

Endocrinología básica

13. MÚLTIPLES FUNCIONES DE LA LEPTINA EN LA CÉLULA ALFA-PANCREÁTICA: REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y DE LA MASA CELULAR

I. Quesada, L. Marroquí, E. Caballero, E. Vieira, A. González y A. Nadal

CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) e Instituto de Bioingeniería. Universidad Miguel Hernández. Elche. España.

Introducción: Además de su acción central, la leptina secretada por el tejido adiposo actúa sobre la célula beta-pancreática, inhibiendo la expresión y la liberación de insulina. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que esta hormona también regula la célula alfa, inhibiendo la secreción de glucagón. Sin embargo, se desconoce si también tiene un papel en otros eventos celulares. En este trabajo, analizamos si la leptina regula la expresión del gen de glucagón así como la masa celular.

Material y métodos: Se utilizaron islotes de ratones c57 y db/db y la línea alfaTC1-9. La expresión génica se evaluó mediante PCR cuantitativa y el contenido de proteína mediante western blot. Para analizar la proliferación se analizó la incorporación de BrdU, y para la apoptosis se utilizó la técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labelling).

Resultados: Tanto el tratamiento de islotes aislados así como de células alfaTC1-9 con leptina (0,625-6,25 nM) durante 24 horas produjo una inhibición de la expresión génica de glucagón. Este efecto se demostró también in vivo en ratones tratados con leptina, pero no sucedió en ratones db/db, carentes del receptor de esta hormona. La leptina activó la fosforilación de Signal Transducers and Activators of Transcription protein (STAT)-3 y su translocación al núcleo. El silenciamiento de STAT3 mediante RNA de interferencia bloqueó este efecto. Por otro lado, la leptina produjo un efecto inhibitorio en la proliferación de células alfaTC1-9 así como de células alfa aisladas. Al analizar la viabilidad y la apoptosis de estas células en presencia de leptina, no se observó ningún efecto. Esta acción proliferativa también tuvo lugar en ratones tratados in vivo con la hormona. Este efecto se asoció a un aumento en la actividad de la proteína inhibitoria del ciclo celular p27.

Discusión y conclusiones: Estos resultados indican que la leptina inhibe la expresión génica de glucagón a través de STAT3 y la proliferación de la célula alfa pancreática mediante un aumento de la proteína p27.

14. PAPEL ESTIMULADOR DE LA NEUROKININA B (NKB) EN EL CONTROL CENTRAL DE LA PUBERTAD Y SU REGULACIÓN POR EL ESTADO METABÓLICO

F. Ruiz-Pino, V.M. Navarro, D. García-Galiano, M.A. Sánchez-Garrido, M. Manfredi, S. León, J.M. Castellano, K. Clifton Don, L. Pinilla, R.A. Steiner y M. Tena-Sempere

Sección de Fisiología. Universidad de Córdoba. España. Departamento de Fisiología. Universidad de Washington. Seattle. EE.UU.

Introducción: Estudios genéticos en humanos han sugerido que la neurokinina B (NKB) y su receptor (NK3R) juegan un papel indispensable en el control del eje reproductor, similar al desempeñado por Kiss1/kisspeptinas. De hecho, NKB y NK3R se co-expresan en las neuronas Kiss1 del núcleo arcuato (ARC), y NKB parece ser un importante regulador de la secreción de GnRH y gonadotropinas en la edad adulta.

Material y métodos: Con objeto de investigar la participación de NKB en la regulación de la pubertad en la rata hembra, hemos caracterizado la expresión de los genes NKB y NK3R en el cerebro de ratas peri-puberales y hemos analizado el papel funcional de NKB en la regulación de la secreción de gonadotropinas y el timing puberal.

Resultados: Nuestros datos muestran que NKB y NK3R mRNAs se expresan de forma abundante en el hipotálamo medio basal y lateral. La expresión de NK3R mRNA (pero no de NKB) en el ARC aumentó durante la maduración puberal. La inyección central del agonista de NK3R, senktide, elevó los niveles de LH en ratas hembra prepuberales. Por contra, la administración crónica del antagonista de NK3R, SB-222200, provocó un ligero retraso de la edad de apertura vaginal (AV) y redujo los niveles de LH. La expresión hipotalámica de los mRNAs de NKB y NK3R en el ARC disminuyó tras un periodo de ayuno de 48-h en ratas puberales. Sin embargo, las respuestas de LH a la administración de senktide no se solo se mantuvieron sino que se vieron aumentadas en condiciones de ayuno. Más aún, la administración repetida de senktide en ratas puberales sometidas a subnutrición crónica del 30% (que por sí misma inhibe el progreso de la pubertad) indujo la aparición de AV en un 50% de los animales y causó potentes respuestas secretoras de LH en todos los animales tratados.

Discusión y conclusiones: En su conjunto, nuestras observaciones apuntan un papel relevante del sistema NKB/NK3R en el control central de la pubertad y sugieren que la expresión y función del mismo es sensible a situaciones de stress metabólico que alteran el timing puberal.

15. LA CORTISTATINA NO ES UN MERO ANÁLOGO NATURAL DE LA SOMATOSTATINA: ESTUDIO ENDOCRINO-METABÓLICO DE RATONES DEFICIENTES EN CORTISTATINA

R.M. Luque-Huertas, J. Córdoba-Chacón, A.I. Pozo-Salas, M.D. Gahete-Ortiz, F. Gracia-Navarro, A.J. Martínez-Fuentes y P. Castaño-Justo

Departamento de Biología Celular. Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn). Córdoba. España.

Introducción: Cortistatina (CORT) y somatostatina (SST) son dos neuropéptidos estrechamente relacionados estructural,

farmacológica y funcionalmente. De hecho, CORT actúa a través de los mismos receptores que SST (sst1-5) y se la ha considerado un análogo natural de SST. Sin embargo, existen datos que indican que CORT podría ejercer funciones específicas propias a través de receptores selectivos (ej. receptor de ghrelina GHS-R1a).

Material y métodos: Para investigar las funciones endocrino-metabólicas de CORT analizamos ratones CORT-KO y empleamos cultivos primarios de hipófisis de ratón y de primate.

Resultados: Ello mostró que la CORT ejerce funciones únicas, diferentes a la SST, sobre distintos ejes hipofisarios-metabólicos. Así, observamos que CORT estimula (mientras que SST inhibe) la secreción de prolactina (PRL) en ratones y primates, un efecto estimulador que CORT ejerce a través del GHS-R1a, pues se bloqueó en presencia de un antagonista del GHS-R1a. En apoyo de estos resultados, los ratones CORT-KO sufren una disminución de PRL circulante y la proporción de hembras CORT-KO que sacan adelante su primera camada de crías es mucho menor que la de hembras control, todo lo cual sugiere que la CORT ejerce un papel fisiológico relevante en el eje lactotrópico. Asimismo, la CORT ejerce importantes acciones inhibitorias, sexo-dependientes, sobre los ejes somatotropo-(GH) y corticotropo-(ACTH), los cuales están elevados en ratones CORT-KO in vivo y son inhibidos por CORT in vitro. Además, la deficiencia en CORT reveló un papel esencial, sexo-dependiente de este péptido en la regulación de la homeostasis glucídica/insulínica, pues solo los machos CORT-KO y no las hembras CORT-KO o machos/hembras SST-KO, son resistentes a la insulina.

Discusión y conclusiones: Nuestros resultados demuestran que muchas acciones ejercidas por la CORT no son compartidas por la SST, lo que sugiere una relevancia singular para este péptido y ofrece nuevas vías para investigar su verdadero papel fisiológico en la regulación de procesos endocrinos y metabólicos.

16. EFECTOS DE GLUCOLIPOTOXICIDAD EN LA PATOGENESIS RENAL DURANTE EL DESARROLLO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

C. Martínez-García, A. Izquierdo la Huerta, V. Velagapudi, Y. Vivas-García, I. Velasco, M. Campbell, M. Oreic, A. Vidal Puig y G. Medina Gómez

Departamento de Bioquímica. Fisiología y Genética Molecular. Universidad Rey Juan Carlos. Madrid. España. VTT Technical Research Centre of Finland. Espoo. Finlandia. Institute of Metabolic Science. University of Cambridge. Cambridge. Reino Unido.

Introducción: El desarrollo de insuficiencia renal crónica (IRC) es de alto riesgo en personas con el síndrome metabólico y diabetes tipo 2. Sin embargo, se desconoce qué patomecanismos están asociados al desarrollo de esta lesión renal. Se conoce que obesidad y diabetes son causa de glucolipotoxicidad asociada a un aumento de glucemia y acumulación de especies reactiva lipídicas que afectan a órganos metabólicamente relevantes que son diferentes al tejido adiposo. Actualmente, el papel que desarrollan la glucosa y los ácidos grasos como factores tóxicos que influyen en la función renal y la etiología de CKD son objeto de estudio.

Material y métodos: Nosotros hemos generado un modelo murino, el ratón POKO, obtenido del cruce entre el ratón con delección de la isoforma 2 del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas (ratón Knock-out (KO) de PPAR γ 2) en un background genético del ratón obeso ob/ob. El ratón POKO muestra: a) hiperfagia, b) resistencia a la insulina, c) hiperglucemia y dislipidemia a

edades tempranas de 4 semanas y pérdida completa de células beta a las 16 semanas de edad. Hemos investigado los cambios estructurales y funcionales en los riñones y la presión arterial en los ratones POKO.

Resultados: A las 4 semanas de edad, estos animales exhiben un aumento considerable de la presión arterial, una mayor índice urinario albúmina/creatinina similar a ratones ob/ob, pero un aumento significativo en el índice de hipertrofia renal en comparación con sus compañeros obesos. Además, el ratón POKO muestra un incipiente daño glomerular asociado a un aumento significativo de la expresión renal de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP), del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) y otros factores pro-inflamatorios y de fibrosis (proteína quicio-atrayente de monocitos 1(MCP-1) y colágeno IV).

Discusión y conclusiones: Estos datos sugieren una lesión acelerada a través de los efectos glucolipotóxicos en la patogenia renal asociado con el síndrome metabólico y resistencia a la insulina en ratones POKO.

17. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN FUNCIONAL DEL RECEPTOR-SENSOR DE CALCIO PARATIROIDEO EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS Y NEURONAS

C. Villalobos-Jorge, G. Díaz-Soto y L. Núñez-Llorente

Instituto de Biología y Genética Molecular-IBGM. Universidad de Valladolid-CSIC. Valladolid. España. Servicio de Endocrinología. Hospital Clínico de Valladolid. Valladolid. España.

Introducción: El receptor-sensor de Ca_2 (CaSR) se expresa en paratiroides, donde actúa como sensor de la concentración extracelular de calcio(Ca_2) regulando la secreción de PTH a través de modificaciones del Ca_2 intracelular($[\text{Ca}_2]_{\text{cit}}$). Datos recientes sugieren la presencia del CaSR en adenohipofisis. Determinar la expresión funcional del CaSR en línea celular mamosomatotropa de rata GH3 y células adenohipofisarias de ratón (Ad) en cultivo primario

Material y métodos: Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640, 10% de suero de caballo y 2,5% de suero bovino fetal. Tratadas con colorante fluorescente fura2 sobre platina termostatzada de un microscopio invertido con perfusión calefactable y cámara digital de fluorescencia. Se perfundieron con medio extracelular a 37 °C (solución control) o en presencia de diferentes concentraciones de Ca_2 extracelular (0,5-4 mM), fenilalanina (3 mM) y cinacalcet (30 μM).

Resultados: Los registros de imagen de Ca_2 en GH3 muestran que los cambios de concentración de Ca_2 inducen incrementos de la $[\text{Ca}_2]_{\text{cit}}$. Este efecto no es inhibido por nifedipino, si bien inhibe la actividad eléctrica de las células GH3. Tanto fenilalanina como cinacalcet inducen aumentos similares de la $[\text{Ca}_2]_{\text{cit}}$. En Ad se observa como los cambios de concentración del Ca_2 inducen una respuesta muy heterogénea en la $[\text{Ca}_2]_{\text{cit}}$, desde la ausencia total de respuesta, a elevaciones rápidas, transitorias o incrementos mantenidos de la $[\text{Ca}_2]_{\text{cit}}$. Cinacalcet induce una respuesta semejante a la obtenida con los cambios de concentración de Ca_2 extracelular.

Discusión y conclusiones: Tanto GH3 como subpoblaciones Ad expresan el CaSR, que podría jugar un papel importante en el control de la secreción de algunas hormonas adenohipofisarias. La expresión adenohipofisaria del CaSR podría abrir una nueva vía terapéutica de agonistas/antagonistas del CaSR como moduladores de la secreción adenohipofisaria y explicar las alteraciones en la secreción hormonal descritas en pacientes con alteraciones de las concentraciones del Ca_2 plasmático.

18. EXPRESIÓN DEL COTRANSPORTADOR DE YODO (NIS) EN OVARIO Y POSIBLE UTILIDAD EN CÁNCER DE OVARIO

A. de la Vieja, G. Riesco-Eizaguirre, D. Hardisson, M. Mendiola, C. García-Jiménez, A. Potente y P. Santisteban

Instituto de Salud Carlos III. CNM. Área de Biología Celular y Desarrollo. Majadahonda. Madrid. España. Servicio de Endocrinología y Nutrición e Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC). Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario La Paz. Madrid. España. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Rey Juan Carlos. Alcorcón. Madrid. España.

Introducción: El cotransportador de yoduro (I^-) dependiente de sodio (NIS) media el transporte de I^- en tiroides, estómago, mama lactante, glándulas salivares, intestino y placenta. El papel fisiológico que juega es específico de cada tejido, siendo bien conocida su función tanto en la entrada de I^- al tiroides para la síntesis de hormonas tiroideas, como su acumulación en la leche de la mama lactante. Además NIS es esencial para el diagnóstico y el tratamiento con yodo radiactivo del cáncer de tiroides y sus metástasis.

Material y métodos: El estudio se ha realizado en: 1) líneas celulares humanas immortalizadas derivadas de ovario normal (IOSE-80) y tumoral (A2780, OVCAR-3, SKOV3, y 41M); 2) ovarios de rata; y 3) bloques de parafina de tejido humano con cáncer de ovario.

Resultados: En el presente trabajo hemos determinado por primera vez la expresión fisiológica de NIS en ovario. Esta expresión está regulada y solo ocurre en determinadas fases del ciclo ovárico/menstrual. La expresión de NIS en ovarios de rata comienza durante la fase diestro y tiene un pico máximo en la fase proestro coincidiendo con el aumento preovulatorio de la LH. La expresión de NIS en ovario estuvo ausente durante la gestación y volvió a reaparecer en la lactancia. También hemos analizado la expresión de NIS en distintas líneas celulares de ovario y hemos observado la expresión de NIS, pero en una forma inmadura que no acumulan I^- . El tratamiento con las hormonas LH y FSH aumentaron la captación de I^- en las células. Finalmente hemos analizado la expresión de NIS en muestras humanas derivada de cáncer de ovario, y sorprendentemente el 100% de los casos fueron positivos para NIS, tanto en estadios clínicos precoces como avanzados.

Discusión y conclusiones: Estos resultados sugieren que NIS tiene un papel importante durante el proceso de ovulación, y además que la sobre-expresión durante la tumorigénesis ovárica puede tener importantes implicaciones en el diagnóstico y/o tratamiento del cáncer de ovario.

Agradecimientos: PI06-1231(ISCIII-FIS) y BFU2010-16025 (MICINN).