arsenite impairs both basal and glucose-stimulated insulin secretion, the mechanism evaluated is probably more relevant in the stimulated condition. Our data showed that the reduction in the proteolysis of SNAP-25 after the exposure to arsenite was only detected with the stimulating glucose concentration. In fact, Marshall et al. have reported that the proteolysis of SNAP-25 occurs only during the stimulation with glucose at high concentrations (10 mM). Moreover, the elevation of  $[Ca^{2+}]_i$  which is not required for basal insulin secretion, is required for the proteolysis of SNAP-25 (Marshall et al., 2005). Experiments in other β-cell lines with better glucose responses will be needed in order to confirm that this is the case.

One of the crucial events needed for β-cells to secrete insulin in response to an increase in the extracellular glucose concentration, is an elevation in  $[Ca^{2+}]_i$ . The fact that free  $[Ca^{2+}]_i$  was statistically different between both glucose concentrations tested (the basal and the stimulating) only in control conditions, without arsenite, suggests that the intrinsic inability of RINm5F cells to increase insulin secretion in response to glucose elevations (Hamid et al., 2002), is related to an impairment of the events downstream  $Ca^{2+}$  elevation. In support of this idea, we obtained data that showed that under control conditions (without arsenite) neither insulin secretion nor global calpain or calpain-10 activity, measured as SNAP-25 proteolysis, were different between the basal and the stimulating extracellular glucose concentrations, respectively. Even more, it has been shown that the stimulation of RINm5F cells by increasing the extracellular concentration of ATP or KCl cause a steep rise in  $[Ca^{2+}]_i$  (Arkhammar et al., 1990; Leiers et al., 2000). Insulin secretion by RIN β-cell line grown in 11.1 mM glucose, is also affected by their number of passages (Hribal et al., 2003). Moreover,

rat and mouse β-cells, as well as human islets chronically cultured *in vitro* under high levels of extracellular glucose (11–15 mM) lose their sensitivity to this sugar (VidalTamayo et al., 1996; Hribal et al., 2003; 370 Díaz-Villaseñor et al., 2006; Olofsson et al., 2007). 371

The increase in the activity of calpains after the arsenite treatment was unexpected due to their calcium dependence. One possible explanation could be that because of the loss in regulation of calcium fluctuations in response to glucose, the activity of these proteases increased as a compensatory mechanism due to the stability of  $[Ca^{2+}]_i$ . Another possibility is that in addition to calpain-10 expression, pancreatic-β-cells also express calpain-1, which participate as well in insulin secretion, and calpain-2 (also referred as  $\mu$  and  $m$ , respectively) (Ort et al., 2001; Aganna et al., 2006; Turner et al., 2007). Consequently, the calpain global activity includes these two calpains and probably other members of this cysteine-protease family with unknown expression in pancreatic β-cells.

Synaptotagmin and calpain-10 have been postulated as  $Ca^{2+}$  sensors in β-cells for insulin secretion (Marshall et al., 2005; Aganna et al., 2006). When we analyzed the activity of calpain-10, evaluated through the partial proteolysis of one of its endogenous targets SNAP-25, its potential role during insulin secretion was assessed as well, because the partial cleavage of SNAP-25 results in the conformational rearrangement of the SNARE complex proteins, which in turn appears to lead to the fusion of insulin granules with the plasma membrane, releasing the granule content from the cell (Marshall et al., 2005).

Our data showed that arsenite exposure reduced glucose-stimulated SNAP25 proteolysis with a dose-dependent pattern. Nevertheless, the effect was reversed at the highest arsenite dose tested (2 μM), reaching similar values to those of control conditions. This increase in the proteolysis could reflect the increment in the global activity of calpains and/or in the expression of calpain-10 mRNA.

The analysis of viability, cell cycle and mitotic and replication index results indicate that arsenite (2–5 μM) prevents the division of the cells that were seeded at the beginning of the experiment. Thus, cells exposed to arsenite cannot reach the 80–90% confluence observed in control cells. Despite the cell death observed in the cultures treated with arsenite, the low number of cells found at the end of the treatment with 5 μM arsenite can be attributed primarily to an arrest occurring in G2/M phase.

An autocrine insulin-feedback mechanism present in β-cells regulates secretion, cell survival and proliferation (Leibiger et al., 2002; Navarro-Tableros et al., 2004; Beith et al., 2008). This autocrine loop could also be targeted by arsenite exposure. If low levels of insulin are secreted, proliferation becomes slower, diminishing cell density and consequently lowering the concentration of insulin in the media. Thus, the effects related to cell division and proliferation

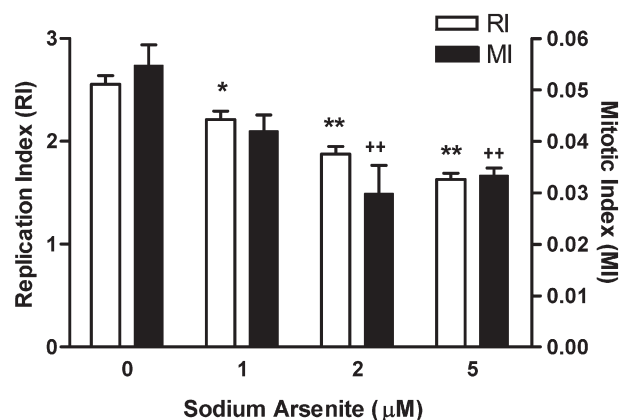


Fig. 9. Mitotic and replication indexes. RINm5F cells exposed to 0, 0.5, 1, 2 and 5 μM arsenite for 72 h. Replication index (RI, white bars) and mitotic index (MI, black bars). Data represent mean ± SEM, n=5. Symbols denote statistically significant differences: \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  with respect to control conditions for IR and \*\* $p < 0.01$  with respect to control conditions for IM.

observed in the arsenite exposed RINm5F cells, can be an indirect consequence of the impairment in insulin secretion and vice versa.

Arsenic can also affect insulin secretion through the disturbance of microtubule assembly as well as altering the reorganization of the actin network, both events needed for insulin exocytosis and glucose uptake (MacDonald et al., 2005), as has been reported for other cell types (Li and Chou, 1992; Ramírez et al., 1997; Lemarie et al., 2006). Additionally, calpains are also involved in this cytoskeleton remodeling process. Calpain-10 particularly facilitates actin reorganization during glucose-stimulated insulin secretion in  $\beta$ -cells. (Turner et al., 2007). Calpain inhibition in skeletal muscle and adipocytes, even the individual inhibition of calpain-10, reduce insulin-stimulated glucose uptake (Sreenan et al., 2001; Paul et al., 2003; Logie et al., 2005; Brown et al., 2007) by regulating the actin cytoskeleton reorganization, a mechanism similar to the one observed for insulin secretion. This reorganization facilitates GLUT4 vesicle translocation to the membrane during insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes (Paul et al., 2003). Thus, it may be possible that the insulin secretion defects caused by arsenite exposure can also result from alterations in the cytoskeleton rearrangement mediated by calpain-10.

It has been documented that  $\beta$  primary cultures and RINm5F cells, under certain stimuli (nerve growth factor, fibroblast growth factor and cAMP), develop neurite-like processes that are produced by the alteration of microtubule assembly and stabilization (Polak et al., 1993; Vidaltamayo et al., 1996). Since arsenic can also interfere with the rearrangement of the cytoskeleton, this might explain the neurite-like processes observed with arsenite treatment.

The impairment of insulin secretion is necessary for the onset and development of type 2 diabetes as is the resistance to insulin (LeRoith, 2002; Kahn, 2003). These results provide more experimental evidence that arsenite is indeed a risk factor for the disease because it affects insulin secretion. It is obvious that while more experimental and epidemiological studies are needed in order to understand better the mechanisms of the induction of type 2 diabetes by arsenic, major efforts should be carried by Public Health Organizations to reduce arsenic population exposure.

## Acknowledgments

This work was partially supported by CONACYT, DGAPA (UNAM) and by The U.S.–Mexico Binational Center for Environmental Sciences and Toxicology. We thank Dr. Roman Vidaltamayo for discussion and proofreading of the manuscript.

## References

AfCS, A. F. C. S., 2002. Assay of Intracellular Free Calcium in Suspended B Cells.  
 Aganna, E., Burrin, J.M., Hitman, G.A., Turner, M.D., 2006. Involvement of calpain and synaptotagmin Ca<sup>2+</sup> sensors in hormone secretion from excitable endocrine cells. *J. Endocrinol.* 190, R1–R7.  
 Arkhammar, P., Hallberg, A., Kindmark, H., Nilsson, T., Rorsman, P., Berggren, P.O., 1990. Extracellular ATP increases cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration in clonal insulin-producing RINm5F cells. A mechanism involving direct interaction with both release and refilling of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> pool. *Biochem. J.* 265, 203–211.  
 BD Biosciences PharMingen, 2000. Technical reports, cytokine analysis. BD Product Catalog, pp. 1397–1400.  
 Beith, J.L., Alejandro, E.U., Johnson, J.D., 2008. Insulin stimulates primary (beta)-cell proliferation via Raf-1 kinase. *Endocrinology* 149, 2251–2260.  
 Brown, A.E., Yeaman, S.J., Walker, M., 2007. Targeted suppression of calpain-10 expression impairs insulin-stimulated glucose uptake in cultured primary human skeletal muscle cells. *Mol. Genet. Metab.* 91, 318–324.  
 Coronado-González, J.A., Del Razo, L.M., García-Vargas, G., Sanmiguel-Salazar, F., Escobedo-de la Peña, J., 2007. Inorganic arsenic exposure and type 2 diabetes mellitus in Mexico. *Environ. Res.* 104, 383–389.  
 Díaz-Villaseñor, A., Sánchez-Soto, M.C., Cebrián, M.E., Ostrosky-Wegman, P., Hiriart, M., 2006. Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic beta-cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 214, 30–34.  
 Díaz-Villaseñor, A., Hiriart, M., Cebrián, M.E., Zacarias-Castillo, R., Ostrosky-Wegman, P., 2007. The activity of calpains in lymphocytes is glucose-dependent and is decreased in diabetic patients. *Blood Cells Mol. Dis.*

Ficker, E., Kuryshv, Y.A., Dennis, A.T., Obejero-Paz, C., Wang, L., Hawryluk, P., Wible, B.A., Brown, A.M., 2004. Mechanisms of arsenic-induced prolongation of cardiac repolarization. *Mol. Pharmacol.* 66, 33–44.  
 Gillis, K., Fishwild, D., P., B., 2003. Performing the Cell Cycle Assay on the Guava PCA System. Guava Technologies.  
 Gonsbatt, M.E., Vega, L., Montero, R., García-Vargas, G., Del Razo, L.M., Albores, A., Cebrián, M.E., Ostrosky-Wegman, P., 1994. Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water. *Mutat. Res.* 313, 293–299.  
 Goytia-Acevedo, R.C., Cebrián, M.E., Calderón-Aranda, E.S., 2003. Differential effects of arsenic on intracellular free calcium levels and the proliferative response of murine mitogen-stimulated lymphocytes. *Toxicology* 189, 235–244.  
 Halim, N.D., Joseph, A.W., Lipska, B.K., 2005. A novel ELISA using PVDF microplates. *J. Neurosci. Methods* 143, 163–168.  
 Hamid, M., McCluskey, J.T., McClenaghan, N.H., Flatt, P.R., 2002. Comparison of the secretory properties of four insulin-secreting cell lines. *Endocr. Res.* 28, 35–47.  
 Hartmann, A., Speit, G., 1996. Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 27, 98–104.  
 Horikawa, Y., Oda, N., Cox, N.J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., Hinokio, Y., Lindner, T.H., Mashima, H., Schwarz, P.E., del Bosque-Plata, L., Oda, Y., Yoshiuchi, I., Colilla, S., Polonsky, K.S., Wei, S., Concannon, P., Iwasaki, N., Schulze, J., Baier, L.J., Bogardus, C., Groop, L., Boerwinkle, E., Hani, C.L., Bell, G.L., 2000. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat. Genet.* 26, 501–502.  
 Hribal, M.L., Perego, L., Lovari, S., Andreozzi, F., Menghini, R., Perego, C., Finzi, G., Uesellini, L., Placidi, C., Capella, C., Guzzi, V., Lauro, D., Bertuzzi, F., Davalli, A., Pozza, G., Pontiroli, A., Federici, M., Lauro, R., Brunetti, A., Folli, F., Sesti, G., 2003. Chronic hyperglycemia impairs insulin secretion by affecting insulin receptor expression, 506 splicing, and signaling in RIN beta cell line and human islets of Langerhans. *FASEB J.* 17, 1340–1342.  
 Izquierdo-Vega, J.A., Soto, C.A., Sánchez-Peña, L.C., De Vizcaya-Ruiz, A., Del Razo, L.M., 2006. Diabetogenic effects and pancreatic oxidative damage in rats subchronically exposed to arsenite. *Toxicol. Lett.* 160, 135–142.  
 Jones, F.T., 2007. A broad view of arsenic. *Poult. Sci.* 86, 2–14.  
 Kahn, S.E., 2003. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46, 3–19.  
 Lai, M.S., Hsueh, Y.M., Chen, C.J., Shyu, M.P., Chen, S.Y., Kuo, T.L., Wu, M.M., Tai, T.Y., 1994. Ingested inorganic arsenic and prevalence of diabetes mellitus. *Am. J. Epidemiol.* 139, 484–492.  
 Lehmann, G.M., McCabe Jr., M.J., 2007. Arsenite slows S phase progression via inhibition of cdc25A dual specificity phosphatase gene transcription. *Toxicol. Sci.* 99, 70–78.  
 Leibiger, I.B., Leibiger, B., Berggren, P.O., 2002. Insulin feedback action on pancreatic beta-cell function. *FEBS Lett.* 532, 1–6.  
 Leiers, T., Bihlmayer, A., Ammon, H.P., Wahl, M.A., 2000. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and insulin-stimulating effect of the non-membranepерmeable phosphatase-inhibitor microcystin-LR in intact insulin-secreting cells (RINm5F). *Br. J. Pharmacol.* 130, 1406–1410.  
 Lemarie, A., Morzadec, C., Bourdonnay, E., Fardel, O., Vernhet, L., 2006. Human macrophages constitute targets for immunotoxic inorganic arsenic. *J. Immunol.* 177, 526–527.  
 LeRoith, D., 2002. Beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *Am. J. Med.* 113 (Suppl 6A), 3S–11S.  
 Li, W., Chou, I.N., 1992. Effects of sodium arsenite on the cytoskeleton and cellular glutathione levels in cultured cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114, 132–139.  
 Logie, L.J., Brown, A.E., Yeaman, S.J., Walker, M., 2005. Calpain inhibition and insulin action in cultured human muscle cells. *Mol. Genet. Metab.* 85, 54–60.  
 Ma, H., Fukiage, C., Kim, Y.H., Duncan, M.K., Reed, N.A., Shih, M., Azuma, M., Shearer, T.R., 2001. Characterization and expression of calpain 10. A novel ubiquitous calpain with nuclear localization. *J. Biol. Chem.* 276, 28525–28531.  
 MacDonald, P.E., Joseph, J.W., Rorsman, P., 2005. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 360, 2211–2225.  
 Marshall, C., Hitman, G.A., Partridge, C.J., Clark, A., Ma, H., Shearer, T.R., Turner, M.D., 2005. Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells. *Mol. Endocrinol.* 19, 213–224.  
 Navarro-Tableros, V., Sánchez-Soto, M.C., García, S., Hiriart, M., 2004. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 53, 2018–2023.  
 Olofsson, C.S., Collins, S., Bengtsson, M., Eliasson, L., Salehi, A., Shimomura, K., Tarasov, A., Holm, C., Ashcroft, F., Rorsman, P., 2007. Long-term exposure to glucose and lipids inhibits glucose-induced insulin secretion downstream of granule fusion with plasma membrane. *Diabetes* 56, 1888–1897.  
 Ort, T., Voronov, S., Guo, J., Zawalich, K., Froehner, S.C., Zawalich, W., Solimena, M., 2001. Dephosphorylation of beta2-syntrophin and Ca<sup>2+</sup>/mu-calpain-mediated cleavage of ICA512 upon stimulation of insulin secretion. *EMBO J.* 20, 4013–4023.  
 Parnaud, G., Hammar, E., Rouiller, D.G., Bosco, D., 2005. Inhibition of calpain blocks pancreatic beta-cell spreading and insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289, E313–321.  
 Paul, D.S., Harmon, A.W., Winston, C.P., Patel, Y.M., 2003. Calpain facilitates GLUT4 vesicle translocation during insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Biochem. J.* 376, 625–632.  
 Paul, D.S., Hernandez-Zavala, A., Walton, F.S., Adair, B.M., Dedina, J., Matousek, T., Stybjo, M., 2007. Examination of the effects of arsenic on glucose homeostasis in cell culture and animal studies: development of a mouse model for arsenic-induced diabetes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 305–314.  
 Perry, P., Wolff, S., 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251, 156–158.  
 Polak, M., Scharfmann, R., Seilheimer, B., Eisenbarth, G., Dressler, D., Verma, I.M., Potter, H., 1993. Nerve growth factor induces neuron-like differentiation of an insulin-secreting pancreatic beta cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5781–5785.

- 566 Rahman, M., Tondel, M., Ahmad, S.A., Axelson, O., 1998. Diabetes mellitus associated  
567 with arsenic exposure in Bangladesh. *Am. J. Epidemiol.* 148, 198–203.
- 568 Rahman, M., Tondel, M., Chowdhury, I.A., Axelson, O., 1999. Relations between exposure  
569 to arsenic, skin lesions, and glucosuria. *Occup. Environ. Med.* 56, 277–281.
- 570 Ramírez, P., Eastmond, D.A., Laclette, J.P., Ostrosky-Wegman, P., 1997. Disruption of  
571 microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of  
572 aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* 386, 291–298.
- 573 Rojas, E., Herrera, L.A., Sordo, M., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Rodriguez, R., Ostrosky-  
574 Wegman, P., 1993. Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of  
575 antineoplastic activity. *Anticancer Drugs* 4, 637–640.
- 576 Salazar, A.M., Ostrosky-Wegman, P., Menendez, D., Miranda, E., Garcia-Carranca, A.,  
577 Rojas, E., 1997. Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mutat. Res.*  
578 381, 259–265.
- 579 Sreenan, S.K., Zhou, Y.P., Otani, K., Hansen, P.A., Currie, K.P., Pan, C.Y., Lee, J.P., Ostrega, D.M.,  
580 Pugh, W., Horikawa, Y., Cox, N.J., Hanis, C.L., Burant, C.F., Fox, A.P., Bell, G.I., Polonsky, K.S.,  
581 2001. Calpains play a role in insulin secretion and action. *Diabetes* 50, 2013–2020.
- 582 Trouba, K.J., Wauson, E.M., Vorce, R.L., 2000. Sodium arsenite inhibits terminal differentia-  
583 tion of murine C3H 10T1/2 preadipocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 25–35.
- 584 Tsai, S.M., Wang, T.N., Ko, Y.C., 1999. Mortality for certain diseases in areas with high  
585 levels of arsenic in drinking water. *Arch. Environ. Health* 54, 186–193.
- 586 Tseng, C.H., Tai, T.Y., Chong, C.K., Tseng, C.P., Lai, M.S., Lin, B.J., Chiou, H.Y., Hsueh, Y.M.,  
587 Hsu, K.H., Chen, C.J., 2000. Long-term arsenic exposure and incidence of non-  
588 insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort study in arseniasis-hyperendemic  
589 villages in Taiwan. *Environ. Health Perspect.* 108, 847–851.
- Turner, M.D., 2007. Coordinated control of both insulin secretion and insulin action  
590 through calpain-10-mediated regulation of exocytosis? *Mol. Genet. Metab.* 91, 591  
592 305–307.
- Turner, M.D., Fulcher, F.K., Jones, C.V., Smith, B.T., Aganna, E., Partridge, C.J., Hitman, G.A.,  
593 Clark, A., Patel, Y.M., 2007. Calpain facilitates actin reorganization during glucose-  
594 stimulated insulin secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 650–655.
- Vidaltamayo, R., Sánchez-Soto, M.C., Rosenbaum, T., Martínez-Morelos, T., Hiriart, M.,  
596 1996. Neuron-like phenotypic changes in pancreatic beta-cells induced by NGF, FGF,  
597 and dbcAMP. *Endocrine* 4, 19–26.
- Walton, F.S., Harmon, A.W., Paul, D.S., Drobna, Z., Patel, Y.M., Styblo, M., 2004. Inhibition  
599 of insulin-dependent glucose uptake by trivalent arsenicals: possible mechanism of  
600 arsenic-induced diabetes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 424–433.
- Wang, S.L., Chiou, J.M., Chen, C.J., Tseng, C.H., Chou, W.L., Wang, C.C., Wu, T.N., Chang, L.W.,  
602 2003. Prevalence of non-insulin-dependent diabetes mellitus and related vascular  
603 diseases in southwestern arseniasis-endemic and nonendemic areas in Taiwan.  
604 *Environ. Health Perspect.* 111, 155–159.
- Wauson, E.M., Langan, A.S., Vorce, R.L., 2002. Sodium arsenite inhibits and reverses  
606 expression of adipogenic and fat cell-specific genes during in vitro adipogenesis.  
607 *Toxicol. Sci.* 65, 211–219.
- Zhou, Y.P., Sreenan, S., Pan, C.Y., Currie, K.P., Bindokas, V.P., Horikawa, Y., Lee, J.P., Ostrega,  
609 D., Ahmed, N., Baldwin, A.C., Cox, N.J., Fox, A.P., Miller, R.J., Bell, G.I., Polonsky, K.S.,  
610 2003. A 48-hour exposure of pancreatic islets to calpain inhibitors impairs  
611 mitochondrial fuel metabolism and the exocytosis of insulin. *Metabolism* 52, 612  
613 528–534.



Contemporary Issues in Toxicology

# Arsenic-induced alteration in the expression of genes related to type 2 diabetes mellitus

Andrea Díaz-Villaseñor <sup>a,\*</sup>, Anna L. Burns <sup>a,b</sup>, Marcia Hiriart <sup>c</sup>,  
Mariano E. Cebrián <sup>d</sup>, Patricia Ostrosky-Wegman <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar, Cd. Universitaria, Coyoacan 04510 México, DF, México

<sup>b</sup> Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>c</sup> Department of Biophysics, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>d</sup> Sección Externa de Toxicología, CINVESTAV, IPN, Mexico

Received 10 May 2007; revised 22 August 2007; accepted 24 August 2007

Available online 31 August 2007

## Abstract

Chronic exposure to high concentrations of arsenic in drinking water is associated with an increased risk for developing type 2 diabetes. The present revision focuses on the effect of arsenic on tissues that participate directly in glucose homeostasis, integrating the most important published information about the impairment of the expression of genes related to type 2 diabetes by arsenic as one of the possible mechanisms by which it leads to the disease.

Many factors are involved in the manner in which arsenic contributes to the occurrence of diabetes. The reviewed studies suggest that arsenic might increase the risk for type 2 diabetes via multiple mechanisms, affecting a cluster of regulated events, which in conjunction trigger the disease.

Arsenic affects insulin sensitivity in peripheral tissue by modifying the expression of genes involved in insulin resistance and shifting away cells from differentiation to the proliferation pathway. In the liver arsenic disturbs glucose production, whereas in pancreatic beta-cells arsenic decreases insulin synthesis and secretion and reduces the expression of antioxidant enzymes. The consequences of these changes in gene expression include the reduction of insulin secretion, induction of oxidative stress in the pancreas, alteration of gluconeogenesis, abnormal proliferation and differentiation pattern of muscle and adipocytes as well as peripheral insulin resistance.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Arsenic; Type 2 diabetes; Gene expression; Insulin; Glucose

## Contents

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| Introduction . . . . .                                               | 124 |
| Pancreatic islets . . . . .                                          | 124 |
| Liver . . . . .                                                      | 125 |
| Peripheral tissue: adipocytes and muscle cells . . . . .             | 125 |
| Genes involved in adipocyte differentiation and cell cycle . . . . . | 126 |
| Proinflammatory response-transcription factor . . . . .              | 126 |
| Signaling pathways . . . . .                                         | 126 |
| Ras–MAP kinase–AP-1 cascade . . . . .                                | 126 |
| PI(3)K–Akt pathway . . . . .                                         | 127 |
| Protein-induced insulin resistance (adipokines) . . . . .            | 127 |

\* Corresponding author.

E-mail address: [andreadv@biomedicas.unam.mx](mailto:andreadv@biomedicas.unam.mx) (A. Díaz-Villaseñor).

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| Discussion . . . . .      | 129 |
| Conclusions . . . . .     | 131 |
| Acknowledgments . . . . . | 131 |
| References . . . . .      | 131 |

## Introduction

The number of adults with diabetes mellitus in the United States increased by 49% between 1991 and 2000, and the World Health Organization predicts that the number of cases worldwide – 150 million in 2000 – will double by 2025 (Marx, 2002). Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells, impairment of insulin action on peripheral tissue (muscle and adipocytes), and/or increased endogenous glucose production by the liver. Type 2 diabetes accounts for 90–95% of all cases of diabetes. Known risk factors include certain genetic polymorphisms, age, sex, family history, obesity, physical inactivity, diet, and stress (Zimmet et al., 2001; ADA, 2006).

Toxic elements, such as arsenic, have been recently proposed as additional risk factors for type 2 diabetes (Longnecker and Daniels, 2001). Hydroarsenicism is a major public health problem since millions of people worldwide are exposed to arsenic by the drinking of contaminated water (Jones, 2007). Epidemiologic and experimental data indicate the diabetogenic role of arsenic but they are still being debated (Navas-Acien et al., 2006). An increase prevalence of diabetes has been consistently observed among residents of high arsenic exposure areas, whereas inconsistent findings have been reported from occupational and community-based studies in low arsenic exposure areas (Chen et al., 2007). Diabetic rats and mice models have been developed by different arsenic exposure protocols (Izquierdo-Vega et al., 2006; Paul et al., 2007a) supporting epidemiological findings.

The potential mechanisms proposed for arsenic-induced type 2 diabetes include, phosphorus substitution, high affinity for sulfhydryl groups, increased oxidative stress and interference with gene expression (Tseng, 2004). Arsenic has been shown to alter the expression of genes related to the maintenance of glucose homeostasis in tissues associated with the pathogenesis of the disease. Thus, arsenic could lead to diabetes by impairing the expression of a wide range of genes involved in pathways that maintain this homeostasis.

Pancreatic islets, adipose tissue, muscle and the liver, regulate glucose blood levels. Pancreatic  $\beta$ -cells secrete insulin in response to an increase in blood glucose levels. This hormone promotes the entrance of glucose into adipocytes and muscle cells via the glucose transporter GLUT4, and inhibits hepatic glucose production. The liver is responsible for gluconeogenesis, which maintains acceptable blood glucose levels when dietary glucose intake is insufficient. In addition, insulin stimulates cell growth and differentiation and promotes the storage of substrates in fat, liver and muscle by stimulating

lipogenesis, glycogen and protein synthesis, and by inhibiting lipolysis, glycogenolysis and protein breakdown (Saltiel and Kahn, 2001). Adipokines, which alter insulin sensitivity, also play a role in this complex regulatory network. In the present review, we discuss the expression of genes involved in glucose homeostasis that are known to be affected by arsenic, identifying possible mechanisms or pathways by which arsenic could lead to or promote diabetes.

## Pancreatic islets

The pancreas plays an important role in maintaining glucose homeostasis by secreting the hormone insulin, which is required for the uptake and storage of glucose, and the counterregulatory hormone glucagon.

*In vivo* arsenic effects in the pancreas have been scarcely studied (Cobo and Castineira, 1997; Izquierdo-Vega et al., 2006). From *in vitro* studies, two mechanisms have been postulated for arsenic-induced type 2 diabetes: the impairment of insulin secretion and transcription (Diaz-Villaseñor et al., 2006) and the induction of oxidative stress (Izquierdo-Vega et al., 2006). Isolated rat pancreatic  $\beta$ -cells treated with noncytotoxic doses of sodium arsenite (5  $\mu$ M) during 72 h showed a significant decrease (40%) in mRNA insulin expression. This reduction also induced a significant decline in insulin secretion (Diaz-Villaseñor et al., 2006). Treated isolated  $\beta$ -cells were no longer able to distinguish between basal and stimulating glucose concentrations (5.6 and 15.6 mmol/l, respectively), and secreted the same amount of insulin in both conditions. Treatment of  $\beta$ -cells with 1  $\mu$ M sodium arsenite during 72 h also significantly reduced (26%) the stimulated insulin secretion. Nevertheless, in this case insulin mRNA was not impaired. We proposed that 1  $\mu$ M sodium arsenite could modify the transcription of genes involved in the process of glucose sensing, the signal transduction needed to couple the stimulus with secretion, and/or the secretion machinery itself, without directly interfering with the insulin gene (Diaz-Villaseñor et al., 2006).

Arsenic-induced alteration in mRNA insulin expression and secretion (pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction) fits the model where insulin resistance alone is not enough to develop type 2 diabetes. Instead, both insulin resistance and insulin deficiency are needed in conjunction. Post-meal insulin level measurements taken 30 min after eating demonstrated that the first phase of insulin secretion after a meal was impaired since or even before the onset of type 2 diabetes (Gerich, 1998). More recent experimental data suggest that the pre-diabetic state is characterized by a similar linear deterioration of peripheral and hepatic insulin sensitivity along with deterioration in  $\beta$ -cell function (Tripathy et al., 2004). In fact, as

discussed below, there are studies that show that arsenic can also affect insulin sensitivity.

It is well known that rodent pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1) is a transcription factor that is required for the development of the pancreas and has been reported to influence the expression of a number of  $\beta$ -cell genes, including those coding for insulin, islet amyloid polypeptide, glucokinase, and the glucose transporter GLUT2 (Johnson et al., 2003). Studies where arsenic was used as positive control to induce cellular stress showed that a 30-min 1 mM arsenite exposure stimulated the binding of PDX-1 to DNA in human pancreatic islets and promoted PDX-1-dependent gene transcription in the pancreatic  $\beta$ -cell line MIN6 (Macfarlane et al., 1997). The same arsenite dose also stimulated PDX-1 translocation from the cytoplasm to the nucleoplasm in human pancreatic  $\beta$ -cells (Macfarlane et al., 1999; Elrick and Docherty, 2001). These results suggest that arsenic may increase insulin transcription acting through PDX-1 activation, contrary to the insulin mRNA decrease found in isolated rat pancreatic  $\beta$  cells (Diaz-Villaseñor et al., 2006). These differences might be due to the duration of arsenite treatment (30 min vs. 72 h), or to the concentration used (1 mM vs. 5  $\mu$ M).

One of the plausible modes of action of arsenic toxicity is oxidative stress since it can stimulate production of reactive oxygen species (ROS), resulting from an imbalance between antioxidants and oxidants during arsenic metabolism (Goering et al., 1999; Sun et al., 2006). Antioxidative enzymes content in various tissues may be a major determinant of their susceptibility to cytotoxic damage (Tiedge et al., 1997). On the other hand, ROS also play an important role in insulin resistance, a highly prevalent condition implicated in the development of type 2 diabetes (Fridlyand and Philipson, 2006; Houstis et al., 2006). In rat pancreatic islets and in the rat insulinoma RINm5F cell line, the expression and the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, hydrogen peroxide-inactivating enzyme catalase, and glutathione peroxidase) are significantly lower than in the liver (Tiedge et al., 1997). Arsenite exposure decreased, in a dose-dependent manner, the expression and activity of the enzyme catalase in the human immortalized keratinocyte cell line HaCaT after 10 to 20  $\mu$ M sodium arsenite treatment over 24 h, whereas the production of ROS increased in a dose-dependent manner starting with 2.5  $\mu$ M arsenite (Sun et al., 2006). Thus, we would expect a decrease in pancreatic  $\beta$ -cell catalase expression and activity values in the presence of arsenic. When rats were treated *in vivo* with 1.7 mg/kg sodium arsenite every 12 h during 90 days, the activity of pancreatic thioredoxin reductase, an enzyme involved in the regulatory system to maintain intracellular redox status by scavenging ROS, was significantly diminished. Interestingly the levels of total glutathione and lipoperoxidation in pancreas increased significantly, indicating the presence of stress and oxidative damage, respectively (Izquierdo-Vega et al., 2006).

## Liver

The studies of arsenic effects on glucose homeostasis have been mostly focused on pancreas and adipocytes, whereas for

muscle and liver the information is limited. Nevertheless arsenic alteration of hepatic glucose production has been documented (Szinicz and Forth, 1988).

Even though the high physiological relevance of the liver in diabetes, the impairment of gene expression by arsenic has been scarcely evaluated. One study carried out in arsenic-treated embryos evaluated the induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) mRNA in liver. During periods of fasting, glucose is obtained from non-sugar carbon substrates (gluconeogenesis). PEPCK is the rate-limiting enzyme of this process and is responsible of the conversion of oxaloacetate to phosphoenolpyruvate. In this study, when 14-day chick embryos were treated with a single dose of sodium arsenite (100  $\mu$ mol/kg), a significant increase was found in the basal expression of PEPCK over time; an altered response of PEPCK gene to glucocorticoid induction was also observed. Interestingly, initially at 2–4 h, an increased response to glucocorticoids was observed but later the response of PEPCK was reduced to basal levels (Hamilton et al., 1998).

Another study reports the use of non-cytotoxic doses of sodium arsenite (0.3–3.3  $\mu$ M) to treat the rat hepatoma H4IIE cell line transiently transfected with luciferase constructs containing two tandem glucocorticoid response elements, finding a significant dose-dependent decrease of the dexamethasone-induced expression of the luciferase construct (Kaltreider et al., 2001). The basal luciferase expression under an intact hormone-responsive promoter from the mammalian PEPCK gene was reduced 50% after arsenite treatment (3.3  $\mu$ M for 18 h), whereas a 2-h arsenite pretreatment almost completely abolished dexamethasone-induced expression. Arsenic was able to alter the expression of PEPCK by interacting directly with the glucocorticoid receptor (GR) complexes. It also inhibits the GR-mediated transcription selectivity, without interfering with the hormone-induced nuclear translocation or activation of the GR complexes (Kaltreider et al., 2001).

In a third study, the activity of hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) from mice fed with arsenic (3.2 mg/l) during 6 to 15 months was significantly reduced in a time-related manner (Santra et al., 2000). G6PDH is an enzyme of the pentose phosphate pathway, an alternate metabolic pathway for glucose. Decreased blood activity of G6PDH has been associated with an increase risk for oxidative-stress-induced diabetes (Wan et al., 2002) and a decrease in the generation of nitric oxide (Gaskin et al., 2001). Nevertheless, a reduction in the activity of the enzyme not necessarily means a change in gene expression.

## Peripheral tissue: adipocytes and muscle cells

Insulin binding to its receptor increases glucose uptake in muscle and fat, triggering a network of signaling pathways which finally stimulate the translocation of the glucose transporter GLUT4 from intracellular sites to the cell membrane (Saltiel and Kahn, 2001). Arsenic exposure alters the expression and/or activity of different genes/proteins expressed in these tissues including genes involved in adipocyte differentiation, cell cycle, a proinflammatory response-transcription factor, two

signaling pathways (Ras–MAP Kinase–AP-1 cascade and PI(3)K–Akt pathway) and protein-induced insulin resistance.

#### *Genes involved in adipocyte differentiation and cell cycle*

Adipogenesis is a well-characterized cellular process. Cultured preadipocyte fibroblasts that differentiate into adipocytes in response to dexamethasone and insulin treatment have provided a useful model for the evaluation of arsenic effects. C3H 10T1/2 pre-adipocytes grown in noncytotoxic sodium arsenite doses (6  $\mu$ M) during chronic exposure (2 months) cannot differentiate into adipocytes, regardless of the continued presence or removal of arsenic during the differentiation protocol (Trouba et al., 2000a). Short-term exposure to sodium arsenite during differentiation inhibits this process in a dose-dependent manner and concentrations  $\geq 3$   $\mu$ M produce a significant inhibition of lipid accumulation (Trouba et al., 2000a). The authors proposed that arsenic can inhibit and reverse differentiation of adipocytes by disrupting the expression of genes involved in adipogenesis, including down-regulation of fat-cell-specific genes, thus shifting away from the differentiation to the proliferation pathway (Wauson et al., 2002).

The expression of different genes was measured when C3H 10T1/2 cells were treated with 6  $\mu$ M sodium arsenite in various differentiation stages. The mRNAs that were found significantly reduced were: (a) the transcription factor required for adipogenesis, peroxisome proliferative-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ); (b) the adipocyte selective fatty acid-binding protein (AP2) (induced by PPAR $\gamma$ ); (c) the transcription factor CCAAT-enhancer binding protein alpha (C/EBP $\alpha$ ) that works in conjunction with PPAR $\gamma$  to induce the expression of most fat cell-specific genes; and (d) genes involved in cell cycle regulation, like *p21<sup>Cip1/Waf1</sup>* and *p27<sup>Kip1</sup>* (Trouba et al., 2000b; Wauson et al., 2002). Together, these findings explain why C3H 10T1/2 pre-adipocytes in the presence of arsenite were not capable of undergoing terminal differentiation, since there is a disruption in the expression of genes involved in the adipogenesis pathway and an inhibition of genes that negatively regulate the cell cycle.

#### *Proinflammatory response-transcription factor*

Activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) has been implicated in chronic disorders, such as diabetes and its complications (Bierhaus et al., 2001; Kumar et al., 2004). NF- $\kappa$ B exists in the cytoplasm in an inactive form associated with the inhibitory protein termed I- $\kappa$ B. Phosphorylation, ubiquitination, and proteolysis of I- $\kappa$ B allows NF- $\kappa$ B to translocate to the nucleus and induce the transcription of certain genes. The protein kinase responsible for I- $\kappa$ B phosphorylation and degradation in response to proinflammatory stimuli is the I- $\kappa$ B kinase (IKK) (Sun and Andersson, 2002).

IKK overexpression or activation by known stimulators in obese rodents promotes insulin resistance, whereas reduction of NF- $\kappa$ B signaling through salicylate treatment improved insulin

sensitivity and dyslipidemia (Yuan et al., 2001). Subjects with type 2 diabetes and insulin resistance have a 60% reduction of I- $\kappa$ B protein in muscle (an indicator of increased activation of the NF- $\kappa$ B pathway), conditions that can be reversed by exercise training (Sriwijitkamol et al., 2006).

Arsenite treatment (12 h) in co-transfected cells with stable expression vectors for IKK $\beta$ - and NF- $\kappa$ B-dependent luciferase reporter gene induced a dose-dependent increase of luciferase activity with a peak at 18  $\mu$ M arsenite. Higher concentrations of arsenite (more than 20  $\mu$ M), however, did not increase NF- $\kappa$ B-dependent luciferase activity further, partially because of the cytotoxic effects of arsenite at higher doses (Chen et al., 2001). On the other hand, Kapahi et al. showed that a 2-h exposure to arsenite potently inhibits NF- $\kappa$ B activation (Kapahi et al., 2000).

Moreover, NF- $\kappa$ B plays a central role in regulating the transcription of cytokines involved in insulin resistance, like tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and various interleukins (Kumar et al., 2004). In HeLa cells, in the presence of TNF- $\alpha$ , arsenite (12.5  $\mu$ M) produced inhibition of NF- $\kappa$ B activation, I- $\kappa$ B degradation and IKK activity. In addition, in the HEK293 human kidney cells, arsenite also inhibited IKK and NF- $\kappa$ B activation in response to either TNF- $\alpha$  or interleukin-1 (Kapahi et al., 2000).

#### *Signaling pathways*

In addition to the regulation of glucose, lipid, and protein metabolism, insulin also participates in a variety of pathways to promote general and specific gene expression required for the regulation of cell metabolism, growth and differentiation (Saltiel and Kahn, 2001). Arsenic can alter gene expression directly by interacting with transcription factors, but it might also act indirectly, interfering with members of the insulin-signal transduction pathway, thus blocking the signal required for the transcription pattern.

#### *Ras–MAP kinase–AP-1 cascade*

Insulin stimulates the mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway (also called extracellular signal-regulated kinase [ERK]), by the activation of Ras, which operates as a molecular switch, stimulating a serine/threonine kinase cascade through the stepwise activation of Raf, MEK, and ERK. Activated ERK can translocate into the nucleus, where it catalyses the phosphorylation of transcription factors, initiating a transcriptional program that leads to cellular proliferation or differentiation (Sasaoka and Kobayashi, 2000; Saltiel and Kahn, 2001). This signal transduction pathway is affected by arsenic. Treatment of Swiss 3T3 mouse fibroblasts, A431 human squamous carcinoma and L6 rat myotubes for 28 min with 0.5 mM sodium arsenite prevented the activation of Ras and strongly suppressed the activation of the MAP kinase cascade induced by the epidermal growth factor (EGF) and the insulin-like growth factor-I (IGF-I). Arsenite exerts its effects by preventing the guanine nucleotide exchanger factor SOS from converting Ras to its active GTP-bound state (Doza et al., 1998).

A variety of growth factors, including insulin, have been found to markedly activate the transcription factor activator protein-1 (AP-1), incrementing the mRNA and posttranslational modifications of its components, c-Fos and c-Jun. The translocation into the nucleus and the activation of Elk-1 turns on the transcription of the c-fos gene and phosphorylates the c-Jun protein, which combines with the newly made Fos protein to form AP-1. C-Fos and c-Jun are intimately involved in the control of intracellular signaling and in the regulation of cell growth and differentiation. Although the expression of c-Fos mRNA was dramatically up-regulated by insulin in both adipose and muscle tissue of diabetic rats, insulin treatment results in only a slight increase in c-Jun mRNA levels (Olson and Pessin, 1994). In addition, an attenuation of c-Fos transrepression occurs in adipose tissue of insulin-deficient diabetic rats, suggesting a differential regulation of insulin-signaling pathways in adipose tissue in altered metabolic states such as diabetes (Olson and Pessin, 1994). In cultured human normal fibroblasts exposed for 22 h to 20  $\mu\text{M}$  arsenic trioxide, c-Jun and c-Fos transcription was up-regulated, but the expression profiles of both were clearly different, c-Fos up-regulation was immediate, whereas a delay for c-Jun was detected (Burnichon et al., 2003). In another study, the effect of arsenic upon c-Fos and c-Jun was time-dependent (Hu et al., 2002). Exposure of human fibroblast cells to sodium arsenite (0.1 and 5  $\mu\text{M}$ ) during 24 h up-regulated the expression of both, c-Fos and c-Jun as well as the DNA binding activity of AP-1. A prolonged exposure time (0.1 and 0.5  $\mu\text{M}$  for 10–20 weeks), however, decreased both protein levels and AP-1 activity. Both mRNAs were decreased only in the long-term exposure (Hu et al., 2002).

#### *PI(3)K–Akt pathway*

Phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI(3)K) has a pivotal role in the metabolic and mitogenic actions of insulin, and its activation transmits multiple signals. PI(3)K catalyses the phosphorylation of phosphoinositides to produce phosphatidylinositol-3-phosphates (PIP-3), which in turn regulate the AGC family of serine/threonine protein kinases, one of the three main classes of signaling molecules regulated by PIP-3. The best characterized AGC kinase is phosphoinositide-dependent kinase 1, one of the kinases that phosphorylates and activates the serine/threonine kinase Akt (Saltiel and Kahn, 2001).

Akt (also known as PKB) is required for insulin-stimulated glucose transport and it has been suggested to be involved in the transmission of the insulin signal (Saltiel and Kahn, 2001). Akt activation by PI(3)K results in inhibition of apoptotic signals and promotion of cell survival (Brunet et al., 1999), and its phosphorylation is also involved in the insulin-sensitizing function of interleukin-6 on glycogen synthesis in human muscle (Weigert et al., 2005).

In processes such as cell growth, proliferation and differentiation, arsenic may act as an agonist of insulin, interfering with the PI(3)K–Akt pathway. In cultured human keratinocytes (HaCaT), arsenite exposure (200  $\mu\text{M}$  for 15–120 min) activates the PI(3)K–Akt cell survival pathway, inducing the activation of Akt at both Ser473 and Thr308 (Souza et al., 2001). In

preadipocytes exposed to 3  $\mu\text{M}$  arsenic trioxide, differentiation was inhibited and the expression and phosphorylation of Akt was stimulated, whereas the direct interaction between Akt and PPAR $\gamma$  and also between PPAR $\gamma$  and its ligand, the Retinoid X Receptor alpha (RXR $\alpha$ ), was inhibited (Wang et al., 2005). Exposure of mouse epidermal JB6 C141 cells to arsenite induced cell proliferation (1.25  $\mu\text{M}$  for 72 h), activated the PI(3)K–Akt/p70(S6k) signal pathway (5 and 10  $\mu\text{M}$  for 1 h), and increased the expression (at both transcription and protein levels) of the nuclear protein cyclin D1 (2  $\mu\text{M}$  for 12 h and 5  $\mu\text{M}$  for 24 h, respectively) (Ouyang et al., 2006), which plays a pivotal role in cell proliferation and cell cycle transition from G1 to S phase. Moreover, arsenite treatment through the PI(3)K–Akt pathway is able to induce cell differentiation or proliferation depending on cell type and p53 status (Sandoval et al., 2007).

In contrast to the activation of the PI(3)K–Akt pathway by arsenic, a 4-h exposure to trivalent arsenicals (50  $\mu\text{M}$  sodium arsenite, 2  $\mu\text{M}$  methylarsine oxide and 5  $\mu\text{M}$  iododimethylarsine) suppressed the expression and phosphorylation of Akt in 3T3-L1 adipocytes, an important event required for the translocation of GLUT4 to the cellular membrane in response to insulin (Walton et al., 2004). Recent studies have shown that the activation of Akt by PDK-1 (the 3-phosphoinositide-dependent kinase-1) phosphorylation, was inhibited by a 4-h treatment with arsenite or methylarsonous acid (50  $\mu\text{M}$  and 2  $\mu\text{M}$ , respectively). In addition, Akt activation by a putative PDK-2 was also suppressed (Paul et al., 2007b). These findings might explain the inhibition of insulin-stimulated glucose uptake and the lower mobilization of the GLUT4 transporter to the cellular membrane observed in the presence of trivalent arsenicals (Walton et al., 2004; Paul et al., 2007b).

In these two signaling pathways (Ras–MAPK and PI(3)K–Akt) involved in gene expression, arsenic alters upstream regulatory signals needed to modify the expression of genes involved in proliferation and differentiation. In the other examples mentioned above, where arsenic altered transcription factors, it is still not known if arsenic directly interferes with the expression of the genes evaluated or it also interacts with proteins involved in the signal transduction pathway to finally impair insulin secretion or action.

#### *Protein-induced insulin resistance (adipokines)*

At the physiological level, hepatic glucose production and skeletal muscle glucose disposal are subject to regulation by a number of adipocyte derived factors, called adipokines (Gurnell, 2003). These secreted proteins include TNF- $\alpha$ , resistin, interleukins (IL)-1 $\beta$ , 6, 8, and 10, acylation-stimulating protein (ASP), angiotensinogen, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), leptin, and adiponectin among others, and have been shown to have a variety of local and peripheral effects (Guerre-Millo, 2004; Rondinone, 2006). Adipokines can indirectly regulate insulin action and substrate metabolism in muscle and liver, as well as glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells. Some adipokines such as TNF- $\alpha$  and IL-6 are also produced in other types of cells, like the ones of the



Table 1  
Effects in the expression of genes related to type 2 diabetes after arsenic exposure

| Gene                                                                            | Concentration and arsenic compound                                                 | Time of exposure                                                                                                                                        | Biological model                                                                                                                                              | Effect                                                                                                                                                                      | Reference                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Insulin</i>                                                                  | 5 $\mu$ M arsenite                                                                 | 72 h                                                                                                                                                    | Isolated rat pancreatic $\beta$ -cells                                                                                                                        | Decrease of mRNA expression (40%) and reduction of insulin secretion; treated cells were no longer able to distinguish between basal and stimulating glucose concentrations | (Díaz-Villaseñor et al., 2006)                                                |
| <i>PDX-1</i>                                                                    | 1 mM arsenite                                                                      | 30 min                                                                                                                                                  | Human pancreatic islets and MIN6 cell line                                                                                                                    | Increase in translocation from the cytoplasm to the nucleoplasm and binding to DNA and PDX-1-dependent gene transcription                                                   | (Macfarlane et al., 1997; Macfarlane et al., 1999; Elrick and Docherty, 2001) |
| <i>Catalase</i>                                                                 | 10 and 20 $\mu$ M<br>2.5–20 $\mu$ M arsenite                                       | 24 h                                                                                                                                                    | Human keratinocyte cell line HaCaT                                                                                                                            | Activity and expression (mRNA and protein) decreased<br>Increase of ROS production in a dose-dependent manner                                                               | (Sun et al., 2006)                                                            |
| <i>PPAR<math>\gamma</math></i><br><i>AP2</i><br><i>c/EBP<math>\alpha</math></i> | 6 $\mu$ M arsenite<br>6 $\mu$ M arsenite<br>6 $\mu$ M arsenite                     | (a) while differentiation was induced, (b) 2 months before differentiation, (c) 2 months before and during differentiation or (d) after differentiation | Mouse pre-adipocytes<br>C3H 10T1/2 cell line                                                                                                                  | Reduction of mRNA<br>Inhibition and reversal of adipocyte differentiation                                                                                                   | (Wauson et al., 2002)                                                         |
| <i>NF-<math>\kappa</math>B</i>                                                  | 18 $\mu$ M arsenite                                                                | 12 h                                                                                                                                                    | Human bronchial epithelial cell line BEAS-2B transfected with the expression vectors for IKK $\beta$ with a NF- $\kappa$ B-dependent luciferase reporter gene | Induction of NF- $\kappa$ B-dependent genes in a dose-dependent manner                                                                                                      | (Chen et al., 2001)                                                           |
| <i>NF-<math>\kappa</math>B</i>                                                  | 12.5 $\mu$ M arsenite                                                              | 2 h                                                                                                                                                     | TNF- $\alpha$ -stimulated HeLa cells                                                                                                                          | Inhibition of NF- $\kappa$ B activation and I- $\kappa$ B degradation                                                                                                       | (Kapahi et al., 2000)                                                         |
| <i>p21<sup>Cip1/Waf1</sup></i>                                                  | 6 $\mu$ M arsenite                                                                 | 2 months before differentiation to adipocytes was induced                                                                                               | Mouse pre-adipocytes<br>C3H 10T1/2 cell line                                                                                                                  | Decrease of mRNA expression, reduced capacity to undergo terminal adipocyte differentiation                                                                                 | (Wauson et al., 2002)                                                         |
| <i>p27<sup>Kip1</sup></i>                                                       | 6 $\mu$ M arsenite                                                                 | 2 months before differentiation to adipocytes was induced                                                                                               | Mouse pre-adipocytes<br>C3H 10T1/2 cell line                                                                                                                  | Down-regulation of mRNA and protein                                                                                                                                         | (Trouba et al., 2000b)                                                        |
| <i>Cyclin D1</i>                                                                | 2 $\mu$ M arsenite<br>5 $\mu$ M arsenite<br>20 $\mu$ M arsenic trioxide            | 12 h<br>24 h<br>22 h                                                                                                                                    | Mouse epidermal JB6 Cl41 cell line<br>Cultured human normal fibroblasts                                                                                       | Increased transcription<br>Increase in the protein expression<br>Transcription up-regulation                                                                                | (Ouyang et al., 2006)<br>(Burnichon et al., 2003)                             |
| <i>c-fos and c-Jun</i>                                                          | 0.1 and 5 $\mu$ M arsenite<br>0.1 and 0.5 $\mu$ M arsenite                         | 24 h<br>10–20 weeks                                                                                                                                     | Human GM847 fibroblast cells<br>Human GM847 fibroblast cells                                                                                                  | Up-regulation of expression and DNA binding activity of AP-1<br>Decrease of mRNA, protein levels and AP-1 activity                                                          | (Hu et al., 2002)<br>(Hu et al., 2002)                                        |
| <i>TNF-<math>\alpha</math></i>                                                  | 1 $\mu$ M arsenite                                                                 | 48 h                                                                                                                                                    | Human peripheral mononuclear cells (12 subjects)                                                                                                              | A twofold release                                                                                                                                                           | (Yu et al., 2002)                                                             |
| <i>IL-6</i>                                                                     | 0.128–0.62 $\mu$ M blood arsenic levels by arsenic-tainted water ingestion         | Extended period of time                                                                                                                                 | Human blood lymphocytes (24 subjects)                                                                                                                         | Threefold expression increase                                                                                                                                               | (Wu et al., 2003)                                                             |
| <i>Akt</i>                                                                      | 200 $\mu$ M arsenite                                                               | 15–120 min                                                                                                                                              | Human keratinocyte cell line HaCaT                                                                                                                            | Increased activation (phosphorylation at Ser473 and Thr308)                                                                                                                 | (Souza et al., 2001)                                                          |
| <i>Akt</i>                                                                      | 3 $\mu$ M arsenic trioxide                                                         | 2 days prior and during differentiation                                                                                                                 | Mouse pre-adipocytes<br>3T3-L1 cell line                                                                                                                      | Stimulation of Akt expression and phosphorylation. Inhibition of the direct interaction between PPAR $\gamma$ and Akt and its ligand the RXR $\alpha$                       | (Wang et al., 2005)                                                           |
| <i>Akt</i>                                                                      | 5 and 10 $\mu$ M arsenite                                                          | 1 h                                                                                                                                                     | Mouse epidermal JB6 Cl41 cell line                                                                                                                            | Akt activation                                                                                                                                                              | (Ouyang et al., 2006)                                                         |
| <i>Akt</i>                                                                      | 50 $\mu$ M arsenite, 2 $\mu$ M methylarsine oxide and 5 $\mu$ M iododimethylarsine | 4 h                                                                                                                                                     | Mouse pre-adipocytes<br>3T3-L1 cell line                                                                                                                      | Decrease of the expression and phosphorylation                                                                                                                              | (Walton et al., 2004)                                                         |

Table 1 (continued)

| Gene                 | Concentration and arsenic compound | Time of exposure | Biological model                                                                                                                                                 | Effect                                                                                                                                              | Reference                 |
|----------------------|------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <i>mSOS-Ras-MAPK</i> | 0.5 mM arsenite                    | 28 min           | Mouse fibroblasts Swiss 3T3, human squamous carcinoma A431 and L6 rat myotubes cell lines                                                                        | Suppression of the activation of MAP kinase cascade induced by EGF and IGF-I preventing the activation of Ras by inhibiting the bound of GTP to Ras | (Doza et al., 1998)       |
| <i>PEPCK</i>         | 100 $\mu$ mol/kg arsenite          | Single dose      | 14-day chick embryo                                                                                                                                              | Increase of basal expression over time in liver. Increase response to glucocorticoids (2–4 h) followed by a decline to basal levels                 | (Hamilton et al., 1998)   |
| <i>PEPCK</i>         | 3.3 $\mu$ M                        | 18 h             | Rat hepatoma H4IIE cell line transfected with luciferase constructs containing an hormone-responsive promoter from PEPCK or two glucocorticoid response elements | Reduction of basal luciferase expression (50%) and abolishment of dexamethasone-inducible expression                                                | (Kaltreider et al., 2001) |
|                      | 0.3–3.3 $\mu$ M arsenite           | 2-h pretreatment |                                                                                                                                                                  | Dose-dependent decrease of dexamethasone-induced expression                                                                                         |                           |

immune system (Spriggs et al., 1992; Akira et al., 1993; Wajant et al., 2003).

TNF- $\alpha$  levels are closely associated with both hyperinsulinemia and insulin resistance, increasing in adipose tissue (mRNA) and in circulation of obese individuals (Sonnenberg et al., 2004; Rondinone, 2006). In adipocytes, TNF- $\alpha$  reduces the secretion of adiponectin (a “good” adipokine) and the expression of genes involved in adipogenesis and lipogenesis, whereas in the liver, TNF- $\alpha$  increases the expression of genes involved in *de novo* fatty acid synthesis and decreases the expression of those involved in fatty acid oxidation (Rondinone, 2006). On the other hand, plasma IL-6 is highly correlated with body mass and inversely correlated with insulin sensitivity, inducing hepatic insulin resistance (Rondinone, 2006). Several groups have reported that PPAR $\gamma$  ligands (like thiazolidinediones) could reduce the release of TNF- $\alpha$  and IL-6 from macrophages (Gurnell, 2003).

Concerning arsenic, a twofold TNF- $\alpha$  release was observed when peripheral mononuclear cells (monocytes/macrophages) of 12 healthy adults were exposed *in vitro* to 1  $\mu$ M sodium arsenite during 48 h. At 5  $\mu$ M TNF- $\alpha$  secretion was further stimulated reaching its maximum level, however it is important to mention that 5  $\mu$ M was already cytotoxic (Yu et al., 2002). Authors did not evaluate whether arsenic can induce TNF- $\alpha$  mRNA expression and an increment in release does not necessarily mean a change in mRNA expression. If arsenic is capable of inducing the secretion of TNF- $\alpha$  by mononuclear cells, it would be plausible for this effect to occur in adipocytes.

In another study in lymphocytes of 24 subjects who had ingested arsenic-tainted well water for an extended period of time, gene expression was evaluated by microarray with 708 human cDNAs (Wu et al., 2003). The samples were separated into groups based on blood arsenic levels [low (0–0.057  $\mu$ M), intermediate (0.061–0.12  $\mu$ M) and high (0.128–0.62  $\mu$ M)], with each group comprising eight similar age-, sex-, and smoking-frequency-matched individuals. The most significantly altered genes were confirmed by real-time RT-PCR and the protein concentration was quantified in the plasma of 51 subjects (18 of the low-, 20 of the intermediate- and 13 of the

high-exposure group) (Wu et al., 2003). One of the genes showing differential expression among the three different groups was IL-6. Between the low- and the intermediate-group, there were no differences, but the highly exposed group showed a nearly threefold increase in IL-6 expression. The authors found no significant correlation of plasma protein levels for IL-6 with blood arsenic. A link that might explain the route by which arsenic induces cytokine production could be the transcriptional regulation of TNF- $\alpha$  and IL-6 by NF- $\kappa$ B or PPAR $\gamma$ .

## Discussion

Complex illnesses such as diabetes are the result of the interaction between environmental factors and genetic predisposition or susceptibility. Lifestyle is one important environmental factor that contributes to the onset of the disease, and refers principally to physical activity, and the type and quantity of food consumed. Nevertheless, exposure to toxic elements such as arsenic may not be considered separately, since it could be one of the etiological factors of the disease. The National Academy of Sciences estimates that about 75,000 to 100,000 tons of arsenic are produced annually on a global scale (NAS, 1977). About 80% of arsenic compounds are used to manufacture products with agricultural applications such as insecticides, herbicides, fungicides, algacides, sheep dips, wood preservatives, dyestuffs and for the eradication of tapeworms in sheep and cattle (NAS, 1977). In addition, the use of arsenic in microelectronics is increasing. Thus, in addition to water contamination by this metal, anthropogenic activity is also important (Goering et al., 1999).

The development of type 2 diabetes is a multifactorial process, therefore many factors could be involved in the manner in which arsenic contributes to the occurrence of diabetes. The reviewed studies suggest that arsenic might increase the risk for type 2 diabetes via several mechanisms, affecting a cluster of regulated events, which in conjunction triggers the disease. In fact, various mechanisms have been linked to arsenic carcinogenesis, including chromosome abnormalities, altered DNA repair and methylation, induction of oxidative stress, modifica-

tion of cell proliferation, and liver metabolism (Jager and Ostrosky-Wegman, 1997b; Clewell et al., 2007).

The expression of several genes involved in glucose homeostasis is altered during the pathogenesis process leading to type 2 diabetes. The expression of many of these genes is also impaired by arsenic exposure, as reviewed in this paper. Nevertheless, other genes affected by arsenic do not always reflect the changes occurring in type 2 diabetes, such as c-Fos, c-Jun, PEPCK and NF- $\kappa$ B, and in the PI(3)K–Akt pathway. Although it has been reported that Akt was induced by arsenic activating the cell survival pathway as insulin does (Wang et al., 2005), others found that its expression was suppressed, inhibiting the insulin-stimulated glucose uptake and the lower mobilization of the GLUT4 transporter to the cellular membrane (Walton et al., 2004). The fact that arsenic can mimic features of insulin related to proliferation does not necessarily mean it can have the same effect on metabolism. Actually, in the majority of the studies reviewed here, arsenic shows insulin antagonistic effects. In regard to c-Fos and c-Jun expression, the effects of arsenic were time-dependent, being the chronic exposure opposite to the known effects of insulin (Hu et al., 2002).

Arsenic has the capacity to disturb NF- $\kappa$ B activation, as an inhibitor or as an activator (Kapahi et al., 2000; Chen et al., 2001). The study by Chen et al. showed similarity to the effects observed in type 2 diabetes (NF- $\kappa$ B activation rather than

inhibition). The DNA binding activity of NF- $\kappa$ B in the presence of arsenic was time-dependent in human fibroblast cells; acute exposure (24 h) to 0.1–5  $\mu$ M sodium arsenite up-regulated its activity, whereas the same doses under chronic exposure (10–20 weeks) decreased it (Hu et al., 2002).

In regard to PEPCK, in chick embryos *in vivo*, the basal and inducible (2–4 h) expression of the enzyme was increased, whereas for the rat hepatoma cell line, a decrease in dexamethasone-induced expression was observed (Hamilton et al., 1998; Kaltreider et al., 2001). The data provided by Kaltreider et al. indicate that arsenic does not induce diabetes by increasing hepatic glucose production via gluconeogenesis; given that one of the principal enzymes for gluconeogenesis is diminished by arsenic, it seems more reasonable to think that arsenic affects  $\beta$ -cell function and/or peripheral insulin sensitivity, rather than causing an increment in hepatic glucose production. However, more studies are needed to fully elucidate it.

The genes included in this review are not the only ones whose expression is impaired by arsenic exposure. Many other genes have been proved to be altered (up- and down-regulated) in SCC9 human keratinocyte cultures treated continuously for 2 weeks with 2 or 6  $\mu$ M arsenite or arsenate, respectively (Rea et al., 2003). Nevertheless, since they do not seem to be directly related to glucose homeostasis and/or diabetes, the results were not included in the present review.

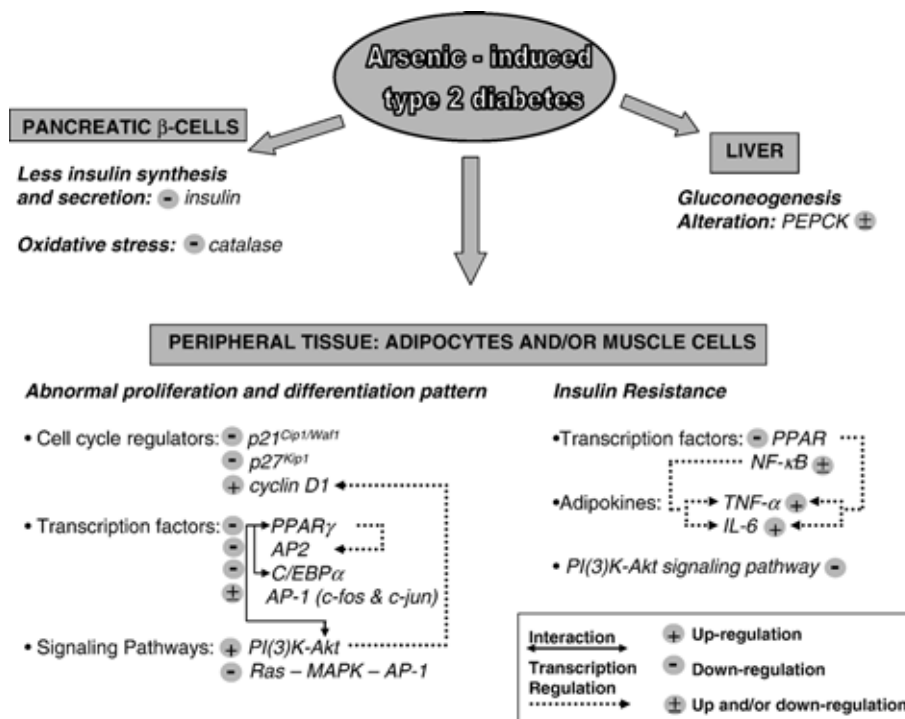


Fig. 1. Alteration of gene expression by arsenic in type 2 diabetes-related tissues and their physiological effects. In peripheral tissue, arsenic has an effect on insulin sensitivity modifying the expression of genes involved in insulin resistance (transcription factors, adipokines and members of the PI(3)K–Akt signaling pathway), and shifting away cells from differentiation to the proliferation pathway (altering the expression of cell cycle regulators, transcription factors and molecules involved in signaling pathways). In pancreatic  $\beta$ -cells arsenic decreases insulin synthesis and secretion and reduces the expression of antioxidant enzymes. Finally, in the liver arsenic disturbs glucose production. According to the analyzed reports, alteration in the expression of genes by arsenic is denoted by the symbols ( $-$ ), ( $+$ ) or ( $\pm$ ) for a down-regulation, up-regulation or for contradictory results, respectively. Indirect arsenic effects can occur due to the interaction between genes ( $\leftrightarrow$ ) and through their regulation by various transcription factors ( $\dots\rightarrow$ ).

It is noteworthy to mention that many of the cellular processes referred were carried out *in vitro*, thus cannot account for the toxicokinetics occurring *in vivo*; nevertheless they are useful models for understanding the onset and progression of type 2 diabetes in the presence of arsenic. Also, many of the existing studies about gene expression were not designed with the goal of understanding arsenic-induced diabetes, which means that studies specifically designed to discover the mechanism(s) by which arsenic induces up- or down-regulation of genes related to type 2 diabetes are necessary. Opposing results have been reported and might be attributable to the dose, time, experimental model, and type of arsenic compound tested. Studies with the main purpose of finding the way in which arsenic is involved in the development of diabetes should use doses similar to human exposure levels (0.05–1  $\mu\text{M}$  in blood) (Vahter, 1998; Wu et al., 2003).

An example of opposite dose-dependent effects of arsenic is the transcription of p53. The expression of this protein, involved in the process of cell cycle and apoptosis, was down-regulated with low doses of inorganic arsenic (0.01  $\mu\text{M}$ ) and up-regulated with higher doses (0.1  $\mu\text{M}$ ). In fact, the alteration of distinct biological processes by arsenic depends upon the arsenic dose tested (Clewell et al., 2007).

Another possible explanation for the contradictory results is that short-term exposure to arsenite (up to 48 h) causes a delay in cell death. Experiments carried out for less than this time, even at low concentrations, should take into account that survival can be underestimated if toxicity is assessed immediately after the treatment. Therefore, effects studied during a short exposure may be evaluating alterations in dying rather than in living cells and leading to the idea that some high doses are “non toxic” (Komissarova et al., 2005). Toxic effects of arsenic have been considered paradoxical. Interestingly, it has been used as a poison as well as a treatment for psoriasis or leukemia (Jager and Ostrosky-Wegman, 1997a), and several studies about other medical uses are being carried out (Dilda and Hogg, 2007).

The possibility that long-term exposure to arsenic enhances the mechanisms that maintain accurate insulin signaling, triggering a disruption in glucose homeostasis, should be further studied.

## Conclusions

Some of the organs and molecules targeted by arsenic are involved in glucose and lipid homeostasis, and are also implicated in type 2 diabetes. In this review, we presented the genes whose expression has been shown to be affected by different concentrations of arsenic with a wide range of exposure times, and in diverse *in vitro* and *in vivo* systems (Table 1). The expression or activation of genes altered by arsenic related to pancreatic  $\beta$ -cells were *insulin*, and *catalase*. In adipocytes and/or muscle were *PPAR $\gamma$* , *AP2*, *C/EBP $\alpha$* , *NF- $\kappa$ B*, *p21<sup>Cip1/Waf1</sup>*, *p27<sup>Kip1</sup>*, *Cyclin D1*, *c-Fos*, *c-Jun*, *TNF- $\alpha$*  and *IL-6*, while the altered signal transduction pathways that finally contribute to the expression of different genes were the *Ras-MAPK* and the *PI(3)K-Akt* pathways. In the liver, the

gene whose expression was impaired by arsenic was *PEPCK* (Fig. 1).

As it has been shown throughout the present review, interactions exist among the products of the genes that are involved in diabetes and that are susceptible to arsenic toxicity, resulting in the generation of altered regulatory signals. For example, PDX-1 is a transcription factor for insulin, as is NF- $\kappa$ B for TNF- $\alpha$ , IL-6 and Cyclin D1 (Kumar et al., 2004). While PPAR $\gamma$  is a transcription factor for AP2, TNF- $\alpha$  and IL-6, in addition it works in conjunction with the transcription factor C/EBP $\alpha$  and interacts with Akt. With regard to the signal transduction pathways, the expression of Cyclin D1 is regulated by the PI(3)K-Akt pathway (Fig. 1).

The data generated until this article was written lead us to propose one possible mechanism by which arsenic could increase the risk for type 2 diabetes by interfering with gene expression. As it is described in Fig. 1, arsenic-induced alteration in the expression of genes related to type 2 diabetes results in the following outcomes: (1) alteration of gluconeogenesis in the liver, (2) the synergistic effect of insulin synthesis and secretion reduction and the induction of oxidative stress in pancreatic  $\beta$ -cells, (3) an abnormal proliferation and differentiation pattern of adipocytes and/or muscle produced by the disruption of the expression of genes implicated in this process (i.e. cell cycle regulators, transcription factors and signaling pathways), and (4) insulin resistance in peripheral tissue caused by the alteration of transcription factors involved in insulin sensitivity, the induction of cytokines like TNF- $\alpha$  and IL-6 (by adipocytes and/or lymphocytes), and the inhibition of Akt activation, which diminished the translocation of GLUT4 transporter to the cellular membrane.

## Acknowledgments

We thank the valuable comments of Dr. Luis A. Herrera and Dr. Emilio Rojas, and the style improvement provided by Robert Burns. This work was partially supported by CONACyT, DGAPA (UNAM) and by The U.S.–Mexico Binational Center for Environmental Sciences and Toxicology.

## References

- ADA, 2006. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 29 (Suppl. 1), S43–S48.
- Akira, S., Taga, T., Kishimoto, T., 1993. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.* 54, 1–78.
- Bierhaus, A., Schiekofer, S., Schwaninger, M., Andrassy, M., Humpert, P.M., Chen, J., Hong, M., Luther, T., Henle, T., Klötting, I., Morcos, M., Hofmann, M., Tritschler, H., Weigle, B., Kasper, M., Smith, M., Perry, G., Schmidt, A.M., Stern, D.M., Haring, H.U., Schleicher, E., Nawroth, P.P., 2001. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 50, 2792–2808.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E., 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857–868.
- Burnichon, V., Jean, S., Bellon, L., Maraninchi, M., Bideau, C., Orsiere, T., Margotat, A., Gerolami, V., Botta, A., Berge-Lefranc, J.L., 2003. Patterns of gene expressions induced by arsenic trioxide in cultured human fibroblasts. *Toxicol. Lett.* 143, 155–162.

- Chen, F., Lu, Y., Zhang, Z., Vallyathan, V., Ding, M., Castranova, V., Shi, X., 2001. Opposite effect of NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase on p53-independent GADD45 induction by arsenite. *J. Biol. Chem.* 276, 11414–11419.
- Chen, C.J., Wang, S.L., Chiou, J.M., Tseng, C.H., Chiou, H.Y., Hsueh, Y.M., Chen, S.Y., Wu, M.M., Lai, M.S., 2007. Arsenic and diabetes and hypertension in human populations: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 298–304.
- Clewell, H.J., Thomas, R.S., Gentry, P.R., Crump, K.S., Kenyon, E.M., El-Masri, H.A., Yager, J.W., 2007. Research toward the development of a biologically based dose response assessment for inorganic arsenic carcinogenicity: a progress report. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 388–398.
- Cobo, J.M., Castineira, M., 1997. Oxidative stress, mitochondrial respiration, and glycemic control: clues from chronic supplementation with Cr<sup>3+</sup> or As<sup>3+</sup> to male Wistar rats. *Nutrition* 13, 965–970.
- Diaz-Villaseñor, A., Sanchez-Soto, M.C., Cebrian, M.E., Ostrosky-Wegman, P., Hiriart, M., 2006. Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic beta-cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 214, 30–34.
- Dilda, P.J., Hogg, P.J., 2007. Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat. Rev.* 33, 542–564.
- Doza, Y.N., Hall-Jackson, C.A., Cohen, P., 1998. Arsenite blocks growth factor induced activation of the MAP kinase cascade, upstream of Ras and downstream of Grb2-Sos. *Oncogene* 17, 19–24.
- Elrick, L.J., Docherty, K., 2001. Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes* 50, 2244–2252.
- Fridlyand, L.E., Philipson, L.H., 2006. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 8, 136–145.
- Gaskin, R.S., Estwick, D., Peddi, R., 2001. G6PD deficiency: its role in the high prevalence of hypertension and diabetes mellitus. *Ethn. Dis.* 11, 749–754.
- Gerich, J.E., 1998. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr. Rev.* 19, 491–503.
- Goering, P.L., Aposhian, H.V., Mass, M.J., Cebrian, M., Beck, B.D., Waalkes, M.P., 1999. The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicol. Sci.* 49, 5–14.
- Guerre-Millo, M., 2004. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab.* 30, 13–19.
- Gurnell, M., 2003. PPARgamma and metabolism: insights from the study of human genetic variants. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 59, 267–277.
- Hamilton, J.W., Kaltreider, R.C., Bajenova, O.V., Ihnat, M.A., McCaffrey, J., Turpie, B.W., Rowell, E.E., Oh, J., Nemeth, M.J., Pesce, C.A., Lariviere, J.P., 1998. Molecular basis for effects of carcinogenic heavy metals on inducible gene expression. *Environ. Health Perspect.* 106 (Suppl. 4), 1005–1015.
- Houstis, N., Rosen, E.D., Lander, E.S., 2006. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440, 944–948.
- Hu, Y., Jin, X., Snow, E.T., 2002. Effect of arsenic on transcription factor AP-1 and NF-kappaB DNA binding activity and related gene expression. *Toxicol. Lett.* 133, 33–45.
- Izquierdo-Vega, J.A., Soto, C.A., Sanchez-Pena, L.C., De Vizcaya-Ruiz, A., Del Razo, L.M., 2006. Diabetogenic effects and pancreatic oxidative damage in rats subchronically exposed to arsenite. *Toxicol. Lett.* 160, 135–142.
- Jager, J.W., Ostrosky-Wegman, P., 1997a. Arsenic: a paradoxical human carcinogen. *Mutat. Res.* 386, 181–184.
- Jager, J.W., Ostrosky-Wegman, P., 1997b. Arsenic: a paradoxical human carcinogen. *Mutat. Res.* 386, 181–361.
- Johnson, J.D., Ahmed, N.T., Luciani, D.S., Han, Z., Tran, H., Fujita, J., Misler, S., Edlund, H., Polonsky, K.S., 2003. Increased islet apoptosis in *Pdx1*<sup>+/-</sup> mice. *J. Clin. Invest.* 111, 1147–1160.
- Jones, F.T., 2007. A broad view of arsenic. *Poult. Sci.* 86, 2–14.
- Kaltreider, R.C., Davis, A.M., Lariviere, J.P., Hamilton, J.W., 2001. Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. *Environ. Health Perspect.* 109, 245–251.
- Kapahi, P., Takahashi, T., Natoli, G., Adams, S.R., Chen, Y., Tsien, R.Y., Karin, M., 2000. Inhibition of NF-kappa B activation by arsenite through reaction with a critical cysteine in the activation loop of Ikappa B kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 36062–36066.
- Komissarova, E.V., Saha, S.K., Rossman, T.G., 2005. Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202, 99–107.
- Kumar, A., Takada, Y., Boriack, A.M., Aggarwal, B.B., 2004. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J. Mol. Med.* 82, 434–448.
- Longnecker, M.P., Daniels, J.L., 2001. Environmental contaminants as etiologic factors for diabetes. *Environ. Health Perspect.* 109 (Suppl. 6), 871–876.
- Macfarlane, W.M., Smith, S.B., James, R.F., Clifton, A.D., Doza, Y.N., Cohen, P., Docherty, K., 1997. The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 272, 20936–20944.
- Macfarlane, W.M., McKinnon, C.M., Felton-Edkins, Z.A., Cragg, H., James, R.F., Docherty, K., 1999. Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 274, 10111–10116.
- Marx, J., 2002. Unraveling the causes of diabetes. *Science* 296, 686–689.
- NAS, 1977. Arsenic. Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants. National Academy of Sciences, Washington D.C.
- Navas-Acien, A., Silbergeld, E.K., Streeter, R.A., Clark, J.M., Burke, T.A., Guallar, E., 2006. Arsenic exposure and type 2 diabetes: a systematic review of the experimental and epidemiological evidence. *Environ. Health Perspect.* 114, 641–648.
- Olson, A.L., Pessin, J.E., 1994. Regulation of *c-fos* expression in adipose and muscle tissue of diabetic rats. *Endocrinology* 134, 271–276.
- Ouyang, W., Li, J., Ma, Q., Huang, C., 2006. Essential roles of PI-3K/Akt/IKKbeta/NFkappaB pathway in cyclin D1 induction by arsenite in JB6 Cl41 cells. *Carcinogenesis* 27, 864–873.
- Paul, D.S., Harmon, A.W., Devesa, V., Thomas, D.J., Styblo, M., 2007a. Molecular mechanisms of the diabetogenic effects of arsenic: inhibition of insulin signaling by arsenite and methylarsonous acid. *Environ. Health Perspect.* 115, 734–742.
- Paul, D.S., Hernandez-Zavala, A., Walton, F.S., Adair, B.M., Dedina, J., Matousek, T., Styblo, M., 2007b. Examination of the effects of arsenic on glucose homeostasis in cell culture and animal studies: development of a mouse model for arsenic-induced diabetes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 305–314.
- Rea, M.A., Gregg, J.P., Qin, Q., Phillips, M.A., Rice, R.H., 2003. Global alteration of gene expression in human keratinocytes by inorganic arsenic. *Carcinogenesis* 24, 747–756.
- Rondinone, C.M., 2006. Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine* 29, 81–90.
- Saltiel, A.R., Kahn, C.R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806.
- Sandoval, M., Morales, M., Tapia, R., del Carmen Alarcon, L., Sordo, M., Ostrosky-Wegman, P., Ortega, A., Lopez-Bayghen, E., 2007. p53 response to arsenic exposure in epithelial cells: protein kinase B/Akt involvement. *Toxicol. Sci.* 99, 126–140.
- Santra, A., Maiti, A., Chowdhury, A., Mazumder, D.N., 2000. Oxidative stress in liver of mice exposed to arsenic-contaminated water. *Indian J. Gastroenterol.* 19, 112–115.
- Sasaoka, T., Kobayashi, M., 2000. The functional significance of Shc in insulin signaling as a substrate of the insulin receptor. *Endocr. J.* 47, 373–381.
- Sonnenberg, G.E., Krakower, G.R., Kissebah, A.H., 2004. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. *Obes. Res.* 12, 180–186.
- Souza, K., Maddock, D.A., Zhang, Q., Chen, J., Chiu, C., Mehta, S., Wan, Y., 2001. Arsenite activation of P13K/AKT cell survival pathway is mediated by p38 in cultured human keratinocytes. *Mol. Med.* 7, 767–772.
- Spriggs, D.R., Deutsch, S., Kufe, D.W., 1992. Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunol. Ser.* 56, 3–34.
- Sriwijitkamol, A., Christ-Roberts, C., Berria, R., Eagan, P., Pratipanawatr, T., DeFronzo, R.A., Mandarino, L.J., Musi, N., 2006. Reduced skeletal muscle inhibitor of kappaB beta content is associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetes: reversal by exercise training. *Diabetes* 55, 760–767.
- Sun, Z., Andersson, R., 2002. NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock* 18, 99–106.
- Sun, X., Li, B., Li, X., Wang, Y., Xu, Y., Jin, Y., Piao, F., Sun, G., 2006. Effects of sodium arsenite on catalase activity, gene and protein expression in HaCaT cells. *Toxicol. In Vitro* 20, 1139–1144.
- Szinicz, L., Forth, W., 1988. Effect of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on gluconeogenesis. *Arch. Toxicol.* 61, 444–449.

- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., Lenzen, S., 1997. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46, 1733–1742.
- Tripathy, D., Eriksson, K.F., Orho-Melander, M., Fredriksson, J., Ahlqvist, G., Groop, L., 2004. Parallel manifestation of insulin resistance and beta cell decompensation is compatible with a common defect in Type 2 diabetes. *Diabetologia* 47, 782–793.
- Trouba, K.J., Wauson, E.M., Vorce, R.L., 2000a. Sodium arsenite inhibits terminal differentiation of murine C3H 10T1/2 preadipocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 25–35.
- Trouba, K.J., Wauson, E.M., Vorce, R.L., 2000b. Sodium arsenite-induced dysregulation of proteins involved in proliferative signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 161–170.
- Tseng, C.H., 2004. The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 197, 67–83.
- Vahter, M.E., 1998. Arsenic. In: Clarkson, F.L., Nordberg, T.W., Sager, G.F. (Eds.), *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Plenum Press, New York, pp. 303–321.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10, 45–65.
- Walton, F.S., Harmon, A.W., Paul, D.S., Drobna, Z., Patel, Y.M., Styblo, M., 2004. Inhibition of insulin-dependent glucose uptake by trivalent arsenicals: possible mechanism of arsenic-induced diabetes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 424–433.
- Wan, G.H., Tsai, S.C., Chiu, D.T., 2002. Decreased blood activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase associates with increased risk for diabetes mellitus. *Endocrine* 19, 191–195.
- Wang, Z.X., Jiang, C.S., Liu, L., Wang, X.H., Jin, H.J., Wu, Q., Chen, Q., 2005. The role of Akt on arsenic trioxide suppression of 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Cell Res.* 15, 379–386.
- Wauson, E.M., Langan, A.S., Vorce, R.L., 2002. Sodium arsenite inhibits and reverses expression of adipogenic and fat cell-specific genes during in vitro adipogenesis. *Toxicol. Sci.* 65, 211–219.
- Weigert, C., Hennige, A.M., Brodbeck, K., Haring, H.U., Schleicher, E.D., 2005. Interleukin-6 acts as insulin sensitizer on glycogen synthesis in human skeletal muscle cells by phosphorylation of Ser473 of Akt. *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.* 289, E251–E257.
- Wu, M.M., Chiou, H.Y., Ho, I.C., Chen, C.J., Lee, T.C., 2003. Gene expression of inflammatory molecules in circulating lymphocytes from arsenic-exposed human subjects. *Environ. Health Perspect.* 111, 1429–1438.
- Yu, H.S., Liao, W.T., Chang, K.L., Yu, C.L., Chen, G.S., 2002. Arsenic induces tumor necrosis factor alpha release and tumor necrosis factor receptor 1 signaling in T helper cell apoptosis. *J. Invest. Dermatol.* 119, 812–819.
- Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z.W., Karin, M., Shoelson, S.E., 2001. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293, 1673–1677.
- Zimmet, P., Alberti, K.G., Shaw, J., 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782–787.

# The activity of calpains in lymphocytes is glucose-dependent and is decreased in diabetic patients

Andrea Díaz-Villaseñor<sup>a</sup>, Marcia Hiriart<sup>b</sup>, Mariano E. Cebrián<sup>c</sup>,  
Rogelio Zacarías-Castillo<sup>d</sup>, Patricia Ostrosky-Wegman<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>b</sup> Department of Biophysics, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>c</sup> Sección Externa de Toxicología, CINVESTAV, IPN, Mexico

<sup>d</sup> Department of Internal Medicine, Hospital General Dr. Manuel Gea González, Mexico

Submitted 20 August 2007

Available online 26 October 2007

(Communicated by P. Majerus, M.D., 27 August 2007)

## Abstract

Calpains are nonlysosomal calcium-dependent cysteine proteases that participate in insulin secretion and action. Polymorphisms in the calpain-10 gene have been shown to increase the risk for type 2 diabetes. Since white blood cells have been used to study glucose homeostasis, the present study was carried to find out if calpains have different activity and/or expression in accessible cells such as lymphocytes of individuals with or without type 2 diabetes. Fasting blood glucose concentration was significantly higher in diabetic subjects, whereas the difference in the activity of calpains evaluated in basal and stimulating extracellular glucose concentration was significantly higher in the lymphocytes from the control group. The mRNA expression of calpain-10 was similar in the lymphocytes of both patients and controls. The protein blots showed four bands that ranged between 75 and 50 kDa; however, no statistical differences were observed in the expression of the calpain-10 isoforms between controls and patients. Data obtained showed that human lymphocytes express calpain-10 mRNA and protein, showing a similar expression between diabetic and control subjects, nevertheless in the diabetic group calpain activity was less glucose-sensitive.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Calpains; Lymphocytes; Glucose; Type 2 diabetes mellitus

## Introduction

Type 2 diabetes mellitus is a heterogeneous group of metabolic disorders characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells and/or defects in insulin action, known as insulin resistance. Risk factors include certain genetic polymorphisms, age, sex, family history, obesity, physical inactivity, diet, and stress [1,2].

The nonlysosomal calcium-dependent cysteine proteases denominated calpains have been associated with type 2 diabetes. In humans, the gene encoding calpain-10 has been linked to type

2 diabetes by positional cloning, and some polymorphisms in the calpain-10 gene have been shown to increase the risk for the disease in certain populations [3–5].

At the physiologic level, calpains participate in insulin secretion and action. Certain members of the calpain family (in particular calpain-10 and 1) are involved in the secretion of insulin by pancreatic  $\beta$ -cells [6–12]. Exposure of pancreatic islets or  $\beta$ -cells to calpain inhibitors results in the suppression of glucose-induced insulin secretion [8,10,12]. More specifically, it has been postulated that calpain-10 is part of the secretion machinery of  $\beta$ -cells, and in response to calcium elevation it cleaves SNAP-25, which produces the fusion of insulin granules to the cellular membrane [6]. Inhibition of calpain activity results in approximately 60% decrease in insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes, preventing the translocation of vesicles containing the insulin-dependent glucose

\* Corresponding author. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Circuito Escolar, Cd. Universitaria, Coyoacán 04510 México, DF, Mexico. Fax: +52 55 56 22 31 57.

E-mail address: [ostrosky@servidor.unam.mx](mailto:ostrosky@servidor.unam.mx) (P. Ostrosky-Wegman).

transporter, GLUT4, to the cellular membrane [13]. Specific inhibition of calpain-10 by antisense expression also reduces insulin-stimulated GLUT4 translocation [13]. Insulin-stimulated glucose uptake is also significantly decreased in the presence of calpain inhibitors in cultured human myotubes [14].

Moreover, subjects carrying the at-risk genotype G/G for SNP-43 within the calpain-10 gene, when compared with subjects carrying the SNP-43 A-allele, exhibit a reduced calpain-10 mRNA expression in their skeletal muscle along with insulin resistance, or show a decreased calpain-10 mRNA levels both before and after insulin clamp [15,16].

The rat strain Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) is an animal model for type 2 diabetes, since they develop hyperglycemia, polyuria, polydipsia and mild obesity spontaneously with age [17,18]. The increased susceptibility of the OLETF rats to develop hyperglycemia is attributed, among others, to the nonconservative amino acid substitution within the catalytic domain of the calpain-10 gene [19,20]. When compared to control animals, OLETF rats show a significantly decreased level of the calpain-10 transcripts in white blood cells and in major insulin-target tissues before and after the onset of type 2 diabetes [21].

Insulin resistance is well characterized in major insulin-target tissues, such as adipocytes, muscle and the liver. White blood cells have also been used to study glucose homeostasis. Insulin can be cleared by monocytes and lymphocytes which contain insulin receptors and the internalization and regulation mechanisms for insulin metabolism [22–25]. In fact, *in vitro* glucose uptake in transformed lymphoblast is basal and insulin-dependent, being lower in the subjects with hypertension. An inverse correlation between the *in vitro* insulin-dependent glucose uptake in lymphoblast and the *in vivo* insulin resistance of the donors has been also documented [26].

Since lymphocytes have been used as a suitable cellular model for studying glucose homeostasis and calpains play an important role in this process, the purpose of the present study was to find out if calpains have different activity and/or expression in lymphocytes of individuals with or without type 2 diabetes.

## Methods

### Subjects

Cases and controls were recruited from the Hospital General “Dr. Manuel Gea González” of the federal Ministry of Health. The Institutional Review Board of the hospital approved the research protocol. All individuals signed an informed consent form and a brief questionnaire was applied. Subjects with insulin treatment and with concomitant diseases (such as cancer and hepatitis) were excluded. Anthropometric and clinic values (age, sex, height, weight, waist circumference, blood pressure and glucose) were obtained for each donor. Body mass index (BMI) and mean arterial pressure (MAP) were calculated with the following formulas, respectively:  $BMI = \text{weight}/\text{height}^2$  ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) and  $MAP = [(2 \times \text{diastolic}) + \text{systolic}]/3$  (mm Hg).

Whole peripheral blood was obtained from fasting donors (8 h minimum). For blood glucose determination, the serum was

obtained by centrifuging the blood samples at 3000 rpm for 10 min. Glucose levels were determined by the glucose oxidase method using an autoanalyzer Synchron LX20 (Beckman Coulter). Lymphocytes were isolated from peripheral blood using a density gradient of Ficoll-Histopaque-1077 (Sigma). The activity of calpains was performed immediately after lymphocyte isolation, whereas for calpain-10 mRNA and protein expression analysis, lymphocytes were frozen at  $-70^\circ\text{C}$  until their processing.

### Calpain activity

The activity of calpains was determined according to Rosser et al. [27] and Sreenan et al. [11] with modifications. The substrate used was the nonfluorescent membrane-permeate CMAC, t-BOC-Leu-Met (Molecular Probes) ( $10\ \mu\text{M}$ ), which after proteolytic cleavage by calpains, liberates the highly fluorescent membrane-impermeable moiety. Briefly,  $1 \times 10^5$  lymphocytes of each donor were placed per well in a 96 well plate in Krebs Ringer solution ( $125\ \text{NaCl}$ ,  $4.7\ \text{KCl}$ ,  $25\ \text{NaHCO}_3$ ,  $1.8\ \text{CaCl}_2$ ,  $1.2\ \text{MgSO}_4$ ,  $1.2\ \text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $10\ \text{mM}$  HEPES, pH 7.4) in two concentrations of glucose (basal  $5.6\ \text{mM}$  and stimulating  $15.6\ \text{mM}$ ) per triplicate. The fluorescence was measured every minute during 1 hour in a Fluoroskan Ascent microplate fluorometer (Thermo Electron Corporation, Vantaa Finland) (Ex:  $355\ \text{nm}$ ;  $460\ \text{nm}$ ). Based on the stability and linearity of the reaction, the increment in fluorescence corresponding to 40–60 min measurements (slope) was taken and the difference of the activity of calpains between the two glucose concentrations was obtained.

### Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Lymphocytes were lysed and total RNA was extracted using TRIzol (Gibco) following the protocol recommended by the manufacturer and quantified by spectrophotometry at  $260\ \text{nm}$ . cDNA synthesis was carried out with the M-MLV reverse transcriptase enzyme and Oligo(dT)<sub>12–18</sub> primer (Invitrogen) at a final concentration of RNA of  $20\ \text{ng}/\mu\text{l}$ . Real-time PCR multiplex reactions were carried out by triplicate per donor with  $25\ \text{ng}$  in an ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems). TaqMan Universal PCR Master Mix and the human calpain-10/FAM (Hs00225048\_m1) and GAPDH/VIC TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) were used.

The analysis of relative real-time RT-PCR quantification was obtained using the threshold cycle ( $C_T$ ) values and the expression was calculated by the comparative  $C_T$  method for statistical analysis [28,29]. For each sample, an average of the triplicates of the  $\Delta C_T$  values was obtained (calpain-10  $C_T$ –GAPDH  $C_T$  values). To determine the basal mRNA expression when comparing groups, the average of the  $\Delta C_T$  values of all control subjects was subtracted from the  $\Delta C_T$  value of each diabetic subject to derive a  $\Delta\Delta C_T$  value, hence the  $\Delta C_T$  value for each nondiabetic subject was 0, and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  for this group was designated 1.



Prior to quantification, an analysis for the use of GAPDH as endogenous control was carried out for the samples analyzed. In single and multiplex reactions, the efficiency of PCR amplification for calpain-10 and GAPDH was confirmed in a series of validation studies, obtaining an absolute value of the slope of log input amount vs.  $\Delta C_T < 0.1$ . In these same validation assays, the dynamic range for starting template concentrations was determined. Finally, multiplex vs. single reactions had no effect on  $C_T$  values.

### Western blotting

Cells were lysed in protein lysis buffer with protease inhibitors according to Salazar et al. [30]. Protein was quantified based in the Lowry method with the DC Protein Assay (Bio-Rad). Twenty micrograms of total protein was heated for 5 min in sample buffer, loaded on 10% polyacrilamide gels, separated by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Blots were blocked for 45 min at room temperature with 1.5% blotto solution (non fat dry milk from Santa Cruz) and then were incubated overnight at 4 °C with anti-calpain-10 antibody (anti-catalytic domain) (Cedarlane labs) diluted 1:5000. Afterwards, the blots were incubated with anti-rabbit antibody conjugated with horseradish peroxidase (Santa Cruz) diluted 1:3333. The blots were developed by the enhanced chemiluminescence (ECL) method (Amersham) and exposed to an X-ray film. For data normalization, membranes were incubated with anti-actin antibody (Santa Cruz) diluted 1:1000. Semi-quantification of the bands was carried out by optical densitometry and analyzed using the Quantity One 4.1.1 software (Bio-Rad).

### Statistical analysis

The clinical and the anthropogenic characteristics of the donors described in Table 1 are expressed as means  $\pm$  SD. Statistical analysis for variables was obtained by unpaired *t*-test, except for glucose that was corrected after the unpaired *t*-test with Welch's correction due to significant differences in variances. Sex and family history for type 2 diabetes were compared by the Fisher's exact test  $\chi^2$  (GraphPad Prism 4.0). For the experimental assays, all the data are reported as mean  $\pm$  SEM.

Table 1  
Clinical and anthropometrical characteristics of the donors

|                                | Controls (n=9)  | Diabetics (n=11) | <i>p</i> |
|--------------------------------|-----------------|------------------|----------|
| Sex (male/female)              | 0.8             | 0.375            | 0.6424   |
| Age (years)                    | 42.8 $\pm$ 5.45 | 47.4 $\pm$ 5.63  | 0.0825   |
| Weight (kg)                    | 77.7 $\pm$ 13.4 | 70.9 $\pm$ 15.1  | 0.3085   |
| Height (m)                     | 1.61 $\pm$ 0.09 | 1.56 $\pm$ 0.119 | 0.2902   |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )       | 29.7 $\pm$ 4.13 | 28.9 $\pm$ 4.4   | 0.6707   |
| Waist (cm)                     | 95.2 $\pm$ 8.23 | 95.3 $\pm$ 6.93  | 0.9699   |
| Fasting plasma glucose (mg/dl) | 92.4 $\pm$ 5.41 | 190 $\pm$ 77.5   | 0.002*   |
| MAP (mm Hg)                    | 89.6 $\pm$ 6.38 | 94.2 $\pm$ 11.2  | 0.2790   |
| Relatives with DM 2 (n)        | 3               | 9                | 0.0648   |

Except for sex and relatives with type 2 diabetes, which are expressed as the ratio of male/female, and the number of relatives, respectively, the rest of the parameters represent mean  $\pm$  SD. BMI: body mass index, MAP: mean arterial pressure. Symbols (\*) denote statistical differences.

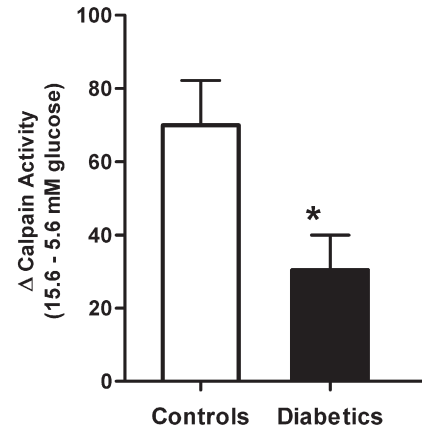


Fig. 1. Activity of calpains in lymphocytes. Lymphocytes from control (white bar) and diabetic (black bar) individuals. Data correspond to the difference between the two glucose concentrations where calpain activity was measured (activity in 15.6 mM–activity in 5.6 mM) and represent mean  $\pm$  SEM. Symbols denote statistical differences, \**p* < 0.05.

The statistical significance for mRNA expression was obtained with one-sample *t*-test with an hypothetical value of 1 corresponding to the mean of the controls. For calpain activity and protein expression (for each band independently), unpaired *t*-test analysis was applied (GraphPad Prism 4.0). *p*  $\leq$  0.05 was considered statistically significant.

### Results

The clinical and anthropometrical characteristics of the donors are outlined in Table 1. The only characteristic that was significantly different between control and diabetic subjects was fasting blood glucose concentration (92.4  $\pm$  5.41 vs. 190  $\pm$  77.5, *p* = 0.002), being higher in diabetics.

The difference of the activity of calpains evaluated in the basal and the stimulating glucose concentration (5.6 and 15.6 mM, respectively) was significantly higher in the lymphocytes from the control group than in the lymphocytes from the diabetic group (Fig. 1). Lymphocytes from the control group were more sensitive to the extracellular concentration of glucose, responding with a higher difference of calpain activity between both

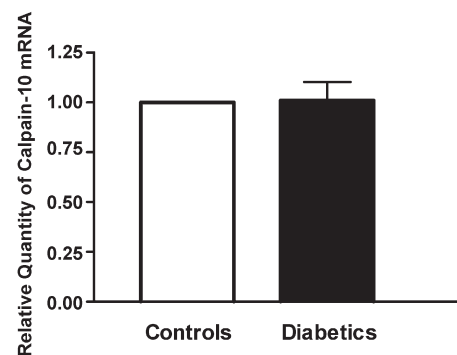


Fig. 2. Expression of calpain-10 mRNA in lymphocytes. Controls (white bar), diabetics (black bar). Data were normalized to values of control donors and represent mean  $\pm$  SEM.

concentrations of glucose, whereas lymphocytes from the diabetic group were significantly less responsive to differences in extracellular glucose concentration.

To elucidate if the difference in calpain activity between control and diabetic individuals was related to a differential expression of calpain-10, one of the members of the calpain family related genetically and pathophysiologically to diabetes, we measured its expression at mRNA and protein level.

The mRNA expression of calpain-10 was similar in the lymphocytes of both patients and controls (Fig. 2). Protein blots showed four bands that ranged between 75 and 50 kDa (Fig. 3A), showing some of the eight isoforms of calpain-10 produced by alternative splicing [5]. In order to determine the isoforms corresponding to the observed bands, the molecular weight for each isoform was predicted with the program *Sequence Manipulation Suite/Protein Molecular Weight* ([http://bioinfo.unice.fr/ressources/sms2/protein\\_mw.html](http://bioinfo.unice.fr/ressources/sms2/protein_mw.html)) based on the amino acid sequences reported (Table 2). The four bands of calpain-10 identified in the samples could correspond to isoforms a, b, c, d and/or e; nevertheless they could not be exactly defined due to their molecular weight similarity. No statistical differences were observed in the isoforms of calpain-10 between controls and patients (Fig. 3B); however, there was a slight tendency of diabetics to express more of each of the four isoforms of calpain-10 detected. Differences in the amount of each band were observed within groups,

Table 2

Molecular weight prediction of calpain-10 isoforms

| Isoform     | Ref Seq  | aa length | kDa   |
|-------------|----------|-----------|-------|
| Calpain-10a | AF089088 | 672       | 74.95 |
| Calpain-10b | AF089090 | 544       | 60.67 |
| Calpain-10c | AF089091 | 517       | 58.00 |
| Calpain-10d | AF089092 | 513       | 57.83 |
| Calpain-10e | AF089093 | 444       | 50.00 |
| Calpain-10f | AF089094 | 274       | 29.46 |
| Calpain-10g | AF089095 | 139       | 15.59 |
| Calpain-10h | AF089096 | 138       | 15.26 |

particularly with band number 4 (the nearest to the 50 kDa molecular weight marker band) (Fig. 3A).

## Discussion

A previous work showed that calpain-10 mRNA is expressed in lymphocytes of rats [21]. Our work found that human lymphocytes also express calpain-10, not only at mRNA level, but even at protein level, showing a similar expression between diabetic and control subjects. Interestingly, the activity of calpains in the lymphocytes of the diabetic group was less glucose-sensitive than the control group. It is noteworthy to mention that one of the diabetic individuals had a very low calpain activity, no calpain-10 protein expression, but normal values of calpain-10 mRNA.

Thus, the activity of calpains was more responsive to extracellular glucose concentration in the lymphocytes of the control group. These differences in sensitivity were not reflected in calpain-10 mRNA or in its protein. Two possible explanations could be: (1) The activity measured is not specific for calpain-10, since the substrate used in the assay detects the whole activity of calpains. Some other members of the calpain family are expressed in lymphocytes, such as calpain 1 and 2 [31,32] and might be also glucose-responsive. (2) Since in lymphocytes of both controls and diabetics the same amount of calpain-10 is expressed, the regulation could be at the enzymatic level. This would imply that glucose is able to modulate the activity of calpains, as shown by Turner et al. [7]. Sustained exposure to high glucose concentration is known to trigger impairment of glucose sensitivity. Thus, in individuals with continuous periods of high blood glucose levels, the regulation of the activity of calpains could be diminished or even abolished.

The results also suggest that lymphocytes have the capacity of distinguishing different extracellular glucose concentration, as pancreatic  $\beta$ -cells do in order to secrete the necessary amount of insulin. Nevertheless, lymphocytes do not have GLUT2 as pancreatic  $\beta$ -cells do, instead the types of glucose transporters known to be expressed in leucocytes are GLUT1, 3, 4, 5 and 6 [33–35].

Other examples of enzymes involved in glucose metabolism that show lower activity in diabetic patients, insulin resistance and/or obese people lymphocytes are: the key enzyme in glucose oxidative breakdown, pyruvate dehydrogenase (PDH) [36]; pyruvate dehydrogenase phosphatase which dephosphorylates and activates PDH [37]; 6-phosphofructokinase, one of the most

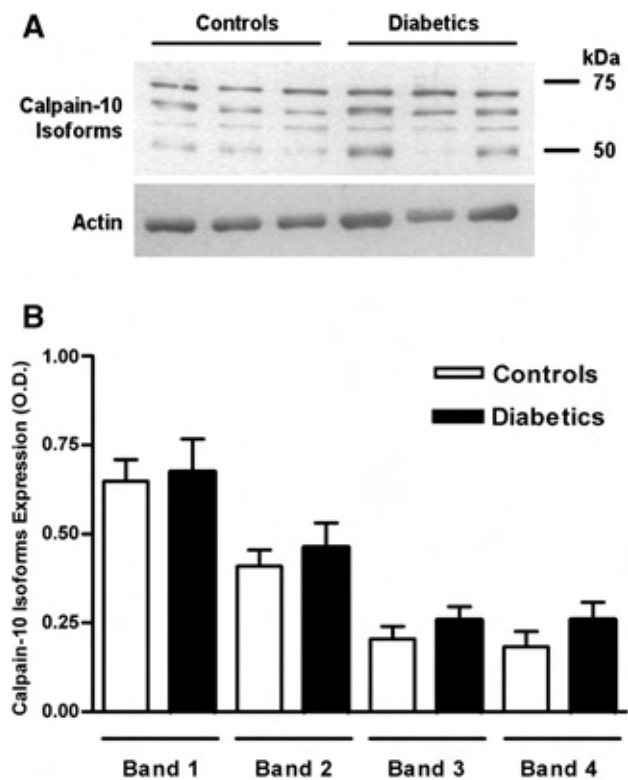


Fig. 3. Expression of calpain-10 isoforms in lymphocytes. (A) Calpain-10 isoform expression of representative donors. (B) Densitometric quantification of the four bands normalized by actin, respectively. Controls (white bars), diabetics (black bars). Data represent mean  $\pm$  SEM.

important regulatory enzyme of glycolysis [38]; and glycerol-3-phosphate dehydrogenase which is the branch point between the glycolytic pathway and triglyceride biosynthesis [39].

Moreover, analogous to mouse muscle, in lymphocytes of obese hyperleptinemic human subjects, basal phosphorylation of the insulin receptor substrate 1 is increased when compared to lean individuals, and during the hyperinsulinemic euglycemic clamp, the increment in the phosphorylation observed in the lymphocytes of lean individuals was absent in the obese [40]. Together these studies suggest that these enzymatic alterations in circulating lymphocytes reflect or can be used as markers of systemic insulin resistance found in type 2 diabetes.

The results presented in this study support the idea that the enzymatic impairment occurring in type 2 diabetes not only takes place in tissues directly involved in glucose homeostasis (i.e. pancreas, the liver, muscle and adipocytes), it can also occur in other type of cells such as lymphocytes. Since variability among individuals exists, a future study with a larger sample would be recommendable. In particular, calpains are an interesting case since they participate in the pathogenesis and genetics of type 2 diabetes and the fact that they can be studied in cells that are obtained with noninvasive methods opens a broad field in the understanding of diabetes.

## Acknowledgments

This work was partially supported by CONACYT, DGAPA (UNAM) and US-Mexico Binational Center for Environmental Studies and Toxicology. We appreciate the technical support of Monserrat Sordo and the assistance of J. Andrés Méndez, Erick Ochoa, and Fernando Ulises Lara.

## References

- [1] P. Zimmet, K.G. Alberti, J. Shaw, Global and societal implications of the diabetes epidemic, *Nature* 414 (2001) 782–787.
- [2] ADA, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care* 29 (Suppl 1) (2006) S43–S48.
- [3] Y. Horikawa, N. Oda, N.J. Cox, X. Li, M. Orho-Melander, M. Hara, Y. Hinokio, T.H. Lindner, H. Mashima, P.E. Schwarz, L. del Bosque-Plata, Y. Oda, I. Yoshiuchi, S. Colilla, K.S. Polonsky, S. Wei, P. Concannon, N. Iwasaki, J. Schulze, L.J. Baier, C. Bogardus, L. Groop, E. Boerwinkle, C.L. Hanis, G.I. Bell, Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus, *Nat. Genet.* 26 (2000) 163–175.
- [4] L. del Bosque-Plata, C.A. Aguilar-Salinas, M.T. Tusie-Luna, S. Ramirez-Jimenez, M. Rodriguez-Torres, M. Auron-Gomez, E. Ramirez, M.L. Velasco-Perez, A. Ramirez-Silva, F. Gomez-Perez, C.L. Hanis, T. Tsuchiya, I. Yoshiuchi, N.J. Cox, G.I. Bell, Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population, *Mol. Genet. Metab.* 81 (2004) 122–126.
- [5] M.N. Weedon, P.E. Schwarz, Y. Horikawa, N. Iwasaki, T. Illig, R. Holle, W. Rathmann, T. Selisko, J. Schulze, K.R. Owen, J. Evans, L. Del Bosque-Plata, G. Hitman, M. Walker, J.C. Levy, M. Sampson, G.I. Bell, M.I. McCarthy, A.T. Hattersley, T.M. Frayling, Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility, *Am. J. Hum. Genet.* 73 (2003) 1208–1212.
- [6] C. Marshall, G.A. Hitman, C.J. Partridge, A. Clark, H. Ma, T.R. Shearer, M.D. Turner, Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells, *Mol. Endocrinol.* 19 (2005) 213–224.
- [7] M.D. Turner, F.K. Fulcher, C.V. Jones, B.T. Smith, E. Aganna, C.J. Partridge, G.A. Hitman, A. Clark, Y.M. Patel, Calpain facilitates actin reorganization during glucose-stimulated insulin secretion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352 (2007) 650–655.
- [8] E. Aganna, J.M. Burrin, G.A. Hitman, M.D. Turner, Involvement of calpain and synaptotagmin Ca<sup>2+</sup> sensors in hormone secretion from excitable endocrine cells, *J. Endocrinol.* 190 (2006) R1–R7.
- [9] T. Ort, S. Voronov, J. Guo, K. Zawlich, S.C. Froehner, W. Zawlich, M. Solimena, Dephosphorylation of beta2-syntrophin and Ca<sup>2+</sup>/mu-calpain-mediated cleavage of ICA512 upon stimulation of insulin secretion, *EMBO J.* 20 (2001) 4013–4023.
- [10] Y.P. Zhou, S. Sreenan, C.Y. Pan, K.P. Currie, V.P. Bindokas, Y. Horikawa, J.P. Lee, D. Ostrega, N. Ahmed, A.C. Baldwin, N.J. Cox, A.P. Fox, R.J. Miller, G.I. Bell, K.S. Polonsky, A 48-hour exposure of pancreatic islets to calpain inhibitors impairs mitochondrial fuel metabolism and the exocytosis of insulin, *Metabolism* 52 (2003) 528–534.
- [11] S.K. Sreenan, Y.P. Zhou, K. Otani, P.A. Hansen, K.P. Currie, C.Y. Pan, J.P. Lee, D.M. Ostrega, W. Pugh, Y. Horikawa, N.J. Cox, C.L. Hanis, C.F. Burant, A.P. Fox, G.I. Bell, K.S. Polonsky, Calpains play a role in insulin secretion and action, *Diabetes* 50 (2001) 2013–2020.
- [12] G. Parnaud, E. Hammar, D.G. Rouiller, D. Bosco, Inhibition of calpain blocks pancreatic beta-cell spreading and insulin secretion, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289 (2005) E313–E321.
- [13] D.S. Paul, A.W. Harmon, C.P. Winston, Y.M. Patel, Calpain facilitates GLUT4 vesicle translocation during insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes, *Biochem. J.* 376 (2003) 625–632.
- [14] L.J. Logie, A.E. Brown, S.J. Yeaman, M. Walker, Calpain inhibition and insulin action in cultured human muscle cells, *Mol. Genet. Metab.* 85 (2005) 54–60.
- [15] L.J. Baier, P.A. Permana, X. Yang, R.E. Pratley, R.L. Hanson, G.Q. Shen, D. Mott, W.C. Knowler, N.J. Cox, Y. Horikawa, N. Oda, G.I. Bell, C. Bogardus, A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) R69–R73.
- [16] E. Carlsson, P. Poulsen, H. Storgaard, P. Almgren, C. Ling, C.B. Jensen, S. Madsbad, L. Groop, A. Vaag, M. Ridderstrale, Genetic and nongenetic regulation of CAPN10 mRNA expression in skeletal muscle, *Diabetes* 54 (2005) 3015–3020.
- [17] K. Kawano, T. Hirashima, S. Mori, Y. Saitoh, M. Kurosumi, T. Natori, Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications Otsuka Long–Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain, *Diabetes* 41 (1992) 1422–1428.
- [18] K. Kawano, T. Hirashima, S. Mori, T. Natori, OLETF (Otsuka Long–Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 24 (1994) S317–S320 Suppl.
- [19] Y. Muramatsu, Y. Taniguchi, H. Kose, K. Matsumoto, T. Yamada, Y. Sasaki, Capn10, a candidate gene responsible for type 2 diabetes mellitus in the OLETF rat, *IUBMB Life* 55 (2003) 533–537.
- [20] S. Iida, Y. Sato, A. Nakaya, Y. Shinohara, Y. Hayashi, A. Sawada, H. Nagata, N. Kaji, H. Kamiya, Y. Baba, H. Harashima, Genome wide expression analysis of white blood cells and liver of pre-diabetic Otsuka Long–Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats using a cDNA microarray, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 2451–2459.
- [21] Y. Sato, M. Kuwajima, H. Kamiya, H. Harashima, Calpain 10 as a predictive gene for type 2 diabetes: evidence from a novel screening system using white blood cells of Otsuka Long–Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, *Biol. Pharm. Bull.* 26 (2003) 1765–1768.
- [22] M.E. Valera Mora, A. Scarfone, M. Calvani, A.V. Greco, G. Mingrone, Insulin clearance in obesity, *J. Am. Coll. Nutr.* 22 (2003) 487–493.
- [23] G. Sesti, R. D'Alfonso, M.D. Vargas Puntì, A.N. Tullio, Y.Y. Liu, M. Federici, P. Borboni, M.A. Marini, R. Lauro, A. Fusco, Delayed intracellular dissociation of the insulin–receptor complex impairs receptor recycling and insulin processing in cultured Epstein–Barr virus-transformed lymphocytes from insulin-resistant subjects, *Diabetologia* 39 (1996) 289–295.
- [24] A. McElduff, J.A. Hedro, S.I. Taylor, J. Roth, P. Gorden, Insulin receptor degradation is accelerated in cultured lymphocytes from patients with genetic syndromes of extreme insulin resistance, *J. Clin. Invest.* 74 (1984) 1366–1374.
- [25] S.I. Taylor, B. Samuels, J. Roth, M. Kasuga, J.A. Hedro, P. Gorden, D.E. Brasel, T. Pokora, R.R. Engel, Decreased insulin binding in cultured

- lymphocytes from two patients with extreme insulin resistance, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54 (1982) 919–930.
- [26] T. Morii, Y. Ohno, H. Hirose, H. Kawabe, T. Ogata, K. Hirao, T. Eguchi, T. Maruyama, Y. Kanno, M. Hayashi, I. Saito, T. Saruta, Cellular insulin resistance in Epstein–Barr virus-transformed lymphoblasts from young insulin-resistant Japanese men, *Metabolism* 54 (2005) 370–375.
- [27] B.G. Rosser, S.P. Powers, G.J. Gores, Calpain activity increases in hepatocytes following addition of ATP. Demonstration by a novel fluorescent approach, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 23593–23600.
- [28] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
- [29] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45.
- [30] A.M. Salazar, P. Ostrosky-Wegman, D. Menendez, E. Miranda, A. Garcia-Carranca, E. Rojas, Induction of p53 protein expression by sodium arsenite, *Mutat. Res.* 381 (1997) 259–265.
- [31] R.V. Deshpande, J.M. Goust, N.L. Banik, Differential distribution of calpain in human lymphoid cells, *Neurochem. Res.* 18 (1993) 767–773.
- [32] J.O. Karlsson, K. Blennow, I. Janson, K. Blomgren, I. Karlsson, B. Regland, A. Wallin, C.G. Gottfries, Increased proteolytic activity in lymphocytes from patients with early onset Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 16 (1995) 901–906.
- [33] Y. Fu, L. Maianu, B.R. Melbert, W.T. Garvey, Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation, *Blood Cells Mol. Diseases* 32 (2004) 182–190.
- [34] H. Doege, A. Bocianski, H.G. Joost, A. Schurmann, Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes, *Biochem. J.* 3 (2000) 771–776.
- [35] E. Maratou, G. Dimitriadis, A. Kollias, E. Boutati, V. Lambadiari, P. Mitrou, S.A. Raptis, Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells, *Eur. J. Clin. Investig.* 37 (2007) 282–290.
- [36] M. Curto, R.F. Novi, I. Rabbone, M. Maurino, M. Piccinini, S. Mioletti, M. Mostert, R. Bruno, M.T. Rinaudo, Insulin resistance in obese subjects and newly diagnosed NIDDM patients and derangements of pyruvate dehydrogenase in their circulating lymphocytes, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 21 (1997) 1137–1142.
- [37] M. Piccinini, M. Mostert, G. Alberto, C. Ramondetti, R.F. Novi, P. Dalmaso, M.T. Rinaudo, Down-regulation of pyruvate dehydrogenase phosphatase in obese subjects is a defect that signals insulin resistance, *Obes. Res.* 13 (2005) 678–686.
- [38] K.I. Timmers, R. Dons, G. Grunberger, J. Hodge, Impaired 6-phosphofructokinase activity in mononuclear leukocytes from patients with type II diabetes mellitus, *Enzyme* 36 (1986) 247–253.
- [39] K.Y. Tu, H.S. Ju, F. Pettit, W. Shive, N.H. Topek, R. Matthews, K. Matthews, Glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity in human lymphocytes: effects of insulin, obesity and weight loss, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207 (1995) 183–190.
- [40] A.M. Hennige, N. Stefan, K. Kapp, R. Lehmann, C. Weigert, A. Beck, K. Moeschel, J. Mushack, E. Schleicher, H.U. Haring, Leptin down-regulates insulin action through phosphorylation of serine-318 in insulin receptor substrate 1, *FASEB J.* 20 (2006) 1206–1208.

## REFERENCIAS

1. Navas-Acien, A., et al., *Arsenic exposure and type 2 diabetes: a systematic review of the experimental and epidemiological evidence*. Environ Health Perspect, 2006. **114**(5): p. 641-8.
2. Poitout, V. and R.P. Robertson, *An integrated view of beta-cell dysfunction in type-II diabetes*. Annu Rev Med, 1996. **47**: p. 69-83.
3. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
4. Barg, S., *Mechanisms of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagon-secreting A-cells*. Pharmacol Toxicol, 2003. **92**(1): p. 3-13.
5. Barrett, E.J., *The Endocrine Pancreas*, in *Medical Physiology*, W.F. Boron and E.L. Boulpaep, Editors. 2005, Elsevier Saunders: Philadelphia, Pennsylvania. p. 1066-1085.
6. Marino, C.R., *Pancreatic and Salivary Glands*, in *Medical Physiology*, W.F. Boron and E.L. Boulpaep, Editors. 2005, Elsevier Saunders: Philadelphia, Pennsylvania. p. 908-909.
7. Hadley, M.E., *Pancreatic Hormones and Metabolic Regulation*, in *Endocrinology*, P.F. Corey, Editor. 2000, Prentice Hall: United States of America. p. 250-276.
8. Hiriart, M. and R. Vidaltamayo, *Cuestión de hormonas: el papel de las hormonas del páncreas en la salud y en la diabetes*. Ciencia, 2002. **53**(3): p. 36-45.
9. Leibiger, I.B., B. Leibiger, and P.O. Berggren, *Insulin feedback action on pancreatic beta-cell function*. FEBS Lett, 2002. **532**(1-2): p. 1-6.
10. Navarro-Tableros, V., et al., *Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival*. Diabetes, 2004. **53**(8): p. 2018-23.
11. Rorsman, P., et al., *The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion*. News Physiol Sci, 2000. **15**: p. 72-77.
12. Ashcroft, F.M., et al., *Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells*. J Cell Biochem, 1994. **55 Suppl**: p. 54-65.
13. Henquin, J.C., et al., *Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion*. Eur J Clin Invest, 2003. **33**(9): p. 742-50.
14. MacDonald, P.E., J.W. Joseph, and P. Rorsman, *Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. **360**(1464): p. 2211-25.
15. Ashcroft, F.M. and P. Rorsman, *Electrophysiology of the pancreatic beta-cell*. Prog Biophys Mol Biol, 1989. **54**(2): p. 87-143.
16. Hiriart, M. and D.R. Matteson, *Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B cells identified with the reverse hemolytic plaque assay*. J Gen Physiol, 1988. **91**(5): p. 617-39.
17. Fernández-Chacón, R., et al., *Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 41-9.
18. Marshall, C., et al., *Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(1): p. 213-24.
19. Aganna, E., et al., *Involvement of calpain and synaptotagmin Ca<sup>2+</sup> sensors in hormone secretion from excitable endocrine cells*. J Endocrinol, 2006. **190**(3): p. R1-7.
20. Chang, L., S.H. Chiang, and A.R. Saltiel, *Insulin signaling and the regulation of glucose transport*. Mol Med, 2004. **10**(7-12): p. 65-71.
21. Bergman, R.N., *Orchestration of glucose homeostasis: from a small acorn to the California oak*. Diabetes, 2007. **56**(6): p. 1489-501.
22. American Diabetes Association, *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2007. **30 Suppl 1**: p. S42-7.
23. Diamond, J., *The double puzzle of diabetes*. Nature, 2003. **423**(6940): p. 599-602.
24. Marx, J., *Unraveling the causes of diabetes*. Science, 2002. **296**(5568): p. 686-9.

25. Bell, G.I. and K.S. Polonsky, *Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 788-91.
26. Barazzoni, R., et al., *Increased fibrinogen production in type 2 diabetic patients without detectable vascular complications: correlation with plasma glucagon concentrations*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(9): p. 3121-5.
27. Orskov, C., et al., *Proglucagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginine*. J Clin Invest, 1991. **87**(2): p. 415-23.
28. Reaven, G.M., et al., *Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 1987. **64**(1): p. 106-10.
29. Moller, D.E., *New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 821-7.
30. Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 782-7.
31. Wild, S., et al., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care, 2004. **27**(5): p. 1047-53.
32. Barceló, A. and S. Rajpathak, *Incidence and prevalence of diabetes mellitus in the Americas*. Rev Panam Salud Publica, 2001. **10**(5): p. 300-8.
33. Secretaría de Salubridad y Asistencia, *Reporte de la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas 1992*. 1993: México.
34. Borges-Yañez, S.A. and H. Gómez-Dantes, *Uso de los servicios de salud por la población de 60 años y más en México*. Salud Publica Mex, 1998. **40**(1): p. 13-23.
35. Olaiz, G., et al., *Diabetes mellitus*, in *Encuesta Nacional de Salud 2000, La salud de los adultos*, J. Sepúlveda, Editor. 2003, Instituto Nacional de Salud Pública: Cuernavaca, México. p. 93-103.
36. Rojas, R., O. Palma, and I. Quintana, *Adultos*, in *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006*, G. Olaiz, et al., Editors. 2006, Instituto Nacional de Salud Pública: Cuernavaca, México. p. 80.
37. Dirección General de Información en Salud, *Mortalidad 2000-2005*. 2005: México.
38. Kaput, J. and K. Dawson, *Complexity of type 2 diabetes mellitus data sets emerging from nutrigenomic research: a case for dimensionality reduction?* Mutat Res, 2007. **622**(1-2): p. 19-32.
39. Hanis, C.L., et al., *A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2*. Nat Genet, 1996. **13**(2): p. 161-6.
40. Horikawa, Y., et al., *Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus*. Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 163-75.
41. Song, Y., et al., *Are variants in the CAPN10 gene related to risk of type 2 diabetes? A quantitative assessment of population and family-based association studies*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(2): p. 208-22.
42. Del Bosque-Plata, L., et al., *Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population*. Mol Genet Metab, 2004. **81**(2): p. 122-6.
43. Harris, F., et al., *Calpains and their multiple roles in diabetes mellitus*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1084**: p. 452-80.
44. Huang, Y. and K.K. Wang, *The calpain family and human disease*. Trends Mol Med, 2001. **7**(8): p. 355-62.
45. Zatz, M. and A. Starling, *Calpains and disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(23): p. 2413-23.
46. Ma, H., et al., *Characterization and expression of calpain 10. A novel ubiquitous calpain with nuclear localization*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28525-31.

47. Yang, X., et al., *Reduced skeletal muscle calpain-10 transcript level is due to a cumulative decrease in major isoforms*. Mol Genet Metab, 2001. **73**(1): p. 111-3.
48. Arrington, D.D., T.R. Van Vleet, and R.G. Schnellmann, *Calpain 10: a mitochondrial calpain and its role in calcium-induced mitochondrial dysfunction*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(6): p. C1159-71.
49. Evans, J.C., et al., *Studies of association between the gene for calpain-10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(3): p. 544-52.
50. Malecki, M.T., et al., *Homozygous combination of calpain 10 gene haplotypes is associated with type 2 diabetes mellitus in a Polish population*. Eur J Endocrinol, 2002. **146**(5): p. 695-9.
51. Tsuchiya, T., et al., *Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes in Europeans: results of pooled and meta-analyses*. Mol Genet Metab, 2006. **89**(1-2): p. 174-84.
52. Orho-Melander, M., et al., *Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels*. Diabetes, 2002. **51**(8): p. 2658-64.
53. Cassell, P.G., et al., *Haplotype combinations of calpain 10 gene polymorphisms associate with increased risk of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in South Indians*. Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1622-8.
54. Lynn, S., et al., *Variation in the calpain-10 gene affects blood glucose levels in the British population*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 247-50.
55. Tschritter, O., et al., *Assessing the shape of the glucose curve during an oral glucose tolerance test*. Diabetes Care, 2003. **26**(4): p. 1026-33.
56. Baier, L.J., et al., *A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(7): p. R69-73.
57. Carlsson, E., et al., *Genetic and nongenetic regulation of CAPN10 mRNA expression in skeletal muscle*. Diabetes, 2005. **54**(10): p. 3015-20.
58. Stumvoll, M., et al., *Functional significance of the UCSNP-43 polymorphism in the CAPN10 gene for proinsulin processing and insulin secretion in nondiabetic Germans*. Diabetes, 2001. **50**(9): p. 2161-3.
59. Shore, A.C., et al., *Association of calpain-10 gene with microvascular function*. Diabetologia, 2002. **45**(6): p. 899-904.
60. Shima, Y., et al., *Association of the SNP-19 genotype 22 in the calpain-10 gene with elevated body mass index and hemoglobin A1c levels in Japanese*. Clin Chim Acta, 2003. **336**(1-2): p. 89-96.
61. Daimon, M., et al., *Calpain 10 gene polymorphisms are related, not to type 2 diabetes, but to increased serum cholesterol in Japanese*. Diabetes Res Clin Pract, 2002. **56**(2): p. 147-52.
62. Hoffstedt, J., et al., *Polymorphism in the Calpain 10 gene influences glucose metabolism in human fat cells*. Diabetologia, 2002. **45**(2): p. 276-82.
63. Hoffstedt, J., E. Naslund, and P. Arner, *Calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced beta(3)-adrenoceptor function in human fat cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(7): p. 3362-7.
64. Ehrmann, D.A., et al., *Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(4): p. 1669-73.
65. González, A., et al., *Comment: CAPN10 alleles are associated with polycystic ovary syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(8): p. 3971-6.
66. Hinney, A., et al., *No evidence for involvement of the calpain-10 gene 'high-risk' haplotype combination for non-insulin-dependent diabetes mellitus in early onset obesity*. Mol Genet Metab, 2002. **76**(2): p. 152-6.

67. Jensen, D.P., et al., *Variation in CAPN10 in relation to type 2 diabetes, obesity and quantitative metabolic traits: studies in 6018 whites*. Mol Genet Metab, 2006. **89**(4): p. 360-7.
68. Rasmussen, S.K., et al., *Variants within the calpain-10 gene on chromosome 2q37 (NIDDM1) and relationships to type 2 diabetes, insulin resistance, and impaired acute insulin secretion among Scandinavian Caucasians*. Diabetes, 2002. **51**(12): p. 3561-7.
69. Horikawa, Y., et al., *Genetic variations in calpain-10 gene are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(1): p. 244-7.
70. Fingerlin, T.E., et al., *Variation in three single nucleotide polymorphisms in the calpain-10 gene not associated with type 2 diabetes in a large Finnish cohort*. Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1644-8.
71. Tsai, H.J., et al., *Type 2 diabetes and three calpain-10 gene polymorphisms in Samoans: no evidence of association*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(6): p. 1236-44.
72. Haddad, L., et al., *Variation within the type 2 diabetes susceptibility gene calpain-10 and polycystic ovary syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(6): p. 2606-10.
73. Weedon, M.N., et al., *Meta-analysis and a large association study confirm a role for calpain-10 variation in type 2 diabetes susceptibility*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(5): p. 1208-12.
74. Parikh, H. and L. Groop, *Candidate genes for type 2 diabetes*. Rev Endocr Metab Disord, 2004. **5**(2): p. 151-76.
75. López-Orduña, E., et al., *CAPN10 mRNA splicing and decay is not affected by a SNP associated with susceptibility to type 2 diabetes*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(3): p. 831-6.
76. Cox, N.J., et al., *Loci on chromosomes 2 (NIDDM1) and 15 interact to increase susceptibility to diabetes in Mexican Americans*. Nat Genet, 1999. **21**(2): p. 213-5.
77. Walder, K., et al., *Calpain 3 gene expression in skeletal muscle is associated with body fat content and measures of insulin resistance*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. **26**(4): p. 442-9.
78. Turner, M.D., *Coordinated control of both insulin secretion and insulin action through calpain-10-mediated regulation of exocytosis?* Mol Genet Metab, 2007. **91**(4): p. 305-7.
79. Ort, T., et al., *Dephosphorylation of beta2-syntrophin and Ca<sup>2+</sup>/mu-calpain-mediated cleavage of ICA512 upon stimulation of insulin secretion*. Embo J, 2001. **20**(15): p. 4013-23.
80. Sreenan, S.K., et al., *Calpains play a role in insulin secretion and action*. Diabetes, 2001. **50**(9): p. 2013-20.
81. Zhou, Y.P., et al., *A 48-hour exposure of pancreatic islets to calpain inhibitors impairs mitochondrial fuel metabolism and the exocytosis of insulin*. Metabolism, 2003. **52**(5): p. 528-34.
82. Parnaud, G., et al., *Inhibition of calpain blocks pancreatic beta-cell spreading and insulin secretion*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**(2): p. E313-21.
83. Turner, M.D., et al., *Calpain facilitates actin reorganization during glucose-stimulated insulin secretion*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **352**(3): p. 650-5.
84. Johnson, J.D., et al., *RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 24794-802.
85. Smith, L.K., K.M. Rice, and C.W. Garner, *The insulin-induced down-regulation of IRS-1 in 3T3-L1 adipocytes is mediated by a calcium-dependent thiol protease*. Mol Cell Endocrinol, 1996. **122**(1): p. 81-92.
86. Otani, K., et al., *Calpain system regulates muscle mass and glucose transporter GLUT4 turnover*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 20915-20.



87. Paul, D.S., et al., *Calpain facilitates GLUT4 vesicle translocation during insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes*. *Biochem J*, 2003. **376**(Pt 3): p. 625-32.
88. Logie, L.J., et al., *Calpain inhibition and insulin action in cultured human muscle cells*. *Mol Genet Metab*, 2005. **85**(1): p. 54-60.
89. Brown, A.E., S.J. Yeaman, and M. Walker, *Targeted suppression of calpain-10 expression impairs insulin-stimulated glucose uptake in cultured primary human skeletal muscle cells*. *Mol Genet Metab*, 2007. **91**(4): p. 318-24.
90. Norton, L., et al., *Characterization of GLUT4 and calpain expression in healthy human skeletal muscle during fasting and refeeding*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2007. **189**(3): p. 233-40.
91. Meier, M., et al., *Calpain inhibition impairs glycogen syntheses in HepG2 hepatoma cells without altering insulin signaling*. *J Endocrinol*, 2007. **193**(1): p. 45-51.
92. Patel, Y.M. and M.D. Lane, *Role of calpain in adipocyte differentiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(4): p. 1279-84.
93. Patel, Y.M. and M.D. Lane, *Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(23): p. 17653-60.
94. Yajima, Y., et al., *Calpain system regulates the differentiation of adult primitive mesenchymal ST-13 adipocytes*. *Endocrinology*, 2006. **147**(10): p. 4811-9.
95. Jones, F.T., *A broad view of arsenic*. *Poult Sci*, 2007. **86**(1): p. 2-14.
96. International Agency for Research on Cancer, *Overall evaluations of carcinogenicity: an update of IARC Monographs*. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 1987. **1 - 42**: p. 173-259.
97. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, *CERCLA Priority List of Hazardous Substances*. 2005. <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html>
98. Zierold, K.M., L. Knobeloch, and H. Anderson, *Prevalence of chronic diseases in adults exposed to arsenic-contaminated drinking water*. *Am J Public Health*, 2004. **94**(11): p. 1936-7.
99. US EPA, U.S. *Arsenic in drinking water*. 2007. <http://www.epa.gov/safewater/arsenic/basicinformation.html>
100. Tchounwou, P.B., B. Wilson, and A. Ishaque, *Important considerations in the development of public health advisories for arsenic and arsenic-containing compounds in drinking water*. *Rev Environ Health*, 1999. **14**(4): p. 211-29.
101. Rosen, B.P., *Biochemistry of arsenic detoxification*. *FEBS Lett*, 2002. **529**(1): p. 86-92.
102. Carter, D.E., H.V. Aposhian, and A.J. Gandolfi, *The metabolism of inorganic arsenic oxides, gallium arsenide, and arsine: a toxicochemical review*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003. **193**(3): p. 309-34.
103. Vahter, M.E., *Arsenic*, in *Biological Monitoring of toxic metals*, F.L. Clarkson T.W., Nordberg G.F., Sager P.R., Editor. 1988, Plenum Press: New York. p. 303-321.
104. Hughes, M.F., *Arsenic toxicity and potential mechanisms of action*. *Toxicol Lett*, 2002. **133**(1): p. 1-16.
105. Goering, P.L., et al., *The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism*. *Toxicol Sci*, 1999. **49**(1): p. 5-14.
106. NAS, National Academy of Sciences, *Arsenic*, in *Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants*. 1977, National Academy of Sciences: Washington D.C. <http://newton.nap.edu/books/0309026040/html/R1.html>
107. Yoshida, T., H. Yamauchi, and G. Fan Sun, *Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004. **198**(3): p. 243-52.
108. Cebrián, M.E., et al., *Chronic arsenic poisoning in humans: The case of Mexico*, in *Arsenic in the Environment, Part II: Human health and Ecosystem effects*, J.O. Nriagu, Editor. 1994, John Wiley & Sons, Inc: New York.

109. Ostrosky-Wegman, P., et al., *Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico*. *Mutat Res*, 1991. **250**(1-2): p. 477-82.
110. Del Razo, L.M., et al., *Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism. A pilot study*. *Arch Toxicol*, 1997. **71**(4): p. 211-7.
111. García-Vargas, G.G., et al., *A pilot study on the urinary excretion of porphyrins in human populations chronically exposed to arsenic in Mexico*. *Hum Exp Toxicol*, 1991. **10**(3): p. 189-93.
112. Coronado-González, J.A., et al., *Inorganic arsenic exposure and type 2 diabetes mellitus in Mexico*. *Environ Res*, 2007. **104**(3): p. 383-389.
113. Gutiérrez-Ávila, H., et al., *[Removal of arsenic from water for human consumption in homes in rural communities in the Comarca Lagunera, Mexico]*. *Salud Publica Mex*, 1989. **31**(3): p. 305-13.
114. Díaz-Barriga, F., et al., *Arsenic and cadmium exposure in children living near a smelter complex in San Luis Potosi, Mexico*. *Environ Res*, 1993. **62**(2): p. 242-50.
115. Calderón, J., et al., *Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children*. *Environ Res*, 2001. **85**(2): p. 69-76.
116. Wyatt, C.J., et al., *Excretion of arsenic (As) in urine of children, 7-11 years, exposed to elevated levels of As in the city water supply in Hermosillo, Sonora, Mexico*. *Environ Res*, 1998. **78**(1): p. 19-24.
117. Meza, M.M., et al., *Arsenic drinking water exposure and urinary excretion among adults in the Yaqui Valley, Sonora, Mexico*. *Environ Res*, 2004. **96**(2): p. 119-26.
118. Hernández-Zavala, A., et al., *Alteration in bilirubin excretion in individuals chronically exposed to arsenic in Mexico*. *Toxicol Lett*, 1998. **99**(2): p. 79-84.
119. Shumilin, E., et al., *Arsenic, antimony, selenium and other trace elements in sediments of the La Paz Lagoon, peninsula of Baja California, Mexico*. *Mar Pollut Bull*, 2001. **42**(3): p. 174-8.
120. Armienta, M.A., R. Rodríguez, and O. Cruz, *Arsenic content in hair of people exposed to natural arsenic polluted groundwater at Zimapán, Mexico*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1997. **59**(4): p. 583-9.
121. Hurtado-Jiménez, R. and J.L. Gardea-Torresdey, *Arsenic in drinking water in the Los Altos de Jalisco region of Mexico*. *Rev Panam Salud Publica*, 2006. **20**(4): p. 236-47.
122. Armienta, M.A. and R. Ramiro, *Metales y metaloides. Estudio de caso: contaminación por arsénico en el agua subterránea de Zimapán, Hidalgo; Problemática ambiental y enfoque metodológico*, in *El agua en México vista desde la academia*, B. Jiménez and L. Marín, Editors. 2004, Academia Mexicana de Ciencias: México D.F. p. 79-98.
123. Leal, M.T. and S. Gelover, *Evaluación de la calidad del agua subterránea de fuentes de abastecimiento en acuíferos prioritarios de la región Cuencas Centrales del Norte*, in *Anuario del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, SEMARNAT*. 2002. p. 77-83.
124. Instituto de Geografía, UNAM, *Nuevo Atlas Nacional de México, Mapa NA XI 1 "Impactos ambientales relacionados con el uso inadecuado del agua subterránea"*. 2007: Mexico DF.
125. Fuentes Díaz, L., *Arsénico en las incrustaciones en las redes de distribución de agua potable en el norte de México y su desprendimiento*. *Agua Latinoamericana*, 2005. **5**(2): p. 15-17.
126. Liu, Z., et al., *Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **351**(2): p. 424-30.
127. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, *How can arsenic affect my health?*, in *ToxFAQs™ for Arsenic*. 2005. <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts2.html>

128. Meliker, J.R., et al., *Arsenic in drinking water and cerebrovascular disease, diabetes mellitus, and kidney disease in Michigan: a standardized mortality ratio analysis*. Environ Health, 2007. **6**: p. 4.
129. Clewell, H.J., et al., *Research toward the development of a biologically based dose response assessment for inorganic arsenic carcinogenicity: a progress report*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **222**(3): p. 388-98.
130. Ficker, E., et al., *Mechanisms of arsenic-induced prolongation of cardiac repolarization*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(1): p. 33-44.
131. Goytia-Acevedo, R.C., M.E. Cebrián, and E.S. Calderón-Aranda, *Differential effects of arsenic on intracellular free calcium levels and the proliferative response of murine mitogen-stimulated lymphocytes*. Toxicology, 2003. **189**(3): p. 235-44.
132. Salazar, A.M., et al., *Induction of p53 protein expression by sodium arsenite*. Mutat Res, 1997. **381**(2): p. 259-65.
133. Tseng, C.H., *The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **197**(2): p. 67-83.
134. Díaz-Villaseñor, A., et al., *Arsenic-induced alteration in the expression of genes related to type 2 diabetes mellitus*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **225**(2): p. 123-133.
135. Izquierdo-Vega, J.A., et al., *Diabetogenic effects and pancreatic oxidative damage in rats subchronically exposed to arsenite*. Toxicol Lett, 2006. **160**(2): p. 135-42.
136. Walton, F.S., et al., *Inhibition of insulin-dependent glucose uptake by trivalent arsenicals: possible mechanism of arsenic-induced diabetes*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **198**(3): p. 424-33.
137. Paul, D.S., et al., *Molecular mechanisms of the diabetogenic effects of arsenic: inhibition of insulin signaling by arsenite and methylarsonous acid*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(5): p. 734-42.
138. Lai, M.S., et al., *Ingested inorganic arsenic and prevalence of diabetes mellitus*. Am J Epidemiol, 1994. **139**(5): p. 484-92.
139. Rahman, M., et al., *Diabetes mellitus associated with arsenic exposure in Bangladesh*. Am J Epidemiol, 1998. **148**(2): p. 198-203.
140. Rahman, M., et al., *Relations between exposure to arsenic, skin lesions, and glucosuria*. Occup Environ Med, 1999. **56**(4): p. 277-81.
141. Tseng, C.H., et al., *Long-term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort study in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan*. Environ Health Perspect, 2000. **108**(9): p. 847-51.
142. Tsai, S.M., T.N. Wang, and Y.C. Ko, *Mortality for certain diseases in areas with high levels of arsenic in drinking water*. Arch Environ Health, 1999. **54**(3): p. 186-93.
143. Wang, S.L., et al., *Prevalence of non-insulin-dependent diabetes mellitus and related vascular diseases in southwestern arseniasis-endemic and nonendemic areas in Taiwan*. Environ Health Perspect, 2003. **111**(2): p. 155-59.
144. Mabuchi, K., A.M. Lilienfeld, and L.M. Snell, *Cancer and occupational exposure to arsenic: a study of pesticide workers*. Prev Med, 1980. **9**(1): p. 51-77.
145. Enterline, P.E. and G.M. Marsh, *Cancer among workers exposed to arsenic and other substances in a copper smelter*. Am J Epidemiol, 1982. **116**(6): p. 895-911.
146. Lagerkvist, B.J. and B. Zetterlund, *Assessment of exposure to arsenic among smelter workers: a five-year follow-up*. Am J Ind Med, 1994. **25**(4): p. 477-88.
147. Rahman, M. and O. Axelson, *Diabetes mellitus and arsenic exposure: a second look at case-control data from a Swedish copper smelter*. Occup Environ Med, 1995. **52**(11): p. 773-4.
148. Rahman, M., G. Wingren, and O. Axelson, *Diabetes mellitus among Swedish art glass workers--an effect of arsenic exposure?* Scand J Work Environ Health, 1996. **22**(2): p. 146-9.

149. Jensen, G.E. and M.L. Hansen, *Occupational arsenic exposure and glycosylated haemoglobin*. *Analyst*, 1998. **123**(1): p. 77-80.
150. Bartoli, D., et al., *Cohort study of art glass workers in Tuscany, Italy: mortality from non-malignant diseases*. *Occup Med (Lond)*, 1998. **48**(7): p. 441-5.
151. Lubin, J.H., et al., *Respiratory cancer in a cohort of copper smelter workers: results from more than 50 years of follow-up*. *Am J Epidemiol*, 2000. **151**(6): p. 554-65.
152. Tollestrup, K., et al., *Mortality among children residing near the American Smelting and Refining Company (ASARCO) copper smelter in Ruston, Washington*. *Arch Environ Health*, 2003. **58**(11): p. 683-91.
153. Longnecker, M.P. and J.L. Daniels, *Environmental contaminants as etiologic factors for diabetes*. *Environ Health Perspect*, 2001. **109 Suppl 6**: p. 871-6.
154. Chen, C.J., et al., *Arsenic and diabetes and hypertension in human populations: a review*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007. **222**(3): p. 298-304.
155. Cobo, J.M. and M. Castineira, *Oxidative stress, mitochondrial respiration, and glycemic control: clues from chronic supplementation with Cr<sup>3+</sup> or As<sup>3+</sup> to male Wistar rats*. *Nutrition*, 1997. **13**(11-12): p. 965-70.
156. Ortsäter, H., et al., *Contribution of glycolytic and mitochondrial pathways in glucose-induced changes in islet respiration and insulin secretion*. *Pflugers Arch*, 2002. **444**(4): p. 506-12.
157. Johnson, J.D., et al., *Increased islet apoptosis in Pdx1<sup>+/-</sup> mice*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(8): p. 1147-60.
158. Macfarlane, W.M., et al., *The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic beta-cells*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(33): p. 20936-44.
159. Macfarlane, W.M., et al., *Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(2): p. 1011-6.
160. Elrick, L.J. and K. Docherty, *Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1*. *Diabetes*, 2001. **50**(10): p. 2244-52.
161. Warren, A.P., et al., *Stress induces an increased hexose uptake in cultured cells*. *J Cell Physiol*, 1986. **128**(3): p. 383-8.
162. Widnell, C.C., et al., *Cellular stress induces a redistribution of the glucose transporter*. *Faseb J*, 1990. **4**(6): p. 1634-7.
163. Pasternak, C.A., et al., *Regulation of glucose uptake by stressed cells*. *J Cell Physiol*, 1991. **149**(2): p. 324-31.
164. Sviderskaya, E.V., et al., *Cellular stress causes accumulation of the glucose transporter at the surface of cells independently of their insulin sensitivity*. *J Membr Biol*, 1996. **149**(2): p. 133-40.
165. McDowell, H.E., et al., *Inositol phospholipid 3-kinase is activated by cellular stress but is not required for the stress-induced activation of glucose transport in L6 rat skeletal muscle cells*. *Eur J Biochem*, 1997. **247**(1): p. 306-13.
166. Fladeby, C. and G. Serck-Hanssen, *Stress-induced glucose uptake in bovine chromaffin cells: a comparison of the effect of arsenite and anisomycin*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1452**(3): p. 313-21.
167. Bazuine, M., et al., *Mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1 and -4 attenuate p38 MAPK during dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes*. *Mol Endocrinol*, 2004. **18**(7): p. 1697-707.
168. Bazuine, M., et al., *Arsenite stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes involves both Glut4 translocation and p38 MAPK activity*. *Eur J Biochem*, 2003. **270**(19): p. 3891-903.

169. Liebl, B., et al., *Influence of organic and inorganic arsenicals on glucose uptake in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells*. *Analyst*, 1992. **117**(3): p. 681-4.
170. Trouba, K.J., E.M. Wauson, and R.L. Vorce, *Sodium arsenite inhibits terminal differentiation of murine C3H 10T1/2 preadipocytes*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000. **168**(1): p. 25-35.
171. Wauson, E.M., A.S. Langan, and R.L. Vorce, *Sodium arsenite inhibits and reverses expression of adipogenic and fat cell-specific genes during in vitro adipogenesis*. *Toxicol Sci*, 2002. **65**(2): p. 211-9.
172. Salazard, B., et al., *Low-level arsenite activates the transcription of genes involved in adipose differentiation*. *Cell Biol Toxicol*, 2004. **20**(6): p. 375-85.
173. Biswas, U., et al., *Chronic toxicity of arsenic in goats: clinicobiochemical changes, pathomorphology and tissue residues*. *Small Rumin Res*, 2000. **38**(3): p. 229-235.
174. Boquist, L., S. Boquist, and I. Ericsson, *Structural beta-cell changes and transient hyperglycemia in mice treated with compounds inducing inhibited citric acid cycle enzyme activity*. *Diabetes*, 1988. **37**(1): p. 89-98.
175. Paul, D.S., et al., *Examination of the effects of arsenic on glucose homeostasis in cell culture and animal studies: development of a mouse model for arsenic-induced diabetes*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007. **222**(3): p. 305-14.
176. Aguilar, M.V., M.C. Martínez-Para, and M.J. González, *Effects of arsenic (V)-chromium (III) interaction on plasma glucose and cholesterol levels in growing rats*. *Ann Nutr Metab*, 1997. **41**(3): p. 189-95.
177. Arnold, L.L., et al., *Chronic studies evaluating the carcinogenicity of monomethylarsonic acid in rats and mice*. *Toxicology*, 2003. **190**(3): p. 197-219.
178. Hughes, M.F. and D.J. Thompson, *Subchronic dispositional and toxicological effects of arsenate administered in drinking water to mice*. *J Toxicol Environ Health*, 1996. **49**(2): p. 177-96.
179. Pal, S. and A.K. Chatterjee, *Protective effect of N-acetylcysteine against arsenic-induced depletion in vivo of carbohydrate*. *Drug Chem Toxicol*, 2004. **27**(2): p. 179-89.
180. Pal, S. and A.K. Chatterjee, *Protective effect of methionine supplementation on arsenic-induced alteration of glucose homeostasis*. *Food Chem Toxicol*, 2004. **42**(5): p. 737-42.
181. Pal, S. and A.K. Chatterjee, *Prospective protective role of melatonin against arsenic-induced metabolic toxicity in Wistar rats*. *Toxicology*, 2005. **208**(1): p. 25-33.
182. Ward, N.I., *Trace element concentrations in blood plasma from diabetic patients and normal individuals*. *Biol Trace Elem Res*, 1984. **6**: p. 469-487.
183. Ruíz-Navarro, M.L., et al., *Urine arsenic concentrations in healthy adults as indicators of environmental contamination: relation with some pathologies*. *Sci Total Environ*, 1998. **216**(1-2): p. 55-61.
184. Lewis, D.R., et al., *Drinking water arsenic in Utah: A cohort mortality study*. *Environ Health Perspect*, 1999. **107**(5): p. 359-65.
185. Joost, H.G. and B. Thorens, *The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review)*. *Mol Membr Biol*, 2001. **18**(4): p. 247-56.
186. Wu, X. and H.H. Freeze, *GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms*. *Genomics*, 2002. **80**(6): p. 553-7.
187. Maratou, E., et al., *Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells*. *Eur J Clin Invest*, 2007. **37**(4): p. 282-90.
188. Fu, Y., et al., *Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation*. *Blood Cells Mol Dis*, 2004. **32**(1): p. 182-90.

189. Doege, H., et al., *Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes*. *Biochem J*, 2000. **350 Pt 3**: p. 771-6.
190. Szablewski, L., et al., *Glut4 is expressed in circulating lymphocytes of diabetic patients. A method to detect early prediabetic stages?* *Diabetologia Croatica*, 2007. **36(4)**: p. 69-76.
191. Valera Mora, M.E., et al., *Insulin clearance in obesity*. *J Am Coll Nutr*, 2003. **22(6)**: p. 487-93.
192. Sesti, G., et al., *Delayed intracellular dissociation of the insulin-receptor complex impairs receptor recycling and insulin processing in cultured Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes from insulin-resistant subjects*. *Diabetologia*, 1996. **39(3)**: p. 289-95.
193. McElduff, A., et al., *Insulin receptor degradation is accelerated in cultured lymphocytes from patients with genetic syndromes of extreme insulin resistance*. *J Clin Invest*, 1984. **74(4)**: p. 1366-74.
194. Taylor, S.I., et al., *Decreased insulin binding in cultured lymphocytes from two patients with extreme insulin resistance*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1982. **54(5)**: p. 919-30.
195. Gordon, P., et al., *Biosynthesis and regulation of the insulin receptor*. *Yale J Biol Med*, 1989. **62(5)**: p. 521-31.
196. Daneman, D., et al., *Insulin-stimulated glucose transport in circulating mononuclear cells from nondiabetic and IDDM subjects*. *Diabetes*, 1992. **41(2)**: p. 227-34.
197. Morii, T., et al., *Cellular insulin resistance in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblasts from young insulin-resistant Japanese men*. *Metabolism*, 2005. **54(3)**: p. 370-5.
198. Kawano, K., et al., *Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain*. *Diabetes*, 1992. **41(11)**: p. 1422-8.
199. Kawano, K., et al., *OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain*. *Diabetes Res Clin Pract*, 1994. **24 Suppl**: p. S317-20.
200. Muramatsu, Y., et al., *Capn10, a candidate gene responsible for type 2 diabetes mellitus in the OLETF rat*. *IUBMB Life*, 2003. **55(9)**: p. 533-7.
201. Sato, Y., et al., *Calpain 10 as a predictive gene for type 2 diabetes: evidence from a novel screening system using white blood cells of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats*. *Biol Pharm Bull*, 2003. **26(12)**: p. 1765-8.
202. Iida, S., et al., *Genome wide expression analysis of white blood cells and liver of pre-diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats using a cDNA microarray*. *Biol Pharm Bull*, 2006. **29(12)**: p. 2451-9.
203. Hayashi, Y., et al., *DNA microarray analysis of type 2 diabetes-related genes co-regulated between white blood cells and livers of diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats*. *Biol Pharm Bull*, 2007. **30(4)**: p. 763-71.
204. Curto, M., et al., *Insulin resistance in obese subjects and newly diagnosed NIDDM patients and derangements of pyruvate dehydrogenase in their circulating lymphocytes*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1997. **21(12)**: p. 1137-42.
205. Piccinini, M., et al., *Down-regulation of pyruvate dehydrogenase phosphatase in obese subjects is a defect that signals insulin resistance*. *Obes Res*, 2005. **13(4)**: p. 678-86.
206. Timmers, K.I., et al., *Impaired 6-phosphofructokinase activity in mononuclear leukocytes from patients with type II diabetes mellitus*. *Enzyme*, 1986. **36(4)**: p. 247-53.
207. Tu, K.Y., et al., *Glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity in human lymphocytes: effects of insulin, obesity and weight loss*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **207(1)**: p. 183-90.
208. Hennige, A.M., et al., *Leptin down-regulates insulin action through phosphorylation of serine-318 in insulin receptor substrate 1*. *Faseb J*, 2006. **20(8)**: p. 1206-8.
209. Hofmann, M.A., et al., *Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB*. *Diabetologia*, 1999. **42(2)**: p. 222-32.

210. Rosenbaum, T., M.C. Sánchez-Soto, and M. Hiriart, *Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic beta-cells*. *Diabetes*, 2001. **50**(8): p. 1755-62.
211. Axxora, *Fluorescein diacetate MGT-M0060*. 2007. Product information sheet [http://www.axxora.com/other\\_products-MGT-M0060/opfa.1.1.MGT-M0060.1880.4.1.html](http://www.axxora.com/other_products-MGT-M0060/opfa.1.1.MGT-M0060.1880.4.1.html)
212. Hartmann, A. and G. Speit, *Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells*. *Environ Mol Mutagen*, 1996. **27**(2): p. 98-104.
213. BD Biosciences PharMingen, *Technical Reports, Cytokine Analysis*, in *BD Product Catalog*. 2000. p. 1397-1400.
214. Halim, N.D., A.W. Joseph, and B.K. Lipska, *A novel ELISA using PVDF microplates*. *J Neurosci Methods*, 2005. **143**(2): p. 163-8.
215. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Extraction, Purification and Análisis of Messenger RNA from Eukaryotic cells*, in *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA. p. 7.28.
216. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
217. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
218. AfCS, (Alliance for Cell Signaling), *Assay of Intracellular Free Calcium in Suspended B Cells*. 2002., Procedure Protocol ID PP0000001100, Versión 1, 03/06/02 <http://www.afcs.org/reports/v1/BC0001/Protocols/DallasCa.pdf>
219. Gillis, K., D. Fishwild, and B. P., *Performing the cell cycle assay on the Guava PCA System*. 2003, Guava Technologies. Assay Protocol, Part. No. 4600-0510 Rev. B
220. Perry, P. and S. Wolff, *New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids*. *Nature*, 1974. **251**(5471): p. 156-8.
221. Rojas, E., et al., *Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity*. *Anticancer Drugs*, 1993. **4**(6): p. 637-40.
222. Meza, M.M., et al., *Developmentally restricted genetic determinants of human arsenic metabolism: association between urinary methylated arsenic and CYT19 polymorphisms in children*. *Environ Health Perspect*, 2005. **113**(6): p. 775-81.
223. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. *Diabetologia*, 1985. **28**(7): p. 412-9.
224. Levy, J.C., D.R. Matthews, and M.P. Hermans, *Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program*. *Diabetes Care*, 1998. **21**(12): p. 2191-2.
225. Wallace, T.M., J.C. Levy, and D.R. Matthews, *Use and abuse of HOMA modeling*. *Diabetes Care*, 2004. **27**(6): p. 1487-95.
226. Emoto, M., et al., *Homeostasis model assessment as a clinical index of insulin resistance in type 2 diabetic patients treated with sulfonylureas*. *Diabetes Care*, 1999. **22**(5): p. 818-22.
227. Stephens, M., N.J. Smith, and P. Donnelly, *A new statistical method for haplotype reconstruction from population data*. *Am J Hum Genet*, 2001. **68**(4): p. 978-89.
228. Stephens, M. and P. Scheet, *Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation*. *Am J Hum Genet*, 2005. **76**(3): p. 449-62.
229. Díaz-Villaseñor, A., et al., *Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic beta-cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006. **214**(1): p. 30-4.
230. Díaz-Villaseñor, A., et al., *Arsenite reduces insulin secretion in rat pancreatic beta-cells by decreasing the calcium-dependent calpain-10 proteolysis of SNAP-25*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. DOI:10.1016/j.taap.2008.05.018

231. Díaz-Villaseñor, A., et al., *The activity of calpains in lymphocytes is glucose-dependent and is decreased in diabetic patients*. Blood Cells Mol Dis, 2008. **40**(3): p. 414-419.
232. Sequence Manipulation Suite, *Protein Molecular Weight*. 2006. [http://bioinfo.unice.fr/ressources/sms2/protein\\_mw.html](http://bioinfo.unice.fr/ressources/sms2/protein_mw.html)
233. Wu, M.M., et al., *Gene expression of inflammatory molecules in circulating lymphocytes from arsenic-exposed human subjects*. Environ Health Perspect, 2003. **111**(11): p. 1429-38.
234. Wu, M.M., et al., *Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan*. Environ Health Perspect, 2001. **109**(10): p. 1011-7.
235. Hall, M., et al., *Determinants of arsenic metabolism: blood arsenic metabolites, plasma folate, cobalamin, and homocysteine concentrations in maternal-newborn pairs*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(10): p. 1503-9.
236. Vidaltamayo, R., et al., *Neuron-like phenotypic changes in pancreatic beta-cells induced by NGF, FGF, and dbcAMP*. Endocrine, 1996. **4**(1): p. 19-26.
237. Hribal, M.L., et al., *Chronic hyperglycemia impairs insulin secretion by affecting insulin receptor expression, splicing, and signaling in RIN beta cell line and human islets of Langerhans*. Faseb J, 2003. **17**(10): p. 1340-2.
238. Federici, M., et al., *High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program*. Diabetes, 2001. **50**(6): p. 1290-301.
239. Ortega-Camarillo, C., et al., *Hyperglycemia induces apoptosis and p53 mobilization to mitochondria in RINm5F cells*. Mol Cell Biochem, 2006. **281**(1-2): p. 163-71.
240. Olofsson, C.S., et al., *Long-term exposure to glucose and lipids inhibits glucose-induced insulin secretion downstream of granule fusion with plasma membrane*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1888-97.
241. Miyazaki, J., et al., *Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms*. Endocrinology, 1990. **127**(1): p. 126-32.
242. Polak, M., et al., *Nerve growth factor induces neuron-like differentiation of an insulin-secreting pancreatic beta cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5781-5.
243. Lehmann, G.M. and M.J. McCabe, Jr., *Arsenite slows S phase progression via inhibition of cdc25A dual specificity phosphatase gene transcription*. Toxicol Sci, 2007. **99**(1): p. 70-8.
244. Gonsebatt, M.E., et al., *Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water*. Mutat Res, 1994. **313**(2-3): p. 293-9.
245. Dilda, P.J. and P.J. Hogg, *Arsenical-based cancer drugs*. Cancer Treat Rev, 2007. **33**(6): p. 542-64.
246. Jager, J.W. and P. Ostrosky-Wegman, *Arsenic: a paradoxical human carcinogen*. Mutat Res, 1997. **386**(3): p. 181-4.
247. Helmstädter, A., *Antidiabetic drugs used in Europe prior to the discovery of insulin*. Pharmazie, 2007. **62**(9): p. 717-20.
248. Leiers, T., et al., *[Ca(2+)](i)- and insulin-stimulating effect of the non-membranepерmeable phosphatase-inhibitor microcystin-LR in intact insulin-secreting cells (RINm5F)*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(6): p. 1406-10.
249. Arkhammar, P., et al., *Extracellular ATP increases cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration in clonal insulin-producing RINm5F cells. A mechanism involving direct interaction with both release and refilling of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> pool*. Biochem J, 1990. **265**(1): p. 203-11.



250. Kitahara, A., et al., *Selective localization of calpain I (the low-Ca<sup>2+</sup>-requiring form of Ca<sup>2+</sup>-dependent cysteine proteinase) in B-cells of human pancreatic islets*. FEBS Lett, 1985. **184**(1): p. 120-4.
251. Ohara-Imaizumi, M., et al., *Imaging analysis reveals mechanistic differences between first- and second-phase insulin exocytosis*. J Cell Biol, 2007. **177**(4): p. 695-705.
252. Li, W. and I.N. Chou, *Effects of sodium arsenite on the cytoskeleton and cellular glutathione levels in cultured cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 1992. **114**(1): p. 132-9.
253. Lemarie, A., et al., *Human macrophages constitute targets for immunotoxic inorganic arsenic*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3019-27.
254. Ramírez, T., et al., *S-adenosyl-L-methionine is able to reverse micronucleus formation induced by sodium arsenite and other cytoskeleton disrupting agents in cultured human cells*. Mutat Res, 2003. **528**(1-2): p. 61-74.
255. Ramírez, P., et al., *Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide*. Mutat Res, 1997. **386**(3): p. 291-8.
256. Trouba, K.J., E.M. Wauson, and R.L. Vorce, *Sodium arsenite-induced dysregulation of proteins involved in proliferative signaling*. Toxicol Appl Pharmacol, 2000. **164**(2): p. 161-70.
257. Sandoval, M., et al., *p53 response to arsenic exposure in epithelial cells: protein kinase B/Akt involvement*. Toxicol Sci, 2007. **99**(1): p. 126-40.
258. Giono, L.E. and J.J. Manfredi, *The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints*. J Cell Physiol, 2006. **209**(1): p. 13-20.
259. Beith, J.L., E.U. Alejandro, and J.D. Johnson, *Insulin Stimulates Primary beta-cell Proliferation via Raf-1 Kinase*. Endocrinology, 2008. **149**(5): p. 2251-2260.
260. Yen, C.C., et al., *The diabetogenic effects of the combination of humic acid and arsenic: in vitro and in vivo studies*. Toxicol Lett, 2007. **172**(3): p. 91-105.
261. Kahn, S.E., *The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes*. Diabetologia, 2003. **46**(1): p. 3-19.
262. LeRoith, D., *Beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities*. Am J Med, 2002. **113 Suppl 6A**: p. 3S-11S.
263. Tripathy, D., et al., *Parallel manifestation of insulin resistance and beta cell decompensation is compatible with a common defect in Type 2 diabetes*. Diabetologia, 2004. **47**(5): p. 782-93.
264. Wagner, K.A., R. McDaniel, and D. Self, *Collection and preparation of sidestream cigarette smoke for trace elemental determinations by graphite furnace atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry*. J AOAC Int, 2001. **84**(6): p. 1934-40.
265. Afridi, H.I., et al., *Evaluation of status of toxic metals in biological samples of diabetes mellitus patients*. Diabetes Res Clin Pract, 2008. **80**(2): p. 280-8.
266. Wang, S.L., et al., *Inorganic arsenic exposure and its relation to metabolic syndrome in an industrial area of Taiwan*. Environ Int, 2007. **33**(6): p. 805-11.
267. Nabi, A.H., M.M. Rahman, and L.N. Islam, *Evaluation of Biochemical Changes in Chronic Arsenic Poisoning among Bangladeshi Patients*. Int J Environ Res Public Health, 2005. **2**(3-4): p. 385-93.
268. Li, X.C. and J.L. Zhuo, *Targeting glucagon receptor signalling in treating metabolic syndrome and renal injury in Type 2 diabetes: theory versus promise*. Clin Sci (Lond), 2007. **113**(4): p. 183-93.
269. Nermell, B., et al., *Urinary arsenic concentration adjustment factors and malnutrition*. Environ Res, 2008. **106**(2): p. 212-8.
270. Narushima, M., et al., *A human beta-cell line for transplantation therapy to control type 1 diabetes*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(10): p. 1274-82.

271. Deshpande, R.V., J.M. Goust, and N.L. Banik, *Differential distribution of calpain in human lymphoid cells*. Neurochem Res, 1993. **18**(7): p. 767-73.
272. Karlsson, J.O., et al., *Increased proteolytic activity in lymphocytes from patients with early onset Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 1995. **16**(6): p. 901-6.
273. Shukla, A., et al., *Regulated exocytosis in immune function: are SNARE-proteins involved?* Respir Med, 2000. **95**(10): p. 773-80.
274. Reales, E., et al., *Identification of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor exocytotic machinery in human plasma cells: SNAP-23 is essential for antibody secretion*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6686-93.
275. Stow, J.L., A.P. Manderson, and R.Z. Murray, *SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(12): p. 919-29.
276. Huse, M., et al., *T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 247-55.
277. Logan, M.R., S.O. Odemuyiwa, and R. Moqbel, *Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(5): p. 923-32; quiz 933.