

Universidad Nacional Autónoma de México



*Estudio de la expresión del
gen de la insulina en células
beta pancreáticas murinas
expuestas a fluoruro*

T E S I S

● **Que para obtener el título de:**

BIÓLOGO

● **Presenta:**

HUGO REYES PÉREZ

● **Tutora:**

DRA. MARÍA DE LA LUZ DEL RAZO JIMÉNEZ



México, D.F. 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

Profesores

- Presidente** Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
- Vocal** Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez
- Secretario** Dra. María de la Luz Del Razo Jiménez
- 1°. Suplente** M. en IBB. Claudia Andrea Segal Kischinevsky
- 2°. Suplente** Dra. Regina Dorinda Montero Montoya

Asesor del tema: _____

Dra. María de la Luz Del Razo Jiménez

Sustentante: _____

Hugo Reyes Pérez

Lugar donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 28, de la Sección Externa de Toxicología del
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto
Politécnico Nacional

Dirección: Av. IPN. No. 2508, Col. Zacatenco, México D.F., C.P.
07360

México, D.F. 2009.

Agradecimientos

A Dios y a la Stma. Virgen por iluminarme el camino. Le agradezco a mi familia toda su comprensión y soporte. Amigos, gracias por su compañía y gran ayuda. A mis maestros, en especial a la Dra. Luz María por su confianza y apoyo; gracias a todas las personas que dieron parte de sus conocimientos para hacer más fácil mi recorrido.

In manus tuas Domine

Índice General

1.	Antecedentes	1	5.	Método	15
1.1	Generalidades del flúor	1	5.1	Línea celular	16
1.2	Usos del fluoruro	1	5.2	Viabilidad celular	16
a)	El fluoruro como contaminante ambiental	2	5.3	Expresión del gen de la insulina	17
1.3	Toxicocinética del fluoruro	3	5.4	Cuantificación de la secreción de insulina	18
1.4	Mecanismos de acción del fluoruro	4	5.5	Análisis estadístico	19
a)	Inhibición de enzimas	4			
b)	Estrés oxidante	5			
1.5	Efectos del fluoruro sobre la salud humana	5	6.	Resultados	20
1.6	La insulina	6	7.	Discusión	23
a)	Síntesis y función de la insulina	6	8.	Conclusión	26
b)	La secreción de la insulina	7	9.	Perspectivas	27
c)	Estructura del gen que codifica a la insulina	9	10.	Bibliografía	28
d)	Factores de transcripción que regulan al gen	10			
e)	Regulación de la expresión del gen por la glucosa	10			
f)	Desregulación del gen	11			
1.7	Efecto del fluoruro sobre la secreción de insulina	11			
2.	Justificación del proyecto	13			
3.	Objetivos	14			
4.	Hipótesis	15			

- 7-AAD:** 7- aminoactinomicina
βTC: tumor célula beta
AC: adenilato ciclasa
ACh: acetilcolina
ADP: adenosín difosfato
ANOVA: análisis de varianza
ATP: adenosín trifostato
ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry
B2: Proteína Neuro Beta2
bHLH: proteínas con dominio hélice-giro-hélice
BKR: Buffer de Krebs-Ringer
CEBP/β: CCAAT/enhancer binding protein/β
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario
Csps: proteínas lazo de cisteína
DAG: diacilglicerol
DE: desviación estándar
DEPC: Dietil pirocarbonato
DMEM: medio de cultivo Dulbecco Modificado Eagle
DMT2: Diabetes mellitus tipo 2
dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato.
DTT: ditioneítrito
ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EPI: epinefrina
ER: retículo endoplásmico
ERO: especies reactivas de oxígeno
FBS: suero fetal bovino
GAL: galanina
GIP: péptido insulínico dependiente
GLP: péptido similar a glucagón
GLP-1: péptido 1 similar a glucagón
GLUT: transportador de glucosa
ER: retículo endoplásmico
ERO: especies reactivas de oxígeno
FBS: suero fetal bovino
GAL: galanina
GIP: péptido insulínico dependiente
GLP: péptido similar a glucagón
GLP-1: péptido 1 similar a glucagón
GLUT: transportador de glucosa
HIT: tumor islote de hamster
IBMX: isobutil metilxantina
IP3: inositol trifosfato
JNK: cinasa c-Jun N-terminal
KATP+: canales de potasio dependientes de ATP
MafA: proteína en mamíferos homóloga a MafA/Maf-L aviar
MCF: factores acoplantes metabólicos
MDA: malondialdehído
MgCl2: cloruro de magnesio
mM: milimolar
NaF: fluoruro de sodio
NFAT: factor nuclear de células T activadas
PACAP: péptido pituitario activado por adenilato ciclasa
PBS: buffer de fosfatos
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PDX-1: homocaja pancreática duodenal – 1
PKA: proteína cinasa A
PKC: proteína cinasa C
PLC: fosfolipasa C
ppm: partes por millón (mg/l)
RIN: insulínoma de rata
RNA: ácido ribonucleico
rpm: revoluciones por minuto
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa de retrotranscripción
SAPK: proteína cinasa activada por estrés
SNAP: proteína soluble de acoplamiento a NSF
SNARE: receptor de proteínas solubles de acoplamiento a NSF
SRIF: factor que inhibe la liberación de somatotropina
SST: somatostatina
SV40: virus 40 de simio
Taq polimerasa: DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*
USF: factor estimulador de río arriba
VDCC: canales de calcio dependientes de voltaje
ψ: potencial de membrana

- Fig. 1.** Áreas de México expuestas a fluoruro.
- Fig. 2.** Estructura del promotor del gen de insulina.
- Fig. 3.** Regulación de la secreción de insulina.
- Fig. 4.** Eventos en la secreción de la insulina.
- Fig. 5.** Viabilidad de células BTC6 expuestas durante 12 horas a fluoruro.
- Fig. 6.** Expresión del gen de insulina (Relación mRNA/18S).
- Fig. 7.** Secreción de insulina después de 12 h de exposición a fluoruro.

El fluoruro es un elemento que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza en muchas formas y sus compuestos son utilizados por el hombre de diversas maneras, por lo que la exposición de los organismos a este compuesto es considerable. El fluoruro puede entrar al organismo a través del agua de bebida, la comida, pastas de dientes, enjuagues bucales y otros productos dentales, además de algunos medicamentos y desechos industriales que utilizan fluoruro en su formulación. Al ingresar el fluoruro a las células mediante un transporte pasivo, interfiere a varias de las vías metabólicas importantes para el organismo, mediante la inhibición de la actividad de proteínas y la modificación de la expresión algunos genes, entre otras, pudiendo promover la aparición de algunas patologías que van desde fluorosis dental hasta daño neurológico.

Uno de los problemas más importantes con respecto al consumo de agua es que una gran cantidad de poblaciones dependen de la extracción de agua de pozos. Esta está puede estar contaminada por materiales inorgánicos solubles como son el fluoruro o arsénico, así como material orgánico insoluble. Por lo anterior, millones de personas en todo el mundo están actualmente expuestas a los efectos tóxicos del fluoruro al beber o preparar sus alimentos con esta agua.

El presente estudio se llevó a cabo para determinar si existe una relación entre la exposición a fluoruro y la alteración de la expresión del gen de la insulina, ya sea aumento o disminución de la expresión, con el objetivo de poder conocer si el fluoruro puede intervenir en el desarrollo de la Diabetes Mellitus tipo 2 al promover variaciones en la exocitosis de insulina o en la síntesis de esta hormona. Los resultados obtenidos mostraron que el fluoruro tiene un efecto evidentemente negativo sobre la expresión del gen de la insulina y la secreción de esta hormona por parte de las células β pancreáticas, pues la exposición de estas células a tratamientos con fluoruro de sodio (0.015, 0.1, 0.4, 3 y 5 mM) disminuyó significativamente tanto la cantidad de mensajero de insulina como de hormona secretada.

Aunque se conocen los posibles efectos que tiene el fluoruro en varios tipos celulares, todavía se desconocen los mecanismos exactos por los cuales se desencadenan esos efectos, por lo que se necesitan más estudios para poder determinar y caracterizar esos mecanismos y procesos.

1.1 Generalidades del flúor

El flúor es un elemento que pertenece al grupo o familia 7A ó 17, conocida como de los halógenos. Es un no metal altamente reactivo que forma un gran número de compuestos. En estado elemental forma moléculas diatómicas y se encuentra de manera natural en forma de gas de color amarillo pálido con un olor característico. En la naturaleza está ampliamente distribuido, sin embargo, debido a su gran reactividad, siempre está combinado con otros elementos, como son los casos de los minerales fluorita (CaF_2), la criolita (Na_3AlF_6), el fluoroaspar y la fluoroapatita (Chang 1997). El flúor constituye el 0.065% de los elementos de la corteza terrestre y es un componente significativo del ciclo biogeoquímico en el cual evoluciona la vida (Rivera et al., 1993).

Los fluoruros son definidos como compuestos binarios o sales de flúor y otro elemento, teniendo como ejemplo el fluoruro de sodio (NaF). Los compuestos de flúor están presentes de manera natural en la corteza terrestre formando rocas, arcilla, carbón, además de presentarse también en el suelo, de donde son liberados al aire mediante la erosión eólica. Otra fuente natural de fluoruro es la liberación al ambiente por las erupciones volcánicas. Una vez que los fluoruros son liberados de las partículas a las que estaban unidos en el aire, caen a la tierra o al agua, se asocian con varios elementos presentes en el medio acuoso, como son aluminio, calcio o magnesio, depositándose y formando parte de los sedimentos, donde se unen fuertemente a otras partículas. Cuando son depositados en la tierra son retenidos en el suelo al formar asociaciones con otros componentes presentes en esta capa terrestre. La lixiviación remueve una pequeña parte del fluoruro del suelo y es por esto que puede ser tomado por las plantas y acumularse en las hojas, logrando de esta forma ingresar a la cadena alimenticia (ATSDR 2003).

Puesto que se pueden encontrar compuestos de flúor tanto en el aire como en tierra y agua, los

organismos pueden estar expuestos al respirar, beber agua e incluso en la comida, además la exposición aumenta considerablemente debido al uso de productos para la higiene dental, el consumo de alimentos fluorados o la adición de fluoruros al agua de bebida. Los fluoruros aparecen en un amplio rango de concentraciones en aire, agua, suelo, vegetales y animales como resultado de la contaminación natural o de la antropogénica. La exposición del hombre a este tóxico a través de estas fuentes constituye un problema de salud pública, que no está siendo atendido en muchas áreas geográficas de nuestro planeta.

1.2 Usos del fluoruro

El flúor ha sido considerado como un elemento que participa en algunas funciones bioquímicas indispensables, como son la formación de tejido óseo y el mantenimiento de la integridad ósea, por lo que se encuentra en líquidos corporales y tejidos del cuerpo humano (Rivera et al., 1993). A pesar de lo anterior y puesto que se encuentra presente en todo el ambiente y las poblaciones humanas están constantemente expuestas principalmente a través de la dieta, el fluoruro se sigue considerando como un elemento traza potencialmente tóxico (Grijalva-Haro et al., 2001).

El uso de compuestos de flúor puede ser de ayuda para prevenir algunos riesgos en la salud humana, siempre y cuando se utilice en concentraciones moderadas. El principal ejemplo es el uso de estos compuestos para prevenir la caries dental, lo cual se logra agregando diversos compuestos que contienen flúor (como son fluoruro de sodio, ácido fluorosilícico y fluorosilicato de sodio) a productos para la profilaxis dental. El fluoruro de sodio es un compuesto que se disuelve fácilmente en el agua y es a menudo añadido a las fuentes de agua potable en pequeñas cantidades (aproximadamente 1 mg/L) y a una variedad de productos como son pastas de dientes y enjuagues bucales con el fin de prevenir la caries, ya que inhibe algunas enzimas

esenciales que participan en la glucólisis bacteriana, impidiendo la proliferación bacteriana causante de ese padecimiento (Adamek et al., 2005). Por otro lado, los iones fluoruro (F⁻) del NaF sustituyen parte de los iones OH⁻ durante el proceso de remineralización del esmalte. Como el F⁻ es una base más débil que el OH⁻, el esmalte modificado, llamado fluorapatita, es más resistente a los ácidos orgánicos generados por el metabolismo bacteriano (Chang, 1997). En los años 1960s, incluso se recomendaba el uso de fluoruro para combatir la osteoporosis, ya que se especulaba que estimulaba la actividad de los osteoblastos para mejorar las características fisicoquímicas del hueso. Esta hipótesis no fue confirmada y actualmente el uso terapéutico de compuestos de flúor para este tipo de padecimientos ya no es recomendado e incluso ha sido refutado (Adamek et al., 2005).

En algunos países se agrega fluoruro incluso a la sal de mesa, colocando a la dieta como principal fuente de exposición a fluoruro. Es interesante mencionar que la creciente utilización de compuestos que contienen F⁻, como son productos en plantas industriales, fertilizantes, esmaltado del aluminio, barnices, fundiciones, vidrio, refinerías de petróleo, hidrocarburos fluorados, entre otros, aumentan significativamente la proporción de fluoruro presente en el cuerpo humano (Rivera et al., 1993). Existen más de 25 compuestos fluorados que se utilizan para cultivo de frutas y hortalizas, algunos como la criolita contienen hasta 50% de fluoruro.

a) El fluoruro como contaminante ambiental.

La presencia de niveles endémicos elevados de fluoruro afecta a algunas poblaciones de varios países en el mundo. Las afecciones derivadas de la fluorosis se observan principalmente en poblaciones que se ubican en áreas geográficas con alto contenido natural de fluoruro en el agua de consumo humano, como ciertos lugares de la India (20 ppm), Sudáfrica (58 ppm), República Checa (28 ppm), Portugal (23 ppm), Estados Unidos (16 ppm) y Australia (13 ppm) (Rivera et al., 1993).

En México son varias las zonas afectadas por la fluorosis endémica, por lo que es importante identificar los riesgos que existen para las poblaciones que habitan en esos lugares. La concentración máxima de fluoruros en el agua potable que permite la normatividad mexicana es de 1.5 mg/L (Secretaría de Salud, 1996), pero los niveles de fluoruro en ciertos estados del territorio nacional pueden alcanzar magnitudes de hasta 20 mg/L, y en algunos de esos lugares las condiciones climáticas suelen ser calurosas, propiciando el consumo de mayores cantidades de agua o bebidas contaminadas, lo que aumenta el riesgo de exposición.

En el caso específico de México, los principales estados donde el agua potable tiene un exceso de F⁻ son: Aguascalientes, Chihuahua, Durango, Sonora, Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí (Hurtado-Jiménez y Gardea-Torresdey, 2005).



La contaminación de los acuíferos se debe tanto a condiciones naturales como a la actividad del hombre. México ha sido un productor importante de fluoroaspar, siendo San Luis Potosí y Coahuila los estados con mayor presencia del mineral. La presencia de fluoruro en el subsuelo en varias zonas de México es una evidencia directa de la vía de contaminación del agua por la presencia geogénica del fluoruro (Díaz-Barriga et al., 1997).

El agua potable es la principal fuente de fluoruro en México, pero la sal, algunas bebidas fluoradas, comida y productos dentales son otras fuentes importantes de exposición. En 1991 comenzó el Programa Nacional de Fluoración de la sal, cuyo objetivo era disminuir la prevalencia de caries dental en la población mexicana. Existe un gran riesgo por el consumo de este tipo de sal en zonas donde existen niveles elevados de fluoruro endémico, ya que de manera general se considera que este tipo de sal no debiera ser distribuida en poblaciones donde el agua de consumo tiene concentraciones por arriba de 0.7 ppm de fluoruro, además, la falta de control de calidad en relación con la adición de fluoruro a la sal de mesa puede acarrear más problemas. La cantidad de fluoruro que se supone debe estar presente en la sal es de 250 ± 50 mg/kg. Sin embargo, en un estudio de 221 muestras se encontró una media de fluoruro de 48.7 mg/kg. En ese mismo reporte se encontró una muestra con una concentración de 475 mg/kg e incluso otras con mayor concentración, las cuales se reparten a la población y en sólo algunos marbetes se puede encontrar un aviso acerca del riesgo de consumir este tipo de sal en áreas con fluorosis endémica (Díaz-Barriga et al., 1997). La recomendación de ingestión total de fluoruros es de 1.5 a 2.5 mg/día para adultos y de 0.7 mg/día para niños. Esta cantidad es considerada como adecuada para prevenir tanto la caries como la fluorosis dental (Grijalva-Haro et al., 2001).

La sobreexplotación de mantos acuíferos que abastecen a varias ciudades en México ha tenido como consecuencia la necesidad de obtener agua

potable de pozos cada vez más profundos. Esto ha dado como resultado que la concentración de fluoruro aumente debido a la precipitación de este ión en las profundidades de las fuentes de suministro de agua que abastecen a la población. Algunas ciudades del país, como San Luis Potosí y Chihuahua, están ubicadas en zonas semidesérticas donde el agua de lluvia no es abundante, por lo que los habitantes de esta áreas mantienen el suministro de agua mediante pozos, que tienen concentraciones altas de fluoruro en forma natural (Loyola-Rodríguez et al., 2000).

Existen otras fuentes adicionales de exposición a fluoruro, como son el consumo de algunas bebidas embotelladas, ya sean refrescos o jugos de frutas, puesto que el agua que se usa para la elaboración de esas bebidas proviene ya sea de la red municipal, o bien, de pozos profundos que se localizan en las fábricas, y en muchas ocasiones no existe un control adecuado de sales.

En regiones con presencia de aguas termales también se han observado concentraciones elevadas de fluoruro. La región que forma el Cinturón Volcánico Trans-Mexicano se caracteriza por la termalidad de las aguas subterráneas, en las que están presentes varios elementos químicos potencialmente tóxicos como el arsénico y el fluoruro (Hurtado-Jiménez y Gardea-Torresdey, 2005).

1.3 Toxicocinetica del fluoruro

El hombre puede estar expuesto a fluoruro a través del aire, agua, comida y por el uso de productos dentales que contengan compuestos con flúor. El proceso de absorción ocurre a través de difusión pasiva y el fluoruro es absorbido principalmente en estómago e intestino. El mecanismo y la velocidad de absorción gástrica del fluoruro están relacionados con la acidez gástrica, pues el ácido fluorhídrico tiene un coeficiente de permeabilidad mayor que el ión fluoruro, aunque una pequeña cantidad puede ser absorbida en la cavidad oral (Whitford et al., 1982).

Una vez absorbido, el fluoruro es rápidamente distribuido por todo el organismo a través de la sangre. La velocidad está determinada por el flujo de sangre hacia los tejidos. El fluoruro presente en plasma no se encuentra unido a proteínas. Aproximadamente el 50% del fluoruro que ingresa al organismo es excretado en las 24 horas siguientes.

Después de la ingestión de fluoruro, la concentración de este compuesto aumentará transitoriamente durante las 2 a 3 horas siguientes, retornando a los niveles basales, por efecto simultáneo de la excreción urinaria y el secuestro por el esqueleto, donde se encuentra más del 99% del fluoruro corporal en forma de fluorapatita, dependiendo entonces su movilización del recambio óseo. Aunque no se ha determinado el límite de la capacidad del esqueleto de acumular fluoruro, la saturación teórica o reemplazo de toda la hidroxapatita por fluorapatita se estima en 35,000 ppm, valores que nunca se han encontrado. En obreros que laboran en la fabricación de plaguicidas expuestos crónicamente a criolita, un herbicida a base de fluoruro y aluminio, se han cuantificado concentraciones óseas del orden de 6,000 – 7,000 ppm (Puche y Rigalli 2007).

La principal vía de eliminación de fluoruro ingerido es a través de la orina, donde se encuentra un 50 a 70%, y esta excreción se encuentra influenciada por diversos factores incluyendo el índice de filtrado glomerular, el flujo y el pH urinario. La presencia de fluoruro en heces (5-10 %) es considerada la cantidad que no fue absorbida por el organismo (Whitford, 1994).

A diferencia de las concentraciones de elementos como calcio o sodio en plasma, la concentración de fluoruro no está regulada metabólicamente. El fluoruro no genera ningún metabolito.

La cantidad de fluoruro en las personas en ayunas depende de su edad y la ingestión de fluoruro con la que su organismo está en equilibrio. En adultos expuestos durante toda su vida al fluoruro, la fluo-

remia basal puede ser relativamente elevada porque el fluoruro del esqueleto está permanentemente en intercambio con el líquido extracelular.

La “dosis tóxica probable” de fluoruro para los seres humanos, deducida de una serie de accidentes e intentos de suicidio es de 5 mg/kg, igual a 100 veces la ingestión espontánea diaria y 10 veces la dosis terapéutica habitual (15 – 30 mg de fluoruro por día) (Puche y Rigalli 2007). La dosis letal de fluoruro es de 30 - 50 mg/kg (NRC, 2006).

1.4 Mecanismos de acción del fluoruro

a) Inhibición de enzimas.

El ión fluoruro interactúa con una gran variedad de procesos celulares. El efecto tóxico de los iones de F⁻ se asocia principalmente con la inhibición de enzimas esenciales para la eficiencia de las vías metabólicas en el organismo. Esta inhibición puede ser provocada por la unión de iones de F⁻ (o su forma protonada HF) con grupos funcionales de residuos aminoacídicos que rodean el centro activo de la enzima y forman puentes de hidrógeno adicionales con mayor fuerza o, por otro lado, por la unión directa de los iones a dominios cargados positivamente que pueden estar lejos del centro activo pero que al promover cambios conformacionales modifican la función de la proteína (Adamek et al., 2005).

El número y variedad de enzimas afectadas por el fluoruro es muy grande, estando entre las enzimas afectadas las oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

En el caso de enzimas participantes en el ciclo de Krebs, el fluoruro puede afectar la actividad de la isocitrato deshidrogenasa, aconitato hidratasa y succinato deshidrogenasa. Para las enzimas que participan en la vía glucolítica, como es el caso de la hexocinasa, piruvato cinasa y fosfopiruvato hidratasa, se reconoce que los iones F⁻ interactúan con Mn²⁺ y Mg²⁺, elementos necesarios para la actividad de dichas proteínas. Es interesante mencionar que como

resultado de la reducción de la actividad enzimática, puede esperarse una disminución del catabolismo de la glucosa, que estaría reflejado con una baja en la concentración de lactato y piruvato y la promoción de la aparición de condiciones de hiperglicemia (Adamek et al., 2005), situación que afecta negativamente el funcionamiento de las células β pancreáticas.

b) Estrés oxidante.

El estrés oxidante se define como un desbalance entre las moléculas pro-oxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras, que se encuentran dentro de la célula. Este fenómeno tiene varios efectos sobre las funciones celulares y por consiguiente sobre todo el organismo. Citando algunos ejemplos, encontramos algunas enfermedades como el Alzheimer y la Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2), e incluso se relaciona con el envejecimiento de los organismos.

Un efecto interesante del estrés oxidante es la inhibición de enzimas tales como las oxido-reductasas. Algunas de ellas contienen iones metálicos en su centro activo, como son Cu^{2+} , Fe^{3+} o ambos, que tienen gran afinidad por los iones de F⁻. Algunos casos de cuproproteínas que pierden actividad en presencia de fluoruro son la L-ascorbato oxidasa y óxido nítrico reductasa. En el caso de la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, se ha reportado en algunos estudios que la enzima puede ser inhibida y en otros casos activada por la presencia de iones de F⁻ (Adamek et al., 2005). La inhibición o inactivación de las moléculas encargadas de la defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ERO) genera una gran cantidad de problemas relacionados con el mal funcionamiento celular, como sería el caso de las células β pancreáticas, ya que éstas son muy susceptibles al daño por estrés oxidante, contribuyendo al desarrollo de patologías severas como la DMT2.

1.5 Efectos del fluoruro sobre la salud humana

Los fluoruros pueden ser benéficos o dañinos en los seres humanos, todo depende de la concentración de fluoruro a la que esté expuesto el organismo. Los efectos varían dependiendo de la vía de exposición y el sistema u órganos involucrados. El efecto más importante del fluoruro sobre la salud del ser humano se presenta si se tiene una exposición crónica por vía oral, como puede ser por el consumo de agua de bebida. Una vez absorbido, el fluoruro es rápidamente distribuido por todo el organismo a través de la sangre. Se ha encontrado que el fluoruro puede afectar al sistema esquelético, al sistema nervioso, al aparato digestivo y a otros órganos como son los riñones, el corazón y glándulas como la tiroides (Willems et al., 1972; ATSDR, 2003), además de relacionarse con problemas reproductivos (ATSDR, 2003). Uno de los efectos más conocidos es la toxicidad del fluoruro en tejidos duros como son huesos y dientes ya que cerca del 99% de fluoruro - en el organismo se acumula en tejidos duros. El fluoruro se deposita de manera primaria en el tejido de los huesos, el mecanismo de depósito se efectúa por intercambio de iones hidroxilo en el cristal de apatita (componente mineral de huesos) que son ocupados por iones fluoruro, que tiene igual carga, para formar fluoruro de apatita, que es menos soluble que la hidroxiapatita y, por tanto, tiende a permanecer indefinidamente donde se deposita (ATSDR, 2003). La estructura del fluoruro de apatita reduce la elasticidad de la matriz calcificada, lo que conlleva a la fragilidad en los huesos.

El mecanismo de inclusión del fluoruro en el mineral del esmalte dental es similar y depende de la concentración de fluoruro en contacto con el diente.

En cuanto a las concentraciones de fluoruro encontradas en tejidos blandos, Whitford (1994) encontró que es 10-50% menor en relación a la concentración plasmática. No obstante, la exposición a 25 ppm de fluoruro a través del agua de bebida

bebida durante 12 semanas en ratas ocasionó un incremento significativo en la concentración de F-, siendo de 11.8, 8.5, 7.5, 6.7 y 1.8 veces relativa a ratas control en testículos > cerebro > riñón > hígado > suero, respectivamente (Inkielewicz y Krechniak, 2003). Estos resultados muestran que la cantidad de F- que se puede encontrar en tejidos blandos es considerablemente mayor a la plasmática, y que existe organoespecificidad en la distribución de fluoruro.

En el caso de los dientes, la ingestión de concentraciones altas de fluoruro puede derivar en la aparición de manchas que van desde un color blanquecino hasta color café oscuro y, en casos graves, se observa la pérdida del esmalte dentario. Este efecto es conocido como fluorosis dental y es un problema endémico de salud pública ampliamente estudiado (Rivera et al., 1993; Díaz-Barriga et al., 1997; Loyola-Rodríguez et al., 1998, 2000; Hurtado-Jiménez; Gardea-Torresdey, 2005).

El contacto directo con altas concentraciones de fluoruro (>2 mM) puede causar daño de tejidos, provocar irritación y daño de las vías respiratorias, estómago y piel. A muy altas concentraciones (>100 mM), puede derivar en hipocalcemia al unirse al calcio sérico, además de tener efectos severos sobre el corazón al promover la tetanización, decremento en la contractilidad miocárdica, colapso cardiovascular y fibrilación ventricular, debido probablemente al desbalance de electrolitos que produce la intoxicación. También se han encontrado posibles relaciones con anomalías durante la gestación del bebé cuando se tiene una dosis que produce toxicidad en la madre (ATSDR, 2003). En general, las principales enfermedades ocasionadas por la ingestión prolongada de concentraciones elevadas de fluoruro incluyen: fluorosis dental, fluorosis esquelética, deformación de huesos, fracturas (principalmente de cadera), diversos tipos de cáncer en hueso y envejecimiento prematuro.

Debido a que la insulina es una de las hormonas más

importantes involucrada en la generación de energía para los organismos, ya que promueve que la glucosa pueda ser metabolizada, a continuación se ofrecen algunos antecedentes sobre este tema, ya que nuestro interés en el presente estudio está centrado en el metabolismo intermedio de carbohidratos.

1.6 La insulina

a) Síntesis y función de la insulina.

Una de las funciones que pueden tener ciertas proteínas es la de regular algunas actividades en células diana distribuidas en el organismo. Es por esta función que dichas proteínas son conocidas como hormonas, las cuales son producidas por células endócrinas. Estas hormonas son las encargadas de controlar el comportamiento del organismo como un todo y es por ello que regulan procesos relacionados con el metabolismo de nutrientes.

La insulina es una hormona secretada por las células β que viaja por el torrente sanguíneo y promueve la entrada de glucosa a las células mediante su unión al receptor de insulina, el cual se activa y desencadena eventos que incrementan el almacenaje de glucosa en las células. La insulina incrementa la entrada de glucosa mediante el aumento de transportadores de glucosa (GLUT) en la membrana celular. Estos transportadores están en continuo estado de cambio de ubicación pues pueden estar unidos a la membrana celular o encontrarse en el citoplasma. GLUT1 está presente en la mayoría de los tejidos, GLUT2 se encuentra principalmente en el intestino, en células β pancreáticas, riñón e hígado, GLUT3 se observa en neuronas e intestino, mientras que GLUT4 se encuentra en tejidos con respuesta a insulina, tales como corazón, tejido adiposo y músculo esquelético. GLUT5 se expresa en intestino, riñón, testículos, músculo esquelético, tejido adiposo y cerebro.

La insulina es una proteína compuesta por dos cadenas de aminoácidos llamadas A (de 21 aminoácidos) y B (de 30 aminoácidos), que están unidas por puentes disulfuro; un tercer puente del mismo tipo dentro de

la cadena A une los residuos 6 y 11 de la misma.

La síntesis de la insulina comienza con la transcripción del gen, que reside en el cromosoma 11 en el humano y en el ratón (*Mus musculus*) en los cromosomas 6 (insulina 1) y 7 (insulina 2), siendo este último homólogo con el del humano (Steiner et al., 1985), esto es relevante pues los experimentos se llevaron a cabo en células murinas, siendo el gen analizado el correspondiente a la insulina 2. En cuanto a la cantidad de mensajero de insulina que se encuentra en una célula β , se reporta que, en condiciones basales de glucosa y sin insulina estimulante, se pueden encontrar entre 40,000 y 50,000 moléculas, siendo 60 a 80 veces mayor esta cantidad que la de mRNA de β -actina. Al cultivar las células en condiciones fisiológicas, el contenido de mRNA de insulina es de 40,000-150,000 moléculas. Considerando que una célula típica contiene aproximadamente 360,000 moléculas de mRNA en el citoplasma, la cantidad de mensajeros de insulina correspondería a un 30% de todos los mRNA.

Antes de la traducción, dos intrones son separados del RNA mensajero, que codifica entonces una proteína de 110 aminoácidos de longitud. Este producto de la traducción primaria es llamado preproinsulina y no es activo pero contiene un péptido señal de 24 aminoácidos de longitud que es requerido por la proteína para poder atravesar la membrana del retículo endoplásmico (RE).

Una vez que la preproinsulina alcanza el RE, una proteasa corta el péptido señal para dar lugar a la proinsulina que consiste de tres dominios: una cadena B amino-terminal, una cadena A carboxi-terminal y un péptido de conexión denominado péptido C.

Dentro del RE, la proinsulina es expuesta a varias peptidasas específicas que remueven el péptido C y generan la forma madura y activa de la insulina. En el aparato de Golgi, la insulina y el péptido C son empacados en gránulos de secreción que se acumulan en el citoplasma de las células β y la entrada de glu-

cosa regula la exocitosis de estos gránulos.

b) La secreción de la insulina.

Debido a que la insulina tiene un papel central en el control metabólico del organismo, pues juega un papel importante en el mantenimiento de los niveles de glucosa en la sangre dentro de un rango fisiológico reducido, la regulación de su producción y liberación es un evento crítico. En sí, la insulina es una hormona que participa en el metabolismo de carbohidratos al favorecer la entrada de glucosa a las células. Es secretada únicamente en las células β del páncreas, agrupadas en los Islotes de Langerhans.

El aumento de los niveles de glucosa dentro de las células β desencadena la liberación de insulina (Fig. 2).

La glucosa es transportada dentro de la célula β por transportadores GLUT2. Una vez dentro, el primer paso en el metabolismo del carbohidrato es la fosforilación de la glucosa para producir glucosa-6-fosfato. Este paso es catalizado por la glucocinasa y es el paso que limita la tasa de velocidad de la glucólisis, además de atrapar de manera efectiva a la glucosa dentro de la célula.

Conforme el metabolismo de la glucosa continúa, se produce ATP en la mitocondria. El incremento de la relación ATP/ADP cierra los canales de potasio sensibles a ATP en la membrana de la célula β . Los iones de potasio (K^+) cargados positivamente son retenidos dentro de la célula produciendo que aumenten las cargas positivas que derivan en la despolarización de la célula, lo que lleva a que se abran los canales de calcio sensibles a voltaje permitiendo la entrada de iones de Ca^{2+} . El incremento del Ca^{2+} intracelular dispara la secreción de la insulina vía exocitosis (Dean et al., 2004).

Regulación de la secreción de insulina

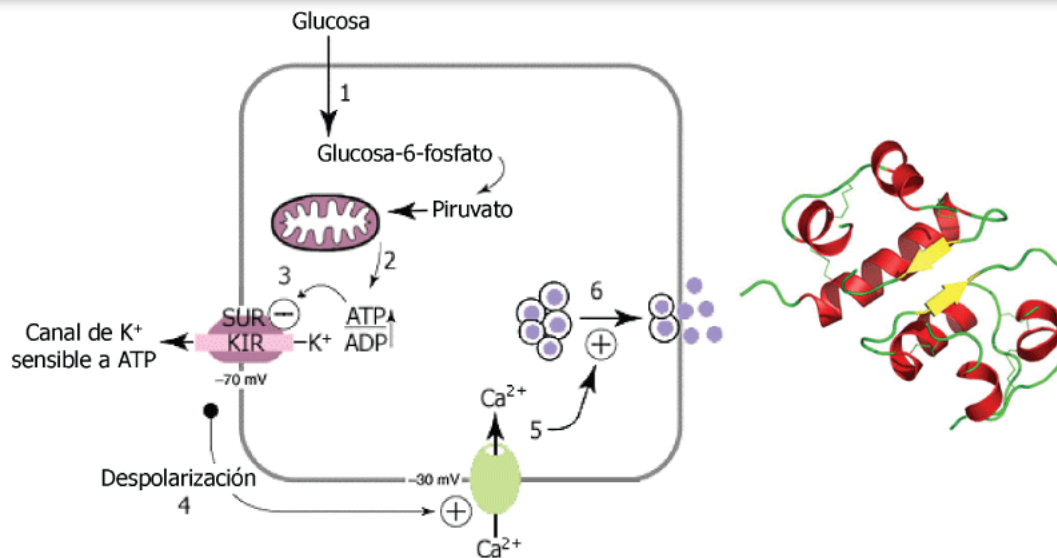


Fig. 2. Regulación de la secreción de insulina

La entrada de glucosa a las células β pancreáticas promueve la glucólisis y la posterior respiración dentro de la mitocondria, provocando el aumento de glucosa-6-fosfato y de la relación ATP/ADP. Lo anterior deriva en el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP reteniendo los iones de potasio dentro de la célula y provocando la despolarización de la membrana celular, que permite la apertura de canales iónicos de Ca^{2+} sensibles a voltaje. El aumento de estos iones dentro de la célula da lugar a la secreción de insulina. (Figura modificada de Dean et al., 2004). La imagen de la derecha es una representación esquemática de dos vistas de la molécula de insulina.

Existen dos fases de secreción de insulina en respuesta al aumento de glucosa: la primera consiste en una liberación inmediata de insulina. Ésta es atribuible a la secreción de la insulina preformada, que está almacenada en los gránulos de secreción. Después de poco tiempo, la segunda respuesta consiste en la secreción prolongada de insulina sintetizada de novo.

Esta segunda fase de secreción está regulada también por la presencia de Ca^{2+} intracelular. Como se mencionó antes, el metabolismo de la glucosa en la mitocondria y los productos derivados de dicha actividad derivan en el cierre de los canales $KATP^+$. La despolarización posterior de la membrana ($\Delta\psi$) promueve la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC), permitiendo la entrada de ese ión a la célula y estimulando así la secreción de insulina (Fig. 3).

Además de la modificación de la relación ATP/ADP,

el metabolismo de la glucosa genera otros factores acoplantes metabólicos (MCF) que actúan en la secreción, aunque estos factores están aún poco caracterizados.

La secreción de la insulina es regulada también por varias hormonas y neurotransmisores como epinefrina, galanina, somatostatina, acetilcolina, péptido pituitario activado por adenilato ciclasa o por el péptido similar a glucagon que se une a sus receptores conocidos.

La asociación de los receptores de dichas hormonas o factores con proteínas G heterodiméricas (G_s , G_i y G_x) activa la adenilato ciclasa (AC), controla los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y los canales $KATP^+$, o activa la fosfolipasa C (PLC). La activación de PLC genera inositol trifosfato (IP_3), con la subsecuente liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (ER), y diacilglicerol (DAG), un activador de la proteína

cinasa C (PKC). La estimulación de la proteína cinasa A (PKA) o de PKC, modifica enzimas generadoras de segundos mensajeros, canales iónicos y también tiene una influencia más directa sobre la secreción de la insulina (Lang et al., 1999). Las elevaciones de calcio citosólico se transmiten a la mitocondria, donde la señal es amplificada. El calcio se ha propuesto como un modulador de la función mitocondrial, con impacto directo en el metabolismo intermediario, oxidación de sustratos y producción de energía (Denton y col., 1990).

Una vez liberada, la insulina permanece activa por poco tiempo antes de ser degradada por la insulinas, enzima que se encuentra en el hígado y en los riñones y degrada la insulina circulante en el plasma. Como resultado, la insulina tiene una vida media de sólo seis minutos y esta corta duración de actividad permite cambios rápidos de los niveles de esta proteína en la sangre.

c) Estructura del gen que codifica a la insulina.

El gen de la insulina en el ser humano consiste de 1.7 kilopares de bases. Una región bastante conservada a 340 pares de bases en dirección 5' del sitio de iniciación de la transcripción del gen se denominada promotor y confiere tanto la expresión específica del tejido como la regulación metabólica del gen (Poitout et al., 2006). La restricción de la expresión del gen de la insulina a las células β pancreáticas radica en la interacción de los elementos del promotor con varios factores de transcripción tanto ubicuos como específicos del islote. Las interacciones con estos factores son las que aseguran una regulación precisa gracias a la sofisticada red transcripcional que forman (Melloul, 2001).

El gen se conforma de varias secuencias conocidas como cajas (Fig. 4). Las cajas E (E1 y E2) presentan una secuencia consenso CANNTG (donde N representa cualquier base) a la cual se unen factores de transcripción de la familia hélice-girohélice básicas (bHLH). Los elementos E1 y E2 son importantes para la expresión específica del tejido. La caja E1 es una secuencia donde se une un heterodímero que consiste de miembros de la familia bHLH de la clase A ubicua así como de clase B restringida a célula. Esta caja se une a EIF1 que está compuesto de proteínas como E12 y/o E47, interactuando también con la proteína bHLH restringida a célula NeuroD/BETA2 que es expresada en células pancreáticas y neuroendócrinas y es un regulador importante para el desarrollo del páncreas (Aronheim, 1991; Naya, 1997) y de la expresión del gen de la insulina. Sin embargo, a

Eventos en la secreción de la insulina

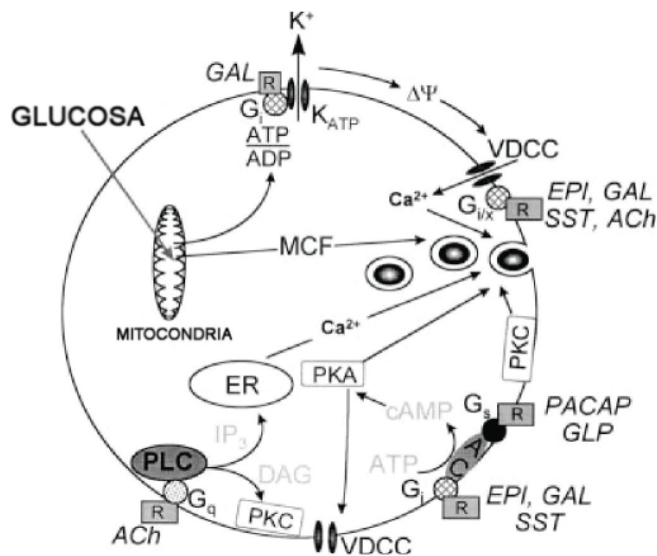


Fig. 3. Eventos en la secreción de la insulina.

La secreción de la insulina está regulada en dos fases: la primera consiste en una respuesta al aumento de glucosa en la sangre y se basa en la liberación inmediata de insulina almacenada en los gránulos de secreción. La segunda respuesta consiste en la secreción prolongada de insulina sintetizada de novo. La despolarización de la membrana celular y la posterior entrada de Ca²⁺ a la célula es uno de los puntos más importantes para la regulación de ambas respuestas. Epinefrina (EPI), galanina (GAL), somatostatina (SST), acetilcolina (ACh), péptido pituitario activado por adenilato ciclasa (PACAP), péptido similar a glucagon (GLP) (Figura tomada de Lang et al., 1999).

diferencia de otros organismos, el gen de insulina en humano no presenta la caja E2 y en su lugar se encuentra una secuencia a la que se une a la proteína conocida como factor estimulador de río arriba (USF) (Read, 1993).

Estructura del promotor del gen humano de insulina

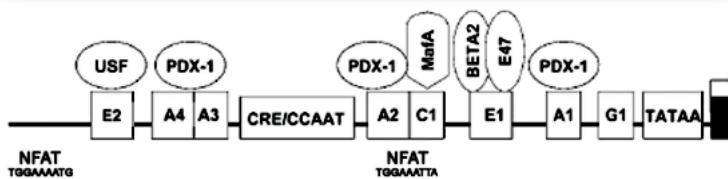


Figura 4. Estructura del promotor del gen humano de insulina.

Cada una de las cajas representa una secuencia reconocida ya sea por un factor de transcripción o por una polimerasa en el caso de la secuencia consenso TATAA (Figura modificada de Poitout et al. 2006).

Las cajas A (A1-A5) tienen secuencias ricas en AT, a las que se unen factores que pertenecen a la familia de proteínas que contienen un homeodominio. A las cajas más conservadas del promotor de la insulina, A1 y A3, se une el factor de transcripción conocido como homeocaja pancreática duodenal-1 o PDX-1 (Melloul, 2001), que es una proteína-homodominio que funcionalmente interactúa con proteínas de la familia bHLH (Peers, 1994).

d) Factores de transcripción que regulan al gen.

Entre los factores de transcripción se encuentran varios elementos cis conservados que probablemente son regulados por factores trans similares. Los factores determinantes para la expresión del gen son las cajas A y E y los elementos cis críticos en la activación transcripcional son los sitios A3, C1 y E1. Es de gran relevancia mencionar que los factores de transcripción que se unen a dichos sitios (PDX-1, MafA y B2/E47) son los principales elementos involucrados en la expresión del gen y ninguno de esos factores actúa de manera independiente, sino que la

interacción entre ellos es la que induce la activación de la transcripción de la insulina (Zhao, 2005). Otro punto interesante es que la cooperación entre PDX-1 y proteínas bHLH también involucra interacciones con otras proteínas de unión a DNA y coactivadores, formando una red única de interacciones proteína-proteína y proteína-DNA (Poitout et al., 2006).

PDX-1 es un factor de transcripción trans que se une a las cajas A. Este elemento se expresa en páncreas y duodeno y juega un papel crucial en el desarrollo del primero, ya que la delección de este factor deriva en la completa agénesis del órgano (Jonsson, 1994). Además, PDX-1 está involucrado en la diferenciación y regeneración de las células β y en el mantenimiento de la función normal de éstas mediante la regulación de varios genes.

Otra molécula importante en la regulación de la expresión del gen es el factor nuclear de células T activadas (NFAT), que es un factor de transcripción clave para el gen de la insulina en las células β , pues se une a dos distintos elementos NFAT dentro del promotor del gen y activa su transcripción. Este factor a su vez es activado por calcineurina o proteína fosfatasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina, en respuesta a elevaciones del calcio intracelular (Lawrence et al., 2001).

e) Regulación de la expresión del gen por la glucosa.

La regulación de la expresión de la insulina a corto plazo, como es el caso de la respuesta a la ingesta de comida, ocurre principalmente a nivel de exocitosis de la hormona almacenada en vesículas dentro del citoplasma de la célula. Sin embargo, el mantenimiento de un adecuado almacenamiento de insulina intracelular a largo plazo se basa en la regulación transcripcional y traduccional su biosíntesis (Poitout et al., 2006).

La glucosa es el nutriente regulador más importante para la función de la célula β , coordinando la expresión del gen de la insulina, así como su biosíntesis y

secreción. La glucosa regula todos los pasos de la expresión de la insulina, incluyendo la transcripción, splicing del pre-mRNA y la estabilidad del mRNA de la preproinsulina (Marshak et al., 2001; Poitout et al., 2006). Dicha estabilidad parece depender de la glucosa para regular la unión de una secuencia rica en pirimidinas del mRNA con una proteína de unión a polipirimidinas que protege al mRNA de ser degradado (Tillmar, 2002).

Se ha encontrado también que la glucosa puede regular positivamente (en corto y mediano plazo de exposición) o negativamente (exposición crónica) la expresión del gen de insulina. Los efectos tempranos de la glucosa son promover la traducción del mRNA de proinsulina preexistente, mientras que los tardíos favorecen la producción de nuevo mRNA de proinsulina (Melloul, 2001). Los elementos de transcripción que responden en mayor medida al estímulo de glucosa son A3, E1 y C1. Es también la glucosa quien promueve la unión de PDX-1 al sitio A3 (Melloul et al., 1993) y potencia la trans-activación de este factor de transcripción (Petersen et al., 1994). Aunque los mecanismos de señal de la transducción por los cuales la glucosa incrementa la unión de PDX-1 al promotor de la insulina han sido ampliamente estudiados, todavía permanecen en controversia. En cuanto a MafA y B2/E47, todavía no se conoce muy bien cómo se regulan, pero sí se sabe que en el caso de MafA, el efector de la expresión como de su unión al promotor del gen de la insulina es la glucosa (Sharma y Stein 1994).

La tasa de transcripción del gen de la insulina en las células β pancreáticas está regulada por una compleja integración de señales derivadas de nutrientes, hormonas y neurotransmisores, mas el Ca^{2+} intracelular parece ser un mediador importante de este proceso. Uno de los puntos de sinergismo de estas señales, específicamente entre la glucosa y las hormonas péptido insulínotropo dependiente de glucosa (GIP) y péptido similar a glucagón 1 (GLP-1), es NFAT.

f) Desregulación del gen.

Uno de los puntos de mayor interés para el presente estudio está relacionado con la disfunción del gen de la insulina, situación bastante estudiada en casos de DMT2 y que se presenta al exponer a las células β a concentraciones elevadas de glucosa (ej. 30 mM). En este caso ocurre el efecto denominado glucotoxicidad que afecta la supervivencia de la célula, impide la secreción de insulina e inhibe la expresión genética, siendo el estrés oxidante producido por la hiperglucemia la explicación más aceptada para estos efectos (Kajimoto y Kaneto, 2004; Kaneto et al., 2005; Melloul, 2001; Poitout et al., 2006; Robertson, 2004; Robertson et al., 1992;).

La glucotoxicidad se asocia con la disminución de la actividad de unión de PDX-1 y MafA (Robertson et al., 2000). El decremento de la actividad de unión de PDX-1 parece involucrar un control post-transcripcional (Olson et al., 1995), aunque el mecanismo preciso todavía no ha sido bien establecido.

En un estudio reciente (Harmon et al., 2005) se mostró que la reducción de la actividad de MafA en células glucotóxicas se debe a la pérdida de la expresión de la proteína, sin observar cambios en la expresión del mRNA, sugiriendo esto que la glucosa reduce la actividad de MafA de un modo post-traduccional.

En otro estudio, Lawrence et al. (2005) propusieron que CEBP/ β impide en condiciones de hiperglucemia que MafA se una a la secuencia que reconoce en el promotor, derivando esto en el impedimento de la inducción cooperativa de la transcripción por parte de MafA y B2.

En condiciones de hiperglucemia se generan ERO en varios tejidos del organismo, generando diversas complicaciones. En cuanto a las células β , éstas son altamente sensibles a los efectos del estrés oxidante por dos razones: la abundante expresión del transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2) que promueve una alta eficiencia de entrada de glucosa a la célula incluso en concentraciones elevadas de dicho carbohidrato en el medio, y en segundo lugar, la expresión relativamente baja de enzimas antioxidantes

como la catalasa y la glutatión peroxidasa (Tiedge et al., 1997), llevando a que las células β pancreáticas sean blancas sensibles a las ERO.

Kajimoto y Kaneto (2004) encontraron que la posible causa de la reducción en la actividad del promotor de la insulina al exponerse a estrés oxidante es la considerable baja de la actividad de unión al DNA por PDX-1.

Otro punto importante relacionado con la regulación del gen es el desbalance en los niveles de Ca^{2+} intracelular producido por efecto del fluoruro, que puede promover que la actividad de NFAT se vea afectada.

1.7 Efecto del fluoruro sobre la secreción de la insulina

Uno de los temas poco tratados en cuanto a los efectos causados por la exposición a fluoruro es su posible efecto sobre la actividad de células pancreáticas. Los estudios que se han realizado al respecto de este tema se enfocan en conocer los cambios en la secreción de la insulina (Komatsu et al., 1995; Menoyo et al., 2005; Rigalli et al., 1990); sin embargo, los resultados obtenidos han sido contradictorios. Komatsu et al., (1995), informa que la exposición a NaF en concentraciones milimolares (5 a 15mM) estimula la exocitosis de la insulina en células β de la línea RINm5F, mientras que Rigalli et al. (1990) y Menoyo et al. (2005) encontraron que en islotes de Langerhans aislados y perfundidos con soluciones de NaF en concentraciones micromolares (5 a 20 μ M) inhiben la secreción de la hormona.

La fluorosis endémica es un problema de salud pública que se observa claramente en varias zonas de México, especialmente en el norte del país, y que afecta aproximadamente a 20 millones de personas. El fluoruro en altas concentraciones tiene efectos adversos sobre la salud. Entre estos, a nivel celular, encontramos variaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular y la inhibición de enzimas que contrarrestan el daño por estrés oxidante, provocando un aumento de ERO, que afectan varias funciones celulares, entre ellas la expresión génica.

Las células β pancreáticas, encargadas de la síntesis y secreción de la insulina, son altamente susceptibles a los efectos del estrés oxidante. Por lo tanto, es importante conocer el efecto que tiene el fluoruro sobre la expresión del gen y la secreción de la insulina en células β pancreáticas, ya que de esta hormona depende el mantenimiento de niveles adecuados de glucosa en la sangre, situación fundamental para el correcto funcionamiento del organismo.

Objetivo general

Evaluar si la exposición a fluoruro en concentraciones micro y milimolares modifica la expresión del gen de la insulina en células β pancreáticas murinas y conocer su relación con la secreción de insulina.

Objetivos particulares

- a) Evaluar la citotoxicidad del NaF en células β pancreáticas murinas.
- b) Evaluar la expresión del gen de insulina en función de la concentración y del tiempo de exposición a fluoruro.
- c) Comparar la secreción de la insulina con la expresión del gen.

Considerando que la expresión del gen de la insulina depende de la adecuada actividad de sus factores de transcripción, como son PDX-1, MafA, neuroB2 y NFAT, y que el fluoruro puede promover la disminución en la actividad de dichos factores debido al aumento de ERO y a la variación de Ca^{2+} intracelular, al exponer células β pancreáticas murinas a tratamientos con fluoruro, la expresión del gen de la insulina disminuirá al aumentar la concentración y el tiempo de exposición.

5.1 Línea celular

Los experimentos de este proyecto fueron llevados a cabo en células de ratón β TC6 (ATCC, No. CRL-11506, Manassas, VA) cultivadas en botellas de cultivo de 75 cm² con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 15 % de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 U/ml) y estreptomocina (100 μ g/ml: todo este material fue adquirido de GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA).

Esta línea celular fue desarrollada por Efrat et al. (1988) gracias a la capacidad de promover la expresión de oncogenes en células de ratones transgénicos mediante el uso de elementos regulatorios específicos para ciertas células, lo cual permite la inmortalización de tipos raros de células. Las líneas celulares β TC (beta tumor cell) se obtuvieron de tumores de ratones transgénicos que expresaban el antígeno T del virus 40 de simio (SV40). La línea β TC6 fue caracterizada por Poitout et al. (1995). Los análisis morfológicos por microscopía confocal mostraron que contenían principalmente insulina, pequeñas cantidades de glucagón y del factor que inhibe la liberación de somatotropina (SRIF), siendo la cantidad de insulina mayor que en otras líneas celulares como RIN y HIT.

Los estudios realizados en estas células demostraron que dentro de los pases 30-45, estas células secretan insulina en respuesta al estímulo de glucosa y que la secreción de insulina es marcadamente potenciada por isobutil metilxantina (IBMX). En incubación estática, la máxima estimulación de insulina se obtuvo en concentraciones de glucosa >2.8 mmol/L y la estimulación media máxima se observó en 0.5 mmol/L. Es importante mencionar que la máxima estimulación es cuatro veces más grande que en células HIT-T15 en los pases en que fueron caracterizadas, 72-81.

Las células β TC6 son una línea celular que responde a estímulos de glucosa y donde la exocitosis de insulina es fisiológicamente regulada por EPI y SRIF mediante un mecanismo regulado por las

proteínas Gi alpha 2, Gi alpha 3 y Go alpha 2.

Debido a que el uso de cultivos primarios de células β para la realización de estudios se ha visto limitada por la dificultad de aislar los islotes de Langerhans, por su incapacidad de crecer en cultivo y por la limitada duración de su viabilidad in vitro, el desarrollo de líneas celulares secretoras de insulina provee de una ilimitada y siempre disponible fuente de tejido para la investigación, siendo interesante mencionar que las líneas celulares que conservan la capacidad de liberar insulina en respuesta a glucosa han mostrado una expresión predominante del transportador de glucosa GLUT2.

Las características mencionadas de la línea β TC6, permiten que estas células representen una herramienta muy útil para estudios de regulación de células β así como de expresión de genes en ellas.

5.2 Viabilidad celular

Para medir la viabilidad celular se expusieron 5x10⁶ células a una concentración de fluoruro de sodio determinada que fue agregada al medio de cultivo DMEM. Se definieron nueve concentraciones de F- por experimento (6.8 μ M, 45 μ M, 1.35 mM, 2.26 mM, 4.5 mM, 7 mM, 9 mM, 13.5 mM y 22.5 mM). Se utilizaron cajas de cultivo de 12 pozos.

Después de 12 horas de cultivo con el medio al cual se le agregó NaF, se retiró ese medio y se estabilizaron las células con buffer Krebs-Ringer sin glucosa durante 30 minutos. Una vez pasado este tiempo se retiró el buffer sin glucosa y se agregó nuevo buffer con glucosa estimuladora (16.6 mM) y se dejó incubar por una hora. Posteriormente se tripsinizaron las células y se lavaron con solución buffer de fosfatos (PBS). Después de centrifugar la muestra se obtuvo un pellet celular que fue resuspendido en 300 μ l de PBS. Se agregó 1 μ g/ml de 7-AAD, incubando posteriormente por 10 minutos a temperatura ambiente, para finalmente

contabilizar el número de células muertas por citometría de flujo (FACSCalibur system, Becton Dickinson; San José, CA.). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

El marcador no vital de DNA 7-AAD es un intercalante de bases G-C específico que puede ser excitado por un laser de argón a 488 nm y emite en el rango del rojo lejano del espectro. La emisión espectral de 7-AAD puede ser separada fácilmente de las emisiones tanto de FITC y PE, siendo los resultados obtenidos muy similares a los logrados por PI. El marcador 7-AAD forma complejos muy estables con el DNA. Su muy alta constante de unión y baja tasa de disociación permite el uso de este marcador no vital de DNA en bajas concentraciones, lo cual reduce la cantidad de marcador no unido libre que pudiera unirse pasivamente a la superficie de células vivas y derivara eventualmente en la tinción de éstas (Schmid et al., 1992).

5.3 Expresión del gen de la insulina

Para evaluar la expresión del gen de la insulina, se sembraron 1×10^6 células por pozo incubando durante un día para permitir su adhesión a la placa de cultivo. Para la evaluación de cada una de las concentraciones de estudio (cero, 0.007, 0.045, 0.181, 1.35 y 2.25 mM de F-), se adicionó 800 μ l de la solución correspondiente de NaF al medio DMEM. Se evaluaron diferentes tiempos de exposición (0, 2, 4, 8, y 12 horas), extrayendo el RNA total de las seis concentraciones (cero – 2.25 mM).

Una vez concluido el tiempo de exposición se extrajo el medio de cultivo y se aisló el RNA total. Para lograr esto se utilizó la técnica de TRIzol (Invitrogen). Las células se lisaron directamente en la placa de cultivo al agregar 500 μ l de TRIzol por pozo, dejando actuar por 5 minutos y colocando el lisado celular en tubos de 1.5 ml. Se añadieron 100 μ l de cloroformo y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron en frío (4°C) a 12,000 rpm para obtener tres fases, de las cuales la superior, que contenía el RNA, se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml. Para precipitar el RNA se agregó alcohol isopropílico y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugar a 12,000

rpm en frío, desechando posteriormente el sobrenadante formado. Finalmente, se añadieron 500 μ l de alcohol etílico al 75% para lavar el pellet obtenido y se centrifugó igualmente en frío una última vez a 8,000 rpm. El RNA fue resuspendido en 20 μ l de agua destilada estéril. Tanto el material como el agua estéril utilizada durante la extracción fueron tratados con DEPC.

La cuantificación y medición de la pureza de cada uno de los RNAs extraídos se analizó por espectrofotometría (Eppendorf BioPhotometer, Hamburg, Alemania). Se usaron 500 ng de RNA para realizar el RT-PCR y obtener el cDNA necesario para realizar la amplificación por PCR. El primer paso de la técnica consistió en reacciones que contenían 0.5 μ l de random primers (Invitrogen), 500 ng de RNA total, 1 μ l de dNTP Mix (Invitrogen) y agua destilada estéril para completar 12 μ l. La mezcla se calentó a 65 °C por 5 minutos y después se colocó en hielo. Una vez hecho esto se agregaron 4 μ l de 5X First-Strand Buffer (Invitrogen) y 2 μ l de 0.1M DTT. Se incubó nuevamente por 2 minutos a 25 °C y finalmente se añadió 0.2 μ l de SuperScript™ II RT y agua destilada estéril para completar 20 μ l de reacción. Se dejó incubar a 42 °C por 50 minutos. Las reacciones se realizaron utilizando un termociclador Touchgene Gradient FTGRAD2D (Techne Duxfort, Cambridge, UK.).

Una vez obtenido el cDNA, se llevó a cabo la PCR usando oligonucleótidos para el gen de insulina 2 de *Mus musculus* (Acceso en Genbank: NM_008387), la secuencia de los oligonucleótidos fue la siguiente: (forward) 5' CAG GAA GCC TAT CTT CCA GGT T y (reverse) 5' GCA GTA GTT CTC CAG CTG GTA G, los cuales fueron sintetizados por Invitrogen.

Como gen control se utilizó el del 18s RNA ribosomal. Los oligonucleótidos utilizados se encontraron reportados en la literatura (Vega-López et al., 2007), cuyas secuencias son: VTG-forward 5' AAR ACC TAT GTG TAC AAG TAT GAG G y VTG-reverse 5' GTC TTC TTG AKG TTR AGC TG (K= G/T y R= A/G). Los oligonucleótidos fueron resuspendidos en agua

inyectable a una concentración de 100 pM.

Las reacciones de PCR, de 25 μ l, se llevaron a cabo en un equipo Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, USA) y contenían 1 μ l de cDNA, 2.5 μ l de PCR Buffer, 0.2 mM de dNTP Mix, 1 μ l de Taq polimerasa, 1.5 mM de MgCl₂ y 0.5 μ l de cada oligonucleótido (todos los reactivos fueron adquiridos en Invitrogen). Las condiciones del PCR fueron las siguientes: 94 oC por dos minutos, 35 ciclos de 94 oC, 55 oC y 72 oC, cada uno por 30 segundos, y una extensión final de 5 minutos a 72 oC. Los resultados del PCR (3 μ l de reacción) se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Cada experimento, consistente en la exposición a cada una de las cinco concentraciones de fluoruro y el control, a diferentes tiempos, se llevó a cabo por triplicado en experimentos independientes.

Los geles se fotografiaron después de una hora de electroforesis a 100 V y las imágenes se analizaron con el software para densitometrías Image J (NIH, USA).

5.4 Cuantificación de la secreción de insulina

Una vez determinada la expresión del gen y de observar cambios en la cantidad de mRNA después de 12 horas de exposición, se determinó la cantidad de insulina secretada por las células con las mismas concentraciones y al mismo tiempo de exposición.

Las células (1x10⁶ células) se sembraron en placas de cultivo de 12 pozos y se dejaron 24 horas para permitir su adhesión a la placa. Después de este periodo, las células se expusieron por 12 horas a las diferentes concentraciones de F- (cero, 0.007, 0.045, 0.180, 1.35 y 2.26 mM) y posteriormente se lavaron con PBS 1X y se mantuvieron en buffer de Krebs-Ringer (KRB) sin glucosa por 30 minutos. Después de este periodo, las células se estimularon con glucosa (2.8 mM ó 16.6 mM) en buffer KRB.

Inmediatamente después de haber estimulado a las células con las diferentes concentraciones de glucosa, se tomaron muestras del buffer KRB a diferentes tiempos durante 30 minutos (0, 2, 5, 8, 12, 15, 18, 21, 30 minutos) para registrar la secreción de insulina en los diferentes esquemas de exposición a F-. Cada una de las muestras

obtenidas en los periodos de tiempo antes mencionados fue centrifugada para remover los restos celulares que pudieran haberse despegado y posteriormente medir las concentraciones de insulina.

Para evaluar la concentración de insulina se utilizó el kit Ultrasensitive Insulin ELISA (Mercodia, Uppsala; Suecia), el cual consiste en un inmunoensayo de fase sólida de dos puntos basado en la técnica de sándwich directo. El protocolo utilizado fue el especificado por el fabricante. Para establecer la curva estándar de insulina, se colocaron en un pozo de microtitulación cubierto con anticuerpo anti-insulina, 10 μ l del Estándar de insulina y 50 μ l de Solución conjugada, mientras que para el ensayo se utilizaron 5 μ L de las muestras, las cuales se adicionaron a la placa de ELISA, añadiendo 200 μ L del conjugado de la enzima e incubando por 2 horas a temperatura ambiente, durante este tiempo la insulina presente en la muestra reacciona con el anticuerpo anti-insulina acoplado a la peroxidasa y con el anticuerpo anti-insulina unido a la placa. Una vez terminado el periodo de incubación, la placa se lava para remover los restos del anticuerpo marcado que no se hayan unido y el complejo es detectado por la reacción con el 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, finalmente la reacción se detiene por adición de 50 μ l ácido sulfúrico (0.5M) para dar una coloración amarilla que es el punto final de la reacción, que se midió a 450 nm en un lector de microplacas Spectra max plus 384 (MDS Analytical Technologies, CA., USA).

Para determinar la cantidad de insulina secretada, se analizó el área bajo la curva de los valores obtenidos por espectrofotometría durante los 30 minutos de estímulo de glucosa. Para conocer si la disminución de la secreción de insulina se relacionaba con el aumento en la cantidad de F- utilizado en los tratamientos, se aplicó la prueba de Tendencia de Levene, con el fin de comparar la relación con la dosis de exposición a fluoruro.

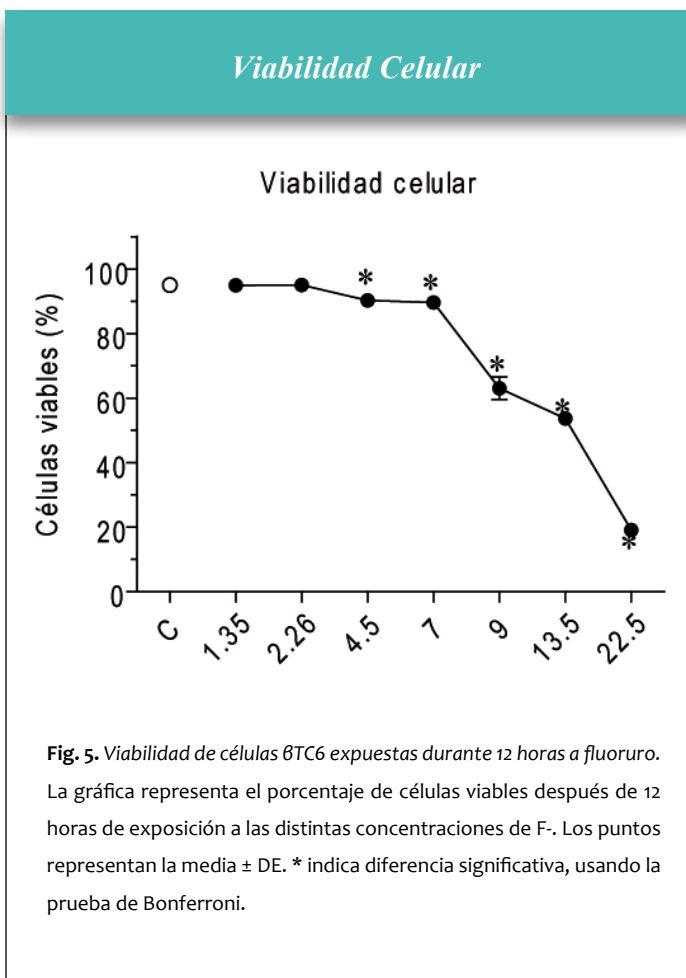
5.5 Análisis estadístico

Para el análisis de resultados se utilizó el software Stata 8.0 (Stata, Corp. College Station Tx). Se realizó estadística descriptiva para analizar los resultados de todos los experimentos. Para evaluar la diferencia entre los grupos de tratamiento se realizó el análisis de varianza (ANOVA) usando como prueba post-hoc la prueba de Bonferroni, tomando como valores significativos $p < 0.05$.

obtenidas en los periodos de tiempo antes mencionados fue centrifugada para remover los restos celulares que pudieran haberse despegado y posteriormente medir las concentraciones de insulina.

6.1 Viabilidad celular

Los resultados obtenidos por citometría de flujo mostraron que a concentraciones de 4.5, 7, 9, 13.5 y 22.5 mM de F⁻ durante 12 horas de exposición, la viabilidad de las células β TC6 se vio altamente comprometida ya que aumentó considerablemente la proporción del número de células no viables. En la Fig. 5 se muestra el efecto de la citotoxicidad del fluoruro a distintas concentraciones. En el caso de concentraciones de hasta 1.35 mM, la viabilidad fue mayor a 95% (datos no mostrados). La exposición de células a la concentración de 4.5 mM de F⁻ disminuyó la viabilidad celular aproximadamente en un 30% y la exposición a una concentración de 9 mM derivó en más del 60% de células muertas. El número de células viables fue mayor al 90% hasta concentraciones no mayores a 2.26 mM.



Es por esta razón que los experimentos subsiguientes a este, tanto el de expresión del gen como de secreción de insulina se realizaron utilizando concentraciones menores a 2.26 mM de F⁻.

6.2 Expresión del gen de la insulina

Los resultados obtenidos en este experimento mostraron que existe un efecto dosis y tiempo dependiente del fluoruro sobre la expresión del gen de la insulina. Conforme aumentó la concentración de F⁻, la cantidad de mRNA de insulina fue disminuyendo, de manera similar a lo que ocurrió al aumentar el tiempo de exposición al tratamiento con NaF. En las figuras 6a, b y c se muestra la expresión a tres diferentes tiempos de exposición. Después de 8 horas de exposición a fluoruro, se observó una disminución marginal en la expresión del gen en los tratamientos con mayor cantidad de F⁻, ya que en el caso de las concentraciones de 1.35 mM de F⁻ la expresión se redujo al 78% y en el tratamiento con 2.25 mM de F⁻, la expresión se vio reducida en un 37% con respecto del control, aunque sin diferencia significativa. Sin embargo, a las 12 horas de exposición a las diversas concentraciones antes mencionadas de F⁻, la expresión del gen se vio reducida a 33 y 41% con respecto del control, en los casos de las mayores concentraciones (1.35 y 2.26 mM de F⁻, respectivamente), mientras que para las concentraciones restantes (0.007, 0.045 y 0.181 mM) la expresión se mantuvo entre el 87 y 71%, sin mostrar diferencia significativa con respecto del control.

Expresión del gen de la insulina

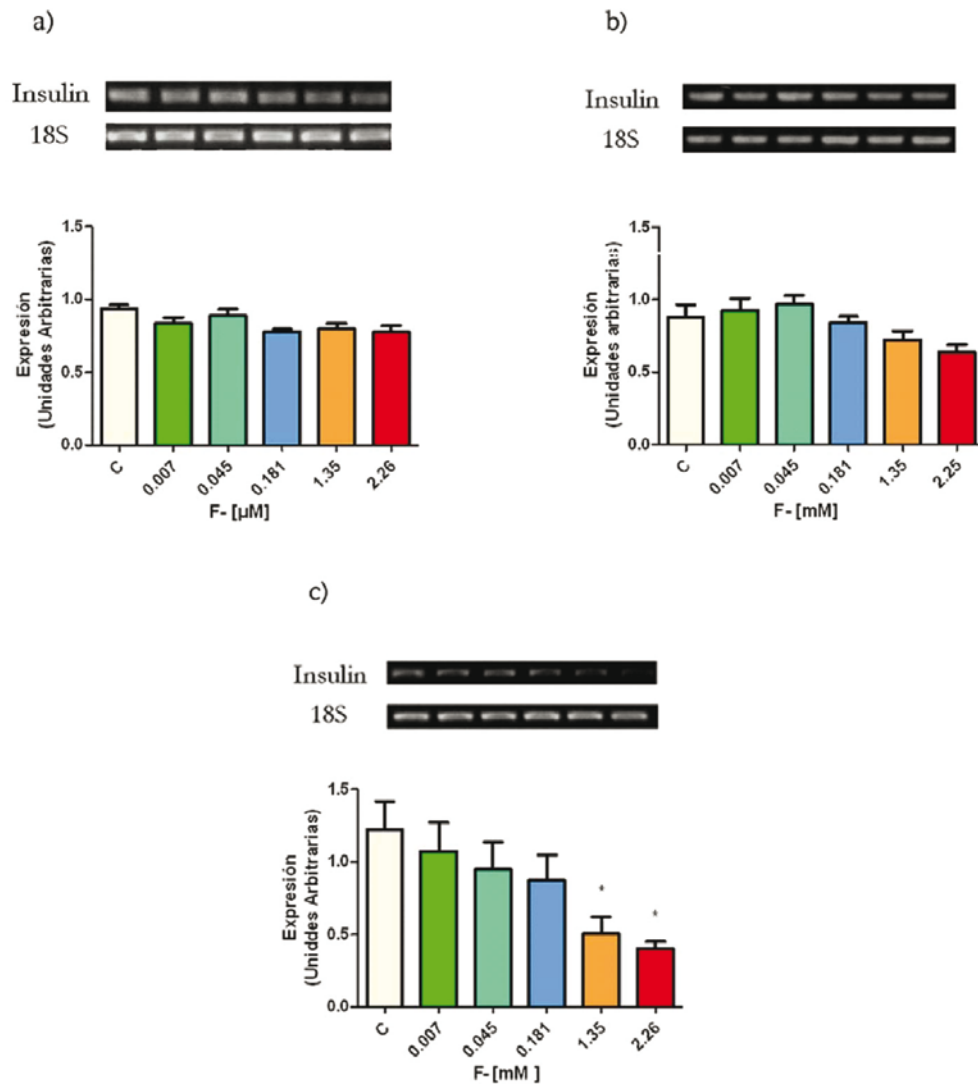


Fig. 6. Expresión del gen de insulina (Relación mRNA/18S)

a) Expresión en el tiempo cero del gen de insulina en células β TC6.

b) Expresión después de 8 horas de exposición a F-.

c) Expresión después de 12 horas de exposición con F-

Las columnas representan la media \pm DE. * indica diferencia significativa con respecto del control, usando la prueba de Bonferroni

d) Prueba de integridad del RNA

6.3 Cuantificación de la secreción de insulina

El análisis de secreción de insulina mostró que las células β TC6 expuestas durante 12 horas a las distintas concentraciones de F^- , al ser estimuladas con glucosa 16.6 mM, mostraron una tendencia significativa hacia la disminución de la secreción de insulina en relación dosis-respuesta (Fig. 7), puesto que a mayor concentración de F^- , se observó una disminución superior en la cantidad de insulina, siendo de 11 y 19% para las concentraciones de fluoruro de 1.35 y 2.26 mM, respectivamente.

La secreción de insulina no se vio afectada al estimular las células con concentraciones de glucosa basal (2.26 mM), encontrando en los tratamientos cantidades de insulina similares al control, por lo que los resultados no se muestran.

Secreción de insulina después de 12 h de exposición a F^- .

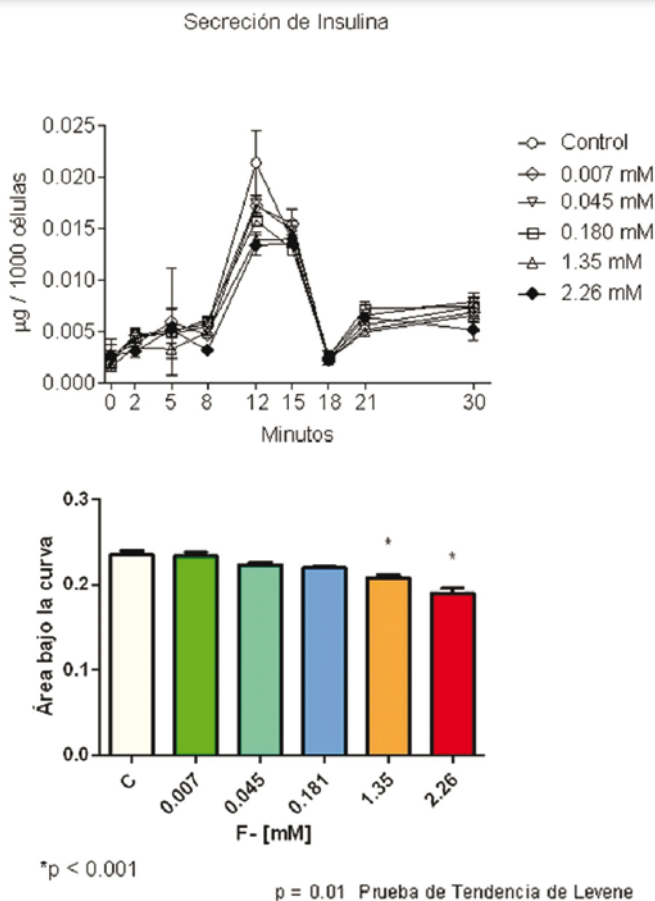


Fig. 7. Secreción de insulina después de 12 h de exposición a F^- .

a) Secreción de insulina cuantificada en muestras de buffer KR con glucosa estimuladora (16.6 mM). Cada curva consta de nueve tiempos en los que se determinó la cantidad de insulina secretada por las células β después de 12 horas de exposición a las distintas concentraciones de F^- .

b) Cada barra de la gráfica corresponde al área bajo la curva integrada de las concentraciones de insulina obtenidas en los nueve tiempos de evaluación de cada concentración de fluoruro. Las barras representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. * indica diferencia significativa usando la prueba de Bonferroni. La prueba de Levene indica que sí existe una tendencia a disminuir la secreción de insulina al aumentar la concentración de F^- .

La exposición a fluoruro mostró tener un efecto claro sobre la expresión de la insulina en células β TC6. Al comparar la cantidad de mRNA de insulina presente en células β expuestas a las distintas concentraciones de fluoruro utilizadas para este estudio, se encontró que a mayor concentración de exposición a fluoruro, menor fue la expresión del gen. En otras palabras, la reducción de la cantidad de mRNA provocada por la exposición a fluoruro fue dosis dependiente, pues se observó una disminución en la cantidad de mensajero de hasta un 33 y 41% para las concentraciones de 1.35 y 2.26 mM de F⁻ respectivamente, después de 12 horas de exposición, mientras que para el caso de la secreción de insulina, la cantidad de hormona secretada por células expuestas durante el mismo tiempo (12 horas) a la mayor concentración de fluoruro utilizada en este estudio (2.26 mM), se redujo sólo en un 19% con respecto del control.

Respecto a la relación con el tiempo de exposición, se observó que la cantidad de mensajero de insulina disminuyó a mayor tiempo de exposición a fluoruro. La expresión del gen a las ocho horas de exposición se redujo un 22 y 37% con respecto al control para las concentraciones 1.35 y 2.26 mM de F⁻, mientras que después de 12 horas de exposición a 2.26 mM de F⁻, la cantidad de mensajero de insulina se redujo un 41% con respecto del control.

El fluoruro mostró tener mayor efecto sobre la expresión del gen que sobre la secreción de la insulina, tal vez debido a la sumatoria de efectos producidos por estrés oxidante, que incluye la alteración de la actividad e incluso la ubicación de factores de transcripción, aunado al efecto que promueve la variación en la concentración de Ca²⁺ intracelular a causa de su interacción con el fluoruro, pues este aumento de calcio es necesario para la activación de NFAT, el cual promueve la transcripción del gen de la insulina.

En el caso de la secreción de la hormona, el

mecanismo por el cual el fluoruro afecta la exocitosis puede estar más relacionado con la concentración de Ca²⁺ intracelular, ya que la entrada de este catión es fundamental para las dos fases de secreción de insulina estimulada por glucosa, pues del calcio dependen varios procesos como son la actividad mitocondrial normal para lograr un aumento en la síntesis de ATP, la regulación del proceso de exocitosis mediante la fusión de las vesículas a la membrana gracias a proteínas SNARE como SNAP-25, cuya proteólisis depende de calpaína, que es una proteasa dependiente de Ca²⁺, así como otras posibles proteínas involucradas en la secreción de la insulina, poniendo como ejemplos a las chaperonas tales como las proteínas lazo de cisteína (Csps), que se expresan en vesículas que contienen insulina y la supresión de la expresión de estas proteínas dependientes de Ca²⁺ inhibe la secreción de la hormona, además de las sinaptotagminas I y II, que se expresan en células β y se requieren específicamente para la secreción estimulada por calcio. Por lo anterior se puede pensar que aunque dentro de las células β se tuviera suficiente cantidad de insulina para ser secretada, el fluoruro impide este fenómeno al modificar la cantidad de calcio que entra a la célula, necesaria para desencadenar el proceso de exocitosis. También es interesante mencionar que esta elevación de Ca²⁺ intracelular no es requerida para la secreción basal de insulina (Marshall et al., 2005), y que se desconoce todavía la concentración real de calcio necesaria para promover la exocitosis de insulina (Lang, 1999).

La idea de exponer células β a concentraciones micro y milimolares de NaF fue debido a los antecedentes horméticos del fluoruro, ya que los estudios previos relacionados con la secreción de insulina han mostrado resultados contradictorios que indican que dependiendo de la concentración de exposición era el efecto sobre la secreción (diferencias entre concentraciones micro y milimolares). En el presente estudio no observamos esa respuesta hormética ya que tanto a concentracio-

nes bajas como milimolares la tendencia fue a disminuir la secreción de insulina.

En relación a la expresión del gen de la insulina no se tienen antecedentes al respecto, hasta donde se conoce los resultados del presente estudio son los primeros en mostrar la disminución de la expresión del gen de insulina por la exposición a fluoruro. Aunque sí se tienen antecedentes sobre la acción del fluoruro en otros tipos celulares y analizando la expresión de otros genes, como es el caso del estudio reportado por Zhang et al. (2007), donde se informa que en cultivo primario de neuronas del hipocampo de ratas, la exposición a concentraciones equivalentes a 1 y 2 mM F⁻ disminuyó los niveles de mRNA de moléculas de adhesión de células neurales en forma dosis-dependiente. También se ha mostrado una disminución en el mRNA de la enzima superóxido dismutasa de cerdos expuestos a concentraciones altas de fluoruro (250 mg/kg) (Zhan y col., 2006).

Generalmente se ha considerado que las concentraciones de fluoruro observadas en plasma o suero de personas que habitan en áreas endémicas son las concentraciones biológicamente relevantes que ameritan ser estudiadas. Estas concentraciones en suero no rebasan el valor de 0.1 mM (Bhagavan, y col., 2005; Xiong y col., 2007). Sin embargo, en modelos experimentales con exposición crónica a fluoruro se ha observado una importante distribución en órganos como el hígado, riñón, cerebro y testículos (Inkiewicz et al. 2003); en este estudio, después de exponer ratas durante 12 semanas a tratamientos de 25 mg F⁻/l, la concentración sérica encontrada fue de 0.095 µg F⁻/ml, mientras que en riñón fue de 7.11 µg F⁻/g. Desafortunadamente no existe información disponible sobre la concentración de fluoruro en tejido pancreático de animales de experimentación y mucho menos de personas expuestas crónicamente. No obstante, es posible que las concentraciones urinarias observadas en personas que viven en áreas endémicas con fluoruro (de hasta 2mM) reflejen mejor la distribución del fluoruro en tejidos blandos que la concentración plasmática.

Además resulta importante destacar que se ha reconocido que en situaciones de deficiencia de calcio y magnesio o bien de presencia de concentraciones de fosfato y sulfato, la biodisponibilidad del fluoruro incrementa (NRC, 2006) por lo que en la exposición crónica a fluoruro estos factores también deberán ser considerados. También se reconoce que las concentraciones plasmáticas de fluoruro son mayores en niños que en adultos (Gupta et al, 2001). Por esta razón, se deberá evaluar el efecto del fluoruro sobre la síntesis de insulina en animales recién nacidos y en estadios de deficiencia alimenticia de calcio y magnesio.

La importancia de los resultados encontrados en este estudio puede estar relacionada con la presencia de enfermedades como la DMT2, ya que la exposición a fluoruro mostró tener efectos adversos al inhibir tanto la secreción como la expresión del gen de la insulina. El mecanismo exacto por el cual se genera este efecto es desconocido todavía, aunque la disminución de la expresión a causa de la exposición a fluoruro se puede comparar con la que acontece en condiciones de hiperglucemia, puesto que bajo el efecto denominado glucotoxicidad, las células β pancreáticas ven afectada su supervivencia, así como la secreción de insulina y la expresión genética. El estrés oxidante producido por la hiperglucemia es la explicación más común para estos efectos (Kajimoto y Kaneto, 2004; Kaneto et al., 2005; Melloul, 2001; Poitout et al., 2006; Robertson et al., 1992). Las ERO afectan de manera importante a las células β debido a la baja expresión de enzimas antioxidantes en ellas y a que expresan en gran cantidad al transportador GLUT2, que promueve la entrada de glucosa a la célula incluso en presencia de concentraciones elevadas de este azúcar en el medio.

Las vías activadas por estrés oxidante que se han propuesto como generadoras de la disminución de la expresión genética son la de las cinasas activadas por estrés (SAPK o JNK) (Kaneto et al., 2005; Poitout et al., 2006) y la vía de las hexosaminas, que parece ser importante por el deterioro que induce en las

células β (Kajimoto y Kaneto 2004; Kaneto et al., 2001), aunque no se ha demostrado con claridad cuál de estas vías tiene el mayor efecto.

La glucotoxicidad y el estrés derivado de ella se relacionan con la disminución de la actividad de unión a DNA de factores de transcripción como PDX-1 y MafA. En ambos casos se sugiere una modificación post-transcripcional del factor a causa de la actividad de ERO. Para el caso específico de MafA se ha propuesto también que CEBP/ β impide la unión del factor de transcripción al promotor del gen, impidiendo la inducción cooperativa de la transcripción por parte de MafA y B2 (Harmon et al., 2005; Olson et al., 1995; Robertson et al., 2000). Otra explicación dada a la disminución de la actividad de PDX-1, es la vía JNK, que promueve tanto la disminución de la unión al DNA del factor de transcripción así como su translocación del núcleo hacia el citoplasma (Kawamori et al., 2003). De manera general se pudiera explicar la disminución en la cantidad de mRNA de insulina como resultado de una baja en la actividad de los factores de transcripción del gen provocado por el aumento de estrés oxidante.

En cuanto al efecto que tiene el fluoruro sobre la secreción de la insulina, los datos obtenidos en el experimento realizado para este trabajo muestran resultados similares a los de la expresión del gen, ya que se observa también una disminución tiempo y dosis-dependiente, aunque son necesarios mayores estudios con distintas condiciones para evaluar el posible efecto hormético mencionado anteriormente, ya que la exposición de células β de la línea RINm5F a fluoruro de sodio en concentraciones de entre 5 a 15mM provocó la estimulación de la exocitosis de la insulina (Komatsu et al., 1995), mientras que Menoyo et al. (2005) y Rigalli et al. (1990) encontraron que islotes de Langerhans aislados expuestos a concentraciones micromolares (5 a 20 μ M) de NaF inhiben la secreción de la hormona.

Aunque se tienen reportes que reconocen que el fluoruro, cuyo peso molecular es muy bajo,

produce efectos en el organismo al combinarse con iones de Ca^{2+} provocando hipocalcemia severa, al mismo tiempo, se conoce como un ionóforo de calcio ya que promueve el transporte de iones de Ca^{2+} hacia dentro de la célula (Sireli y Bulbul, 2004). Junto con estos datos, se ha encontrado evidencia que el efecto del fluoruro estimula la actividad de la adenilato ciclasa en homogenados de Islotes de Langerhans de rata. Considerando que el fluoruro puede promover la entrada de Ca^{2+} a la célula y que estimula la actividad de la adenilato ciclasa, teóricamente se esperaría que al exponer células β a NaF, la secreción de la insulina aumente. Lo anterior no ha sido comprobado por la evidencia experimental presentada en este trabajo. De acuerdo a los resultados del presente estudio se podría considerar que en individuos que padecen DMT2, la exposición a fluoruro podría exacerbar los efectos adversos causados por ésta enfermedad crónico-degenerativa.

Además la co-exposición a fluoruro y otros agentes diabetogénicos también merece ser estudiada. Junto con el fluoruro, otros elementos pueden tener efectos adversos para la salud y específicamente para las células relacionadas con la síntesis y secreción de insulina. En México existen varias localidades que presentan niveles elevados de fluoruro en el agua, pero en algunas de ellas también se han encontrado otros elementos potencialmente tóxicos como el arsénico. Los efectos de este metaloide en la salud son diversos y recientemente se ha reconocido como un agente diabetogénico, de manera que resulta obligada la evaluación de la co-exposición de fluoruro y arsénico inorgánico en la síntesis y expresión de insulina.

El presente estudio demostró que el fluoruro tiene efectos negativos dosis y tiempo-dependientes sobre las células β TC6, apoyando esto los resultados obtenidos en otros trabajos donde se observa una disminución en la cantidad de insulina secretada.

Los mecanismos que producen estos efectos no son del todo conocidos, pero sí se sabe que tanto el fenómeno de expresión del gen como la secreción de insulina dependen de varios factores que pueden ser afectados por la presencia de fluoruro. Entre esos factores se encuentra uno en común para los dos fenómenos, la alteración del nivel de Ca^{2+} intracelular, pues modifica la secreción de la hormona al inhibir la actividad de varias moléculas involucradas con la exocitosis, mientras que la transcripción del gen se puede ver afectada por alteraciones en la actividad de NFAT, la cual es dependiente de calmodulina. Sumado a este efecto, el fluoruro también promueve el aumento de ERO y de estrés oxidante dentro de la célula β , condiciones que también afectan negativamente la expresión del gen.

Esta información resulta de relevancia al conocer que en México hay una gran cantidad de personas, aproximadamente 20 millones, expuestas a concentraciones no seguras de fluoruro a través del consumo de agua y alimento contaminado con este compuesto.

Debido a que la DMT2 puede ser inducida por condiciones favorecidas por el daño oxidante provocado por hiperglicemia, condición derivada de la insuficiente producción o una baja secreción de insulina, además de la resistencia por parte de las células a dicha hormona, es importante el estudio y análisis de los efectos producidos por la ingestión de altas concentraciones de fluoruro, puesto que los efectos ya mencionados que provoca la exposición a este compuesto podrían actuar como coadyuvantes para el desarrollo de esta patología.

Entre las soluciones que pueden considerarse para contrarrestar el efecto del estrés oxidante están ciertos compuestos conocidos como antioxidantes, tales como las vitaminas C y E, aunque su uso depende de estudios previos importantes pues en el caso de la segunda se conoce que tiene un fuerte efecto citotóxico a concentraciones elevadas. Otra idea es el uso de extractos de alimentos como el té verde, que se utiliza y recomienda por sus propiedades antioxidantes, aunque es interesante mencionar que bajo ciertas condiciones las hojas de té pueden contener concentraciones elevadas de fluoruro, por lo que previo a su uso debe extraerse dicho compuesto.

Una opción más sería reducir la presencia de contaminantes en el agua mediante el método de precipitación química. Para lograr esto se añade sulfato de aluminio y un polímero aniónico, logrando remover hasta un 77% de fluoruro y 99% de arsénico.

Finalmente, el uso de otro tipo de técnicas como el PCR de tiempo real sería de gran utilidad para confirmar los resultados descritos en el presente trabajo, pues esta técnica permite un análisis cuantitativo de buena precisión de la expresión de un gen en particular.

Otro punto interesante para complementar este

estudio es exponer a las células β a menores concentraciones de fluoruro pero durante más tiempo, con la finalidad de reproducir de mejor manera las condiciones de exposición a las que se encuentran las poblaciones humanas, pues ésta suele ser por tiempo prolongado y a concentraciones bajas, recordando que la mayor cantidad de fluoruro ingerida permanece en hueso y la que se encuentra en tejidos blandos es considerablemente menor.

Además, ya que todavía se desconoce la forma precisa por la que el fluoruro afecta las actividades biológicas, es necesario contar con mayores estudios sobre la distribución de fluoruro en tejido pancreático, sus efectos en modelos experimentales in vivo, mecanismos de acción y factores biológicos y fisiológicos relacionados con la exposición a fluoruro y sus efectos a nivel de metabolismo de carbohidratos.

- Adamek, E., Pawlowska-Góral, K., Bober, K.** In vitro and in vivo effects of Fluoride ions on enzyme activity. *Annals of the Pomeranian Medical University* 51: 69-85; 2005
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** Toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine. Public Health Service. U.S. Department of Health and Human Services. 2003
- Aronheim, A., Ohlsson, H., Park, C.W., Edlund, T., Walker, M.D.** Distribution and characterization of helix-loop-helix enhancer-binding proteins from pancreatic beta cells and lymphocytes. *Nucleic Acids Res.* 19(14):3893-3899; 1991
- Bhagavan, S.V., Raghu, V.** Utility of check dams in dilution of fluoride concentration in ground water and the resultant analysis of blood serum and urine of villagers, Anantapur District, Andhra Pradesh, India. *Environ. Geochem. Health.* 27(1):97-108; 2005
- Chang, H.S., Walsh, L.J., Freer, T.J.** Enamel demineralization during orthodontic treatment. *Aetiology and prevention. Aust. Dent. J* 42(5):322-327; 1997
- Dean, L., McEntyre, J.R. *The Genetic Landscape of Diabetes.* Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI; 2004
- Denton, R.M., McCormack, J.G.** Ca²⁺ as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Annu. Rev. Physiol.* 52:451-466; 1990
- Díaz-Barriga, F., Navarro-Quezada, A., Grijalva, M., Grimaldo, M., Loyola-Rodríguez, J.P., Deogracias, M.** Endemic fluorosis in Mexico. *Fluoride* 30:223-239; 1997
- Efrat, S., Linde, S., Kofod, H., Spector, D., Delannoy, M., Grant, S., Hanahan, D., Baekkeskov, S.** Beta-cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene-oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 9037-9041; 1988
- Grijalva-Haro, M.I., Barba-Leyva, M.E., Laborín-Alvarez, A.** Ingestión y excreción de fluoruros en niños de Hermosillo, Sonora, México. *Salud Pública Mex.* 43: 127-134; 2001
- Gupta, S.K., T.I. Khan, R.C. Gupta, A.B. Gupta, K.C. Gupta, P. Jain, and A. Gupta.** Compensatory hyperparathyroidism following high fluoride ingestion—a clinicobiochemical correlation. *Indian Pediatr.* 38(2):139-146; 2001
- Harmon, J.S., Stein, R., Robertson, R.P.** Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells. *J Biol. Chem.* 280(12):11107-11113; 2005
- Hindmarsh, J.T.** Arsenic its clinical and environmental significance. *J Trace Elem. Exp. Med.* 13:165-172; 2000
- Hu, Y., Jin, X., Snow, E.** Effect of arsenic on transcription factor AP-1 and NF-kappa B DNA binding activity and related gene expression. *Toxicology Lett.* 133(1): 33-45; 2002
- Hurtado-Jiménez, R., Gardea-Torresdey, J.** Estimación de la exposición a fluoruros en Los Altos de Jalisco. México. *Salud Pública de México.* 47(1):58-63; 2005
- Inkielewicz, I., Krechniak, J.** Fluoride content in soft tissues and urine of rats exposed to sodium fluoride in drinking water. *Fluoride* 36(4): 263-266; 2003
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., Edlund, H.** Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371(6498):606-609; 1994
- Kajimoto, Y., Kaneto, H.** Role of Oxidative Stress in Pancreatic β -Cell Dysfunction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1011: 168-176; 2004
- Kaneto, H., Matsouka, T., Nakatani, Y., Kawamori, D., Miyatsuka, T., Matsuhisa, M., Yamasaki, Y.** Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *J Mol Med* 83: 429-439; 2005

- Kaneto, H., Xu, G., Song, K., Suzuma, K., Bonner-Weir, S., Sharma, A., Weir, G.C.** Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic β -cell function through the induction of oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 276 (33): 31099-31104; 2001
- Kawamori, D., Kajimoto, Y., Kaneto, H., Umayahara, Y., Fujitani, Y., Miyatsuka, T., Watada, H., Leibiger, I.B., Yamasaki, Y., Hori, M.** Oxidative stress induces nucleo-cytoplasmic translocation of pancreatic transcription factor PDX-1 through activation of c-Jun N-terminal kinase. *Diabetes* 52:2896-2391; 2003
- Komatsu, M., McDermott, A.M., Sharp, G.W.G.** Sodium Fluoride Stimulates Exocytosis at a Late Site of Calcium Interaction in Stimulus-Secretion Coupling: Studies with the RINm5F β Cell Line. *Molecular Pharmacology* 47: 496-508; 1995
- Lang, J.** Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur. J. Biochem.* 259: 3-17; 1999
- Lawrence, M.C., McGlynn, K., Park, B.H., Cobb, M.H.** ERK1/2-dependent activation of transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene promoter. *J Biol. Chem.* 280(29):26751-26759; 2005
- Lawrence, M.C., Harshika, S., Bhatt, H.S, Easom, R.A.** NFAT Regulates Insulin Gene Promoter Activity in Response to Synergistic Pathways Induced by Glucose and Glucagon-Like Peptide-1. *Diabetes* 51:691-698; 2002
- Loyola-Rodríguez, J.P., Pozos-Guillén, A.J., Hernández-Guerrero, J.C., Hernández-Sierra, J.F.** Fluorosis en dentición temporal en un área con hidrofluorosis endémica. *Salud Pública de México.* 42(3): 194-200; 2000
- Malinowska, E., Inkielewicz, I., Czarnowski, W., Szefer, P.** Assessment of fluoride concentration and daily intake by human from tea and herbal infusions. *Food Chem. Toxicol.* 46(3):1055-1061; 2008
- Marshak, S., Benshushan, E., Shoshkes, M., Leibovitz, G., Kaiser, N., Gross, D., Bertuzzi, F., Cerasi, E., Melloul, D.** Beta-cell-specific expression of insulin and PDX-1 genes. *Diabetes* 50 Suppl. 1:S131-S132; 2001
- Marshall, C., Hitman, G.A., Partridge, C.J., Clark, A., Ma, H., Shearer, T.R., Turner, M.D.** Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells. *Mol. Endocrinol.* 19: 213-22; 2005
- Melloul, D.** Glucose signaling to transcription factors of the insulin gene. In: *Molecular Basis of Pancreatic Endocrine Development and Function.* Eds. Habener J. F. y Hussain M. A. Kluwer Academic Publishers, Boston. 19-33; 2001
- Melloul, D., Ben-Neriah, Y., Cerasi, E.** Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(9):3865-3869; 1993
- Menoyo, I., Rigalli, A., Puche R.C.** Effect of Fluoride on the Secretion of Insulin in the Rat. *Arzneim.-Forsch./ Drug Res.* 55 (8): 455-460; 2005
- Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F.J., Leiter, A.B., Tsai, M.J.** Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev.* 11(18):2323-2334; 1997
- National Research Council (NRC).** Fluoride in drinking-water. A scientific review of EPA's standards. Washington D.C. 2006
- Olson, L.K., Sharma, A., Peshavaria, M., Wright, C.V., Towle, H.C., Rodertson, R.P., Stein, R.** Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(20):9127-9131; 1995
- Peers, B., Leonard, J., Sharma, S., Teitelman, G., Montminy, M.R.** Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol. Endocrinol.* 8(12):1798-806; 1994

- Petersen, H.V., Serup, P., Leonard, J., Michelsen, B.K., Madsen, O.D.** Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(22):10465-10469; 1994
- Piñón-Miramontes, M., Pérez-Hernández, A., Bautista-Margulis, R.** Disminución de flúor y arsénico utilizando sulfato de aluminio y polímero aniónico en agua subterránea. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 2002
- Poitout, V., Hagman, D., Stein, R., Artner, I., Robertson, R.P., Harmon, J.** Regulation of the Insulin Gene by Glucose and Fatty Acids. *J. Nutr.* 136: 873-876; 2006
- Poitout, V., Stout, L.E., Armstrong, M.B., Walseth, T.F., Sorenson, R.L., Robertson, R.P.** Morphological and functional characterization of beta TC-6 cells--an insulin-secreting cell line derived from transgenic mice. *Diabetes* 44: 306-313; 1995
- Puche, R.C., Rigalli, A.** Metabolismo del flúor. *Actualiz. Osteol.* 3(1): 10-12; 2007
- Read, M.L., Clark, A.R., Docherty, K. The helix-loop-helix transcription factor USF (upstream stimulating factor) binds to a regulatory sequence of the human insulin gene enhancer. *Biochem. J* 295(1):233-327; 1993
- Rigalli, A., Ballina, J.C., Roveri, E., Puche R.C.** Inhibitory Effect of Fluoride on the Secretion of Insulin. *Calcif Tissue Int.* 46: 333-338; 1990
- Rivera, S., Godorecci, S., Borgel, L., Díaz, E., Fuchs, T., Martin, M.I.** Flúor: potenciales efectos adversos. *Rev. Chil. Pediatr.* 64 (4):278-283; 1993
- Robertson, R.P., Harmon, J.S., Tanaka, Y., Sacchi, G., Tran, P.O.T., Gleason, C.E., Poitout, V.** Glucose toxicity of the beta cell: cellular and molecular mechanisms. In: *Diabetes mellitus. A fundamental and clinical text.* 2nd ed. Eds. Le Roith, D., Taylor, S.I., Olefsky, J.M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 125-132; 2000
- Robertson, R.P.** Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem.* 279 (41): 42351-42354; 2004
- Robertson, R.P., Zhang, H.J., Pyzdrowski, K.L., Walseth, T.F. Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *J Clin. Invest.* 90:320-325; 1992
- Schmid, I., Krall, W.J., Uittenbogaart, C.H., Braun, J., Giorgi, J.V.** Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 13: 204-208; 1992
- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana: NOM 127-SSA1-1994.** Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. México, D.F.: Diario Oficial de la Federación DVIII 13, 18 de enero. 41; 1996
- Sharma, A., Stein, R.** Glucose-induced transcription of the insulin gene is mediated by factors required for beta-cell-type-specific expression. *Mol. Cell Biol.* 14(2):871-879; 1994
- Sireli, M., Bulbul, A.** The effect of acute fluoride poisoning on nitric oxide and methemoglobin formation in the guinea pig. *Turk J Vet. Anim. Sci.* 28:591-595; 2004
- Steiner, D.F., Chan, S.J., Welsh, J.M., Kwok, S.C.** Structure and evolution of the insulin gene. *Ann. Rev. Genet.* 19:463-484; 1985
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., Lenzen, S.** Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46(11):1733-1742; 1997
- Tillmar, L., Carlsson, C., Welsh, N.** Control of insulin mRNA stability in rat pancreatic islets. Regulatory role of a 3'-untranslated region pyrimidine-rich sequence. *J Biol Chem.* 277(2):1099-1096; 2002

- Vega-López, A., Ortiz-Ordóñez, E., Uría-Galicia, E., Mendoza-Santana, E.L., Hernández-Cornejo, R., Atondo-Mexia, R., García-Gasca, A., García-Latorre, E., Domínguez-López, M.L.** The role of vitellogenin during gestation of *Girardinichthys viviparus* and *Ameioba splendens*; two goodeid fish with matrotrophic viviparity. *Comp. Biochem. Physiol.* 147: 731-742; 2007
- Whitford, G.M.** Intake and metabolism of fluoride. *Adv. Dent. Res.* 8(1):5-14; 1994
- Whitford, G.M., Callan, R.S., Wang, H.S.** Fluoride absorption through the hamster cheek pouch: a pH-dependent event. *J Appl. Toxicol.* 2(6):303-306; 1982
- Willems, C., Berberof-van Sande, J., Dumont, J.E.** Inhibition of thyroid secretion by sodium fluoride in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 264(1):197-204; 1972
- Xiong, X., Liu, J., He, W., Xia, T., He, P., Chen, X., Yang, K., Wang, A.** Dose-effect relationship between drinking water fluoride levels and damage to liver and kidney functions in children. *Environ. Res.* 103(1):112-116; 2007
- Zhan, X.A., Wang, M., Xu, Z.R., Li, W.F., Li, J.X.** Effects of fluoride on hepatic antioxidant system and transcription of Cu/Zn SOD gene in young pigs. *J Trace Elem. Med. Biol.* 20(2):83-87; 2006
- Zhang, M., Wang, A., He, W., He, P., Xu, B., Xia, T., et al.** Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons. *Toxicology* 236:208-216; 2007
- Zhao, L., Guo, M., Matsuoka, T.A., Hagman, D.K., Parazzoli, S.D., Poitout, V., Stein, R.** The islet beta cell-enriched MafA activator is a key regulator of insulin gene transcription. *J Biol Chem.* 280(12):11887-94; 2005