



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO p53-PARP-1 Y LA POLI (ADP –
RIBOSILACIÓN) DE p53 EN CÉLULAS RIN_m5F POR EFECTO DE
HIPERGLUCEMIA Y SU RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE APOPTOSIS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

P R E S E N T A

SANDOVAL MIRANDA BLANCA ESTELA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. CLARA ORTEGA CAMARILLO



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN BIOQUÍMICA.

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. BERNARDO SEPULVEDA,

CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

DEDICATORIAS

Primeramente a Díos

*Que gracias a que siempre está conmigo y me brinda su
ayuda logre una de mis metas, realizar mi trabajo de tesis.*

A mí familia

*Que gracias a su esfuerzo en todos los sentidos
logre estudiar una carrera.*

A G R A D E C I M I E N T O S

A dios

Por ser mi familia mi amigo mi consejero y el que jamás se separo de mi lado ni me abandono en los momentos más angustiosos y difíciles, gracias por ser mi consuelo y motivación para seguir adelante con entusiasmo.

A mis padres David Sandoval Vázquez y Taide Miranda Durán

Por su esfuerzo cotidiano para que yo fuera una persona con valores, por su amor confianza y por su magnífico ejemplo de buena conducta. Mil gracias máma por tu amor, consejos, por enseñarme que el bien triunfa sobre cualquier cosa y por ser una mujer con una gran paciencia, nobleza, fuerza espiritual y una fe inmensa cualidades que admiro.

A mis hermanos

Fernando, Miguel, Juan, Guadalupe, Gustavo, David y Javier, por su cariño desde mi nacimiento, por consentirme, por guiarme por el camino del bien porque vive en mi algo que aprendí de cada uno de ustedes, por su apoyo emocional y económico para finalizar mi carrera.

A la doctora Clara Ortega Camarillo

Por brindarme la oportunidad de aprender y desarrollarme con nuevos conocimientos para mi futura vida profesional. Por su confianza apoyo y paciencia.

Al Biólogo José Misael Vicente Hernández Vázquez

Por ser mi asesor interno, por su ayuda apoyo, paciencia, tiempo, atención y por compartirme de sus conocimientos, así como cuestionarme, hacerme investigar y aprender.

A mis sinodales

Al M.C, Raúl Zavala Chavero, A la M. en C, Rosalva Rangel Corona

Al M. en C, Luis Sánchez Sánchez

Por su atención y amabilidad y por sus aportaciones a este trabajo de tesis que fueron de gran ayuda.

A Nayeli Torres Ramírez

Por ser tan espontanea sincera noble y paciente por portarse maravillosamente conmigo en el laboratorio, por su apoyo incondicional en varios aspectos tanto profesional como emocional, por tener las palabras precisas y justas para hacerme continuar con ánimo por los momentos agradables y divertidos de risas compartidas por convertirse en una amiga de gran valor para mi. Gracias también a ti Jhonny Maturano por brindarme tu amistad y hacer un entorno agradable. Gracias Luis Antonio por tu ayuda, por enseñarme a realizar el trabajo en el laboratorio y por la convivencia compartida. Gracias Armando Cortes Salazar por tu compañía y apoyo.

A mis amigos de FES ZARAGOZA

*Porque vivimos hermosos momentos, enojos y alegrías porque te das cuenta que cuando estás en la universidad ellos se convierten en algo muy parecido a tu familia ya que la mayor parte del tiempo convives con ellos, a mi equipo de toda la carrera integrado por Osvaldo, Edgardo, Diana y Yo, que aprecio y se queda como un lindo recuerdo en mi mente, pero en especial a mi mejor amiga **Diana Jiménez Cruz** que a lo largo de 4 años y medio estuvo conmigo y que sigue a mi lado y espero sigas siempre cerca de mí mil gracias por escucharme por tu paciencia y más que nada por tu comprensión.*

Gracias a la UNAM FES Zaragoza por acogerme entre sus aulas y al IMSS Centro Médico Siglo XXI por abrirme sus puertas.

*Nunca consideres el estudio como una obligación,
sino como una oportunidad para penetrar en el bello
y maravilloso mundo del saber. (Alebert Einstein)*

*La teoría es asesinada tarde o temprano por la experiencia.
(Alebert Einstein)*

Y de la experiencia creo y aprendí que:

*El ser un individuo valioso que trasciende no está plasmado en
nada material, ni el cuanto puedas tener, ni en cuanto puedas
saber, sino en nuestra energía interior, en la fuerza del espíritu
que jamás muere.*

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	05
ÍNDICE DE CUADROS	06
ÍNDICE DE TABLAS	07
ÍNDICE DE RESULTADOS	08
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	13
1. INTRODUCCIÓN	16
2. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1. Epidemiología de diabetes.....	18
2.2. Definición de diabetes y su clasificación	19
2.3. Anatomía y fisiología del páncreas	21
2.4. Células β y su fisiología.....	23
2.5. Captación de glucosa por la célula β	23
2.6. Mecanismo de secreción de insulina.....	24
2.7. Mitocondria y estrés oxidativo en células β	26
2.8. Los ERO son potentes promotores de apoptosis.....	28
2.9. Apoptosis.....	29

2.9.1. Vía extrínseca.....	30
2.9.2. Vía intrínseca.....	31
2.10. Apoptosis: importancia fisiopatológica	33
2.11. Apoptosis en células β	34
2.12. Estructura y función de la proteína p53	37
2.12.1. p53 Función no transcripcional	38
2.13. Estructura y función de PARP	38
2.14. Mecanismo de Poli –ADP- ribosilación	42
2.14.1. Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD ⁺)	43
2.15. Poli –ADP- ribosilación de p53	45
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46
2. JUSTIFICACIÓN	47
3. HIPÓTESIS	48
4. OBJETIVOS	49
5. MATERIAL Y MÉTODOS	50
7.1. Cultivo celular	50
7.1.1. Resiembra de células	50
7.1.2. Cosecha de células	51

7.1.3. Viabilidad	51
7.2. Obtención de fracciones celulares	52
7.2.1. Lisado de células	52
7.3. Cuantificación de proteínas	52
7.4. Determinación de apoptosis	53
7.4.1. Fragmentación de DNA	53
7.5. Electroforesis y Western blot	54
7.5.1. Preparación de geles	54
7.5.2. Preparación de las muestras	54
7.5.3. Transferencia de proteínas	55
7.5.3.1. Bloqueo	55
7.5.3.2. Incubación con el anticuerpo primario	55
7.5.3.3. Incubación con el anticuerpo secundario	55
7.5.3.4. Revelado	56
7.6. Inmunoprecipitación	56
7.7. Concentraciones de NAD ⁺ Y NADH	57
7.7.1. Lisis de células para cuantificación de nucleótidos	57
7.7.2. Cuantificación de NAD ⁺	57

7.7.3. Cuantificación de NADH	58
1. RESULTADOS	60
2. DISCUSIÓN	69
3. CONCLUSIÓN	74
4. BIBLIOGRAFÍA	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Porcentaje de diabetes en México 2001.....	18
Figura 2.	Tasa de mortalidad causada por diabetes	19
Figura 3.	Apoptosis vía extrínseca e intrínseca	33
Figura 4.	Estructura de la proteína p53	38
Figura 5.	Estructura de la proteína PARP	40
Figura 6.	Activación de PARP tras daño en DNA	41
Figura 7.	Mecanismo de poli-ADP-ribosilación	43
Figura 8.	Eventos de supervivencia regulados por apoptosis o necrosis	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I.	Valores de glucosa en sangre y su diagnóstico	21
Cuadro II.	Transportadores de glucosa	24
Cuadro III.	Curva estándar de cuantificación de proteínas	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Apoptosis y patologías	34
----------	------------------------------	----

ÍNDICE DE RESULTADOS

TABLAS

Tabla 2.	Porcentaje de viabilidad de células RINm5F	60
Tabla 3.	Relación NADH/ NAD ⁺	68

FIGURAS

Figura 9.	Viabilidad de células RINm5F	60
Figura 10.	Fragmentación oligonucleosomal de DNA en células RINm5F	61
Figura 11.	Formación del complejo PARP-p53	62
Figura 12.	Western blot y densitometría de PARP en células RINm5F	63
	A. Tiempos (24, 48 y 72 horas)	63
	B. Tiempos (2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas)	63
Figura 13.	Poli-ADP-ribosilación de p53 por alta glucosa.	65
	A. Análisis de los residuos de ADP- ribosa en p53 de células RINm5F	
	B: Western blot de p53 (immunoprecipitación) y revelado con antiPAR	
Figura 14.	Concentración de nucleótidos de niacinamida en células RINm5F tratadas con alta glucosa por diferentes tiempos	
	A. Concentración de NAD ⁺	66

B. Concentración de NADH	67
C. Relación de NADH/NAD+	67

ABREVIATURAS

Diabetes mellitus	DM
Diabetes mellitus tipo 1	DT1
Diabetes mellitus tipo 2	DT2
Del inglés Murina doble minuto-2.....	Mdm-2
Del inglés Enzima Poli-ADP-ribosa polimerasa	PARP
Encuesta Nacional de Salud	ENSA
Secretaria de Salud México	SSA
Dirección de Gestión de Emergencias	DGE
Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática	INEGI
Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	ENSANUT
Asociación Americana de Diabetes	ADA
Adenosina-5- trifosfato	ATP
Proteasa de cisteína que corta en residuos de aspartato	CASPASA
Proteínas inhibidoras de apoptosis	IAPs
Inhibidor de IAP, segundo activador mitocondrial de caspasa	Smac/DIABLO
Factor inductor de apoptosis	AIF
Factor de necrosis tumoral	TNF
Receptor del TNF	TNFR-1
Ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF	TRAIL

Canal aniónico dependiente de voltaje	CADV
Especies reactivas de oxígeno	ERO
Del inglés Ácido desoxirribonucleico	DNA
Factor activador de proteasa apoptóticas-1	Apaf-1
Transportador de glucosa tipo-2	GLUT-2
Poros transicional de permeabilidad mitocondrial	PMPT
Glucosa alterada en condiciones de ayuno	IFG
Prueba de tolerancia oral a la glucosa	PTOG

**LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO p53-PARP-1 Y LA POLI (ADP –
RIBOSILACIÓN) DE p53 EN CÉLULAS RINm5F POR EFECTO DE
HIPERGLUCEMIA Y SU RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE
APOPTOSIS.**

RESUMEN

El estado crónico de hiperglucemia, característico de la DT2 conduce a alteraciones metabólicas, que incluyen la activación de varias enzimas, las cuales pueden estimular a su vez, cambios en la estructura de diversas moléculas y contribuir a la muerte de las células β pancreáticas y de la misma forma a las complicaciones tardías de esta enfermedad. Algunas de las proteínas que se activan después del daño en el DNA son p53 y PARP, se cree que ambas interaccionan para desencadenar la muerte por apoptosis de la célula beta, a través de la adición de ribosas a p53 lo que posiblemente incrementa su actividad biológica. Hecho que permitiría que una porción de p53 se desplazara hacia la mitocondria y unirse a proteínas anti apoptóticas de la familia bcl2, lo que permitiría la activación de proteínas pro apoptóticas como BAX y BAK. Estas proteínas contribuyen a la formación de poros en la mitocondria, que permiten la salida de citocromo c, entre otras moléculas. Por otro lado, el incremento de ERO debido a la hiperglucemia y a la ineficacia de los sistema antioxidantes, causa severos daños a la célula, Estos eventos pueden conducir a la célula β hacia la muerte por apoptosis (vía intrínseca). Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la poli-ADP-ribosilación de p53; la formación del complejo p53-PARP-1 y la inducción de apoptosis en células RINm5F tratadas con concentraciones altas de glucosa. Para cubrir el objetivo se cultivaron células RINm5F en presencia de alta glucosa (30 mM, a diferentes tiempos), después del tratamiento se obtuvieron las fracciones celulares (nuclear y citosólica), se cuantificaron las proteínas y mediante western blot se identificó el complejo p53-PARP, la poli ADP ribosilación de p53. También se cuantificó la concentración de NAD^+ y de NADH por espectrofotometría. Además, se comprobaron las características ineludibles de apoptosis como: fragmentación oligonucleosomal del DNA y la ruptura de PARP.

Los resultados mostraron que en las células RINm5F cultivadas con alta glucosa (30 mM) se favorece la interacción p53-PARP y la adición de residuos de ADP-ribosa a p53, lo que contribuye a incrementar su vida media y su actividad biológica. Estos eventos coincidieron con el aumento en la tasa de apoptosis en células RINm5F, como se demuestra por la presencia de fragmentos oligonucleosomales de DNA a partir de 24 h de cultivo en estas condiciones. La actividad de la enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) y la acumulación de p53 se inducen por el daño en el DNA, y ambas han sido implicadas en la respuesta celular normal a tales daños, como es la activación de los mecanismos apoptóticos (Simbulan-Rosenthal, 1998). La molécula de PARP se une al DNA dañado y cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa a partir del NAD^+ , a sí misma y a otras proteínas nucleares como p53, iniciando así la síntesis del polímero pADPr. Sin embargo, la fragmentación de PARP por acción de la caspasa 3, también constituye un marcador adicional de apoptosis, en este estudio la fragmentación de PARP se hizo evidente a partir de 24 h. Con base en estos resultados se decidió estudiar la concentración e integridad de PARP y la poli ADP ribosilación de p53 a tiempos más cortos (2, 4, 8, 16 h). Se observó que la integridad de PARP y su actividad se estimulan por concentraciones altas de glucosa y que éstas se mantienen hasta las 16 h, lo que favorece la poli ADP ribosilación de p53 hasta las 24 h, momento en que comienza a disminuir y se incrementa la degradación de PARP. Lo que demuestra que la poli-ADP-ribosilación de p53 es una respuesta temprana en condiciones de alta glucosa que pudiera contribuir a la estabilidad de la proteína y probablemente a su movilización hacia a la mitocondria.

La concentración intracelular de NAD^+ es de vital importancia para la actividad de PARP, ya que determina el tamaño del polímero ADP-ribosa (reacción de polimerización), por lo que cuando se induce un aumento en la activación de PARP, se observa una importante disminución en las concentraciones de NAD^+ , las cuales tienen un efecto directo en el aporte energético a la célula, siendo motivo suficiente para iniciar el proceso de muerte (West, 2000). Nuestros resultados muestran que en las células RINm5F cultivadas con alta glucosa se presenta una disminución significativa de las concentraciones de NAD^+ y un incremento en la concentración de NADH, lo que también modificó la relación NAD^+/NADH . Sin embargo, los cambios en los nucleótidos de niacinamida en estas condiciones, aparentemente no están relacionados con la sobreactivación de PARP, dado que ésta se degrada y disminuye su actividad a

partir de 24 h. La disminución en la relación NAD^+/NADH , se debe al incremento de NADH , lo cual tiene consecuencias severas en el metabolismo celular, uno de los más importantes relacionados con la hiperglucemia es el aumento en la producción de ERO.

Con base en estos resultados podemos concluir que la presencia de alta glucosa y el estrés oxidativo derivado de esta situación, conducen a la activación de PARP y a la adición de residuos de ADP-ribosa que podría contribuir a la preservación y activación de la proteína p53 para la inducción de apoptosis en las células RINm5F, aunado a los cambios redox dados por la relación NAD^+/NADH en condiciones de alta glucosa.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el número de personas con diabetes se ha incrementado velozmente. La Diabetes es una enfermedad metabólica degenerativa con dependencia genética, ligada a malos hábitos alimenticios sedentarismo y sobrepeso, su detección es mediante la medición de los niveles de glucosa en sangre. (González *et al.*, 2009).

La diabetes mellitus comprende un grupo heterogéneo de desordenes hiperglucémicos que afectan al metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, asociada a una deficiencia absoluta o relativa de insulina, con grados variables de resistencia a ésta (Giogino *et al.*, 2005).

Existen varios tipos de diabetes, siendo el de mayor relevancia en cuanto a epidemiología, la diabetes tipo 2 (DT2), un síndrome caracterizado por trastornos metabólicos generalizados en el cual, el factor dominante es una hiperglucemia crónica. En dicho padecimiento se centra esta investigación.

La producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el estado de estrés oxidativo constituyen dos características importantes en el paciente diabético descompensado, debido a las altas concentraciones de glucosa (30 mM) (Evans *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2002; Brownlee *et al.*, 2005; West, 2000). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la exposición a niveles altos de glucosa provoca el deterioro de la función de las células β (kaneto *et al.*, 1999; Marshak *et al.*, 1999; Kahn *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2003) e incrementa la tasa de apoptosis lo que genera la pérdida de masa pancreática (kahn *et al.*, 2001; Butler *et al.*, 2003; Koo *et al.*, 2011). Además, los pacientes con DT2 están sujetos a estrés oxidativo crónico (Robertson *et al.*, 2004), que aunado a que el páncreas cuenta con un sistema de defensa intrínseca relativamente débil contra el estrés oxidativo (Kaneto *et al.*, 1999), favorecen la pérdida de la masa de células β (West, 2000).

Entre los daños causados por ERO y el estrés oxidativo, destacan los cambios biomoléculares, como en las proteínas de las células β pancreáticas (Díaz-Flores *et al.*, 2007), que pueden inducir la muerte por apoptosis vía intrínseca (Schuler *et al.*, 2000). Entre las proteínas que pueden presentar alteraciones se encuentra p53. La proteína p53 se activa cuando existen daños en el DNA por diferentes estímulos estresantes. Las

funciones de p53 están reguladas por diversos cambios postraduccionales (acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación, y poli-ADP-ribosilación). Estas modificaciones además, pueden prolongar la vida media de p53, que normalmente es corta (aprox. 20 min), al evitar su reconocimiento por la proteína Mdm-2, encargada de presentarla al sistema de degradación mediado por proteosomas (Waning *et al.*, 2010). Está reportado que la poli-ADP-ribosilación incrementa la vida media de p53 (Won *et al.*, 2006). Cuando existe un daño en el DNA, la enzima nuclear poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) inicia un ciclo de transferencia de unidades de ADP-ribosa a varias proteínas nucleares a partir del consumo de NAD⁺ y de ATP (Pacher *et al.*, 2002).

En la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, se ha demostrado que la proteína p53, se traslada desde el citosol hasta la mitocondria durante la apoptosis vía intrínseca de las células RINm5F (células β procedentes de páncreas de rata), cultivadas con concentraciones altas de glucosa (30 mM) este evento se relacionó con el aumento de ERO, alteraciones en la permeabilidad mitocondrial y liberación de citocromo c (Ortega *et al.*, 2006). La translocación de p53 a la mitocondria también se ha reportado en células tratadas con radiaciones ultravioleta (Mihara *et al.*, 2003).

Estudios con modelos animales, han demostrado que la sobre activación de PARP, representa un importante mecanismo de daño de tejidos en diferentes condiciones patológicas asociadas con estrés oxidativo (Xia *et al.*, 2009; Pacher *et al.*, 2002), incluyendo la destrucción de células β de islotes pancreáticos desde los primeros indicios de diabetes así como en alteraciones de la función endotelial en modelos de diabetes con estreptozotocina (Pacher *et al.*, 2002). Este trabajo de investigación tiene como finalidad establecer la relación entre la poli-ADP-ribosilación de p53 y la inducción de apoptosis en células RINm5F cultivadas con altas concentraciones de glucosa.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Epidemiología De Diabetes

A nivel mundial en 1985, se estimó que existían 30 millones de personas con diabetes, para 1995 esta cifra ascendió a 135 millones de pacientes diabéticos y se esperan alrededor de 300 millones para el año 2025. Entre los años 1995 y 2025 se ha estimado un incremento de 35% en la prevalencia. Predomina el sexo femenino y es más frecuente en el grupo de edad de 45 a 64 años (Moreno, 2001).

En México de acuerdo con resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000 (ENSA), la prevalencia de diabetes mellitus en hombres y mujeres adultos de más de 20 años fue de 7.5% y se encontraba entre las tres primeras causas de muerte de los adultos mayores, 14 y 19% en hombres y mujeres, respectivamente (ENSA, 2000). En la Fig.1 se muestra el porcentaje de diabetes en México en el año 2001 en un rango de edad de 20 a 69 años. La diabetes es la principal causa de demanda de consulta externa en instituciones públicas y privadas y uno de los principales motivos para la hospitalización. Es más frecuente en el medio urbano (63%) que en el rural (37%), en la Fig. 2 se muestra el porcentaje de mortalidad de personas con DM en el año 2001 (Moreno, 2001).



Fig.1. Porcentaje de diabetes en México 2001. El 8.2% de la población mexicana de entre 20 y 69 años la padece y cerca de 30% de los individuos afectados, desconoce que la tiene. Esto significa que en nuestro país existen de cinco a seis millones de personas enfermas, de las cuales poco más de un millón no han

sido diagnosticadas. Este hecho impide que los individuos que busquen tratamiento, o sabiéndose enfermos, no acudan a los servicios de salud, o lo hagan de manera irregular (SSA, DGE., 2001).



Fig. 2. Tasa de mortalidad causada por diabetes por cada 100 mil habitantes 2001. Anualmente se registran alrededor de 300 mil personas diabéticas y fallecen 40 mil aproximadamente. Por cada diabético que muere se detectan 13 nuevos casos. La mortalidad por DM es mayor en los estados del Norte que en los del Sur, los del Centro tienen un comportamiento intermedio y el DF se comporta como los Estados del Norte, es más frecuente en los grupos sociales con estilo de vida urbano (SSA, GDE., 2001).

Para el 2005 México ocupaba el décimo lugar a nivel mundial con un alto índice de personas con diabetes y se estima que para el año 2030 tenga el séptimo puesto (INEGI, 2005). Para el 2006, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) reportó una incidencia del 14%, lo que representa un total de 8 millones de personas con diabetes (ENSANUT, 2006).

2.2 Definición de Diabetes y Su Clasificación

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica caracterizada por altos niveles de azúcar en sangre, como resultado de defectos en la secreción o acción de la insulina (Koo *et al.*, 2011). Esta comprende un grupo heterogéneo de desordenes hiperglucémicos con dependencia genética que afecta al metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, asociada a una deficiencia absoluta o relativa de insulina, con grados variables de resistencia a ésta (Giogino *et al.*, 2005).

Existen varios tipos de diabetes, en 2004 la Asociación Americana de Diabetes, estableció la clasificación de diabetes de acuerdo a su fisiopatología en 4 categorías principales, entre las más importantes la diabetes tipo 1 (DT1) y tipo 2 (DT2), siendo esta última la de mayor relevancia en cuanto a epidemiología. Más del 90% de los pacientes diabéticos sufren DT2, esta es una enfermedad progresiva con inicio en edad adulta (Koo *et al.*, 2011).

La DT1 es llamada dependiente de insulina y se distingue por la destrucción selectiva de células β por apoptosis a través de procesos autoinmunes (Koo *et al.*, 2011) y ausencia absoluta de insulina, por lo que es necesario que a las personas con este padecimiento se les administre esta hormona. La DT1 se presenta con mayor frecuencia durante la infancia (aunque también puede ocurrir en adultos) (ADA, 2004)

La DT2, se considera no insulino dependiente (Koo *et al.*, 2011) y se caracteriza porque el páncreas continúa produciendo insulina en las primeras etapas de la enfermedad (ADA, 2004) y comúnmente se acompaña de resistencia a la insulina (ADA, 2004). La glucosa tiene como principales órganos blanco al tejido adiposo, músculo e hígado, en este padecimiento estos órganos responden pobremente a su actividad (Koo *et al.*, 2011). La resistencia a la insulina se encuentra habitualmente vinculada con otras comorbilidades como la hipertensión arterial y obesidad, e influenciado por los hábitos y estilo de vida tales como la ingestión exagerada de grasas saturadas y el sedentarismo (ADA, 2004), además de una reducción en síntesis y secreción de insulina causada por la disfunción y pérdida de las células β pancreáticas con tendencia progresiva, crónica e irreversible. (Koo *et al.*, 2011; ADA, 2004). La DT2 tiene mayor prevalencia en adultos (ADA, 2004).

Los factores de riesgo para desarrollar Diabetes se incrementan con la edad, la falta de actividad física, la presencia de diabetes gestacional, entre otras; además asociado con una fuerte predisposición genética (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003).

La diabetes está asociada con complicaciones a largo plazo como retinopatía, neuropatía, nefropatía y problemas vasculares (Sheetz y King, 2002). Los síntomas de diabetes están descritos por las 4Ps: Poliuria, secreción y emisión extremadamente abundantes de orina; Polidipsia, sed excesiva; Polifagia, hambre voraz o excesiva y Pérdida inexplicable de peso. Además de una glicemia casual (a cualquier hora del día

sin relación con el tiempo transcurrido desde la última ingesta de alimentos o bebidas) medida en plasma venoso \geq a 200 mg/dl (11.1 mmol/l). Glicemia en ayunas (definida como un período sin ingesta calórica de por lo menos 8 horas) medida en plasma venoso \geq a 126 mg/dl (7 mmol/l). Glicemia 2 horas después de una carga de glucosa, durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), medida en plasma venoso \geq a 200 mg/dl (11.1 mmol/l) (ADA, 2004). Aunque ésta se puede presentar de forma asintomática, por lo que el diagnóstico es dictado meses e incluso años después del inicio de la enfermedad. Sin embargo, el Comité de Expertos (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997 y The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003), reconoció un grupo intermedio de sujetos (prediabéticos) cuyos niveles de glucosa no pertenecía al grupo de criterios para diabetes, pero que el nivel de glucosa es alto para ser considerado normal. Este grupo está definido en la siguiente Cuadro.

Cuadro I. Valores de glucosa en sangre y su diagnóstico. The Expert (Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003)

Glucosa plasmática en ayunas (FPG)	Glucosa 2 h después en una prueba de tolerancia a la glucosa	Diagnóstico
<100 mg/dl (5.6 mmol/l)	<140 mg/dl (7.8 mmol/l)	Normal
100-125 mg/dl (5.6-6.9 mmol/dl)	140-199 mg/dl (7.8-11.1 mmol/dl)	Glucosa alterada en condiciones de ayuno (IFG)./ Glucosa alta al consumir glucosa 2 h antes.
\geq 126 mg/dl (7.0 mmol/l)	>200 mg/dl (11.1 mmol/l)	Diagnóstico provisional de Diabetes (prediabetes). Necesita ser confirmada

2.3 Anatomía y Fisiología del Páncreas

El páncreas es una glándula mixta de color gris rojizo y amarillento, se encuentra a la altura de la primera y segunda vertebras lumbares y por detrás del estómago y está cruzado por la línea transpilórica, su forma asemeja un martillo y se divide en

porciones, cabeza, que se extiende hacia la derecha y esta circundado por el asa duodenal, cuerpo, que se extiende horizontalmente hacia la izquierda, y cola, que se encuentra en contacto con el bazo (Crafts, 1989). Mide entre 16 y 20 cm de largo, de 4 a 5 cm de alto y de 2 a 3 cm de espesor en su cuerpo, su peso varía entre 60 y 90 gramos (Gray, 2010).

Esta glándula desempeña dos funciones una exocrina y una endocrina. Las secreciones exocrinas del páncreas son importantes en la digestión. El jugo pancreático consta de un componente acuoso, rico en bicarbonato, que ayuda a neutralizar el contenido duodenal y un componente enzimático, para la digestión de carbohidratos, proteínas y grasas. La secreción exocrina del páncreas está controlada por señales nerviosas y hormonales originadas sobre todo por la presencia de ácido y productos de digestión en el duodeno. Las secreciones endocrinas están dadas por los islotes de Langerhans que secretan hormonas que interactúan y regulan el metabolismo (Ganong, 2010).

En el humano, el páncreas cuenta con uno o dos millones de islotes de Langerhans, lo que corresponde entre 3 y 5% de la masa pancreática total, distribuidos de una forma aleatoria. Se encuentran organizados en torno a pequeños capilares, hacia los que vierten sus hormonas. La localización de los islotes está relacionada con su ontogenia, el desarrollo de islotes comienza a las 10 semanas de gestación y se cree continua hasta la niñez (Booner–Weir, 2000).

Los islotes están constituidos por cuatro tipos fundamentales de células: células β secretoras de insulina y amilina, que representan entre el 60 y 80% de la masa total del islote, células α secretoras de glucagon 17%, células δ secretoras de somatostatina 7% y células PP productoras de polipéptido pancreático (McClenaghan, 2007). Las cuales liberan sus secreciones dentro de la vena pancreática que después se une a la vena portal. Estas hormonas tienen diversas funciones en el organismo, entre las que destacan la regulación del metabolismo de carbohidratos. La masa de células β pancreáticas en el adulto está regulada por tres mecanismos: 1) replicación; 2) neogénesis; 3) apoptosis. La suma de los primeros menos la tercera da como resultado la masa total de células β pancreáticas. La contribución de cada uno de ellos es variable y puede cambiar en las diferentes etapas de la vida de acuerdo con cambios en la demanda metabólica (Rhodes, 2005).

2.4 Célula β y su Fisiología

En el páncreas se localizan los islotes constituidos principalmente por células β , las cuales se encargan de sintetizar y secretar insulina en respuesta a los nutrientes principalmente glucosa circulante y otros secretagogos como: Axedina-4, glibenclamida, leucina, etc. (Ravassard, 2011). Las células β tienen la capacidad incluso de responder a cambios sutiles en la concentración de glucosa. Diversas moléculas están involucradas en el mecanismo de secreción de la insulina, aunque la producción de ATP es uno de los eventos más importantes. Las alteraciones en la tasa de secreción de insulina se presentan durante el desarrollo del síndrome metabólico, resistencia a la insulina, obesidad y DT2. En estas condiciones muchos órganos y tejidos se ven afectados, al no disponer de glucosa para su metabolismo, situación que promueve que las células β pancreáticas aumenten la tasa de secreción de insulina, lo que conduce a un estado de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. Las células β tienen gran capacidad de adaptación a la carga metabólica aun en condiciones de obesidad y resistencia a la insulina, sin embargo si estas condiciones persisten puede ocurrir una disminución progresiva en la masa celular, debido probablemente a que la hiperglucemia postprandial e hiperlipidemia conducen a un estado de glucolipotoxicidad, con la subsecuente activación de mecanismos que incrementan la tasa de apoptosis de las células β , hecho que puede coincidir con el inicio de DT2 (González *et al.*, 2009; Ortega *et al.*, 2009).

2.5 Captación de glucosa a la célula β

La glucosa penetra a la célula por difusión facilitada, o al intestino y los riñones por transporte activo secundario por sodio. En músculos, grasa y otros tejidos, la insulina estimula el ingreso de glucosa a las células, al incrementar el número de transportadores de dicho carbohidrato en la membrana celular.

Los transportadores de glucosa (GLUT) que actúan por difusión facilitada a través de las membranas celulares, son una familia de proteínas muy similares que abarcan 12 veces la membrana celular y que dentro de la célula muestran sus terminaciones amino y carboxilo. Se han identificado 7 transportadores de glucosa representados en el Cuadro

II. Estos contienen 492 a 524 residuos de aminoácidos y varía su afinidad por la glucosa (Ganong, 2010)

Cuadro II. Transportadores de glucosa. (Ganong, 2010; Bermúdez *et al.*, 2007)

	FUNCIÓN	SITIOS PRINCIPALES DE EXPRESIÓN
GLUT 1	Captación basal de glucosa	Placenta, barrera hematoencefálica, encéfalo, eritrocitos, riñones espermatozoides y otros órganos.
GLUT 2	Censor de glucosa por la célula β , salida desde células epiteliales intestinales y renales	Células β , hígado, células epiteliales del intestino delgado, riñones y espermatozoides.
GLUT 3	Captación basal de glucosa	Encéfalo, placenta, riñones y otros órganos.
GLUT 4	Captación de glucosa estimulada por insulina	Miocardio y músculo de fibra estriada, tejido adiposo y otros tejidos.
GLUT 5	Transporte de fructosa	Intestino delgado, yeyuno músculo esquelético, testículo, riñón, tejido adiposo, cerebro y espermatozoides.
GLUT 6	Ninguna	Seudogén
GLUT 7	Transportador de glucosa 6 fosfato en el retículo endoplásmico	Hígado, otros tejidos.

La vía normal por la que la glucosa induce la secreción de insulina, comienza con el transporte de glucosa hacia el interior de la célula β por medio de GLUT-2. La fosforilación de glucosa en glucosa-6-fosfato por la glucocinasa y el metabolismo posterior, que implica la FAD-glicerofosfato deshidrogenasa (GDH) mitocondrial, resulta en la generación óptima de ATP. El aumento de ATP/ADP celular, el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP (K^{ATP}) y el incremento intracelular de Ca^{2+} activan la maquinaria de exocitosis que culmina en la secreción de insulina (Flatt *et al.*, 1997).

2.6 Mecanismos De Secreción De Insulina

Las células β del páncreas controlan de manera fina la síntesis y secreción de insulina en respuesta a la ingesta de alimentos. Estas células utilizan la concentración de glucosa circulante como un detector del estado nutricional. La glucosa estimula una elevación de los niveles de mRNA de insulina en células β en cultivo, esto se debe al incremento

en la transcripción del gen, de la maduración del pre mRNA y a la disminución en la degradación del mRNA de insulina. La insulina está contenida en gránulos de secreción localizados en las células β pancreáticas, formados en el complejo de Golgi como proinsulina (gránulos inmaduros). Los gránulos de secreción se han localizado en tres pozas: una cercana a la membrana plasmática con capacidad de secretar insulina inmediatamente y otras dos en el interior de las células una de ellas que se puede movilizar para liberar insulina y una más que constituye la poza de reserva. La glucosa estimula la movilización de los gránulos, del interior hacia la superficie de la célula y también de pozas localizadas justamente bajo la superficie celular. Las células β contienen una cantidad constante de insulina y presentan un balance controlado entre la secreción de insulina, biosíntesis de proinsulina y degradación de los gránulos. Cuando la glucosa extracelular se eleva, los transportadores de glucosa tipo 2 (GLUT2), en la superficie de las células β facilitan su incorporación hacia su interior. La glucosa se metaboliza por la vía glucolítica, en donde la etapa limitante es la fosforilación de la glucosa para formar glucosa-6-fosfato. Cuando la tasa de fosforilación se incrementa por aumento de la enzima hexocinasa 1, se acelera la glucólisis y el promotor de insulina se activa (LeRoith *et al.*, 2000). Como consecuencia del metabolismo de la glucosa, aumentan el ATP y la relación ATP/ADP, lo que induce el cierre de los canales K_{ATP} y con la despolarización de la membrana celular, los canales de Ca^{2+} se abren e incrementan la concentración de Ca^{2+} intracelular. La respuesta a esta elevación del calcio provoca que algunos gránulos acoplados y dispuestos, se fusionen y liberen insulina y que otros gránulos se movilen hacia la superficie. La secreción de insulina se da en dos fases, en la primera se libera la insulina de la poza cercana a la membrana plasmática. El primer pico se presenta de los 5 a 10 minutos después del estímulo con glucosa, seguida por una disminución en la secreción, sin que los niveles de insulina regresen a su valor basal después se eleva gradualmente, siempre que la glucosa esté presente (segunda fase). Esta segunda fase ocurre solo con estímulos de nutrientes y aparentemente representa la secreción de aquellos gránulos que se han movilizado para sustituir a los que ya están listos para liberar rápidamente la insulina. La liberación de insulina es pulsátil y se acompaña de oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} citoplásmico (Bergsten, 1998).

2.7 Mitocondria y Estrés Oxidativo en células β

La mitocondria es un organelo citoplasmático cuyo nombre proviene del griego mito (hilo) chondros (cartílago). Las mitocondrias presentan una estructura con dos compartimentos bien definidos matriz y espacio intermembranal delimitados por dos membranas interna y externa con características morfológicas, funcionales y de permeabilidad muy diferentes. La membrana interna se caracteriza morfológicamente por presentar invaginaciones (crestas) con multitud de complejos enzimáticos y proteínas que regulan el paso de metabolitos. Esta membrana resulta especialmente impermeable a iones, debido a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina y a la gran cantidad de bombas y transportadores específicos. Por el contrario, la membrana externa carece de crestas y, en condiciones fisiológicas, su permeabilidad es menos selectiva, gracias a la presencia de una proteína denominada porina o canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) que permite el paso de iones y metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6.000 Da (Tornero y Jordan, 2002).

Las mitocondrias tienen una función esencial en el aporte de energía para la célula, proveniente de los carbohidratos contenidos en los alimentos, a través de la fosforilación oxidativa. Las mitocondrias poseen la enzima piruvato deshidrogenasa, las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, las enzimas que catalizan la oxidación de ácidos grasos y las enzimas y proteínas redox que intervienen en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, de esta manera la mitocondria es un gran complejo enzimático que participa en el metabolismo de lípidos, y en la biosíntesis de uridina así como en la homeostasis del calcio. La función mitocondrial es fundamental para la proliferación celular y su supervivencia (Belizário, 2007).

La mitocondria cumple la gran meta de transformar y abastecer a la célula de energía. La glucosa se transforma a través de reacciones enzimáticas hasta piruvato y produce 2 moléculas de ATP y dos de NADH que se utilizarán en la mitocondria. El piruvato es oxidado hasta acetil-CoA, por la enzima piruvato deshidrogenasa mitocondrial produciendo equivalentes intermediarios o donadores como NADH y FADH₂, éstos no pueden cruzar la membrana mitocondrial, así que utilizan sistemas de intercambio con otros compuestos llamados lanzaderas, para llegar al interior de la membrana mitocondrial, donde luego de pasar a través de una serie de complejos ubicados en la membrana interna (I, II, III, IV y ATP sintasa), que forman la cadena de transporte de

electrones (CTE), se reducen a O_2 y agua y conducen a la síntesis de ATP (Brownlee, 2005). La energía obtenida a través de la transferencia de electrones a lo largo de CTE se utiliza para bombear protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal, creando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna denominado $\Delta\Psi$ (Stryer, 1995). Este gradiente electroquímico de protones permite a la ATP sintasa utilizar el flujo de H^+ que se genera a través de esta enzima para producir ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico, la suma de protones y electrones da como resultado el potencial de membrana mitocondrial. La cadena de transporte de electrones transporta tanto protones como electrones, transfiriendo electrones desde donantes hacia aceptores, y transportando protones a través de la membrana. Estos procesos utilizan moléculas de transferencias tanto solubles como unidas a proteínas. En la mitocondria, los electrones hidrosolubles, son transferidos por la proteína citocromo c dentro del espacio intermembranal, por la reducción y oxidación de un átomo de hierro que se encuentre en el grupo hemo de la proteína (Fariss, 2005).

Dentro de la membrana interna mitocondrial, el transportador de electrones liposolubles es la coenzima Q10 (Q) transporta tanto electrones como protones a través de un ciclo redox. Durante la transferencia de electrones a lo largo de los complejos, los electrones solitarios salen y como resultado hay una reducción de un electrón de oxígeno molecular lo que forma el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Belizário, 2007), (se estima que más del 1% del oxígeno consumido puede resultar en la formación de especies reactivas de oxígeno tales como anión $O_2^{\cdot-}$, principalmente en mitocondria. Además, esta producción de superóxido mitocondrial puede incrementarse significativamente si la tasa de transporte de electrones, está limitada por la acumulación de un gran gradiente de protones en la membrana mitocondrial interna (IMM). Tal acumulación de protones puede ocurrir por el suministro continuo de energía (producción de NADH) o con el deterioro funcional de una o más de los complejos de transporte de electrones (especialmente complejos I y III) (Fariss, 2005).

El $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial contribuye a la producción de ERO como peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El cual puede dar origen a otras ERO. El H_2O_2 en presencia de hierro produce radical hidroxilo altamente reactivo (Reacción de Fenton) (Belizário, 2007). Los sistemas enzimáticos no antioxidantes y antioxidantes se ven abrumados por las ERO y puede ocurrir daño y la muerte celular. Aunque la producción de energía es una función

importante de las mitocondrias, estos orgánulos también participan en el inicio y ejecución de la muerte celular por apoptosis o necrosis (Fariss *et al.*, 2005).

2.8 Las ERO son potentes promotores de apoptosis.

La acumulación de ERO en las mitocondrias es resultado del balance entre dos procesos: (a) la producción de radicales por reacciones redox en la membrana mitocondrial interna y (b) eliminación de los mismos por mecanismos antioxidantes conocidos. Entre los sistemas antioxidantes, el dependiente de glutatión (GSH/GSSG), es el más importante, sin embargo se debe tener en cuenta que la reducción del GSH produce la apertura del PMPT, un efecto apoptogénico. El PMPT tiene dos mecanismos sensibles a ERO, uno que se equilibra con el GSH de la matriz, y otro que es directamente inactivado por ERO. La sobreproducción de ERO puede también ser consecuencia de una expresión exagerada de la proteína p53 o de la acción de la ceramida. Otro factor importante en el inicio de apoptosis es el óxido nítrico (NO) y su derivado el peroxinitrito. La producción fisiológica de NO es catalizada por la NO sintasa, enzima inducida por citocinas en varias estirpes celulares. Uno de los efectos del NO es la inhibición de la citocromo oxidasa mitocondrial, por lo que estimula la producción de ERO. En cerebro la inhibición de esta enzima, induce la liberación de ácido glutámico responsable de la toxicidad del NO en esas células. El NO inhibe además la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo I, efecto que se explica por nitrosilación de grupos tioles. Adicional a esto, en presencia de anión superóxido el NO produce peroxinitrito que puede inhibir a la aconitasa, la creatina cinasa, y aumentar la salida de protones al citosol. Estos efectos conducen a la apertura del PMPT y al inicio de la apoptosis (Dubin, 2000)

Las mitocondrias sirven como un barómetro que evalúa los cambios celulares y viabilidad relacionados con la fosforilación oxidativa, el inicio de la permeabilidad transicional mitocondrial, aumento de las concentraciones de Ca^{2+} libre, la biodisponibilidad de hierro, y el daño por oxidación de los componentes mitocondriales. Con base en los conocimientos actuales sobre la función mitocondrial, no es de sorprender que el estrés oxidativo esté relacionado con la etiología de enfermedades como: hígado graso no alcohólico, isquemia-reperfusión, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, envejecimiento y muchas otras (Fariss *et al.*, 2005).

2.9 Apoptosis

La apoptosis implica una programación genética de la célula que promueve una cascada dependiente de energía de cambios morfológicos y bioquímicos en el interior de la célula (Cascales, 2003). El proceso apoptótico es utilizado por los organismos multicelulares para eliminar células dañadas o no necesarias sin afectar a las células vecinas (Dubin, 2000).

La apoptosis juega un papel esencial en el desarrollo embrionario, especialmente en el desarrollo del sistema nervioso, donde el número de neuronas depende de la eliminación de muchas células mediante este proceso, además se eliminan por apoptosis las células de las regiones interdigitales para dar lugar a los dedos. (Porras, 2010) e interviene en la senilidad, la formación de queratocitos, la renovación del epitelio de las membranas mucosas, la atrofia de órganos después de la eliminación de las hormonas tróficas, como consecuencia de castración y la muerte de neutrófilos (Dubin, 2000).

Los organismos multicelulares están constituidos por un número predeterminado de células, que es característico para cada especie. Ese número resulta de la suma de dos procesos; la multiplicación celular y la muerte y eliminación de un número igual de células redundantes. El desequilibrio de esos procesos determina efectos que pueden ser letales, sea por exceso en la destrucción celular o la conservación de estas.

Apoptosis es el término más usado como referente de muerte celular programada y su etimología proviene del griego y significa la caída otoñal de hojas y pétalos (Kerr, 1972; Gómez, 1998; Jordan, 2003). La apoptosis según Kerr Wyllie y Currie (1972) es un término descriptivo que define un tipo o muerte celular, con diversas características morfológicas, tales como: colapso celular, reducción del volumen citoplásmico, condensación de la cromatina (picnosis), desintegración y desaparición del núcleo (cariorrhexis), fragmentación internucleosomal de DNA en patrón de escalera (fragmentos específicos de 200 a 180 bp o múltiplos de ellos (Vaux, 1999; Leist, 1997; Gómez, 1998) Porras, 2010). En el catabolismo lipídico, se produce ácido araquidónico, ceramidas y metabolitos derivados, se observan también cambios en la distribución de lípidos de la membrana plasmática. Un fosfolípido normalmente presente sólo en la cara interna de la bicapa lipídica, la fosfatidilserina, se transloca a la cara externa, donde constituye una señal para que la célula apoptótica sea reconocida y fagocitada por

células vecinas o macrófagos, previniendo así una reacción inflamatoria (Ortega, 2001; Porras, 2010).

La degradación proteolítica que se observa en la apoptosis requiere de energía en forma de ATP y de la acción de proteasas específicas conocidas como caspasas (Lizarbe, 2007). Las caspasas son proteasas dependientes de tioles (residuos de cisteína), caracterizadas por su especificidad para hidrolizar péptidos y proteínas en la cercanía de residuos aspárticos. Su especificidad catalítica originó el término “caspasa” en el que la “c” representa al residuo cisteína de la enzima y “aspasa” representa residuos aspárticos de la proteína sustrato. (Cohen, 1997; Thornberry, 1998). Éstas se engloban en tres grupos: caspasas implicadas en la producción de citocinas (caspasas 1, 4, 5 y 13), caspasas de señalización o de activación de otras caspasas (caspasas 2, 8, 9 y 10) y caspasas efectoras de muerte o ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) (Jordan, 2003). Existen por lo menos tres vías de activación para las caspasas. La primera requiere de otras caspasas; la segunda, ocurre a través de receptores de muerte de la familia del TNFR/NGFR y la tercera involucra la traslocación del citocromo c.

La apoptosis puede ser inducida por diversos estímulos como son: ausencia de factores de crecimiento, factores tróficos, glucocorticoides, radiaciones y activación de receptores de muerte (Ortega, 2001).

Existen dos rutas principales de activación de la apoptosis, la vía extrínseca e intrínseca estas se muestran en la Fig.3 (Leibowitz, 2010). La primera inicia en la membrana a nivel de receptores de muerte, que al unirse a determinadas proteínas extracelulares (ligandos) desencadenan la activación de las caspasas. La segunda vía se inicia en respuesta al daño celular causado por radiación o determinados compuestos tóxicos (Porras, 2010), además de estrés oxidativo (Gómez, 1998).

2.9.1 Vía extrínseca

Una de las principales vías que inicia la apoptosis en las células de los mamíferos son los receptores de superficie celular que transmiten las señales de apoptosis y son activados por ligandos de muerte específicos. Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral y el receptor del factor de necrosis neural, respectivamente (TNFR/NGFR), que contienen un dominio

extracelular rico en cisteínas y una secuencia homóloga citoplásmica llamada dominio de muerte. Los receptores de muerte mejor caracterizados son Fas y TNFRI. El Fas se expresa en diversos tejidos como: timo, pulmón, hígado, corazón, riñón, ovario y linfocitos maduros. La interacción receptor-ligando (Fas/FasL) participa en procesos fisiológicos. Igual que otros miembros de la familia TNF, FasL es una molécula homotrimérica, por lo que se sugiere que cada trímero de FasL se une a tres moléculas de Fas. Esta unión promueve la oligomerización del receptor, e inmediatamente después la proteína adaptadora llamada FADD (dominio de muerte asociado a Fas o Mort 1), se asocia al dominio de muerte del receptor. La proteína FADD se une a través de su propio dominio efector de muerte a la procaspasa 8 que conduce a su activación. La caspasa 8 (conocida como FLICE o MACH) es la responsable de activar a otras caspasas.

En el caso del TNF, los receptores de esta citocina se encuentran presentes en todas las células del cuerpo, cuando las células tumorales o existe una infección viral el programa de muerte se cumple.

En algunos tipos celulares el TNF puede inducir apoptosis por dos vías: la primera es a través de la asociación con el receptor de muerte y la subsecuente activación de la caspasa 8. La segunda al inducir cambios en el potencial de la membrana mitocondrial con la producción de radicales libres, ceramidas vía hidrólisis de la esfingomielinina1 y la activación de una proteasa semejante a la caspasa 3 (Ortega, 2001)

2.8.2 Vía intrínseca

Las mitocondrias tienen una función de vital importancia para el proceso apoptótico. De tal forma que, una vez que se rompe la homeostasis mitocondrial, existe un desequilibrio fisiológico (Gómez, 1998), que incluye alteraciones en la permeabilidad de la membrana interna y como consecuencia la caída transitoria del potencial de membrana. Se observa además la inhibición de la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP, rompimiento de las membranas mitocondriales con liberación de proteínas solubles tanto de matriz mitocondrial como del espacio intermembranal tal como el citocromo c (Dubin, 2000). Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial afectan a la cadena respiratoria e incrementan el flujo de electrones

desapareados y por lo tanto la producción de radicales libres. Este aumento, principalmente de formas reactivas de oxígeno conduce a estrés oxidativo inespecífico con el consecuente deterioro oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Esta serie de eventos constituyen la señal para iniciar la activación de una cascada de caspasas (Gómez, 1998).

Así la vía intrínseca inicia con la desestabilidad de la mitocondria y la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PMPT). Estos efectos facilitan la salida de iones de calcio de la matriz mitocondrial al citosol, colapso del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), aumento en la producción de radicales libres de oxígeno y la disminución de GSH (glutati6n reducido), de ATP y de ADP en la matriz mitocondrial (Dubin, 2000).

Los cambios mitocondriales son efectuados por productos g6nicos de Bcl-2 (Nuñez, 1994) una familia de proteínas estructurales y funcionales, descubierta por alteraciones genéticas en las células B de linfomas, esta familia de proteínas se caracteriza por la presencia de por lo menos una homología de dominio Bcl-2 (BH). Estas proteínas se dividen en tres subfamilias en base a su funci6n y estructura. Los miembros anti-apopt6ticos son Bcl-2, Bcl-XL, MCL-1, Bcl-w y A1/Bfl1. Las proteínas pro apopt6ticas son Bad, Bak, Bax, NOXA y PUMA. Finalmente, la tercera subfamilia BH3, llamada así porque su homología de secuencia con el resto de la familia se limita al dominio BH3-solo, responsable en gran parte de detectar y transmitir seÑales apopt6ticas a otros miembros de la familia Bcl-2. En familia Bcl-2 la subfamilia antiapopt6tica se encarga de mantener cerrados los canales mitocondriales, mientras tanto la subfamilia proapopt6tica genera la ruptura de la membrana mitocondrial formando orificios o poros (PMPT) e iniciando la apoptosis (Leibowitz, 2010).

La activaci6n de las proteínas proapopt6ticas Bax y Bak conduce a la permeabilizaci6n de la membrana externa mitocondrial y liberaci6n de de otras proteínas proapopt6ticas, entre ellas citocromo c, Smac/Diablo y AIF (Factor inductor de la apoptosis), en respuesta al estímulos de muerte. La liberaci6n de estas proteínas al citosol induce la activaci6n de caspasas ya sea a través de la formaci6n del complejo citocromo c/Apaf-1/pro-caspasa-9 llamado apoptosoma, o a través de la inhibici6n de los IAPs por Smac/Diablo (Leibowitz, 2010). La activaci6n de las caspasas ejecutoras como caspasa 3, inicia la degradaci6n del DNA a través de DNAsas; aunado a esto el mecanismo de

reparación del DNA a cargo de PARP se anula, debido a que la caspasa 3 hidroliza e inhibe las funciones de PARP (Dubin, 2000).

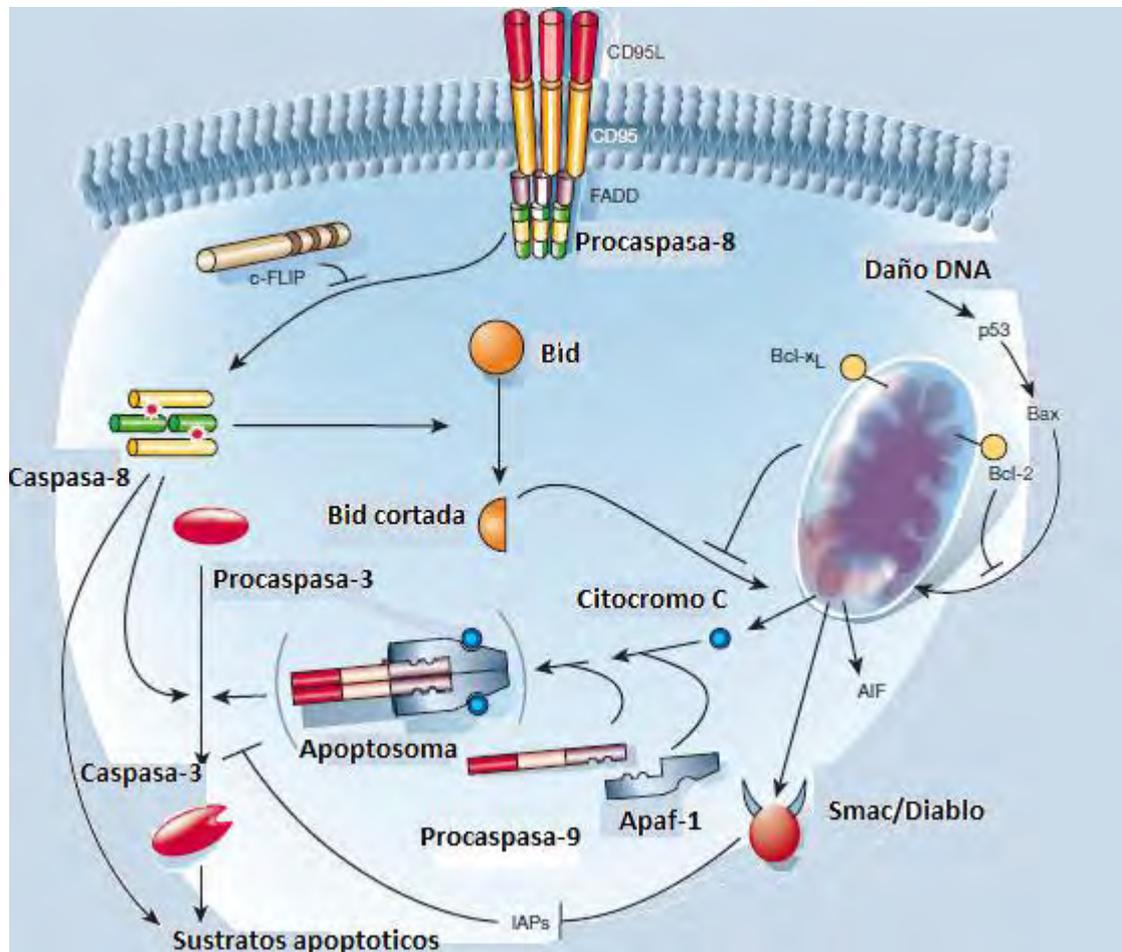


Fig.3. Representación de las vías extrínseca e intrínseca del proceso apoptótico (Modificada de Hengartner, 2000).

2.10 Apoptosis: importancia fisiopatológica

Las patologías relacionadas con la apoptosis se pueden clasificar en dos grandes grupos Tabla1: (a) las asociadas con la inhibición de la apoptosis y (b) las asociadas con la activación de la apoptosis.

Tabla 1. Incluye enfermedades en las que el papel de la apoptosis parece importante (Dubin, 2000).

Enfermedades dependientes de activación de la apoptosis	Enfermedades dependientes de inhibición de la apoptosis
1. Enfermedades neurodegenerativas	1. Cáncer: Linfomas; Carcinomas con mutación del gen p53; Cáncer de mama; Cáncer de próstata; Cáncer de ovario.
2. SIDA	2. Enfermedades autoinmunes
3. Displasias medulares (anemia aplásica)	Lupus eritematoso sistémico
4. Reperfusión post-isquemia	Glomerulonefritis
5. Intoxicaciones por fármacos y xenobióticos	3. Virosis: Herpes; Poxvirus; Adenovirus

Tabla 1. Se muestran algunas enfermedades por activación o inhibición de apoptosis.

2.11 Apoptosis en células β

La exposición a niveles altos de glucosa provoca el deterioro de la función de las células β , esto ha sido *demonstrado in vitro e in vivo* (Kaneto *et al.*, 1999, Marshak *et al.*, 1999; Kahn *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2003; Robertson y Harmon, 2006). Durante los estados iniciales de la hiperglucemia hay una reducción en el número de células β pancreáticas, las células restantes incrementan su sensibilidad a la glucosa y aumentan la producción y secreción de insulina para prevenir la hiperglucemia en ayuno (Maechler *et al.*, 1999). Posteriormente durante los estados crónicos de la hiperglucemia, se agota la capacidad de respuesta de las células β y en un tiempo no muy largo existe una disminución de células β resultado del incremento en la tasa de apoptosis (Kahn *et al.*, 2001; Butler *et al.*, 2003; Steppel y Horton, 2004; Leahy, 2008).

El aumento compensatorio en la secreción de insulina en el estado de resistencia a la acción de la insulina, se debe a la expansión en la masa de células β y a las alteraciones en la expresión de enzimas clave para el metabolismo de glucosa. Las ratas obesas Zucker no incrementan adecuadamente la masa celular durante la resistencia a la insulina; esto aparentemente, no se debe a fallas en la proliferación, sino más bien a un

aumento en la tasa de muerte de las células β , presumiblemente por apoptosis (Roche, 2003).

Se ha demostrado que la insulina regula vías de señalización importantes para la preservación de la función normal de las células β , lo que aumenta la posibilidad de que la resistencia a la insulina en las células β , se desarrolle al mismo tiempo que en músculo, tejido adiposo e hígado, lo que podría contribuir directamente a la disfunción de la célula β (Satiel et al., 2001). Los islotes muestran una reducción en la transcripción del gene de insulina, lo que puede deberse en parte, a una disminución en la acción de la hormona en este tejido, lo que indica que la activación del gene de insulina es un efecto importante de la insulina (Bell y Polonski, 2001).

En condiciones de hiperglucemia, las células β presentan un incremento en la expresión de genes y proteínas proapoptóticas como Bad, Bid y Bik (Donath, 1999; Mathis et al., 2001), aumento de la expresión de Fas y activación de caspasas 8 y 3, eventos que correlacionan con la fragmentación oligonucleosomal del DNA (Thomas, 2002). Otro estudio, realizado para evaluar los cambios en la expresión de genes de estrés, que acompañan la hipertrofia de las células β en ratas pancreatectomizadas durante 4 semanas, demostró un aumento marcado en la expresión de genes antioxidantes como: hemooxigenasa 1, glutatión peroxidasa y el gene antiapoptótico A20, cambios sutiles en la expresión de la superóxido dismutasa y disminución de Bcl-2. Otros genes no mostraron ningún cambio (catalasa, proteínas de choque calórico 70 y p53), por lo que concluyen que la adaptación de las células β a la hiperglucemia incluye un aumento en la demanda de secreción de insulina y de la expresión de genes que protegen del estrés, lo que puede contribuir a la supervivencia de las células β hipertróficas (Laybutt *et al.*, 2002). Estos estudios apoyan la idea de que las vías de señalización que conducen a la apoptosis de la célula β , pueden estar localizadas en la mitocondria (Mathis, 2001).

El estrés oxidante generado en la mitocondria, durante la hiperglucemia a través de las vías antes mencionadas, se reconoce como un factor primordial que contribuye al desarrollo de varias de las complicaciones diabéticas, dado que el aumento de ERO es capaz de dañar muchos componentes celulares incluyendo el DNA y desencadenar la muerte celular. Se ha demostrado que las células β bajo concentraciones altas de glucosa poseen un nivel elevado de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (marcador de estrés oxidativo) (Kaneto *et al.*, 1999).

El páncreas, cuenta con un sistema de defensa intrínseca relativamente débil contra el estrés oxidativo. (Kaneto *et al.*, 1999). Los pacientes diabéticos tienden a bajar las defensas antioxidantes gracias a la hiperglucemia (West, 2000) Sin embargo el tratamiento de ratones db/db diabéticos y no diabéticos con antioxidantes disminuye de manera importante la tasa de apoptosis en las células β (Kaneto *et al.*, 1999; Donath *et al.*, 1999; Maechler *et al.*, 1999). Muchos estudios clínicos sugieren que los pacientes con DT2 están sujetos a estrés oxidativo crónico. (Robertson *et al.*, 2004). Las evidencias más convincentes sobre la participación de apoptosis en la eliminación de células β en DT2, se tienen con experimentos realizados en gerbos *Psammomys obesus*, los cuales no desarrollan la enfermedad de forma natural, pero sí por dieta. La enfermedad comienza con un estado de resistencia a la insulina que se caracteriza por tener hiperinsulinemia, que en algunos casos logra mantener la normoglucemia, pero normalmente termina en hipoinsulinemia y por lo tanto en hiperglucemia. Durante el desarrollo de la hiperglucemia, se observa un incremento en la apoptosis, que culmina en daño severo en la arquitectura del islote. Este incremento en la muerte de la célula β puede resultar de la hiperglucemia, (Santangelo *et al.*, 2007) como sugieren los estudios *in vitro* de islotes de gerbos cultivados con concentraciones altas de glucosa (Donath *et al.*, 1999).

Estudios realizados en ratas Zucker obesas diabéticas (fa/fa) demuestran que el contenido de ácidos grasos libres (AG) en los islotes es 100 veces más alto que en animales delgados y proponen que pueden estar involucrados en la tasa de apoptosis. El cultivo de islotes pancreáticos de rata Zucker prediabética con AG libres (1mmol/l), mostró un aumento de hasta 4 veces en el índice de apoptosis; mismo que se asoció con un incremento de ceramida. Por otro lado los AG libres también inducen un aumento en la expresión de la óxido nítrico sintasa (NOS) y de óxido nítrico (NO), los cuales también son inductores de la muerte por apoptosis (Ceriello *et al.*, 2002). La apoptosis de forma fisiológica también puede ser inducida por otras proteínas como p53, esta proteína es un regulador muy importante de la proliferación y muerte celular (Maillet, 2002 y Fernández, 2004).

2.12 Estructura y Función De p53

El gen p53 ha sido llamado "el guardián del genoma" (Lane, 1992; Ríos y Hernández, 2001; Khoury y Bourdon, 2010). Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p1.3) en humanos y está constituido por 11 exones, de los cuales el exón 1 contiene una secuencia no-codificante; en el exon 2 existen dos sitios putativos de inicio de la transcripción y el exón 11 contiene el codón de terminación y una gran secuencia no codificante (Fernández, 2004). Este gen sintetiza una proteína, del mismo nombre (Ríos y Hernández, 2001), de 393 aminoácidos con tres dominios funcionales: un dominio amino-terminal (N-), implicado en la activación transcripcional (residuos 1-60) y donde se localiza una subregión rica en prolinas que contiene 5 copias de la secuencia PXXP (residuos 20-97); un dominio central que contiene la secuencia específica de unión al DNA, constituye además la región más conservada de la proteína (residuos 100-300), presenta una estructura de dos hojas β y un átomo de zinc que estabiliza la estructura; y el dominio carboxilo-terminal (C-) que está constituido por una región flexible (residuos 300-325), una zona de tetramerización (residuos 325-355) y un extremo básico (363-393). La proteína p53 se representa en la Fig.4 (Fernández, 2004).

La proteína p53 mantiene la integridad y estabilidad del genoma por dos mecanismos, el primero implica la pausa del ciclo celular (Fernández, 2004) regulando la proliferación en la mayoría de estirpes celulares (Maillet, 2002) y el segundo la inducción de la muerte de la célula (Fernández, 2004). Tanto la pausa en el ciclo celular como la inducción de apoptosis requieren de activación transcripcional mediante la unión de p53 a una secuencia específica de transactivación (SST sequence specific transactivation) del DNA (Maillet, 2002).

La proteína p53 (Fig. 4) es muy lábil con una vida media de pocos minutos entre (15 y 20 min aproximadamente). Sin embargo, la vida media y la regulación de su actividad biológica puede aumentar por mecanismos postraduccionales (Fernández, 2004).



Fig. 4. Estructura de la proteína p53 y sus dominios. Proteína compuesta por 393 aminoácidos divididos en cuatro áreas diferentes: el dominio de activación en el extremo N-terminal, la secuencia de DNA específica dominio de unión en el núcleo, el dominio de tetramerización, y la unión al DNA dominio no específico en el extremo C-terminal, esta proteína puede unirse al DNA a través de ambas secuencias específicas (dominio básico) y no específica (dominio C-terminal) (Tafvizi, 2011).

2.12.1 p53 Función no transcripcional

Las evidencias sugieren que p53 induce la muerte celular por diversas vías moleculares incluyendo la transactivación de genes y la directa señalización apoptótica. Sin embargo existen evidencias que sostienen que una fracción de p53 sale del núcleo y migra hasta la membrana mitocondrial transpasando el citoplasma. En la membrana mitocondrial se encuentran las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL (antiapoptóticas) y son las protectoras de la estabilidad de la membrana mitocondrial externa previniéndola de las señales tempranas de apoptosis. La proteína p53 puede enlazarse con Bcl-2 y Bcl-xL (proteínas anti apoptóticas) y permitir el acercamiento y la acción de Bax o Bak (proteínas pro apoptóticas) que se encargan de romper la membrana y hacer poros lo que resulta en la pérdida del potencial de la membrana y en la liberación de citocromo c (Marchenko, 2000).

2.13 Estructura y Función De PARP-1

La enzima responsable de la síntesis de poli-ADP-ribosa fue nombrada PARP. La cual fue llamada a finales de 1980 PARP-1 anteriormente conocida como poly-ADP-ribosa sintetasa o poli-ADP-ribosil transferasa (Hassa *et al.*, 2006). PARP es una enzima nuclear de 116 kDa, que cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa empleando

como sustrato NAD^+ , sobre residuos carboxílicos de ácido glutámico y aspártico de proteínas nucleares (Suzuki *et al.*, 1986; D'amours *et al.*, 1999; Martin, 2005).

La proteína PARP-1 estructuralmente se divide en seis dominios (A, B, C, D, E y F), aunque solo se conoce la función de cuatro de ellos (A, B, D y F) Fig.5. El dominio estructural A o dominio de unión al DNA (DBD, DNA Binding Domain), situado en el extremo amino terminal, este dominio permite la interacción PARP-1 -DNA, lo cual estimula la actividad catalítica de la enzima (Lindahl *et al.*, 1995, Caldecott *et al.*, 1996). Esta interacción se realiza a través de dos estructuras en dedos denominadas FI y FII. Dentro de este dominio también se encuentra la señal de localización nuclear (NLS, del inglés Nuclear Localizations Sequence), o dominio estructural B además de la secuencia diana de la caspasa-3 responsable de la proteólisis de PARP-1 (Kaufmann *et al.*, 1993, Lazebnik, 1994). De los dominios C y E se desconoce su función. Se cree que los motivos HTH (Helix Turn Helix) presentes en el dominio C pueden también actuar como enlace entre la proteína y el DNA. De tal manera que se ha sugerido que esta estructura HTH podría mediar la unión de PARP-1 al DNA no dañado, sin que por ello se produzca la activación catalítica de la proteína (D'amours *et al.*, 1999). El dominio de automodificación o dominio estructural D, comprende la mayoría de los residuos de ácido glutámico que son modificados por poli-ADP-ribosilación. También contiene otros motivos (secuencias comunes de aminoácidos con secuencias de pliegues bien conocidas) de gran importancia en la proteína, tales como los motivos de cremallera de leucina (LZ, Leucine Zipper) supuestamente implicados en la homo- o heterodimerización de la enzima, y el motivo BRCT (BRCA1 C-terminal) a través del cual PARP-1 podría interaccionar con diferentes proteínas, tales como factores de transcripción (NF- κ B, Ying-Yang-1 y Oct-1) y proteínas asociadas con la reparación de DNA (histonas, XRCC1 y DNA polimerasa β). El dominio C-terminal o dominio catalítico F es el más conservado en la escala filogenética, revelando relaciones evolutivas con otras enzimas ADP-ribosil transferasas. Presenta una estructura terciaria idéntica a otras mono-ADP-ribosil transferasas alternando estructuras de láminas- β con hélices- α (Ruf *et al.*, 1996 y 1998) en donde se une el NAD^+ . La estructura de PARP se muestra en la Fig.5 (Amé *et al.*, 2004).

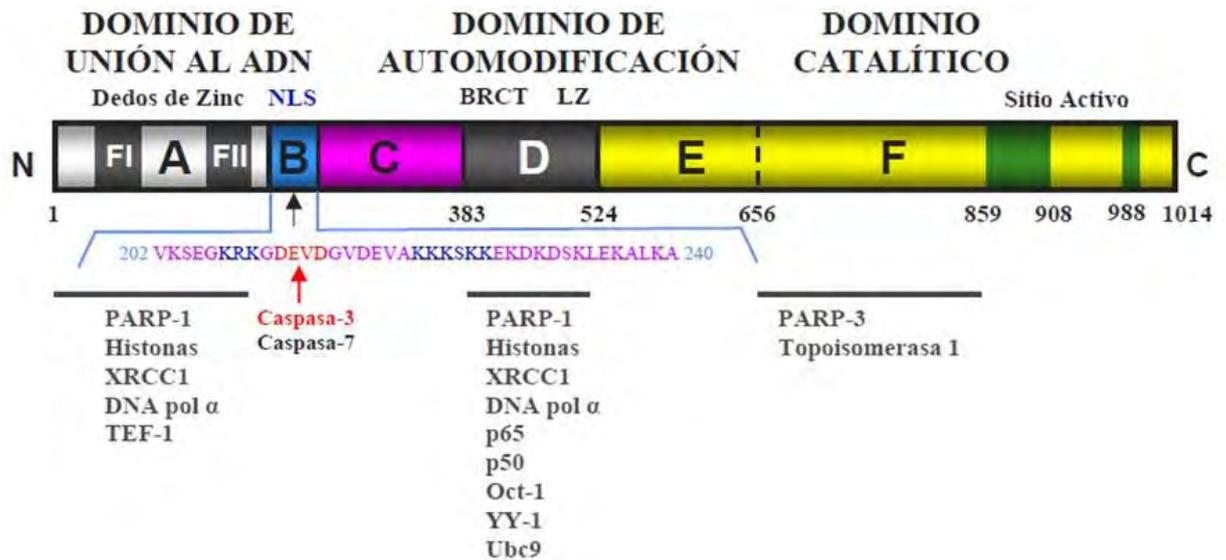


Fig.5. Dominios estructurales de la proteína PARP-1. DBD, dominio de unión al DNA; FI y FII, estructura en dedos de Zinc; secuencia de localización nuclear NLS; dominio de automodificación y dominio catalítico, motivo BRCT, BRCA (like C terminus lugar donde cortan las caspasas 3 y 7); LZ, estructura de cremallera de leucina. Además se muestran los posibles sitios de interacción con otras proteínas.

Función

PARP-1 es una proteína de detección de daños en el DNA (Fig.6), que presenta la capacidad de unirse a roturas simples así como a las de doble cadena, producidas por agentes genotóxicos como: radiación ionizante, radicales libres, inhibidores de la topoisomerasa I y II y los agentes alquilantes. Así mismo actúa como una proteína de señalización a los complejos de reparación del daño inducido en el DNA.

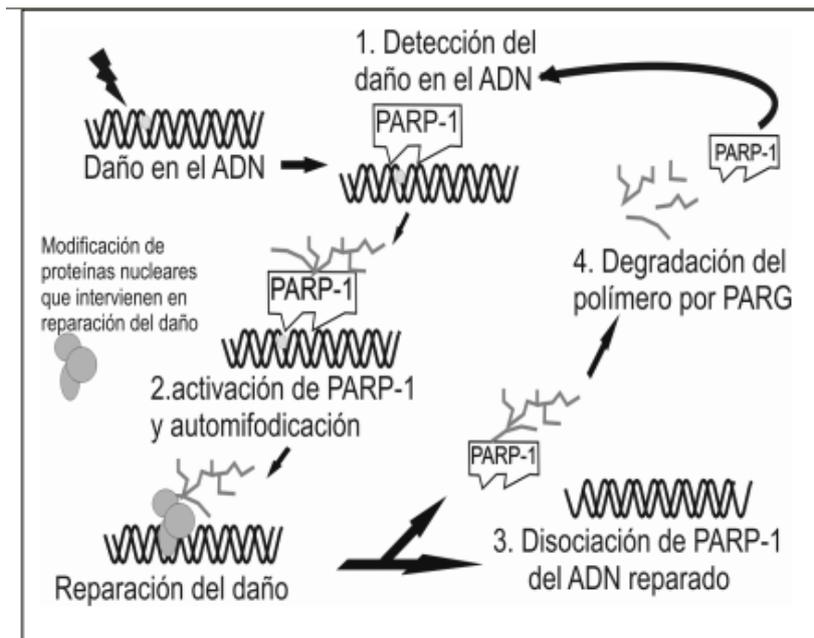


Fig.6. Una vez detectado el daño PARP-1 se une al DNA, activando e iniciando la síntesis del polímero y la modificación postranscripcional de una serie de proteínas implicadas en la reparación del mismo. Los niveles constitutivos del polímero son normalmente muy bajos en células sin estimular; en presencia de daño en el DNA los niveles pueden aumentar entre 100 y 500 veces sobre su nivel basal. La auto modificación de PARP-1 regula su actividad enzimática y su unión al DNA (Martin, 2005). Se ha propuesto un modelo para explicar la disociación de la proteína de las zonas de unión al DNA tras su auto modificación. El modelo se basa en la repulsión electrostática ocasionada por auto modificación de la propia PARP-1 mediante el polímero, lo que le confiere una gran carga negativa a la enzima produciendo su inactivación y electro repulsión entre PARP-1 y el DNA. A continuación la enzima PARG llevaría a cabo la degradación del polímero, esto permite de nuevo que la enzima PARP-1 esté lista para un nuevo ciclo de activación en respuesta a daños en el DNA (D'amours *et al.*, 1999)

PARP-1 está involucrada en diversos procesos tales como reparación y replicación de DNA, transcripción génica, muerte celular y respuesta inflamatoria. (Martin, 2006). Se ha demostrado la participación de PARP-1 durante la reparación del DNA en los procesos de reparación por escisión de bases (BER, del inglés, *Base Excision Repair*) y reparación de daños de cadena simple (SSBR, del inglés, *Single Strand Break Repair*). El papel de PARP-1 en la reparación del DNA dañado se debe a su capacidad de modificar de forma transitoria, mediante la poli-ADP-ribosilación, proteínas que interviene en la estructura de la cromatina (especialmente histonas), modificando la estructura de la cromatina, haciéndola de esta forma más accesible a las proteínas que participan en el complejo de reparación de DNA. Además PARP-1 también participa en el reclutamiento y regulación de las proteínas que forman parte de este complejo como XRCC1, DNA polimerasa β y la DNA ligasa III (Martin, 2005).

Numerosos estudios han demostrado que durante la replicación del material genético, el metabolismo de la poli-ADP- ribosa se encuentra acelerado en el núcleo celular, aunque el mecanismo de PARP-1 en la regulación de la replicación del DNA, no se conoce aún con exactitud; pero algunos trabajos sugieren que PARP-1 podría formar parte del multicomplejo proteico encargado de la replicación (*MRC, Multiprotein Replication Complex*). En este sentido se sabe que PARP-1 copurifica junto a DNA polimerasas α y β , DNA primasa, DNA helicasa, DNA ligasa, Topoisomerasa I y II. Algunas de estas proteínas, pueden además, modificarse por Poli-ADP-ribosilación, tales como la Topoisomerasa I y II y DNA polimerasas α .

Por otro lado se ha demostrado que PARP-1 puede unirse a ciertas estructuras del DNA aun en ausencia de daño, además de que interacciona con diferentes factores de transcripción y estudios recientes indican que regula la transcripción génica. PARP-1 tiene un efecto dual en la regulación de la transcripción, de tal forma que la puede estimular o reprimir, esto a través de tres procesos no excluyentes entre sí como son: 1) la alteración de la estructura de la cromatina a través de la modificación de histonas y proteínas HMGs; 2) al actuar como coactivador o como correpresor al interactuar físicamente con factores de transcripción y 3) al unirse a secuencias reguladoras o promotoras de distintos genes (Martin, 2005).

2.14 Mecanismo De Poli ADP ribosilación

La activación de PARP-1 promueve tanto la síntesis de mono como de poli-ADP-ribosa, para lo que requiere de NAD^+ como precursor e inmediato sustrato de la reacción (Hassa *et al.*, 2006). De tal manera que el incremento en la actividad de PARP conduce al abatimiento de los niveles de NAD^+ , lo que afecta en forma directa el aporte energético a la célula, siendo motivo suficiente para iniciar el proceso de muerte. Adicional a esto, la disminución de NAD^+ también tiene consecuencias negativas sobre la actividad de SIRT-1, una desacetilasa que regula el metabolismo y la sobrevivencia de la célula por lo que su deficiencia también puede causar muerte celular (Xia *et al.*, 2009).

La formación del polímero de ADP-ribosa requiere de tres etapas básicas: primero: mono-ADP- ribosilación del sustrato; segundo: etapa de elongación del polímero; y

tercero: ramificación del mismo. Para ello PARP-1 posee estas tres actividades enzimáticas representadas en la Fig.7. La degradación del polímero sintetizado se lleva a cabo por la poli-ADP-ribosa glicohidrolasa (PARG) y la poli-ADP-ribosa liasa. La primera de ellas es responsable de la hidrólisis de enlaces glucosídicos mientras que la segunda hidroliza los enlaces éster.

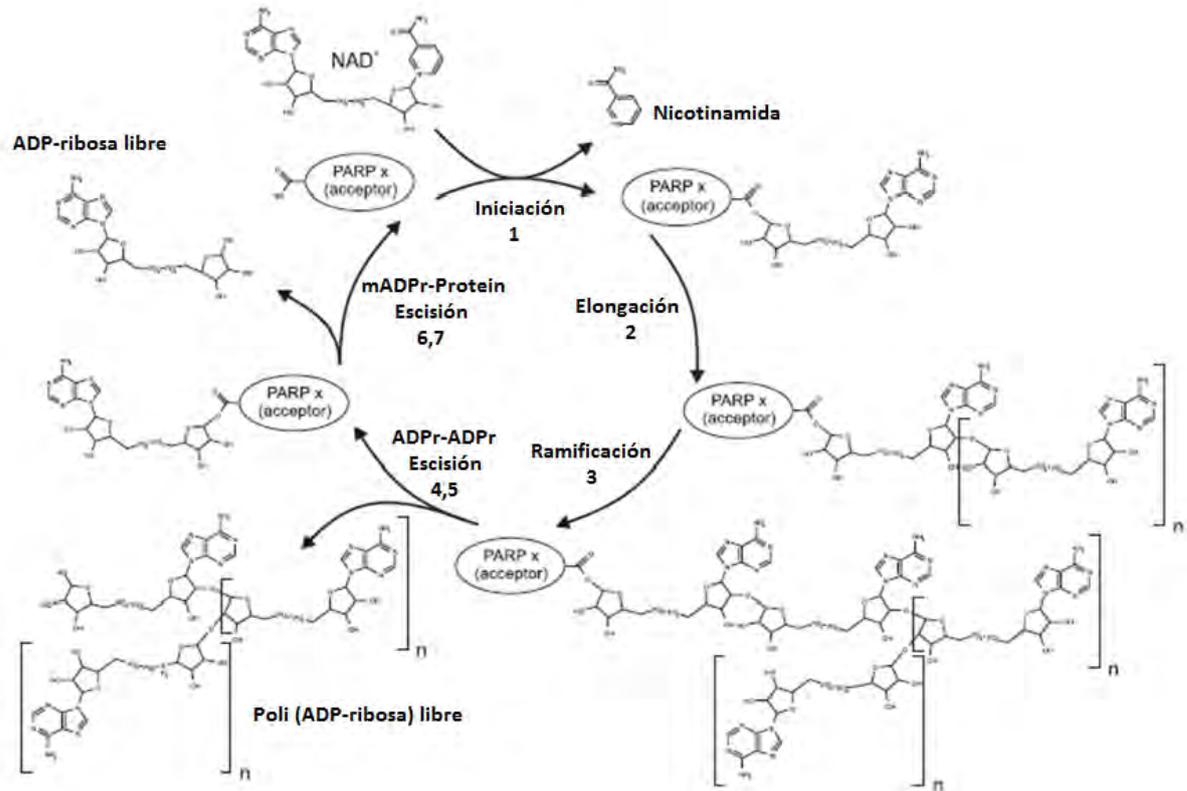


Fig.7. Mecanismo de poli-ADP-ribosilación. Los pasos 1 a 3 y los pasos 4 a 7 del ciclo de poli-ADP-ribosa representan las reacciones anabólicas y catabólicas, respectivamente, en el metabolismo de la poli-ADP-ribosa. La síntesis de poli-ADP-ribosa requiere de tres actividades distintas de PARP: 1, la iniciación o mono-ADP-ribosilación de un determinado ácido glutámico, a través de la enzima PARP (acceptor), 2, elongación del polímero, y 3, ramificación del polímero. La degradación requiere por lo menos cuatro alternativas de actividad de PARG y (P/M) ARH: 4, actividad de PARG exoglicosidasa y endoglicosidasa (PARG) respectivamente, que hidrolizan los enlaces glucosídicos entre las unidades de ADP-ribosa, paso 5, actividad potencial de la poli-ADP-ribosilhidrolasa; 6, MARH, o 7, actividad de mono-ADP ribosa liasa. (Hassa *et al.*, 2006).

2.14.1 NAD⁺

El nucleótido de nicotinamida (NAD⁺) es una coenzima necesaria para una gran variedad de proteínas que catalizan reacciones de óxido-reducción. El NAD⁺ es un aceptor de electrones (en su forma oxidada, NAD⁺) y un donador (en su forma reducida,

NADH) durante la eliminación enzimática de átomos de hidrogeno procedentes de sustratos específicos. Por lo que participa como un receptor de electrones en reacciones catalizadas por enzimas en la cadena de transporte de electrones mitocondrial que conduce a la síntesis de ATP durante la fosforilación oxidativa. Además constituye el sustrato principal para la PARP-1 en las reacciones de ADP-ribosilación Fig.8. Estas reacciones son importantes en el metabolismo celular y en la formación de varios metabolitos, incluyendo nicotinamida, mono ADP-ribosa libre, mono y poli-ADP-ribosilación de proteínas, el ciclo ADP-ribosa, NAADP, O-AADP-ribosa (Ziegler, 2000; Rongvaux, 2003; Berger, 2004; Schuber, 2004). Por lo que la sobre activación de PARP-1 afecta sobremanera la concentración de NAD^+ , cuya concentración normal en células de mamíferos es de aproximadamente 400 y 500 μM y su vida media alrededor de 1 a 2 horas (Elliott, 1975; Rechsteiner, 1976; Williams, 1985). Cuando las células se exponen a agentes genotóxicos se incrementan las reacciones de poli-ADP ribosilación, coincidiendo con la disminución de NAD^+ . El agotamiento de NAD^+ se traduce en agotamiento de ATP, que puede comprometer la viabilidad celular (Goodwin, 1978; Skidmore, 1979; Chappie, 2005).

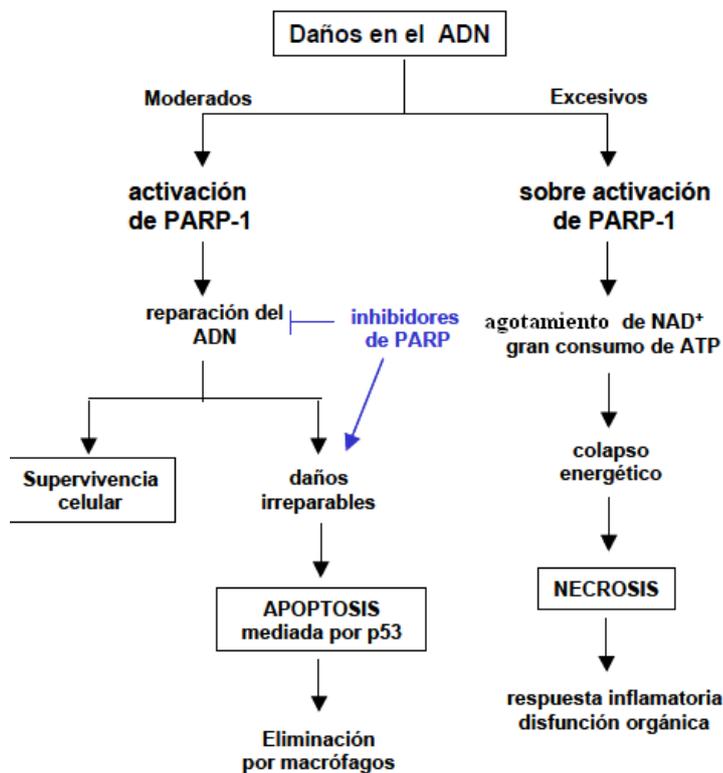


Fig.8. PARP regula eventos celulares como supervivencia, apoptosis o necrosis, dependiendo de las concentraciones de NAD^+ y ATP (Martin, 2005).

2.15 Poli ADP ribosilación de p53

Estudios recientes demuestran que la reacción de poli-ADP-ribosilación tiene una función importante en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, incluyendo la señalización intercelular, transcripción, reparación de DNA, regulación del ciclo celular, mitosis, necrosis y apoptosis (Hassa *et al.*, 2006).

La activación de PARP-1 y p53 ocurre en forma simultánea debido a que están implicadas en la respuesta celular normal a daños en el DNA, en el mantenimiento de la integridad del genoma (Xia *et al.*, 2009 y Hassa *et al.*, 2006), así como en la activación de los mecanismos apoptóticos. Mientras que la síntesis de PARP aumenta segundos después de que ha ocurrido el daño en el DNA (figura 1), la cantidad de p53, se incrementa varias horas después, principalmente como resultado de una disminución en su degradación (Simbultan-Rosenthal *et al.*, 1998). Estudios por inmunoprecipitación e inmunoblot han demostrado, que junto con otras proteínas, p53 experimenta una extensa poli-ADP-ribosilación durante la muerte por apoptosis (Simbultan-Rosenthal *et al.*, 1999). La poli-ADP-ribosa polimerasa modifica las funciones de unión de p53. Se ha calculado que una molécula de un solo polímero de 20 residuos de ADP-ribosa puede bloquear o revertir la secuencia de unión específica de 4 moléculas de p53 a la secuencia consenso de DNA. La poli-ADP-ribosilación de p53 forma el complejo PAR-p53 que puede interferir con las siguientes funciones de p53: a) evitar su unión al DNA, al bloquear el dominio de unión de p53 con el DNA; b) protegerla de la degradación al modificar su configuración de tal manera que sea inaccesible a la proteólisis. (Simbultan-Rosenthal *et al.*, 1999).

La estructura de poli-ADP-ribosa está bien caracterizada. Las unidades del polímero ADP-ribosa están unidas por enlaces glucosídicos ribosa- ribosa 1'-2'. La longitud de la cadena de polímeros es heterogénea y puede alcanzar los 200 a 400 unidades *in vitro* o *in vivo*. Los polímeros largos están ramificados de una forma irregular. La ramificación se produce *in vitro* e *in vivo* con un frecuencia de aproximadamente una rama en la sección lineal de 20 a 50 unidades de ADP-ribosa. La estructura química del sitio de ramificación de poli-ADP-ribosa es *O*-D-ribofuranosil-(1'-2')-*O*-D-ribofuranosil-(1'-2')-adenosina-5',5',5-trifosfato, comúnmente conocido como Ado-(P)-Rib-(P)-Rib-P (Hassa *et al.*, 2006).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DT2 es una enfermedad crónica degenerativa que aumenta día con día, tanto a nivel nacional como mundial. Esta enfermedad es incurable ya que una vez que se presenta no existe medicamento que revierta sus efectos en los pacientes ni que los haga retornar a las condiciones metabólicas normales, por lo que constituye un grave problema de salud pública. Hasta el momento la diabetes solo puede prevenirse y controlarse con los hábitos cotidianos de alimentación y actividad física. Otra de las desventajas para las personas diabéticas es que su detección puede ocurrir después de varios años de adquirida, lo que desenlaza en diferentes complicaciones, por lo que a la DM se le ha denominado “la muerte silenciosa”. En la DT2, enzimas como PARP tienen un papel central, por lo que los mecanismos a nivel bioquímico son una fuente importante de conocimientos, para entender de qué manera afecta a nuestro organismo, especialmente al páncreas y proponer alternativas que nos permitan sugerir un tratamiento eficaz contra esta enfermedad. La poli-ADP-ribosilación de p53 se ha descrito en células endoteliales en condiciones de hiperglucemia, sin embargo en la apoptosis de las células β por hiperglucemia, no se ha estudiado. Por lo que es importante evaluar el proceso de poli-ADP-ribosilación como uno de los mecanismos postraduccionales que benefician la permanencia de p53 en las células β pancreáticas, alargando su vida y su actividad biológica y así propiciando la muerte de la célula β por apoptosis, la disminución de la masa celular y un mal funcionamiento del páncreas, a través de los años que resultará en complicaciones y en un mal estado de salud.

4. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un problema de salud mundial de grandes proporciones que afecta de forma creciente a personas en edades cada vez más tempranas, resta años, calidad de vida y se acompaña de un elevado costo económico además deja grandes secuelas de invalidez, discapacidad y mortalidad (González *et al.*, 2009).

En 2010 la organización mundial de la salud (OMS), estimaba que a nivel mundial, existían 250 millones de personas con esta enfermedad y consideraba que más de 300 millones estarán en riesgo de presentarla.

En México, en 2008 se calculó que los costos hospitalarios directos e indirectos de la diabetes mellitus fueron de 100 millones de dólares anuales. Por otra parte, las instituciones que llevan el mayor peso en la atención de pacientes con diabetes, son el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) que atiende el 47.2% de los egresos hospitalarios y la Secretaría de Salud (SSA) en donde se atiende al 35.9%; estas instituciones registran poco más del 83% de los egresos hospitalarios por diabetes, situación de importancia por el costo que les implica.

La diabetes mellitus no solo es importante por los costos que esta genera también es importante desde el punto de vista emocional, para la familia implica el cuidado y atención de un familiar con alguna discapacidad visual, motora o por daño renal.

El 90 por ciento de las personas que padecen diabetes presentan el tipo 2 de la enfermedad. Además 13 de cada 100 muertes en México son provocadas por la diabetes. Una característica de la DT2 es la pérdida de células β pancreáticas a través de procesos apoptóticos, al morir las células β la producción de insulina decrece hasta llegar a la deficiencia absoluta. El estrés oxidativo es un factor determinante para que estas células mueran ya que son altamente sensibles al daño por ERO (derivado de la cadena de transporte de electrones mitocondrial), resultado de la hiperglucemia, la localización mitocondrial de p53 se ha relacionado con la inducción de apoptosis en células RINm5F. Por lo que este estudio pretende ayudar a describir los cambios postraduccionales de p53 que contribuyen a su estabilización y particular activación en respuesta al estrés hiperglucémico que culmina con la apoptosis de la célula.

5. HIPÓTESIS

Es conocido que la hiperglucemia genera ERO que dañan el DNA de la célula β , lo que favorecería la formación del complejo p53-PARP y la poli-ADP-ribosilacion de p53 hecho que permitiría incrementar su vida media y su actividad biológica; así también, evitaría su degradación induciendo la muerte por apoptosis de las células RINm5F.

6. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la Poli-ADP-ribosilación de p53; la formación del complejo p53-PARP-1 y la inducción de apoptosis en células RINm5F tratadas con 30 mM de glucosa.

Objetivos específicos:

- Evaluar la Poli-ADP-ribosilación de p53; la formación del complejo p53-PARP-1 y la inducción de apoptosis en células RINm5F tratadas con 30 mM de glucosa.
- Establecer la presencia e interacción de PARP-1 y p53 a través de la técnica de western blot e inmunoprecipitación.
- Evaluar la poli-ADP-ribosilación de p53 en células RINm5F tratadas con 30 mM glucosa por inmunoprecipitación y western blot.
- Medir las concentraciones de NAD^+ y NADH por espectrofotometría.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Cultivo celular.

La línea celular RINm5F de origen pancreático (células β), de morfología epitelial, secretoras de insulina, L-dopa-decarboxilasa de estirpe NEDH, patología insulinoma, organismo de procedencia rata *Rattus norvegicus* (Gazdar *et al.*, 1980, Oie *et al.*, 1983) cultivadas en medio RPMI-1640 adicionado con 11 mM de glucosa suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (v/v), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio; 20 μ g/l gentamicina y 23.8 mM NaHCO₃ en una atmósfera húmeda a 37 °C y 5 % de CO₂ (Ortega, 2006).

7.1.1. Resiembra de células.

Se retiró el medio agotado. Se lavó dos veces con solución de Hank (5 ml por lavado). Se adicionó 1 ml de tripsina (Tripsina 0.025%-EDTA 2 mM) e incubó a 37 °C hasta que se desprendieron las células, aproximadamente 1 min. Se adicionaron 4 ml de solución de Hank y se resuspendió varias veces con una pipeta de 5 ml. Se recuperaron las células en un tubo de 15 ml. Se lavó la botella con 5 ml de solución Hank y se adicionó al mismo tubo, se tomó una alícuota (aprox. 20 μ l) para cuantificar el número de células. Se centrifugó a 240 x g (Rotanta 460 R 28 cm diámetro), 5 min a 4 °C se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con 5 ml de RPMI 1640 suplementado. En la botella (75 mm²) se adicionaron 5 ml de RPMI 1640 suplementado y posteriormente se agregaron las células (1.5 a 2.5 x 10⁶) para mantener el cultivo, se cambió el medio un día si el siguiente con la finalidad de que los nutrientes no se agotaran. Cuando las células alcanzaron 75% de confluencia se desprendieron con tripsina y se procedió a resembrar las células para aplicar los tratamientos (3.5 x 10⁶ células) en botellas de 75 mm² con 10 ml RPMI 1640 suplementado con SFB 10%. Se utilizaron 3 botellas para el control (5.5 mM de glucosa) este fue evaluado hasta las 72h, y tres por cada tratamiento (30 mM glucosa) y se mantuvieron por 2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas donde el porcentaje de viabilidad óptimo en un cultivo de células RINm5F debe ser mayor al 90%.

7.1.2. Cosecha de células.

Al término de los tratamientos se recuperó el medio de cada una de las botellas (control y tratamientos) en tubos de 50 ml para rescatar las células flotantes por centrifugación a 240 x g (Rotanta 460 R 28 cm diámetro) por 5 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. En consecuencia las células de las botellas se desprendieron con 5 ml de PBS-EDTA (NaCl 140 mM; KCl 2.1 mM; Na₂HPO₄ 8.1 mM; KH₂PO₄ 3H₂O 1.5 mM; EDTA 2 mM), se incubó durante 3 min aprox. Después de este tiempo se agregaron 5 ml de PBS frío y se recuperaron en los tubos de acuerdo al tratamiento, se lavaron las botellas con PBS con el objetivo de recolectar el mayor número de células posible. Antes de ser centrifugadas a 240 x g (Rotanta 460 R 28 cm diámetro) a 4 °C por 5 min, se tomó una alícuota (20 µl) para cuantificar y verificar la viabilidad de las células mediante la prueba de exclusión con azul de tripán. El resto de las células se lavaron 2 veces con PBS por centrifugación y se pasaron a tubos cónicos de plástico de 1.5 ml.

7.1.3. Viabilidad.

Esta técnica se basa en que las células muertas incorporan el colorante debido a cambios en la permeabilidad de la membrana citoplasmática. La proporción relativa de las células coloreadas o no, refleja el número exacto de células vivas o muertas (Morales, 2010).

Para comprobar el porcentaje de viabilidad celular, se hizo una dilución 1:5 células-azul tripán y se colocó en un hemocitómetro (versión Neubauer). Se observaron inmediatamente al microscopio y se contaron las células viables (claras), distinguiéndolas de las dañadas (azules). No se consideraron las células que estaban fuera del cuadrante de referencia y se realizó el cálculo correspondiente (Lomonte, 2009; Morales, 2010).

$$\text{Viabilidad} = \left[\frac{\text{N}^\circ \text{ células vivas}}{\text{N}^\circ \text{ células vivas} + \text{N}^\circ \text{ células muertas}} \right] \times 100$$

7.2. Obtención de fracciones celulares.

7.2.1. Lisado de células

Los botones celulares de control y tratamientos se resuspendieron en 500 µl de buffer A (10mM Hepes, 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM EGTA, pH 7.9) que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasa (DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, NaF 50 mM, NaVO₄ 100 mM) y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, se transfirieron los lisados a un tubo 1.5 ml, se tomaron alícuotas de 50 µl para cuantificar proteínas totales. Posteriormente se centrifugaron a 1500 x g (Thermo scientific survall ST 40 R 17 cm diámetro) por 1 min a 4 °C y se colocaron en hielo. De los botones celulares se obtuvieron la fracción nuclear y del sobrenadante la fracción citosólica. Los botones se resuspendieron en 100 µl de Buffer C (20 mM HEPES pH 7.9; 0.4 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA) se incubaron en hielo durante 30 min con agitación en vórtex cada 2 min. Antes se tomó una alícuota para verificar la pureza de los núcleos, mediante una tinción con azul de toluidina. Posteriormente, se centrifugó a 1500 x g (Thermo scientific survall ST 40 R 17 cm diámetro) por 5 minutos a 4 °C y la fracción nuclear se recuperó en el sobrenadante A. Los sobrenadantes obtenidos de la primera centrifugación (fracción citosólica) se centrifugaron a 3100 x g (Thermo scientific survall ST 40 R 17 cm diámetro) por 30 minutos a 4 °C (2 veces). Finalmente los sobrenadantes se separaron en alícuotas y antes de guardarlos a -70 °C se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

7.3. Cuantificación de proteínas

La técnica de Lowry es un método sensible que se basa en el contenido de aminoácidos aromáticos de la muestra. Permite analizar de manera rápida muestras que contengan hasta 5 µg de proteína. La reacción de Folin-Ciocalteu (Cu alcalino del reactivo y la reducción de fosfomolibdato-fosfotungstato) con los aminoácidos triptófano y tirosina dará como resultado un compuesto de color característico (azul) (Lowry *et al.*, 1951; Clark, 1966).

Para este propósito se utilizó un estuche de Bio-Rad Protein Assay (Bio Rad Laboratories Inc) el cual consta de Reactivo B (1 Litro). Reactivo A (250 ml) y Reactivo S (5 ml). Esta técnica se realizó en una placa de ELISA de 96 pozos tomando como referencia una curva patrón de albúmina como estándar.

Cuadro III. Curva para cuantificación de proteínas.

Agua destilada (µl)	BSA 1 mg/ml (µl)	*Reactivo D (µl)	Reactivo B (µl)
25	0	25	200
20	5	25	200
15	10	25	200
10	15	25	200
7.5	17.5	25	200

*El reactivo D se preparó mezclando 500 µl del reactivo A con 10 µl del reactivo S.

Se utilizó una dilución 1:5 de las muestras citosólica y nuclear de los tratamientos control, 24, 48 y 72 h). Se colocaron 20 µl de agua y 5 µl de muestra en cada pozo y se agregaron 25 µl de solución D a todos los pozos; así como 200 µl de solución B. La cuantificación se hizo por triplicado. Se registro la absorbencia a 690 nm (filtro 8) en un lector de ELISA (Multiskan Ex Labsystems). Con los datos se obtuvo una gráfica de referencia para calcular la concentración de proteínas totales.

7.4. Determinación de apoptosis.

7.4.1. Fragmentación de DNA.

Extracción de DNA

Después de los tratamientos las células se cosecharon con PBS- EDTA. Se lavaron dos veces por centrifugación con PBS. El botón celular se resuspendió con 10 µl de solución de lisis (EDTA 20 mM, Tris-HCl, igepal 1% pH 7.5) por cada millón de células (por lo menos 5 millones) se agitó 10 segundos e inmediatamente se centrifugó por 5 min a 9200 x g (Thermo scientific survall ST 40 R 17 cm diámetro) 4 °C. A continuación se repitió la extracción con el buffer de lisis en el botón y se unificaron los sobrenadantes.

Posteriormente, al sobrenadante se adicionó SDS al 1% y se incubó 2 horas con RNasa a una concentración final de 5 µg/µl a una temperatura de 56 °C, seguido por la

digestión con proteinasa K a una concentración final de 2.5 µg/µl durante 2 h a 37 °C. Después se adiciono ½ volumen de acetato de amonio 10 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, para precipitar el DNA, se almaceno una noche a -20 °C. El DNA se visualizó en un gel de agarosa 1.3% durante 70 min a 60 volts en TBE 1x (Herrmann, 1994).

7.5. Electroforesis y Western blot.

7.5.1. Preparación de geles

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida. Gel separador al 8 % (mezclar 2.3 ml H₂O destilada; 1.3 ml de acrilamida mix al 30%; 1.3 ml Tris 1.5 M (pH 8.8); 0.05 ml SDS al 10%, persulfato de amonio al 10%, 0.003 ml TEMED). Posteriormente, se preparo el gel concentrador con 1.4 ml H₂O destilada; 0.33 ml de acrilamida mix 30 %; 0.25 ml Tris 1 M (pH 6.8); 0.02 ml SDS al 10%; 0.02 ml persulfato de amonio al 10%; 0.002 ml TEMED. Se colocó el peine sobre el gel separador y se llenaron los espacios con el gel concentrador y se dejó polimerizar a temperatura ambiente. Una vez polimerizados los geles se colocaron en la cámara de electroforesis y se adicionó el buffer de corrida 1 X (Tris base 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH de 8.3).

7.5.2. Preparación de las muestras

Se tomaron 50 µg de proteína según la cuantificación previamente realizada (método de Lowry), se adicionó el volumen correspondiente de amortiguador de Laemli (Tris 125 mM, SDS 2%, glicerol 10%, Mercaptoetanol 11 mM, azul de bromofenol 0.002%, pH 6.9) (SIGMA) y se incubó a 95 °C durante 5 min, posteriormente las muestras se centrifugaron a 2200 x g (Thermo scientific survall ST 40 R 17 cm diámetro) por 1 min y se colocaron en los pozos del gel concentrador (máximo 25 µl), se utilizo un marcador de peso molecular preteñido (Bio-Rad). Se colocaron los electrodos y se dejó 15 min a 90 volts pasado este periodo se aumentó el voltaje a 120 volts por 60 minutos.

7.5.3. Transferencia de proteínas

Se prepararon las esponjas, el papel filtro y la membrana de PVDF (8.5 x 6 cm). Se humedeció el papel filtro y las esponjas en agua destilada durante 10 min y 10 min más en el buffer de transferencia (Glicina 192 mM, Tris base 25 mM pH de 8.3; SDS 0.037 %; 20% de metanol). La membrana de PVDF se colocó 30 s en metanol, después 5 min en agua destilada y finalmente 15 min en buffer de transferencia. Se utilizó un cassette de transferencia y se emparedo el gel, se colocó en la cámara de transferencia, y se adicionó el buffer de transferencia. Se colocó un agitador magnético y se dejó sobre una placa de agitación, cerrando el dispositivo y se aplicaron 40 volts toda la noche.

7.5.3.1. Bloqueo

Al final de la transferencia, se enjuagó la membrana con TBS-T (Tris 20 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 al 0.1%) y se bloqueó con una solución de albúmina al 5% en TBS durante 2 h en agitación suave. Posteriormente se lavó dos veces con TBS-T 0.5 M NaCl durante 10 min y 3 veces de 10 min con TBS-T 0.15 M NaCl con agitación máxima.

7.5.3.2. Incubación: anticuerpo primario.

Se adicionó el anticuerpo anti-PARP-1 (rabbit polyclonal IgG; Santa Cruz Biothecnology, Santa Cruz, CA), 1:1000 en TBS-Tween (0.15 M NaCl) BSA 1%, se incubó con agitación suave toda la noche a 4 °C. Se lavo 3 veces por 10 min con TBS-Tween (0.15 M NaCl).

7.5.3.3. Incubación: anticuerpo secundario

La unión de los anticuerpos se detecto con un anticuerpo anti-rabbit marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (1:2000) (Santa Cruz Biothecnology, Santa Cruz, CA) en TBS-Tween (0.15 M NaCl) BSA 1%. Se lavo 3 veces por 10 min con TBS-T (0.15 M NaCl).

7.5.3.4. Revelado

Se utilizó un estuche comercial de quimioluminiscencia (Perking Elmer LifeScience, Boston USA), 1 ml de esta solución fue vertida en la membrana y se dejó actuar por 2 min y se visualizó en un fotodocumentador STORM (lámpara azul) y se escaneo la membrana, la imagen se guardo en formato TIFF.

7.6. Inmunoprecipitación.

Se transfirieron 200 µg de proteína total a un tubo de centrifuga de 1.5 ml. Se añadió 5 µl (1µg) de anticuerpo primario anti-p53 pAb 240 (Santa Cruz Biotechnology) y se incubaron durante una hora a 4 °C en agitación orbital. Se añadieron 20 µl de Protein G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) y se incubaron en agitación orbital toda la noche. Posteriormente se colectaron los inmunoprecipitados por centrifugación a 1000 x g (Thermo scientific survall ST 40 R 17 cm diámetro) por 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se descartó. Los precipitados se lavaron 4 veces con PBS por centrifugación y finalmente se resuspendieron con 20 µl de amortiguador de Laemli, se calentaron por 2-3 minutos a 95 °C y se centrifugaron 1 min a 1000 x g (Thermo scientific survall ST 40 R 17 cm diámetro), el sobrenadante se pasó a un tubo limpio. Finalmente las muestras se cargaron en PAGE-SDS al 10 %, 1 h a 100 volts, y se transfirieron a una membrana de PVDF (0.8 mA/cm²), la membrana se lavó y se bloqueó como se describió previamente. Se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-PARP (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), anti-poly(ADP-ribose) (10H) (Alexis Biochemicals) para detectar residuos de Poli-ADP-ribosa (1:200) poly(ADP-ribose) en TBS-T-BSA 1%. Para la detección se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano y un estuche comercial de quimioluminiscencia (Perking Elmer Life Science, Boston USA).

7.7. Concentraciones de NAD⁺ y NADH

7.7.1. Lisis de células para cuantificación de nucleótidos

NAD⁺

Después de los tratamientos las células se obtuvieron con PBS-EDTA y se lavaron dos veces por centrifugación con PBS. El botón celular se resuspendió en 500 µl de ácido perclórico 5% y se homogeneizó con un polytron (Mod. PT 1200 CL hecho en Suiza) por 2 minutos, 5 repeticiones con intervalos de incubación en hielo de 1 min. Al término de la homogenización se centrifugaron las muestras a 10000 x g (Thermo scientific survall ST 40 R 17 cm diámetro) 4 °C, 15 min. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 2.5 µl de azul de bromotimol, se adicionó KOH 2 N hasta un color verde-azul, para ajustar el pH. Posteriormente se dejaron en hielo durante 30 min y se centrifugaron a 10000 x g (Thermo scientific survall ST 40 R 17 cm diámetro) a 4 °C durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se almaceno a -70 °C hasta el día siguiente.

7.7.2. Cuantificación NAD⁺

La concentración de NAD⁺ celular se determinó por un método cíclico enzimático que utiliza la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) de *Saccharomyces cerevisiae*. El incremento en la densidad óptica tomada a 340 nm nos indica la cantidad de NAD⁺. La enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) se utilizó con la siguiente concentración 1mg /50 µl amortiguador de fosfatos 0.1 mM pH = 7.5. La reacción se lleva a cabo directamente en la celdilla del espectrofotómetro, colocando las siguientes soluciones:

Se agregaron 2.89 ml del amortiguador de pirofosfato de sodio (0.1 M a pH 7.2), al cual se agregó 1 ml de etanol por cada 100 ml al momento del uso. Más 0.1 ml de NAD⁺ (1 mg/ml) (control) o bien de muestra, se agita y se toma una primera lectura (E1), a 340 nm y se inicia la reacción adicionando 0.01 ml de ADH (20 U/mg concentración final), se mezcla y se toma una segunda lectura (E2), se adiciona nuevamente 0.01 ml de ADH se mezcla y se toma una tercera lectura (E3) (Worthington, 1973).

Principio:



Las 3 lecturas son utilizadas para calcular las concentraciones de la coenzima, utilizando la siguiente fórmula.

$$C = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d \cdot l} = \frac{\Delta E}{\epsilon (1.0) (0.10)}$$

= $\mu\text{moles/ml} = \text{muestra}$

Paso de luz
celdilla

Vol. de la
muestra

Donde:

ϵ = Coeficiente de extinción molar = 6.22 para 340 nm

$$\Delta E = (E_2 - E_1) - (E_3 - E_2)$$

NADH

El botón celular se resuspendió y homogeneizó con 500 μl buffer (50mM de KOH, 22mM de boratos, 30% de etanol). Se incubó 30 min en hielo después se centrifugó a 10000 x g (Thermo scientific survall ST 40 R 17 cm diámetro) por 10 min a 4 °C, se tomó el sobrenadante y se agregaron 2.5 μl de azul de timol (0.1%) se adicionaron 2 μl de HCl 3M (para neutralizar el pH), se dejó en hielo por 30 min y se centrifugó a 10000 x g por 10 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -70 °C hasta el día siguiente para hacer la cuantificación (Tommy *et al.*, 1999).

7.7.3. Cuantificación de NADH

La concentración de NADH celular se determinó por un método cíclico enzimático que utiliza la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) de *Saccharomyces cerevisiae*. La disminución en la densidad óptica a 340 nm es un indicador de NADH. La reacción se

lleva a cabo directamente en la celdilla del espectrofotómetro, colocando las siguientes soluciones:

Se colocó en la celdilla, 2.49 ml buffer de trietanolamina- HCl (0.1 M, pH 7.6) y 0.40 ml piruvato de sodio (23 mM) se mezcló y se registró la absorbencia a 340 nm (E1). Se adicionaron 0.10 ml de muestra o estándar NADH (1 mg/ml), se mezcló y se registró la absorbencia (E2). Se inició la reacción por la adición de 0.01 ml de LDH se mezcló y se tomó la tercera lectura (E3). Se adicionó nuevamente la enzima 0.01 ml, se mezcló y leyó (E4) La concentración final de la enzima fue de 9.2 U/ml (Worthington, 1973).

Principio:



Las 4 lecturas son utilizadas para calcular las concentraciones de la coenzima, utilizando la siguiente fórmula:

$$C = 3.0 = \frac{\mu\text{moles/ml} \times \text{muestra} \times (\Delta E)}{\epsilon (1.0) (0.10)}$$

Paso de luz celdilla Vol. de la muestra

Donde

$$\epsilon_{340} = 6.22$$

$$(\Delta E) = (E1 - E2) + (E4 - E3)$$

8. RESULTADOS

Efecto de la hiperglucemia sobre la viabilidad de las células RINm5F.

Se puede observar en la Fig. 9 el porcentaje de viabilidad del promedio de 3 experimentos independientes a través de la técnica de exclusión de azul tripán y conteo en cámara de Neubauer, el porcentaje de células RINm5F vivas disminuye cuando se aumenta el tiempo de exposición a una condición de hiperglucemia (30 mM glucosa) lo que denota un comportamiento inversamente proporcional.

Tabla 2. Porcentaje de viabilidad

TRATAMIENTOS	% DE VIABILIDAD
Control	100
2 h	97
4 h	96
8 h	95
16 h	90
24 h	91
48 h	65
72 h	45

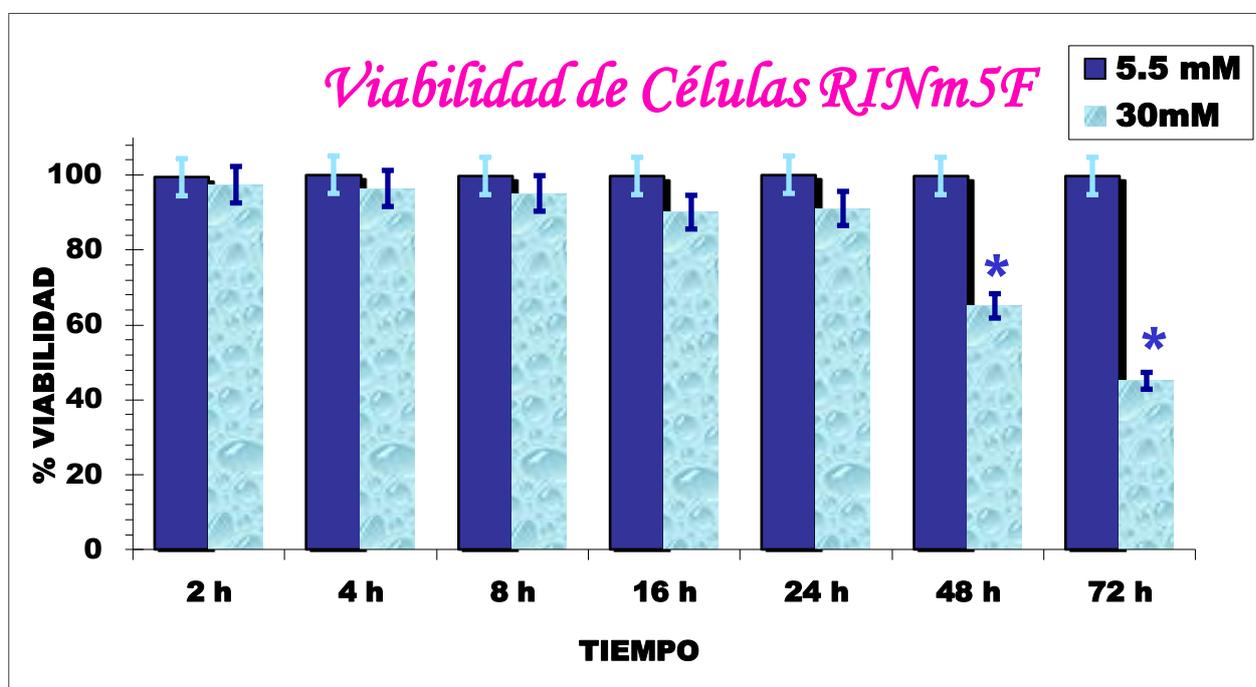


Fig.9. Porcentaje de Viabilidad. Las células RINm5F se cultivaron en condiciones 30mM de glucosa por 2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 h. Células control tratadas con 5.5 mM de glucosa. La viabilidad se evaluó a través de la prueba de exclusión con azul tripán. La gráfica muestra el coeficiente de variación (% CV) de 3 experimentos independientes y el error típico ($\pm 5\%$).

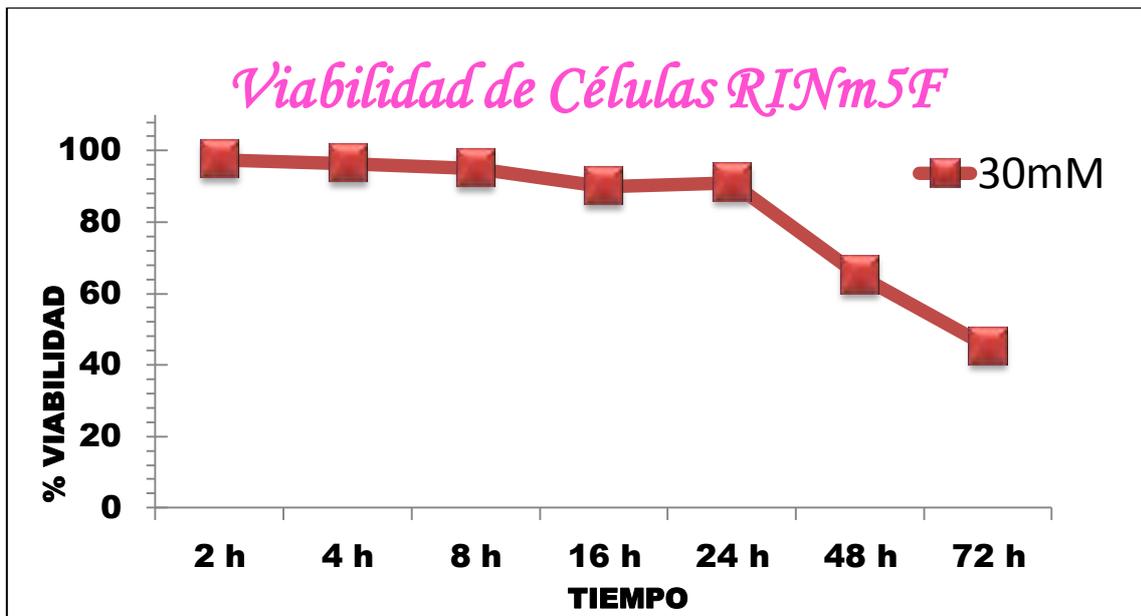


Fig.9. Porcentaje de Viabilidad. Las células RINm5F se cultivaron en condiciones 30mM de glucosa por 2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 h. Células control tratadas con 5.5 mM de glucosa. La viabilidad se evaluó a través de la prueba de exclusión con azul tripán, éstas fueron observadas al microscopio a un aumento de 40X en un hemocitómetro (cámara de Neubauer). La gráfica muestra el coeficiente de variación (% CV) de 3 experimentos independientes y el error típico ($\pm 5\%$).

Fragmentación de DNA oligonucleosomal

La Fig. 10 muestra la fragmentación oligonucleosomal de DNA, a mayor tiempo de exposición de las células a una condición 30 mM de glucosa se aprecian con mayor nitidez las bandas de DNA.

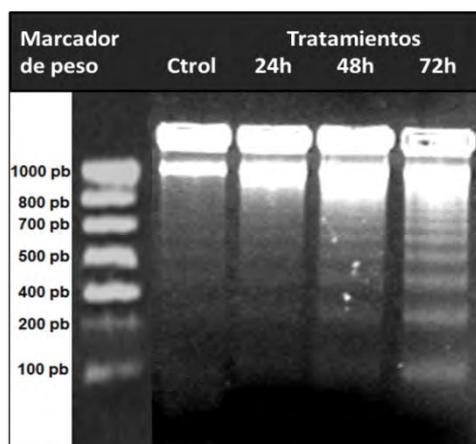


Fig. 10. Fragmentación oligonucleosomal de DNA en células RINm5F tratadas con 30 Mm de glucosa por diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas y control 5.5 mM de glucosa. Marcador de peso molecular (BIO RAD 100 a 1000 pb). Agarosa al 1.3% en TBE 1X. Imagen representativa de 4 experimentos independientes.

Formación del complejo p53-PARP por hiperglucemia

La interacción entre las proteínas p53 y PARP se comprobó por inmunoprecipitación de p53 de la fracción nuclear y el revelado del western blot con el anticuerpo anti-PARP. En la Fig. 11 se observa que PARP co-precipita con p53 a partir de las 2 h de exposición a 30 mM de glucosa y a partir de las 24 h empieza a disminuir su presencia. El grupo control tratado con 5.5 mM de glucosa es evaluado hasta las 72.

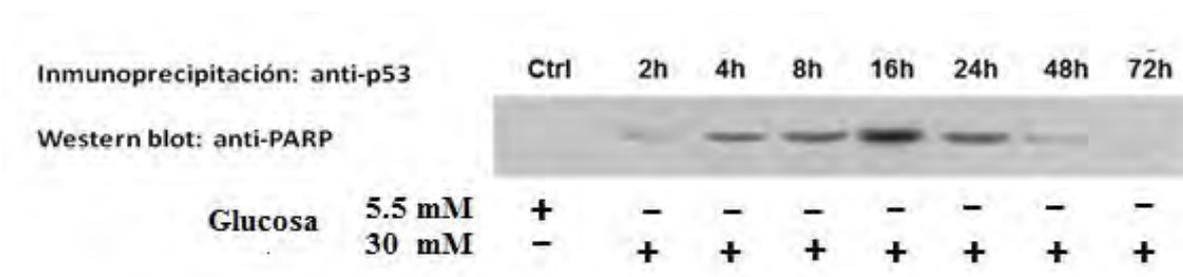


Fig. 11. Formación del complejo p53-PARP en células RINm5F cultivadas con 30 mM a diferentes tiempos 2,4, 8, 16, 24, 48 y 72 h. Se muestra una imagen representativa de 5 experimentos independientes.

Fragmentación de PARP en células RINm5F por hiperglucemia.

Como se observa en la Fig. 12 A en las células RINm5F, la condición de alta glucosa induce la fragmentación de PARP (30 mM), así se muestra la presencia de un fragmento de 85 kDa a partir de 24 h de incubación, siendo más evidente a las 72 h. Con base en estos resultados decidimos analizar la integridad de la enzima a tiempos más cortos (Fig. 12 B). Los resultados mostraron que antes de 24 h la enzima se encuentra íntegra en las células RINm5F. Además la densitometría muestra un incremento en la concentración de PARP a partir de las 2 h de tratamiento con a 30 mM de glucosa, alcanzando un pico a las 16 h.

A

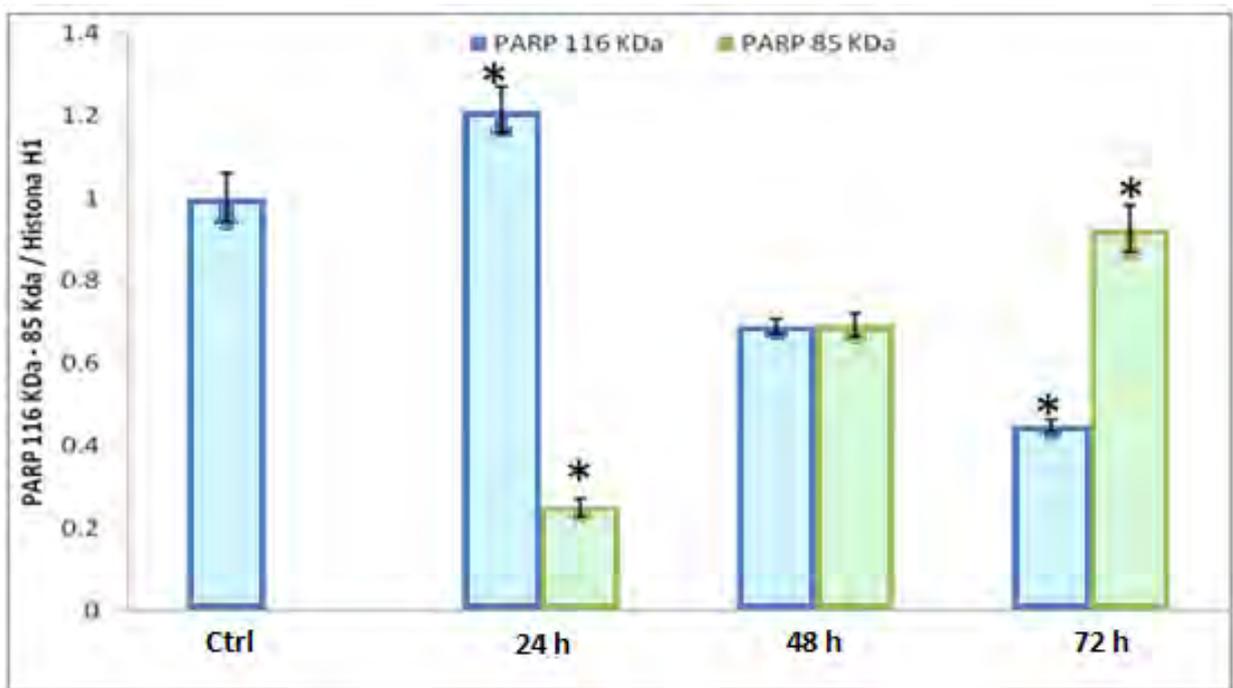
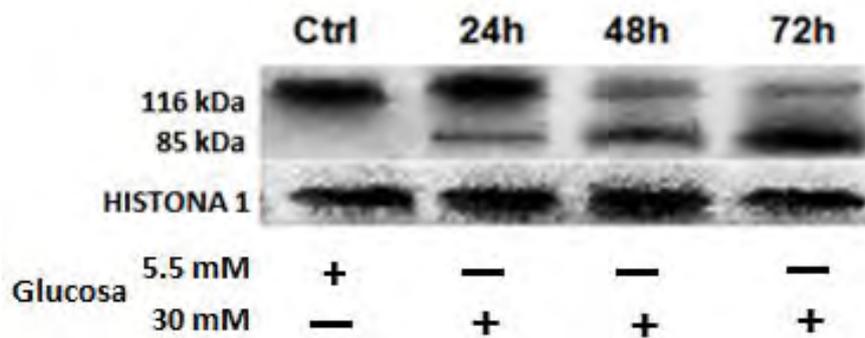
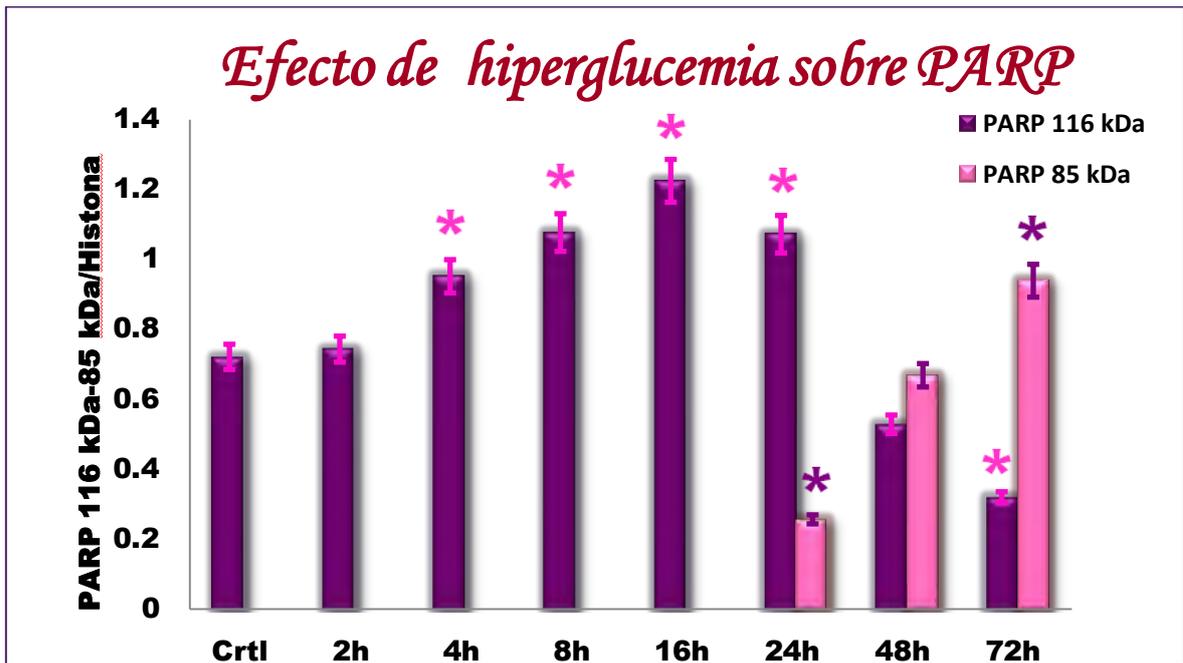
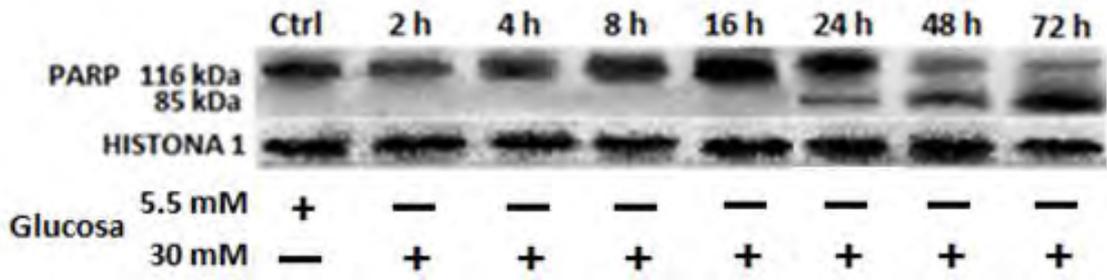


Fig. 12 A: Análisis por Western blot y densitometría de PARP en células RINm5F cultivadas con 30 mM a diferentes periodos de tiempo (24, 48 y 72 h) 5.5 mM de glucosa. Se muestra una imagen representativa de 5 experimentos independientes. * $p < 0.001$

B

12 B: Western blot y densitometría de PARP en células RINm5F cultivadas con 30 mM durante diferentes periodos de tiempo (2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 h). Control 5.5 mM. Se muestra una imagen representativa de 5 experimentos independientes. * $p < 0.001$

Poli -ADP- ribosilación de p53 en condiciones de alta glucosa

La Fig. 13 A muestra que el tratamiento con 30 mM de glucosa favorece la adición de residuos de ADP ribosa a p53, a partir de las 2 h, mostrando además un pico a las 16 h. Este evento disminuyó a partir de las 24 h. Con el propósito de confirmar estos resultados se realizó la inmunoprecipitación de p53 del extracto nuclear y se hizo el western blot, posteriormente la membrana se reveló utilizando el anticuerpo contra los residuos de ADP-ribosa. Los resultados demuestran que la hiperglucemia induce la poli ADP ribosilación de p53 en células RINm5F Fig. 13 B.

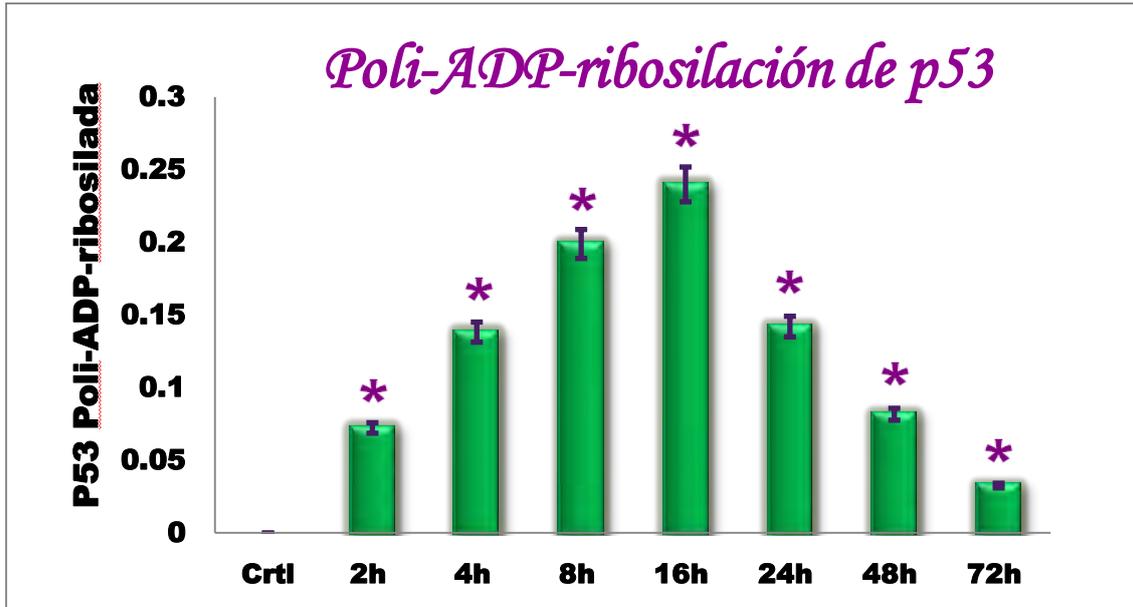
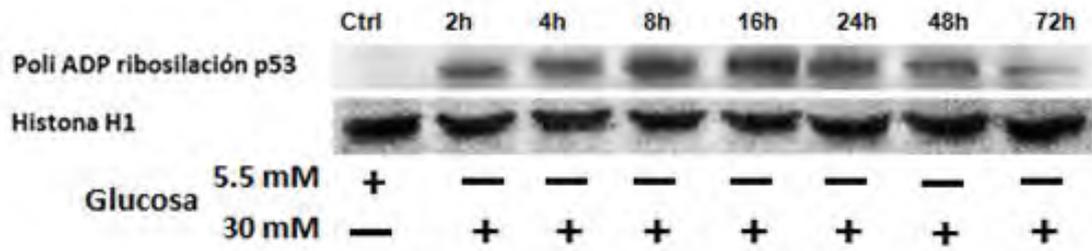
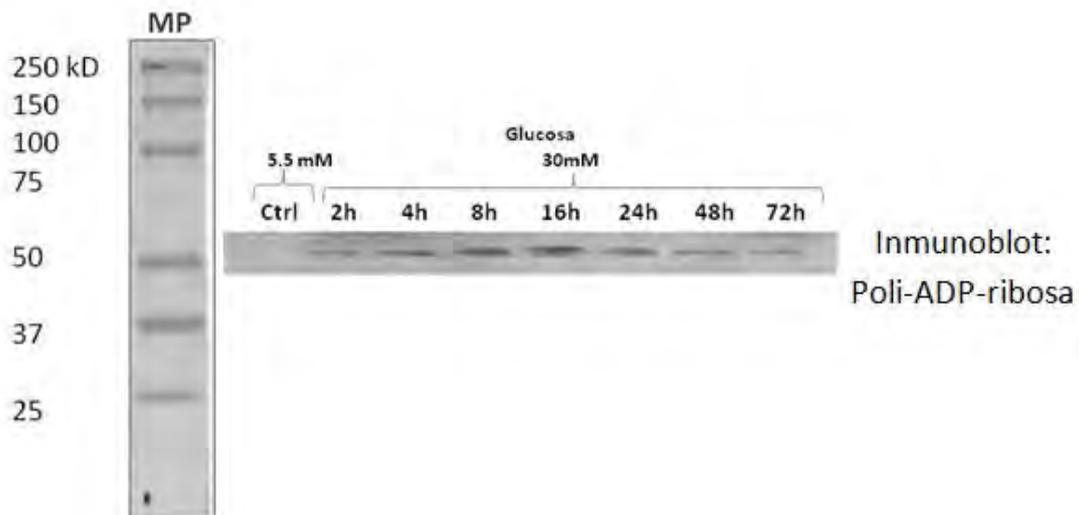
A**B**

Fig. 13 A. Poli ADP ribosilación de p53 por alta glucosa. **A:** Análisis de los residuos de ADP- ribosa en extracto nuclear células RINm5F cultivadas con 30 mM de glucosa por diferentes tiempos (2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72). **13 B:** Western blot de p53 (immunoprecipitación) y revelado con anti-PAR. MP: marcador de peso molecular. Se muestra una imagen representativa de 5 experimentos independientes. (ANOVA y Fisher * $p < 0.001$).

Alteración de las concentraciones de NAD^+ y NADH por efecto de hiperglucemia

Los resultados sobre la cuantificación de los nucleótidos se muestran en las figuras 14 A y 14 B. La concentración de NAD^+ disminuyó significativamente en el grupo de 30 mM glucosa desde 24 y hasta 72 h; (0.0054; 0.0031; 0.0015), con respecto al grupo control (0.0067) (Fig. 14 A). Por el contrario la concentración de NADH tendió a ser mayor en las células RINm5F cultivadas con 30 mM glucosa conforme se incrementó el tiempo de tratamiento (0.2109, 0.2554, 0.3672) con respecto al grupo control (0.1252) (Fig. 14 B). Por lo tanto la relación NAD^+/NADH mostró el mismo comportamiento (Tabla 3).

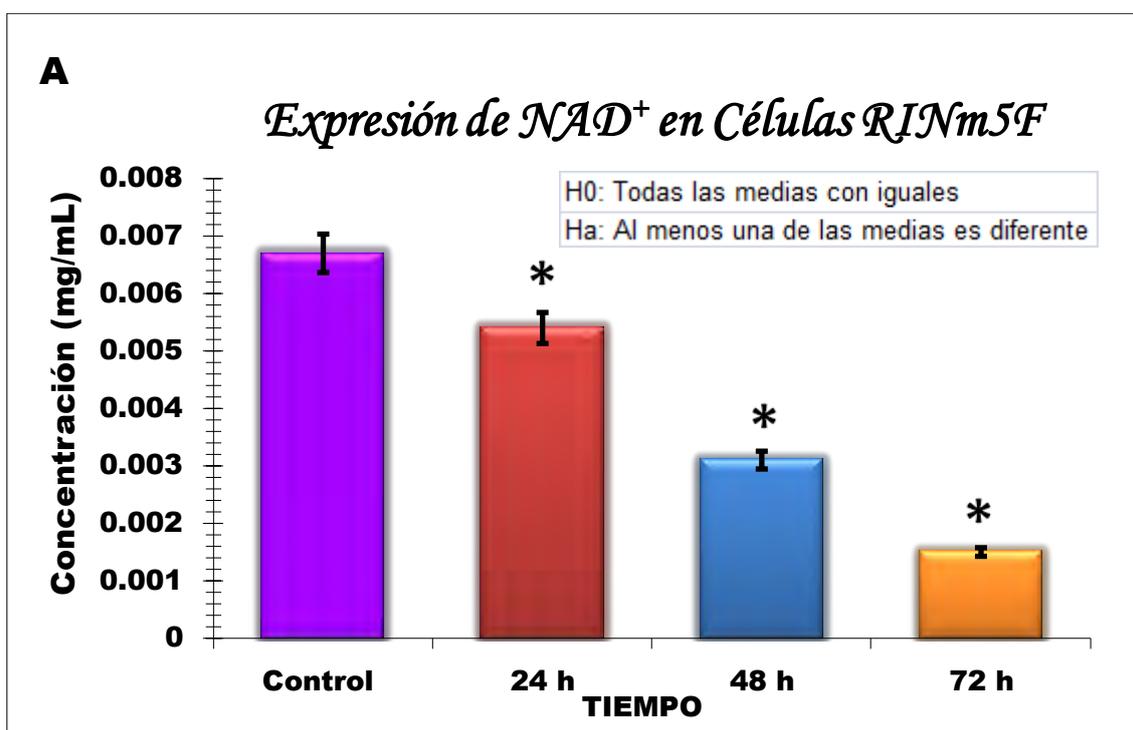


Fig.14 A. Expresión de la concentración (mg/mL) de NAD^+ a diferentes tiempos en células RINm5F cultivadas con glucosa 30mM (24h, 48h y 72h) y glucosa 5.5 mM de glucosa (Control). Cuantificación realizada por método de espectroscopia UV/Visible. Error Típico ($\pm 5\%$). ANOVA One-Way Kruskal-Wallis; Ha: aceptada. Comparación Múltiple de los Tratamientos, por método de Fisher LDS y Tukey Kramer; pruebas Ha: aceptadas * $p = 0.05$.

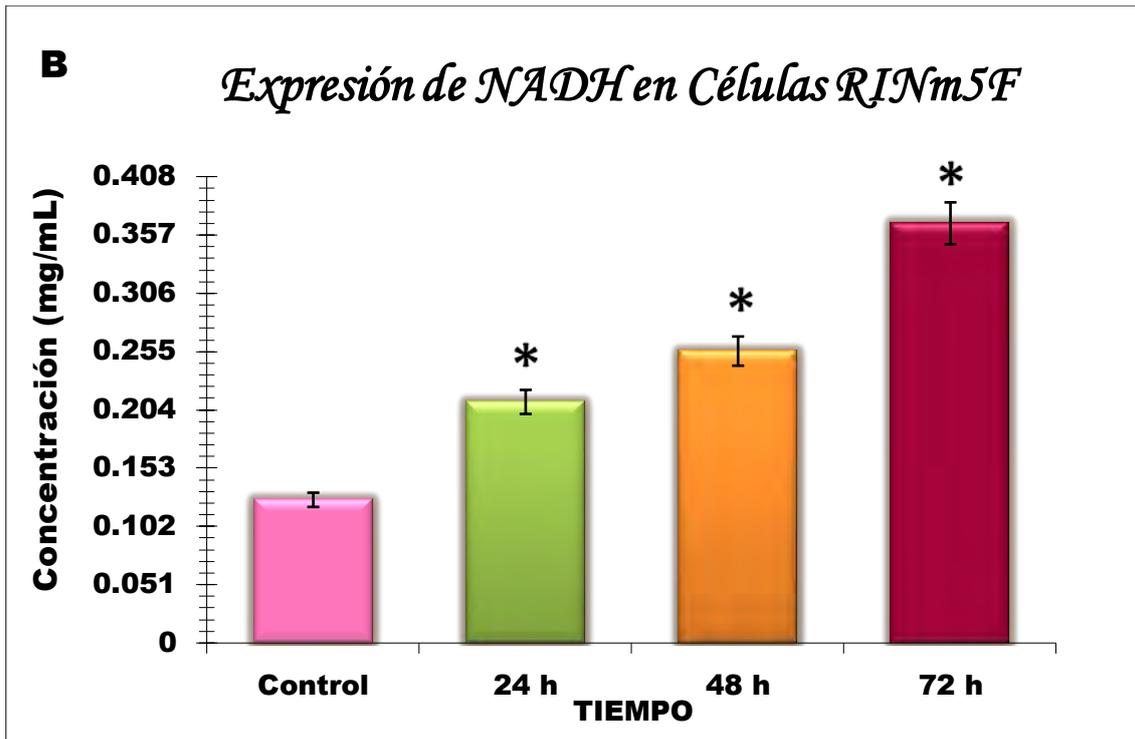


Fig. 14 B. Expresión de la concentración (mg/mL) de NADH a diferentes tiempos en células RINm5F cultivadas con glucosa 30mM (24h, 48h y 72h) y glucosa 5.5 mM de glucosa (Control). Cuantificación realizada por método de espectroscopia UV/Visible. Error Típico ($\pm 5\%$). ANOVA One-Way Kruskal-Wallis; H_a : aceptada. Comparación Múltiple de los Tratamientos, por método de Fisher LDS y Tukey Kramer; pruebas H_a : aceptadas * $p = 0.05$.

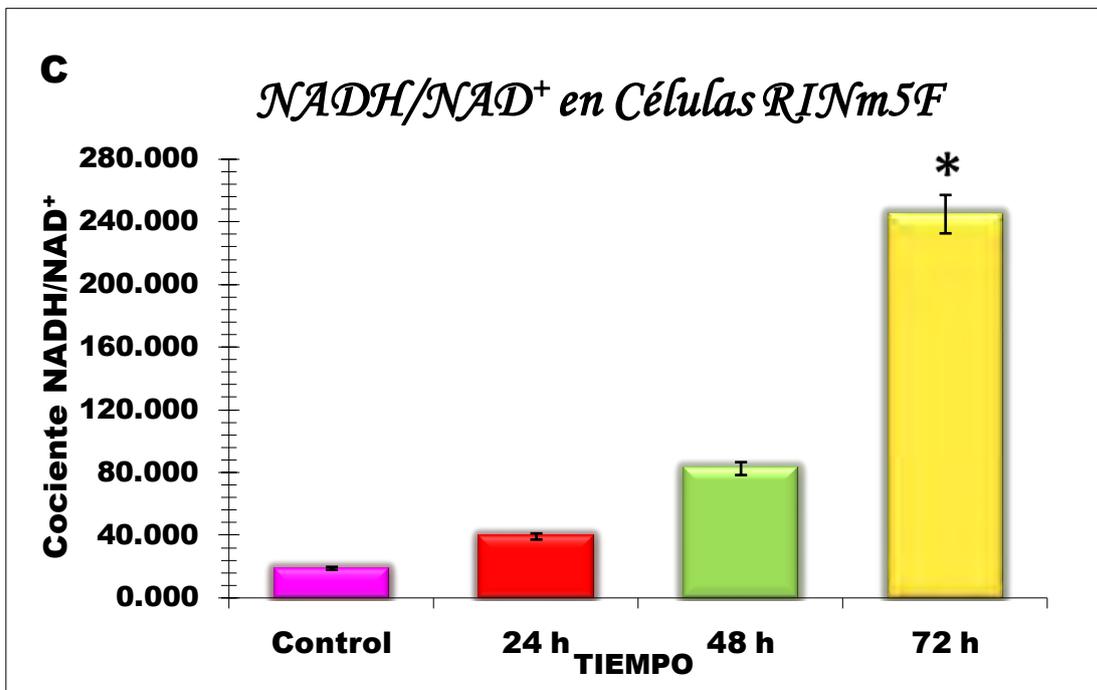


Fig. 14 C. Relación de NADH con NAD⁺ en células RINm5F a diferentes tiempos cultivadas con glucosa 30mM (24h, 48h y 72h) y glucosa 5.5 mM de glucosa (Control). Error Típico ($\pm 5\%$).

Tabla 3. Relación NADH/NAD⁺. Se muestra la media (concentración mg/ml) el coeficiente de variación (%CV) y la relación (cociente) entre NADH/NAD⁺ de 3 experimentos independientes.

Grupos	NADH (mg/mL)	%CV=NADH	NAD ⁺ (mg/mL)	%CV=NAD ⁺	Cociente NADH/NAD ⁺
Control	0.12516667	0.263	0.0067	0	18.682
24 h	0.21086667	7.2	0.0054	4.536	39.049
48 h	0.25536667	0.239	0.0031	0	82.376
72 h	0.3672	3.349	0.0015	0	244.800

Tabla 3. Se muestra la media (concentración (mg/mL) de NAD⁺ y NADH obtenido) de los Tratamientos realizados por triplicado de Células RINm5F cultivadas con glucosa 5.5 mM (Control) y 30 mM por 24h, 48h, y 72h; así como, el porcentaje del Coeficiente de Variación (medida de dispersión que tiene por objeto evaluar la magnitud de los desvíos de los valores de la variable con respecto al valor central de la distribución, este equivale a la razón entre la media aritmética y la desviación típica o estándar). Nivel optimo estandarizado $\%CV \leq 7.250$, para cada muestra.

9. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como propósito determinar si en condiciones de hiperglucemia (30 mM de glucosa) se activa la enzima PARP y se forma el complejo p53-PARP-1 y sucede el proceso de Poli-ADP-ribosilación de p53 permitiendo de esta manera la inducción de apoptosis en células RINm5F (línea proveniente de insulinoma de rata). Así se encontró que la alta glucosa induce la formación del complejo p53-PARP-1 y la poli-ADP-ribosilación de p53 en tiempos cortos; y posteriormente inactiva a PARP. Este evento podría resultar en el incremento en la tasa de apoptosis. Existen otros mecanismos post-traduccionales de p53 como la metilación, fosforilación, acetilación y ubiquitinación, que determinan las funciones de p53 en respuesta al estrés celular. (Taira y Yoshida, 2012). También observamos que la alta glucosa modifica el metabolismo celular al desequilibrar la relación NAD^+/NADH .

Las células RINm5F se cultivaron en RPMI-1640 11 mM suplementado con SFB 10% siguiendo las recomendaciones para esta línea celular en una atmósfera húmeda a 37 °C y 5% de CO_2 . Para los tratamientos el medio RPMI 1640 11 mM de glucosa, se sustituyó por RPMI 1640 que contenía 5.5 mM de glucosa para el grupo control (esta concentración equivale a 100 mg/dl de glucosa en humanos sanos) y para los tratamientos por RPMI 1640 adicionado con glucosa 30 mM, (equivalente a 540 mg/dl de glucosa sanguínea semejantes a los que se observan en personas con DT2). Las células se mantuvieron en estas condiciones durante 2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 h.

Los efectos adversos de la hiperglucemia (30 mM) sobre la viabilidad de las células β pancreáticas se conocen hace tiempo (Grankvist *et al.*, 1977; Kaneto *et al.*, 1999; Marshak *et al.*, 1999; Kahn *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2003; Robertson y Harmon, 2006). Se ha descartado la inviabilidad de las células como consecuencia de un cambio osmótico, ya que en experimentos anteriores se adiciono manitol (25 mM), como control de osmolaridad (Ortega C. 2006). De esta forma se puede observar en la Fig. 9 que el porcentaje de células RINm5F vivas disminuye hasta un 45% a las 72 h, (medida por exclusión de azul tripán), valor significativo que demuestra que poco más de la mitad de la población celular no es viable, así pues; cuando se aumenta el tiempo de exposición a una condición de hiperglucemia (30 mM glucosa) se denota que de manera inversamente proporcional disminuye la viabilidad celular.

Así también las condiciones de hiperglucemia constante conducen a estrés oxidativo crónico porque la glucosa en concentraciones anormalmente altas estimula producción de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres, de origen mitocondrial debido al incremento de NADH y FADH₂, por lo tanto al flujo de electrones en la cadena respiratoria (Robertson y Harmon, 2006).

Tanto, las ERO, el óxido nítrico (NO), y el estrés oxidativo (Koo et al, 2011), presentes en pacientes diabéticos debidos principalmente a la hiperglucemia crónica causan un deterioro importante en las células β (Marshak, 1999; West, 2000; Ortega *et al.*, 2006) debido a la vulnerabilidad de estas a las ERO (Kijimoto y Kaneto, 2004; Koo, 2011) y a los bajos niveles de expresión de enzimas antioxidantes, resultando en el bajo rendimiento de las mismas (West, 2000; Kijimoto y Kaneto, 2004), estos daños pueden conducir a la muerte por apoptosis. (Koo et al, 2011). En este estudio observamos la fragmentación oligonucleosomal del DNA (patrón escalera) en células RINm5F, una característica que hasta ahora se ha considerado exclusiva de la muerte apoptótica (Gómez, 1998; Porras, 2010). Se sabe que las células RINm5F cultivadas con 30 mM de glucosa a las 48 h presentan externalización de fosfatidilserina, un indicativo inicial de muerte por apoptosis. Una vez que se inicio un proceso apoptótico en dichas células la proteína p53 se localizó en la mitocondria, y se observó una disminución en el potencial de membrana mitocondrial (Ortega C. 2006). Con base en estos resultados se propuso que la hiperglucemia induce apoptosis de las células β pancreáticas, posiblemente a través de la movilización de la proteína p53 a la mitocondria (Ortega *et al.*, 2006). Derivado de este estudio, surgió la propuesta de estudiar las modificaciones postraduccionales que pudieran estar regulando la vida media de p53, al inhibir su degradación.

La proteína p53 cumple una función importante en cuanto a la sobrevivencia de la célula, a través del monitoreo de daño celular que puede ser provocado por el estrés oxidante al aumentar la producción de ERO que inducen daños en el DNA con la subsecuente activación de los mecanismos de reparación (Sakai 2003; Brownlee, 2005). Así como respuesta al daño en el DNA, se estimula la activación de genes y proteínas que catalizan los mecanismos de reparación del DNA, entre estas proteínas se encuentran p53 y PARP, para enmendar los daños y tratar de restablecer a la célula hasta un estado metabólico normal. Sin embargo si el daño es severo entonces p53 se encarga de iniciar el proceso de apoptosis a través de la expresión de genes pro y

antiapoptóticos como los pertenecientes a la familia Bcl-2 o PIGs (Genes inducidos por p53). La proteína p53 tiene la propiedad de regular el inicio de la apoptosis a través de mecanismos transcripcionales, como los antes descritos e independientes de transcripción (Caelles *et al.*, 1994). Se ha demostrado que en respuesta a múltiples estímulos de muerte, una fracción de p53 se transloca a la mitocondria (Sansome *et al.*, 2001). En la mitocondria p53, puede interactuar directamente e inhibir a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL (presentes en la membrana mitocondrial externa) y contribuir a la activación de Bax y Bak que permeabilizan la membrana mitocondrial externa, actuando sobre CADV (canal aniónico dependiente de voltaje) y por ende desequilibrar el potencial de membrana; permitiendo así, la liberación de activadores apoptóticos hacia el citoplasma (Marchenko, 2000), como el citocromo c, contribuyendo de esta manera a la formación del apoptosoma y a la activación de la vía intrínseca de apoptosis (Belizário, 2007). Debido a que p53 es una proteína de vida media corta, es probable que para su translocación hacia la mitocondria, sea necesario evitar los mecanismos de degradación. La degradación de p53 a cargo de Mdm-2, puede evadirse por cambios postraduccionales como fosforilación, acetilación, ubiquitinación y poli-ADP-ribosilación.

La actividad de la enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) y la acumulación de p53 se inducen por el daño en el DNA, y ambas han sido implicadas en la respuesta celular normal a tales daños, como es la activación de los mecanismos apoptóticos (Simbulan-Rosenthal, 1998). La molécula de PARP se une al DNA dañado y cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa a partir de NAD^+ , a sí misma y a otras proteínas nucleares como p53 (Pacher, 2002) iniciando así la síntesis del polímero pADPr. Los resultados de este estudio muestran que en condiciones de hiperglucemia en el cultivo de células RINm5F, la poli ADP-ribosilación de p53 se presenta al poco tiempo de iniciado el tratamiento (2 h), se incrementa hasta las 16 h, y posteriormente inicia el decremento en forma constante, debido a la fragmentación e inactivación de la enzima PARP (ANOVA One-Way Kruskal-Wallis, comparación múltiple de los tratamientos, por método de Fisher $*p < 0.001$) que se observa claramente (Fig. 12 A y 12 B) a partir de 24 h de exposición a 30 mM de glucosa. Lo que demuestra que la poli-ADP-ribosilación de p53 es una respuesta temprana en condiciones de hiperglucemia (Fig. 13 A y 13 B) que pudiera contribuir a la estabilidad de la proteína y probablemente a su movilización hacia la mitocondria. Se ha demostrado que PARP constituye un

sustrato para la caspasa 3, enzima encargada de la proteólisis apoptótica. La enzima caspasa-3 reconoce el motivo DEVD dentro de las secuencias de localización nuclear de PARP-1 esta proteína puede ser cortada en dos fragmentos de 89 y 24 kDa. Esta ruptura proteolítica se considera actualmente como un marcador de apoptosis dependiente de caspasas (Martin, 2005). Por lo que su inactivación de PARP en estas condiciones concuerda con el decremento de la viabilidad de las células RINm5F por apoptosis en condiciones de hiperglucemia. Estudios previos con células humanas, han demostrado por inmunoprecipitación la formación del complejo PARP-p53 (Malanga, 1998). La poli ADP-ribosilación de p53 puede evitar su degradación al modificar su configuración haciéndola inaccesible a la proteólisis de Mdm2, estos eventos conducen inevitablemente a la muerte de las células por apoptosis (Wesierska-Gadek et al., 1996; Malanga, 1998).

Por otro lado, las concentraciones intracelulares de NAD^+ son de vital importancia para la activación de PARP, debido a que determinan el tamaño del polímero de ADP-ribosa (reacción de polimerización). Por lo que en este estudio se midieron las concentraciones intracelulares de NAD^+ y de NADH, mediante espectrofotometría. Los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa de las concentraciones de NAD^+ y un incremento en la concentración de NADH, conforme se incremento el tiempo de cultivo con alta glucosa (ANOVA One-Way Kruskal-Wallis, comparación múltiple por Fisher LDS y Tukey Kramer, $*p= 0.05$), lo que modificó la relación NAD^+/NADH . Sin embargo, los cambios en los nucleótidos de niacinamida en estas condiciones, aparentemente no están relacionados con la sobreactivación de PARP, dado que ésta se degrada y disminuye su actividad a partir de 24 h. Lo que resulta de suma importancia para preservar los niveles de energía necesarios para la apoptosis. Se sabe que el abatimiento significativo de la concentración de NAD^+ tiene un efecto directo sobre el aporte energético de la célula, siendo motivo suficiente para iniciar el proceso de muerte (West, 2000). La disminución en la relación NAD^+/NADH es el reflejo del incremento en la concentración de NADH, lo cual tiene consecuencias severas en el metabolismo celular. Uno de los más importantes relacionados con la hiperglucemia, es la acumulación de protones en la membrana interna mitocondrial, lo que incrementa el gradiente de protones, y la producción de anión superóxido y otras ERO. Por lo que es un indicador del estado redox de la célula. El incremento de ERO de origen mitocondrial y estrés oxidante en células tratadas con alta glucosa se ha

demostrado previamente (West, 2000; Sakai *et al.*, 2003; Kajimoto y Kaneto, 2004; Ortega *et al.*, 2006; Robertson y Harmon, 2006), así como los cambios en la concentración de nucleótidos de niacinamida y de los sistemas antioxidantes (Rechsteiner *et al.*, 1976; West, 2000; Kajimoto y Kaneto, 2004; Díaz-Flores *et al.*, 2006). Por otro lado, según los resultados mostrados en la Fig.14 C las concentraciones de NADH son mucho más altas que las de NAD⁺ por lo que una de las posibles causas de este comportamiento es que ya no existe una reacción de oxidación solo de reducción por el exceso de protones derivado de la condición de hiperglucemia y del mal funcionamiento metabólico generado por el proceso apoptótico.

10. CONCLUSIONES

Con base en estos resultados podemos concluir que la hiperglucemia, conduce a la activación PARP y a la adición de residuos de ADP-ribosa que podría contribuir a la preservación y activación de la proteína p53 para la inducción de apoptosis en las células RINm5F, aunado a los cambios redox dados por la relación NAD⁺/NADH en condiciones de alta glucosa.

Por lo que este estudio aportó un mecanismo bioquímico no conocido que sin duda ayudara a comprender aun más el funcionamiento de la célula β , del páncreas y los daños por hiperglucemia presentes en un estado diabético, que hoy en día cada vez suma un mayor número de personas a nivel mundial como nacional, las que al padecer la enfermedad pierden calidad y años de vida de ahí la importancia de esta investigación. Hasta el momento la mejor opción para los pacientes con diabetes mellitus (DM) es la prevención, mediante una alimentación sana y balanceada, hacer ejercicio y una vida sin estrés. Uno de los propósitos de la ciencia es poder brindar medicamentos más eficientes para la población diabética por lo que aún queda mucho por entender de la bioquímica de la célula β y en consecuencia un arduo trabajo por hacer.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Asociación Americana de Diabetes (ADA). 2004. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 27: (1): 55-59.
- Belizário E, Alves J, Occhiucci JM, Garay-Malpartida M, and Sesso A. 2007. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. *Braz J Med Biol Res*. 40(8):1011-1024.
- Bell IG, Polonsky SK. (2001). Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function. *Nature*. 414:788-791.
- Berger F, MH. Ramirez-Hernandez, Ziegler M. 2004. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci*. 29:111–118.
- Bermúdez V, Bermúdez F, Arraiz N, Leal E, Linares S, Mengual E, Valdelamar L, Rodríguez M, Seyfi H, Amell A, Carrillo M, Silva C, Acosta A, Añez J, Andara C, Angulo V, Martins G. 2007. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 26(2): 76-86.
- Bergsten P. 1998. Glucose-induced pulsatile insulin release from single islets at stable and oscillatory cytoplasmic Ca^{+2} . *Am J Physiol*. 274:796-800.
- Bonner-Weir S. 2000. Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology*.114:1926-1929.
- Brownlee M. 2005. The pathology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes*. 54: 1615-1625.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. 2003. Beta cell deficit and increased β cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 52:102-110.
- Caelles C, Helmborg A, Karin M. 1994. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*. 370(6486):220-223.
- Cascales MA. 2003. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm*. 69(1):37-64.
- Ceriello A., Quagliaro L., D'Amico M., Filipo DC., Marfella R., Nappo F., Berrino L., Rossi F., Giugliano D. (2002). Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes*. 51: 1076-1082.
- Chappie JS, Cànaves JM, Han GW, Rife CL, Xu Q, Stevens RC. 2005. The structure of a eukaryotic nicotinic acid phosphoribosyltransferase reveals structural heterogeneity among type II PRTases. *Structure*.13(9):1385-1396.

- Clark JM Jr. 1966. Bioquímica experimental. Ed. Acribia. 1° ed. España.
- Clément MV, Ponton A, Pervaiz S. 1998. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *FEBS Lett.* 440: 13-18.
- Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *J Biochem.* 326: 1-16.
- Crafts R., 1989. Anatomía humana funcional, Ed. Limusa, México pág. 875.
- D'amours D, Desnoyers SD' Silva I, Poirier GG. 1999. Poly(ADP ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *J Biochem.* 342: 249-268.
- Díaz-flores M, Gutiérrez- Rodríguez M, Ortega-Camarillo C, Cruz M, Baiza-Gutman. 2007. Las alteraciones moleculares de las lesiones tisulares inducidas por la hiperglucemia crónica. *Salud y ciencia.* 15(4): 742-750.
- Donath YM, Gross JD, Cerasi KN. 1999. Hyperglycemia induced β cell apoptosis in pancreatic islets of *psammomysobesus* during development of diabetes. *Diabetes.* 48: 738-744.
- Drake R. 2010. Gray anatomía para estudiantes. Ed. Elsevier. 2da edición. México: 1103.
- Dubin M, Stoppani A. 2000 Muerte celular programada y apoptosis función de las mitocondrias *MEDICINA* (Buenos Aires). 60: 375-386.
- Elliott G, y Rechsteiner M. 1975. Pyridine nucleotide metabolism in mitotic cells. *J. Cell Physiol.* 86(2):641-651.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). 2006. Institutos Nacionales de Salud.
- Evans JL, Goldfine DI, Maddux BA, Grodsky GM. 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 23(5):599-622.
- Evans JL, Goldfine I, Maddux BA, Grodsky GM. 2003. Are oxidative stress_activated signaling pathways mediators of insulin resistance and cell dysfunction? *Diabetes.* 52:1-8.
- Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S. 2005. Role of mitochondria in toxic oxidative stress, *Mol Interv.* 5(2):94-111
- Fernández FJ, Gómez M y Jordan J. 2004. p53, Nuestro guardián celebra sus bodas de plata. *AFT* (España). 2(3): 195-203.

- Flatt P, Abdel-Wahab Y, Boyd AC, Barnett CR, O'harte FM. 1997. Pancreatic B-cell dysfunction and glucose toxicity in non-insulin-dependent diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society*. 56: 243-262.
- Ganong K. 2010. Fisiología médica. Ed Mc.Graw Hill Interamericana. 23 ed. México: 714.
- Gazdar AF, Chick W, Oie HK, Sims HL, King DL, Weir GC and Lauris V. 1980. Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc Natl Acad Sci (U S A)*. 77(6):3519-3523.
- Giogino F, Laviola L, Lonardi A. 2005. Pathophysiology of type 2 diabetes: Retinale for different oral antidiabetic treatment strategies. *Diabetes Res Clin Pract*. 68(1):22-29.
- Gómez G E, Zentella A. 1998. Apoptosis y muerte celular programada. *BEB*. 17(3): 105-114.
- González Cháves A, Lavalle GJ, Ríos Gonzales J. 2009. Síndrome Metabólico y enfermedad cardiovascular, obesidad, dislipidemia, hipertensión, prediabetes, diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina. Ed. Intersistemas. 3ªed. S.A de C.V México: 269.
- Goodwin PM, Lewis PJ, Davies ML, Skidmore CJ, Shall S. 1978. The effect of gamma radiation and neocarzinostatin on NAD⁺ and ATP levels in mouse leukaemia cells. *Biochim. Biophys*. 543:576–582.
- Grankvist K, Lernmark A, Täljedal IB. 1997. Alloxan cytotoxicity in vitro. Microscope photometric analyses of Trypan Blue uptake by pancreatic islet cells in suspension. *Biochem J*.162(1):19-24.
- Grankvist k, Marklund SL, Taljedal IB. 1981. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *J Biochem*. 199: 393-398.
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger M O. 2006. Nuclear ADP-Ribosylation reactions in mammalian cells: Where are we today and where are we going?. *Microbiol Mol Biol Rev*. 70(3):789-881
- Herrmann M, Lorenz HM, Voll R, Grunke M, Woith W y Kalden JR.1994. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments nucleic acids research. *Nucleic Acids Research*. 22 (24): 5506-5507.
- Hiraoka W, Vazquez N, Nieves-Neira W, Chanock SJ, Pommier Y. 1998. Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. *J Clin Invest*. 102: 1961-1968.
- Jordán J. 2003. Apoptosis: Muerte celular programada. *OFFARM* (Centro Regional de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Castilla-La Mancha). 22 (6): 100-106.

- Kahn SE. 2001. The importance of β -cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(9):4047-4058.
- Kajimoto Y, Kaneto H. 2004. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* 1011:168-176.
- Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. Beneficial effects of antioxidants in diabetes possible protection of pancreatic β -Cells against glucose toxicity. *Diabetes.* 48: 2398-2400.
- Kawahito S, Kitahata H, Oshita S. 2009. Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J Gastroenterol.*15: 4137-4142.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: A basic biologic phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-257.
- Konigsberg F.M. 2008. Estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. El manual moderno. México: 477-481.
- Koo KB, Suh HJ, Ra KS, Choi JW. 2011. Protective effect of cyclo (His-Pro) on streptozotocin-induced cytotoxicity and apoptosis in vitro. *J Microbiol Biotechnol.* 21(2):218-227.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, PeterME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ.* 16(1): 3–13.
- Lang J. 1999. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem.* 259:3-17.
- Laybutt DR, Kaneto H, Hasenkamp W, Grey S, Jonas JC, Sgroi DC, Groff A, Ferran C, Bonner-Weir S, Sharma A, Weir GC (2002). Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes.* 2002 51:413-423.
- Leahy JL. 2008. Mary, Mary, quite contrary, how do your cells fail? *Diabetes.* 57:2563-2564.
- Leist M, Nicotera P. 1997. The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 236: 1-9.
- LeRoith D, Taylor SL, Olefsky JM. 2004. Diabetes Mellitus. A fundamental a Clinical Text. 3^a Ed, ed. Lippincot Williams & Wilkins (Philadelphia E.U.A): 1545.
- Lomonte VB. 2009. Técnicas de laboratorio e inmunología clínica. 3^a Ed. Universidad De Costa Rica Facultad de Microbiología Instituto Clodomiro Picado:122.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folinphenol reagent. *JBC*. 193(1):265-75.
- Maechler P, Jornot L, Wollheim CB. 1999. Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*. 274(39):27905-27913.
- Maillet M. 2002. Biología celular. Ed. Masson. Barcelona.
- Malanga M, Pleschke JM, Kleczkowska HE, Althaus FR. 1998. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. *J Biol Chem*. 273(19):11839-11843.
- Malmlöf M, Pajarvi G, Högberg J, Stenius U. 2008. Mdm2 as a sensitive and mechanistically informative marker for genotoxicity induced by benzo[a]pyrene and dibenzo[a,l]pyrene. *Toxicol Sc*. 102(2):232–240.
- Marchenko ND, Zaika A, Moll UM. 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *Biol Chem*. 26; 275(21):16202-16212.
- Marshak S, Leibowitz G, Bertuzzi F, Kaiser N, Gross J.D, Cerasi E, Melloul D. 1999. Impaired β -cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes*.48: 1230–1236.
- Martin OD. 2005. La poli (ADP-Ribosa) polimeraza-1 de la expresión génica durante la carcinogénesis epidérmica. Tesis doctoral, Granada. España.
- Martin D, Muñoz JA, Aguilar R, Ruíz M and Javier F. 2006. Poli(ADP-ribose) polimerasa-1: una proteína nuclear implicada en procesos inflamatorios ,muerte celular y cáncer. *Médicas UIS*. 19:95-103.
- Mathis D, Vence L, Benoist C. 2001. Beta-cell death during progression to diabetes. *Nature*. 414:792-798.
- McClenaghan NH. 2007. Physiological regulation of the pancreatic β -cell: functional insights for understanding and therapy of diabetes. *Exp Physiol*. 92: 481-496.
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Oleski P, Chittenden T, Pancoska P, MoilMU. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*. 11: 577–590.
- Morales V.A. (2010). Identificación de patrones de viabilidad y expresión génica en condrocitos articulares humanos para su utilización en ingeniería tisular. Tesis doctoral, Universidad de Granada Facultad de Medicina: 44,55.
- Moreno A.L. 2001. Epidemiología y diabetes. *Rev Fac Med UNAM*; 44(1):35-37.

Oie HK, Gazdar AF, Minna JD, Weir GC, Baylin SB. 1983. Clonal analysis of insulin and somatostatin secretion and L-dopa decarboxylase expression by a rat islet cell tumor. *Endocrinology*. 112(3):1070-1075.

Ortega-C, Flores M, Avalos A, Vergara M, Rosales A. 2001. La apoptosis y su importancia biomédica. *Gac Méd Méx*.137(6): 563-577

Ortega CC. 2006. Estudio de la participación de la mitocondria y la proteína p53 en la muerte de las células de insulinoma inducida por concentraciones altas de glucosa. Tesis doctoral UAM Iztapalapa División de ciencias biológicas y de la salud. México. D.F.

Ortega CC, Guzmán GM, García MR, Rosales T, Avalos RA, Durán RG, Medina NR, Cruz M, Díaz FM, Kumate J. 2006. Hyperglycemia induces apoptosis and p53 mobilization to mitochondria in RINm5F cells. *Mol Cell Biochem*. 281: 163-171.

Ortega CC, García MR, Cruz. LM. 2009. Alteraciones de las células β pancreáticas y su asociación con síndrome metabólico. Ed. Intersistemas. 3^aed. S.A de C.V México: 53.

Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JG., Szabó E and Szabó C. 2002. The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes*. 51(2):514-21.

Porras A, Marzo I. 2010. Apoptosis: Una forma controlada de muerte celular, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular II. Universidad Complutense de Madrid / Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. *SEBBM* Divulgación.

Ravassard P, Hazhouz Y, Pechberty S, Bricout E, Neveu, Armanet M, Czernichow P, and Scharfmann R. 2011. A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J Clin Invest*. 121(9): 3589- 3597.

Rechsteiner M, Hillyard D, y Olivera BM. 1976. Turnover at nicotinamide adenine dinucleotide in cultures of human cells. *J Cell Physiol*. 88:207–217.

Ríos H.M, Hernández MM. 2001. Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Rev Cubana Oncol*.17(1): 65-71.

Rhodes CJ. 2005. Type 2 Diabetes a matter of β cell life And Death? *Science*. 307:380-383.

Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. 2004. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*. 53;1(1):19-24.

Robertson RP, Harmon JS. 2006. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radic Biol Med*.15; 41(2):177-184.

Roche E. (2003). Diabetes tipo 2: gluco-lipo-toxicidad y disfunción de la célula β pancreática. *Ars Pharmaceutica*. 44:313-332.

- Rongvaux AF, Andris F, Van Gool, y Leo O. 2003. Reconstructing eukaryotic NAD⁺ metabolism. *Bioessays*. 25: 683–690.
- Ryoichi T, Toyoshi I, and Keizo O. 2011. Clinical and experimental evidence for oxidative stress as an exacerbating factor of diabetes mellitus. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 48 (1):72–77.
- Sambrook, Fritseh EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual, tomo 3 2° Ed, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa I, Suefuji M, Nakamaru k, HirashimaY, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose k, Brownlee M and Araki E. 2003. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic β cells. *Biochem Biophys Res Commun* 300(1):216-222.
- Sansome C, Zaika A, Marchenko ND, Moll UM. 2001. Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett.* 19; 488(3):110-5.
- Santangelo C, Matarrese P, Masella R, Di Carlo MC, Di Lillo A, Scazzocchio B, Vecci E, Malorni W, Perfetti R, Anastasi E. 2007. Hepatocyte growth factor protects rat RINm5F cell line against free fatty acid-induced apoptosis by counteracting oxidative stress. *J Mol Endocrinol.* 38(1-2):147-158.
- Saltiel A., Kahn R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipidmetabolism. *Nature.* 414:799-806.
- Secretaria de Salud México Gobierno Federal (SSA), Dirección de Gestión de Emergencias (DGE) 2001.
- Simbultan-Rosenthal CM, Rosenthal SD, Ding R, Bhatia K, Smulson EM.1998. Prolongation of the p53 response to DNA strand breaks in cells depleted of PARP by antisense RNA expression. *Biochem Biophys Res Comm.* 253: 864-868.
- Simbulan-Rosenthal, Rosenthal DS, Lyer S, Boulares AH and Simulson ME. 1999. Involment of PARP and Poly(ADP ribosil)ation in the early stages of apoptosis and DNA replication. *Mol Cell Biochem.* 193: 137-148.
- Sheetz MJ; King GL 2002. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA.* 288(20): 2579-2588.
- Schuber F y Lund FE. 2004. Structure and enzymology of ADPribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr. Mol. Med.* 4:249–261.
- Schuler M, Bossy-Wetzl E, Goldstein CJ, Fitzgerald P, Green RD. 2000. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *JBC* 275: 7337–7342.

- Skidmore CJ, Davies ML, Goodwin PM, Halldorsson H, Lewis PJ, Shall S y Zia'ee AA. 1979. The involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in the degradation of NAD⁺ caused by gamma-radiation and N-methyl-N-nitrosourea. *Eur. J. Biochem.* 101:135–142.
- Steppel JH, Horton ES. 2004. Beta-cell failure in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep.* 4(3):169-175.
- Stryer L. 1995. Bioquímica. Vol. 2. Editorial Reverte, Cuarta Edición, Barcelona.
- Suzuki H, Quesada P, Farina B. Leone E, 1986 In vitro Poly(ADP ribosylation) of seminal ribonuclease. *JBC* 261: 6048-6055.
- Taira N, Yoshida K. 2012. Post-translational modifications of p53 tumor suppressor: determinants of its functional targets. *Histol Histopathol.* 27 (4):437-443.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1997. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 20: 1183–1197
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2003. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 26: 3160– 3167.
- Thomas HE, Durmiche R, Corbett JA, Kay TW. 2002. Interleukin-1 plus gammainterferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by overexpression of suppressor of cytokine signalling-1. *Diabetes.* 50: 2744-2751.
- Thornberry NA. 1998. Caspases: Key mediators of apoptosis. *Chem & Biol.* 5: 97-103.
- Casey TM, Dufall KG, Arthur PG. 1999. An improved capillary electrophoresis method for measuring tissue metabolites associated with cellular energy state. *EUT J. Biochem.* 261: 740-745.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ. 1999. Cell death in development. *Cell.* 96: 245-54.
- Waning DL, Lehman JA, Batuello CN, Mayo L. D. 2010. Controlling the Mdm2-Mdmx-p53 circuit. *Pharmaceutic (Basel).* 3(5): 1576-1593
- Wesierska-Gadek J, Schmid G, Cerni C. 1996. ADP-ribosylation of wild-type p53 in vitro: binding of p53 protein to specific p53 consensus sequence prevents its modification. *Biochem Biophys Res Commun.* 224(1): 96-102.
- West I.C. 2000. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diab Med.* 17: 171-180.
- Williams GT, Lau KM, Coote JM, Johnstone AP. 1985. NAD⁺ metabolism and mitogen stimulation of human lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 160: 419–426.

Won J, Chung SY, Kim SB, Byun BH, Yoon YS, Joe CO. 2006. Dose-dependent UV stabilization of p53 in cultured human cells undergoing apoptosis is mediated by poly(ADP-ribosyl)ation. *Mol Cells*. 21(2): 218-223.

Worthington. 1973. Worthington Enzyme Manual. Bioquímica information. Biochemical Corporation, New Jersey.

www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/.../estadísticas/2007/edad07.pdf

Xia W, Wang Z, Wang Q, Han J, Zhao C, Hong Y, Zeng L, Tang L y Ying W. 2009. Roles of NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cell death. *Curr Pharm Des*.15(1): 12-19.

Ziegler M. 2000. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD⁺ in cellular signaling. *Eur. J. Biochem*. 267: 1550–1564.