

————— *Artículo original* —————

Efecto de la subnutrición materna sobre el desarrollo, crecimiento y funcionalidad de las células β pancreáticas en el feto: implicación del sistema de IGFs

Recibido el 26 de febrero de 2007

ELISA FERNÁNDEZ MILLÁN¹, M. ÁNGELES MARTÍN ARRIBAS², CARMEN ÁLVAREZ ESCOLÁ^{1*}

¹*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, España.*

²*Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto del Frío, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España*

RESUMEN

Los fetos a término procedentes de ratas gestantes sometidas a una restricción proteico-calórica del 65% de la ingesta diaria de alimento (S) presentan un incremento de la masa de células β e hiperinsulinemia. Los procesos metabólicos y moleculares implicados en estas alteraciones no han sido estudiados hasta este momento. Con este fin valoramos los efectos inmediatos de la restricción proteico-calórica sobre los mecanismos que regulan la funcionalidad y el crecimiento de las células β durante el desarrollo fetal. Los resultados indican que: 1) La restricción nutricional en los fetos provoca alteraciones de la secreción de insulina, consecuencia de cambios en los niveles de expresión del gen de insulina y su contenido.

Extracto del trabajo de investigación original que obtuvo el Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia del año 2006.

* **Información de contacto:**

Doctora Carmen Álvarez Escolá.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid.

E-mail: calvarez@farm.ucm.es

Fax: 91 394 17 79

La alteración en la expresión del mRNA de insulina parece ser debida a un incremento de p38/SAPK2 y de la oxidación de glucosa, implicados ambos en la activación del factor de transcripción PDX-1. 2) El incremento en la masa de células β encontrado en los fetos S podría relacionarse con una mayor estimulación de la replicación de células β , debido al aumento del IGF-1 pancreático, del número de IGF-1R y de una mayor activación, tanto en situación basal como tras la estimulación con glucosa/IGF-1 de la vía de señales IRS-2/PI3K/Akt.

Palabras clave: Malnutrición.—Islote.—Insulina.—Señalización.—Sustrato del receptor de insulina-2 (IRS-2).

ABSTRACT

Effect of maternal undernutrition on fetal pancreatic β -cell development, growth and functionality: involvement of the IGF system.

We have previously shown that Wistar fetuses from protein-caloric undernourished (U) pregnant rats at 21 days post coitum (dpc) exhibit increased β -cell mass and hyperinsulinemia. The metabolic and molecular processes involved in these alterations are not fully understood. To this end, we examined the immediate effects of a protein-caloric restricted diet on the mechanisms that regulate both the functionality and growth of the β -cells during fetal development. The data show that: 1) Food restriction causes in fetuses alterations in glucose-stimulated insulin secretion as a consequence of changes in the levels of insulin gene expression and content. Altered insulin mRNA expression seems to be caused by the increase in p38/SAPK2 protein levels and glucose oxidation, both of them implicated in the activation of the insulin gene transcription factor PDX-1. 2) The increased β -cell mass found in U fetuses could be related to a higher stimulation of β -cell replication, due to locally increased pancreatic IGF-1, the elevated number of IGF-1R and the enhancement in both basal and glucose/IGF-1 activations of the IRS-2/PI3K/Akt pathway.

Key words: Malnutrition.—Islet.—Insulin.—Signalling.—Insulin receptor substrate-2 (IRS-2).

INTRODUCCIÓN

1. Efecto de la subnutrición sobre las células β

Mantener un estado nutricional adecuado es de vital importancia, pero adquiere una consideración crítica cuando se ve alterado en periodos de crecimiento. De hecho, desde hace tiempo se consi-

dera el bajo peso al nacer como un factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes tipo 2 y de otras enfermedades que no se manifiestan clínicamente hasta la edad adulta. Las razones para establecer esta relación se basan, fundamentalmente, en la hipótesis del «fenotipo ahorrador» lanzada por Hales y Barker en 1992 (1), según la cual la subnutrición intrauterina y durante la infancia afecta adversamente el desarrollo y función de las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans.

Esta teoría ha sido testada experimentalmente en numerosos modelos animales. En función del tipo de restricción nutricional aplicada a la madre varían los mecanismos implicados en las modificaciones estructurales y funcionales que sufre el páncreas endocrino de sus fetos. En este sentido, se ha visto que someter a las ratas gestantes a una dieta hipoproteica (8% de proteínas) conduce a la formación, en fetos a término, de islotes más pequeños y menos vascularizados, con menos células β y con menor contenido de insulina que los de los animales controles (20% de proteínas). Asimismo, la liberación de insulina en respuesta a secretagogos, tales como glucosa o aminoácidos, está dañada en estos islotes (2).

Con respecto a la malnutrición global, también se han descrito alteraciones en la estructura del páncreas endocrino, disminución de la masa de células β y del contenido de insulina pancreática (3, 4). Otros autores, sin embargo, han encontrado la situación contraria, incremento en la masa de células β , así como del contenido insulínico (5), en paralelo a un aumento de la respuesta insulino-secretora de los islotes fetales (5, 6). Esta última situación se asemeja a lo que ocurre en fetos procedentes de ratas gestantes que padecen una diabetes moderada, los cuales se caracterizan por tener no sólo incrementado el contenido de insulina pancreática, sino también la secreción de insulina en respuesta a glucosa, además de una mayor proliferación de células β (7).

En cualquier caso, la subnutrición en la etapa fetal en todos estos modelos provoca cambios estructurales y funcionales en el páncreas endocrino capaces de llevar a una alteración de la homeostasis glucídica en la etapa adulta (8).

A la vista de los resultados obtenidos con los distintos modelos de malnutrición materna se puede concluir que las condiciones intraute-

rinas adversas condicionan el desarrollo fetal y el peso al nacer, pudiendo llegar a inducir una tendencia diabetogénica en la descendencia. Por estas razones se debe reconocer que la subnutrición, al igual que la obesidad, juega un papel importante en la etiopatogénesis de la diabetes. Es por tanto apropiado decir que la diabetes está relacionada con los dos extremos de un mismo concepto, la nutrición.

2. Control nutricional de la función de la célula β

Las principales funciones de la célula β , secreción y producción de insulina, están controladas por nutrientes y de todos ellos la glucosa es el regulador fisiológico más importante. Esta regulación requiere que la glucosa se metabolice en el interior de las células β , como consecuencia de lo cual se generan una serie de intermediarios metabólicos capaces de controlar el índice de expresión del gen de insulina, la síntesis de la hormona y la secreción de la misma.

La glucosa es capaz de regular la producción de insulina en tan sólo unos minutos, fundamentalmente a través de la traducción del mRNA preexistente. De este modo, la célula β puede reponer rápidamente sus reservas insulínicas, siendo capaz así de responder a las oscilaciones diarias de los niveles circulantes de glucosa. Sin embargo, una exposición más prolongada (24 horas) de las células β a elevadas concentraciones de glucosa conduce a un aumento de la estabilidad del mRNA de la hormona y de la transcripción del gen que la codifica, capacitando así a la célula β a responder a cambios dietéticos más mantenidos en el tiempo como, por ejemplo, periodos de ayuno.

Debido a que la célula β pancreática es la única célula del organismo capaz de sintetizar insulina, contiene como tal la maquinaria adecuada para este fin. Uno de los elementos claves en la regulación, por parte de la glucosa, de la expresión del gen de insulina es el factor de transcripción pancreático PDX-1 (9), el cual está implicado además, en la transcripción de otros genes como son el GLUT-2 y la glucocinasa.

La glucosa afecta la distribución intracelular del PDX-1 a través de un proceso fosforilación-activación en el que interviene una cas-

cada de señales que implica la participación de la proteína kinasa 2 activada por estrés (p38/SAPK2) y de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) (10) (Figura 1). La proteína kinasa p38/SAPK2 es un miembro de la familia de las MAP kinasas que se activan en respuesta a estímulos adversos, tales como el calor, el choque osmótico, la luz ultravioleta o citocinas proinflamatorias, que son producidas durante condiciones de estrés. En las células β, la activación por glucosa de la vía de la p38/SAPK2 implica la participación de PI3K, mientras que en la activación por el estrés no (11).

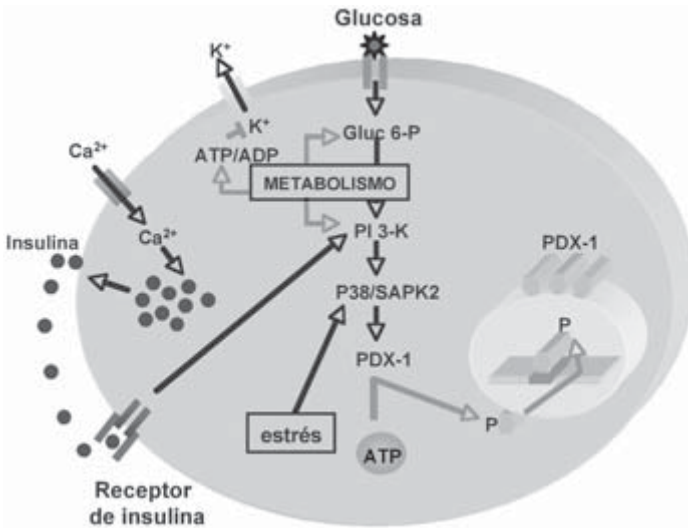


FIGURA 1. *Función de PDX-1 en la expresión del gen de insulina en las células β pancreáticas y su regulación por glucosa.*

3. Crecimiento de la masa de células β

El páncreas endocrino está sujeto a cambios dinámicos en función de la demanda de insulina, de modo que la masa de células β puede modificarse tanto en número (hiperplasia), como en tamaño celular (hipertrofia), e incluso, si fuese necesario, aumentar o disminuir su funcionalidad con el fin de mantener los niveles de glucemia del organismo dentro de un estrecho rango fisiológico (revisado en 12).

Fundamentalmente, se puede decir que la masa de células β es el resultado de un fino balance entre factores que inducen a su crecimiento, como son el índice de replicación y de neogénesis, y el proceso de muerte celular programada o apoptosis.

3.1. *Factores que modulan el crecimiento de las células β : Sistema de IGFs*

Los factores implicados en la plasticidad del páncreas incluyen desde nutrientes como la glucosa, aminoácidos y ácidos grasos libres, hasta hormonas tales como la insulina, la hormona del crecimiento (GH) o el glucagón, e incluso factores de crecimiento como los similares a la insulina (IGFs). Estos y otros factores son capaces de suprimir o estimular el crecimiento de las células β , su supervivencia, diferenciación y secreción de insulina.

Entre los factores de crecimiento mejor caracterizados y más relevantes desde el punto de vista fisiológico cabe destacar el sistema de IGFs. La familia de factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) incluye dos ligandos (IGF-1 e IGF-2), dos receptores de membrana (IGF-1R e IGF-2R) y al menos seis proteínas distintas de unión a los IGFs (IGFBP-1 a IGFBP-6), que regulan la actividad de los IGFs en numerosos tejidos (revisado en 13).

En muchas especies, ambos IGFs son detectados en la circulación fetal desde el principio de la gestación, si bien las concentraciones plasmáticas del IGF-2 son muy superiores a las del IGF-1, llegando a desaparecer en roedores la expresión de IGF-2 de la mayoría de los tejidos alrededor del periodo de destete (14). El predominio del IGF-2 durante el periodo embrionario permite considerarle como el principal responsable del crecimiento fetal. Por el contrario, los niveles plasmáticos de IGF-1 aumentan rápidamente después del nacimiento, fundamentalmente como consecuencia de su producción hepática estimulada por GH (revisado en 15).

Los IGFs juegan un importante papel en el crecimiento feto-placentario. Desempeñan acciones de carácter metabólico y mitogénico, así como de diferenciación celular en un amplio abanico de tejidos fetales (revisado en 13). Pero además de estimular la proliferación

celular, está demostrado que tanto el IGF-1 como el -2 previenen la apoptosis. En los roedores, las células β del páncreas endocrino sufren un proceso de muerte celular programada o apoptosis alrededor del tiempo de destete, lo que es seguido de un incremento en el proceso de neogénesis (14). Esta secuencia de destrucción y renovación celular coincide con una caída en la expresión génica de IGF-2 y con un cambio de células β fetales capaces de replicar a otras no-proliferantes con respuesta insulínica secretora propia de los individuos adultos. En trabajos realizados en animales transgénicos que sobreexpresan IGF-2 se ha descrito una reducción de la apoptosis característica de este periodo y un incremento de la masa de células β (16).

Hay que señalar que la expresión génica de los IGFs está regulada de modo específico para cada tejido y puede verse afectada por las condiciones nutricionales y endocrinas que se den en el ambiente intrauterino, si bien estas condiciones tienen, generalmente, un efecto más pronunciado sobre los niveles del IGF-1 que del IGF-2, independientemente de la causa o naturaleza de la alteración alimentaria u hormonal (17).

3.2. *Vías de señales de la glucosa e IGF-1 implicadas en el crecimiento y/o supervivencia de las células β*

El IGF-1 estimula la proliferación de las células β del páncreas de los mamíferos a través de su receptor, el IGF-1R, y la consecuente activación de toda una cascada de transducción de señales. Cuando el IGF-1 se une al IGF-1R se activa la actividad tirosina kinasa intrínseca del receptor, lo que conlleva su autofosforilación y la fosforilación en tirosina de diversas proteínas intracelulares, entre las que se incluye la familia de sustratos específicos del receptor de insulina (IRSs), siendo especialmente importante en las células β el IRS-2. Una vez fosforilado, el IRS-2 queda anclado a los residuos de fosfotirosina de la subunidad β del IGF-1R a través de su dominio PTB situado en la región N-terminal. El IRS-2, entonces, es capaz de secuestrar a la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) a través del dominio SH2 de su subunidad reguladora, la p85, provocando, a su vez, la activación de la subunidad catalítica de 110 kDa (p110). La PI3K activada transforma los fosfatidilinositoles difosfato (PIP₂) de la

membrana plasmática, en fosfatidilinositoles trifosfato (PIP_3), los cuales actúan como mensajeros secundarios activando a la proteína kinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK1) y a determinadas isoformas de la proteína kinasa C (PKC). La PDK activa, a continuación, a la proteína kinasa B (PKB, también denominada Akt) y a varias isoformas atípicas de la PKC. La Akt es una serina/treonina kinasa que tiene una gran cantidad de proteínas sustrato entre las que se incluye la glucógeno sintasa kinasa-3 (GSK3), cuya actividad es inhibida por fosforilación; por el contrario, tiene otras dianas que al ser fosforiladas se activan, como la diana en mamíferos de la rapamicina (mTOR), que a su vez media la activación de la p70S6K y de la 4E-BP1 implicadas, ambas, en la síntesis de proteínas. La Akt puede también fosforilar directamente en serina/treonina a determinados factores de transcripción, los cuales por su parte contribuyen a promover la entrada en el ciclo celular.

Por otro lado, la unión del IGF-1 con su receptor provoca también la activación de la ruta de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK). Esta activación se logra por la interacción de la proteína adaptadora Grb-2 con las tirosinas fosforiladas del receptor de IGF-1 o del IRS-2, a través de sus dominios SH2, o por la unión de proteínas Shc. A su vez, Grb-2 se une a mSOS, una molécula intercambiadora de los nucleótidos de guanina de la proteína Ras, la cual resulta activada por esta acción. La forma Ras-GTP se une a Raf, la cual fosforila entonces a la kinasa MEK, resultando en la fosforilación-activación de Erk-1/2. La activación de las Erks o p42/44MAPK conduce a la activación de otra kinasa, la p90RSK, lo que induce la translocación de ésta al núcleo o bien, las propias Erks pueden directamente translocarse ellas mismas. En el núcleo fosforilarán a determinados factores de transcripción favoreciendo la mitogénesis y la transcripción de diversos genes como el de insulina.

La activación de la ruta de las MAPKs y de la PI3K es un requisito esencial para la mitogénesis de la mayoría de las células de los mamíferos.

Es importante destacar que la actividad de los IGFs es dependiente del metabolismo de la glucosa. Además, la glucosa puede activar la vía de transducción de señales mediada por los IRSs, independientemente de estos factores de crecimiento (18). Se ha visto

que concentraciones estimulantes de glucosa (6-18 mM), pueden promover la asociación de IRS-2 con la subunidad reguladora p85 de la PI3K, o de IRS-2 con Grb2/mSOS (18). Por otro lado, la glucosa puede conducir, de modo no-dependiente de IRS-2, a la activación de Erk-1/2 y de p70S6K.

4. Objetivos

En nuestro grupo de trabajo se ha puesto a punto un modelo animal de subnutrición proteico-energética que reproduce una situación muy similar a la que padecen los seres humanos en países del Tercer Mundo: se comienza en una etapa temprana del desarrollo y se continúa hasta la edad adulta. En trabajos previos realizados en dicho modelo (5) se ha mostrado que una restricción del 65% de la ingesta a la madre durante la tercera semana de gestación aumenta, en los fetos a término, la masa de células β y la respuesta insulino-secretora a glucosa y aminoácidos. Los procesos metabólicos y moleculares responsables de todas estas alteraciones causadas por la malnutrición global no han sido analizados hasta el momento. En este sentido, creemos que nuestro modelo de subnutrición nos brinda una oportunidad única para valorar *in vivo* e *in vitro* los mecanismos que regulan la funcionalidad y crecimiento de las células β durante el desarrollo fetal y puede ayudarnos a profundizar en la comprensión de la fisiología del páncreas endocrino y de las patologías que lo afectan. Con este fin nos hemos planteado estudiar: 1) Los efectos de la subnutrición materna sobre los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la funcionalidad de las células β de los fetos a término; 2) Los efectos de la restricción global sobre el crecimiento de las células β pancreáticas en periodo fetal y valorar la posible implicación del sistema de IGFs; 3) Caracterizar las vías de señales de la glucosa e IGF-1 implicadas en el crecimiento de las células β durante la etapa fetal.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales y dieta

A lo largo de este trabajo se han utilizado ratas de la raza Wistar sometidas a un ciclo de luz/oscuridad automático. El inicio de la gestación fue establecido al día siguiente del apareamiento mediante la observación, por frotis, de la presencia de espermatozoides en la vagina de la rata. Desde el día 14 de gestación se limita la cantidad de pienso administrado diariamente a un 35% del valor ingerido por las ratas controles.

Todas las determinaciones se realizaron en fetos a término (21,5 dpc) subnutridos, comparando los resultados obtenidos con los de sus correspondientes animales controles alimentados *ad libitum*. Para la recogida de las muestras, los animales fueron sacrificados alrededor de las 10:00 horas, cuando se encontraban en periodo postabsorptivo. Todos los estudios se llevaron a cabo siguiendo los criterios indicados en la «Guía para el Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio», preparada por la National Academy of Sciences y publicada en National Institutes of Health (NIH).

2. Aislamiento y cultivo primario de islotes de langerhans fetales

Los islotes fetales se obtienen a partir de páncreas (7-9) de fetos a término y según la técnica descrita por Hellerström y cols. (19). Los islotes así obtenidos se cultivaron durante distintos periodos de tiempo según los experimentos a realizar.

3. Secreción y contenido de insulina de los islotes

Para valorar la función secretora, los islotes fetales procedentes de cultivo primario son sometidos a una incubación estática en una solución tampón-bicarbonato que contiene albúmina bovina (5 mg/ml; Fracción V; SIGMA) y las distintas concentraciones de glucosa a evaluar: 2,8 mM y 16,7 mM. La incubación se lleva a cabo durante

90 minutos, a 37° C y con agitación. Después de la incubación se recoge el sobrenadante que se conserva a -20° C hasta el momento de valorar, mediante RIA, la cantidad de insulina liberada por los islotes.

Para determinar el contenido de insulina, grupos de veinte islotes fetales primarios son recogidos en 0,5 ml de una mezcla ácido-alcohol (75% de etanol, 1,5% de ácido clorhídrico 12 N y 23,5% de agua destilada). Posteriormente, son sonicados y el extracto que se obtiene se conserva a -20° C hasta su valoración mediante RIA.

4. Metabolismo de la glucosa

La determinación del metabolismo de la glucosa se llevó a cabo en islotes fetales procedentes de cultivo primario siguiendo el método descrito por Malaisse y Sener (20).

Como marcadores radiactivos se usaron D-[5-³H]-glucosa y D-[6-¹⁴C]-glucosa (Amersham-Pharmacia). La liberación de ³H₂O a partir de D-[5-³H]-glucosa nos proporciona la medida de la utilización global de la molécula, mientras que su oxidación viene dada por la producción de ¹⁴CO₂ a partir de D-[6-¹⁴C]-glucosa. Ambos productos fueron determinados en un contador de centelleo líquido (1209 Rackbeta, LKB WALLAC).

5. Análisis de proteínas mediante western-blot

Los extractos de proteínas se obtienen a partir de grupos de islotes primarios que se recogen sobre hielo y se sonicán durante un minuto en tampón de lisis (Tris 12,5 mM; EGTA 1,25 mM; EDTA 1,25 mM; Triton X-100 0,25%; PMSF 2 mM; Leupeptina 10 μM; Na₃VO₄ 2 mM; Benzamidina 2 mM y Aprotinina 10 μg/ml). En ocasiones, para aumentar la sensibilidad, se hace necesario llevar a cabo una inmunoprecipitación de las muestras, cuya finalidad es la separación de una proteína específica del extracto de proteínas totales.

El análisis cuantitativo de las proteínas se llevó a cabo mediante el método descrito por Bradford (21). Las proteínas se separan en un

gel de poliacrilamida y posteriormente, son transferidas electroforéticamente a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Después se incuba ésta con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TTBS (TBS con 0,05% de Tween-20) a 4° C durante toda la noche.

Tras esta incubación se lava con TTBS y se añade el anticuerpo secundario con el que se incuba la membrana durante una hora con agitación suave y a temperatura ambiente. Posteriormente se vuelve a lavar. Para visualizar los inmunocomplejos se utiliza una técnica de quimioluminiscencia (ECL Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences, UK).

6. Análisis del RNA total

6.1. *Northern blot*

El RNA total se extrae siguiendo el método descrito por Chomczynski y Sacchi (22), basado en la utilización de una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina (Trizol, Gibco Life Technologies).

Una vez cuantificado, la cantidad necesaria de RNA total es sometida a Northern blot siguiendo el método anteriormente descrito (23). El cDNA correspondiente a la sonda de insulina, de tamaño 399 pares de bases, fue cedido generosamente por S. J. Chan; University of Chicago, USA.

Las prehibridaciones e hibridaciones se realizan basándose en el método de Amasino (24) y como control de carga se usa la sonda ribosomal de 18S. Terminado el proceso, las membranas se introducen en una placa de autorradiografía para exponer, el tiempo adecuado, una película de rayos X a -80° C (Kodak OMAT X-AR) que, posteriormente, se revela utilizando un revelador Agfa, Curix 60.

6.2. *Ensayo de protección de las ribonucleasas*

Las muestras de RNA total se obtuvieron y valoraron siguiendo el método descrito anteriormente (22). Se utilizaron 20 µg de RNA

de cada muestra que se dejaron precipitando en 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol puro a -20° C hasta el momento de su análisis.

Los cDNAs correspondientes a las sondas de IGF-1 e IGF-2 de rata han sido generosamente cedidas por los doctores C. T. Roberts Jr. y D. LeRoith (National Institute of Health, Bethesda, MD). El cDNA correspondiente a la sonda de 18S ribosomal se usa como control de carga (pT7 RNA 18S antisense, Ambion, Austin, Texas).

Para el marcaje radiactivo de las sondas con ($^{32}\alpha$ -P) dUTP (ICN, Nuclear Iberica, Madrid, España) se sigue el protocolo indicado en el kit Riboprobe Gemini II core system (Promega, Madison, WI, USA). La hibridación del RNA total con la ribsonda marcada ha sido descrito anteriormente (25) y los híbridos formados se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida empleando el sistema Sequigen II Sequencing Cell de BioRad.

Una vez finalizada la electroforesis se mantiene el gel a -80° C en contacto con una película sensible el tiempo necesario.

7. Estudios inmunohistoquímicos

El índice de replicación de células β ha sido valorado *in vitro* en cultivo primario de islotes fetales. La replicación de células β se mide añadiendo BrdU al medio de cultivo hasta una concentración final de 100 $\mu\text{mol/l}$ y después de una hora se recogen los islotes bajo lupa, se incluyen en agarosa y una vez solidificada ésta, en parafina. A continuación, los bloques de parafina se cortan con un microtomo en finas secciones de 7 μm de espesor, cada una de las cuales es fijada a continuación con calor sobre un portaobjetos. A un intervalo fijo de cada 72 secciones se procede al doble marcaje del tejido, frente a la insulina y frente a la BrdU (kit de proliferación celular de Amersham).

La valoración cuantitativa se lleva a cabo mediante un microscopio Olympus BX40. El índice de proliferación de células β viene expresado por la relación porcentual de células β que han incorporado la BrdU en función del número total de células β .

8. Técnicas analíticas

8.1. Determinación de glucosa e insulina en plasma

Para la determinación de glucosa, el plasma obtenido es desproteínizado con la mezcla de Somogyi [SO_4Zn 0,08 M, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,08 M] y, a continuación, se centrifuga durante cinco minutos a 2.500 rpm. La glucosa se analizó en el sobrenadante aplicando el método de la glucosa-oxidasa acoplado a la oxidación de un cromógeno (BioSystems).

La insulinemia se valoró por radioinmunoanálisis (RIA) utilizando un kit suministrado por la casa Linco (LINCO Research Inc., USA). Se parte de una sensibilidad de 0,1 ng/ml en la curva patrón y se usaron 100 μl de suero de cada muestra.

8.2. Determinación de IGFs en suero

El **IGF-1** en suero se mide por enzimoimmunoanálisis (EIA, Diagnostic Systems Laboratories, Texas, USA). La determinación sérica de **IGF-2** se lleva a cabo por el análisis de radiorreceptor (RRA). Para el marcaje radiactivo de la hormona con ^{125}I se utiliza una modificación del método de la cloramina T (26) y como hormona se utiliza IGF-2 recombinante humano de R&D Systems (Abingdon, UK). En ambos casos, el método incorpora un pretratamiento de las muestras para evitar interferencias de las IGFBPs.

8.3. Determinación de la proliferación celular

Para valorar *in vitro* la proliferación de islotes fetales inducida por glucosa y por el factor de crecimiento IGF-1 se usa un kit de enzimoimmunoanálisis colorimétrico (Roche Diagnostics), basado en la medida de la incorporación de BrdU durante la síntesis de DNA *de novo*.

Se recogen grupos de 25 islotes fetales procedentes de cultivo primario que se llevan a una placa de cultivo donde se adiciona el medio correspondiente a cada condición [RPMI-1640 con glutamina suplementado con 3 mM ó 17 mM de glucosa, con o sin IGF-1

(100 ng/ml) y 1% de antibióticos]. Al día siguiente se añade la BrdU (concentración final: 10 μ M) y se incuban los islotes durante veinte horas a 37° C y 5% CO₂. Pasado el periodo de incubación se aplica el protocolo indicado en el kit.

9. Cálculos estadísticos

Los resultados obtenidos se expresan como la media aritmética de cada serie de valores y su error estándar (E.S.). Para determinar el grado de significación estadística de la diferencia de dos medias, se utiliza la «*t*» de Student. En el caso en el que se comparen más de dos medias, el cálculo del grado de significación estadística se determina mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

RESULTADOS

Características generales de los animales (Tabla 1)

El estudio *in vitro* de la respuesta insulino-secretora de los islotes fetales mostró que la liberación de insulina en la población subnutrida respecto a la control era mayor en las dos condiciones estudiadas. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que los fetos procedentes de madres subnutridas tienen unos valores de insulínemia y contenido de insulina por islote, significativamente superior a los de fetos controles. Por lo tanto, para comparar los niveles relativos de insulina liberada por los islotes, controles y subnutridos, la secreción de insulina fue normalizada en función del contenido por islote de la misma, encontrándose que la liberación de insulina era similar en ambas poblaciones, lo que parecía indicar que la subnutrición afectaba el contenido de insulina pero no el mecanismo secretor de la hormona.

La valoración de la oxidación de glucosa en el ciclo de Krebs puso de manifiesto una importante estimulación de la ruta oxidativa mitocondrial de la glucosa en la población subnutrida.

TABLA 1. *Características generales de fetos a término procedentes de madres controles y subnutridas. Los datos se expresan como la media \pm E.S. Número de datos 12-14*

	<i>Control</i>	<i>Subnutridas</i>
Peso corporal (g)	5,04 \pm 0,05	4,17 \pm 0,09a
Peso páncreas (mg)	20,01 \pm 0,43	17,51 \pm 0,53a
Glucemia (mg/100 ml)	51,4 \pm 3,1	52,1 \pm 1,7
Insulinemia (μ U insulina/ml)	171,3 \pm 10,2	218,1 \pm 9,7a
Contenido de insulina por islote (μ U insulina/islote)	1.541 \pm 93	3.144 \pm 117a
Glucosa 2,8 mM	1,24 \pm 0,042	1,18 \pm 0,06
Secreción de insulina (% contenido de insulina por islote)		
Glucosa 16,7 mM	2,85 \pm 0,17b	3,13 \pm 0,13b
Glucosa 2,8 mM	3,31 \pm 0,22	3,70 \pm 0,16
Oxidación de D-(6- ¹⁴ C)glucosa (pmol/islote/120 min.)		
Glucosa 16,7 mM	5,11 \pm 0,17b	9,03 \pm 0,33ab

^ap < 0,05 relativo a ratas controles, ^bp < 0,05 relativo a glucosa 2,8 mM.

Estudio de la expresión del mRNA de insulina

El análisis densitométrico del mRNA pancreático de insulina mostró que la subnutrición provocaba un aumento de cuatro veces en los niveles del mismo en relación a lo encontrado en los fetos controles (Figura 2).

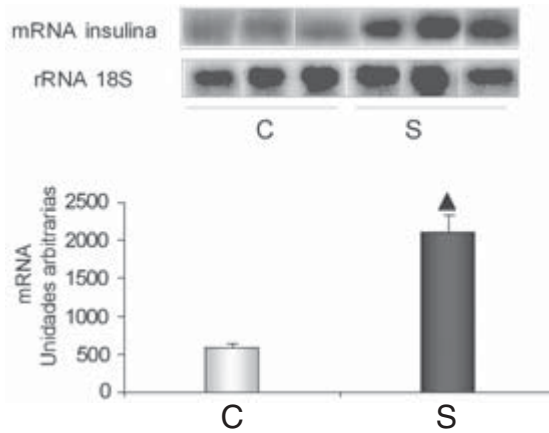


FIGURA 2. *Análisis mediante Northern blot de los niveles del mRNA de insulina en páncreas de fetos controles (C) y subnutridos (S). Se cargaron 30 µg de mRNA total por experimento. La carga fue normalizada por hibridación con la sonda de la subunidad 18S ribosomal. Los datos se expresan como unidades arbitrarias de la media ± E.S. de cinco experimentos independientes. ▲p < 0,05 relativo a ratas controles.*

Dado que la expresión del gen de insulina estimulada por glucosa está regulada por el factor de transcripción PDX-1, el cual a su vez es activado por la PI3K y la p38/SAPK2, valoramos los niveles de estas tres proteínas. Los resultados de las Figuras 3A y B muestran que los niveles proteicos de PDX-1 y p85(PI3K) fueron similares entre la población control y subnutrida, mientras que el contenido en islote de p38/SAPK2 se vio incrementado significativamente como consecuencia de la restricción nutricional (Figura 3C).

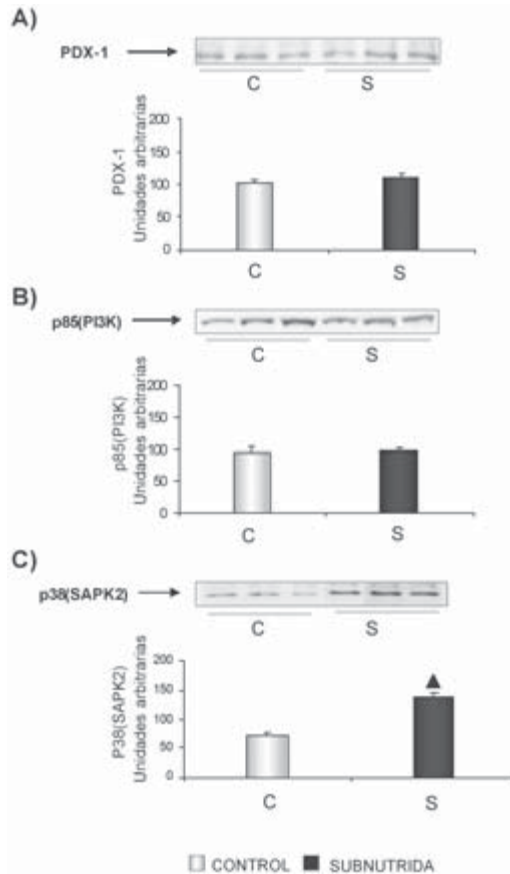


FIGURA 3. **Contenido proteico de PDX-1 (A), de la subunidad p85 de la PI3K (B) y de la p38/SAPK2 (C) en islotes aislados de fetos a término, controles (C) y subnutridos (S).** Las imágenes muestran una autorradiografía representativa de seis experimentos realizados donde cada banda contiene 50 µg de extracto de proteína de los islotes aislados. Los datos se expresan como unidades arbitrarias de la media ± E.S. ▲p < 0,05 relativo a ratas controles.

Niveles séricos de los IGFs

El IGF-1 en suero fue valorado por enzimoimmunoanálisis, encontrándose una disminución significativa de sus niveles en los fetos a término procedentes de madres subnutridas en relación a los datos

de la población control. Sin embargo, la valoración por el método del radioreceptor de los niveles séricos de IGF-2 no reveló diferencia alguna entre ambos grupos (Figura 4A).

Expresión génica de IGF-1/2 en hígado y páncreas

Aunque el hígado es la principal fuente de producción de los IGFs, estos también se expresan en el páncreas endocrino fetal.

Las medidas densitométricas obtenidas a partir de la realización del ensayo de protección de la ribonucleasa revelaron que la expresión en hígado del mRNA de IGF-1 se encontraba significativamente disminuida en los fetos procedentes de madres subnutridas en comparación con el grupo control, mientras que la expresión hepática del IGF-2 fue similar entre ambas poblaciones (Figura 4B).

En la Figura 4C se observa que los niveles pancreáticos del mRNA de IGF-1 en fetos subnutridos eran significativamente superiores a los encontrados en el grupo control. Por otro lado, la expresión hepática de IGF-2 aparecía significativamente reducida.

Respuesta mitogénica a los IGFs en islotes aislados de fetos: estudio inmunohistoquímico

Al adicionar al medio de cultivo IGF-1/2 se indujo un aumento significativo de la replicación de las células β tanto en el grupo control como en el subnutrido en relación a los valores basales obtenidos en ausencia de IGFs (de $0,972 \pm 0,11$ en ausencia de IGFs a $1,61 \pm 0,1$ con IGF-1 ó $1,67 \pm 0,12$ con IGF-2 en el caso del grupo control; de $1,21 \pm 0,13$ en ausencia de IGFs a $2,68 \pm 0,14$ con IGF-1 ó $3 \pm 0,22$ con IGF-2 para el grupo subnutrido). No se halló diferencia alguna entre el efecto mitogénico de IGF-1 y de IGF-2. Sin embargo, la respuesta mitogénica a los IGFs en la población subnutrida fue significativamente superior a la encontrada en el grupo control posiblemente debido al mayor contenido de IGF-1R que presentan sus islotes fetales.

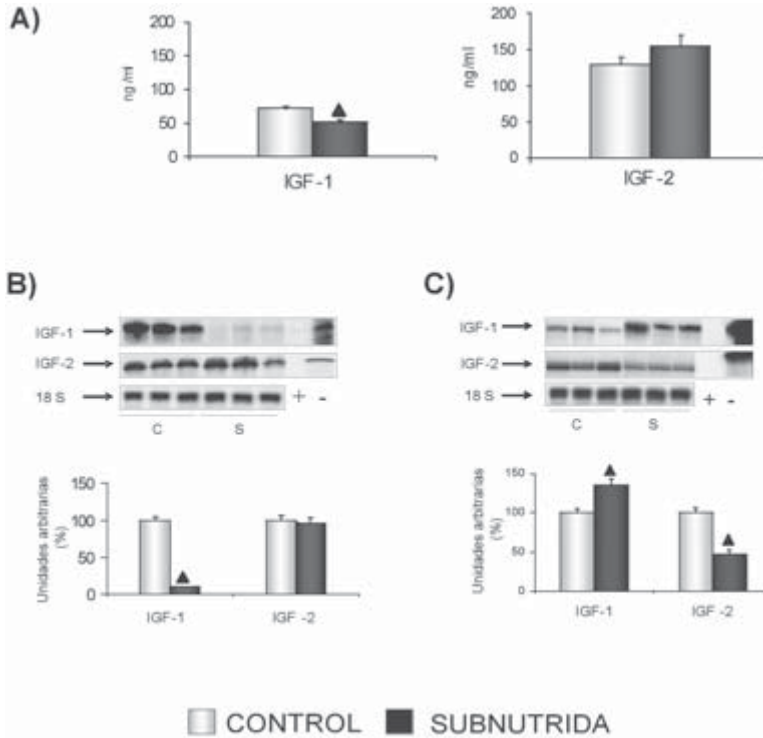


FIGURA 4. (A) Concentración en suero de IGF-1 y -2 en fetos de 21,5 días de gestación controles y subnutridos. Los datos se expresan como la media \pm E.S. de 11-12 observaciones diferentes dentro de cada grupo. Los fetos fueron obtenidos de entre 5-7 camadas distintas. Ensayo de protección de la ribonucleasa de los transcritos hepáticos (B) y pancreáticos (C) de IGF-1 y -2 en fetos controles (c) y subnutridos (s) de 21,5 días de gestación. Los controles + y - se obtuvieron por tratamiento de la ribosonda con o sin RNasas respectivamente. Las autorradiografías que se muestran son representativas de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como la media \pm E.S. de 8-9 observaciones distintas dentro de cada grupo. Los fetos fueron obtenidos de entre 4-6 camadas diferentes. ▲ $p < 0,05$ relativo a ratas controles.

Hay que señalar que el número de células β por islote aislado fue similar entre los fetos subnutridos y los controles (361 ± 39 , $n = 15$ vs. 335 ± 24 , $n = 14$).

Efecto mitogénico inducido por la glucosa y el IGF-1 sobre los islotes aislados de fetos: estudio por enzimoanálisis

Una vez visto que tanto la expresión pancreática del IGF-1 como el metabolismo oxidativo de la glucosa estaban incrementados en los fetos subnutridos, y dado que ambos son capaces de estimular el crecimiento de las células β durante el periodo fetal de un modo sinérgico, quisimos estudiar el efecto mitogénico de estos factores en islotes fetales controles y subnutridos.

El aumento de la concentración de glucosa de 3 a 17 mM incrementó en las dos poblaciones el índice de proliferación, siendo este aumento todavía mayor cuando se añadió IGF-1 al medio. Sin embargo, el efecto mitogénico producido por el IGF-1, a las dos concentraciones de glucosa utilizadas, fue significativamente más elevado en los islotes subnutridos en comparación con la respuesta encontrada en sus correspondientes controles (Figura 5).

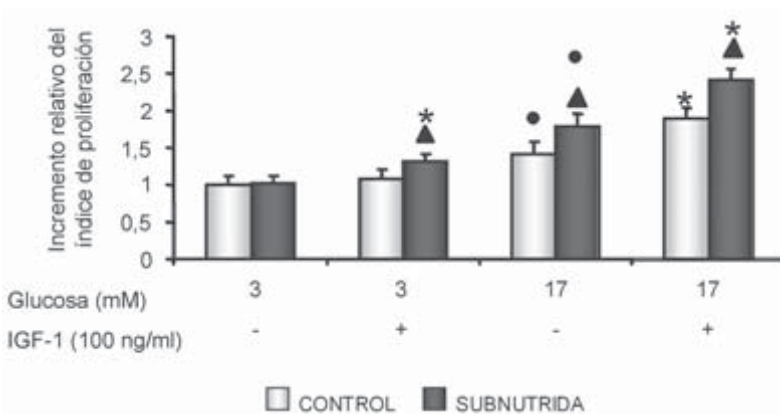


FIGURA 5. *Índice de proliferación en islotes fetales aislados de ratas controles y subnutridas.* El índice de incorporación de BrdU fue determinado, para cada condición y experimento, sobre cinco pocillos diferentes y se realizaron cuatro experimentos independientes ($n = 20$). Los datos se expresan como la media \pm E.S. respecto al valor obtenido dentro de cada población a 3 mM de glucosa. $\blacktriangle p < 0,05$ relativo a islotes fetales controles en la misma condición, $\bullet p < 0,05$ relativo al incremento de glucosa dentro de cada población, $* p < 0,05$ relativo a la misma concentración de glucosa en ausencia de IGF-1 dentro de cada población.

Niveles proteicos del receptor de IGF-1 y fosforilación del mismo

El efecto mitogénico del IGF-1 es mediado a través de la interacción con su receptor, el IGF-1R. Los islotes fetales, controles y subnutridos, tras dos días de cultivo se mantuvieron durante 20 horas más a 3 mM de glucosa y sin suero (periodo de quiescencia). A continuación, los islotes quiescentes bien se lisaron directamente o tras el periodo de estimulación con 3 ó 17 mM de glucosa \pm 100 ng/ml de IGF-1. Estas condiciones son comunes para todas las determinaciones.

Como se muestra en la Figura 6A, los niveles proteicos del IGF-1R encontrados en la población subnutrida fueron un 30% superiores a los datos obtenidos en el grupo control. La estimulación de los islotes fetales durante 5 minutos con IGF-1 indujo, en ambas poblaciones, un aumento significativo de la fosforilación en tirosina del receptor; si bien, este aumento fue significativamente superior en los fetos subnutridos (Figura 6B).

Contenido proteico de IRS-2 y su asociación con la subunidad reguladora p85 de la PI3K

Como la autofosforilación del IGF-1R y la activación de su actividad tirosina kinasa, conduce a la fosforilación en tirosina del IRS-2, quisimos saber si la subnutrición podía estar afectando el contenido proteico del IRS-2.

En la Figura 7A se puede apreciar que los niveles proteicos de IRS-2 en los islotes procedentes de fetos subnutridos eran el doble que los valores encontrados en la población control. Observamos también una mayor asociación, tanto en condiciones basales como tras la estimulación con glucosa e IGF-1, de IRS-2 con la subunidad reguladora de la PI3K (Figura 7B).

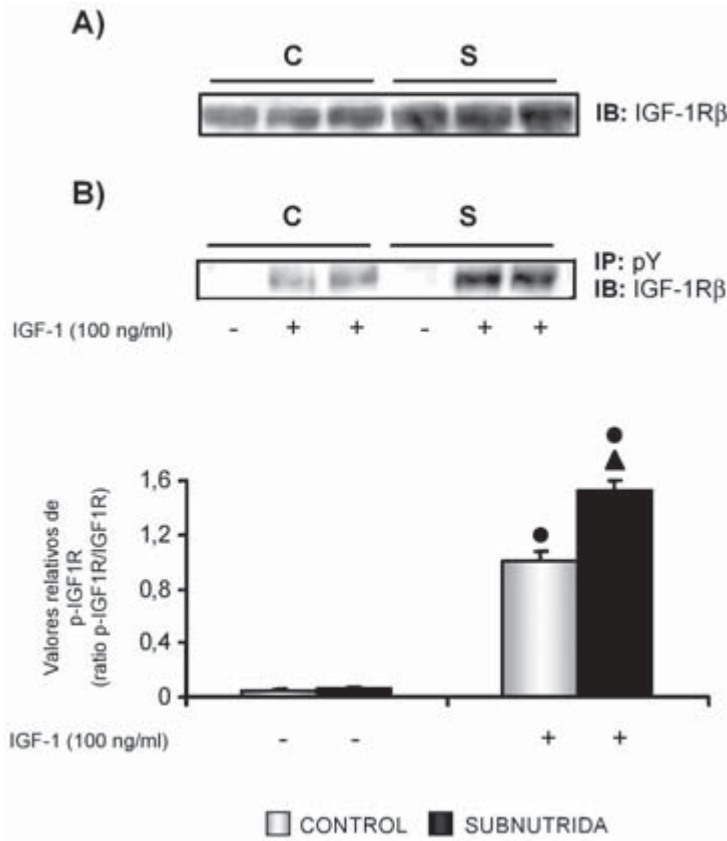


FIGURA 6. Efecto de la subnutrición sobre el contenido proteico (A) y fosforilación (B) del IGF-1R. Los datos se expresan como la media \pm E.S. de tres experimentos independientes. \blacktriangle $p < 0,05$ relativo a islotes fetales controles de la misma condición, \bullet $p < 0,05$ relativo a islotes fetales de su misma población en ausencia de IGF-1.

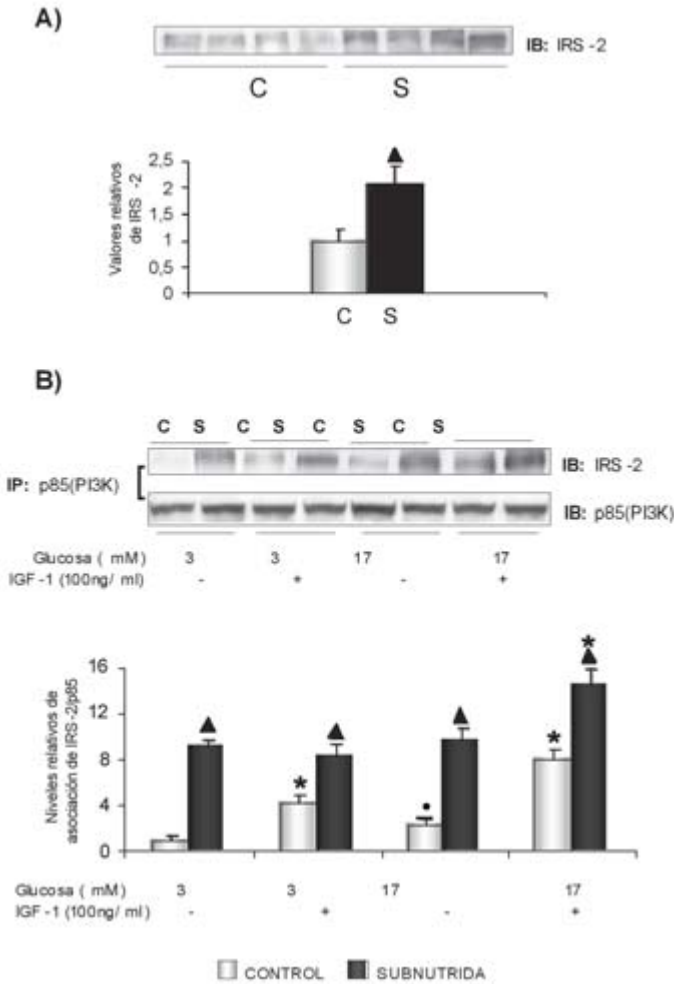


FIGURA 7. Efecto de la subnutrición sobre el contenido proteico de IRS-2 (A) y su asociación con la subunidad reguladora p85 de la PI3K (B). Los datos de cuatro experimentos independientes se expresan como la media \pm E.S. respecto al valor obtenido en la población control a 3 mM de glucosa. $\blacktriangle p < 0,05$ relativo a islotes fetales controles de la misma condición, $*p < 0,05$ relativo al incremento de glucosa dentro de cada población, $*p < 0,05$ relativo a la misma concentración de glucosa en ausencia de IGF-1 dentro de cada población.

Contenido proteico y fosforilación de Akt, GSK3 y PKC ζ

El incremento en la asociación entre IRS-2/p85 conduce a un aumento en los niveles de fosforilación de Akt, la cual desempeña un papel fundamental no sólo en la proliferación de las células β , sino también en su supervivencia. Nosotros hemos encontrado en la población subnutrida que Akt está constitutivamente activa y que los niveles de fosforilación de la misma son considerablemente mayores que lo encontrado en el grupo control bajo todas las condiciones estudiadas (Figura 8A). Asimismo, se analizaron los niveles de fosforilación de diversas dianas de Akt. Respecto a GSK3, únicamente aparecieron incrementados (60%) en relación a los valores controles en situación basal (Figura 8B). Otra diana de la Akt, la isoforma atípica ζ de la proteína kinasa C (PKC ζ), también se encuentra constitutivamente activa en los islotes procedentes de fetos subnutridos puesto que en situación basal los niveles de fosforilación de ésta fueron cinco veces superiores a lo observado en los islotes de la población control (Figura 8C).

Contenido proteico y fosforilación de mTOR, p70S6K y 4EBP-1

Uno de los múltiples factores que determinan la masa de células β es el tamaño celular, el cual generalmente se relaciona con la síntesis de proteínas. En este sentido, cabe destacar el mTOR, cuya fosforilación-activación por parte de la Akt conduce a su vez, a la fosforilación de dos proteínas implicadas en el control de la traducción de proteínas, la p70S6K y la 4EBP-1. Como se muestra en la Figura 9A, en los islotes procedentes de fetos subnutridos mTOR se encontró ya activo en situación basal y durante todo el estudio los niveles de mTOR fosforilado fueron superiores en el grupo subnutrido en comparación con el control. Como cabría esperar, en el grupo subnutrido se encontró que la p70S6K estaba constitutivamente activada y, en presencia de IGF-1, tanto a una concentración basal como estimulante de glucosa, esta fosforilación fue significativamente superior a lo observado en el grupo control (Figura 9B). De modo similar, en situación basal los niveles de fosforilación de la 4EBP-1 también fueron significativamente más elevados en la población subnutrida en relación a lo encontrado en los islotes procedentes de fetos controles y permanecieron así durante todo el estudio (Figura 9C).

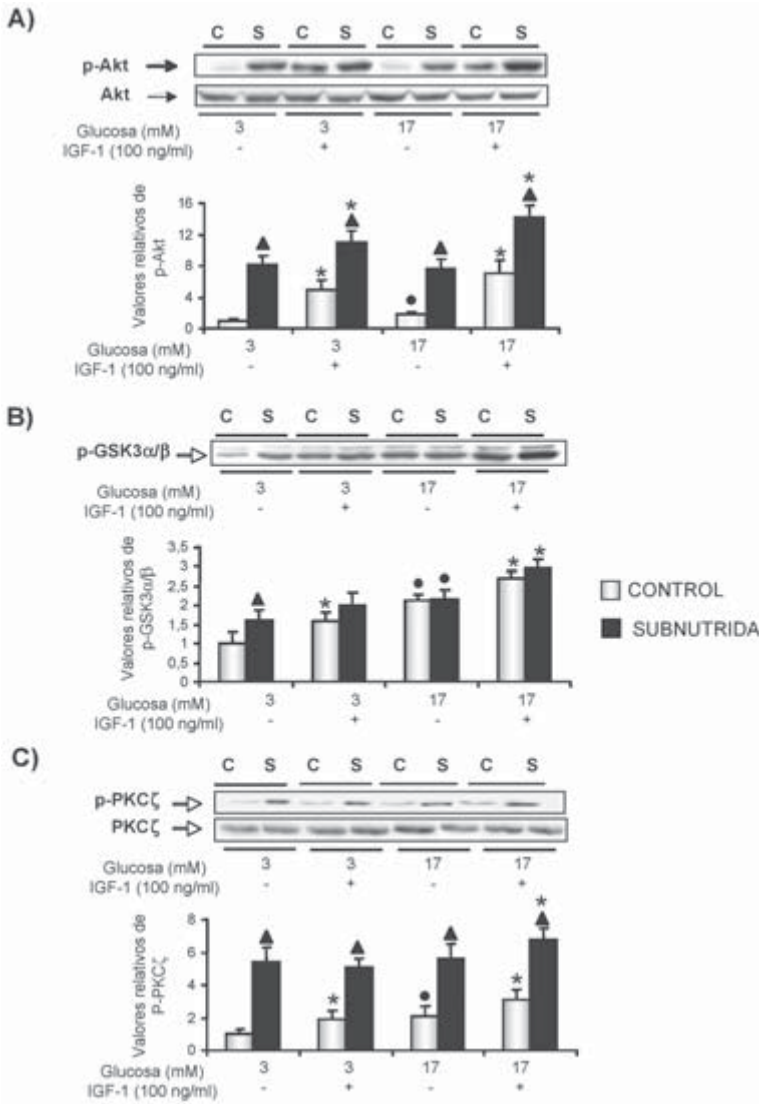


FIGURA 8. Efecto de la subnutrición sobre el contenido proteico y fosforilación de Akt (A), GSK3 (B) y PKCζ (C). Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Los datos se expresan como la media ± E.S. respecto al valor obtenido en la población C a 3 mM de glucosa. ▲ $p < 0,05$ relativo a islotes fetales C de la misma condición, * $p < 0,05$ relativo al incremento de glucosa dentro de cada población, * $p < 0,05$ relativo a la misma concentración de glucosa sin IGF-1 dentro de cada población.

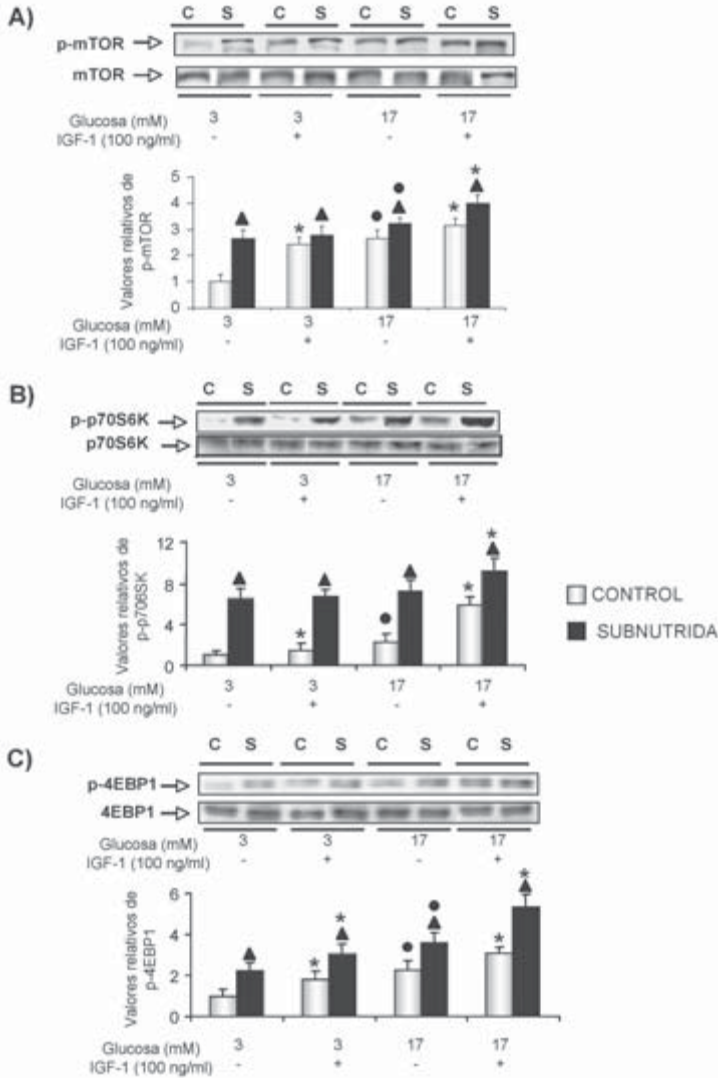


FIGURA 9. Efecto de la subnutrición sobre el contenido proteico y fosforilación de mTOR (A), p70S6K (B) y 4EBP-1 (C). Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Los datos se expresan como la media \pm E.S. respecto al valor obtenido en la población control a 3 mM de glucosa. $\blacktriangle p < 0,05$ relativo a islotes fetales C de la misma condición, $\bullet p < 0,05$ relativo al incremento de glucosa dentro de cada población, $\ast p < 0,05$ relativo a la misma concentración de glucosa sin IGF-1 dentro de cada población.

Contenido proteico y fosforilación de Erk-1/2 en islotes pancreáticos fetales

La glucosa puede también inducir la fosforilación-activación de Erk-1/2 en las células β , independientemente de IRS-2. La activación de la ruta de las MAPK es un requisito esencial en la estimulación del proceso mitogénico de las células β inducido por glucosa e IGF-1. Por este motivo decidimos estudiar cuál podría ser el efecto de la subnutrición en los pasos finales de esta vía.

Tanto en islotes controles como en subnutridos, el aumento de glucosa en el medio indujo un incremento significativo en la fosforilación de las Erks, siendo este aumento mayor en presencia de IGF-1. Pero al contrario de lo encontrado en la vía del IRS-2/Akt/P70S6K, parecía no existir efecto alguno de la malnutrición sobre la activación de las Erks por glucosa e IGF-1 (Figura 10).

DISCUSIÓN

Una reducción de la ingesta diaria de alimento del 65%, durante la tercera semana de gestación, provoca en las ratas gestantes un daño en la secreción *in vivo* de insulina, así como intolerancia a la glucosa (5). Además, la alteración de la homeostasis glucídica materna en este modelo, conduce a un incremento de la masa de células β y a hiperinsulinemia en los fetos a término. El presente estudio trata de determinar qué cambios metabólicos y moleculares podrían ser los responsables de las alteraciones observadas en la etapa fetal.

La hiperinsulinemia descrita en los fetos subnutridos viene acompañada de un incremento en el contenido de insulina por islote, así como de una mayor liberación de insulina estimulada por glucosa. Sin embargo, cuando el índice de secreción de insulina se normalizó en relación al contenido de insulina por islote, la fracción de insulina liberada fue similar a la encontrada en el grupo control. Estos resultados indican que el mecanismo secretor de las células β en los animales subnutridos no está dañado y a la vez son indicativos del papel regulador del contenido de insulina en la propia liberación de la hormona.

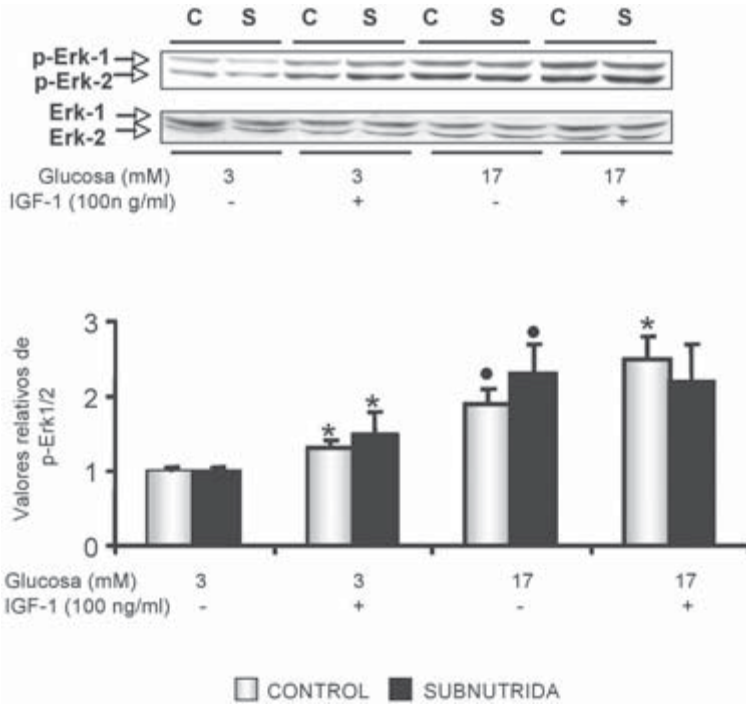


FIGURA 10. **Efecto de la subnutrición sobre el contenido proteico y fosforilación de Erk-1/2.** Se muestra un experimento representativo de cinco realizados. Los datos se expresan como la media \pm E.S. respecto al valor obtenido en la población control a 3 mM de glucosa. * $p < 0,05$ relativo al incremento de glucosa dentro de cada población, * $p < 0,05$ relativo a la misma concentración de glucosa sin IGF-1 dentro de cada población.

Para determinar si las alteraciones observadas en el contenido de insulina podrían ser causadas por cambios en la expresión del gen de insulina, nos propusimos valorar los niveles del mRNA de insulina en el páncreas de los animales controles y subnutridos. En línea con las observaciones anteriores encontramos que éste estaba incrementado en los fetos subnutridos en comparación con el correspondiente grupo control. Estos elevados niveles del mRNA de insulina podrían ser el resultado de un incremento en los requisitos de insulina, como consecuencia de episodios hiperglucémicos postprandiales generados por la alteración de la homeostasis glucídica presente en las ratas gestantes (5).

El principal estímulo fisiológico para la síntesis de insulina es la glucosa. Dado que la glucosa regula la producción de insulina por medio de señales procedentes de la ruta glucolítica, nos planteamos valorar en islotes fetales si se había producido alguna adaptación del metabolismo de la glucosa en el interior de la células β como consecuencia de la subnutrición. La medida del flujo glucolítico total no puso de manifiesto ninguna perturbación de la concentración de glucosa intracelular, lo cual indicaba que la captación de glucosa por las células β no estaba dañada (datos no mostrados). Sin embargo, y en línea con los resultados mostrados de expresión y contenido de insulina, los islotes procedentes de fetos subnutridos expuestos a una concentración estimulante de glucosa (16,7 mM), incrementaron significativamente la oxidación de glucosa en el ciclo de Krebs con respecto a los valores controles. Estos resultados sugieren que las alteraciones encontradas en la expresión del gen de insulina podrían estar relacionadas, al menos en parte, con cambios en la oxidación mitocondrial de glucosa.

Los resultados concernientes a las alteraciones encontradas en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, que parecen conducir a cambios en la síntesis de insulina pero no en el mecanismo secretor, revelan que, aunque la síntesis y secreción de insulina estimuladas por glucosa comparten determinados pasos de la misma cascada de señales, ambos procesos deben, necesariamente, divergir en algún punto. Recientemente se ha visto que este punto de divergencia parece hallarse en algún paso de la anaplerosis, por debajo de la glucólisis y por encima de la fosforilación oxidativa (27). La naturaleza de las señales procedentes del metabolismo de la glucosa que conectan con la expresión y síntesis de insulina no están todavía totalmente establecidas, pero nuestros resultados parecen situar estas señales en el ciclo de Krebs, de acuerdo con otros autores (27, 28).

La transcripción del gen de insulina viene determinada por la interacción entre diversos elementos reguladores y factores de transcripción, entre los que cabe destacar el PDX-1 como uno de los principales mediadores del efecto de la glucosa sobre la expresión del gen de insulina (9). Aunque los niveles proteicos de PDX-1 en islotes de fetos subnutridos fueron similares a los del grupo control, los niveles de la p38/SAPK2, proteína implicada en la activación de PDX-1 (10), se encontraron significativamente elevados. SAPK2 es

un miembro de la extensa familia de proteínas kinasas activadas por mitogénos que se caracteriza por activarse en respuesta a estímulos adversos (10). El incremento detectado en los niveles de p38/SAPK2 sugiere que la restricción nutricional en los fetos podría suponer una situación de estrés y, que como tal, indujese en los islotes la respuesta correspondiente. Resultados similares se han descrito en islotes procedentes de ratas neonatales sometidas a una dieta rica en carbohidratos, en los que el incremento detectado en los niveles del mRNA de insulina y en la actividad de SAPK2 se relacionó con una situación de estrés provocada por el tratamiento nutricional (29). Por otro lado, se ha encontrado que la sobreexpresión de SAPK2 parece mimetizar los efectos de la glucosa resultando en una hiperestimulación de la ruta de activación de PDX-1 (11). Además del estrés, el metabolismo de la glucosa es capaz de activar p38/SAPK2 a través de una cascada de señales que implica la participación de PI3K (10, 11). Aunque no se detectaron variaciones en los niveles de PI3K de los animales subnutridos, no podemos descartar la posibilidad de que el aumento descrito en el metabolismo oxidativo de los fetos subnutridos pudiera estar causando una mayor activación de PI3K y, en consecuencia, de p38/SAPK2. Por tanto, teniendo en cuenta que la activación de PDX-1 parece estar regulada por algún metabolito(s) derivado de la glucosa, las alteraciones causadas en el metabolismo oxidativo de la glucosa por la subnutrición, podrían estar, de algún modo, afectando la expresión del mRNA de insulina.

Por otro lado, como en nuestro modelo de malnutrición global los fetos a término presentan un incremento en la masa de células β , quisimos saber si la subnutrición estaba alterando la disponibilidad de factores de crecimiento, tales como los IGFs y, en qué grado, esta disponibilidad podría estar determinando el aumento de la masa de células β observado.

La mayoría de los estudios sobre la regulación nutricional del IGF-1 se han realizado en el hígado y en todos estos estudios, además de en aquellos pocos en los que se han investigado otros tejidos, se ha observado que la subnutrición disminuye la expresión génica y proteica del IGF-1 durante el periodo neonatal y adulto (17), así como durante la etapa fetal (25, 30). En concordancia con estas investigaciones, los fetos subnutridos presentan reducidos niveles hepáticos del mRNA de IGF-1 y, probablemente, consecuencia de

esto sean los bajos niveles séricos de IGF-1 observados. De hecho, existen antecedentes de una reducción de los niveles circulantes de IGF-1 en situaciones de restricción nutricional (25, 30, 31). Por el contrario, y en línea con estudios previos (25, 31), no hemos detectado variación alguna en los niveles séricos y hepáticos de IGF-2 como consecuencia de la malnutrición global. Estos datos parecen indicar, como ya se había descrito anteriormente (15), que el IGF-1 es más sensible que el IGF-2 a cambios de la dieta materna, independientemente de la causa o naturaleza del déficit nutricional.

Se sabe que durante la vida fetal y principios de la postnatal, las acciones del IGF-1 son fundamentalmente locales, de modo que los IGFs producidos por el páncreas actuarían de forma autocrina/paracrina y estarían implicados en la regulación del crecimiento y diferenciación de los islotes (14). En este sentido, parece lógico pensar que el incremento encontrado en los niveles pancreáticos del mRNA de IGF-1 en fetos procedentes de madres subnutridas podría estar desempeñando un importante papel en el aumento de su masa de células β . De acuerdo con nuestras observaciones, en otro modelo de malnutrición (32) se ha descrito una elevada expresión génica de IGF-1 en cerebro de ratón, lo cual ha sido relacionado con un efecto protector de este órgano frente a la carencia de nutrientes. En este sentido, la expresión local de IGF-1, protegería el páncreas endocrino de los fetos del impacto de la subnutrición materna, en un periodo crítico para el desarrollo del páncreas. Además, dado que la insulina es un importante regulador del crecimiento, de la función y de la supervivencia de las células β (14), la hiperinsulinemia que presentan los fetos subnutridos podría estar también contribuyendo a elevar la masa de células β , es decir, el IGF-1 y la insulina podrían estar actuando cooperativamente.

Por otro lado, la producción pancreática de IGF-2 aparece significativamente reducida en los fetos subnutridos. Esto está en concordancia con las observaciones descritas en fetos procedentes de madres sometidas a restricción proteica (33). Sin embargo, en estos estudios, la baja expresión pancreática de IGF-2 se correlaciona con una masa de células β reducida, mientras que en el presente trabajo no se observa este patrón. Parece ser que bajo nuestras condiciones de estudio, la influencia de la malnutrición materna sobre el sistema de IGFs es específica de tejido.

Cuando, se analizó *in vitro* la respuesta mitogénica de las células β a los IGFs se observó que tanto IGF-1 como -2, inducían la proliferación de las células β . Ahora bien, esta respuesta fue significativamente superior en la población subnutrida, posiblemente como consecuencia del mayor contenido en islote de receptores de IGF-1. Aunque el IGF-1 es más mitógeno que el IGF-2, no se observaron diferencias en el índice de proliferación inducido por estos factores, ni en la población control ni en la subnutrida, debido, seguramente, a que ambos factores actúan a través del mismo receptor, el IGF-1R.

A la vista de estos resultados, el siguiente objetivo que nos planteamos fue caracterizar el sistema de transducción de señales de la glucosa e IGF-1 que podrían estar implicadas en la mayor masa de células β encontrada en los fetos subnutridos. Con este fin, hemos desarrollado un modelo *in vitro* de islotes fetales primarios que fueron cultivados 48 horas con 11 mM de glucosa. Posteriormente, estos islotes se mantuvieron 20 horas más en un medio libre de suero con 3 mM de glucosa (periodo de quiescencia). Este procedimiento experimental nos permitió obtener mejores condiciones fisiológicas y minimizar los posibles efectos que sobre la ruta de señales del IGF-1 podría tener la glucosa y el suero tras un prolongado periodo de cultivo.

En primer lugar encontramos que la glucosa era capaz de estimular la replicación de las células β en islotes fetales cultivados dos días, si bien esta respuesta aparecía significativamente elevada en el grupo subnutrido. La adición al medio de IGF-1 en los cultivos de islotes controles tan sólo indujo una mayor replicación a 17 mM de glucosa, lo cual no es sorprendente, puesto que el IGF-1 sólo provoca una respuesta mitogénica en presencia de un rango fisiológico de concentraciones de glucosa de entre 6 a 18 mM (18). Sin embargo, en los islotes subnutridos, incluso a 3 mM de glucosa, se detectó un incremento en el índice mitótico en respuesta al estímulo de IGF-1. Estos resultados sugieren que los islotes fetales subnutridos presentan una mayor sensibilidad a glucosa y a IGF-1 que el grupo control.

Para identificar el mecanismo subyacente a la mayor respuesta replicativa encontrada en la población subnutrida valoramos, tanto en islotes fetales controles como subnutridos, los niveles de diferentes proteínas implicadas en la vía mitogénica del IGF-1 y su fosforilación después de estimular con IGF-1 y glucosa. Para que el IGF-1 desem-

peñe su acción sobre el crecimiento celular, es necesario que interactúe con su receptor presente en las células β (18). Como consecuencia, el incremento encontrado en los islotes fetales subnutridos, en cuanto al contenido y fosforilación del IGF-1R, podría estar favoreciendo la acción mitogénica del IGF-1. Asimismo, la activación del IGF-1R conduce a la fosforilación en tirosina y consecuente activación del IRS-2, el cual está implicado de modo trascendental en el crecimiento de las células β . Así, por ejemplo, se ha visto que la sobreexpresión de IRS-2 promueve la replicación de células β , la neogénesis y la supervivencia (34). En este sentido, nosotros hemos encontrado un incremento significativo de los niveles de IRS-2 en los islotes de fetos procedentes de madres subnutridas, además de una mayor asociación, tanto en condiciones basales como tras la estimulación con glucosa e IGF-1, de IRS-2 con la subunidad reguladora de la PI3K. Parece ser, que cuando se produce un aumento en la expresión de IRS-2, esta proteína se dirige hacia la membrana plasmática de las células β favoreciéndose entonces su fosforilación basal en tirosina y, por tanto, incrementando la activación de la señalización a través de IRS-2/PI3K/Akt tanto en situación basal como en respuesta a glucosa e IGF-1 (35). En relación con esto, la mayor activación observada, en los islotes subnutridos, de la cascada de señales de la PI3K podría ser consecuencia de los elevados niveles de IRS-2. Esta respuesta se correlaciona además, con el incremento descrito en la replicación, inducida por glucosa e IGF-1, de las células β en los islotes de fetos subnutridos, lo que reafirma el importante papel del IRS-2 en la proliferación de las células β . Es interesante señalar que la glucosa, a través de su metabolismo oxidativo, es capaz de aumentar específicamente el nivel de expresión endógena de IRS-2 (36). En relación con esto y teniendo en cuenta que los islotes de fetos subnutridos presentan una elevada oxidación mitocondrial de glucosa, sugerimos que este elevado metabolismo oxidativo podría estar relacionado con el incremento detectado en el contenido de IRS-2 de estos islotes.

Asimismo, es importante mencionar que la activación de Akt, kinasa situada por debajo de IRS-2, desempeña un papel fundamental en la supervivencia de las células β (37). Además, la glucosa por sí misma puede promover la supervivencia de las células β a través de la activación de la vía de señales PI3K/Akt. De este modo, se podría considerar que el hecho de que la Akt esté activada incluso

en situación basal conduce, en los fetos sometidos a restricción nutricional, a un incremento de la supervivencia y proliferación de las células β .

Para determinar el papel de la Akt en la respuesta mitogénica observada en los islotes de fetos subnutridos, evaluamos las dianas de la Akt que podrían estar implicadas en este proceso. Se ha descrito que la Akt puede activar una de las isoformas atípicas de la proteína kinasa C, la PKC ζ , la cual potencia la mitogénesis de las células β en respuesta al péptido similar a glucagón tipo 1 (GLP-1) (38). En este estudio, nosotros hemos encontrado que el incremento en la fosforilación de PKC ζ en la población subnutrida se correlaciona con el incremento en la fosforilación de Akt lo que sugiere una implicación de la PKC ζ en el aumento de la respuesta replicativa de los islotes subnutridos tras la estimulación con glucosa e IGF-1. A diferencia de la PKC ζ , el incremento en la fosforilación de la Akt en los islotes de fetos subnutridos, únicamente indujo mayor inhibición de GSK3 en situación basal, pero no en respuesta a IGF-1 y/o glucosa. Por lo tanto, podemos suponer que GSK3 no está implicada en la mayor replicación de las células β encontrada en el grupo subnutrido pero podría estar promoviendo procesos de supervivencia celular (39).

Por debajo de Akt, mTOR integra señales derivadas de factores de crecimiento y de nutrientes. Esta serina/treonina kinasa regula el crecimiento celular a través, de al menos, dos proteínas, la 4E-BP1 y la p70S6K, cuya activación conduce al aumento de la síntesis de proteínas en las células β . Nosotros hemos encontrado en este estudio que los niveles de fosforilación de mTOR estaban significativamente elevados en los islotes de fetos subnutridos en comparación con los valores controles, incluso en condiciones basales. Además, los mayores niveles de fosforilación de mTOR hallados en los islotes subnutridos se correlacionan con un incremento proporcional de la fosforilación de p70S6K y de 4E-BP1. Esta respuesta aumentada de mTOR parece deberse a la capacidad de la glucosa de activar esta proteína en las células β independientemente de IRS-2/Akt (40). Por lo tanto, es lógico pensar que el incremento descrito en el metabolismo oxidativo de la glucosa de los fetos subnutridos, podría estar contribuyendo a aumentar la fosforilación de mTOR y, en consecuencia, la replicación de las células β . Estos resultados ponen de manifiesto la importancia y necesidad de una óptima función mito-

condrial para la adecuada regulación del crecimiento y proliferación de las células β .

Es sorprendente que la respuesta replicativa de las células β de los islotes subnutridos no esté aumentada a 3 mM de glucosa en relación al grupo control, cuando, en condiciones basales, hemos encontrado que la fosforilación de Akt, PKC ζ , GSK3, 4E-BP1 y p70S6K sí estaba significativamente elevada. Sin embargo, basándonos en la literatura se sabe que para que se produzca la mitogénesis de las células β es necesaria no sólo la participación de Akt, si no también la de las Erk-1/2 y, en condiciones basales, esta última vía no se vio afectada. De hecho, el incremento observado en los islotes procedentes de fetos subnutridos en los niveles de IRS-2 tampoco tuvo efecto alguno sobre la activación, inducida por glucosa e IGF-1, de Erk-1/2, a pesar de que la proteína IRS-2 es común a las dos vías. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en células INS-1 (36). Aunque el metabolismo de la glucosa también media la activación de las Erks, la cascada de señales que provoca dicha activación es distinta de la implicada en la estimulación de mTOR (40). Así, al contrario de lo que ocurriría con mTOR, no hemos encontrado diferencia alguna en los niveles de fosforilación de las Erks entre los grupos control y subnutrido.

Nuestros resultados demuestran que los islotes de fetos procedentes de madres subnutridas presentan múltiples alteraciones en la ruta de señalización del IGF-1, lo que provoca una mayor activación de la vía del IRS-2/PI3K/Akt/mTOR y una respuesta mitogénica a glucosa e IGF-1 más potente. Todos estos cambios moleculares pueden estar contribuyendo al aumento de la masa de células β encontrado en los fetos subnutridos. Asimismo, y dado que el IRS-2 desempeña un importante papel promoviendo la supervivencia (36) y la neogénesis de las células β (34), el hecho de estar aumentado su contenido en los islotes subnutridos sugiere que ambos procesos podrían estar implicados en el incremento de la masa de células β descrito en esta población (Figura 11).

En conclusión, nuestro modelo animal de subnutrición intrauterina y crónica, es una herramienta muy útil para analizar, *in vivo* e *in vitro*, los efectos que distintos factores puedan tener sobre el desarrollo, crecimiento y funcionalidad de las células β . La compren-

sión de las señales moleculares implicadas en el crecimiento de dichas células, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, podría permitir poner en marcha futuras estrategias dirigidas a la prevención y tratamiento de la diabetes y de otros desórdenes metabólicos relacionados.

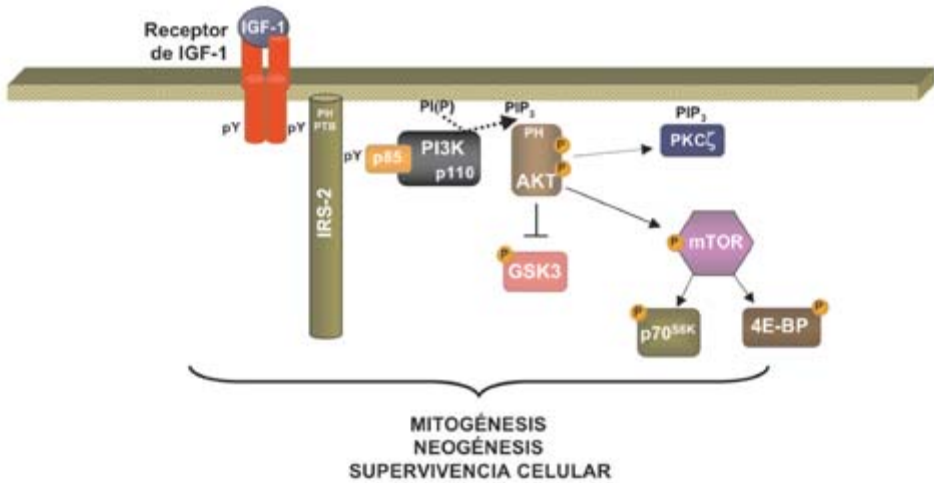


FIGURA 11. **Hiperactivación de la ruta de señalización del IRS-2/PI3K/Akt/mTOR** implicada en el incremento encontrado en la masa de células β de los fetos subnutridos.

AGRADECIMIENTOS

Elisa Fernández Millán es contratada Doctor del ISCIII-RETIC RD06.

El presente trabajo ha sido financiado por el Proyecto BFU2005-02849 (MEC) y por el ISCIII-RETIC RD06.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HALES, C. N. and BARKER, D. J. P. (1992): Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 35: 595-601.

- (2) DAHRI, S.; SNOECK, A.; REUSENS-BILLEN, B.; REMACLE, C. and HOET, J. J. (1991): Islet function in offspring of mothers on low protein-diet during gestation. *Diabetes*. 40: 115-120.
- (3) BERTIN, E.; GANGNERAU, M. N.; BELLON, G.; BAILBE, D.; ARBELOT DE VACQUEUR, A. and PORTHA, B. (2002): Development of beta cell mass in fetuses of rats deprived of protein and/or energy in last trimester of pregnancy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283: R623-R630.
- (4) GAROFANO, A.; CZERNICHOV, P. and BREANT, B. (1998): Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. *Diabetologia*. 41: 1114-1120.
- (5) ÁLVAREZ, C.; MARTÍN, M. A.; GOYA, L.; BERTIN, E.; PORTHA, B. and PASCUAL-LEONE, A. M. (1997): Contrasted impact of maternal rat food restriction on the fetal endocrine pancreas. *Endocrinology*. 138: 2267-2273.
- (6) OLIVER, M. H.; HAWKINS, P.; BREIER, B. H.; VAN ZIJL, P. L.; SARGISON, S. A. and HARDING, J. E. (2001): Maternal undernutrition during the periconceptual period increases plasma taurine levels and insulin response to glucose but not to arginine in the late gestation fetal sheep. *Endocrinology*. 142: 4576-4579.
- (7) AERTS, L.; HOLEMANS, K. and VAN ASSCHE, F. A. (1990): Maternal diabetes during pregnancy: Consequence for the offspring. *Diab. Metab. Rev.* 6: 147-167.
- (8) MARTÍN, M. A.; ÁLVAREZ, C.; GOYA, L.; PORTHA, B. and PASCUAL-LEONE, A. M. (1997): Insulin secretion in adult rats that had experienced different underfeeding patterns during their development. *Am. J. Physiol.* 272: E634-E640.
- (9) MACFARLANE, W.; READ, M.; GILLIGAN, M.; BUJALSKA, I. and DOCHERTY, K. (1994): Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner. *Biochem. J.* 303: 625-631.
- (10) MACFARLANE, W. M.; SMITH, S. B.; JAMES, R. F. L.; CLIFTON, A. D.; DOZA, Y. N.; COHEN, P. and DOCHERTY, K. (1997): The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by glucose in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 272: 20936-20944.
- (11) MCKINNON, C. M. and DOCHERTY, K. (2001): Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia*. 44: 1203-1214.
- (12) BERNARD-KARGAR, C. and KTORZA, A. (2001): Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions. *Diabetes*. 50: 30-35.
- (13) JONES, J. I. and CLEMMONS, D. R. (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews*. 16: 3-34.
- (14) HILL, D. J.; PETRIK, J. and ARANY, E. (1998): Growth factors and the regulation of fetal growth. *Diabetes Care Supplement*. 2: B60-B69.
- (15) FOWDEN, A. L. (2003): The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta*. 24: 803-812.
- (16) HILL, D. J.; STRUTT, B.; ARANY, E.; ZAINA, S.; CONKELL, S. and GRAHAM, C. F. (2000): Increased and persistent circulating insulin-like growth factor II in

- neonatal transgenic mice suppresses developmental apoptosis in the pancreatic islets. *Endocrinology*. 141: 1151-1157.
- (17) THISSEN, J. P.; KETESLEGERS, J. M. and UNDERWOOD, L. M. (1994): Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr. Rev.* 15: 80-101.
 - (18) HUGL, S. R.; WHITE, M. F. and RHODES, C. J. (1998): Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic b-cell growth is glucose dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-1 in INS-1 cells. *J. Biol. Chem.* 273: 17771-17779.
 - (19) HELLERSTRÖM, C.; LEWIS, N. J.; BORG, H.; JOHNSON, R. and FREINKEL N. (1979): Method for large-scale isolation of pancreatic islets by tissue culture of fetal rat pancreas. *Diabetes*. 28: 769-776.
 - (20) MALAISSE, W. J. and SENER, A. (1988): Hexose metabolism in pancreatic islets. Feedback control of D-glucose oxidation by functional events. *Biochem. Biophys. Acta*. 971: 246-254.
 - (21) BRADFORD, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
 - (22) CHOMCZYNSKI, P. and SACCHI, N. (1987): Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
 - (23) VALVERDE, A. M.; NAVARRO, P.; TERUEL, T.; CONEJO, R.; BENITO, M. and LORENZO M. (1999): Insulin and insulin-like growth factor I up-regulate GLUT-4 gene expression in fetal brown adipocytes in a phosphoinositide 3-kinase dependent manner. *Biochem. J.* 337: 397-405.
 - (24) AMASINO, R. M. (1986): Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. *Anal. Biochem.* 152: 304-307.
 - (25) STRAUSS, D. S.; OOI, G. T.; ORLOWSKI, C. C. and RECHLER, M. N. (1991): Expression of the genes of insulin-like growth factor-I (IGF-I)-IGF-II and IGF binding proteins-I and -II in fetal rat under conditions of intrauterine growth retardation caused by maternal fasting. *Endocrinology*. 128: 518-525.
 - (26) HUNTER, W. M. and GREENWOOD, F. C. (1962): Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*. 194: 495-496.
 - (27) ALARCÓN, C.; WICKSTEED, B.; PRENTKI, M.; CORKEY, B. E. and RHODES, C. J. (2002): Succinate is a preferential metabolic stimulus-coupling signal for glucose-induced proinsulin biosynthesis translation. *Diabetes*. 51: 2496:2504.
 - (28) LEIBOWITZ, G.; KHALDI, M. Z.; SHAUER, A.; PARNES, M.; OPRESCU, A. I.; CERASI, E.; JONAS, J. C. and KAISER, N. (2005): Mitochondrial regulation of insulin production in rat pancreatic islets. *Diabetología*. 48: 1549-1559.
 - (29) SRINIVASAN, M.; SONG, F.; AALINKEL, R. and PATEL, M. S. (2001): Molecular adaptations in islets from neonatal rats reared artificially on a high carbohydrate milk formula. *J. Nutr. Biochem.* 12: 575-584.
 - (30) EL-KHATTABI, I.; GREGOIRE, F.; REMACLE, C. and REUSENS, B. (2003): Isocaloric maternal low-protein diet alters IGF-I, IGFBPs and hepatocytes proliferation in fetal rats. *Am. J. Physiol.* 285: E991-E1000.

- (31) MUAKU, S. M.; BEAULOYLE, V.; THISSER, J.-P.; UNDERWOOD, L. E.; KELESLEPERS, J.-M. and MAITER, D. (1995): Effects of maternal protein malnutrition on fetal growth, plasma insulin-like growth factors, insulin-like growth factor binding protein and liver insulin-like growth factor gene expression in the rat. *Pediatr. Res.* 37: 334-342.
- (32) CALIKOGLU, A.; KARAYAL, A. and D'ERCOLE, A. (2001): Nutritional regulation of IGF-1 expression during brain development in mice. *Pediatr. Res.* 49: 197-202.
- (33) PETRIK, J.; REUSENS, B.; ARANY, E.; REMACLE, C.; COELHO, C.; HOET, J. J. and HILL, D. J. (1999): A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor II. *Endocrinology.* 140: 4861-4873.
- (34) HENNIGE, A. M.; BURKS, D. J.; OZCAN, U.; KULKARNI, R. N.; YE, J.; PARK, S.; SCHUBERT, M.; FISCHER, T. L.; DOW, M. A.; LESHAN, R.; ZAKARIA, M.; MOSSA-BASHA, M. and WHITE, M. F. (2003): Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic β cells prevents diabetes. *J. Clin. Invest.* 112: 1521-1532.
- (35) LINGOHR, M. K.; DICKSON, L. M.; WREDE, C. E.; MCCUAIG, J. F.; MYERS, M. G. and RHODES, C. J. (2003): IRS-3 inhibits IRS-2-mediated signalling in pancreatic β -cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 204: 85-99.
- (36) LINGOHR, M. K.; DICKSON, L. M.; WREDE, C. E.; BRIAUD, I.; MCCUAIG, J. F.; MYERS, M. G. and RHODES, C. J. (2003): Decreasing IRS-2 expression in pancreatic β -cells (INS-1) promotes apoptosis, which can be compensated for by introduction of IRS-4 expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 209: 17-31.
- (37) TUTTLE, R. L.; GRILL, N. S.; PUGH, W.; LEE, J. P.; KOEBERLEIN, B.; FURTH, E. E.; POLONSKY, K. S.; NAJI, A. and BIRNBAUM, M. J. (2001): Regulation of pancreatic β -cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt/PKB α . *Nat. Med.* 7: 1133-1137.
- (38) BUTEAU, J.; FOISY, S.; RHODES, C. J.; CARPENTER, L.; BIDEN, T. J. and PRENTKI, M. (2001): Protein kinase C ζ activation mediates glucagons-like peptide-1-induced pancreatic β -cell proliferation. *Diabetes.* 50: 2237-2243.
- (39) CHANG, F.; LEE, J. T.; NAVOLANIC, P. M.; STEELMAN, L. S.; SHELTON, J. G.; BLALOCK, W. L.; FRANKLYN, R. A. and MCCUBREY, J. A. (2003): Involvement of PI3K/Akt in cell cycle progression, apoptosis and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* 17: 590-603.
- (40) BRIAUD, I.; LINGOHR, M. K.; DICKSON, L. M.; WREDE, C. E. and RHODES, C. J. (2003): Differential activation mechanism of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 52: 974-983.