



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**UBIQUITINACIÓN DE P53 POR MDM2 Y SU RELACIÓN CON LA APOPTOSIS
DE LAS CÉLULAS RINM5F CULTIVADAS CON ALTA GLUCOSA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RAÚL BARZALOBRE GERÓNIMO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CLARA ORTEGA CAMARILLO
FACULTAD DE MEDICINA-UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES, IZTACALA-UNAM.
DRA. MARGARITA DÍAZ FLORES
FACULTAD DE MEDICINA-UNAM.

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2014



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 09 de diciembre de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **BARZALOBRE GERÓNIMO RAÚL** con número de cuenta **98237315**, con la tesis titulada **"UBIQUITINACIÓN DE p53 POR Mdm2 Y SU RELACIÓN CON LA APOPTOSIS DE CÉLULAS RINm5F CULTIVADAS CON ALTA GLUCOSA"**, realizada bajo la dirección de la DRA. CLARA ORTEGA CAMARILLO:

Presidente: DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ
Secretario: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Suplente: DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO
Suplente: DRA. MARGARITA DÍAZ FLORES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 06 de marzo de 2014

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por su excelente programa de estudios de Maestría y su excelencia académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado para la realización de la presente tesis (número de registro CVU/becario: 365222/ 245515).

Al Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo económico concedido durante el desarrollo del presente trabajo de Investigación (Nº de registro: FIS/IMSS/PROT/G11/968) y a la Coordinación de Investigación en Salud, IMSS (matrícula de becario: 99095930).

A la Fundación IMSS A.C. y a la Fundación Río Arronte I.A.P por su apoyo para la compra de equipo de la UIM en Bioquímica del HE, CMN SXXI.

A la Dra. Clara Ortega Camarillo, Investigador Asociado B en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

A la Dra. Margarita Díaz Flores, Investigadora Asociada D en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, IMSS, y al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, Investigador Titular C en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México por haber conformado el comité tutor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Clara Ortega Camarillo por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y para realizar este trabajo de investigación bajo su valiosa asesoría, por ser mi maestra, por brindarme su apoyo, por los conocimientos compartidos y sobre todo por su enorme paciencia, además de ser un ejemplo a seguir.

A la Dra. Margarita Díaz Flores, por ser parte de mi comité tutorial, quien por su apoyo y sus consejos han servido para que esta tesis pudiera realizarse y por brindarme su valiosa amistad.

Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, por formar parte de mi comité tutorial, por sus acertadas sugerencias en la revisión de este trabajo, por su constante ayuda y sobre todo por su preciada amistad.

A la Dra. Rebeca García Macedo, por su ayuda y apoyo técnico para trabajar de forma correcta en el laboratorio y también por su amistad.

Al Dr. Daniel Hernández Saavedra, por la forma de transmitir sus conocimientos y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Miguel Cruz López, por permitir la elaboración de este proyecto de investigación en la Unidad de Investigación en Bioquímica.

A los miembros del jurado por haber revisado mi trabajo, por sus valiosos comentarios y sugerencias, muchas gracias:

Dr. Ricardo Mejía Zepeda.

Dra. María del Carmen García Rodríguez.

Dra. Gisela Ceballos Cancino.

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Investigación en Bioquímica, Luis, Javier, Nayeli, Ángeles, Selene, Fernanda y Jaime por hacer más agradable mi estancia en el laboratorio.

DEDICATORIA

Especialmente a Sony, por brindarme su amistad, su constante ayuda en la realización de este trabajo, por todos los momentos vividos en el laboratorio, por su apoyo incondicional en todas las situaciones de alegría y tristeza en los que hemos sido implicados, por su enorme paciencia en los momentos difíciles que hemos vivido. Te doy las gracias por ser mi esposa, por compartir cada segundo de tu vida con la mía, y por ser el gran amor de mi vida.

A mi hija Nurya por darme la invaluable oportunidad de ser papá. Su nacimiento ha coincidido con el final de esta tesis y me ha servido para darme el último empujón para concluir este trabajo. Por lo mucho que he aprendido de ella en tan poco tiempo. Es sin duda mi referencia para el presente y para el futuro. Espero ser un ejemplo para ella. Es una experiencia única el verte crecer cada día.

A mi nueva familia, mis suegra Paz, mi suegro Santiago, mis cuñados Nancy, René, mis sobrinos Alejandra, Aldo, Alejandro y Mauricio y a la tía Lily, por aceptarme en su familia y por todo el apoyo y comprensión recibidos en todos los momentos buenos y malos que hemos compartido.

A mis padres Bertha y Arturo, por todo su apoyo incondicional el cual ha sido fundamental para concluir este trabajo, por ser siempre mis ejemplos de superación profesional y para vencer los obstáculos y salir adelante, por el interés que siempre han mostrado por mi trabajo, por dedicarme su tiempo y comprensión, por sus consejos, por su cariño, por creer en mi y sobre todo por todo su amor y darme la vida.

A mis hermanos Conny, Rafa y Arturo, a quienes quiero mucho, por ser parte importante de mi vida, por compartir muchos momentos alegres y tristes, por su apoyo incondicional. Con gratitud y cariño.

A mis tíos por su gran apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida, y aunque ya no los vea con frecuencia se que siempre voy a contar con ellos.

A mis primos, por todos los momentos que hemos compartidos.

ÍNDICE

I. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	I
II. RESUMEN	1
III. ABSTRACT	2
IV. INTRODUCCIÓN	3
1. DEFINICIÓN DE DIABETES MELLITUS	3
2. EPIDEMIOLOGÍA.....	4
3. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES.	7
4. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA CÉLULA β	11
5. CARACTERÍSTICAS DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	15
6. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO COMO INICIADORAS DE LA APOPTOSIS DE LA CÉLULA β	26
6.1 Reducción de la masa de la célula \square por apoptosis como consecuencia de la hiperglucemia.	27
7. PROTEÍNA P53.....	31
7.1 Características estructurales de la proteína p53.....	31
7.2 Funciones fisiológicas de p53.....	32
7.3 Regulación de p53.....	33
7.4 p53 en el ciclo celular.	35
7.5 p53 y apoptosis.....	36
7.6 Degradación de p53.....	38
9. PROTEOSOMA	41
10. PROTEÍNA MDM2.....	44
10.1 Características estructurales de la proteína Mdm2.....	44
10.2 La actividad de Mdm2 está regulada por modificaciones post-traduccionales.	47
10.3 Regulación de Mdm2 por MicroRNAs.....	50
10.4 Regulación de Mdm2 por estrés ribosomal.....	51
10.5 Regulación de Mdm2 por estrés crónico y neurohormonas.....	51
10.6 Enfermedades asociadas con actividad excesiva de p53.....	51
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	54

VI. HIPÓTESIS	55
VII. OBJETIVO GENERAL	56
VIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
IX. MATERIAL Y MÉTODOS	58
1. REACTIVOS	58
2. CULTIVO CELULAR.....	58
3. EXTRACCIÓN DE RNA Y RT-QPCR (REAL TIME- QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION).....	59
4. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS.	59
4.1 Fragmentación de DNA.....	59
5. FRACCIONES SUBCELULARES.....	60
6. "WESTERN BLOT" PARA MDM2 Y MDM2 P-SER ¹⁶⁶	61
7. INMUNOPRECIPITACIÓN.....	61
8. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE MDM2 POR MICROSCOPIA CONFOCAL	62
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	63
X. RESULTADOS	64
1. LAS CONCENTRACIONES ALTAS DE GLUCOSA INDUCEN APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS RINm5F.....	64
2. LA EXPRESIÓN DE MDM2 EN CÉLULAS RINm5F DISMINUYE EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES ALTAS DE GLUCOSA	66
3. EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES ALTAS DE GLUCOSA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE MDM2 EN CÉLULAS RINm5F.....	67
4. LAS CONCENTRACIONES ALTAS DE GLUCOSA INDUCEN LA FOSFORILACIÓN DE SER 166 DE MDM2 EN CÉLULAS RINm5F	70
5. RELACIÓN ENTRE MDM2 TOTAL Y MDM2 P-SER 166	73
6. EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES ALTAS DE GLUCOSA SOBRE LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE MDM2.....	76
7. ANÁLISIS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE P53 CONTRA MDM2.	77
8. LAS CONCENTRACIONES ALTAS DE GLUCOSA INHIBEN LA UBIQUITINACIÓN DE P53.	80
XI. DISCUSIÓN	83
XII. CONCLUSIONES	95

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
1. PÁGINAS WEB CONSULTADAS.....	109

I. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Complicaciones asociadas a la diabetes mellitus.....	3
Figura 2. Prevalencia Mundial de Diabetes Mellitus 2010.....	5
Figura 3. Proyección Mundial de Diabetes Mellitus 2030.	5
Figura 4. Prevalencia de diabetes según entidad federativa. México, ENSANUT 2012. ...	7
Figura 5. El páncreas y los islotes de Langerhans.	12
Figura 6. Islote de Langerhans.	12
Figura 7. Mecanismos que controlan la masa de las células β	13
Figura 8. Secreción de insulina de las células β pancreáticas.	15
Figura 9. Estructura de la mitocondria.....	17
Figura 10. DNA mitocondrial.....	18
Figura 11. Proteínas mitocondriales.....	19
Figura 12. Flujo de electrones y protones a través de los cuatro complejos de la cadena respiratoria. La coenzima Q (CoQ) captura vía los complejos I y II.....	20
Figura 13. Modelo del acoplamiento del metabolismo de glucosa a la secreción de insulina en la célula β	22
Figura 14. Formación del apoptosoma.	24
Figura 15. Permeabilización de la membrana mitocondrial.	25
Figura 16. La glucosa estimula la actividad de la célula β	27
Figura 17. Disfunción de la célula β e historia natural de DT2.....	29
Figura 18. Estructura del gen p53 y dominios funcionales de la proteína p53.....	32
Figura 19. Modificaciones post-traduccionales del Carboxilo-terminal.....	34
Figura 20. La proteína p53 en el ciclo celular.....	36
Figura 21. p53 y apoptosis.....	37
Figura 22. Ruta de la conjugación de ubiquitinias. En el proceso de ubiquitinación de las proteínas participan tres enzimas, E1, E2 y E3.....	41

Figura 23. Composición y organización de los proteosomas.....	43
Figura 24. Estructura del gen mdm2 y dominios funcionales de la proteína Mdm2.....	45
Figura 25. Regulación de Mdm2 por PKB/Akt.....	50
Figura 26. Balance entre p53 y Mdm2.....	52
Figura 27. Inducción de apoptosis en células RINm5F por glucosa.....	65
Figura 28. Efecto de la glucosa (5 ó 30 mM) sobre la expresión de Mdm2.....	66
Figura 29. Efecto de la glucosa (5 ó 30 mM) sobre Mdm2 total en la fracción citosólica.	68
Figura 30. Efecto de la glucosa (5 ó 30 mM) sobre Mdm2 total en la fracción nuclear....	69
Figura 31. Efecto de la glucosa sobre la fosforilación de Mdm2 en la fracción citosólica	71
Figura 32. Efecto de la glucosa sobre la fosforilación de Mdm2.....	72
Figura 33. Relación entre Mdm2 fosforilada y Mdm2 total de la fracción citosólica.....	74
Figura 34. Relación entre Mdm2 fosforilada y Mdm2 total de la fracción nuclear.....	75
Figura 35. Efecto de la glucosa sobre la distribución de Mdm2.....	76
Figura 36. Efecto de la glucosa sobre la asociación entre p53 y Mdm2 de la fracción citosólica.	78
Figura 37. Efecto de la glucosa sobre la asociación entre p53 y Mdm2 de la fracción nuclear.	79
Figura 38. Efecto de la glucosa sobre la ubiquitinación de p53 en la fracción citosólica.	81
Figura 39. Efecto de la glucosa sobre la ubiquitinación de p53 en la fracción nuclear....	82
Cuadro I. Clasificación de la Diabetes.....	10
Cuadro 2. Enfermedades Asociadas a la actividad excesiva de p53.....	53

II. RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad multifactorial, que se caracteriza principalmente por los niveles altos de glucosa en sangre, causados por una disminución en la producción y secreción de insulina de las células β pancreáticas. El mecanismo mediante el cual la hiperglucemia induce la apoptosis de las células β pancreáticas no está completamente entendido. Sin embargo, se sabe que la hiperglucemia crónica promueve la activación y translocación de la proteína p53 hasta la mitocondria. El presente trabajo pretende conocer si la apoptosis de las células RINm5F generada por hiperglucemia está relacionada con la regulación deficiente de p53 por parte de la proteína Mdm2 que ve alterada su función de ubiquitina E3 ligasa. Con este propósito se cultivaron células productoras de insulina (RINm5F) en medio RPMI 1640-SFB 10%, en presencia de 5 mM ó 30 mM de glucosa durante 4, 8, 16, 24, 48 y 72 h. Se obtuvo el RNA para analizar la expresión de *Mdm2* por qPCR en tiempo real, también se obtuvieron las fracciones subcelulares (núcleo y citosol) para determinar la concentración y actividad de Mdm2 por ensayos de western blot. La apoptosis se evaluó mediante el análisis de integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa. Con el propósito de conocer la localización subcelular de Mdm2, se realizó un estudio por microscopia confocal

Los resultados mostraron que las células RINm5F cultivadas con glucosa 30 mM disminuyen la expresión y concentración de Mdm2 desde 8 y 24 h respectivamente. También se observó que la fosforilación de Mdm2 en serina 166 se incrementa hasta las 72 h. Estos resultados nos permiten proponer que la hiperglucemia al afectar la expresión y concentración de Mdm2 evita el reconocimiento y degradación de p53, desencadenando la apoptosis de las células RINm5F. Sin embargo la fosforilación del Mdm2 en serina 166 nos indica que una parte de las células, resistió al estrés producido por los niveles elevados de glucosa, activando las señales de sobrevivencia. Con base en estos resultados podemos concluir que en condiciones de alta glucosa, las funciones de Mdm2 para ubiquitinar y conducir la degradación de p53, están disminuidas y llevan finalmente a la apoptosis de las células RINm5F.

III. ABSTRACT

Diabetes mellitus is a multifactorial disease which is mainly characterized by high levels of blood glucose, caused by a decrease in the production and secretion of insulin from pancreatic β cells. The mechanism through which hyperglycemia induces apoptosis of pancreatic β cells is not fully understood. However, it is known that chronic hyperglycemia promotes the activation and translocation of p53 protein to the mitochondria. This work aims to determine whether apoptosis of RINm5F cells was generated by the effect of hyperglycemia and to determine whether this related to poor regulation of p53 by Mdm2 protein that altered function of E3 ubiquitin ligase. In order to carry this out, insulin producing cells (RINm5F) were cultured in RPMI 1640-SFB 10% medium in the presence of 5 or 30 mM glucose for 4, 8, 16, 24, 48, 72 h. RNA was obtained to analyze Mdm2 expression by real-time qPCR were also obtained subcellular fractions (nucleus and cytosol) to determine the concentration and activity of Mdm2 by western blot assays. Additionally, DNA integrity was analyzed using electrophoresis in agarose gel to assess apoptosis. For the purpose of assessing intracellular Mdm2 distribution confocal microscopy was done.

The results showed that RINm5F cells cultured with 30 mM glucose and decrease expression of Mdm2 concentration from 8 and 24 h respectively. It was also observed that phosphorylation of serine 166 Mdm2 is increased up to 72 h. These results allow us to propose that hyperglycemia by affecting the concentration of Mdm2 expression and preventing the recognition and degradation of p53, triggers apoptosis of RINm5F cells. However, the phosphorylation of Mdm2 on serine 166 indicates that there is a certain percentage of cells that resisted the stress caused by high levels of blood glucose, activating survival signals but these are weak unable to prevent and who activates survival signals but not enough to prevent apoptosis of RINm5F cells. Based on these results we can conclude that under high glucose, the functions of Mdm2 to regulate p53 ubiquitination and degradation are decreased and eventually lead to apoptosis of RINm5F cells.

IV. INTRODUCCIÓN

1. Definición de Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por un estado de hiperglucemia crónica resultante de la secreción y acción defectuosa de la insulina. La hiperglucemia crónica en diabetes está asociada con daño a largo plazo, disfunción y falla de varios órganos, especialmente en los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Figura 1). Los síntomas de una marcada hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces con polifagia y visión borrosa (American Diabetes Association, 2004).

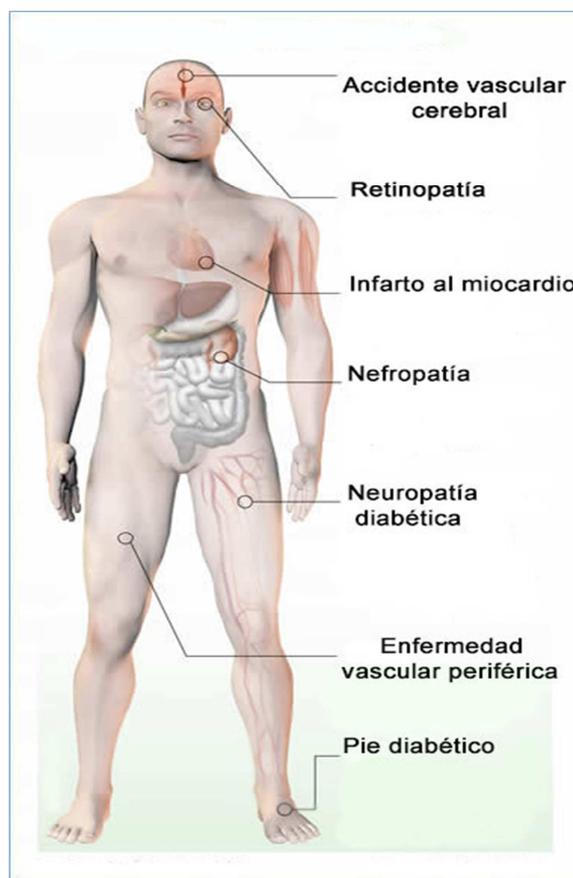


Figura 1. Complicaciones asociadas a la diabetes mellitus. La diabetes aumenta el riesgo de numerosos problemas de salud debido a los niveles altos de glucosa en la sangre, tales como complicaciones oculares, enfermedad renal, daño al sistema nervioso, daño en pies, enfermedad cardíaca y derrame cerebral. (Fuente: American Diabetes Association).

2. Epidemiología

La diabetes mellitus (DM) es uno de los desórdenes endócrinos más comunes en el ser humano. En la actualidad, la diabetes afecta alrededor de 243 millones de personas en el mundo y se espera que esta cifra aumente a más de 365 millones en el año 2030 (Figura 2 y 3). La epidemiología de la diabetes mellitus en el mundo convierte a esta enfermedad en una verdadera pandemia, cuyos cálculos para el año 2030 solo en América Latina y el Caribe (con mayor prevalencia en Brasil, México y Argentina) indican que pasará de 13 millones, en la actualidad, a 60 millones de enfermos si no se toman las medidas de prevención requeridas y necesarias (Gutiérrez *et al.*, 2007). Según la Federación Internacional de Diabetes, los países subdesarrollados incrementarán el riesgo de padecer diabetes así como las complicaciones asociadas con este padecimiento y la posibilidad de morir, motivando a todos los servicios de salud de los países con este grave problema, a tomar medidas que eviten que la carga de salud por las complicaciones de esta enfermedad sea insostenible.

De la población total de pacientes diabéticos, más de la mitad viven en países subdesarrollados y aproximadamente 60 millones de ellos habitan en el continente americano. La diabetes mellitus tiene una importante participación dentro de las principales causas de muerte. En 1990 se registraron alrededor de 660 000 defunciones en el mundo por esta causa, de las cuales 74% ocurrieron en países en vías de desarrollo (Aguilar, 2009; Contreras; 2004; Rubio, 2003; Rubio, 2008).

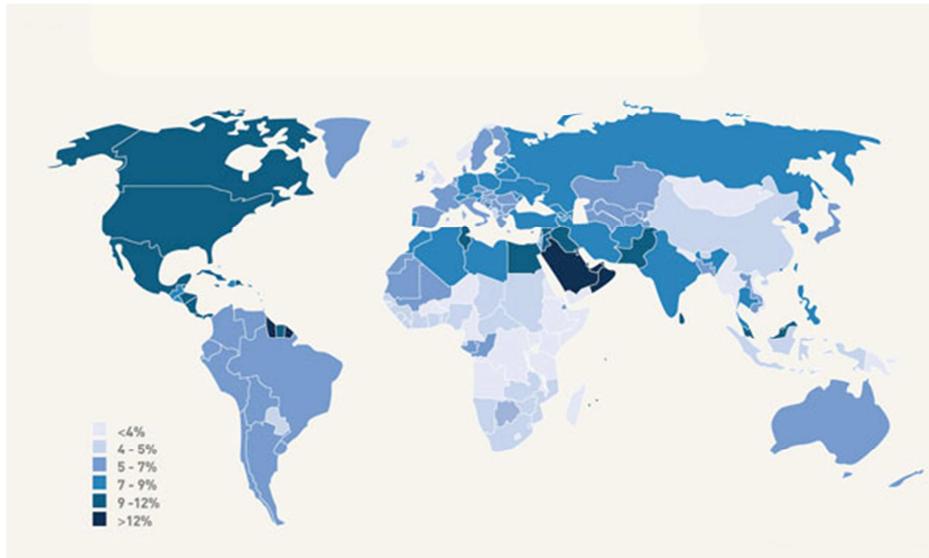


Figura 2. Prevalencia Mundial de Diabetes Mellitus 2010 (Fuente: www.diabestesatlas.org/map).

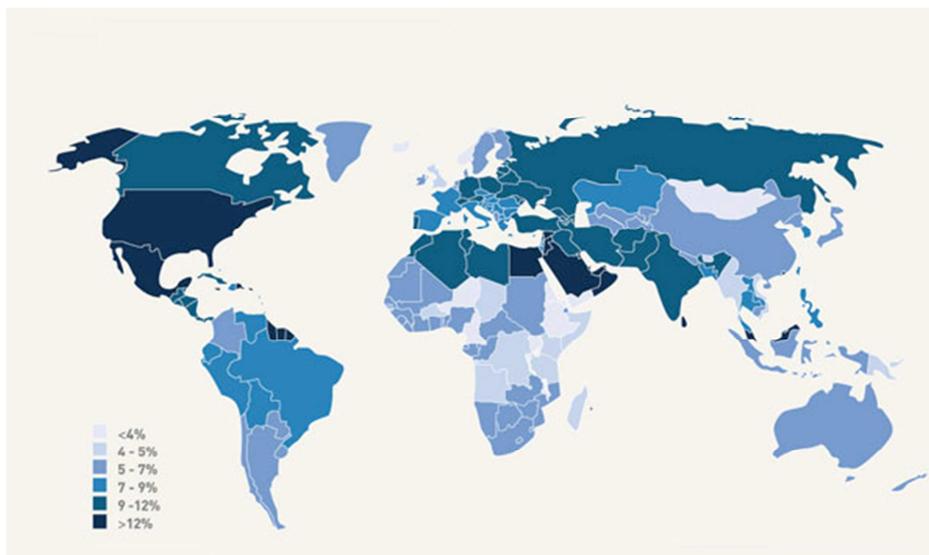


Figura 3. Proyección Mundial de Diabetes Mellitus 2030 (Fuente: www.diabestesatlas.org/map).

La prevalencia de diabetes en nuestro país es entre 20 y 25% en el grupo de personas mayores de 60 años. Diversos estudios muestran que las mujeres son 10% más propensas a desarrollar diabetes que los hombres. Las investigaciones también han arrojado datos que indican una incidencia 50% mayor de diabetes en las zonas urbanas que en las rurales. La diabetes tiene una mayor prevalencia en los estados ubicados en el Norte, así como en el Distrito Federal, Estado de México, Veracruz y Morelos (Figura 4). México contaba en el año 1993 con alrededor de 6.5 millones de personas con diabetes, de las cuales 35% desconocía que la padecían; estas estimaciones sugieren que estas cifras se duplicarían en 10 años. En el año 2000 la Encuesta Nacional Epidemiológica para Enfermedades Crónicas degenerativas (ENSA) estableció 7.5 millones de diabéticos y 35% más que desconocían su enfermedad, lo que equivale a más de 10 millones si no se toman las medidas de prevención y educación necesarias. Actualmente, en la región de América Latina, México es el segundo país con mayor índice de personas con algún tipo de diabetes (más de 10 millones de mexicanos), únicamente superado por Brasil.

La diabetes es la primera causa de muerte en México, con más de 70 mil decesos al año por complicaciones del padecimiento. Asimismo, es la primera causa de amputaciones no traumáticas, de ceguera y de insuficiencia renal. Se estima que en nuestro país los costos directos e indirectos de la diabetes ascienden a \$318 millones de dólares anuales, que se reparten entre el capital erogado para los tratamientos médicos y los gastos que conllevan las complicaciones de la enfermedad. Los costos directos e indirectos de la diabetes en el país llegan a representar hasta el 17% del presupuesto asignado a la Secretaría de la Salud (Aguilar, 2009).

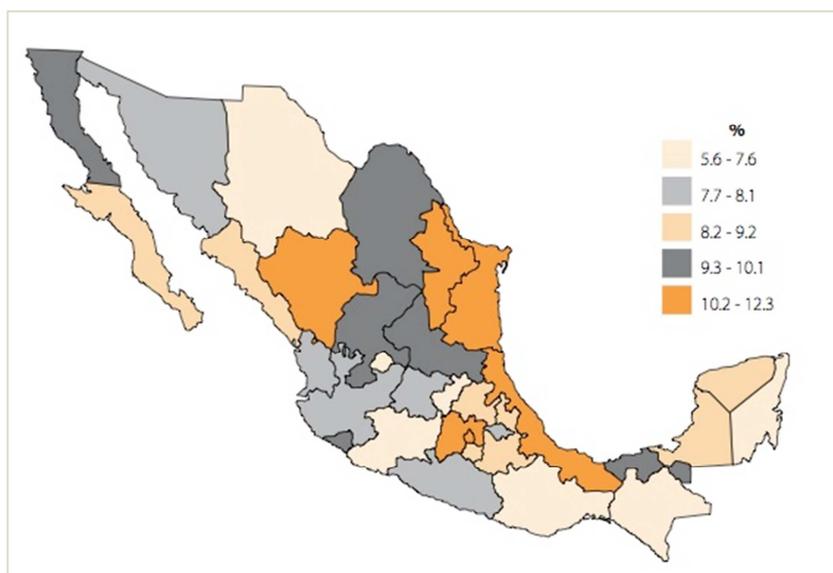


Figura 4. Prevalencia de diabetes según entidad federativa. México, ENSANUT 2012 (Fuente <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>).

3. Clasificación de la diabetes.

Dentro de la diabetes mellitus existen 4 tipos (Cuadro 1) :

Diabetes Tipo 1. También conocida como diabetes juvenil o diabetes mellitus insulino dependiente, representa aproximadamente el 10% de todos los diabéticos. Se caracteriza por: un déficit absoluto de insulina como consecuencia de la destrucción autoinmune de las células β productoras de insulina y por la dependencia vital a la insulina exógena y por presentarse en etapas tempranas de la vida, generalmente antes de los 30 años pero su mayor incidencia se observa en menores de 15 años, con mayor frecuencia en edad preescolar y especialmente prepuberal. El proceso de desarrollo de la diabetes tipo 1 es gradual, pudiendo ser necesarios varios años antes de que se manifieste clínicamente. Su etiología en el 90% de los casos es autoinmune, lo que se determina por la presencia de anticuerpos anti-islotos (ICA), anti-GAD y anti-insulina. Un 10% de los casos son idiopáticos (Aguilar, 2009; Rubio, 2003; Rubio, 2008).

Diabetes tipo 1.5 o L.A.D.A. Diabetes Autoinmune Latente en Adultos (LADA) es el término acuñado por Zimmet y col. (1994) para describir a los pacientes adultos, que presentan una forma lenta y progresiva de diabetes tipo 1. Es un desorden en el que, a pesar de la presencia de anticuerpos contra los islotes en el momento de la diagnosis, la progresión de la disfunción autoinmune de la célula β es lenta. Actualmente su diagnóstico se basa en tres criterios: (1) Edad adulta al inicio de la diabetes, (2) la presencia de anticuerpos para los islotes y (3) la independencia de insulina al menos durante los primeros seis meses después del diagnóstico. Estudios prospectivos de la función de la célula β han demostrado que los pacientes con LADA que presentan múltiples anticuerpos para islotes desarrollan fallas en las células β en 5 años. El reconocimiento de LADA expande el concepto y prevalencia de la diabetes, sin embargo permanece pobremente entendido a nivel clínico y experimental (Stenström *et al* 2005; Furlanos *et al* 2005).

Diabetes Tipo 2. Se caracteriza por la disfunción de la célula β para secretar insulina, pero el mayor evento patofisiológico que contribuye al desarrollo de la diabetes tipo 2 es la resistencia de los tejidos blancos a la insulina, que está asociada con una secreción anormal de insulina en músculo, hígado y tejido adiposo. Clínicamente, el término “resistencia a la insulina” implica que se necesita mayor concentración plasmática de insulina para que la glucosa entre a la célula y así mantener la condición normoglucémica. La resistencia a la insulina en diabetes tipo 2, tiene determinantes genéticos y ambientales. Se considera a la hiperglucemia crónica como principal factor causal, aunque el exceso de ácidos grasos libres, el incremento en las concentraciones sistémicas de diversas citosinas, factores de crecimiento y angiotensina II contribuyen también en forma importante (Aguilar, 2009).

La diabetes tipo 2 es la forma de diabetes más frecuente (90% de los casos), siendo las personas entre los 35 y los 80 años de edad las más afectadas. La diabetes tipo 2 está emergiendo rápidamente como uno de los mayores retos de salud global del siglo XXI y es un síndrome en franco ascenso en su prevalencia e incidencia, por las siguientes razones:

1. El estilo de vida occidental consistente en el consumo de alimentos con alto índice glucémico y la escasa o nula actividad de tipo aeróbico, ya que no existe

una cultura para la realización de deportes cuyo objetivo sea la salud por sí misma; favoreciendo su aparición a través de la resistencia a la insulina.

2. La población cada vez es más longeva y con ello aumenta las probabilidades de que la diabetes tipo 2 se haga presente, además da la oportunidad de transmitir sus genes a las próximas generaciones.

3. Las complicaciones agudas de la diabetes tipo 2 son, en la mayoría de los casos, identificadas y tratadas de manera satisfactoria; en la actualidad rara vez son causa de muerte la cetoacidosis diabética, la hipoglucemia o el estado hiperosmolar no cetósico.

Existen **otro tipos específicos de diabetes** ocasionadas por: defectos genéticos de la célula β , defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exócrino, endocrinopatías, inducidas por medicamentos (como glucocorticoides) o químicos, causadas por infecciones virales, formas poco comunes de diabetes mediada inmunitariamente, otros síndromes genéticos asociados algunas veces con diabetes y la **Diabetes mellitus gestacional** caracterizada por un estado de intolerancia a la glucosa identificado en mujeres embarazadas (Aguilar, 2009; Contreras; 2004; Rubio, 2003; Rubio, 2008).

Cuadro I. Clasificación de la Diabetes

Tipo de Diabetes	Características
1	<ul style="list-style-type: none"> - Destrucción total de células β - Regulada por inmunidad idiopática - Se presenta en etapas tempranas de de la vida.
1.5	<ul style="list-style-type: none"> - Destrucción progresiva de células β - Independencia de Insulina durante los primeros seis meses. - Se presenta en edad adulta.
2	<ul style="list-style-type: none"> - Destrucción parcial de células β - Resistencia a la Insulina
Otros tipos específicos	<ul style="list-style-type: none"> - Defectos genéticos en la función de la célula β - Defectos genéticos de la insulina - Endocrinopatías - Inducida por químicos o fármacos - Asociada a infecciones
Diabetes gestacional	<ul style="list-style-type: none"> - Estado de intolerancia a la glucosa identificado sólo en mujeres embarazadas

Nota. Fuente: American Diabetes Association, 2004; Stenström *et al* 2005; Furlanos S *et al* 2005.

4. Características estructurales y funcionales de la célula β

El páncreas humano presenta de 1 a 2 millones de islotes de Langerhans, lo que representa entre el 3 y 5% de la masa pancreática total, éstos se encuentran distribuidos de forma aleatoria; cada islote mide aproximadamente 0.3 mm de diámetro; están organizados en torno a pequeños capilares, hacia los que vierten sus hormonas (Bonner-Weir ., 2000). El páncreas de un mamífero adulto está compuesto de una parte exócrina y una parte endócrina, esta última contiene grupos de células conocidas como islotes de Langerhans, que juega un papel clave en mantener un nivel apropiado de nutrientes (minerales, carbohidratos, lípidos, proteínas y vitaminas) en la sangre y depósitos celulares (Figura 5). Las islotes de Langerhans están constituidos por las *células β* liberadoras de insulina (65-90%) formando el núcleo del islote, las *células α* liberadoras de glucagón (15-20%), las *células δ* productoras de somatostatina (3-10%), las *células --PP* (Productoras de Polipéptidos Pancreáticos) que controlan y regulan la secreción exócrina del páncreas (1%) y las *células ϵ* que hacen que el estómago genere y libere a la hormona Grelina la cual estimula el hambre y aumenta la ingesta de alimentos (Figura 6). En los humanos, el Factor Promotor de Insulina 1 (IPF-1) es el factor de transcripción más importante involucrado en la diferenciación específica de las células β pancreáticas y en la inducción de la secreción de la insulina (Skelin M *et al* 2010).

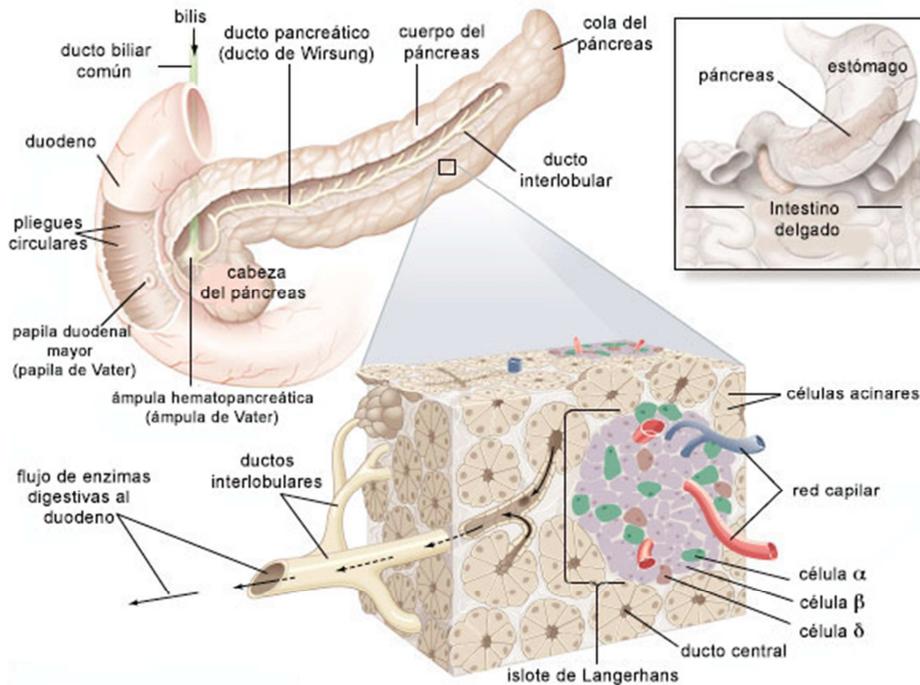


Figura 5. El páncreas y los islotes de Langerhans. El páncreas de un mamífero adulto está compuesto de una parte exócrina y una parte endócrina, que contiene a los islotes de Langerhans. Las hormonas producidas en este grupo de células son secretadas directamente al flujo sanguíneo (Fuente: <http://www.britannica.com/blogs/2011/07/discovered-insulin/>)

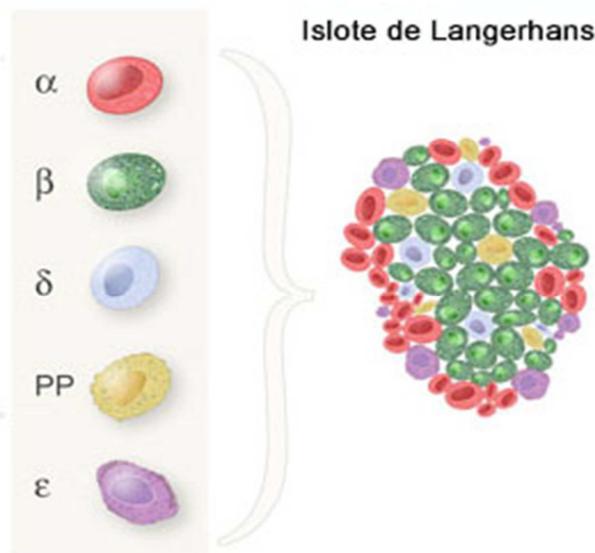


Figura 6. Islole de Langerhans. Los islotes de Langerhans están constituidos por 5 tipos de células: células α , las células β , las células δ , las células PP y las células ϵ (Fuente: http://www.betacell.org/content/articlepanelview/article_id/13/panel_id/1).

La masa de células β pancreáticas está regulada por al menos cuatro mecanismos independientes: (1) *replicación* (mitosis de células existentes), (2) *hipertrofia*, (3) *neogénesis* (células β nuevas a partir de células epiteliales del ducto pancreático) y (4) *apoptosis*. La suma de los tres primeros procesos menos la tasa de muerte celular por apoptosis resulta en la masa total de células β pancreáticas (Figura 7). Poco antes del nacimiento, la replicación se convierte en el principal mecanismo que adiciona nuevas células al páncreas, pero la neogénesis (el proceso de la diferenciación) y la replicación continúan durante toda la vida adulta. Por lo tanto un fino balance entre renovación y muerte celular determinará la masa de la célula β pancreática. El aporte de cada uno de ellos puede ser variable y puede cambiar en las diferentes etapas de la vida o bien cuando la masa de células β se adapta a los cambios metabólicos (Bonner-Weir, 2000; Rhodes, 2005).

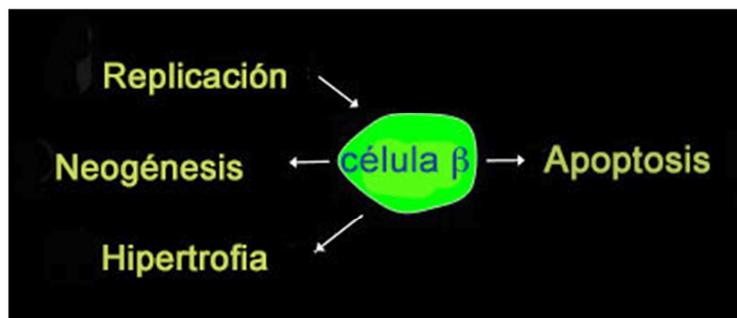


Figura 7. Mecanismos que controlan la masa de las células β . La replicación, neogénesis e hipertrofia (aumento del tamaño celular) incrementan la masa de la célula β , mientras la apoptosis reduce la masa de la célula β (Fuente: Ackermann y Gannon, 2007; Lupi y Del Prato 2008).

La replicación de las células β es un proceso lento, ya que solo 1% de las células entran a las fases mitóticas G1, S y G2. Las células β nuevas probablemente se originan de los precursores que secretan IPF-1 en el ducto pancreático. La diferenciación de las células β ocurre desde las nueve semanas de gestación en adelante, su área se incrementa de forma lineal hasta el nacimiento. Esto resalta la importancia de la diferenciación y replicación para la expansión prenatal de la célula β en humanos. Durante las etapas de la niñez y la adolescencia la tasa de replicación celular, la neogénesis y la apoptosis

decrecen de forma importante. En el adulto, el tiempo de vida estimado para las células β , es de alrededor de 60 días. En condiciones fisiológicas cerca de 0.5% de células β presenta apoptosis, que se neutraliza por la tasa de replicación y en menor grado por la neogénesis. Regularmente, el tamaño y la masa de las células β es constante; sin embargo en los últimos años de vida, se ha encontrado una reducción en la masa de células β con un ligero incremento de la apoptosis, lo que explica por qué las personas de edad avanzada exhiben mayor tendencia a padecer diabetes tipo 2 (Rhodes, 2005).

Las células β mantienen su capacidad de adaptación a la carga metabólica, aún en condiciones de resistencia a la insulina y obesidad, no obstante llega un periodo en el cual se presenta una disminución creciente en la masa de las células β tanto en roedores como en humanos y que corresponde con el inicio de la diabetes tipo 2, ésta disminución se debe al aumento de la tasa de apoptosis (Bonner-Weir, 2000; Rhodes, 2005).

El almacenamiento de los nutrientes en general y la homeostasis de la glucosa en particular dependen de (1) la regulación de la secreción de insulina de las células β pancreáticas y (2) de la acción de la insulina. Tal equilibrio requiere un estrecho acoplamiento entre metabolismo de la glucosa y la respuesta secretoria de la insulina. Por lo tanto, la célula β funciona como sensor de glucosa con la crucial tarea de ajustar con precisión la liberación de insulina para nivelar los niveles de glucosa en la sangre (Figura 8), un proceso en el que la mitocondria tiene un rol principal.

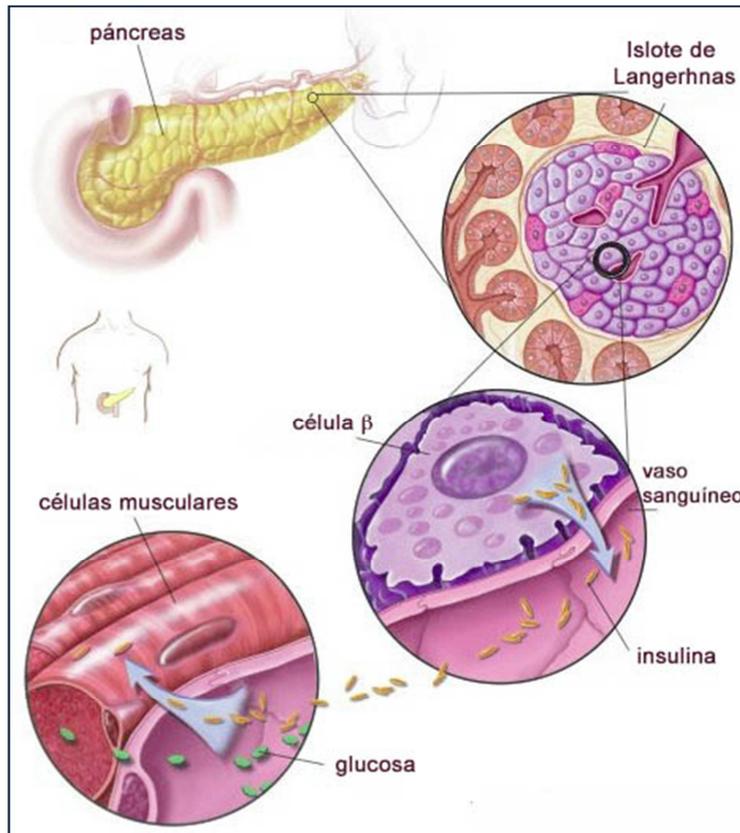


Figura 8. Secreción de insulina de las células β pancreáticas. La célula β funciona como un sensor de glucosa con la tarea de ajustar la liberación de insulina para facilitar que la glucosa que circula en la sangre penetre en la células y sea aprovechada como energía (Fuente: Winslow, 2001).

5. Características de la función mitocondrial

La mitocondria es un organelo citoplasmático de características muy especiales, debido a su posible origen endosimbiótico (Maechler y Wolheim, 2001), con una participación clave en muchas de las funciones celulares como: producción de energía, metabolismo de los ácidos grasos, biosíntesis de pirimidinas, homeostasis de calcio y señalización celular (Bradford, 2005). El citoplasma de casi todas las células eucariotas contiene a las mitocondrias, sin embargo el protozoo *Chaos (Pelomyxa) carolinensis* carece de este organelo.

La mitocondria es especialmente abundante en las células que están asociadas con procesos activos. Cada célula contiene varios cientos hasta miles de mitocondrias. La mitocondria es de aproximadamente 0.5-1 μ m de diámetro y hasta de 7 μ m de largo. Al conjunto de mitocondrias se le denomina

condrioma. El tamaño, la forma y la abundancia de las mitocondrias varían dramáticamente en diferentes tipos celulares y pueden cambiar bajo diferentes demandas energéticas y diferentes condiciones fisiológicas o ambientales, pero la arquitectura en general es la misma. Los tejidos con funciones metabólicas altas tales como el músculo esquelético o el riñón presentan una gran cantidad de mitocondrias (Krauss, 2001).

La mitocondria puede ser subdividida en cuatro compartimentos: la membrana externa e interna, el espacio intermembranal y la matriz. Las membranas (interna y externa) están compuestas de bicapas de fosfolípidos (Figura 9). Las dos membranas son distintas en apariencia y en propiedades fisicoquímicas, están caracterizadas por diferentes composiciones de fosfolípidos y sus proporciones de proteína-lípidos, esto determina sus funciones bioquímicas. Para la membrana externa, este ratio es de alrededor 50:50. Para la membrana interna, el ratio proteína-lípido es de 80:20. La membrana interna se encierra en la matriz, formando las crestas mitocondriales que contiene la principal maquinaria enzimática del proceso de fosforilación oxidativa (Krauss, 2001). La membrana externa es muy permeable a iones, metabolitos y a muchos polipéptidos debido a que contiene proteínas que forman poros, llamadas porinas o CADV (de *canal aniónico dependiente de voltaje*), que permiten el paso de grandes moléculas de hasta 10.000 dalton y de un diámetro aproximado de 20 Å. La membrana interna es mucho menos permeable a iones y moléculas pequeñas, proporcionando la compartimentalización a través de la separación de la matriz del ambiente citoplasmático. Esta compartimentalización es la característica medular de la conversión de la energía libre derivada de los sustratos oxidables. La membrana interna mitocondrial tiene función de aislante eléctrico y de barrera química. Existen diferentes sistemas antiporte embebidos en la membrana interna mitocondrial, permitiendo el intercambio de aniones entre el citosol y la matriz mitocondrial (Krauss 2001; Devlin, 2004). Entre ambas membranas queda delimitado un espacio intermembranoso que está compuesto de un líquido que presenta una alta concentración de protones que es resultado del bombeo de los mismos por los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria. En él se localizan diversas enzimas que intervienen en la transferencia del enlace de alta energía del ATP, como la adenilato cinasa o la creatina cinasa (Devlin, 2004). La matriz mitocondrial o mitosol presenta mucho

menor número de moléculas que el citosol, sin embargo contiene iones, DNA circular bicatenario muy parecido al de las bacterias, ribosomas tipo 55s (70s en vegetales), llamados mitorribosomas, los cuales realizan la síntesis de algunas proteínas mitocondriales, y contiene RNA mitocondrial. En la matriz se llevan a cabo numerosas rutas metabólicas claves para la vida, como el ciclo de Krebs y la β -oxidación de los ácidos grasos, además se oxidan los aminoácidos y se producen algunas reacciones de la síntesis de urea y grupos hemo (Devlin, 2004).

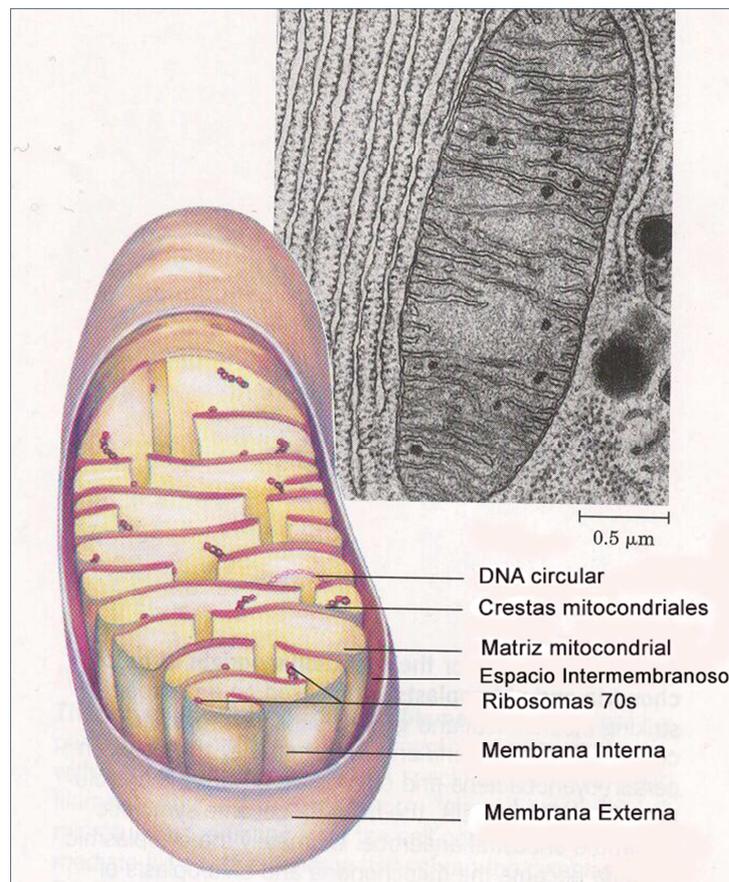


Figura 9. Estructura de la mitocondria. Las mitocondrias están rodeadas de dos membranas diferentes en sus funciones y actividades enzimáticas: la Membrana Externa y la Membrana Interna. Poseen una molécula de DNA circular de doble hebra (mtDNA), así como su propio aparato de síntesis proteica que incluye ribosomas mitocondriales 70s que se transcriben a partir de DNA mitocondrial y son transcritos por una RNA polimerasa mitocondrial específica (Fuente: Nelson y Cox, 2000).

La mitocondria es un organelo único debido a que posee su propio DNA (mtDNA), una molécula de DNA circular de doble hebra (Figura 10). Las células eucariotas albergan de 2 a 10 copias de mtDNA. De los 37 genes (16 569 pares de bases) que componen al mtDNA, 13 son traducidos a polipéptidos, las cuales se localizan en la membrana interna mitocondrial, que son parte del complejo enzimático de multisubunidades de la cadena respiratoria; incluyen 7 subunidades de NADH deshidrogenasa, 3 subunidades del citocromo C oxidasa, 2 subunidades de la F₀F₁ ATPasa, y el citocromo b (Bradford, 2005; Hsin-Chen y Yau-Huei, 2005). El genoma nuclear especifica el resto de subunidades enzimáticas y otras proteínas mitocondriales; las cuales son sintetizadas en el citosol e importadas a la mitocondria (Figura 11). El genoma nuclear codifica todas las proteínas y enzimas implicadas en la replicación, transcripción (a través del factor transcripcional mitocondrial A) y traducción del mtDNA (Hsin-Chen y Yau-Huei, 2005).

La replicación del mtDNA, ocurre predominantemente en las fases S y G₂ del ciclo celular. Bajo condiciones fisiológicas normales, en cada ciclo celular las moléculas de mtDNA se duplican (Hsin-Chen y Yau-Huei, 2005).

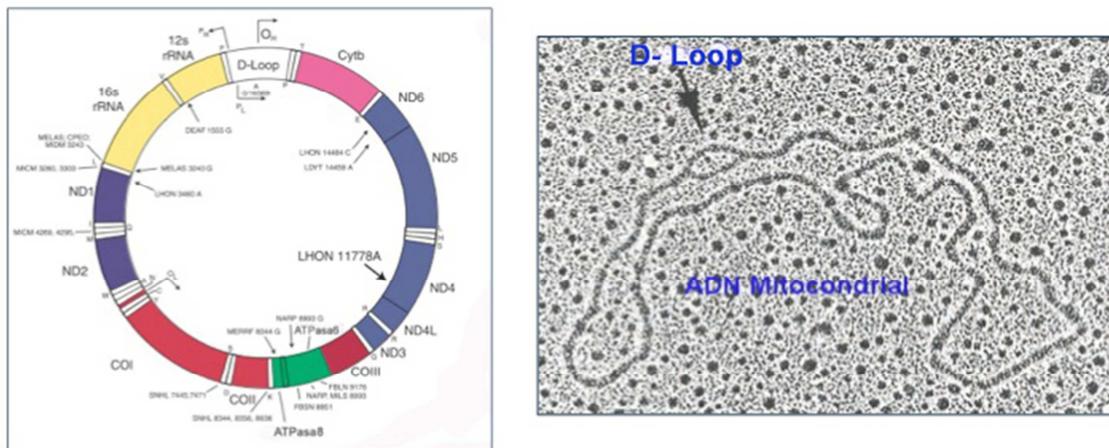


Figura 10. DNA mitocondrial. Mapa Genético del DNA mitocondrial humano. Se representan las 2 hebras del DNA con los genes que codifican RNAr (12s y 16s), RNAt, y secuencias codificadoras de proteínas (CO: subunidades citocromo c oxidasa, cit B: citocromo B y ND: subunidades de NADH deshidrogenasa). H₁, H₂ y L indican los lugares de inicio de la transcripción de las hebras pesada y ligera, respectivamente. O_H y O_L simbolizan los orígenes de replicación de la cadena pesada y ligera (arriba a la izquierda). Autorradiografía del DNA mitocondrial con su loop de desplazamiento (D-Loop) (arriba a la derecha) (Fuente: Fariss *et al*, 2005).

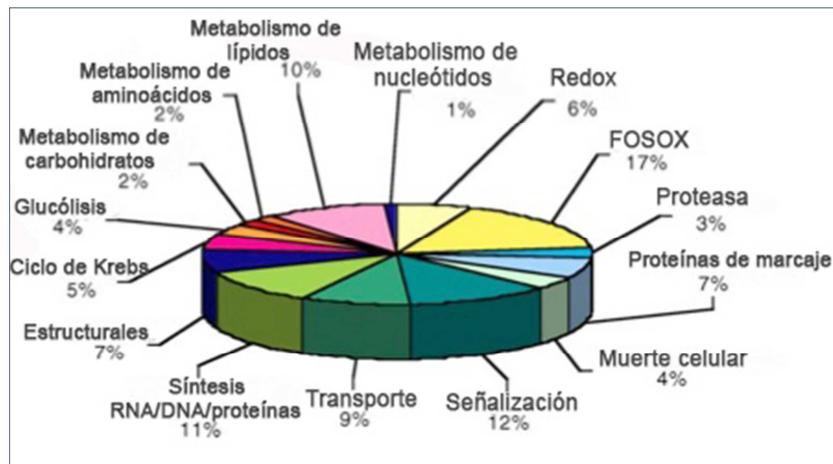


Figura 11. Proteínas mitocondriales. Clasificación de proteínas mitocondriales de acuerdo a sus funciones bioquímicas y celulares. (Fuente: Gibson, 2005)

La mitocondria genera la mayor parte de la energía de las células animales, al sintetizar el ATP a través del transporte de electrones, y la producción del gradiente de protones mediante la fosforilación oxidativa, junto con la oxidación de los metabolitos del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y el catabolismo de ácidos grasos por la β -oxidación (Hsin-Chen y Yau-Huei, 2005).

La fosforilación oxidativa, es el proceso por el cual los electrones pasan a través de la cadena transportadora de electrones o cadena respiratoria mitocondrial, la cual está conformada por cuatro complejos respiratorios, que están embebidos en la membrana interna mitocondrial y dos tipos de transportadores de electrones (ubiquinona y citocromo c). El paso de los electrones a través de los complejos hace que se transloquen protones (H^+) desde la matriz hacia el espacio intermembranoso mitocondrial. Este flujo de H^+ genera una diferencia de potencial electroquímico de protón ($\Delta\mu_{H^+}$), también llamado fuerza protón-motriz que se manifiesta en el potencial de membrana mitocondrial, con un valor entre 150 - 180 mV, con carga negativa con respecto al citosol (Hicks y Medina, 2001; Duchon, 2004; Konigsberg, 2008). La energía de este potencial es utilizada por la enzima ATP sintasa para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato. Los electrones provienen del NADH y $FADH_2$. El NADH producido en el ciclo de Krebs, dona electrones al complejo I, éste a su vez los transfiere a la CoQ, la cual también puede ser reducida por los electrones donados por varias deshidrogenasas que contienen $FADH_2$, como la succinato-

ubiquinona reductasa (complejo II) (Hicks y Medina, 2001; Konigsberg, 2008). Los electrones de la CoQ son transferidos al complejo III. Posteriormente pasan a través del citocromo c, al complejo IV y finalmente al oxígeno molecular. La transferencia de electrones a través de los complejos I, III y IV generan un gradiente de protones (voltaje) y gran parte de la energía de este gradiente, es utilizada para producir ATP a través de la ATP sintasa (complejo V) (Figura 12). Esta energía puede ser disipada en forma de calor a través de las proteínas desacoplantes (UCPs). Cuando hay una sobrecarga de protones, el transporte de electrones en el complejo III se inhibe parcialmente y promueve el retorno de electrones a la coenzima Q y su donación al oxígeno molecular, facilitando así la producción del anión superóxido (Hicks y Medina, 2001; Duchon, 2004).

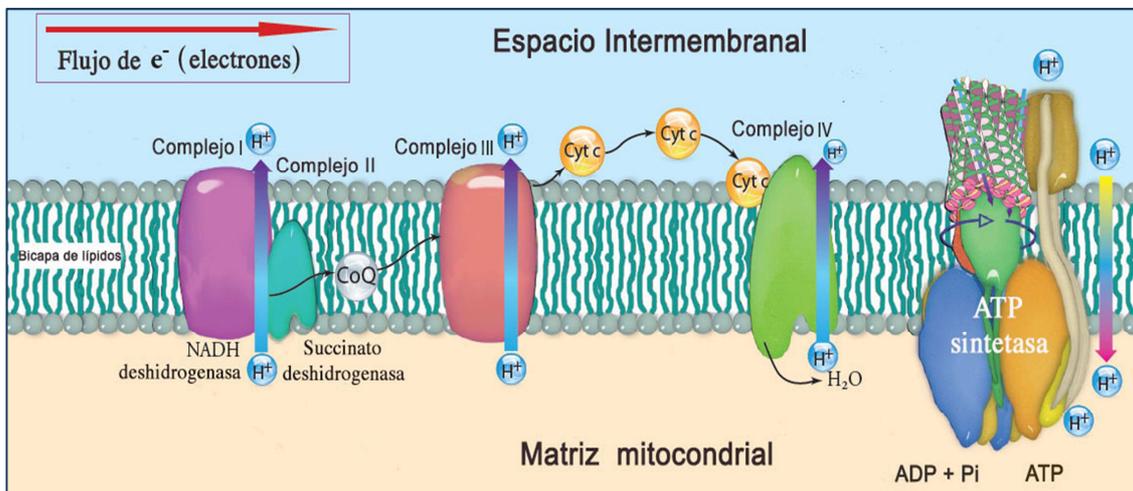


Figura 12. Flujo de electrones y protones a través de los cuatro complejos de la cadena respiratoria. La coenzima Q (CoQ) captura vía los complejos I y II. El ubiquinol sirve como un acarreador móvil para los electrones y protones y pasa los electrones al complejo III, el cual los transfiere a otro conector móvil, el citocromo c. El complejo IV pasa los electrones del citocromo c reducido al oxígeno. El flujo de electrones a través de los complejos I, III y IV se acompaña por uno de protones. Estos saltos de electrones sirven para expulsar protones al espacio entre las dos membranas. Al entrar por la ATP sintetasa se fosforila ADP, y se produce el ATP (Adenosin de trifosfato). El transporte de electrones y la fosforilación oxidativa lo realizan proteínas de la membrana interna mitocondrial (Fuente: Lagouge y Larsson., 2013).

La producción de ATP estimulada por glucosa a expensas del ADP causa que se incremente la relación ATP/ADP citoplasmática, induciendo el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}), la despolarización de la membrana plasmática, la abertura de los canales de calcio (Ca^{2+}), la entrada e incremento de la concentración de Ca^{2+} al citosol y otros compartimientos celulares, y la activación de elementos efectores sensibles a Ca^{2+} . Un incremento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, es encaminado a la mitocondria a través del transportador unidireccional de Ca^{2+} . Este proceso es de suma importancia, ya que el Ca^{2+} constituye una de las moléculas de señalización de mayor trascendencia fisiológica, en diversos procesos metabólicos, incluyendo el mecanismo de secreción de la insulina en las células β pancreáticas (Figura 13).

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) son generadas en los peroxisomas, y en las reacciones catalizadas por la NADPH oxidasa, sin embargo la fuente principal de ERO en las células es la mitocondria (Zhongmin *et al.*, 2012). La acumulación de evidencias indica que la obesidad y la hiperglicemia está asociada con el incremento en la producción de ERO, de hecho se ha reportado que estos dos padecimientos metabólicos incrementan la producción del anión $O_2^{\circ-}$ mitocondrial que resulta en disfunción de la célula β (Zhongmin *et al.*, 2012). Las ERO pueden lesionar a la mitocondria al promover el entrecruzamiento de proteínas, la peroxidación de fosfolípidos de membrana, y la fragmentación del mtDNA, el DNA mitocondrial es muy susceptible a mutaciones, debido a que sus mecanismos de reparación son muy pobres; como consecuencia es muy sensible al estrés oxidante (Maechler y Wolheim, 2001; Fariss *et al.*, 2005). Se ha señalado que en células β -pancreáticas de individuos que padecen diabetes tipo 2 exhiben anormalidades morfológicas, en comparación con las células β -pancreáticas de individuos sanos (Anello *et al.*, 2005).

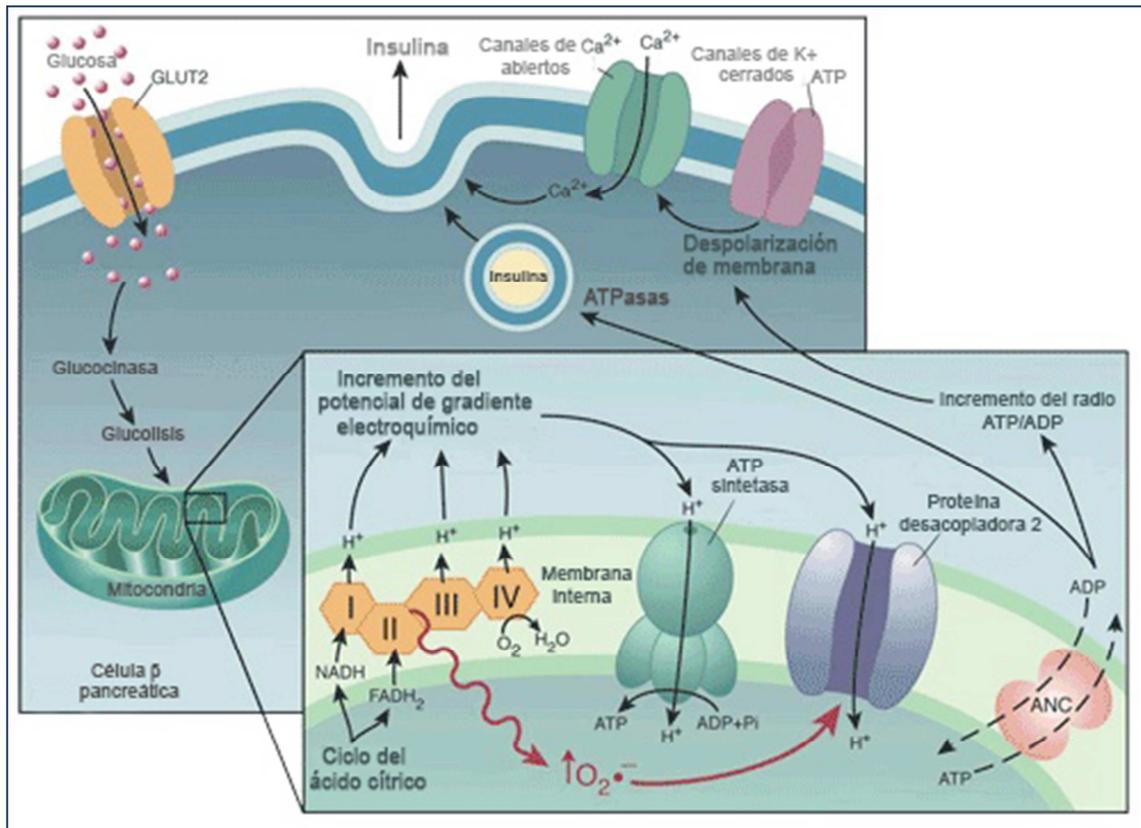


Figura 13. Modelo del acoplamiento del metabolismo de glucosa a la secreción de insulina en la célula β La glucosa atraviesa la membrana plasmática y es fosforilada por la glucocinasa. La glucólisis produce piruvato el cual entra a la mitocondria. La activación mitocondrial resulta en la generación de ATP. El ATP es transferido al citosol, incrementando el ratio ATP/ADP. Subsecuentemente, el cierre de los canales de K⁺ despolariza la membrana celular. Esto abre los canales dependiente de Ca²⁺, incrementando las concentraciones Ca²⁺ citosólico, el cual dispara la exocitosis de insulina (Fuente: Supale et al, 2012)

5.1 Apoptosis y mitocondria

La mitocondria es parte importante de la vida y la muerte celular. Es esencial para mantener la entalpía necesaria para sustentar la vida. La mitocondria proporciona la energía necesaria para casi todos los procesos celulares además de que participa de manera notable en la muerte celular por el mecanismo de apoptosis (Santos *et al.*, 1998). Por lo tanto las alteraciones en la función mitocondrial resultan en enfermedades, por ejemplo la disfunción mitocondrial tiene un papel importante en la isquemia y aún más durante la reperfusión de tejidos, en células β pancreáticas provoca diabetes, además, la

disfunción mitocondrial ha sido implicada en enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, enfermedad motoneuronal), y la acumulación de defectos mitocondriales es señalada como un mecanismo de enfermedades relacionadas con la edad (Duncheon, 2004), por lo tanto las alteraciones en la función mitocondrial tienen un papel clave en diversas patologías, debido a que: (1) la mitocondria realiza el mayor consumo de oxígeno utilizado por la célula, (2) el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial no es perfecto pues pierde algunas moléculas de oxígeno parcialmente reducido en forma del radical $O_2^{\bullet-}$, (3) las ERO tienen la capacidad de oxidar casi a todos los componentes celulares, lípidos, proteínas o DNA, alterando su estructura y función y (4) la mitocondria es la principal generadora de ATP que utiliza la célula (Martínez *et al.*, 2005).

La liberación de diferentes proteínas del espacio intermembranal de la mitocondria, es un evento crítico en la muerte celular apoptótica regulada por la mitocondria. El estímulo pro-apoptótico induce la liberación del citocromo c de la mitocondria al citoplasma; el citocromo c es una proteína que al salir al citosol forma un complejo con el factor activador de proteasas 1 (Apaf-1) y la procaspasa-9, que deriva en la formación del apoptosoma resultando en la activación de la caspasa 9 y la subsecuente activación de las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7 que desmontan a la célula, causando la activación de la cascada proteolítica, que provoca muchas de las alteraciones morfológicas bioquímicas y morfológicas características de la apoptosis (Figura 14) (Zhongmin *et al.*, 2012). Las mitocondrias de algunas células también liberan al factor inductor de apoptosis (AIF), una flavoproteína que se transloca hasta el núcleo e induce la condensación de la cromatina y fragmentación del DNA a gran escala (Wang, 2001).

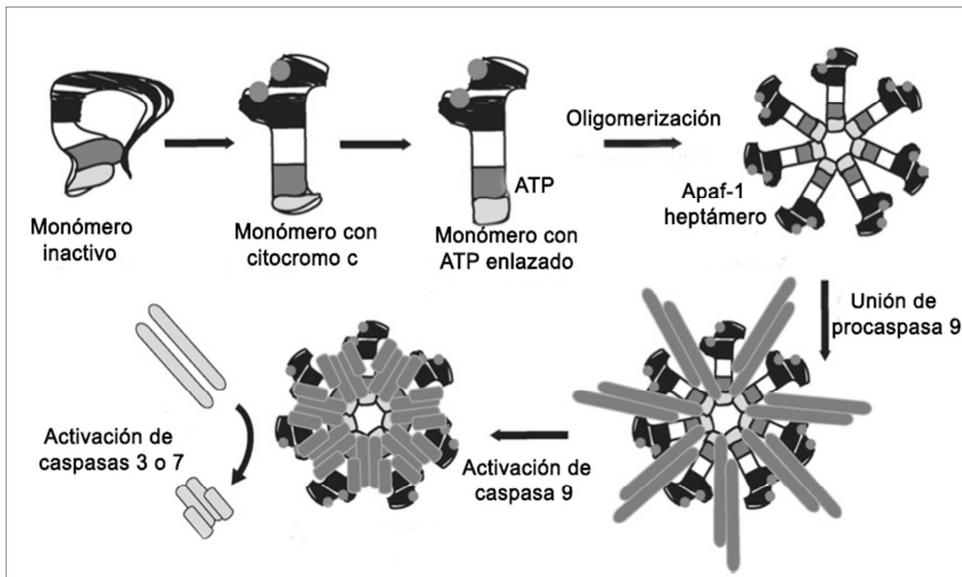


Figura 14. Formación del apoptosoma. El factor activador de proteasas 1 (Apaf-1) existe como un monómero inactivo en el citosol. Cuando el citocromo c es liberado de la mitocondria se enlaza a Apaf-1 cambiando su conformación, lo que permite la interacción con el ATP. Esto a su vez induce la formación del heptámero Apaf-1. El heptámero interactúa con la pro-caspasa 9 resultando en la activación de la caspasa 9 y la formación del apoptosoma (Fuente: Czernski y Nuñez, 2004).

Diversos estudios se han enfocado en la permeabilización de la membrana externa mitocondrial ya sea por la abertura del poro de transición de permeabilidad (PTP) o la activación de los miembros de la familia de proteínas pro-apoptóticas Bcl-2, como Bid, Bax y Bak. Ambos procesos resultan en la liberación del citocromo c (Fariss *et al.*, 2005) (Figura 15). Se han determinado modelos con liposomas donde se señala que las proteínas proapoptóticas Bak y Bax apresuran la apertura de los Canales Aniónicos Dependientes de Voltaje (en inglés, VDAC, Voltage Dependent Anionic Channels,) permitiendo la salida de citocromo c, mientras que las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L cierran estos canales por unión directa con Bax y Bak. El hecho de que Bcl-2 se localice en la membrana mitocondrial ha permitido pensar que la función antiapoptótica de Bcl-2 podría relacionarse con el mantenimiento de la integridad de la membrana mitocondrial y, en un sentido más amplio, en regular los procesos de tráfico intracelular. La explicación de esto es que durante la interacción de VDAC con Bax y Bak ocurren cambios conformacionales, formando un mega canal que permite la salida de citocromo c (Adamsy Cory, 1998). No obstante, algunos estudios demuestran que la liberación de citocromo c y la activación de las

caspasas pueden ocurrir antes de que se detecte la pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria. Esto sugiere que hay mecanismos diferentes que regulan la permeabilidad de las membranas interna y externa de la mitocondria (Bernardi *et al.*, 1999).

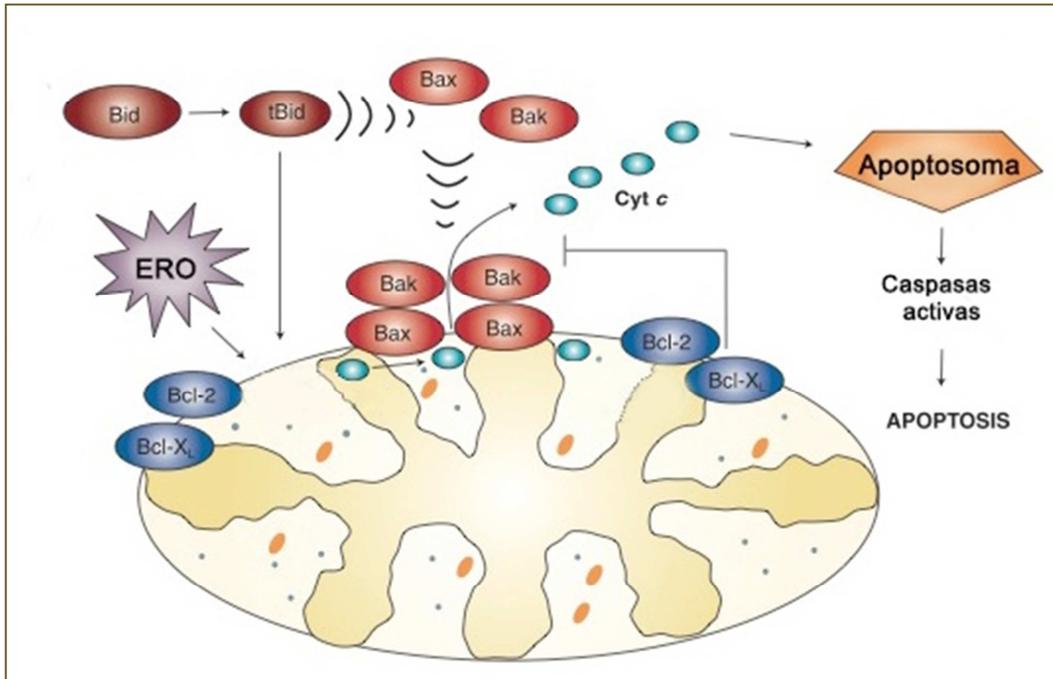


Figura 15. Permeabilización de la membrana mitocondrial. La membrana externa mitocondrial es permeabilizada por tBid, el cual promueve la oligomerización e inserción de Bax y Bak, esto induce la liberación del citocromo c que produce la activación de la pro-caspasa 9 vía mecanismo del apoptosoma (Fuente: Fariss *et al.*, 2005).

Por otra parte la mitocondria forma una red dinámica que se modifica continuamente por eventos de fisión y fusión, bajo el control de proteínas específicas de anclaje de las membrana mitocondriales. Las mitocondrias de las células β de humano, ratón y rata exhiben una red tubular por todo el citoplasma, con eventos de fisión/fusión continuos (Molina, *et al.*, 2009; Twig *et al.*, 2008). Las tomografías electrónicas, de islotes pancreáticos de ratones, revelaron mitocondrias tubulares densamente interconectadas en células β (Supale *et al.*, 2012). Se han observado la presencia de mitocondrias desconectadas e hinchadas, en las célula β , en ratas obesas y diabéticas Zucker y en ratas GotoKakisaki (diabetes tipo 2 sin obesidad), así como pacientes con diabetes tipo 2 (Supale *et al.*, 2012).

El inicio y desarrollo de la diabetes tipo 2 se acompaña de la disminución progresiva de células β que resulta de un marcado incremento en la tasa de apoptosis. En las células β pancreáticas, la mitocondria tiene una participación central para acoplar el metabolismo de la glucosa a la exocitosis de la insulina, de tal modo que asegura un control estricto de la secreción de insulina estimulada por glucosa. Los defectos en la función mitocondrial impiden que se lleve a cabo este proceso, promoviendo la muerte celular apoptótica de las células β (Supale *et al.*, 2012).

6. Especies reactivas de Oxígeno como iniciadoras de la apoptosis de la célula β .

La apoptosis o muerte celular programada, es fundamental en el mantenimiento homeostático de los sistemas biológicos, esta genéticamente controlada y evolutivamente conservada. La apoptosis está estrechamente regulada por procesos fisiológicos, iniciados por una variedad de estímulos metabólicos o dependientes de citosinas, que consisten de un programa constitutivo que conduce a la muerte celular (Al-Gubory *et al.*, 2010).

La muerte celular apoptótica puede iniciar por activación de receptores de muerte (extrínseca), estos receptores de muerte son miembros de una familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) que inducen una trimerización y la formación de un complejo denominado DISC, que recluta a la procaspasa-8 a través de FADD/MORT1 como molécula adaptadora e induce un cambio conformacional en la procaspasa-8 que resulta en la ruptura de la caspasa-8 y su activación y/o mediada por la mitocondria (intrínseca) (Farris *et al.*, 2005). Un exceso de muerte celular por necrosis o apoptosis puede contribuir a una insuficiencia aguda de órganos, así como enfermedades crónicas que implican la pérdida de células postmitóticas (Konisberg, 2008).

Las ERO han sido reconocidas como moléculas clave, que pueden modificar selectivamente las proteínas y por lo tanto modificar la señalización celular incluso la de la apoptosis (Konisberg, 2008). La mitocondria contribuye a la señalización de la apoptosis por medio de la producción de ERO (Al-Gubory *et al.*, 2010). La liberación de diferentes proteínas del espacio intermembranal de la mitocondria es un evento temprano crítico de la apoptosis mediada por la

mitocondria. El citocromo c es una proteína transportadora de electrones que reside en el espacio intermembranal de la mitocondria, donde tiene un rol crítico en el proceso de la fosforilación oxidativa y la producción de ATP celular. La liberación del citocromo c de la mitocondria al citoplasma activa a las caspasas. Este es un evento central en la inducción de la apoptosis y al parecer está mediada por ERO (Al-Gubory *et al.*, 2010).

6.1 Reducción de la masa de la célula β por apoptosis como consecuencia de la hiperglucemia.

Las células β pancreáticas son estimuladas principalmente por el nutriente más común, la glucosa (Figura 16). Por consiguiente, la célula β funciona como sensor de glucosa con la tarea crítica de ajustar con precisión la liberación de insulina para nivelar los niveles de glucosa en la sangre, aunque los ácidos grasos y algunos aminoácidos también son capaces de regular la secreción de insulina (Supale *et al.*, 2012).

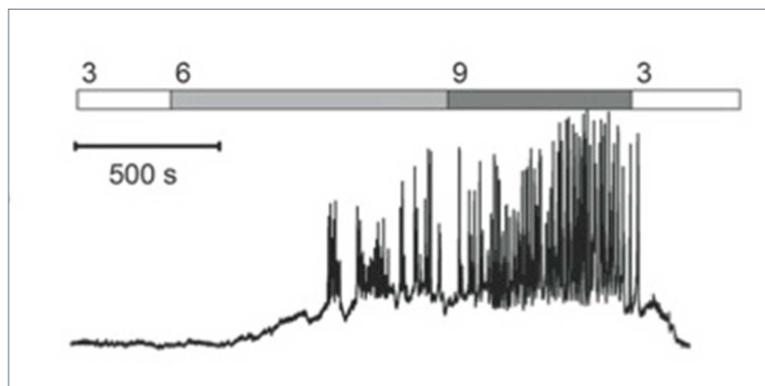


Figura 16. La glucosa estimula la actividad de la célula β . Actividad eléctrica estimulada por glucosa registrada en una célula β de un islote intacto cuando la concentración de glucosa se incrementó de 3 a 9 mM (Fuente: Skelin *et al.*, 2010).

En todas las especies, la exposición a corto plazo de las células β a concentraciones altas de glucosa induce proliferación de forma concentración-dependiente (Butler, 2003). Sin embargo el exceso de glucosa circulante daña el funcionamiento de la célula β , alterando sus rutas de transducción y por lo tanto su patrón de expresión génica. Estos eventos desembocan a largo plazo en la disfunción de la célula β que se manifiesta por defectos en la secreción de insulina y eliminación del tejido endócrino pancreático mediado por mecanismos apoptóticos (Roche, 2003). En estas circunstancias, en la que aparece conjuntamente la resistencia a la insulina en los tejidos diana y el fallo en el funcionamiento de las células β pancreáticas, es que la diabetes tipo 2 se hace evidente (Figura 17). La glucosa puede tener efectos dañinos o benéficos sobre la célula β , dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición; en otras palabras, si la célula está expuesta a hiperglucemia aguda (situación fisiológica) o crónica (situación patológica). En el caso de la hiperglucemia crónica, la glucosa es capaz de alterar directa e indirectamente diferentes programas génicos que resultan en cambios fenotípicos. Esto se ha observado en diversos modelos experimentales incluyendo animales y células en cultivo, donde las concentraciones elevadas de glucosa modifican la expresión del gen de la insulina (Kaneto *et al.*, 1999) y del transportador de glucosa GLUT-2, e inducen la activación de glucocinasa y de otras enzimas que participan en la glucólisis, anaplerosis y lipogénesis (Roche *et al.*, 1997 y 1998). Además de inducir la expresión anticipada de genes implicados en la regulación del ciclo celular como c-myc, c-fos, c-jun entre otros (Susini *et al.*, 1998). En estas circunstancias, la célula β comienza a expresar proteínas típicas de estadios primitivos de su desarrollo, como hexocinasa I o lactato deshidrogenasa-A (Grill y Björklund, 2001; Mandrup-Poulsen, 2001). Todos estos cambios se acompañan de alteraciones metabólicas y funcionales como defectos en la secreción de insulina, depósitos de glucógeno, aumento de glucólisis, así como de los procesos anapleróticos y lipogénicos (Roche, 2003).

La respuesta normal de la célula β pancreática a un exceso crónico de glucosa y la resistencia a la insulina asociada a obesidad es la hipersecreción compensatoria de insulina para mantener la normoglucemia. La diabetes tipo 2 solo se desarrolla en sujetos que son incapaces de sostener la respuesta compensatoria de sus células β . En estudios longitudinales de sujetos que

desarrollaron diabetes tipo 2, se observó un incremento en los niveles de insulina en las fases de normoglucemia y prediabetes, para mantener la glucemia cerca de los niveles normales a pesar de la resistencia a la insulina (compensación de la célula β), seguido por una reducción cuando la glicemia en ayunas supera el límite normal de 5.5 mM (falla de la célula β) (Prentki y Nolan, 2006). Esta característica puede deberse a una disminución en la masa de células β y/o a defectos funcionales de las mismas asociada con la pérdida de la masa de la célula β debido a la apoptosis. (Kennedy *et al.*, 2002). La regulación de la masa celular β parece implicar un balance entre la replicación y la apoptosis de la célula β , así como el desarrollo de nuevos islotes a partir de los ductos pancreáticos exócrinos. La alteración de cualquiera de estas rutas o el incremento de la tasa de muerte celular podría causar un decremento en la masa de las células β (Butler, 2003).

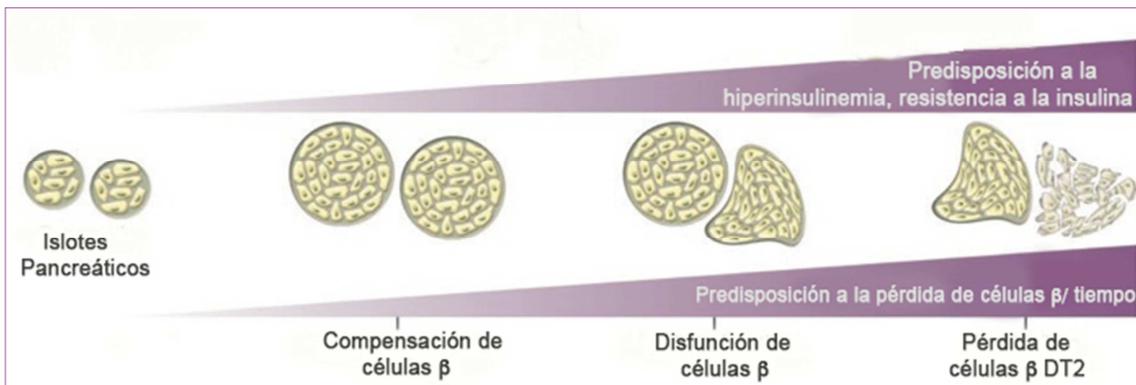


Figura 17. Disfunción de la célula β e historia natural de DT2. La DT2 se desarrolla en individuos con predisposición genética y adquirida. Con el tiempo la compensación de las células β falla, resultando en un decremento progresivo de la función de las células β . Como consecuencia los sujetos, progresan de la tolerancia normal a la glucosa a la intolerancia a la glucosa y finalmente a la DT2 establecida. Aún después de la diagnosis de la DT2 la función de la célula β sigue empeorando (Fuente. Prentki y Nolan, 2006).

La contribución de la reducción de la masa de la celular β al desarrollo de diabetes tipo 2 ha sido fuertemente debatida por muchos años. Estas discrepancias en parte se deben a la escases de datos por la dificultad de obtener tejido pancreático humano, ya que este generalmente solo se obtiene de autopsias, ya cuando el páncreas pudo haber sufrido autolisis excesiva. Además, la información clínica confiable acerca de los casos de autopsias casi siempre es inasequible. Sin embargo, diversas publicaciones confirman la hipótesis que relaciona la hiperglucemia y apoptosis, pues se ha observado que un decremento en el número de células β productoras de insulina contribuye a la patofisiología de la diabetes tipo 2. La masa de célula β en diabetes tipo 2 está aproximadamente al 50% de lo normal, lo que implica que las células β restantes no son capaces de secretar más insulina para mantener a los pacientes en un estado normoglucémico (Federicci, 2001). En un estudio realizado en islotes de Langerhans humanos expuestos a altas concentraciones de glucosa por 5 días, se encontró un incremento de muerte celular en comparación con islotes cultivados con niveles normales de glucosa (Federicci, 2001). En otros estudios se observó que en *Psammomys obesus* la capacidad de las células β estaba abatida después de la exposición prolongada a concentraciones altas de glucosa (33 mmol/l), se observó un incremento lineal de apoptosis (Efanova *et al.*, 1998; Donath *et al.*, 1999).

El mecanismo probable de la muerte de la célula β incluye disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplasmático, ciclo disfuncional de triglicéridos/AGL, y glucolipototoxicidad. Una vez que la hiperglucemia se ha desarrollado, se presentan los procesos adicionales relacionados a la glucotoxicidad y al ambiente diabético, tales como inflamación de los islotes, O-glucosilación, depósitos de amiloides y muerte acelerada de las células β , resultando en alteraciones fenotípicas severas y pérdida de la masa de las células β por apoptosis (Prentki y Nolan, 2006). Otra de las manifestaciones tempranas de las alteraciones en la función de la célula β , incluye una respuesta retardada a la glucosa, irregularidades temporales en los pulsos y oscilaciones de secreción de insulina y pérdida del acoplamiento entre los pulsos de secreción de insulina y los niveles de glucosa.

7. Proteína p53

7.1 Características estructurales de la proteína p53

El gen p53 pertenece a una familia de genes altamente conservada, se localiza en el brazo corto del cromosoma 17, banda 13 (17p13.1), aproximadamente de 20 kb. Está compuesto por 11 exones y 10 intrones. Este gen produce un transcrito de RNA mensajero de 2,8 kb cuyo resultado es una proteína con un peso molecular de 53 kD, constituido por 393 aminoácidos (López *et al.*, 2001). La proteína tiene varias regiones evolutivamente conservadas (>90%), las cuales son esenciales para la función normal de la proteína p53. La proteína posee varios dominios estructurales y funcionales tales como la región N-terminal que contiene al dominio de transactivación (residuos 1-42), una región rica en prolinas con múltiples copias de la secuencia PXXP (residuos 61-94, donde la X es cualquier aminoácido), un dominio central que contiene una secuencia enlazante al DNA presentando una estructura de dos hojas beta y un átomo de zinc que estabiliza la estructura (residuos 102-292) y la región carboxilo terminal con propiedades reguladoras (residuos 301-393) que contiene un dominio de oligomerización (residuos 324-355), y un dominio regulador extremo básico (363-393), una secuencia señal de localización nuclear y tres secuencias señal de exportación nuclear (Figura 19) (Bai y Zhu, 2006). En estado de latencia de p53, la región C-terminal se pliega sobre el dominio central de la molécula y evita su unión al DNA. Las modificaciones pos- traduccionales de la región terminal por acetilación, fosforilación y O-glicosilación generan cambios conformacionales en p53 que regulan la unión específica a secuencias del DNA (Maclachlan *et al.*, 1999).

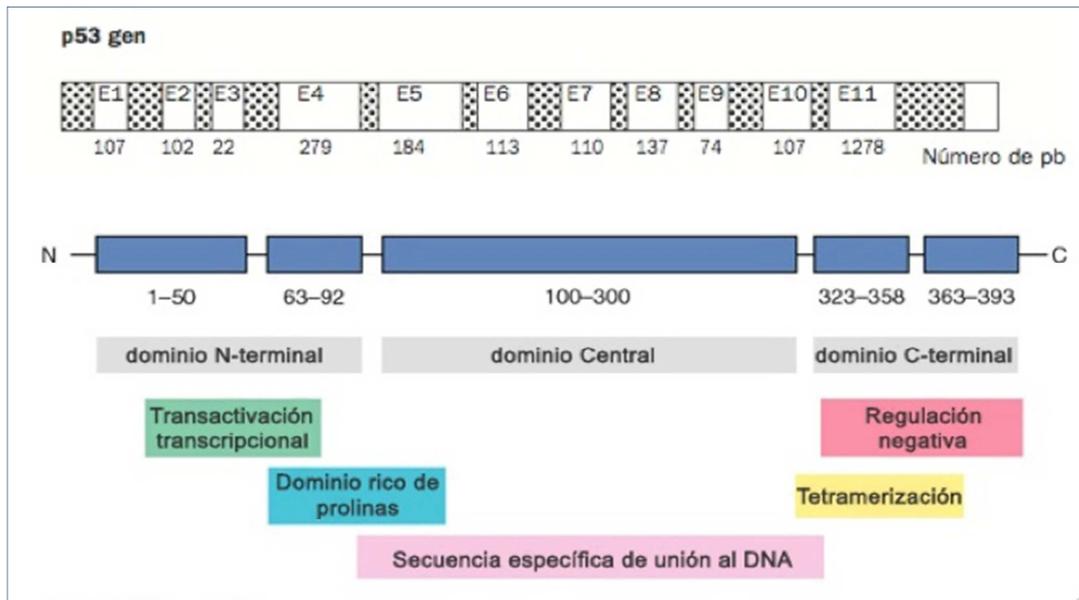


Figura 18. Estructura del gen p53 y dominios funcionales de la proteína p53. El gen *p53* Este gen produce un transcrito de RNA mensajero de 2,8 kb cuyo resultado es una proteína con un peso molecular de 53, kD, constituido por 393 aminoácidos. La proteína p53, comprenden diversos dominios, incluyendo una región N-terminal que contienen al dominio de transactivación, un núcleo que contiene la secuencia específica de unión al DNA y un domino complejo C- terminal con múltiple funciones. (Fuente: López *et al.*, 2001; Anzola y Burgos, 2003).

7.2 Funciones fisiológicas de p53

La proteína p53 es esencial para prevenir la proliferación celular inapropiada y mantener la integridad del genoma después de un estrés genotóxico. Después de varios estímulos intra y extracelulares, tales como daño al DNA (que incluye radiación ionizante, radiación UV, aplicación de drogas citotóxicas o agentes quimioterapéuticos e infección de virus), choque de calor, hipoxia y sobre expresión de oncogenes, p53 nativa se activa y emerge como una proteína fundamental que dispara diversas respuestas biológicas, a nivel de célula así como de un organismo completo. Los genes activados por p53 son funcionalmente diversos y constituyen efectores de la cascada de las rutas de señalización que inducen varias respuestas tales como puntos reguladores del ciclo celular, supervivencia celular, apoptosis, y senescencia. Múltiples funciones de p53 incluyen el papel principal de supresor de tumores, que puede ser atribuido a su habilidad para actuar como factor de transcripción de un secuencia

específica que regula la expresión de diferentes genes que modulan varios procesos celulares. En respuesta a varios tipos de estrés, p53 se acumula en el núcleo y se une a sitios específicos en las regiones reguladoras de genes sensibles a p53, promoviendo la transcripción de dichos genes. Los blancos de p53 se activan diferencialmente dependiendo del tipo celular, y el grado de daño. Por tanto, p53 es un factor de transcripción multifactorial, implicado en el control de la progresión del ciclo celular, integridad del DNA y supervivencia de las células expuestas a agentes que dañan al DNA (López *et al.*, 2001; Bai y Zhu, 2006).

7.3 Regulación de p53

La vida media de p53 es de 6 a 20 minutos en células saludables, además esta proteína existe principalmente en una forma latente inactiva. Sin embargo su concentración se incrementa de 3 a 10 veces y su vida media se extiende a horas en respuesta al estrés, que incluyen daño al DNA, hipoxia, privación de los factores de crecimiento, y pérdida de contacto célula-célula. La activación de p53 puede ser regulada en cinco niveles: a) transcripción inducida del gen Tp53, b) un incremento de la concentración ya sea por una eficiente traducción o una vida media prolongada, c) la transformación de una forma latente a una conformación activa, d) la translocación del citoplasma al núcleo y e) la reducción de la ubiquitinación y degradación proteosomal. La acumulación de la proteína p53 es capaz de activar genes que promuevan el arresto del crecimiento celular, la apoptosis, y la reparación del DNA a través de su función transactivadora. Hay que considerar que además de la estabilización y activación de p53, es necesario un transporte adecuado de la misma, del citoplasma al núcleo que es donde lleva a cabo sus funciones (Liang y Clarke, 2001; Davis *et al.*, 2013). Esta proteína existe en una forma latente, incapaz de unirse al DNA, la cual se modifica por cambios covalentes en el extremo amino-terminal y en el extremo C-terminal de la molécula. El extremo C-terminal es un dominio regulador negativo, ya que su eliminación la activa constitutivamente. Por otra parte ciertas interacciones proteína-proteína afectan la función de p53 como factor de transcripción así como a su capacidad de respuesta celular. Estas interacciones se producen entre p53 y reguladores tanto positivos de su actividad (HIF-a, c-abl, p300, PARP, WT-1, p19, pRB) como negativos (hsp70,

BRCA 2, bcl-2, c-jun). Estos mecanismos de regulación de p53 permiten que se torne estable y activa (López *et al*, 2001).

La actividad de p53 y su estabilización son dirigidos principalmente a través de una red compleja de modificaciones post-traduccionales, que incluyen: fosforilación, acetilación, ADP-ribosilación, sumoilación, nedilación, O-GlcNAcación y ubiquitinación (Figura 20). Muchas de estas modificaciones ocurren en las regiones N- y C- terminal de p53. La fosforilación y la acetilación son las principales modificaciones post- traduccionales que potencian la actividad transcripcional de p53, estas estabilizan y permiten su acumulación en el núcleo, donde interactúa con secuencias específicas de sus genes blancos (Bai y Zhu, 2006). Mientras que la ubiquitinación, sumoilación y nedilación se han asociado con la supresión de la transcripción mediada por p53 y su exportación nuclear (Lee y Gu, 2010).

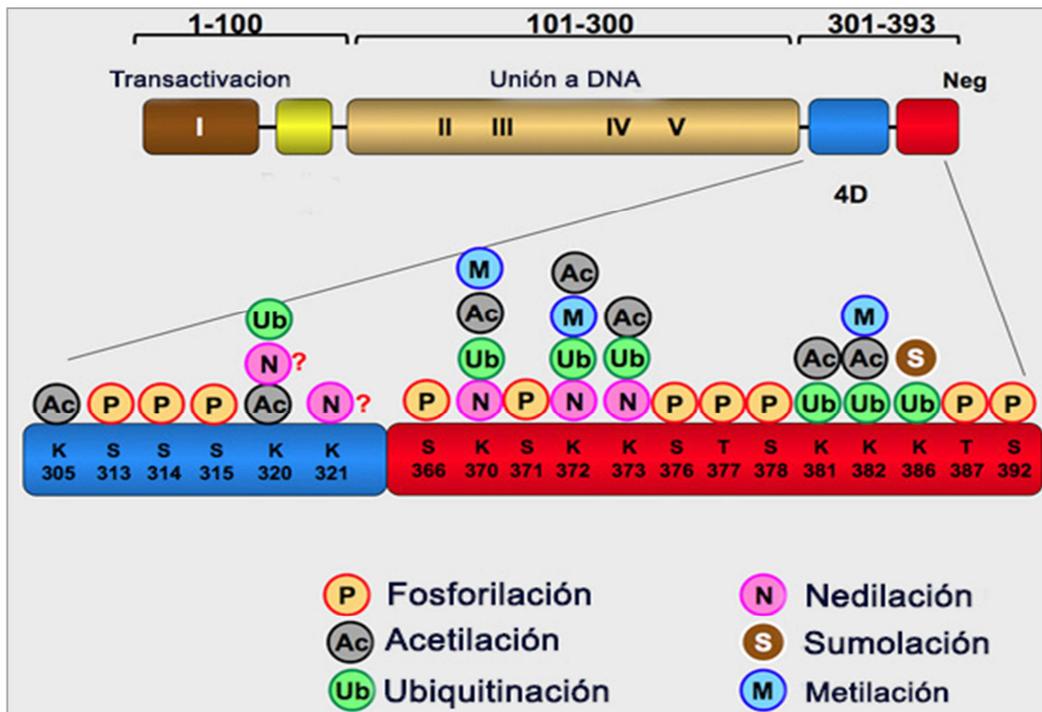


Figura 19. Modificaciones post-traduccionales del Carboxilo-terminal. La actividad de p53, y su estabilización son regulados principalmente por una red compleja de modificaciones post-traduccionales, que incluyen: fosforilación, acetilación, metilación, sumoilación, nedilación, ubiquitinación (Fuente: http://p53.free.fr/p53_info/p53_modifications.html).

7.4 p53 en el ciclo celular.

Entre varias de las respuestas celulares producidas por p53, la más notable es la inducción del arresto del ciclo celular (Bai, y Zhu, 2006). La proteína p53 induce el arresto del ciclo celular al intervenir en la fase G1/S evitando la entrada apresurada a la fase S, debido a que p53 opera como un activador transcripcional de genes específicos como: p21, retinoblastoma, E2F, PCNA y GADD45. La proteína p21, también conocida como WAF-1 o CIP-1 pertenece a la familia de proteínas reguladoras del ciclo celular denominadas inhibidores mitóticos. La proteína p21 se une a los complejos ciclina-Cdk, implicados en el control de la actividad del ciclo celular en los puntos de control G1/S y G2/M, inhibiendo la actividad catalítica de estos. La expresión de esta proteína está estrechamente controlada por p53 en respuesta a una variedad de estímulos de estrés. Así por ejemplo, p21 inhibe el complejo ciclina D1-Cdk4 que desencadena la acumulación de la forma fosforilada del factor de transcripción retinoblastoma (Rb). El Rb es una fosfoproteína nuclear que desempeña un importante papel en el control de la división y diferenciación celular. El Rb en su forma desfosforilada se encuentra activado y gracias a la hendidura que posee en su estructura es capaz de unir y retener al factor de transcripción nuclear E2F. E2F es un factor de transcripción que activa los genes necesarios para la transición G1/S (de síntesis del DNA) en el ciclo celular. Cada miembro de la familia E2F dimeriza con una proteína DP-1 para formar un complejo transcripcional E2F activo y de esta forma actúa como un freno para el ciclo celular. Así mismo, p53 interviene en procesos de reparación gracias a la modulación de una proteína que previene la replicación del DNA alterado, la PCNA (del inglés Proliferating Cell Nuclear Antigen). La actividad de esta enzima es inhibida por p53 a través de dos mecanismos: (1) por medio de p21, al formar un complejo con PCNA que la inhibe y (2) promoviendo la sobreexpresión de GADD45. El GADD45 además de unirse a PCNA, regula la transcripción de la subunidad R2 de la ribonucleótido reductasa, la cual es la enzima esencial para la síntesis y reparación del DNA, en concreto en la reparación por escisión de nucleótidos y de bases (Fernandez- Gómez, 2004). Así el arresto del ciclo celular en los puntos G₁ y G₂ proporciona tiempo adicional para que la célula repare el daño genómico antes de entrar a las etapas críticas de la síntesis del DNA y la mitosis (Figura 21)(Bai y Zhu, 2006).

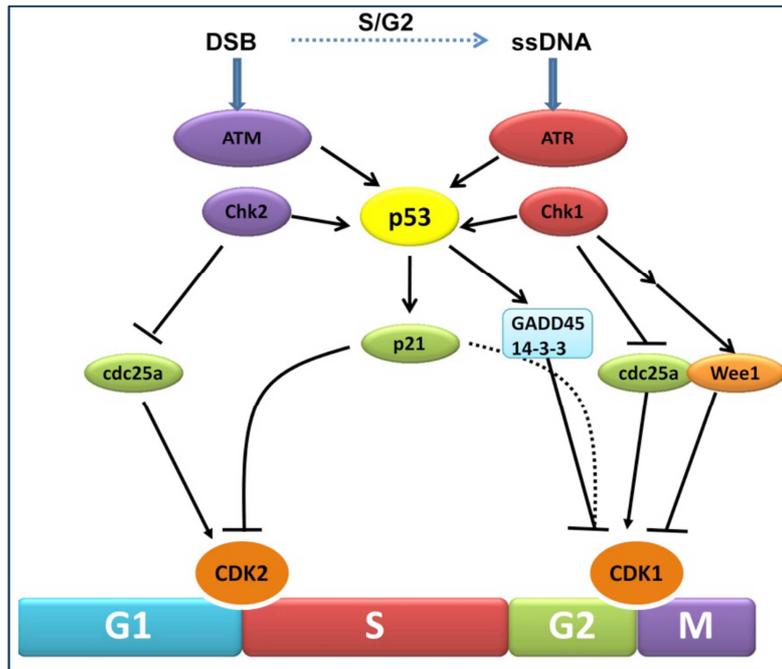


Figura 20. La proteína p53 en el ciclo celular. p53 opera como un activador transcripcional de genes específicos como: p21 y GADD45 (Fuente: López y Fernandez, 2012).

7.5 p53 y apoptosis

Cuando la célula es incapaz de reparar el daño en el DNA y con el objetivo de impedir que dicho daño se herede a las células hijas, p53 activa rutas de señalización que llevan a su muerte. Entre estas situaciones se encuentra el daño grave sobre el DNA, los factores de supervivencia celular limitados o un oncogen activado que obliga a la célula a realizar el ciclo replicativo.

La proteína p53 activa se une específicamente al DNA y regula la transcripción de diferentes genes efectores, involucrados en la reparación del DNA, en el arresto del ciclo celular, y apoptosis. Este último proceso está controlado por p53 al activar la transcripción de genes pro-apoptóticos como Bax, Bid, Noxa, p53 AIP-1, Apaf-1, y PERP, Puma, y catepsina D y por represión transcripcional de Bcl2 e IAPs (Mihara *et al.*, 2003; Wäster y Ölinger 2009). Sin embargo, también se demostró que en diferentes líneas celulares la apoptosis dependiente de p53, ocurría en ausencia de transcripción, se observó que p53 interactuaba con proteínas de la familia Bcl-2 en citosol y en mitocondria promoviendo la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la

liberación de mediadores proapoptóticos como Bax, de los complejos formados con las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y/o Bcl-_{XL} (Wäster y Ölinger , 2009). Schuler et al. (2000) observó en líneas celulares de osteosarcoma humano Saos-2 que p53 al activar a la proteína Bax, inducía la liberación de citocromo c al citoplasma, mientras Mihara et al. (2003), demostró que las proteínas p53, Noxa, Puma, Bim y Bad se translocaban rápidamente a la mitocondria tras un estímulo de muerte, estas se unían e inhibían a las proteínas Bcl_{XL} y Bcl2, e inducían la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, conduciendo a la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas 9 por oligomerización con la molécula adaptadora Apaf-1 en presencia de ATP (Figura 22). Por otra parte Wäster y Öllinger (2009) observaron en melanocitos que la inhibición de p53 incrementaba significativamente la translocación de esas proteínas antiapoptóticas a la mitocondria.

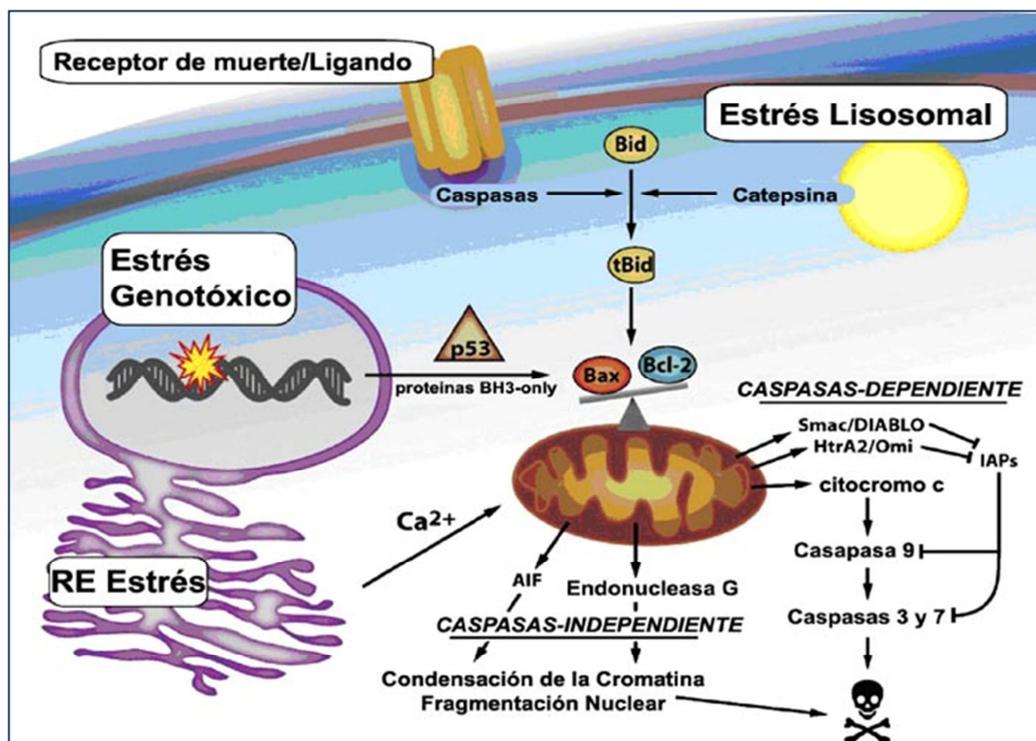


Figura 21. p53 y apoptosis. Los genotóxicos activan a la proteína p53, y a las proteínas BH3, Noxa y Puma que promueven la permeabilidad de la MEM y la liberación de factores de muerte. La activación de receptores de muerte involucra diversas vías que involucran disfunción lisosomal, degradación de la proteína Bid inducida por caspasa 8, alteración mitocondrial y activación de caspasas ejecutoras (Fuente: Sterin y Nieto, 2007).

Las ERO están implicadas en diferentes niveles de la señalización de p53. Así mismo p53 contiene varios residuos de cisteína, lo que sugiere que p53 presentan diferentes conformaciones dependiendo de su estado redox intracelular (Wäster y Öllinger, 2009). Se ha demostrado que las especies reactivas de oxígeno son mediadores de la apoptosis dependiente de p53. Una serie de genes llamados PIGs (genes inducidos por p53), (Colman *et al.*, 2000), con actividades óxido-reductoras, han sido identificados en células apoptóticas de carcinoma colorectal. Lo que sugiere que el daño oxidante de la mitocondria es de gran importancia en el control de la muerte apoptótica inducida por p53 (Marchenko *et al.*, 2000).

7.6 Degradación de p53

La vía más común de degradación de p53 es la ruta de la ubiquitina-26S proteosoma, también se ha descrito que p53 puede hidrolizarse por miembros de la familia de las cisteína proteasas, como las calpaínas. Aunque el sistema proteosomal se presenta tanto en el citoplasma como en núcleo, la degradación de p53 tiene lugar de forma exclusiva en el citoplasma, por lo que se necesita un retorno de p53 desde el núcleo a este compartimiento; la salida tiene lugar por la vía del CRN1. Tres son los sistemas descritos encargados de 'preparar' a p53 para su degradación: (1) el señalosoma COP9 (CSN), que fosforila a p53 en la Tre155, (2) la enzima JNK que fosforila la Tre81 y (3) la proteína MDM2 (del inglés, murine double minute 2) quizás el más importante, encargada de dirigir la translocación desde el núcleo al citoplasma (Haupt *et al.*, 1996; Honda R, *et al.*, 1997; Gómez-Lázaro *et al.*, 2004).

8. Ubiquitinación

Las proteínas están sometidas a un recambio constante degradación/síntesis, por tanto todos los días podemos degradar hasta 300g de proteínas endógenas. En la síntesis de cualquier compuesto se gasta energía, sin embargo en la degradación de proteínas no sólo no se produce energía, sino que en muchos casos la consume. Los motivos por los que se degradan las proteínas son:

1. Síntesis de proteínas anormales. Con algún o varios aminoácidos alterados, cuya acumulación puede ser peligrosa para la vida celular

2. Envejecimiento proteico. Las proteínas a medida que pasa el tiempo se van oxidando y alterando.

3. Permitir la regularización del metabolismo celular: Las proteínas más activas (por ejemplo, enzimas reguladoras) no pueden tener una concentración elevada en la célula, por lo que deben ser degradadas una vez que cumplan su función.

Las proteínas se pueden degradar casi en cualquier lugar de la célula pero esto se realiza mayoritariamente en los lisosomas y en el citosol. En los lisosomas se puede degradar cualquier tipo de proteína, pero normalmente la degradación en lisosomas afecta a proteínas que entran a la célula por endocitosis (por ejemplo las lipoproteínas) o proteínas estructurales (de membranas mitocondriales, plasmáticas, etc). Las enzimas que se encargan de degradarlas se conocen en general como catepsinas. Las catepsinas son proteasas lisosomales (se conocen alrededor de 50) bastante inespecíficas que actúan tanto como endopeptidasas o como exopeptidasas, con pH ácido (entre 3-5), debido a que si se liberaran del lisosoma, el pH citosólico las inactivaría para impedir el daño celular. En cambio la degradación de proteínas en el citosol requiere de vías de señalización. Las proteínas solubles de la célula suelen degradarse en citosol, y presentan una secuencia específica que las marca para ser degradadas. La proteína encargada del marcaje es la ubiquitina (Hochstrasser, 2009; Rodríguez, 2003).

Las proteínas en las células eucariotas están sujetas a una amplia variedad de modificaciones post-traduccionales. Entre estas modificaciones, está la unión covalente de ubiquitina o proteínas similares a ubiquitinas que marcan a las proteínas (Fushman y Wilkinson, 2011). La ubiquitina es una pequeña proteína bien conservada entre los eucariontes pero ausente en las eubacterias y en las archaea. (Hochstrasser, 2009). La ubiquitinación funciona como un sistema unificador para la degradación de diversas proteínas, es decir, se requieren la unión previa de ubiquitinas para que ocurra el paso final de la degradación.

El proceso de ubiquitinación de las proteínas se lleva a cabo en varias etapas. En él participan, fundamentalmente, tres enzimas, E1, E2 y E3. El primer paso se observa en la ubiquitina ya que esta tiene un residuo de glicina en su carboxilo terminal, y este debe ser activado antes de que forme enlaces covalentes con otra proteína. Al principio, el carboxilo terminal es adenilado por E1, con el aducto ubiquitina-AMP permaneciendo unido a la enzima. Entonces

una cadena lateral de cisteína en E1 atacará al carboxilo terminal de la ubiquitina, de este modo se da la formación dependiente de ATP de un enlace tioéster entre el C-terminal de la ubiquitina y un tiol de cisteína en E1 (también llamada enzima activadora de ubiquitina). A continuación, se produce la transferencia de la ubiquitina desde E1 a otro grupo de cisteína de E2 (denominada enzima transportadora de ubiquitina), la cual se encarga de transportar la ubiquitina hasta el sustrato proteico y por último la ubiquitina es transferida a un factor específico, la tercera enzima E3 (proteína ligasa de ubiquitina) antes que al sustrato. La enzima E3, facilita entonces la transferencia de la ubiquitina activada desde E2 hasta residuos de lisina en las proteínas diana. De esta forma la enzima E3 cataliza la transferencia de la ubiquitina al sustrato puesto que tienen la función de reconocer la proteína blanco y mediar esta transferencia (Figura 23). El proceso se puede repetir (poliubiquitinación) o no (monoubiquitinación). Si se produce la poliubiquitinación, entonces, nuevas moléculas de ubiquitina se unen a la proteína ya marcada. La ubiquitina puede, en este momento, unirse a otros residuos de lisina de la proteína diana, y/o unirse a residuos de lisina de una ubiquitina unida anteriormente, formándose así largas colas de ubiquitinas. La ubiquitina tiene siete residuos de lisina (Lis6, Lis11, Lis27, Lis29, Lis33, Lis48 y Lis63) cada uno de los cuales puede, unirse con el resto C-terminal de otra ubiquitina. En el proceso de poliubiquitinación se ha descubierto la participación de otra enzima, E4 (factor de ensamblaje de las cadenas de ubiquitina). La poliubiquitinación, está relacionada con la degradación de la proteína por el proteosoma, que reconoce las cadena de ubiquitina y atrae a la proteína hacia su interior. La monoubiquitinación está más relacionada con procesos de regulación, como la endocitosis, la reparación de DNA o la regulación transcripcional (Rodríguez, 2003; Castellanos, 2009; Hochstrasser, 2009).

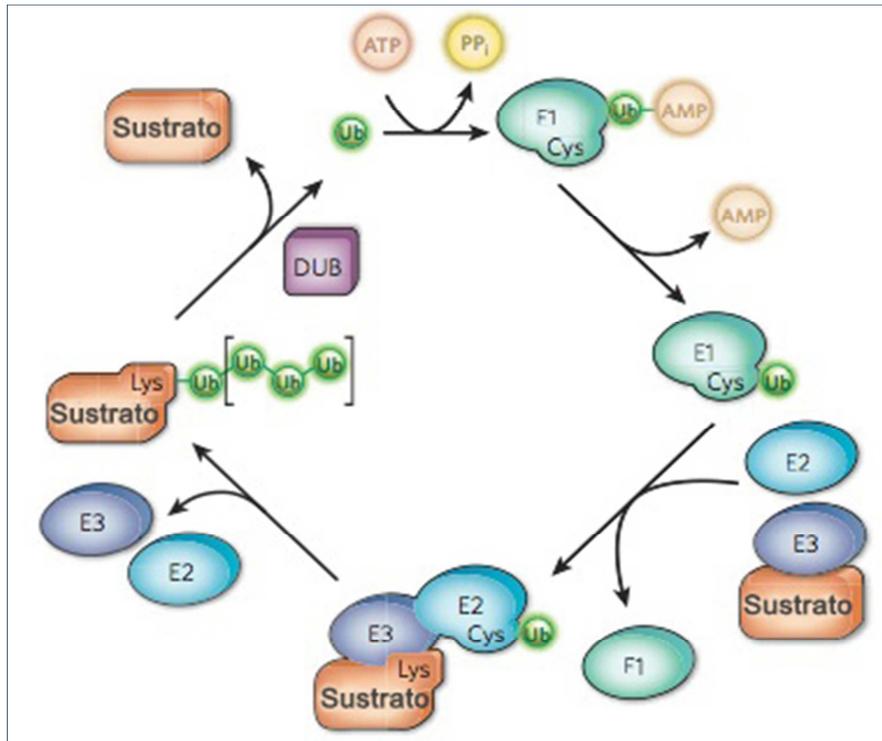


Figura 22. Ruta de la conjugación de ubiquitinas. En el proceso de ubiquitinación de las proteínas participan , tres enzimas, E1, E2 y E3. La enzima E1 une la ubiquitina, activándola para su procesamiento. La enzima conjugadora E2 acepta la ubiquitina activada de E1 y la transfiere a las enzima E3 (Fuente Hochstrasser, 2009).

9. Proteosoma

El destino final de muchas proteínas marcadas por la ubiquitina es su destrucción por el proteosoma. El proteosoma se descubrió a finales de los años setenta, y se llamó así porque contiene muchas proteasas. Los proteosomas son complejos multicatalíticos. Mientras que una proteína de tamaño medio tiene entre 40,000 y 80,000 daltons, la mayoría de los proteosomas de los organismos superiores pesan más de dos millones de daltons. El proteosoma está constituido por una partícula central con aspecto de túnel (proteosoma 20S) a la que acompañan una o dos partículas reguladoras menores, situadas en un extremo o en ambos. La unidad central es la región catalítica del proteosoma, mientras que los anillos externos actúan como puertas de control y alejan así el peligro de que alguna proteína extraviada penetre en su cámara de destrucción (Rodríguez, 2003; Hochstrasser, 2009). El núcleo central proteosomas 20S, es una estructura conservada desde arqueobacterias (del género *Thermoplasma* o

Rhodococcus) hasta eucariotas, y estructuras similares se han detectado en bacterias como *Escherichia coli*. Uno de los proteosomas mejor caracterizado ha sido el proteosoma 20S de *Thermoplasma acidophilum*.

El proteosoma 20s es un complejo multicatalítico que se encuentra en citosol y núcleo de células eucariotas. Consiste de una partícula central formada por 28 subunidades (proteosoma 20S) de 2.100 kDa, formando una estructura tubular con dos anillos idénticos exteriores (anillos α) y dos idénticos interiores (anillos β). La subunidad 20s contiene tres actividades proteolíticas: de tripsina, de quimiotripsina y de peptidil-glutamil. Cada uno de los dos anillos α y β están formados por 7 subunidades diferentes (codificadas por 14 genes distintos), dando lugar a una estructura general $\alpha_7\text{-}\beta_7\text{-}\beta_7\text{-}\alpha_7$. Los tres sitios catalíticos se encuentran en algunas de las subunidades β , en la parte interna del complejo para así, evitar la degradación indiscriminada de proteínas intracelulares. Estos tres centros activos promueven la hidrólisis de proteínas en los residuos hidrofóbicos básicos o ácidos del carboxilo terminal. La subunidad β puede ser constitutiva o inducible, y está ensamblada de manera diferente dependiendo de las condiciones fisiológicas y de los requerimientos celulares. Parece ser que en los tres tipos de actividades proteolíticas, la treonina es el residuo catalítico esencial. Los anillos externos, formados por las subunidades α , no presentan actividad proteolítica pero sirven de anclaje para una multisubunidad PA700 (19S; 700 kDa) que contiene actividad ATPasa. La subunidad 19S se une al extremo superior e inferior del proteosoma 20S para formar el proteosoma 26S y se une a las proteínas ubiquitinadas., el proteosoma 26S solamente ha sido detectado en eucariotas. Una vez unidas las subunidades presenta las siguientes funciones: (1) abrir el canal de entrada al interior de la subunidad 20S, ya que este estaría cerrado por los restos N-terminales de las subunidades α y (2) desplegar las proteínas ubiquitinadas para que puedan penetrar en el centro catalítico. Ambos procesos requieren ATP (Rodríguez, 2003; Hochstrasser, 2009) (Figura 24).

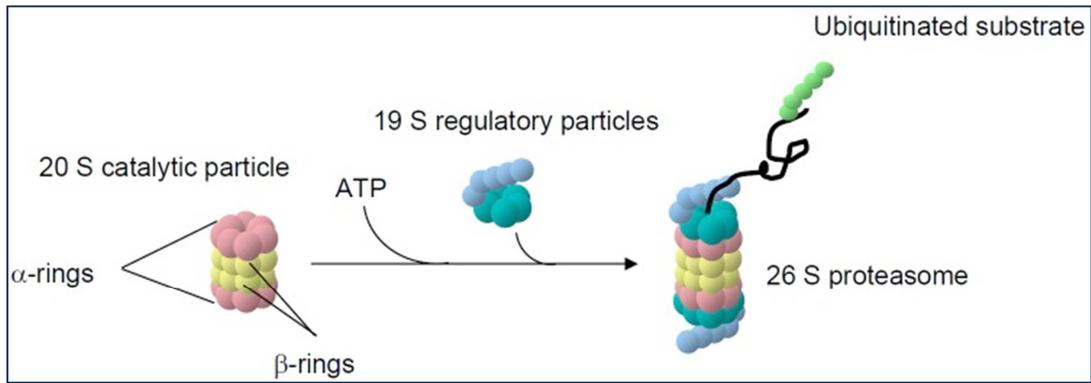


Figura 23. Composición y organización de los proteosomas. El proteosoma está compuesto por una región catalítica, que constituye a la subunidad 20S y una región reguladora, la multisubunidad 19S que presenta actividad de ATPasa. El ensamblaje de las dos regiones constituye al proteosoma 26 S, (Fuente: Lilienbaum, 2013).

Los defectos en las rutas de ubiquitinación de proteínas para la proteólisis en el proteosoma, se han relacionado con desórdenes neurodegenerativos tales como el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Fushman y Wilkinson, 2011). Otra de las enfermedades crónico degenerativas que puede afectar la función del proteosoma es la diabetes. Varios reportes han demostrado que los niveles altos de glucosa aceleran la actividad proteosomal con la consecuente pérdida muscular y una activación constante del factor nuclear- κ B. Queisser *et al.* (2010), demostró que la actividad proteosomal está disminuida *in vitro* e *in vivo* bajo condiciones de hiperglucemia, así como su actividad similar a quimiotripsina *in vitro*, también demostró que las altas concentraciones de glucosa permiten la reducción del complejo ubiquitina-19S dependiente de ATP, lo que probablemente induzca la acumulación de proteínas intracelulares poliubiquitinadas (Queisser *et al.*, 2010). La degradación de la proteína p53 se realiza principalmente por la vía ubiquitina-proteosoma, aunque también intervienen otras enzimas proteolíticas como las calpaínas.

10. Proteína Mdm2

10.1 Características estructurales de la proteína Mdm2

Mdm2 es una oncoproteína y su gen está localizado sobre el cromosoma humano 12q14.3q15. El gen *mdm2* fue identificado originalmente como uno de los tres genes (*mdm1*, 2 y 3), los cuales se sobre expresaron más de 50 veces por amplificación en la línea celular murina BALB/c (3T3-DM). Estos genes se localizaron sobre pequeños cuerpos nucleares extracromosomales acentroméricos, llamados dobles minutos. El producto del gen fue presentado más tarde como el responsable de la transformación de las células cuando lo sobre expresaban, por lo tanto a *mdm2*, se le considera un oncogén pues se ha observado que está amplificado en el 7% de todos los cánceres humanos, como cáncer de mama, osteosarcomas, y carcinomas esofágicos.

La proteína Mdm2 presenta una longitud de 491 aminoácidos- y una masa molecular de 90 KDa. La estructura de Mdm2 ha sido resuelta por cristalografía de rayos X (Lozano y Montes de Oca., 1998), posee 4 dominios funcionales bien conservados entre los vertebrados con mandíbula estos son: 1) el dominio de unión con p53, 2) el dominio ácido central, 3) el dominio Zinc Finger o dedo de zinc y 4) el dominio de Ring Finger o dedo anular (Momand *et al.*, 2011) (Figura 25). La porción del N terminal de Mdm2 contiene el *dominio de unión a la proteína p53* (residuos 23-108), el cual forma una hendidura hidrofóbica donde el α -hélice de p53 se une. El α -hélice de p53 está constituida por 18-26 aminoácidos, y forma parte del gran dominio de transactivación que se une a diversos factores de transcripción. Mdm2 en su *dominio central ácido* (residuos 243-301) presenta sitios de unión para las proteínas TBP, p300, el supresor de tumores p14/p19_{Arf}, las secuencias de localización y exportación nuclear que modulan el movimiento nucleo-citoplásmico. El dominio central ácido presenta un punto Isoeléctrico calculado de 2.9, debido a su gran número de residuos de ácido aspártico y ácido glutámico. Este dominio contiene cuatro serinas que son blancos de fosforilación por la cinasa de control 1 y 2 (checkpoint kinase 1 y 2). El dominio ácido se une al supresor de tumores, p14/p19_{Arf}, que permite el secuestro de Mdm2 al nucléolo, lo que evita la unión a p53, resultando en el incremento de la actividad de p53 y de la unión de p14/p19_{Arf} a Mdm2, lo que previene a ubiquitinación de p53 regulada por Mdm2. Hay evidencias que

proponen que el dominio ácido de Mdm2 contribuye a la degradación eficiente de p53. El dominio ácido de Mdm2 puede interactuar y facilitar la entrada de p53 al proteosoma. Esto sugiere que este dominio participa en la degradación de Mdm2 post-ubiquitinación (Meek y Knippschild, 2003; Michael y Moshe, 2003). El *dominio de dedo de Zinc* (residuos 299-328), contiene cuatro cisteínas conservadas que coordinan al Zinc. Este dominio junto con el central ácido se unen a varias moléculas biológicas que incluyen a las proteínas ribosomales L5, L11, L23, la proteína de unión a TATA y al supresor de tumores Rb. La región del COOH-terminal de Mdm2 exhibe el *dominio Ring Finger* (438-479 aminoácidos); conocidos como motivos de interacción proteína-proteína, pero también pueden unirse a DNA o RNA. Este dominio usa seis cisteínas y dos histidinas para la unión de 2 átomos de Zinc, que es esencial para el plegamiento apropiado de este dominio. El dominio Ring Finger es necesario para la transferencia de la ubiquitina de E2 a las lisinas de p53 y para la autodestrucción de Mdm2. (Daujat *et al.*, 2001; Michael y Moshe, 2003; Meek y Knippschild, 2003; Momand *et al.*, 2011).

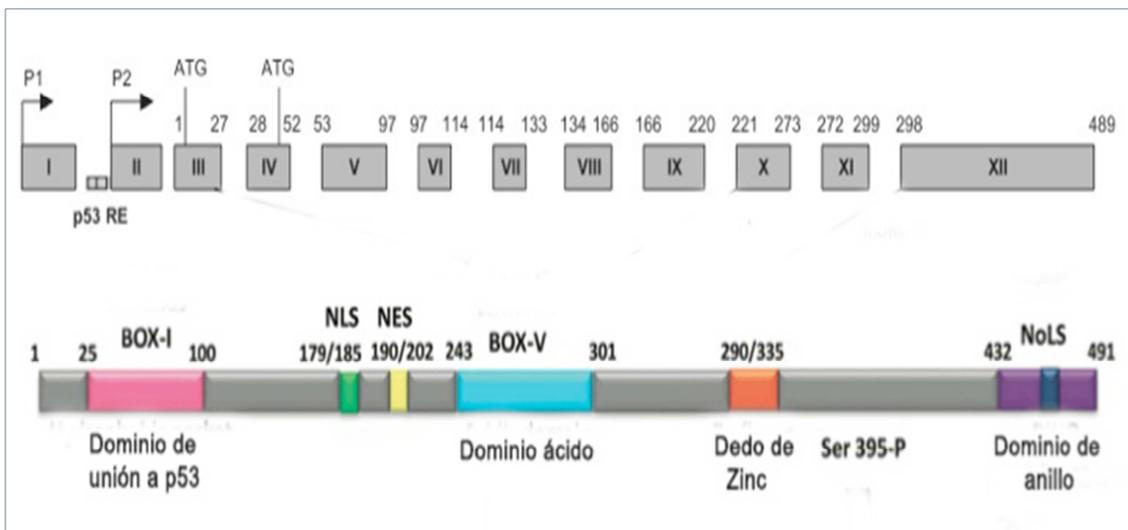


Figura 24. Estructura del gen *mdm2* y dominios funcionales de la proteína Mdm2. El gen *mdm2* consiste de 12 exones y dos elementos sensible a p53 (p53 RE) en el intrón 1. La proteína Mdm2 presenta una longitud de 491 aminoácidos y una masa molecular de 90 Kd, comprenden, el dominio de unión a p53, el dominio ácido, el dominio de dedo de zinc y el dominio de anillo, además presenta las señales de exporte y localización nuclear (NLS y NES) así como la señal de localización nucleolar (NoLS) (Fuente: Iwakuma y Lozano, 2003; Ponnuswamy *et al.*, 2012).

La transcripción de Mdm2 está regulada por p53, por lo tanto cuando p53 se estabiliza, la transcripción de Mdm2 también se induce, resultando en un incremento de los niveles de Mdm2 (Iwakuma y Lozano, 2003). Así Mdm2 y p53 forman parte de un loop auto-regulador negativo que mantiene los niveles de p53 bajos en ausencia de señales que estabilicen a p53 como la radiación ionizante y ultravioleta lo que le permiten escapar de la degradación promovida por Mdm2 (Michael y Oren, 2003; Moll y Petrenko, 2003; Manfredi, 2010).

La función más importante de Mdm2 es la regulación negativa de la proteína supresora de tumores p53. Mdm2 por medio de su NH₂- terminal que contiene el sitio de unión a p53, logra unirse al dominio de transactivación p53 y así reprime su actividad transcripcional. Además Mdm2 en virtud de su señal de exportación traslada a p53 fuera del núcleo (Chan *et al.*, 2006). Mdm2 también actúa como una ubiquitina E3 ligasa, esta propiedad se la confiere su dominio Ring Finger; este dominio es el más conservado en términos evolutivos y se ha observado que sus funciones se anulan mediante mutaciones que eliminan o sustituyen cualquiera de sus aminoácidos necesarios para la coordinación de moléculas de Zinc (Meek y Knippschild, 2003; Moll y Petrenko, 2003). Este dominio también modula su autoubiquitinación y la ubiquitinación de p53 y de otros sustratos. Por lo tanto Mdm2 es capaz de neutralizar la actividad de p53 no solo por impedir su activación transcripcional, sino también por promover su degradación a través de la ubiquitinación (Iwakuma y Lozano, 2003; Michael y Oren, 2003). Mdm2 es una proteína de vida muy corta, cuya rápida degradación se debe a su proteólisis dependiente de ubiquitina, por lo tanto la actividad de ligasa E3 de Mdm2 es importante no sólo por regular los niveles de p53 sino también para su propia autorregulación (Michael y Oren, 2003; Moll y Petrenko, 2003; Manfredi, 2010).

Existen seis residuos de lisina en p53 que son ubiquitinados por Mdm2 (lisina 370, 372, 373, 381, 382 y 386). La ubiquitinación de p53 por Mdm2 inicia con la unión de Mdm2 al extremo N-terminal de p53. Existe una segunda región de p53, llamada caja-V que sirve como señal de ubiquitinación y sitio de acoplamiento para Mdm2. Esto permitió a Wallace *et al.* (2006) proponer un modelo donde la unión de Mdm2 al extremo N-terminal de p53 promueve la unión del dominio ácido de Mdm2 a la región de la caja-V de p53, permitiendo la transferencia de ubiquitinas de E2 al extremo C-terminal de p53 (Chan *et al.*,

2006; Wallace *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2013).

Mdm2 cataliza la monoubiquitinación y la poliubiquitinación de p53 de manera dosis-dependiente. Los niveles elevados de Mdm2 regulan la poliubiquitinación y degradación proteosomal, mientras que los bajos niveles de Mdm2 inducen la monoubiquitinación y el transporte nuclear de p53 (Li *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2011). Marchenko *et al.* (2007), señaló que la monoubiquitinación de p53, constituye una señal de tráfico para redireccionar a p53 de la degradación e inactivación a la translocación hacia la mitocondria y activación temprana durante la respuesta al estrés, así Mdm2 parece actuar no como una lanzadera de p53 sino como un promotor de la translocación de p53 a la mitocondria, en virtud de su actividad enzimática E3 ligasa. Se ha demostrado que la monoubiquitinación es catalizada sólo por Mdm2, mientras que la poliubiquitinación está regulada por Mdm2 junto con p300 (Chan *et al.*, 2006). Además del cambio conformacional de Mdm2 que se produce por la unión de su dominio central al dominio de unión a DNA de p53, se necesita de una segunda interacción para una poliubiquitinación y degradación proteosomal eficiente (Wang *et al.*, 2011). La interacción de p53 con Mdm2 necesita de otras proteínas que mejoren y controlen este mecanismo. Davis *et al.* (2013) demostró que antes de que p53 se transloque al núcleo, se le une en el citoplasma una proteína “switch” (PS) que le permite interactuar con Mdm2 y su subsecuente ubiquitinación. De este modo la proteína switch proporciona una interacción controlada de p53 con Mdm2.

10.2 La actividad de Mdm2 está regulada por modificaciones post-traduccionales.

La función de Mdm2 está altamente controlada por modificaciones post-traduccionales, entre las que destaca, la fosforilación. Mdm2 contiene múltiples sitios de fosforilación, localizados dentro de dos dominios funcionales: 1) el dominio N-terminal que interactúa con p53 e inhibe su actividad y 2) el dominio ácido en la parte central de Mdm2 que sirve como sitio de acoplamiento para otras proteínas. La fosforilación de Mdm2 regula la ubiquitinación de p53 como: 1) afectar directamente la actividad de E3 ligasa de Mdm2, 2) interfiere con la asociación física entre p53 y Mdm2 y 3) restringe a Mdm2 en ciertos

compartimentos subcelulares para proteger a p53 de la degradación (Shi y Gu, 2012).

La DNA-PK (proteína cinasa activada por DNA) fosforila a Mdm2 en el dominio de unión a p53 en serina 17, la fosforilación en este sitio ha sido reportada con un impacto significativo sobre la habilidad de Mdm2 para ubiquitinar a p53 (Shi y Gu, 2012).

La ATM cinasa (Ataxia-Telangiectasia Mutada), un miembro de la familia de las fosfatidil inositol 3-cinasas, fosforila a p53 y a Mdm2. La fosforilación de p53 en serina 15 por ATM, reduce su afinidad por Mdm2 y su degradación, por lo tanto incrementa su estabilidad y función. ATM también puede fosforilar a Mdm2 en serina 395, reduciendo la oligomerización de su dominio "Ring Finger" y atenuando la actividad de E3 ligasa de Mdm2, esto implica la inhibición de la cualidad exportadora de Mdm2 para acarrear a p53 del núcleo al citoplasma, evitando la degradación de p53 y promoviendo su acumulación en la células (Shi y Gu, 2012; Hu *et al.*, 2012). ATM no sólo fosforila directamente a Mdm2 sino también activa a una segunda cinasa, la c-Abl (del inglés Abelson murine leukemia), La fosforilación de Mdm2 inducida por c-Abl en Tirosina 394, debilita la interacción entre Mdm2 y p53 protegiendo de la degradación a p53 (Hu *et al.*, 2012).

La exposición a la radiación ultravioleta, activa a la proteína cinasa ATR (*Ataxia Telangiectasia-Rad 3*), la cual fosforila a p53 en múltiples sitios, que incluyen serina 15 y serina 37, además fosforila a Mdm2 en serina 407, reduciendo la exportación de p53 del núcleo al citoplasma dependiente de Mdm2, incrementando la acumulación y función de p53 (Hu *et al.*, 2012).

Wip1 es un gen blanco y una fosfatasa inducidos por p53 en una fase posterior al estrés genotóxico, que desfosforila a Mdm2 en el residuo de serina 395 (el sitio fosforilado por ATM). Esta desfosforilación incrementa la afinidad de Mdm2 hacia p53 y la ubiquitinación y degradación de p53, al mismo tiempo que reduce la autoubiquitinación de Mdm2 (Shi y Gu, 2012).

El dominio central ácido de Mdm2 está altamente desordenado y requiere modificaciones para adoptar estructuras fijas que favorezcan la unión con otras proteínas. Se han identificado múltiples sitios de fosforilación en este dominio. La Glicógeno sintasa cinasa-3 β (GSK-3 β), una serina/ treonina cinasa, fosforila a la serina 240 y a la serina 254 del dominio central ácido de Mdm2 (Shi y Gu, 2012).

Por otra parte la vía de señalización de PI-3K/Akt es una ruta evolutivamente bien conservada que tiene un papel crítico en la tumorigénesis al regular la proliferación y supervivencia celular. La unión de IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1 a su receptor de tirosina cinasa) resulta en la activación de PI3K (Fosfoinositol 3 Cinasa), el cual a su vez fosforila a los fosfoinosítidos y permite que los niveles de PIP3 (Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato) en la membrana plasmática se incrementen. De esta manera PIP3 logra el reclutamiento de las proteínas que contienen dominios de homología de plekstrina, como PDK1 y PDK2, activadores de Akt. El incremento de PIP3 activa a las PDKs, las cuales fosforilan a Akt en treonina 308 y serina 473. La activación de Akt permite su liberación de la membrana para interactuar y fosforilar un gran número de sustratos citoplásmicos y nucleares, que inhiben la apoptosis y estimulan la supervivencia celular (Hu *et al.*, 2012). Mdm2 se fosforila por Akt en serina 166/186, ambos se localizan dentro de los motivos consenso RXRXXS/T para la cinasa Akt y cercanos a la secuencia de localización nuclear (Mdm2 NLS). En estudios previos en células de osteosarcoma de la línea U2OS mediante análisis de Western blot, se observó que en condiciones de escases de suero los niveles de Mdm2 no se afectaron, por el contrario en presencia de suero, hubo un rápido incremento en la fosforilación de Serina 166 de Mdm2. Este hallazgo respaldó la hipótesis de que Mdm2 presentaba fosforilaciones en el residuo de Ser166 cuando la actividad de Akt era inducida (, por lo tanto Mdm2 fue identificado como sustrato de Akt. Gottlieb *et al.*, 2002; Meek y Knippschild, 2003; Al- Anati *et al.*, 2009). Hay que destacar que los sitios Ser166 y Ser186 están evolutivamente bien conservados. La fosforilación de Mdm2 en Serina 166/186 promueve su localización nuclear y su interacción con p300, un co-activador transcripcional que forma un complejo con Mdm2. Este complejo heterogéneo favorece la inhibición y degradación de p53 (Shi y Gu, 2012; Hu *et al.*, 2012). El residuo de serina 166 de Mdm2 está conservado entre 13 especies de mamíferos (incluido el humano) (Fuente: www.uniprot.org) (Figura 26).

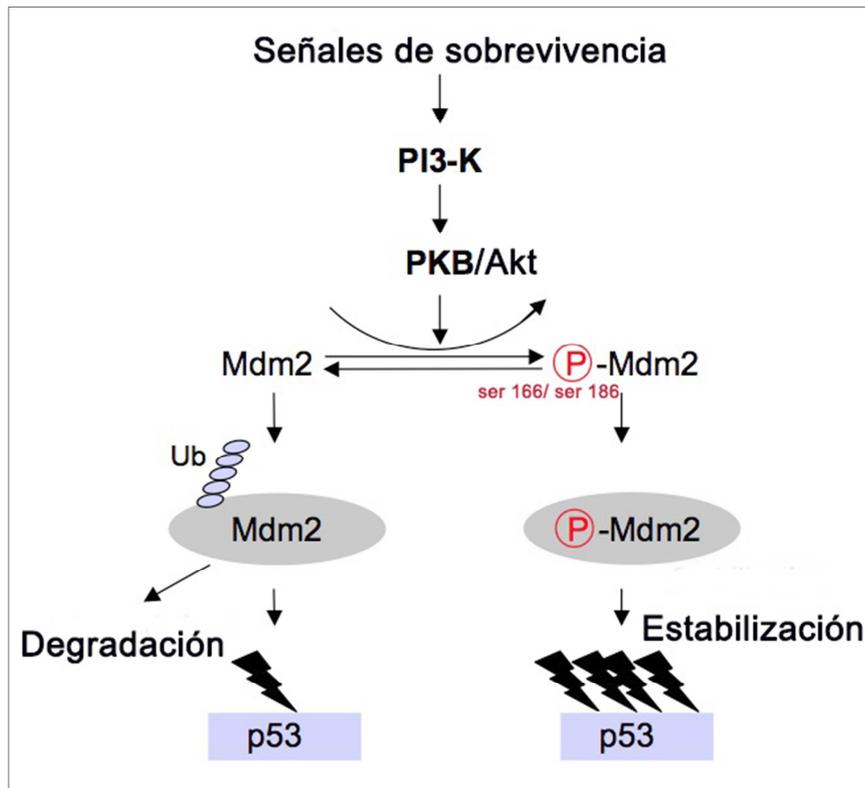


Figura 25. Regulación de Mdm2 por PKB/Akt. La vía de señalización de PI-3K/Akt. La unión de un factor de crecimiento a su receptor de tirosina cinasa resulta en la activación de PI3K que a su activa a PKB/Akt, la cual fosforila a Mdm2 en los residuos de serina 166 y 186 que promueven su estabilización, favoreciendo la ubiquitinación y degradación de p53 . Mdm2 al no ser fosforilada por PKB/Akt induce a su autoubiquitinación que produce su degradación (Fuente: Feng *et al.*, 2004).

10.3 Regulación de Mdm2 por MicroRNAs

Los Micro RNAs son pequeños RNAs no codificantes que se expresan endógenamente. Los Micro RNAs se alinean con sitios parcialmente complementarios del 3'-UTR de los RNA mensajeros, permitiendo la represión traduccional de genes diana. Los micros RNA aberrantes se han observado en diversos tipos de cáncer, evidenciando su participación en la tumorigénesis. Se han identificado diversos micro RNAs como activadores de Mdm2 entre los que se incluyen: miR143/145, miR605, miR25, miR32 y miR143/145. Los Micro RNAs regulan negativamente a los RNAm de Mdm2 por unión directa con su 3'-UTR, incrementando los niveles y la función de p53 (Hu *et al.*, 2012).

10.4 Regulación de Mdm2 por estrés ribosomal

La retroalimentación negativa de Mdm2-p53 está regulada por estrés ribosomal, también conocida como estrés nucleolar. La biogénesis es un proceso celular coordinado que involucra la expresión de RNA ribosomales (rRNA) y proteínas ribosomales, procesamiento de los rRNA, y ensamblaje de PR (proteínas ribosomales) con el rRNA para generar ribosomas 80s, asegurando un nivel adecuado de síntesis de proteínas que entren al ciclo celular y mantengan la homeostasis celular. Las alteraciones en la biogénesis ribosomal, incluyen una inadecuada transcripción de rRNA, interrupción del procesamiento del rRNA y estrés ribosomal. Diversas PR interactúan con Mdm2 (RPL5, RPL11, RPL23, RPL26, RPS3, RPS7, RPS14, y RPS27/L). Un exceso de PR libres, implica una unión directa al dominio central ácido de Mdm2, haciéndola menos eficiente para regular a p53 (Hu *et al.*, 2012).

10.5 Regulación de Mdm2 por estrés crónico y neurohormonas.

Estudios recientes sugieren que el incremento de neurohormonas durante el estrés crónico desregulan a p53 a través de la activación de Mdm2. Las hormonas glucocorticoides y corticosterona, incrementan la fosforilación de los residuos de Serina 166/186 y reducen los niveles y funciones de p53. Este efecto está regulado por la proteína cinasa inducida por glucocorticoides y suero (SGK1). Al bloquear la función de SGK1 se suprime la fosforilación de Ser 166/186 en Mdm2 por glucocorticoides y su efecto inhibitorio sobre p53. Por lo tanto el estrés crónico eleva la concentración de glucocorticoides que disminuyen la función de supresor de tumores de p53 al incrementar la actividad de Mdm2 (Hu *et al.*, 2012).

10.6 Enfermedades asociadas con actividad excesiva de p53

Los cambios en los niveles de p53 tienen importantes consecuencias para la biología celular y la fisiología animal, destacando la importancia de controlar la expresión de p53 bajo condiciones normales así como en condiciones de estrés. La activación farmacológica de p53 en ratones transgénicos usando péptidos con el C-terminal modificado induce un fenotipo pro-envejecimiento

caracterizado por una longevidad reducida, osteoporosis, atrofia de órganos generalizada y una tolerancia al estrés disminuida. En otros estudios con ratones transgénicos usando otra forma de p53 truncada con mutaciones en el dominio de unión a Mdm2, se observó que p53 promovía el envejecimiento. Por otra parte el estrés por adrenalina crónico a través de los receptores β -andrenérgicos regula la supresión de Mdm2 y activa a p53 lo que deriva en daño al DNA y envejecimiento en ratones (Ponnuswamy *et al.*, 2012). Por lo tanto el incremento de la actividad de p53 afecta adversamente a la salud, ya que se incrementa la muerte por apoptosis de los tejidos sanos. Algunas enfermedades son el resultado de la actividad excesiva de p53 (Cuadro 2). (Nayak *et al.*, 2009) (Figura 27).

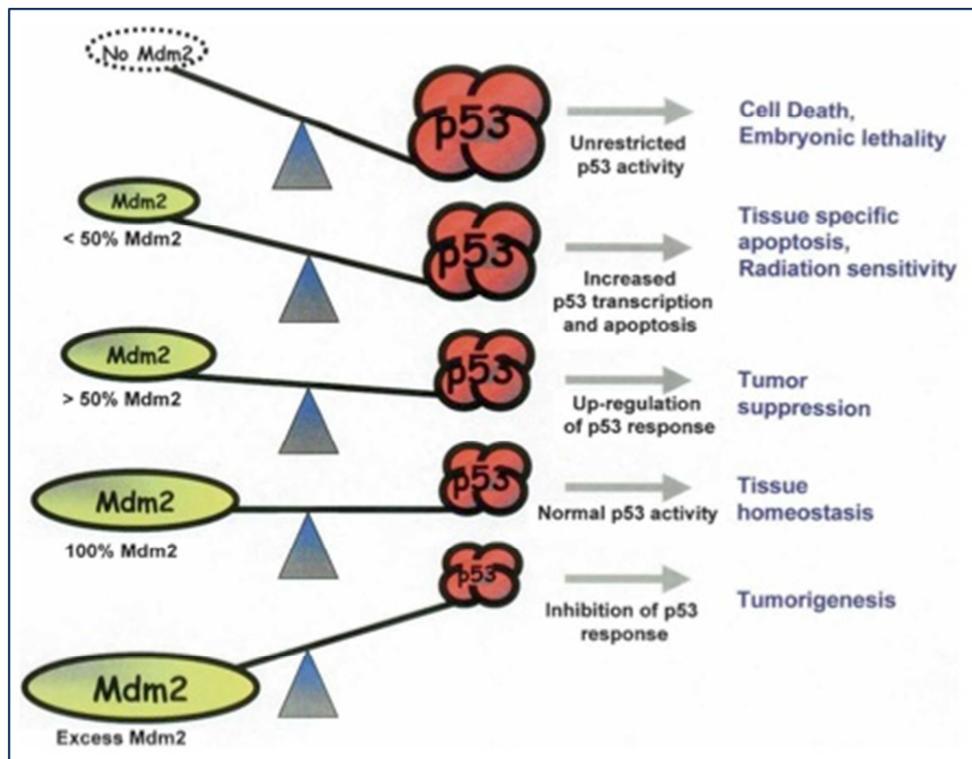


Figura 26. Balance entre p53 y Mdm2. Los niveles totales de Mdm2 en la célula modifican en gran medida la actividad de p53. La reducción de los niveles de Mdm2 a menos del 50% conducen a un incremento de la apoptosis específica de tejidos, mientras una reducción del 80% de Mdm2 permiten la supresión de tumores sin efectos adversos para el organismo, sin embargo un exceso de más del 100% en los niveles de Mdm2 inhiben la actividad de p53 induciendo la tumorigénesis (Fuente: Poyurovsky y Prives, 2006).

Cuadro 2. Enfermedades Asociadas a la actividad excesiva de p53

Enfermedades asociadas a la actividad excesiva de p53	Tipos
Enfermedades Neurodegenerativas	Enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), retinitis pigmentosa (RP)
Enfermedades Hematológicas	Síndromes mielodisplásicos, anemia aplásica, neutropenia crónica, y talasemia severa.
Enfermedades Infecciosas	Influenza, neumonía, VIH
Enfermedades Dermatológicas	Psoriasis, alopecia androgénica, verrugas comunes, condiloma acuminado y epidermodisplasia verruciforme.
Enfermedades del Sistema Inmunológico.	SIDA, exocrinopatía autoinmune y lupus eritematoso sistémico
Enfermedades Oseas	Artritis y osteoporosis

Nota. Fuente: (Nayak *et al.*, 2009).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hiperglucemia es una característica de la diabetes, durante esta condición el número de células β pancreáticas disminuye, por lo tanto la secreción de insulina también se reduce. En reportes previos se han obtenido evidencias de que la hiperglucemia crónica origina estrés oxidativo y este a su vez promueve la muerte celular por apoptosis. En situaciones de estrés la activación de la proteína p53 tiene un papel importante, pues activa una serie de genes pro y anti apoptóticos, además de participar en los cambios a nivel mitocondrial, en este caso la hiperglucemia podría provocar un aumento en los niveles de p53 al disociarla de su principal regulador, MDM2 (al inhibir su actividad de ubiquitina ligasa). Lo que permitiría el reclutamiento de p53 hacia la mitocondria y la apoptosis de las células β pancreáticas y ser el origen de la disfunción de las mismas. Por lo tanto en el presente estudio la respuesta a resolver es:

¿Qué efectos tiene la hiperglucemia crónica sobre la función reguladora de MDM2 en p53 y la apoptosis de células β pancreáticas?

VI. HIPÓTESIS

Las altas concentraciones de glucosa disminuirán la degradación de p53 interfiriendo con la fosforilación de MDM2 lo que inducirá la muerte por apoptosis de las células RINm5F.

VII. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de la hiperglucemia sobre Mdm-2 como regulador principal de p53 en células RINm5F cultivadas con concentraciones altas de glucosa.

VIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En células RINm5F cultivadas en un medio con concentraciones altas de glucosa comparándolo contra un grupo con glucosa normal :

- Demostrar que la hiperglucemia promueve apoptosis mediante análisis de fraccionamiento del DNA.

- Determinar la concentración y fosforilación de Mdm2 mediante ensayos de Western Blot.

-

Indicar la localización subcelular de Mdm2 mediante ensayos de Western Blot y microscopía confocal.

Evaluar la ubiquitinación de p53 mediante ensayos de Inmunoprecipitación y de Western Blot

IX. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Reactivos

Cultivo Celular: El medio de cultivo RPMI 1640 sin glucosa & NaHCO₃, la Tripsina (10x), y el EDTA, de Sigma-Aldrich Corporate (St. Louis, MO, USA). La solución balanceada de Hanks (10x) sin NaHCO₃, la L-Glutamina 200mM (100x), la Solución de Aminoácidos no esenciales (100x) de In Vitro S.A (México D.F). El medio RPMI 1640 con glucosa y L-Glutamina sin NaHCO₃ (10x) y el Piruvato de sodio de GIBCO (Carlsbad, California, USA). El suero fetal bovino de PPA The Cell Culture Company (Pashing, Austria).

Western Blot: Los anticuerpos anti Mdm2, anti p53 (pab 246), anti β -Actina, anti Histona, la proteína G Plus-Agarosa, la albúmina de suero bovino (BSA) y las membranas para transferencia PVDF de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, USA). El anticuerpo anti fosfo-MDM2 (Ser¹⁶⁶) de Thermo Scientific (Rockford, IL, USA). Los anticuerpos secundarios cabra-anti conejo y cabra-anti ratón conjugados con peroxidasa de MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA). Los marcadores de peso molecular se obtuvieron de Bio-Rad (Hercules CA, USA). El estuche de quimioluminiscencia de GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Bucks, UK). Otros reactivos grado analítico se obtuvieron de E. Merck (Darm Stadt, Germany).

2. Cultivo celular

Células RINm5F. Esta línea celular es obtenida de insulinomas (tumor del páncreas endócrino que se origina en las células β de los islotes pancreáticos) de rata. Las células RINm5F son de las líneas celulares secretoras de insulina más usadas en investigación bioquímica y molecular para probar los efectos de varios fármacos, se caracterizan por secretar principalmente insulina y pequeñas cantidades de glucagón y somatostatina.

Las células RINm5F se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio; 20 μ g gentamicina y 23.8 mM de bicarbonato de sodio en una atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. El cultivo celular se mantuvo a dos concentraciones de glucosa 5 y 30 mM.

Las células al alcanzar 80% de confluencia, se desprendieron con 5 ml de tripsina al 0.025% - EDTA 2 mM y se recuperaron por centrifugación por 5 min a 250 x g a 4°C. El botón celular se resuspendió con medio RPMI 1640 suplementado y se tomó una alícuota para cuantificar el número de células. Posteriormente, se procedió a resembrar las células para administrar los tratamientos. Con este objetivo se puso la cantidad de 2.5×10^6 células en cada botella de 75 mm², con 10 ml de medio RPMI 1640 suplementado, al día siguiente se les cambió el medio y al segundo día se adicionaron los tratamientos, como se señala posteriormente.

3. Extracción de RNA y RT-qPCR (Real Time- quantitative Polymerase Chain Reaction).

El RNA fue purificado de las células RINm5F con agente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, Ca), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La síntesis del cDNA provino de 5 µg de RNA usando el kit ImProm II Reverse Transcriptase System (Promega, Madison, WI, USA); el cDNA obtenido fue usado para el RT-qPCR. Los primers específicos para Mdm2 que fueron usados: 5'- AGGAGCGGCTCCATGTGCAATACCATG – 3' (forward), y 5'- CTAGGGGAAATAAGTTAGCACAAT – 3' (reverse). RT-qPCR fue realizado en un termociclador de luz 2.0 (Roche Molecular Biochemicals Mannheim-Alemania) en conjunto con el kit para termociclador Fast Star DNA M PSYBR Green I (Applied Biosystem). Los datos fueron normalizados con GAPDH. Después de la amplificación, las curvas de fusión para cada producto de PCR fueron obtenidos y usados para determinar su especificidad.

4. Determinación de apoptosis.

4.1 Fragmentación 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 adicionó ½ volumen de acetato de amonio 10 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA y se almacenó 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 *et al.*, 1994). Por medio de un fotodocumentador de geles (Gel Doc 2000, Bio-Rad) se obtuvieron los patrones de corrimiento del DNA.

5. Fracciones subcelulares

Las células RINm5F (2×10^7) se resuspendieron en 350 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 de 1.5 ml, se tomaron alícuotas de 50 µl para cuantificar proteínas totales. Posteriormente se centrifugaron a 1500 x g (Thermo Scientific Sorvall ST 40 R 17 cm diámetro) por 1 min a 4 °C y se colocaron en hielo. De los botones celulares se obtuvo 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) que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasa (DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, NaF 50 mM, NaVO₄ 100 mM) y 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 Sorvall 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 Sorvall 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).

6. “Western blot” para Mdm2 y Mdm2 p-Ser¹⁶⁶

Las fracciones (de 80-100 µg proteína), se mezclaron con 2 volúmenes del amortiguador de carga Laemmli 2x (Tris HCl 125 mM, SDS 4%, glicerol 20%, 2- mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.004%, pH 6.8; Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis, MO, USA), se calentaron por 5 min a 95 °C y se corrieron en PAGE-SDS (8 y 10%), al inicio por 15 minutos a 90 volts para que las muestras corrieran del gel concentrador al gel separador y a continuación 1 h a 120 volts, posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF (0.8 mA/cm², toda la noche a 4 °C), en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y 20% de metanol). El corrimiento y la transferencia de las proteínas se confirmó con rojo de Ponceau S al 0.1%. A continuación, la membrana se lavó 2 veces con agua Milli Q y 4 veces con TBS-T (NaCl 140 mM, Tris 50 mM pH 7.2; Tween 20 al 0.1%), para proceder a bloquear los sitios de unión inespecíficos con Albúmina al 5% en TBS-T durante 2 h a temperatura ambiente. Al concluir el bloqueo la membrana se lavó tres veces con TBS-T y se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo anti MDM2 (1:1000, C-18) o anti fosfo-MDM2 (Ser¹⁶⁶) (1:1000) en BSA al 1% en TBS-T. La unión de los anticuerpos se detectó mediante la utilización de un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano y se reveló utilizando un estuche GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Bucks, UK).

7. Inmunoprecipitación

La fracciones se incubaron con el anticuerpo anti p53 (pab 246) en PBS o con el amortiguador con el que se diluyó cada fracción y se incubaron durante una hora a 4 °C en agitación orbital. A las fracciones se les añadió Proteína G PLUS-Agarosa y se incubaron en agitación orbital por una hora o toda la noche a 4 °C. Posteriormente se colectaron los inmunoprecipitados por centrifugación a 1000 x g por 5 minutos a 4 °C y descartando el sobrenadante. Las pastillas se lavaron 4 veces con PBS cada vez repitiendo el paso de centrifugación. Después del lavado final, se aspiró y descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en amortiguador de carga Laemmli 2x (Tris HCl 125 mM, SDS 4%, glicerol 20%, 2- mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.004%, pH 6.8), se calentaron por 2-3 minutos a 95 °C y se centrifugaron 1 minuto a 1000 x g.

Finalmente las muestras fueron cargadas directamente en un PAGE-SDS (8-10%) y analizadas por Western blot (siguiendo la metodología descrita anteriormente); los inmunoprecipitados fueron revelados con el anticuerpo anti MDM2 (1:1000, C-18).

8. Localización subcelular de Mdm2 por microscopía confocal

Las células se cultivaron en cubre objetos de 8 pozos (25,000 células por pozo) (Thermo Scientific Rockford, IL, USA) en presencia de 5 ó 30 mM de glucosa y se analizaron a las 24, 48 y 72 horas. Después de los tratamientos, las células se lavaron con PBS y se fijaron durante 30 minutos a 37 °C con paraformaldehído al 4%, se realizaron tres lavados con PBS-T. Posteriormente se permeabilizaron las células con PBS-Tritón al 0.3% durante 15 minutos y se lavaron 3 veces con PBS-T. Después se bloqueó con Bloqueador universal (Bionex, USA) por 15 minutos a 37 °C y se realizaron los lavados correspondientes con PBS-T. Las células se incubaron toda la noche en cámara húmeda a 4 °C en presencia del anticuerpo primario contra α -Mdm2 (1:10 en PBS-T al 1%). Después se lavaron las células con PBS-T y se adicionó el anticuerpo secundario (anti conejo conjugado con FITC, 1:100), en el mismo amortiguador por 3 horas adicionales en las condiciones anteriores incluyendo los lavados con PBS-T. Se continuó a marcar los núcleos con la sonda fluorescente DRAQ-7 (0.3 mM) (Biostatus, Leicestershire, UK), después de incubar en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente, las muestras se lavaron tres veces con PBS-T. Al final de este procedimiento a cada muestra se le añadió 3 μ l del medio de montaje VECTASHIELD para preservar la fluorescencia (Vector Laboratories, San Mateo, California, USA), se colocó el cubreobjetos, se selló con barniz de uñas transparente y se procedió al análisis. Las muestras se examinaron con un microscopio confocal Carl Zeiss, Axiovert 100 M provisto con un rayo laser de argón/helio/neón, con el programa de captura ZEON 2009 (Carl Zeiss, Goettingen, Germany). Para la captura de imagen se utilizaron el láser de 488 nm y 543 nm así como filtros de pase corto (BP 505-530) para FITC y filtro de pase largo (LP 650) para DRA-Q7. Se capturaron imágenes de 40X. Los resultados se analizaron utilizando una representación con pseudo-color y con el programa de procesamiento digital Image J 1.45 s..

9. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico NCSS. Los resultados se expresan como promedios \pm DS. Se utilizó una prueba paramétrica de comparaciones múltiples (ANOVA). La comparación entre grupos para encontrar diferencias significativas se realizó con la prueba de Tukey-Kramer.

X. RESULTADOS

1. Las concentraciones altas de glucosa inducen apoptosis en las células RINm5F

Las células RINm5F se cultivaron en un medio que contenía 5 ó 30 mM de glucosa durante 24, 48 y 72 h para evaluar el efecto de la concentración de glucosa sobre la supervivencia celular. La apoptosis se determinó mediante el análisis de fragmentos oligonucleosomales del DNA de aproximadamente 200 pares de bases, característica distintiva de la muerte por apoptosis. El análisis electroforético del DNA proveniente de las células RINm5F cultivadas con alta glucosa exhibió el patrón en escalera a partir de las 48 h. Esta característica no se observó a las 24 h ni en las células cultivadas con 5 mM de glucosa (Figura 27).

MP 1 2 3 4
 Control 24h 48h 72h

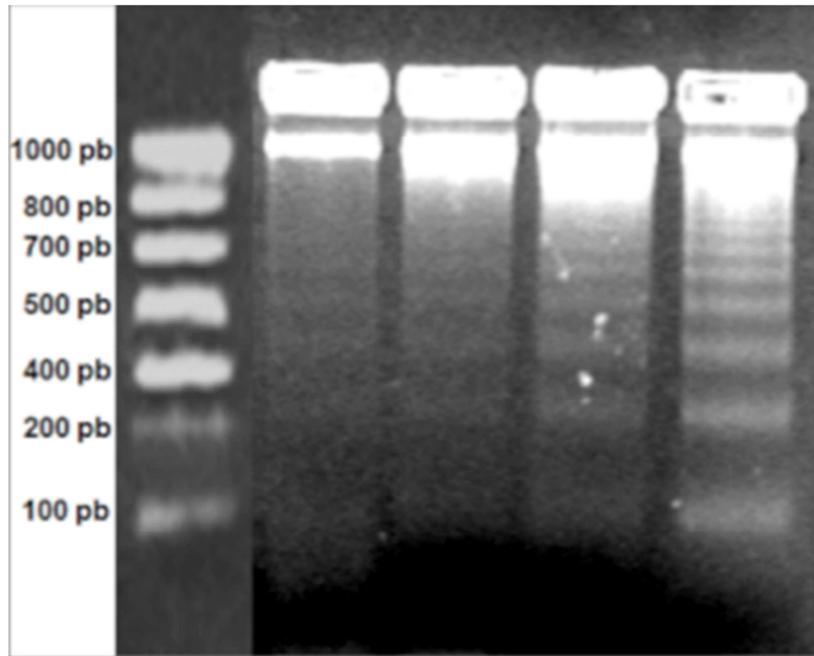


Figura 27. Inducción de apoptosis en células RINm5F por glucosa. Fragmentación oligonucleosomal del DNA de las células RINm5F por hiperglucemia. Células RINm5F cultivadas con altas concentraciones de glucosa durante 24, 48 y 72 h. MP: marcador de peso molecular. Línea 1: DNA de células RINm5F cultivadas con 5 mM de glucosa por 72 h. Línea 2, 3 y 4: DNA de células RINm5F cultivadas con 30 mM de glucosa por 24, 48 y 72 h, respectivamente. Esta figura representa 3 experimentos independientes.

2. La expresión de MDM2 en células RINm5F disminuye en presencia de concentraciones altas de glucosa

El análisis de qPCR reveló que las concentraciones altas de glucosa (30 mM) disminuyen la expresión de Mdm2 a partir de las 4 horas de tratamiento y que este decremento continúa hasta las 72 horas, siendo significativo ($p < 0.05$) a partir de 8 horas de tratamiento, resultando en un efecto negativo de las altas concentraciones de glucosa sobre el RNA mensajero de Mdm2 (Figura 28).

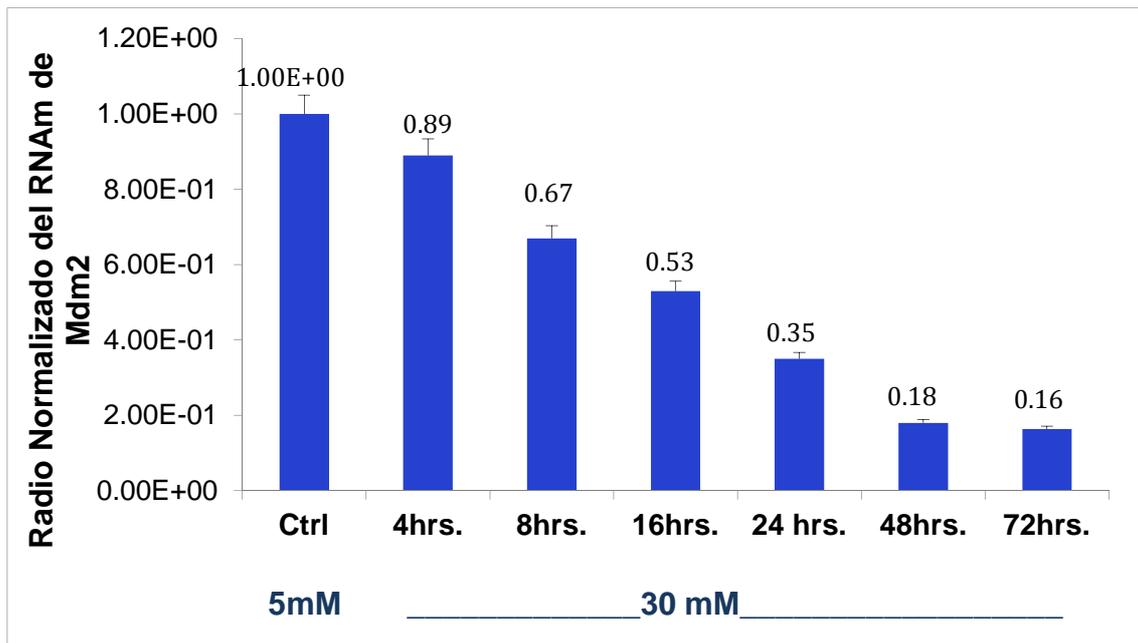


Figura 28. Efecto de la glucosa (5 ó 30 mM) sobre la expresión de Mdm2. Análisis de la expresión de Mdm2 por qPCR (quantitative polymerase chain reaction) en células RINm5F cultivadas con 5 ó 30 mM de glucosa durante 4, 8, 16, 24, 48 y 72 h. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

3. Efecto de las concentraciones altas de glucosa sobre la concentración de MDM2 en células RINm5F

Los resultados del Western blot, demuestran que en las células RINm5F cultivadas con alta glucosa la concentración de Mdm2 disminuye progresivamente a partir de 24 h y hasta 72 h en la fracción citosólica. Un comportamiento similar se observó en la fracción nuclear, sin embargo con el análisis densitométrico, solo se observaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en la fracción citosólica con respecto al control (Figura **29** y **30**).

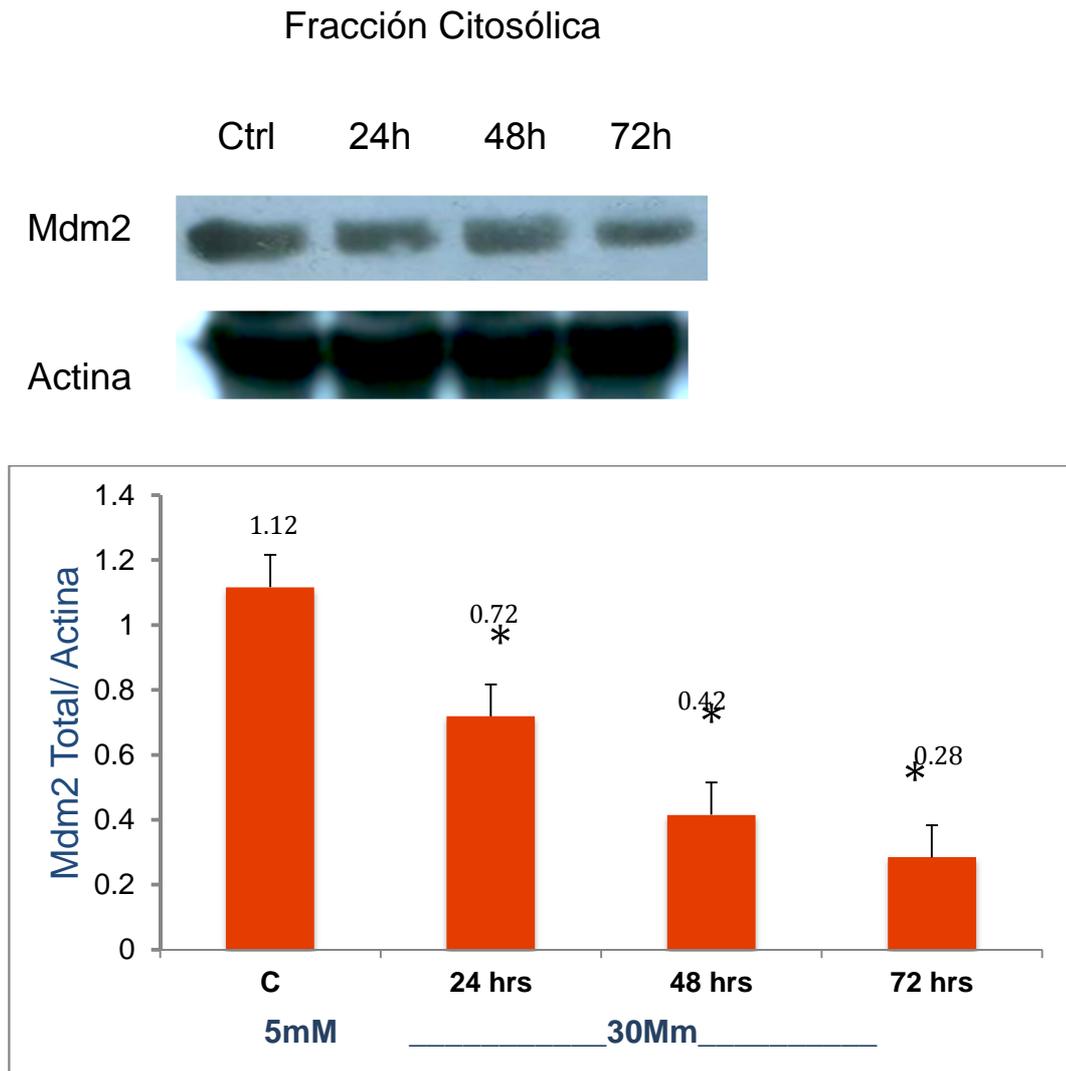


Figura 29. Efecto de la glucosa (5 ó 30 mM) sobre Mdm2 total en la fracción citosólica. Western blot y análisis densitométrico de Mdm2 en la fracción citosólica de células RINm5F cultivadas con 5 ó 30 mM de glucosa durante 24, 48 y 72 h. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. ANOVA; * p 0.05 vs Control.

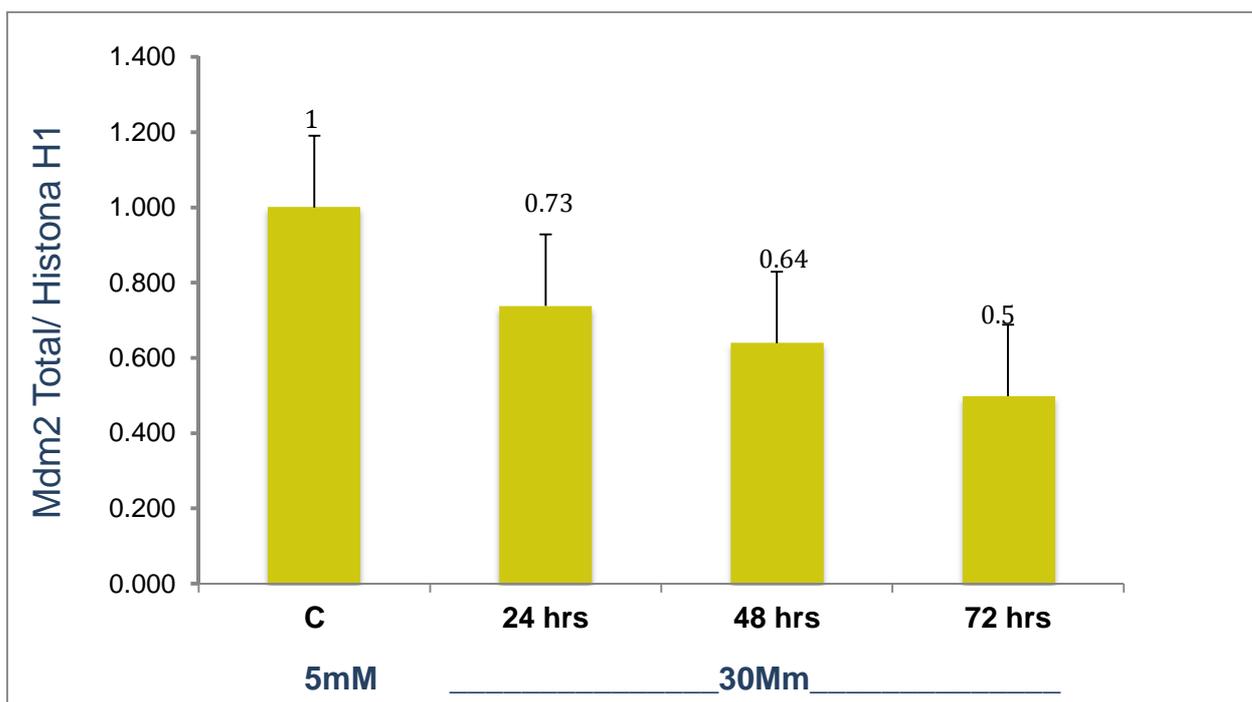
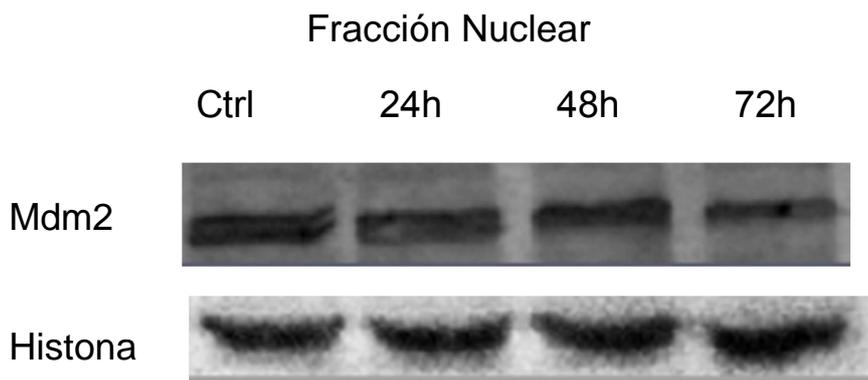


Figura 30. Efecto de la glucosa (5 ó 30 mM) sobre Mdm2 total en la fracción nuclear. Western blot y análisis densitométrico de Mdm2 en la fracción nuclear de células RINm5F cultivadas con 5 ó 30 mM de glucosa durante 24, 48 y 72 h. Los valores representan el promedio \pm de 3 experimentos independientes.

4. Las concentraciones altas de glucosa inducen la fosforilación de ser 166 de MDM2 en células RINm5F.

Con el propósito de saber si el estrés generado por altas concentraciones de glucosa (30 mM), tienen algún efecto sobre la fosforilación del residuo Ser166 se llevó a cabo el análisis por Western blot. Los resultados obtenidos muestran que en la fracción citosólica de las células RINm5F, la fosforilación de Ser166 se incrementa significativamente ($P < 0.05$) a partir de 24 horas siendo más evidente a las 72 horas de tratamiento. En la fracción nuclear no se observaron diferencias significativas en la fosforilación de Mdm2 (Figura **31** y **32**).

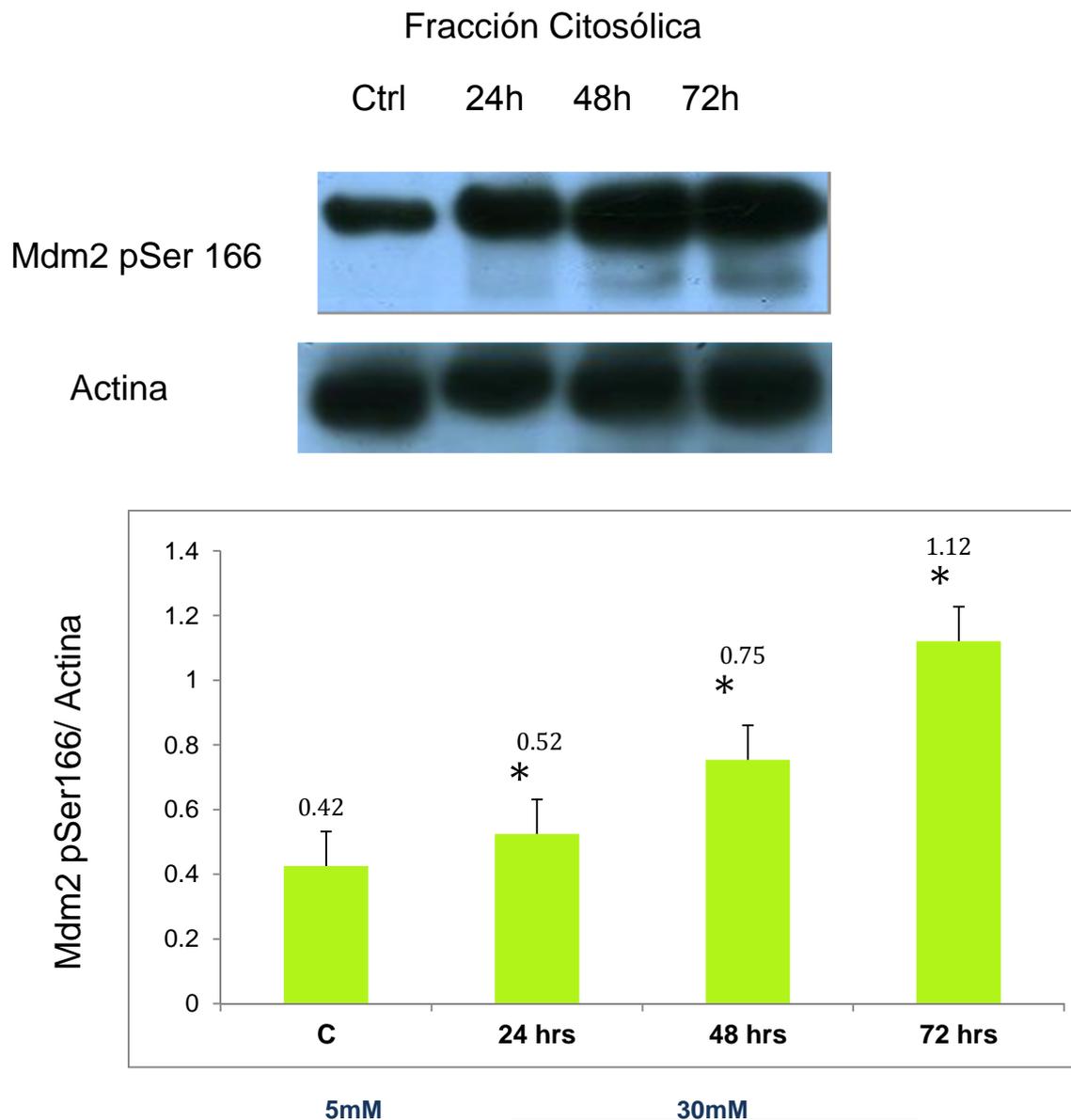


Figura 31. Efecto de la glucosa sobre la fosforilación de Mdm2 en la fracción citosólica. Western blot y análisis densitométrico de la fosforilación en serina 166 de Mdm2 en la fracción citosólica de células RINm5F cultivadas con 5 ó 30 mM de glucosa durante 24, 48 y 72 h. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. ANOVA; * p 0.05 vs C, 24 and 48h.

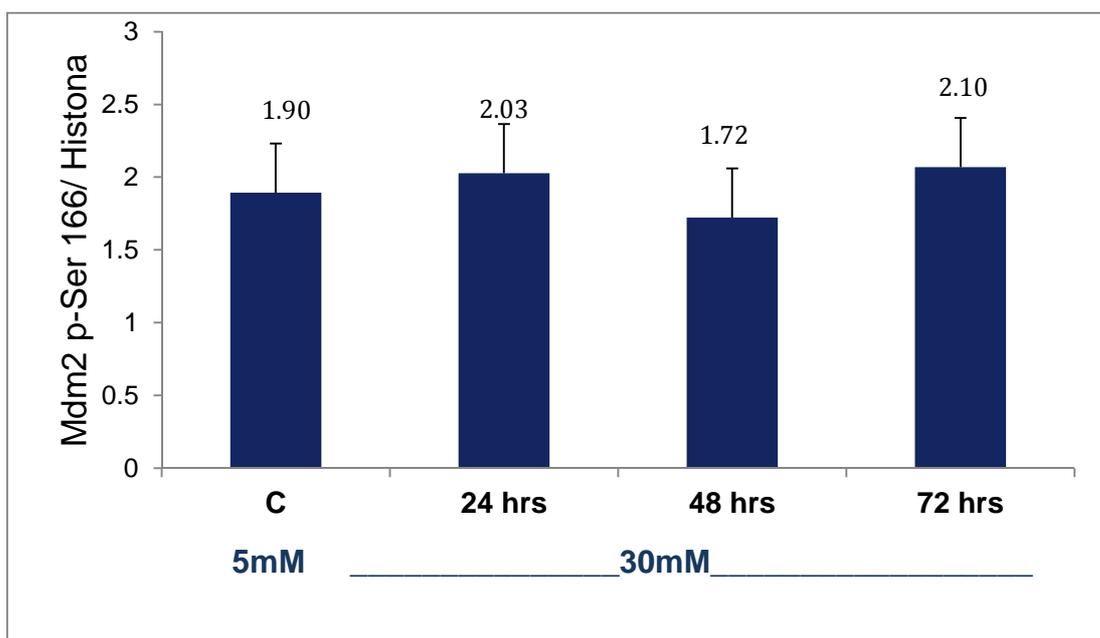
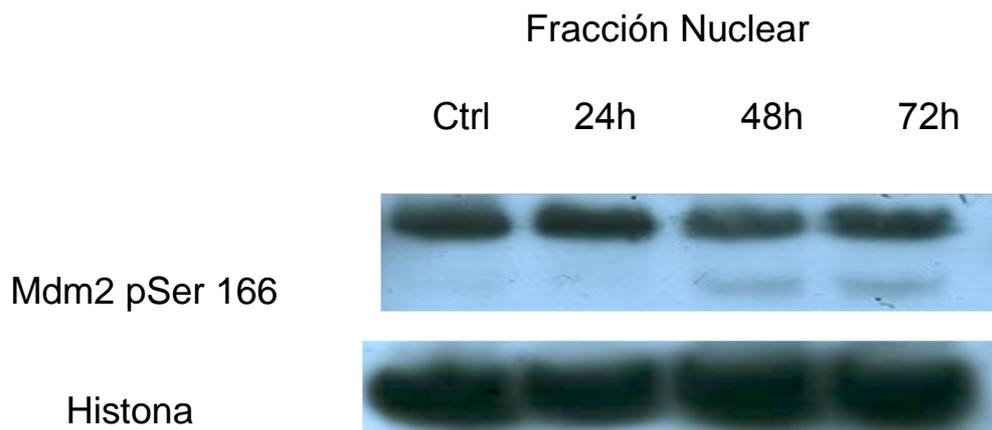


Figura 32. Efecto de la glucosa sobre la fosforilación de Mdm2. Western blot y análisis densitométrico de la fosforilación en serina 166 de Mdm2 en la fracción nuclear de células RINm5F cultivadas con 5 ó 30 mM de glucosa durante 24, 48 y 72 h. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

5. Relación entre Mdm2 total y Mdm2 pSer 166

Una vez obtenidos los datos de los análisis de Western blot del efecto de las altas concentraciones de glucosa sobre la concentración de Mdm2 total y de la fosforilación de Mdm2 en el residuo de serina 166, se obtuvo el cociente de la relación Mdm2 pSer166/ Mdm2 total de las fracciones citosólicas y nucleares. En la fracción citosólica se observa un aumento de la fosforilación a las 48 horas y esta se incrementa de forma significativa a las 72 horas con alta glucosa (30 mM) con respecto al control (5mM) ($P < 0.01$). En cuanto a la fracción nuclear, el incremento en la fosforilación no fue estadísticamente significativo en ninguno de los tiempos estudiados (Figura 33 y 34).

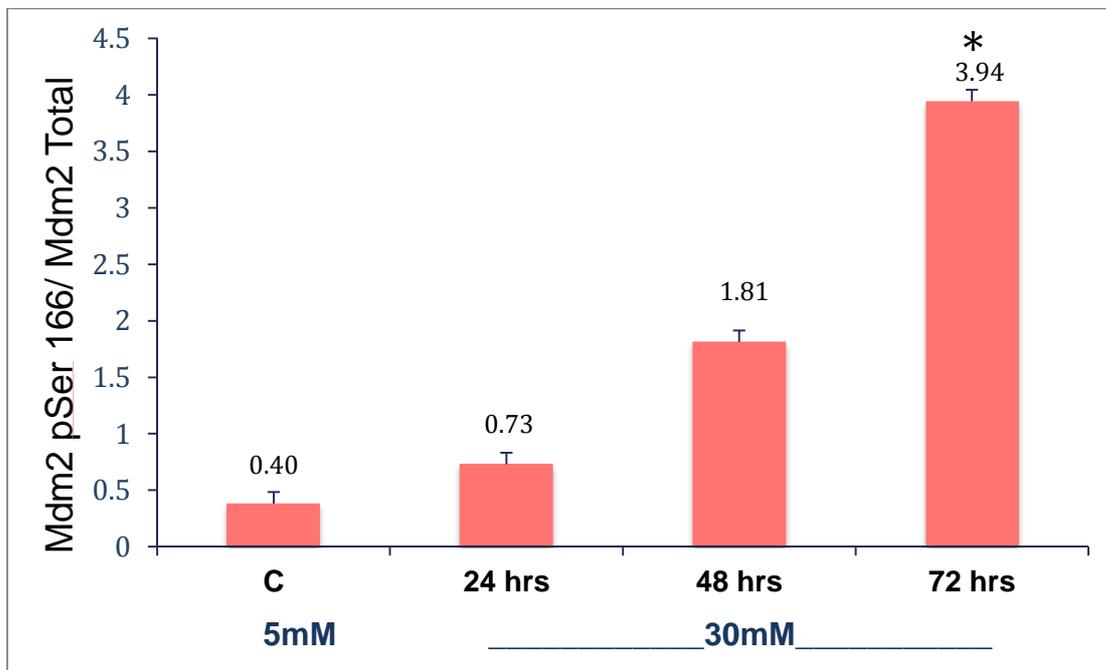
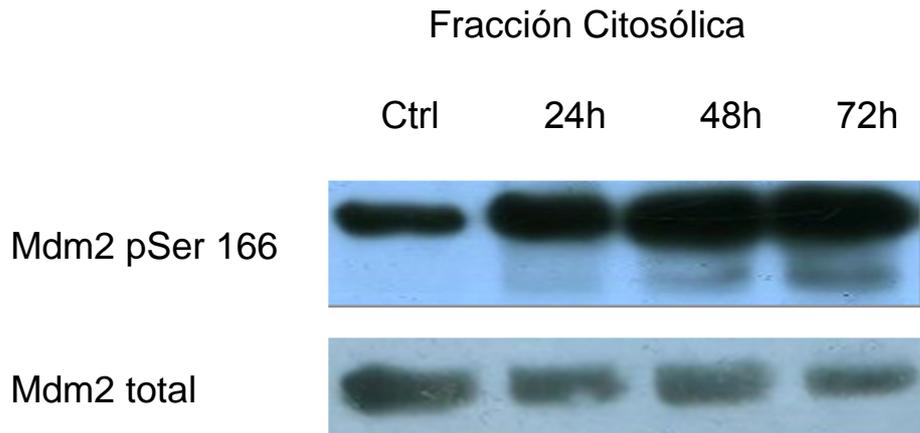


Figura 33. Relación entre Mdm2 fosforilada y Mdm2 total de la fracción citosólica.

Western blot y Análisis densitométrico de la relación Mdm2 fosforilada en serina 166 y Mdm2 total de la fracción citosólica de células RINm5F cultivadas con 5 ó 30 mM de glucosa durante 24, 48 y 72 h. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. ANOVA; * p 0.05 vs C, 24 and 48.

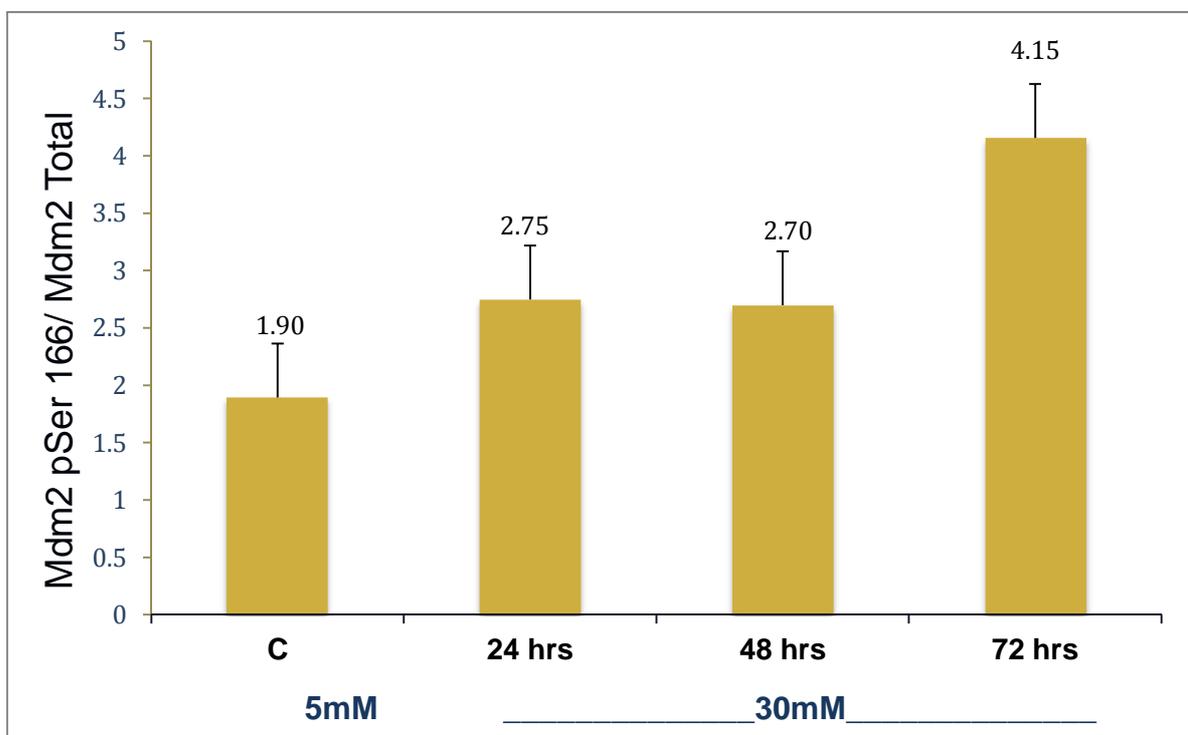
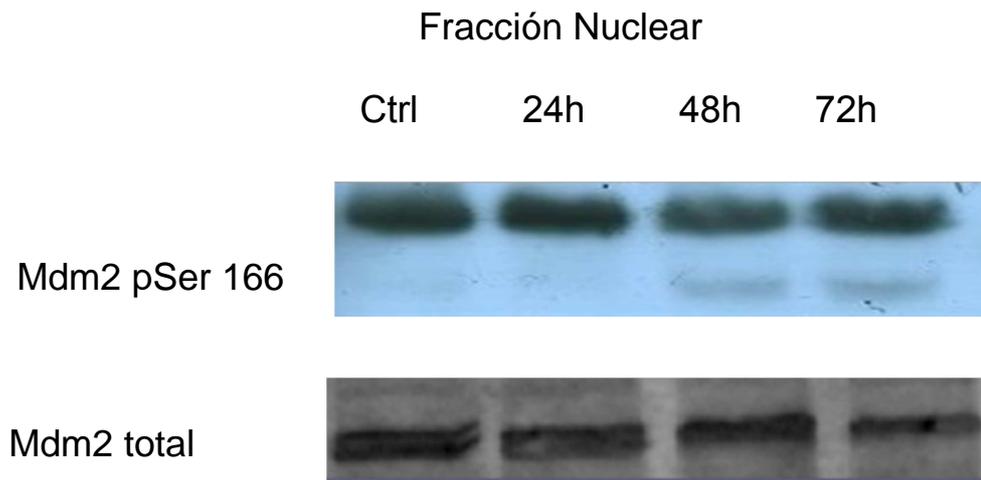


Figura 34. Relación entre Mdm2 fosforilada y Mdm2 total de la fracción nuclear. Western blot y análisis densitométrico de la relación de Mdm2 fosforilada en serina 166 y Mdm2 total de la fracción nuclear de células RINm5F cultivadas con 5 ó 30 mM de glucosa. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes.

6. Efecto de las concentraciones altas de glucosa sobre la distribución intracelular de Mdm2.

El resultado del análisis de la distribución intracelular de Mdm2 en células RINm5F cultivadas con alta glucosa y a diferentes tiempos, se observa en la figura 41. La presencia de Mdm2 en el citoplasma incrementa a las 24 y 48 h con respecto al control. A las 72 h se observó una reducción de la presencia de Mdm2 en el citoplasma. Este evento no se observó en las células cultivadas con 5 mM de glucosa (Figura 35).

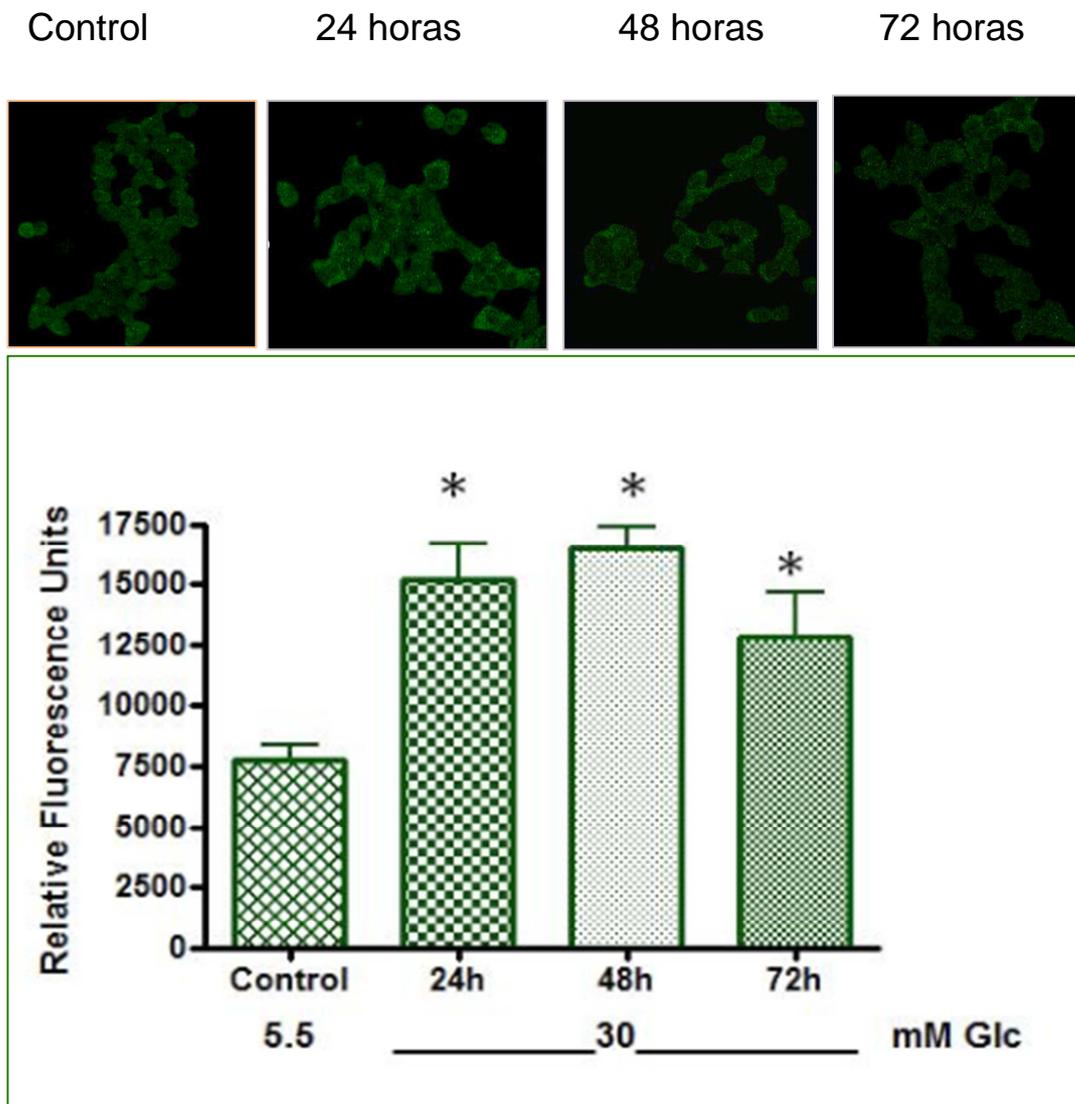


Figura 35. Efecto de la glucosa sobre la distribución de Mdm2. Análisis de la distribución intracelular de Mdm2 por inmunofluorescencia en células RINm5F cultivadas con 5 ó 30 mM de glucosa durante 24, 48 y 72 h. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. ANOVA; * p 0.05 vs Control.

7. Análisis de inmunoprecipitación de p53 contra Mdm2.

Con el propósito de saber si las altas concentraciones de glucosa (30 mM) afectan la interacción entre p53 y Mdm2, realizamos un estudio por inmunoprecipitación de estas proteínas. Los resultados muestran que en la fracción citosólica a partir de 24 horas de tratamiento con 30mM de glucosa, hay un incremento de la interacción de p53 con Mdm2 con respecto al control y se hace más evidente a 48 h, sin embargo es hasta las 72 horas que es estadísticamente significativo ($P < 0.05$) (Figura 37). En la fracción nuclear se observa un aumento de la interacción de p53 con Mdm2 con respecto a su control (5mM), sin embargo este efecto se reduce a las 48 y 72 horas de tratamiento, estos resultados no poseen relevancia significativa (Figura **36** y **37**)

Fracción Citosólica

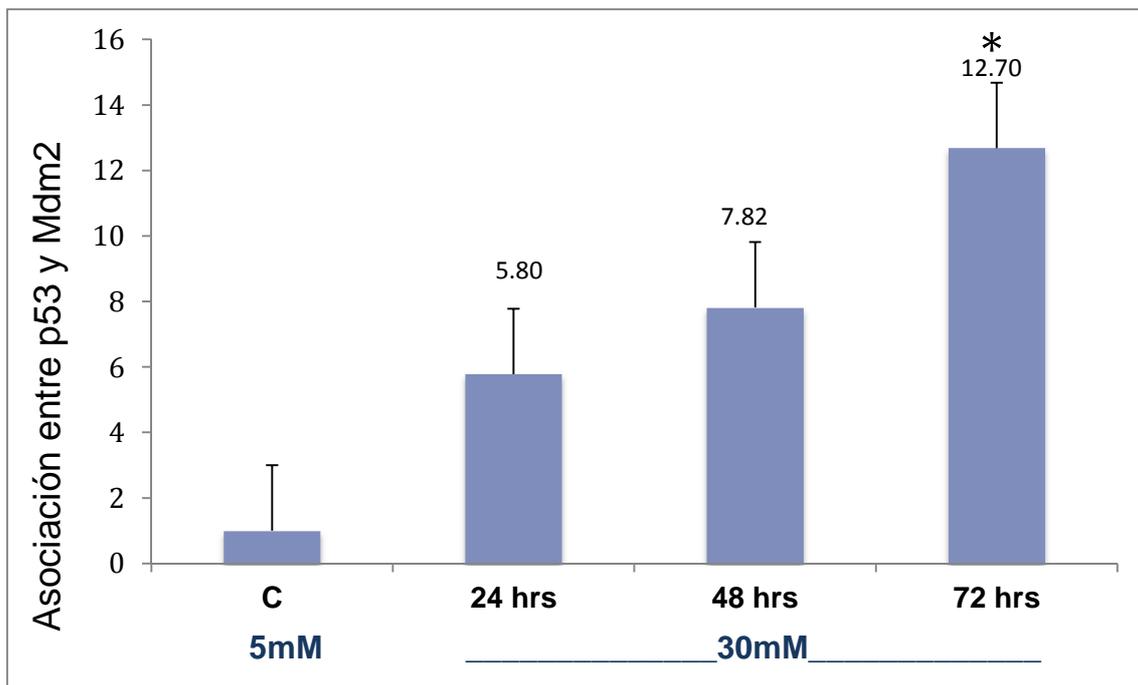
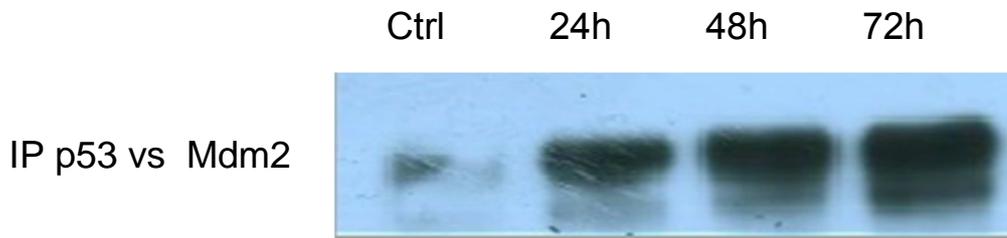


Figura 36. Efecto de la glucosa sobre la asociación entre p53 y Mdm2 de la fracción citosólica. Inmunoprecipitación (IP) de p53 y western blot con Mdm2 en la fracción citosólica de células RINm5F cultivadas con 5 ó 30 mM de glucosa durante 24, 48 y 72 h. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. ANOVA; * p 0.05 vs C, 24 y 48h.

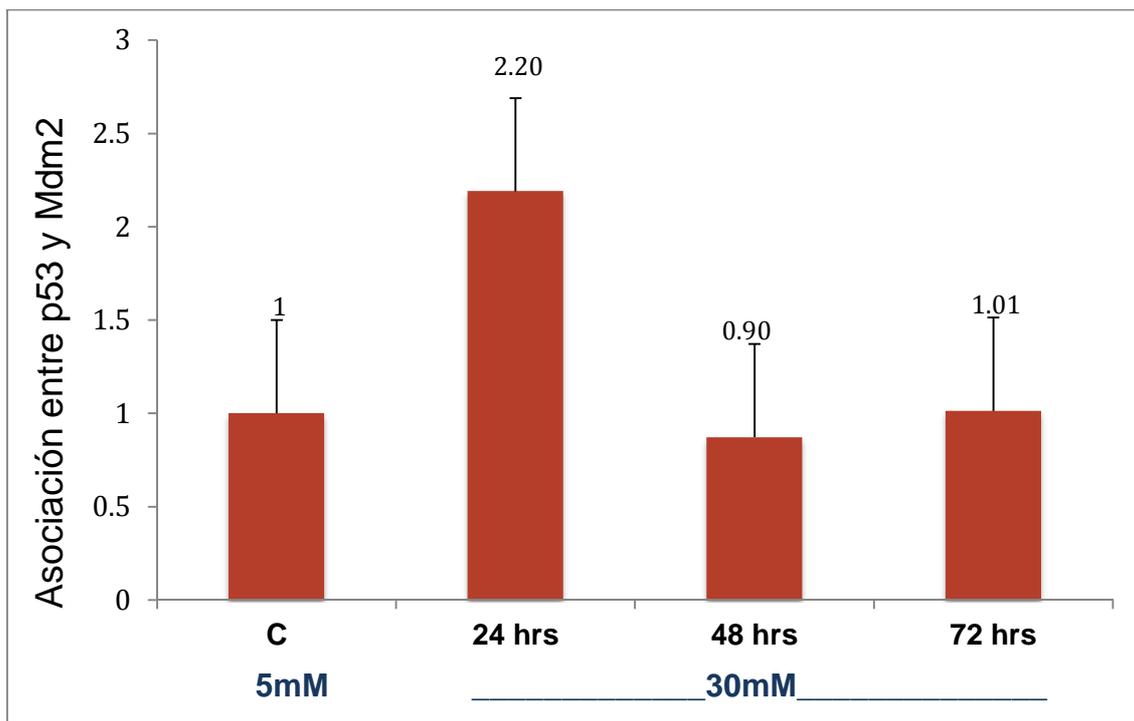
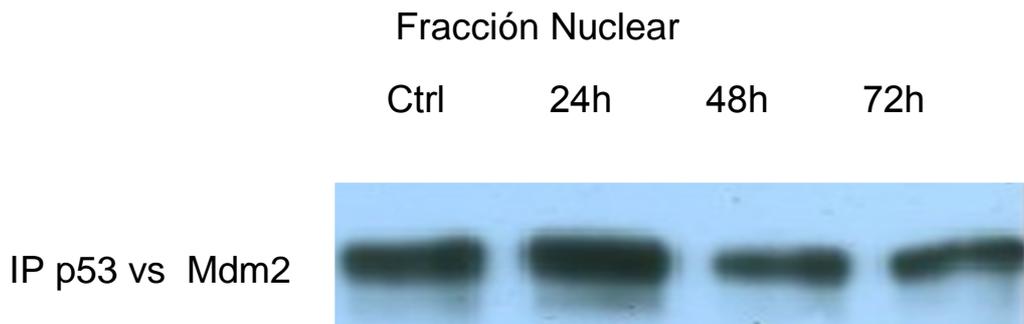


Figura 37. Efecto de la glucosa sobre la asociación entre p53 y Mdm2 de la fracción nuclear. Inmunoprecipitación (IP) de p53 y western blot con Mdm2 en la fracción nuclear de células RINm5F cultivadas con 5 ó 30 mM de glucosa durante 24, 48 y 72 h. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos.

8. Las concentraciones altas de glucosa inhiben la ubiquitinación de p53.

La función de MDM2 es ubiquitinar a p53, por lo que después de analizar la interacción de p53 con MDM2, quisimos comprobar que MDM2 estuviera adicionando ubiquitina a p53. Con este propósito realizamos la inmunoprecipitación de p53 y el western blot se reveló con un anticuerpo contra ubiquitina y para determinar si el tiempo tenía algún efecto sobre la ubiquitinación de p53, realizamos el estudio a tiempos más cortos. En la fracción citosólica se observó que a partir de 4 y 6 horas de tratamiento con 30mM de glucosa la interacción entre p53 y ubiquitina disminuye con respecto al control, a partir de 8 h la señal se pierde completamente ($P < 0.05$). Un comportamiento similar se observó en la fracción nuclear, sin embargo la señal persistió hasta las 16 h tiempo a partir del cual se inhibe la interacción entre p53 y ubiquitina, siendo significativos estos datos (Figura **38** y **39**)

Fracción Citosólica

Ctrl 2h 4h 8h 16h 24h 48h 72h

IP p53 vs
Ubiquitina

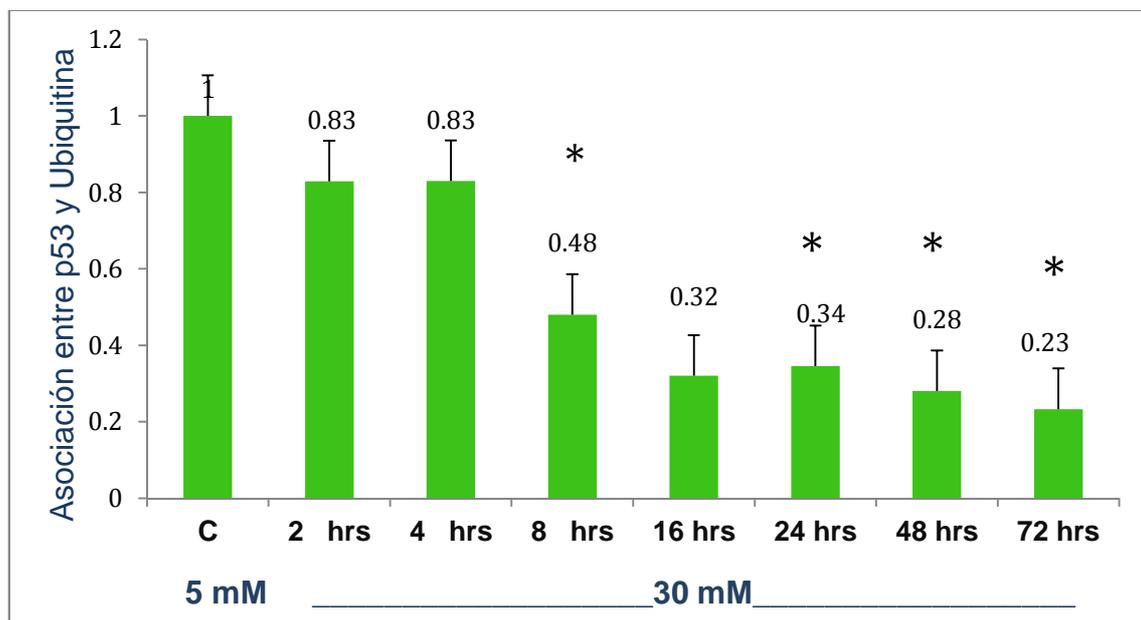
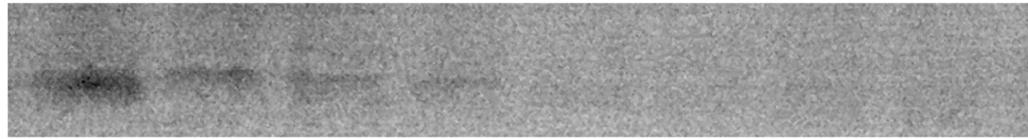


Figura 38. Efecto de la glucosa sobre la ubiquitinación de p53 en la fracción citosólica. Inmunoprecipitación (IP) de p53 y western blot con ubiquitina en la fracción citosólica de células RINm5F cultivadas con 5 ó 30 mM de glucosa durante 2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 h. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos. ANOVA; * p 0.05 vs C, 2 y 4 horas.

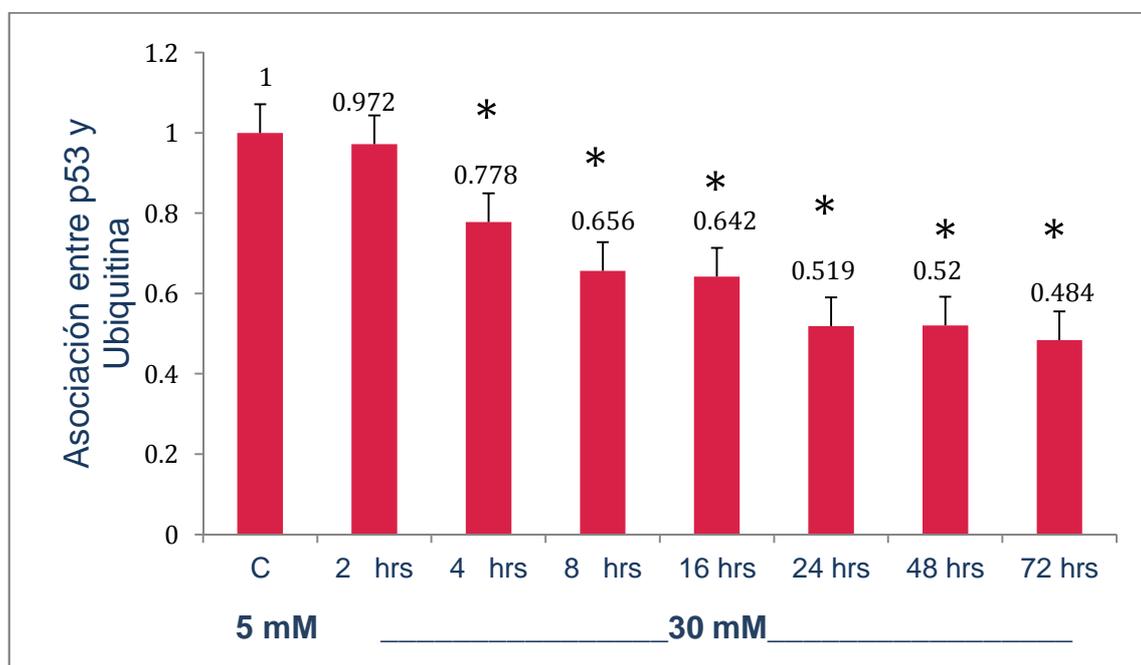
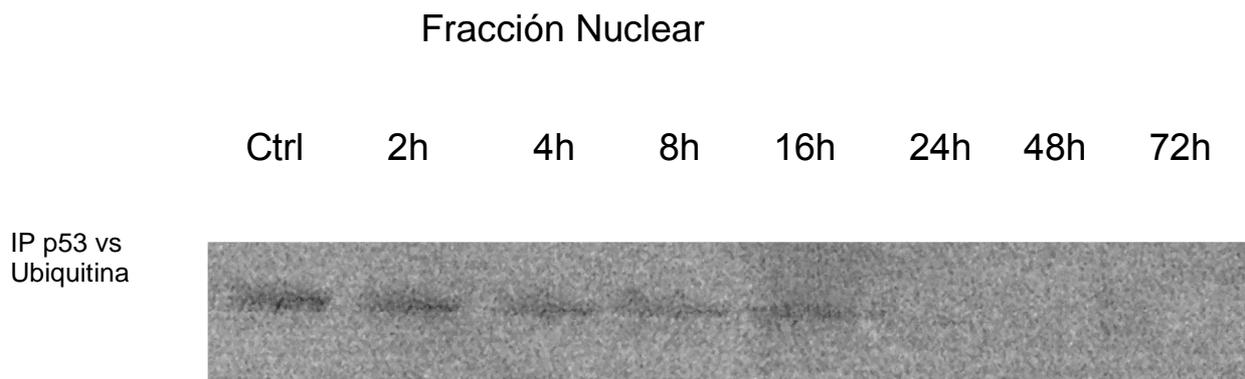


Figura 39. Efecto de la glucosa sobre la ubiquitinación de p53 en la fracción nuclear. Inmunoprecipitación (IP) de p53 y western blot con ubiquitina en la fracción nuclear de células RINm5F cultivadas con 5 ó 30 mM de glucosa durante 2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 h. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos. ANOVA; * p 0.05 vs C y 2 horas.

XI. Discusión

En el páncreas se localizan los islotes de Langerhans constituidos principalmente por las células β , las cuales se encargan de sintetizar y secretar insulina en respuesta a la glucosa que circula en el torrente sanguíneo. Así mismo las células β tienen la particularidad de responder a pequeños cambios en la concentración de glucosa y adaptar la secreción de insulina. Sin embargo, durante el desarrollo del síndrome metabólico, resistencia a la insulina, obesidad y diabetes mellitus tipo 2, las células β incrementan la secreción de la insulina, lo que conduce a un estado de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. Con el tiempo el estímulo constante sobre las células β , conduce al deterioro progresivo de la masa celular y disminución de la síntesis y secreción de insulina, lo que conduce a un estado de hiperglucemia crónica. La hiperglucemia genera la activación de los mecanismos que incrementan la tasa de apoptosis de las células β . Hay estudios que proponen que el efecto de la hiperglucemia sobre las células β depende del tiempo de exposición y del acervo genético de estas células. A pesar de que existe el debate sobre los efectos de la hiperglucemia sobre la proliferación y la apoptosis de las células β pancreáticas, se tienen las suficientes evidencias en las que el estado de hiperglucemia crónica dañan la función de las células β e inducen la muerte por apoptosis (Roche, 2003). Butler *et al*, (2003) reportó que la masa de las células β estaba reducida en personas obesas y delgadas que presentaban diabetes tipo 2 en comparación con personas no diabéticas. Otros estudios han demostrado que esta disminución en la masa de células β pancreáticas también se presenta en personas con alteraciones de la glucosa en el ayuno, lo que trataría de explicar a la apoptosis de la célula β como un evento temprano en el desarrollo de DT2 (Giorgino *et al*, 2005). Por lo tanto, la reducción en el número de las células β pancreáticas durante los estados de hiperglucemia se producen por mecanismos apoptóticos. No obstante aun con todas las investigaciones hechas hasta la actualidad, el mecanismo exacto por el cual la hiperglucemia interviene como inductor de la muerte apoptótica de las células β continúa desconocido.

Por otra parte cuando los niveles de ERO exceden la capacidad antioxidante de las células β , se produce “estrés oxidante”, que provoca la destrucción de los componentes celulares así como de la mayoría de las

biomoléculas esenciales. Estos eventos contribuyen al desarrollo y progresión de la diabetes. La estrecha relación entre hiperglucemia, sus complicaciones, y el estrés oxidante se ha demostrado en pacientes diabéticos (Ceriello 1997; Evans 2002).

Además se sabe que las células β son particularmente susceptibles a los daños provocados por estrés oxidativo. La exposición *in vivo* de células β a un ambiente oxidante generado por hiperglucemia crónica, resulta en la disrupción de la función mitocondrial. El tratamiento con alta glucosa de células RINm5F incrementa el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial y la producción de ERO que pueden inducir daño al DNA de estas células (Ortega *et al.*, 2006). Otro estudio realizado por Dypbukt *et al* (1994), con células RINm5F expuestas a dimetoxinaftoquinona (DMNQ), un inductor de anión superóxido, demostró que a concentraciones de 10 μ M, estimulaba su proliferación pero al aumentar la concentración (30 μ M), provocaba apoptosis. Se sabe que las endonucleasas responsables de la fragmentación oligonucleosomal del DNA son dependientes de ERO. Estos estudios están de acuerdo con nuestros datos, donde observamos que las células cultivadas por periodos largos (24 a 72 horas) con una concentración alta de glucosa (30mM) presentan fragmentación de su DNA y muerte por apoptosis.

Como se mencionó previamente, la mitocondria tiene un papel clave en la apoptosis, debido a que almacena en su espacio intermembranal activadores y efectores de muerte celular. Durante la fase de ejecución, debido a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la alteración del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$). Además se puede observar la translocación de proteínas de señalización y moléculas efectoras entre núcleo, citoplasma y la mitocondria, entre ellas Bax (Zong *et al.*, 2001), AIF (Susini *et al.*, 1999) y endonucleasa G (Wang, 2001). La movilización de proteínas proapoptóticas hacia la mitocondria promueve la disfunción de este organelo. Dentro de las proteínas proapoptóticas que se trasladan hacia la mitocondria y que inducen su disfunción se encuentra: p53 (Moll y Zaika 2001), que interacciona con BclXL (miembro de la familia Bcl2) y promueve la liberación de los factores proteicos pro apoptóticos como citocromo c, factor inductor de apoptosis (AIF) y Smac/diablo hacia el citosol (Mihara *et al* 2003). La participación de p53 en la apoptosis de miocitos cultivados con altas concentraciones de glucosa fue

propuesta por Fiordaliso *et al* (2001). Keim *et al* 2001 también presentó que las altas concentraciones de glucosa inducían la expresión de p53 iniciando la cascada apoptótica por medio de la activación de Bax en blastocitos de ratón. Ortega *et al* 2006, demostró que el estrés oxidante producido por hiperglucemia desencadenaba el mecanismo de inducción de la apoptosis de las células β pancreáticas a través de la movilización de la proteína p53 desde el citosol hasta la mitocondria aunado a cambios asociados al potencial de membrana mitocondrial.

La expresión de p53 también se induce por estrés oxidante (Chen *et al.*, 1998) y esta proteína puede inducir la producción de ERO (Hussain *et al.*, 2004) a través de la activación de genes relacionados con el metabolismo de estos radicales (Polyak *et al.*, 1999; Macip *et al.*, 2003). La diabetes al generar estrés oxidante suprime la degradación de p53 permitiendo su acumulación y un incremento anormal de la apoptosis celular en tejidos normales afectando negativamente la salud.

La cantidad de proteína p53 en las células esta determinada principalmente por la velocidad a la que se degrada, en lugar de la velocidad a la que se produce. La vía más común para la degradación de p53 es la ruta ubiquitina-26S proteosoma (Kruse JP y Gu W, 2009). La proteína Mdm2 es una de las enzimas implicadas en el marcaje de p53 con ubiquitinas. Esto es un proceso de retroalimentación negativa, la proteína p53 se une a la región reguladora del gen *Mdm2* y estimula la transcripción de este gen en RNA mensajero, que luego se traduce en la proteína Mdm2 que se une a p53 y estimula la incorporación de los grupos de ubiquitina al carboxilo terminal de p53, que a continuación es degradada. Esto disminuye la concentración de p53 y reduce la transcripción del gen de Mdm2, cerrando el bucle de retroalimentación y permitiendo que los niveles de p53 aumenten de nuevo (Ito A., *et al.*, 2001). En nuestro estudio el análisis de qPCR reveló que en las células RINm5F tratadas con alta glucosa (30 mM) la expresión de Mdm2 disminuye significativamente a partir de las 8 horas y continúa hasta las 72 horas de tratamiento., lo que nos permite demostrar que el efecto hiperglucémico tiene un resultado negativo a nivel transcripcional sobre la función reguladora de Mdm2. En trabajos previos se ha descrito que en la región amino de p53, los residuos de leucina 22 y triptófano 23 son críticos para la regulación transcripcional de Mdm2, por lo que

tampoco podría descartarse que las condiciones de alta glucosa estuvieran alterando la unión de estos aminoácidos afectando la transcripción de Mdm2 (Lin *et al.*, 1994; Kussie *et al.*, 1996)

En este trabajo exponemos que la función de proteínas con función de ubiquitina-ligasa como Mdm2 está alterada como consecuencia del tratamiento con alta glucosa. En primer lugar se observa que la concentración total de esta proteína dentro de la fracción citoplasmática se reduce a partir de 24 h de tratamiento y este decremento se hizo más notable a las 72 horas. Cabe señalar que la exportación nuclear de p53 es importante para su degradación por Mdm2. El tránsito continuo de Mdm2 entre el núcleo y citoplasma es esencial para promover la degradación de p53, debido a que Mdm2 debe exportar a p53 del núcleo al citoplasma, y así dirigirlo al proteosoma 26s (Weikang y Levine, 1999).

Se ha sugerido que la acumulación sostenida de las proteínas con modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, acetilación, ribosilación, ubiquitinación, sumoilación y glucosilación causan la apoptosis de las células β (Kruse y Gu, 2009). Reportes preliminares indican que Mdm2 se fosforila en respuesta a tratamientos con agentes nocivos para el DNA, y esta fosforilación inhibe el reconocimiento de anticuerpos monoclonales específicos, dando la impresión de que los niveles de Mdm2 están reducidos (Inoue *et al.*, 2001). En este trabajo presentamos que la disminución de Mdm2 en citoplasma está ligada al incremento de la fragmentación del DNA de las células RINm5F. Se sabe que en células con DNA dañado la vida media de Mdm2 esta reducida, por lo que es poco probable que la interacción entre Mdm2 y p53 ocurra, ya que bajo condiciones dañinas Mdm2 puede pasar la mayor parte de su existencia en procesos relacionados con su propia ubiquitinación y degradación regulada por el proteosoma (Stommel y Geoffrey., 2004). Como se señaló anteriormente el daño provocado por el tratamiento con alta glucosa afecto negativamente el DNA, además de reducir la vida de Mdm2 al producir su propia degradación. La desestabilización de Mdm2 en células que presentan daños en el DNA, requiere de su propia actividad de ubiquitina ligasa. Mdm2 es de las ubiquitinas E3 ligasas que catalizan la ubiquitinación tanto de sus sustratos como de ellas mismas (Fang *et al.*, 2000; Honda y Yasuda, 2000). Debido a que estas enzimas regulan su propia degradación, tienen que existir los mecanismos que atenúan

esta función, para asegurar que las ubiquitinas E3 de vida corta sean lo suficientemente estables para garantizar el acceso a sus sustratos.

Cuando Mdm2 se encuentra en bajas concentraciones, su actividad de E3 ligasa cataliza la monoubiquitinación de p53. La monoubiquitinación favorece la exportación nuclear de p53. En cambio, si p53 es poliubiquitinada se degrada por el proteosoma en ausencia de estrés celular (Shi y Gu., 2012). Es claro que el estrés generado por las condiciones altas de glucosa disminuyó la concentración de Mdm2 en las células RINm5F, favoreciendo la monoubiquitinación de p53 para su exportación nuclear y así intervenir en la cascada de muerte apoptótica intrínseca en lugar de ser poliubiquitinada para su posterior degradación.

No obstante en este trabajo observamos que no toda Mdm2 se degradó por el tratamiento con alta glucosa, y la cantidad de proteína restante se fosforiló en el residuo de serina 166 de forma dependiente al tiempo. Se sabe que el estrés oxidante induce la fosforilación en serina 166, lo que subsecuentemente aumenta su actividad de ubiquitina E3 ligasa y la degradación de p53 (Malmlöf *et al.*, 2007; Al-Anati *et al.*, 2009). Sin embargo, lo que se observa es que las condiciones de alta glucosa alteran la función de Mdm2 como regulador de p53. Se sugiere en este trabajo que la fracción de Mdm2 que resistió a la degradación, fue usada por las células RINm5F para activar otras vías importantes de sobrevivencia, que derivaron en la fosforilación del residuo de serina 166 en Mdm2, sin embargo estas fueron abatidas por el probable rol dominante de p53, volviéndolas ineficientes para protegerse de la muerte apoptótica. Consideramos que la activación de la porción que quedó de Mdm2 es resultado del estrés generado por las condiciones hiperglucémicas, puesto que las células RINm5F por medio de las vías de supervivencia pretenden mantener la homeostasis celular y tratan de contrarrestar o inhibir la cascada de muerte apoptótica, como resultado se produce la fosforilación de Mdm2 en serina 166. En la región amino terminal de Mdm2 se encuentran los residuos de serina 166 y 186, así como las secuencias de localización y exportación nuclear. La fosforilación de Mdm2 en estos residuos es necesaria para inducir un cambio conformacional, que exhibe la secuencia de localización nuclear y permitir la entrada de Mdm2 al núcleo, además de exponer el sitio de unión a p53. En este trabajo observamos, mediante ensayos de inmunoprecipitación, que Mdm2,

además de ser fosforilado, también interaccionó con p53 en la fracción nuclear de las células RINm5F. El tratamiento hiperglucémico de las células RINm5F provocó que la tasa de asociación entre Mdm2 y p53, se incrementaran a las 24 horas, sin embargo esta asociación disminuyó a las 48 y 72 horas. Es probable que las condiciones de alta glucosa alteren la interacción entre ambas proteínas, y permitan que p53 salga hacia el citoplasma para iniciar el mecanismo de apoptosis. Del mismo modo, se observa en la fracción citosólica la asociación de estas dos proteínas, la cual es dependiente del tiempo y la concentración de glucosa, sin embargo la muerte de las células RINm5F continuaba produciéndose. Estos resultados confirman que las condiciones de alta glucosa afectan de manera negativa la función ubiquitina ligasa de Mdm2, pues la asociación entre Mdm2 y p53 es defectuosa, alterando la degradación de p53 que produce el mecanismo de muerte por apoptosis. Pero por otra parte estos resultados, abren la posibilidad de demostrar que la hiperglucemia produce fosforilaciones con efecto negativo sobre la función de Mdm2. Varios estudios han observado que múltiples factores de estrés pueden reducir los niveles de Mdm2 mediante mecanismos post-transcripcionales resultando en el incremento de los niveles de p53 (Alarcón *et al*, 1999; Ashcroft *et al*, 2000; Inoue *et al*, 2001; Wang *et al*, 2002), un ejemplo es el efecto negativo de la fosforilación sobre la función de Mdm2 como ubiquitina E3 ligasa .

Las proteínas poliubiquitinadas son blanco para el proteosoma 26S ya que las cadenas de poliubiquitinas dirigen a las proteínas al proteosoma para iniciar el proceso de degradación. Sin embargo la poliubiquitinación de p53, no es suficiente para producir su eliminación. A pesar de que Mdm2 se una con p53, esta interacción no es suficiente, pues el mecanismo para que p53 sea poliubiquitinada depende de otros dominios que componen a Mdm2. Se ha reportado que la desestabilización de Mdm2 es mediante la fosforilación en múltiples sitios localizados en otros dominios de la estructura de Mdm2 (Michael y Oren, 2003; Stommel y Geoffrey., 2004; Kulikov *et al*, 2010).

La existencia de un mecanismo por el cual Mdm2 es desestabilizado en condiciones de hiperglucemia, implicaría la existencia de un interruptor dependiente del estrés. Este interruptor podría estar dentro del dominio RING, este dominio se localiza en la región carboxilo terminal de Mdm2 y contiene secuencias consenso ricas en cisteínas que forman 2 sitios intercalados de

unión a zinc (Fang *et al.*, 2000). La estructura del dominio RING reúne al sitio activo de E2 y al aceptor de lisinas del sustrato. Las mutaciones en los residuos claves de cisteína que comprenden los sitios de unión a zinc anula la actividad intrínseca de ubiquitina E3 ligasa de Mdm2, por lo tanto la función de ubiquitina de Mdm2 es dependiente del dominio RING localizado en la región carboxilo terminal. Ranaweera y Yang (2013) expusieron que el dominio de RING de Mdm2 es el regulador maestro de p53, debido a que este dominio etiqueta a p53 para su degradación proteosómica, restringiendo su actividad potencial y permitiendo la sobrevivencia y proliferación celular.

En investigaciones recientes se han identificado diversos sitios de fosforilación cerca del dominio RING de Mdm2 y han demostrado que después de bloquearlos se generan un Mdm2 constitutivamente muy activo que pudo prevenir la estabilización de p53 después del daño al DNA (Cheng *et al.*, 2011). En nuestro trabajo observamos que las condiciones hiperglucémicas probablemente pudieron inducir la fosforilación sobre el dominio RING de Mdm2 y evitar la ubiquitinación de p53. Cheng *et al.* (2009), demostró que en ausencia de estrés, el dominio RING de Mdm2 forma dímeros u oligómeros que reclutan múltiples moléculas de E2. Este proceso incrementa la capacidad de procesamiento de la reacción de elongación de la cadena de ubiquitina, resultando en la poliubiquitinación y degradación de p53. De esta forma el estrés generado por el tratamiento con alta glucosa pudo fosforilar a Mdm2 anulando su capacidad para poliubiquitinar a p53, al prevenir la oligomerización del dominio RING de Mdm2.

Nuestros resultados nos permiten sugerir que si las concentraciones altas de glucosa afectaron de forma negativa al dominio RING de Mdm2 también pudieron alterar al Dominio Central Ácido de Mdm2. Este dominio también presenta múltiples sitios de fosforilación ricos en serinas que son modificados constitutivamente en ausencia de estrés pero suprimidas por daño al DNA. Se ha observado que en mutaciones en los sitios de fosforilación del dominio central ácido inhibe la degradación de p53 sin anular su ubiquitinación (Inuzuka *et al.*, 2010). Así mismo en estudios recientes se ha demostrado que los sitios de fosforilación del dominio central ácido de Mdm2 interaccionan con la subunidad reguladora 19S del proteosoma, permitiendo que Mdm2 libere a p53 ubiquitinada para su degradación por el proteosoma (Kulikov *et al.*, 2005). Por lo tanto el

dominio central asiste a la poliubiquitinación de p53, pero si el estrés producido por las condiciones hiperglucémicas dañaron al DNA, es muy probable que los sitios de fosforilación de este dominio hayan sido suprimidos impidiendo la poliubiquitinación y degradación de p53.

La ubiquitina es una pequeña proteína que aparece naturalmente en células eucariontes. Su función es marcar otras proteínas para su destrucción. Este proceso se conoce como proteólisis. Varias moléculas de ubiquitina se anclan a la proteína que van a eliminar para dirigirla hacia el proteosoma. Diversos estados patológicos están asociados con aberraciones del mecanismo de ubiquitinación, y se clasifican en 2 categorías: (a) los que resultan de la degradación acelerada de la proteína blanco y (b) los que resultan de la pérdida de la función de las enzimas del sistema ubiquitina-proteosoma. La diabetes tipo 2, podría clasificarse en esta última categoría ya que una hiperglucemia crónica podría alterar a las ubiquitinas en las células β . En nuestro estudio establecemos que la alta glucosa incapacita a la ubiquitina para anclarse a p53 y por lo tanto se produce la muerte apoptótica de las células RINm5F. Estudios recientes han descubierto que la ubiquitinación puede ser revertida por cisteínas proteasas desubiquitinadoras, las cuales regulan la actividad de proteínas específicas celulares mediante la escisión de la ubiquitina. Por ejemplo, se ha señalado que en cardiomiopatía dilatada humana, las concentraciones de p53 se encuentra elevadas y se asocia con desregulación de los componentes del sistema ubiquitina-proteosoma, debido a que p53 es rescatada de la ubiquitinación y la subsecuente degradación proteolítica, por alteraciones de las enzimas que componen al sistema ubiquitina-proteosoma (Birks *et al.*, 2008). Mediante el ensayo de inmunoprecipitación observamos que la interacción entre p53 y ubiquitinas fue disminuyendo en ambas fracciones (nuclear y citosólica) a partir de las 8 horas de tratamiento con alta glucosa hasta casi desaparecer a las 72 horas. En conjunto, estos resultados nos permiten demostrar que el efecto hiperglucémico es negativo no sólo para Mdm2 sino también para los componentes del sistema ubiquitina ligasa, en este caso nosotros presentamos que la interacción p53-ubiquitina disminuyó al incrementarse el tiempo de tratamiento con alta glucosa, probablemente porque el efecto hiperglucémico impidió el anclaje de ubiquitinas sobre p53. En condiciones de estrés en las células RINm5F, es probable que se acumulen proteínas que tenían que ser

degradadas como p53, debido a que las ubiquitinas encargadas de marcarla para su degradación, están incapacitadas para esta función, incrementando la susceptibilidad de las células RINm5F al mecanismo de muerte celular.

Se ha demostrado que el tratamiento con alta glucosa no altera la transcripción de p53 sino que su estabilización y movilidad depende de modificaciones post-traduccionales como las fosforilaciones que además de impedir su degradación incrementan su actividad biológica. Las fosforilaciones pueden afectar tanto a la región amino (se ha observado en el citosol que esta fosforilación ha sido relacionado con la transcripción de Bax) (Ito *et al.*, 2004; Lavin *et al.*, 2006) como la región carboxilo de p53 (relacionada con la tetramerización, unión al DNA, supresión tumoral y apoptosis) (Huang *et al.*, 1999; Hoogervorst *et al.*, 2006). Por los antecedentes anteriores, es probable que el tratamiento con alta glucosa provoque la fosforilación de residuos de lisina claves (localizados en la región carboxilo terminal), impidiendo el anclaje de las ubiquitinas sobre p53 y su reconocimiento por el proteosoma para su degradación e induzca la apoptosis de las células RINm5F. Sin embargo, no sólo la fosforilación que protegió a p53 de la ubiquitinación, es una vía para explicar la incapacidad de las ubiquitinas para ejercer su acción. Es importante señalar que la ubiquitinación es un mecanismo dependiente de ATP. En condiciones de hiperglucemia, el incremento de los niveles de ATP de las células β inducido por glucosa está suprimido debido al desacoplamiento mitocondrial y al mal funcionamiento de los canales K_{ATP} . Por lo tanto si hay un decremento de ATP, las ubiquitinas son incapaces de condensar los residuos de glicina de su región carboxilo terminal con los residuos de lisina de p53.

Por otra parte se ha demostrado que los efectos de la hiperglucemia sobre el sistema ubiquitina-proteosoma produce resultados contradictorios. Se ha reportado que los altos niveles de glucosa permiten una actividad acelerada del proteosoma mientras que otros señalan que su función se altera en patologías como diabetes y arteriosclerosis (Queisser *et al.*, 2010). El proteosoma 26S se compone de la subunidad catalítica 20S, la cual desempeña tres tipos de actividades proteolíticas: tripsina, quimiotripsina y peptidil glutamil con actividad parecida a la de caspasa. Además posee una o dos subunidades reguladoras 19S. Estas subunidades reguladoras controlan la entrada de las proteínas al núcleo catalítico de la subunidad 20S (Birks *et al.*, 2008). En nuestro

trabajo hipotetizamos que el sistema ubiquitina-proteosoma pudo estar abatido por las condiciones altas de glucosa, debido a la producción excesiva de proteínas aberrantes o citotóxicas que afectaron la capacidad degradativa del proteosoma, y por lo tanto impidieron la degradación de p53. Se ha reportado que la glicación de proteínas tiene un efecto inhibitorio sobre la ubiquitinación debido a que ambas modificaciones ocurren sobre los residuos de lisina. En investigaciones previas se han señalado que los productos de glicación avanzada (AGES, por sus siglas en inglés) influyen sobre la degradación proteolítica a través de la disminución de la actividad de catepsina, lo que sugiere que las AGEs afectan la proteólisis de proteínas. Las condiciones de hiperglucemia intracelulares activa la ruta del Metilglioxal, la cual está implicada en la patogénesis y complicaciones de la diabetes. Este reactivo forma aductos covalentes con residuos de lisina y arginina de proteínas, alterando su función. Es la principal fuente de productos finales de glicación avanzada intracelulares. La influencia del metilglioxal sobre la actividad del proteosoma se ha estudiado en células vasculares endoteliales, en ratones diabéticos Akita Ins2, ratones diabéticos inyectados con estreptozotocina (STZ) y ratones knockdown GLO1, donde se demostró que produce modificaciones covalentes en el proteosoma alterando su función, por ejemplo, disminuye la actividad de quimiotripsina del proteosoma y reduce los niveles de actividad del receptor de poliubiquitinas de la subunidad 19S (Queisser *et al.*, 2010).

En este trabajo se muestra que en las células RINm5F aumento la señal de localización de Mdm2 a partir de 24 h, misma que se incrementó de forma importante a las 48 h sin embargo a las 72 h se redujo ligeramente. La presencia de Mdm2 en el citosol coincidió con el incremento de la fosforilación de los residuos de serina 166 de la fracción citosólica, estos resultados confirman la existencia de una fracción de Mdm2 que resistió a la alteración de su estructura o degradación total producida por la alta glucosa. Este evento nos sugiere un intento de adaptación de las células RINm5F para mantener la homeostasis, probablemente a través de la fosforilación de serina 166 de Mdm2. No obstante la ubiquitinación de p53 por Mdm2 es deficiente, permitiendo que esta proteína tuviera libre movilización intracelular y activará las vías de muerte apoptóticas. Ortega *et al* (2003), demostró en esta misma línea celular que p53 se traslada a

la mitocondria a las 48 horas de tratamiento con alta glucosa y coincide con el incremento en el porcentaje de células apoptóticas.

Por otra parte, la hiperglucemia pudo afectar también la señal de exportación nuclear (NES por sus siglas en inglés) de Mdm2, restringiendo su ingreso al núcleo, incrementando sus niveles citosólicos, los cuales coinciden con los resultados del ensayo de inmunofluorescencia. Este evento probablemente estaría correlacionado con el incremento de muerte apoptótica, ya que Mdm2 estaría inhabilitado para reclutar a p53 nuclear y llevarla a la degradación. Así mismo como se ha descrito en este trabajo, el daño producido por el efecto hiperglucémico al DNA de las células RINm5F desestabilizó a Mdm2, permitiendo el incremento de la actividad de p53. En otros estudios se ha observado que los diversos tipos de estrés pueden reducir los niveles de Mdm2 a través de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales, resultando en un incremento de la actividad de p53 y por consiguiente de la muerte apoptótica (Alarcon *et al*, 1999; Ashcroft *et al*, 2000; Inoue *et al*, 2001; Wang *et al*, 2002) .

El regulador principal de Mdm2 es la proteína pKB/Akt, y como bien se sabe presenta propiedades anti-apoptóticas importantes, porque al fosforilar a Mdm2 protege a las células de la apoptosis inducida por p53. La pKB/Akt induce la fosforilación del residuo de serina 166 y 186 de Mdm2 potenciando su habilidad para degradar a p53 en varios tipos celulares. Estos residuos se localizan en la proximidad de la Secuencia de Localización Nuclear (NLS, por sus siglas en inglés), por lo tanto la fosforilación de estos sitios promueve la entrada de Mdm2 al núcleo. La fosforilación de Mdm2 por pKB/Akt protege a las células de la apoptosis ya que promueve la degradación dependiente de ubiquitinas. El tratamiento con alta glucosa causó la fosforilación de serina 166 de Mdm2, este evento coincidió con los efectos protectores que se le atribuyen a la glucosa sobre las células β , en la que la síntesis de proteínas anti-apoptóticas es estimulada de manera dependiente de tiempo y concentración de glucosa (Martens y Pipeleers., 2009), sin embargo nuestros datos demuestran que aunque Mdm2 se esté fosforilando, el tratamiento con alta glucosa incrementa la tasa de muerte por apoptosis de las células RINm5F. Esta respuesta probablemente está relacionada con las diferencias de sensibilidad de las células β a la glucosa. Cada célula que conforma a la población pudo haber estado en distinta etapa del ciclo celular, una condición que podría afectar la

respuesta celular ante diferentes tipos de estrés. Se ha propuesto que las subpoblaciones de células previenen o revierten la activación de rutas apoptóticas (Martens y Pipeleers., 2009), por lo que es muy probable que la subpoblación de células que resistió las condiciones hiperglucémicas, activaran las rutas de supervivencia celular como la de pKB/Akt, la cual a su vez produjo la fosforilación de serina 166 de Mdm2, sin embargo esto no fue suficiente para evitar la activación de las rutas apoptóticas. La muerte celular deriva de la integración de diversas señales. Otra cinasa involucrada en la fosforilación de Mdm2 es ERK 1/2, se ha demostrado en hepatocitos que el estrés oxidante induce la fosforilación de serina 166 de Mdm2 por medio de la vía MEK 1/2 - ERK 1/2 (Malmlöf *et al.*, 2007) y la inhibición farmacológica de la ruta ERK/12 induce la apoptosis de células malignas de ovario (Coltella *et al.*, 2006). En condiciones de hiperglucemia, la fosforilación de ERK 1/2 disminuye en forma dependiente al tiempo, lo que afecta la supervivencia de las células β (Flores *et al.*, 2013).

En nuestros resultados demostramos que las células β intentan mantener la homeostasis la cual se ve condicionada por el ambiente hiperglucémico, por lo que activan la vía ERK 1/2 para inducir la fosforilación de Mdm2 en serina 166, sin embargo la transducción de esta señal disminuye con el tiempo. Por el contrario, la activación de MAP cinasa p38 prevalece, que además es particularmente efectiva por el incremento de ERO generados por la hiperglucemia, lo que permite la fosforilación de p53 en la mitocondria (Flores *et al.*, 2013), y provoca la apoptosis de las células β al neutralizar la acción anti-apoptótica de Mdm2 .

XII. CONCLUSIONES

1. El cultivo de las células RINm5F en condiciones de alta glucosa durante 72 h induce la muerte por apoptosis, como se demuestra por la fragmentación oligonucleosomal del DNA.

2. La apoptosis de las células RINm5F causada por concentraciones altas de glucosa correlaciona positivamente con la disminución de la expresión y concentración citosólica de Mdm2 y la reducida interacción de p53 con ubiquitina a las 72 h de cultivo.

3. Hay una subpoblación de células RINm5F que resistió a las condiciones hiperglucémicas y que activó las rutas de supervivencia, esto se confirma con la fosforilación de Mdm2 en serina 166 y la interacción tardía de Mdm2 con p53 a las 72 h de cultivo sin embargo esto no fue suficiente para evitar la activación de las rutas apoptóticas.

En resumen, nuestros resultados demuestran que la disminución de la expresión y concentración citosólica de Mdm2, la reducida interacción de p53 con ubiquitina y las vías de supervivencia celular debilitadas, forman parte del mecanismo de inducción de la apoptosis de las células RINm5F, durante el estado de estrés oxidante provocado por hiperglucemia

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackermann Amanda M y Gannon Maureen. (2007). Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *Journal of Molecular Endocrinology*. 38: 193–206.

Adams MJ., Cory S. (1998). The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*: 281:1322-1325.

Alarcón Rodolfo, Koumenis Constantinos, Geyer Rory K, Maki Carl G and Giaccia Amato J. (1999). Hypoxia Induces p53 Accumulation through MDM2 Down-Regulation and Inhibition of E6-mediated Degradation. *Cancer Research*. 59: 6046–6051

Aguilar Rebolledo Francisco. *Neuropatía diabética. Aspectos prácticos, diagnósticos, terapéuticos y medidas profilácticas.* Editorial Alfil. 3a. Edición. México. 2009. 796 páginas.

Al-Anati L., Högberg J., Stenius U. Non-dioxin-like-PCBs phosphorylate Mdm2 at Ser166 and attenuate the p53 response in HepG2 cells. *Chemico-Biological Interactions*. 182: 191–198. 2009

Al-Dallen Saed Mohamed, Chávez Rodríguez Taimy, Gregorio Martínez Sánchez, Ferreira Bega Edilene & León Fernández Olga Sonia. (2004). El Equilibrio Redox en la Diabetes y sus Complicaciones. *Acta Farm. Bonaerense*: 23: 2: 231-42

Al-Gubory Kaïs H, Fowler Paul A, Garrel Catherine. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 42:1634–1650

Altomare, E., Grattagliano I. y Vendemaile G. (1997). Oxidative protein damage in human diabetic eye: evidence of a retinal participation. *Eur. J. Clin. Invest.* 27: 141-7.

Anello M, Lupi R, Spampinato D, Piro S, Masini M, Boggi U, Del Prato S, Rabuazzoo AM, Purrello F, Marchetti P. (2005). Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetología*. 48:2:282-9.

Anzola, M. and Burgos, J.J. (2003). Hepatocellular carcinoma: molecular interactions between hepatitis C virus and p53 in hepatocarcinogenesis. *Experts Reviews in Molecular Medicine*.5: 1-19.

Ashcroft Margaret, Taya Yoichi and Vousden Karen H. (2000). Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Molecular Cell and Biology*. 20: 9: 3224–3233

Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V., Di Lissa F. (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem*; 264: 687-701.

Bai Ling y Zhu Wei-Guo. (2006). p53: Structure, function and therapeutic applications. *Journal of Cancer Molecules*. 2:4: 141-153.

Birks Emma J, Najma Latif, Enesa Karine, Folkvang Tonje, Luong Le Anh, Sarathchandra Padmini, Khan Padmini, Ovaa Huib , Terracciano Cesare M, Barton Paul J.R, Yacoub Magdi H, and Evans Paul C. (2008). Elevated p53 expression is associated with dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*. 79: 472–480

Bonner-Weir S. (2000). Life and death of the pancreatic β cells. *Trends Endocrinology Metabolism*: 11(9):375-8.

Bonner-Weir S. (2000). Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology*: 141:1926-1929.

Butler EA., Janson J., Bonner-Weir S., Ritzel R., Rizza RA., Butler PC. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 102-110.

Brandan Nora, Juaristi Julián, Aguirre Victoria, Romero Benítez Margarita. (2002). Oncogenes y genes supresores de tumores. Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste. 1-12.

Castellanos Isabel Cristina. (2009). Implementación de una Metodología in silico usando el modelo oculto de Markov para la identificación de proteínas involucradas en el mecanismo de señalización con ubiquitina en el sistema Ubiquitina—Proteosoma en el parásito Giardia intestinalis. *Tesis de Maestría*. Colombia. Universidad Nacional de Colombia.

Cebioglu M, Schild HH, Golubnitschaja O. (2008). Diabetes mellitus as a risk factor for cancer: stress or viral etiology? *Infect Disord Drug Targets*: 8: 76-87.

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.

Chan Wan Mui, Mak Man Chi, Fung Tsz Kan, Lau Anita, Siu Wai Yi, and Poon Randy Y.C. (2006). Ubiquitination of p53 at multiple sites in the DNA-binding domain. *Molecular Cancer Research*. 4:1:15-25.

Chen Quin M, Bartholomew James C, Campis Judith, Acosta Meileen, Reagan Joshua D, Ames Bruce N. (1998). Molecular analysis of H₂O₂ induced senescent like growth arrest in normal human fibroblast: p53 and control G1 arrest but not cell replication. *Biochemical Journal*. 332: 43-50.

Cheng Qian, Chen Lihong, Li Zhenyu, Lane William S and Chen Jiandong. (2009). ATM activates p53 by regulating MDM2 oligomerization and E3 processivity. *The EMBO Journal*. 28: 3857–3867

Cheng Qian, Cross Brittany, Li Baozong, Chen Lihong, Li Zhenyu, and Chen Jiandong. (2011). Regulation of MDM2 E3 Ligase Activity by Phosphorylation after DNA Damage. *Molecular and Cell Biology*: 31: 24: 4951–4963

Colman SM., Afshari AC., Barrett JC. (2000). Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutation Res*. 462: 179-188.

Coltella Nadia, Rasola Andrea, Nano Elisa, Bardella, Fassetta Michela, Filigheddu Nicoletta, Graziani Andrea, Comoglio Paolo M, Di Renzo Maria Flavia. p38 MAPK turns hepatocyte growth factor to a death signal that commits ovarian cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *International Journal of Cancer*. 118: 112: 2981-2990

Contreras C. Diabetes Mellitus. Editorial Mediterráneo Ltda. Segunda Edición. Santiago de Chile. 2004.p.p: 468

Corbalán-García, Senena., Gómez-Fernández, J. C. (2006). Protein kinase C regulatory domains: The art of decoding many different signals in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*: 1761:633–654.

Czerski Lech, Nuñez Gabriel. (2004). Apoptosome formation and caspase activation: is it different in the heart? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 37: 643–652.

Daujat Sylvain, Neel Henry and Piette Jacques. (2001). MDM2: life without p53. *TRENDS in Genetics*: 17: 8: 459-464

Davis James R., Mossalam Mohanad, y Lim Carol S. (2013). Controlled Access of p53 to the Nucleus Regulates its Proteasomal Degradation by MDM2. *Molecular Pharmaceutics*. Recién aceptado.

Devlin, T. M. (2004). *Bioquímica*, 4ª edición. Reverté, Barcelona.

Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N. (1999). Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of Psammomys obesus during development of diabetes. *Diabetes*: 48:738–744.

Duan Yuntao, Gross Robert A, Sheu Shei-Shing. (2007). Ca²⁺-dependent generation of mitochondrial reactive oxygen species serves as a signal for poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during glutamate excitotoxicity. *The Journal of Physiology*. 585: 741-758

Duchen RM. (2004). Section III: Mitochondria, β -cell function, and type 2 diabetes. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*: 53 (Suppl. 1): S96-S102.

Dypbukt Jeanette M., Ankarcrona Maria, Burkitt Mark, Sjöholm Ake, Strom Kerstin, Orrenius Sten y Nicotera Pierluigi S. (1994). Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis or produce necrosis of insulin-secreting rim5f cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 48: 30553-30560

Efanova IB, Zaitsev SV, Zhivotovsky B, Kohler M, Efendic S, Orrenius S, Berggren PO. (1998). Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic β -cells: a process dependent on intracellular Ca²⁺ concentration. *J Biol Chem*: 273:33501–33507.

Evans Joseph L, Goldfine Ira D, Maddux Betty A, Grodsky Gerold M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*. 23, 599-622.

Fang Shengyun, Jensen Jane P, Ludwig Robert L, Vousden Karen H, and Weissman Allan M. (2000). Mdm2 Is a RING Finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 12: 8945–8951

Fariss M. W., Chan C. B., Patel M., Van Houten B., y Orrenius S. (2005). Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular Interventions*. 5:2:94–111.

Federici Massimo, Hribal Marta, Perego Lucia, Ranalli Marco, Caradonna Zaira, Perego Carla, Usellini Luciana, Nano Rita, Bonini Paolo, Bertuzzi Federico, Marlier Lionel N.J.L, Davalli Alberto M., Carandente Orazio, Pontiroli Antonio E, Melino Gerry, Marchetti Piero, Lauro Renato, Sesti Giorgio and Folli Franco. (2001). High Glucose Causes Apoptosis in Cultured Human Pancreatic Islets of Langerhans. A Potential Role for Regulation of Specific Bcl Family Genes Toward an Apoptotic Cell Death Program. *Diabetes*: 50:1290-1300.

Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. (2007) Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer*. 121: 2381-2386.

Feng Jianhua, Tamaskovic Rastislav, Yang Zhongzhou, Brazil Derek P, Merlo Adrian, Hess Daniel and Hemmings Brian A. (2004). Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 34:35510-7.

Fernández-Gómez F.J, Gómez-Lázaro M, Jordán J. (2004). p53, nuestro Guardián, celebra sus bodas de plata. *Actualidad en Farmacología y Terapéutica*. 2:3:195-203.

Fiordaliso Fabio, Leri Annarosa, Cesselli Daniela, Limana Federica, Safai Bijan, Nadal-Ginard Bernardo, Anversa Piero, Kajstura Jan. (2001). Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes*: 50: 2363-2375.

Flores López LA. Díaz Flores M, García Macedo R, Ávalos Rodríguez A, Vergara Onofre M, Cruz M, Contreras Ramos A, Konigsberg M, Ortega Camarillo C. (2013). High glucose induces mitochondrial p53 phosphorylation by p38 MAPK in pancreatic RINm5F cells. *Molecular Biology Reports*. 40: 8: 4947-4958

Fourlanos S,Dotta F, Greenbaum CJ, Palmer JP, Rolandosson O, Colman PG, Harrison LC. (2005). Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent. *Diabetología*: 48:11:2206-12.

Fushman David y Wilkinson Keith D. (2011). Structure and recognition of polyubiquitin chains of different lengths and linkage. *Biology Reports*: 3:26: 1-10

Gibson Bradford W. (2005). Molecules in focus. The human mitochondrial proteome: oxidative stress, protein modifications and oxidative phosphorylation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 37: 927–934.

Giogino F, Laviola L, Leonardi A. (2005). Pathophysiology of type 2 diabetes: Rationale for different oral antidiabetic treatment strategies. *Diabetes Research and Clinical Practice* 68S1: S22-S29.

Gómez-Lázaro M, Fernández-Gómez F.J, Jordán J. (2004). La proteína p53 en procesos neurodegenerativos en sus 25 años de historia. *Revista de Neurología*. 39: 3: 243-250.

Gottlieb MT., Martinez Leal JF., Seger R., Taya Y., and Oren M. (2002). Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 21: 1299-1303.

Gray MW., Burger G., Lang BF. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283: 5407: 1476-1481.

Grill V., Björklund A. (2001). Overstimulation and β -cell function. *Diabetes* 50: (suppl. 1): S122-S124.

Gunnar Stenström,Anders Gottsäter, Ekaterine Bakhtadze, Bo Berger, and Göran Sundkvist (2005). Latent autoimmune diabetes in adults definition, prevalence, β -cell function, and treatment. *Diabetes*: 54: Suppl 2:S68-72.

Haupt Ygal, Barak Yaacov, Oren Moshe. (1996). Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *EMBO J*: 15: 1596-606.

Hawkins M., Barzilai N., Liu R., Hu M., Chen W., Rossetti L. (1997). Role of the glucosamine pathway in fat-induced insuline resistance. *J Clin Invest*. 99:2173-2182.

Herrmann M, Lorenz H. M, Voll R, Grunke M, Woith W. and Kalden J.R. (1994). A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Research*. 22: 24: 5506-5507

Hicks JJ., Medina SR. (2001). Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. *Bioquímica*. Hicks JJ (Ed.) McGraw-Hill Interamericana. México. pp 411-433

Hsin-Chen Leea, Yau-Huei Wei. (2005). Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*: 37: 822–834.

Honda R, Tanaka H, Yasuda H. (1997). Oncoprotein MDM2 is ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters*: 420:25-27.

Honda R and Yasuda H. (2000). Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene*. 19: 1473-1476

Hochstrasser Mark. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*: 458:422-429.

Hoogervorst Esther M. Bruins Wendy, Zwart Edwin, van Oostrom Conny Th. M, van den Aardweg Gerard J, Beems Rudolf B, van den Berg Jolanda, Jacks Tyler, van Steeg Harry, and de Vries Annemieke. Lack of p53 Ser389 phosphorylation predisposes mice to develop 2-acetylaminofluorene-induced bladder tumors but not ionizing radiation-induced lymphomas. (2005). *Cancer Research*. 65: 3610-3616.

Hu Wenwei, Feng Zhaohui, y Levine Arnold J. (2012) The Regulation of Multiple p53 Stress Responses Is Mediated through MDM2. *Genes & Cancer*. 3: 3-4: 199–208.

Huang Cheng long, Kohno Nobuoki, Inufusa Haruhiko, Kodame Ken, Taki Toshihiko, Miyake Masayuki. Overexpression of bax Associated with Mutations in the Loop-Sheet-Helix Motif of p53. *The American Journal of Pathology*. 155: 3: 955- 965.

Hussain PS, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S, Hofseth JL, Moake M, Nagashima M, Forrester, SK, Harris, CC. (2004). P53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not Catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Research*. 64: 2350-2356.

Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, Yamada Y. (1999). Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes*: 48:927–932.

Inoue Tomomi, K. Geyer Rory, Howard David, Yu Zhong K, and Maki Carl G. (2001). MDM2 can promote the ubiquitination, nuclear export, and degradation of p53 in the absence of direct binding. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 48: 45255–45260

Inuzuka Hiroyuki, Fukushima Hidefumi, Shaik Shavali, Wei Wenyi. (2010). Novel insights into the molecular mechanisms governing mdm2 ubiquitination and destruction. *Ocotarget*. 1: 7 :685-90.

Ito K, Nakazato T, Yamato K., Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Segawa K, Ikeda Y, Kizaki M. (2004). Induction of apoptosis in Leukemia cells by homovanillic acid derivate, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Research*. 64: 1071-1078.

Iwakuma Tomoo and Lozano Guillermina. (2003). MDM2, an Introduction. *Molecular Cancer Research*. 1: 993– 1000.

James MA., Murphy PM. (2002). How mitochondrial damage affects cell function. *J. Biomed Sci*. 9: 475-487.

Kaneto H., Kajimoto Y., Miyagawa J., Matsuoka T., Fujitani Y., Umayahara Y., Hanafusa T., Matsuzawa Y., Yamasaki Y., Hori M. (1999). Benefical effects of antioxidants in diabetes. Possible protection of pancreatic B-cells against glucose toxicity. *Diabetes*: 48: 2398- 2406.

Kennedy Robert T, Kauri Lisa M, Dahlgren Gabriella M, and Sung-Kwon Jung. (2002). Metabolic Oscillations in β -Cells. *Diabetes*. 51: 1: S152-S161

Keim April L,M Maggie, Chi Y, Kelle H Moley. Hyperglycemia-induced apoptotic cell death in the mouse blastocyst is dependent on expression of p53. *Molecular Reproduction and Development*. 60: 2: 214-224

Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. (2001). Adipose tissue tumour necrosis factor and interleukin- 6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol*: 280: 745751.

Konigsberg Fainstein Mina. *Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas*. El Manual Moderno. México. 2008. p.p: 477-481.

Krauss Stefan. Mitochondria: Structure and Role in Respiration. *Encyclopedia of life sciences*. (2001). Nature Publishing. pp 1-6.

Kruse Jan-Philipp and Gu Wei. (2009). Modes of p53 Regulation. *Cell*. 137:4: 609-622

Kulikova Roman, Letiennea Justine, Kaurb Manjit, Grossman Steven R, Arts Janine and Blattnera Christine. (2005). Mdm2 facilitates the association of p53 with the proteasome. *PNAS*. 107: 22: 10038–10043

Kulikova Roman, Letiennea Justine, Kaurb Manjit, Grossman Steven R, Arts Janine, and Blattnera Christine. (2010). Mdm2 facilitates the association of p53 with the proteasome. *PNAS*. 107: 22: 10038–10043.

Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP. (1994). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*. 274: 5289: 948-53.

Lagouge M y Larsson NG. (2013). The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of Internal Medicine*. 273(6):529-43

Lavin MF and Gueven N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death and Differentiation*. 13: 941–950

Lee JT y Gu W. (2010). The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell Death and Differentiation*: 17:86–92.

Li Muyang, Brooks Christopher L, Wu-Baer Foon, Chen Delen, Baer Richard. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*: 302: 1972–1975.

Liang Shun Hsin y Clarke Michael F. (2001). Regulation of p53 localization. *Journal of Biochemistry*. 268: 2779-2783.

Lilienbaum Alain. (2013). Relationship between the proteasomal system and autophagy. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 4:1: 1–26.

Lin J, Chen, Elenbaas B, Levine AJ. (1994). Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes & Development*. 8: 10: 1235-46.

Liu Kan, Paterson Andrew J, Chin Edward, Kudlow Jeffrey E. (2000). Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. *PNAS*. 97: 6: 2820–2825

Lopez-Contreras Andres Joaquin y Fernandez-Capetillo Oscar. (2012). Signaling DNA Damage. Protein Phosphorylation in Human Health. Editado por Cai Huana.

López M, Anzola M, Cuevas-Salazar N, Aguirre J.N, Martínez de Pancorbo M. (2001). p53, un gen supresor tumoral. *Gaceta Medica de Bilbao.* 98: 1: 21-27.

Lowry Oliver H, Rosebrough Nira J, Farr A. Lewis, Randall Rose J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Nucleic Acids Research.* 22: 24: 5506–5507.

Lozano Guillermina, Montes de Oca Luna Roberto. (1998). MDM2 function *Biochimica et Biophysica Acta.* 1377: M55–M59

Lupi R y Del Prato S. (2008). β - cell Apoptosis in diabetes type 2: quantitative and functional consequences. *Diabetes & Metabolism.* 34: S56-S64.

Macip S, Igarashi M, Berggren P, Yu J, Lee WS, Aaronson AS. (2003). Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Molecular Cell Biology.* 23: 8576-8585.

Maclachlan KT., Meng DR., El-Deiry WS. (1999). “P53: Twenty years on”. *J Cell Physiol.* 181: 371-374.

Maechler P., Wolheim BC. (2001). Mitochondrial function in normal and diabetic β -cell. *Nature:* 414:807-812.

Marchenko DN., Zaika A., Moll MU. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. *J Biol Chem.* 275: 16202- 16212.

Mandrup-Poulsen T. (2001). β -cell apoptosis. *Diabetes:* 50 (suppl. 1): S58-S63.

Malmlöf Maria, Roudier Emilie, Johan Högberg, and Stenius Ulla. (2007). **MEK-ERK-mediated Phosphorylation of Mdm2 at Ser-166 in Hepatocytes Mdm2 is Activated in Response to Inhibited Akt Signalling.** *The Journal of Biological Chemistry.* 282: 4: 2288 –2296.

Manfredi James J. (2010). The Mdm2–p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes & Develoment.* 24: 1580-1589

Marchenko Natasha D, Wolff Sonja, Erster Susan, Becker Kerstin y Moll Ute M. (2007). Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *The EMBO Journal:* 26: 923–934.

Martens Geert A and Pipeleers Daniel. (2009). Glucose, regulator of survival and phenotype of pancreatic beta cells. *Vitamins & Homones.* 80: 507–539

Martelli, A. M., Evangelisti, C., Nyakern, M., Manzoli, F. A. (2006). Nuclear protein kinase C. *Biochimica et Biophysica Acta:* 1761:542-551.

Martínez Abundis Eduardo, Sánchez Rodríguez Martha A, El Hafidi Bentlakder Mohammed. (2005) Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad. *Bioquímica*. 30:003: 82-89.

Medina-Navarro R., Hicks JJ. (2001). *Radicales libres de oxígeno: bioquímica inorgánica y biomedicina*. En: *Bioquímica*. Hicks JJ (Ed.) McGraw-Hill Interamericana. México, , pp 779-792.

Meek David y Knippschild W. Uwe. (2003). Posttranslational Modification of MDM2. *Molecular Cancer Research*. 1: 1017-1026.

Michael Dan, Oren Moshe. (2003). The p53–Mdm2 module and the ubiquitin System. *Seminars in Cancer Biology*. 13 49–58

Mihara Motohiro, Erster Susan, Zaika Alexander, Petrenko Oleksi, Chittenden Thomas, Pancoska Petr y Moll Ute M. (2003). p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria. *Molecular Cell*. 11: 77–590.

Molina, A.J, Wikstrom JD, Stiles L, Las G, Mohamed H, Elorza A, Walzer G, Twig G, Katz S, Corkey BE, Shirihai OS. (2009). Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes*: 58, 2303–2315.

Moll Ute M, Zaika Alex. (2001). Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *Febs Letter*. 493: 65-69.

Moll Ute M. and Petrenko Oleksi. (2003). The MDM2-p53 Interaction. *Molecular Cancer Research*. 1:1001-1008

Momand Jamil , Villegas Alberto, Belyi Vladimir A. (2011). The evolution of MDM2 family genes. *Gene*: 486: 23–30.

Nayak Surendra Kumar, Panesar Paramjit Singh and Kumar Harish. (2009). p53-Induced Apoptosis and Inhibitors of p53. *Current Medicinal Chemistry*. 16: 2627-2640

Nelson David L y Cox Michael M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. Third Edition. New York, USA.

Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. (2003). Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*: 417: 311.

Ortega Camarillo C, Guzmán Grenfell A.M, García Macedo R, Rosales Torres A.M, Ávalos Rodríguez A, Durán Reyes G, Medina Navarro R, Cruz M, Díaz Flores M and Kumate J. (2006). Hyperglycemia induces apoptosis and p53 mobilization to mitochondria in RINm5F cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 281: 163–171

Polyak Kornelia, Xia Yong, Zweier Jay L, Kinzler Kenneth W, Vogelstein Bert. (1999). A model for p53-induced apoptosis. *Nature*. 389: 300-3005

Ponnuswamy Anand, Hupp Ted y Fähræus Robin. (2012). Concepts in MDM2 Signaling. Allosteric Regulation and Feedback Loops. Genes & Cancer. 3:3-4: 291-297.

Poyurovsky Masha V. y Prives Carol. (2006). Unleashing the power of p53: lessons from mice and men. Genes & Development. 20: 125-131

Prentki Marc and Nolan Christopher J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. The Journal of Clinical Investigation. 116: 7: 1802- 1812

Queisser Markus A., Yao Dachun, Geisler Sven, Hammes Hans-Peter, Lochnit Günter, Schleicher Erwin D., Brownlee Michael, Preissner Klaus T. (2010). Hyperglycemia Impairs Proteasome Function by Methylglyoxal. Diabetes: 59: 670-678.

Ranaweera Ruchira S. and Yang Xiaolu. (2013). Auto-ubiquitination of Mdm2 enhances its substrate ubiquitin ligase activity. The Journal of Biological Chemistry. 288: 26: 18939-46

Rebolledo Aguilar Francisco. Neuropatía diabética. Aspectos prácticos, diagnósticos, terapéuticos y medidas profilácticas. Editorial Alfil. Tercera edición. 2009.pp 133-134.

Rengifo J, Gibson CJ, Winkler E, Collin T, Ehrich BE. Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type I by O-GlcNAc glycosylation. Journal of Neuroscience: 27:50:13813-21. 2007.

Rhodes JC. (2005). Type 2 Diabetes- a matter of β -cell life and death? Science: 307: 380-383.

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

Roche E., Assimacopoulos Jeannet F., Witters LA., Perruchoud B., Yaney G., Corkey B., Asfari M., Prentki M. (1997). Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic β -cell line (INS-1). Journal of Biology Chemistry .272:3091-3098

Roche E., Farfari S., Witters LA., Assimacopoulos-Jeannet F., Thumelin S., Brun T., Perruchoud B., Yaney G., Corkey B. (1998). Long-term exposure of β -INS cells to high glucose increases anaplerosis, lipogenesis and lipogenic gene expression. Diabetes: 47:1086-1094.

Rodríguez López José Neptuno. (2003). Proteólisis Intracelular: Recambio Proteico. Universidad de Madrid. 1-32.

Rodríguez S J. (2002). La diabetes. Alfaomega Everest. España.

Ross Laybutt, Hideaki Kaneto, Wendy Hasenkamp, Shane Grey, Jean-Christophe Jonas, Dennis C. Sgroi, Adam Groff, Christiane Ferran, Susan Bonner-Weir, Arun Sharma, y Gordon C. Weir. (2002). Increased Expression of Antioxidant and Antiapoptotic Genes in Islets That May Contribute to β -Cell Survival During Chronic Hyperglycemia. *Diabetes*: 51:413–423

Rubbi Carlos P y Milner Jo. (2003). p53 Guardian of a Genome's Guardian? *Cell Cycle* 2:1:18-19.

Rubio Guerra Alberto Francisco Resistencia a la insulina. Mc Graw Hill Interamericana. México. 2003. p.p: 37-39

Rubio Guerra Alberto Francisco Síndrome Metabólico. Colegio de Medicina Interna de México-Edición y Farmacia. México.2008. p.p: 48-49.

Supale Sachin, Li Ning, Brun Thierry, and Maechler Pierre. (2012). Mitochondrial dysfunction in pancreatic β cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 23:9: 477-487.

Sadaivudu, B., M. Sasikala & V. Sailaja (1997). *Med. Sci. Res*: **25**: 631-3.

Santos A, Naoufal Z, Kroemer G. (1998). Mitochondria as regulator apoptosis: doubt no more. *Biochemical and Biophysics Acta*. 1366: 151-165.

Schuler Martin, Bossy-Wetzell Ella, Goldstein Joshua C, Fitzgerald Patrick y Green Douglas R. (2000). p53 Induces Apoptosis by Caspase Activation through Mitochondrial Cytochrome c Release. *The Journal of Biological Chemistry*. 275:10: 7337-7342.

Shi Dingding, Gu Wei. (2012). Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity. *Genes & Cancer*. 3: 3-4: 240–248.

Skelin Masa, Rupnik Marjan, Cencic Avreljia. (2010). Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *ALTEX*: 27(2):105-13.

Sterin-Speziale N. y Nieto F. Leocata. (2007). Los esfingolípidos en la muerte y proliferación celular. *Revista Química Viva*. 3:6.

Stefan Krauss. (2001). Mitochondria: Structure and Role in Respiration. Encyclopedia of Life Sciences Nature Publishing Group

Stenström Gunnar, Gottsäter Anders, Bakhtadze Ekaterine, Berger Bo and Sundkvist Göran. Latent autoimmune diabetes in adults definition, prevalence, β -cell function, and treatment. *Diabetes*. 2005. 54: 2: S68-72.

Stommel Jayne M, Geoffrey Wahl M. (2004). Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *The EMBO Journal*. 23: 1547–1556

Susini S., Roche E., Prentki M., Schlegel W. (1998). Glucose and glucocorticoid peptides synergize to induce c-fos, c-jun, Jun B, Zif-268 and nur-77 gene expression in pancreatic β (INS-1) cells. *FASEB Journal*: 12: 1173-1182.

Susini Santos A, Lorenzo Hans K, Zamzami Naoufal, Marzo Isabel, Snow Bryan E, Brothers Greg M, Mangion Joan, Jacotot Etienne, Constantini Paola, Loeffler Markus, Larochette Nathanael, Goodlett David, Aebersold Ruedi, Siderovski David P, Penninger Josef M, Kroemer Guido. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.

Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. (2006). Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer*. 42: 6: 745-50.

Twig, G. Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*. 27, 433–446.

Wallace Maura, Worrall Erin, Pettersson Susanne, Hupp Ted R, Ball Kathryn L. (2006). Dual-site regulation of MDM2 E3-ubiquitin ligase activity. *Molecular Cell*. 23:2: 251-63.

Wang Hui, Nan Li, Yu Dong, Lindsey J Russell, Agrawal Sudhir, and Zhang Ruiwen. (2002). Anti-tumor efficacy of a novel antisense anti-mdm2 mixed-backbone oligonucleotide in human colon cancer models: p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Molecular Medicine*: 8: 4: 185–199

Wang Ke-Sheng, Chen Gang, Shen Hai-Lian, Li Ting-Ting, Chen Fei, Wang Qin-Wan, Wang Zhi-Qin, Han Ze-Guang, Zhang Xin. (2011). Insulin receptor tyrosine kinase substrate enhances low levels of mdm2-mediated p53 ubiquitination. *Plos One*: 6:8:1-12.

Wang X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Gen Dev*. 15: 2922-2933.

Wäster Petra K y Ölinger Karin M. (2009). Redox-Dependent Translocation of p53 to Mitochondria or Nucleus in Human Melanocytes after UVA- and UVB-Induced Apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*. 129:1769–1781.

Webb CG., Akbar SM., Zhao C., Steiner FD. (2001). Expression profiling of pancreatic β -cells. Glucose regulation of secretory and metabolic pathway genes. *Diabetes* 50 (supp 1): S135-S136.

Weikang Tao and Levine AJ. (1999). Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *PNAS*. 96:6: 3077-3080.

Zhongmin Alex Ma, Zhengshan Zhao, y John Turk. (2012). "Mitochondrial dysfunction and β -cell failure in type 2 diabetes mellitus". *Experimental Diabetes Research*: 1-11.

Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, Lang DA. (1994). Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetic Medicine*. 11: 9: 866-871.

Zmijewski Murray Fiona, Slee Elizabeth A, Lu Xin. (2008). A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 9:9:702-12.

1. Páginas Web Consultadas.

American Diabetes Association: www.diabetes.org

Beta Cell Biology:

www.betacell.org/content/articlepanelview/article_id/13/panel_id/1

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Resultados Nacionales: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>

Encyclopedia Britannica Blog: www.britannica.com/blogs/2011/07/discovered-insulin/

International Diabetes Federation: www.idf.org/diabetesatlas.org/map

The Tp53 Web Site: http://p53.free.fr/p53_info/p53_modifications.html