

Amilina: del estudio molecular a las acciones fisiológicas

I. ROJAS y A. NOVIALS

Centro de Diabetología. Fundación Sardà Farriol. Barcelona.

La amilina (en terminología anglosajona, *islet amyloid polypeptide* [IAPP]) es un péptido de 37 aminoácidos sintetizado y cosecretado con la insulina por la célula β -pancreática en respuesta a los mismos estímulos secretagogos. Este péptido constituye el principal componente de los depósitos de sustancia amiloide que aparecen en los islotes pancreáticos de la inmensa mayoría de individuos que padecieron diabetes mellitus (DM) tipo 2 clínicamente establecida, constituyendo un hecho característico de esta enfermedad. Actualmente, se considera que la presencia de depósitos de sustancia amiloide ejerce un papel crítico en la progresiva disfunción y destrucción de la población celular β que se produce en el curso evolutivo de la DM tipo 2. No obstante, los mecanismos moleculares responsables de la conversión de la amilina en fibras insolubles son, en gran parte, desconocidos. La presencia de mutaciones en el gen de la amilina y la sobreexpresión del péptido han sido involucradas en el desarrollo de la amiloidosis en los islotes pancreáticos y de la DM tipo 2. El gen codificante para la amilina humana está ubicado en el brazo corto del cromosoma 12, y contiene tres exones y dos intrones. La creación de modelos de ratones transgénicos proporcionó la oportunidad de estudiar *in vivo* la formación de los depósitos de amiloide en los islotes pancreáticos y las acciones de la amilina humana.

El propósito de este artículo es efectuar una revisión de la importancia del amiloide pancreático en la patogenia y tratamiento de la DM tipo 2, así como de las acciones fisiológicas de la amilina.

AMYLIN: FROM MOLECULAR BIOLOGY TO PHYSIOLOGY

Islet amyloid polypeptide (IAPP), also known as amylin, is a 37-amino acid peptide which is synthesized and cosecreted with insulin from pancreatic islet- β cells in response to the same secretagogue stimuli. This peptide is the primary constituent of amyloid deposits, which are found in pancreatic islet of the vast majority of individuals with well-established type 2 diabetes, and constitutes a characteristic feature of the disease process. There is increasing evidence suggesting that the presence of islet storage has an important role in progressive β -cell dysfunction and β -cell loss in type 2 diabetes. However, the molecular mechanism responsible for the conversion of IAPP to insoluble fibrils still remain largely unknown. Mutations of the IAPP gene and overexpression of the peptide have been involved in islet amyloidogenesis and type 2 diabetes. The gene encoding human IAPP is located on the short arm of chromosome 12, and contains three exons and two introns. The creation of transgenic mouse models allowed the opportunity to study *in vivo* the formation of amyloid islet and the actions of human IAPP. This article reviews the importance of amyloid islet in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes and the physiologic actions of IAPP.

Key words: Amylin. IAPP. Type 2 DM.

HISTORIA Y TERMINOLOGÍA

La presencia de depósitos de sustancia amiloide reemplazando las células endocrinas en los islotes pancreáticos ha sido reconocida desde principios de siglo como un hallazgo histológico característico en el páncreas de pacientes con DM tipo 2. Estos depósitos fueron originalmente descritos como “degeneración hialina de los islotes de Langerhans” por Opie¹. El principal componente proteico de los depósitos descritos por Opie fue identificado por Westermarck et al a partir de un insulinoma pancreático^{2,3}. El nuevo péptido fue denominado *insulinoma amyloid peptide*, siendo purificado y secuenciado parcialmente. Con posterioridad, Cooper et al⁴ aislaron un péptido idéntico en extractos de tejido pancreático rico en amiloide procedente de pacientes con DM tipo 2.

El término “amiloidosis” engloba un grupo de entidades clínicas caracterizadas por el depósito extracelular de proteínas de estructura fibrilar en órganos y tejidos. Algunas formas de amiloidosis fueron consideradas como un fenómeno inespecífico asociado al proceso de envejecimiento. No obstante, el aumento de la longevidad y la mejor definición clínica de las enfermedades crónicas ha demostrado que el depósito de amiloide es específico para determinadas enfermedades, como son las placas de amiloide en la enfermedad de Alzheimer o el amiloide pancreático en la DM tipo 2.

El término amiloide fue introducido por Virchow en 1853, basándose en las características tintoriales de los depósitos amorfos en las secciones histológicas: los órganos infiltrados adquirirían coloración negra (al ser tratados con yodo, de forma análoga al almidón (del griego *amylos*, almidón)).

A pesar de que cada tipo de amiloidosis se caracteriza por la deposición de una proteína fibrilar específica, los depósitos de sustancia amiloide com-

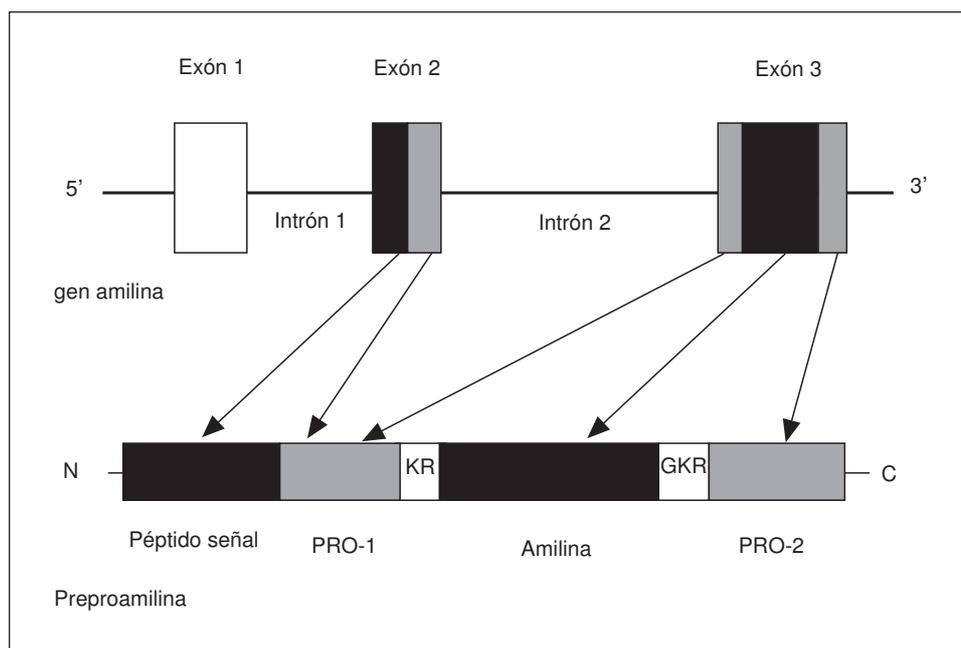


Fig. 2. Representación esquemática del gen humano de la amilina y proamilina. Los exones y los intrones del gen están representados en relación con la secuencia del propéptido. KR y GKR: señales dibásicas, puntos de escisión proteolítica de la molécula por endopeptidasas (G: glicina; K: lisina; R: arginina); PRO1: propéptido aminotermina; PRO-2: propéptido carboxiterminal.

tural del 43 y el 49%, respectivamente, con los neuropéptidos CGRP-1 y CGRP-2 (*calcitonin gene-related-peptides*), sintetizados por las células C de la glándula tiroides como resultado de un *splicing* alternativo de los genes CALC, ubicados en el cromosoma 11²². Los tres péptidos tienen una longitud idéntica y presentan dos modificaciones postraduccionales homólogas (amidación del residuo carboxiterminal y un puente disulfuro intramolecular).

La amilina es sintetizada a partir de un precursor prepropeptídico de 89 aminoácidos, la preproamilina²³. Mientras que los residuos 1-37 presentan un alto grado de conservación entre las diferentes especies, los propéptidos amino y carboxiterminal presentan un mayor grado de variabilidad, lo que indica una probable ausencia de actividad biológica. La escisión proteolítica de la secuencia de 22 aminoácidos del péptido señal en el retículo endoplasmático rugoso libera la proamilina, de 67 aminoácidos. Las modificaciones postraduccionales incluyen la liberación de amilina madura por la escisión proteolítica de la molécula en las señales dibásicas lisina-arginina, con pérdida de los propéptidos aminoterminales (11 aminoácidos), y carboxiterminal (19 aminoácidos), y la formación de un puente disulfuro entre los residuos 2 y 7 de cisteína. En el extremo carboxiterminal, la señal dibásica está precedida de una glicina, lo que permite la amidación de la tirosina en posición 37 de la amilina madura. Estas modificaciones postraduccionales son fundamentales para la actividad biológica del péptido. No se conoce con certeza qué endopeptidasas son responsables del procesamiento *in vivo* de la proamilina humana. No obstante, el hecho de que la amilina esté colocalizada con la insulina en los gránulos de las células β ²⁴ y que la proinsulina sea procesada por la acción combinada de las proteasas PC2 y PC3²⁵ sugiere que estas endopeptidasas podrían ser también responsables del procesamiento de la proamilina. Dado que pacientes con DM tipo 2 presentan un incremento desproporcionado de la concentración de proinsulina²⁶, un procesamiento anómalo de la proamilina podría constituir un factor patogénico en la formación de amiloide en la DM tipo 2.

ESTRUCTURA DEL GEN DE LA AMILINA

Mosselman et al identificaron la secuencia del gen de la amilina, el cual está ubicado en el brazo corto del cromosoma 12, en la región 12p12.3-p12.1²⁷. Los estrechamente relacionados genes CALC (gen CALC-A, codificante para la calcitonina y para el neuropéptido CGRP-1, y gen CALC-B, codificante para el neuropéptido CGRP-2) están ubicados en el cromosoma 11. La importante homología entre los cromosomas 11 y 12 ha sugerido la existencia de un gen ancestral común²⁸.

El gen humano de la amilina es un gen de copia única, de aproximadamente 6,6 Kb, que está constituido por 3 exones y 2 intrones, de los cuales el exón 1 es no codificante, mientras que el exón 3 codifica la mayor parte del propéptido²⁹. El exón 1, de 103 pb, contiene la región 5' no traducida del ARN mensajero o región 5'UTR. El exón 2, de 95 pb, contiene el codón ATG de inicio de la traducción y codifica el péptido señal y los primeros 9 aminoácidos del propéptido aminoterminales. El exón 3, de 1,2 Kb, codifica el resto del propéptido aminoterminales, el propéptido carboxiterminal, la secuencia completa de la amilina madura, así como la región 3'UTR. Los exones están separados por intrones de 330 pb y 4,8 Kb, respectivamente, produciéndose el punto de inicio de la transcripción 31 pb en dirección 3' de la caja TATA (fig. 2). Estudios en insulinomas han identificado la presencia de cuatro señales diferentes de poliadenilación en el gen de la amilina humana, que dan lugar a ARN mensajeros de diferente tamaño: 1,2 Kb (A1), 1,6 Kb (A2), y 2,1 Kb (A3).

ESTRUCTURA DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DE LA AMILINA

La expresión del gen de la amilina en la célula β está fundamentalmente regulada por secuencias proximales promotoras. Estas secuencias que controlan la expresión tisular específica están localizadas entre los nucleótidos -2798 y +450 del gen humano de la amilina²⁹, habiéndose detectado que las secuencias entre -222 y +450 pb son necesarias para la transcripción del gen³⁰. Estudios de mutagénesis y de de-

lección secuencial han puesto de manifiesto la presencia de diversos elementos en la región promotora del gen (elementos cis) que regularían la transcripción génica mediante la unión a factores proteicos positivos y/o negativos (elementos trans)^{30,31}. Además, se ha demostrado que esta región promotora contiene elementos homólogos al promotor de los genes de la insulina humana y de rata^{32,33}.

Se ha detectado un motivo TATA proximal (-87/-82 pb), y un motivo TATA distal (-245/-238 pb) homólogo al elemento FAR, denominado caja IAPP-FAR. Por otro lado, la secuencia de nucleótidos -61/-54 pb es similar a la del elemento CRE (*cAMP-responsive element*, o elemento de respuesta al AMP cíclico) descrito en el promotor del gen de la insulina. A diferencia de éste, estudios efectuados por Mosselman et al han sugerido que se trata de un CRE no funcional³¹. Además, se han identificado tres elementos de regulación positiva, homólogos a las cajas CT del gen de la insulina: A1 (-91/-84 pb), A2 (-154/-142 pb) y A3 (-172/-163 pb), elementos ricos en adenina/timina que constituirían lugares de unión del factor de transcripción PDX 1 al promotor del gen de la amilina^{30,34}. El factor PDX 1 (*pancreatic and duodenal homeobox factor 1*), también denominado IPF 1 (*insulin promoter factor 1*), o IUF 1 (*insulin upstream factor 1*) es una proteína expresada selectivamente en células del páncreas y duodeno y que es esencial para la diferenciación del páncreas y la regulación de la transcripción de los genes de la insulina y la amilina³⁵⁻³⁸. Estudios en ratones, en los que el gen de PDX 1 ha sido inactivado, han demostrado que este factor es necesario para el mantenimiento del fenotipo de célula β , regulando positivamente la expresión de la insulina y de la amilina, y reprimiendo la expresión del glucagón³⁹.

Se sabe que la estimulación transcripcional del gen de la insulina en respuesta a la glucosa está mediada por el factor PDX1⁴⁰. Recientemente, ha sido descrita la vía de señalización intracelular que enlaza el metabolismo de la glucosa con la regulación de la unión del factor PDX1 al ADN y con la actividad del promotor de la insulina⁴¹. Según este modelo, la glucosa estimularía la actividad de la fosfatidilinositol 3-cinasa, que a continuación activaría la proteína 2-cinasa (también denominada p38 o SAPK2, siglas de *stress-activated protein kinase 2*)⁴². Ello conduciría a la fosforilización y la activación de la forma citoplasmática de PDX1 (proteína inactiva de 31 K-Da), con conversión a una forma activa de la proteína (de 46 K-Da), que migraría al núcleo, donde finalmente activaría la transcripción del gen de la insulina. En contraposición, se desconoce en gran parte la vía de señalización intracelular que enlaza PDX1 con la activación del promotor de la amilina. PDX1 regularía la transcripción del gen de la amilina interactuando fundamentalmente con los elementos A1 y A2³⁰.

SECRECIÓN DE LA AMILINA

La amilina es cosecretada con la insulina en condiciones basales y en respuesta a los mismos estímulos secretagogos. En la mayoría de condiciones, los cambios en la secreción de la amilina se producen de forma paralela a los cambios en la secreción de insulina, constituyendo un 1-20% de la producción de insulina en relación molar⁴³. Se ha hipotetizado que los cambios en este cociente molar amilina/insulina podrían estar involucrados en el desarrollo de la DM tipo 2. Por otro lado, experimentos en islotes pancreáticos humanos y de rata sometidos a estimulación prolongada con concentraciones elevadas de glucosa han demostrado que la secreción de ambos péptidos no se produce siempre de forma tan estrictamente coordinada⁴⁴.

La amilina circula en plasma a concentraciones picomolares. Los métodos disponibles para la determinación de las

concentraciones plasmáticas de amilina han demostrado que existen considerables variaciones entre los valores detectados en individuos sanos y pacientes con diabetes. En sujetos no diabéticos y no obesos las concentraciones basales de amilina oscilan entre 2 y 13 pmol/l, y aumentan de forma paralela a la insulina en el período posprandial o después de una sobrecarga oral de glucosa hasta 5-17 pmol/l²⁰. Los pacientes con DM tipo 1 con una importante reducción de la secreción de péptido C también presentan concentraciones plasmáticas mínimas o no detectables de amilina²¹, correspondiendo esta pérdida de secreción a la destrucción de las células β . En contraste, los individuos obesos en los que se detectan concentraciones basales y estimuladas de insulina aumentadas presentan, de forma análoga, concentraciones aumentadas de amilina en relación a sujetos con normopeso⁴⁵.

En estadios iniciales de la DM tipo 2, las concentraciones plasmáticas de amilina suelen estar incrementadas, mientras que en el curso de la enfermedad, la secreción de amilina disminuye de forma paralela a la progresiva reducción de la secreción de insulina⁴⁶. Por otro lado, también la terapia utilizada en la DM tipo 2 puede influir en la secreción de amilina. En este sentido, se ha demostrado que pacientes tratados con sulfonilureas presentan concentraciones postprandiales de amilina aumentadas en comparación con pacientes tratados con dieta o insulina⁴⁷. Se ha hipotetizado que este incremento en la secreción de amilina sería responsable de una aceleración del proceso de deposición de fibras de amiloide y, ulteriormente, del deterioro de la función celular β y del fracaso secundario al tratamiento con tales fármacos.

En el proceso de envejecimiento se produce una disminución progresiva de la secreción de amilina, que se asocia a un deterioro de la secreción de insulina⁴⁸. Esta reducción de ambos péptidos indica el fracaso de la célula β para aumentar su función secretora de forma compensadora al estado de resistencia a la insulina, que es característico de este proceso fisiológico. En contraposición, un proceso asociado a concentraciones plasmáticas aumentadas de amilina es la insuficiencia renal crónica. Pacientes con insuficiencia renal pueden llegar a presentar concentraciones de amilina en plasma de 25 pmol/l, mientras que después de hemodiálisis las concentraciones del péptido experimentan una reducción de hasta el 50%⁴⁹. Finalmente, también se ha descrito un aumento de las concentraciones de amilina en pacientes con diabetes gestacional en relación con mujeres gestantes con tolerancia oral a la glucosa normal⁵⁰.

OTROS COMPONENTES DEL AMILOIDE PANCREÁTICO

El examen de muestras de autopsias precedentes de pacientes con DM tipo 2 ha demostrado la presencia de, al menos, dos componentes adicionales en los depósitos de sustancia amiloide en los islotes pancreáticos: el heparán sulfato proteoglicano perlecan¹⁰ y la apoproteína E¹¹. Ambas proteínas han sido identificadas en otras formas de amiloidosis.

La apoproteína E (apo E) es una proteína de origen hepático que se expresa en la superficie de las lipoproteínas circulantes en plasma que son ricas en triglicéridos: quilomicrones, VLDL, IDL y LDL. Desempeña una función crítica en el aclaramiento de las lipoproteínas aterogénicas remanentes en el espacio vascular uniéndose al receptor LDL y LRL (*LDL receptor related protein*), así como participando en el transporte reverso del colesterol⁵¹.

El gen humano de la apo E es polimórfico, habiéndose identificado 3 alelos diferentes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$) en el locus de la apo E, ubicado en el cromosoma 19, codificantes para

	N-IAPP	IAPP	C-IAPP
	I		37
Hombre	TPIES:::HQVEKR	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY	GKRNAVEVLKREPLNYLPL
Mono	-----:::-----	-----R-----T-----D-----	-----
Gato	-----:::N-----	-----IR-----L-----P-----	-----ST-DI-N-----F
Perro	---K:::-M---	-----RT---L---P-----	-----TI-I-N-G-----
Rata	----VG-GTN--D--	-----R---L-PV-PP-----	-----VA-DPN--S-DF-L-
Ratón	----VR-GSNP-MD-	-----R---L-PV-PP-----	-----AGDPN--S-DF-KV
Hámster	----VR-GTN-MD-	-----N-L-PV-P-----	-----S-A-IPDGDS-DLFL-
Cobayo	--S-A-DTG--G-	-----T---R-H-L--A-LP-D-----	-----PQISD--LCH----

Fig. 3. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proamilina en 8 especies de mamíferos. IAPP: amilina; N-IAPP: región aminoterminal; C-IAPP: región carboxiterminal. La secuencia comprendida entre los aminoácidos 24-28 (GAILS), que es crítica para la fibrillogénesis, está conservada en aquellas especies en las que se desarrolla amiloide en los islotes pancreáticos o en insulinomas (hombre, perro y gato), y presenta sólo una sustitución en simios. Los guiones indican los residuos que son idénticos a los de humanos para esta posición. Los aminoácidos están indicados con los siguientes símbolos: A: alanina; C: cisteína; D: ácido aspártico; Z: ácido glutámico; F: fenilalanina; G: glicina; H: histidina; I: isoleucina; K: lisina; L: leucina; M: metionina; N: asparagina; P: prolina; Q: glutamina; R: arginina; S: serina; T: treonina; V: valina; Y: tirosina.

tres isoformas diferentes (apo E2, apo E3 y apo E4), que darían lugar a seis fenotipos diferentes (apo E2/2, apo E3/3, apo E4/4, apo E3/2, apo E4/2 y apo E4/3)⁵². En población caucásica, las frecuencias de los alelos ε2, ε3 y ε4 son del 8, el 77 y el 15%, respectivamente. En comparación con el alelo ε3, los valores de colesterol total y LDL son inferiores en sujetos con el alelo ε2 y están aumentados en portadores del alelo ε4, mientras que ambos alelos ε2 y ε4 se asocian a valores incrementados de triglicéridos. Actualmente, se considera que los polimorfismos de la apo E constituyen uno de los más importantes determinantes genéticos de la coronariopatía isquémica en la población general, confiriendo especialmente la isoforma E4 un riesgo aumentado de enfermedad coronaria⁵³.

La apo E constituye un componente fundamental de las placas seniles y de las estructuras neurofibrilares detectadas en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Investigaciones recientes han demostrado que la presencia del alelo ε4 se asocia con un riesgo incrementado de presentación de formas esporádicas y familiares de la enfermedad⁵⁴. De forma análoga, se ha detectado por inmunocitoquímica la presencia de apo E formando parte de los depósitos de amiloide en islotes pancreáticos de humanos, simios y ratones transgénicos, pero estos estudios no han podido nunca demostrar la presencia de ARN mensajero de la apo E, sugiriendo este hecho que el lugar de síntesis de la apo E es extrapancreático. En contraste, en la enfermedad de Alzheimer sí que se ha detectado abundante ARN mensajero en los astrocitos, que constituyen la fuente predominante de producción de apo E, siendo vehiculizada al interior de las neuronas a través del receptor LDL. El origen más probable de la apo E presente en los islotes pancreáticos es el hígado, que constituye el principal lugar de síntesis de esta proteína,

o bien los macrófagos circulantes a través de los islotes pancreáticos⁵⁵.

La hipotética función de la apo E en la amiloidogénesis de los islotes pancreáticos es controvertida. Estudios desarrollados en la enfermedad de Alzheimer sugieren que puede promover la fibrillogénesis y estabilizar las fibras de amiloide formadas a partir del precursor amiloide Aβ, siendo la isoforma E4 la variante con mayor afinidad por el amiloide β⁵⁶. Por extrapolación de la enfermedad de Alzheimer, se ha hipotetizado que la apo E también podría desempeñar un papel en la aparición de amiloide en islotes pancreáticos. No obstante, los estudios desarrollados en este sentido han resultado negativos. Por un lado, los estudios genéticos no han demostrado la asociación del alelo ε4 con una mayor frecuencia o gravedad de la amiloidosis en islotes pancreáticos de pacientes con DM tipo 2. Por otro lado, experimentos en modelos de ratones transgénicos que sobreexpresan la amilina humana, pero que son deficientes en apo E, tampoco han demostrado una mayor frecuencia ni gravedad de la amiloidosis en relación con animales que expresan correctamente la apo E.

Otro componente del amiloide pancreático es el perlecan. Esta molécula proteica es un heparán sulfato, formando parte de la familia de los proteoglicanos, y constituye un componente fundamental de la membrana basal de las células endoteliales, siendo por tanto ubicua. Las proteínas amiloidogénicas, incluyendo la amilina, contienen una secuencia consensual de unión a las cadenas de glucosaminoglucanos del perlecan⁵⁷. Se ha demostrado que el perlecan es uno de los componentes del amiloide detectado en la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Dawn o en enfermedades causadas por priones (p. ej., la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, el síndrome de Gerstmann-Straussler y el Kuru). Estu-

dios efectuados en la enfermedad de Alzheimer sugieren que el perlecan actuaría estimulando la deposición de fibras de amiloide a partir de la proteína A β , estabilizando los agregados neurofibrilares e inhibiendo la degradación proteolítica de éstos⁵⁸. Evidencias a favor de un potencial papel del perlecan en la formación de depósitos de amiloide también en los islotes pancreáticos de pacientes con DM tipo 2 han sido proporcionadas por experimentos *in vitro* desarrollados por Castillo et al, en los que se ha demostrado que las cadenas de glucosaminoglucanos del perlecan constituirían la malla donde precipitarían las moléculas de amilina, promoviendo la formación de agregados fibrilares y, finalmente, conduciendo a la aparición de depósitos de amiloide⁵⁹.

CAPACIDAD AMILOIDOGÉNICA DE LA AMILINA

La amilina ha sido identificada en todos los mamíferos examinados hasta el momento actual. Sin embargo, no en todas las especies animales se forma amiloide: sólo los humanos, los primates y los felinos son capaces de desarrollar depósitos de amiloide, mientras que otras especies animales —como las ratas y los ratones— no lo son. Esta diferencia es debida a las variaciones de aminoácidos en la porción central de la molécula y, específicamente, la secuencia de aminoácidos 24-28 glicina-alanina-isoleucina-leucina-serina (GAILS) es crítica en el proceso de amiloidogénesis. En este sentido, experimentos *in vitro* han demostrado que la sustitución de la serina en posición 28 de la secuencia de la amilina humana, tal como presentan los roedores (fig. 3), inhibe la formación de fibras de amiloide⁶⁰.

La presencia de depósitos de amiloide es excepcional en individuos sanos no diabéticos¹¹. Por tanto, la crítica secuencia amiloidogénica de la amilina es necesaria, pero no suficiente, para la formación de tales depósitos en los islotes pancreáticos de pacientes con DM tipo 2. En consecuencia, otros factores estarían involucrados en el proceso de amiloidogénesis, genéticos y/o ambientales.

DEFECTOS GENÉTICOS E HIPERSECRECIÓN DE AMILINA

De forma análoga a algunas formas de amiloidosis, en las que se ha demostrado la presencia de alteraciones genéticas que resultan en la agregación de la proteína codificada, tal como sucede en la enfermedad de Alzheimer⁶¹, se postuló que mutaciones en el gen de la amilina podrían desempeñar una función en el proceso de amiloidogénesis; por ejemplo, incrementando la propensión del péptido a la agregación y precipitación. En este sentido, estudios en población japonesa han detectado la presencia de la mutación S20G, que involucra la sustitución de la serina en posición 20 por glicina, en un 4% de pacientes con DM tipo 2. Dicha mutación se asocia a un patrón fenotípico específico: edad de diagnóstico relativamente joven (≤ 35 años), tendencia a la insulinopenia y a la agregación familiar de diabetes⁶². Estudios *in vitro* han demostrado el potencial amiloidogénico de la proteína mutada⁶³. No obstante, esta mutación no ha sido detectada en otras poblaciones estudiadas, inclusive la nuestra. Por tanto, si constituye un factor patogénico, sería inusual y, evidentemente, no puede explicar la frecuente asociación de amiloide y DM tipo 2.

Otra hipótesis que se postuló es que una hipersecreción de la amilina podría conducir a la acumulación y la agregación del péptido. Sin embargo, estudios realizados *in vivo* que intentaban verificar esta hipótesis han resultado negativos, y un importante argumento en contra viene dado por la infrecuente detección de depósitos de amiloide en individuos normoglucémicos que son obesos y/o que presentan resistencia a la insulina y que, por tanto, serían hipersecre-

tores de amilina¹³. No obstante, en determinados casos de estimulación masiva crónica de la célula β es posible la formación de depósitos de amiloide en humanos, siendo el ejemplo más demostrativo el amiloide asociado a insulinomas humanos¹⁷. También se ha documentado el desarrollo de abundante amiloide insular en un paciente con hiperplasia de islotes pancreáticos debido a la presencia de anticuerpos contra el receptor de la insulina⁶⁴. Por otro lado, una situación especial es la de pacientes no diabéticos con insuficiencia renal terminal, en los que junto a elevadas concentraciones de amilina se ha descrito una mayor prevalencia de amiloide pancreático en relación con sujetos no diabéticos y sin insuficiencia renal⁶⁵. Esta mayor prevalencia podría ser el resultado de las elevadas concentraciones de amilina, una prediabetes no diagnosticada, y/o un estado de resistencia a la insulina que frecuentemente acompaña a la insuficiencia renal.

AMILOIDE PANCREÁTICO: ¿UN COMPONENTE PRECOZ O TARDÍO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2?

Constituye motivo de gran controversia si la presencia de amiloide en los islotes pancreáticos representa un componente precoz en la patogenia de la DM tipo 2, o se trata realmente de un epifenómeno. Parte de la dificultad en proporcionar una respuesta proviene de la imposibilidad de realizar amplios estudios longitudinales en humanos relacionando la presencia de depósitos con cambios en el metabolismo de la glucosa. Además, gran parte de las investigaciones desarrolladas están basadas en estudios con microscopía óptica, en la cual sólo es posible detectar cambios correspondientes a un estadio avanzado del proceso de amiloidogénesis, mientras que los cambios ultraestructurales en fase precoz sólo son detectables con microscopía electrónica.

El acceso a modelos de ratones transgénicos proporcionó la oportunidad de estudiar el efecto de un factor individual en una enfermedad multifactorial como es la diabetes. La influencia de factores adicionales puede ser estudiada mediante el cruzamiento del ratón transgénico inicial con otro ratón transgénico, recombinante homólogo o mutante, o mediante la manipulación de factores ambientales como la dieta. La creación de estos modelos de ratones transgénicos que producen amilina humana en sus células β permitió estudiar las propiedades diabéticas y amiloidogénicas de la amilina humana *in vivo*⁶⁶⁻⁶⁸.

Los ratones transgénicos heterocigotos iniciales que sobreexpresaban la amilina humana no eran capaces de formar depósitos de amiloide⁶⁶. Pero con la obtención de ratones homocigotos, algunos de estos animales desarrollaron amiloide en sus islotes pancreáticos^{67,68}. Este hallazgo sugiere que la citotoxicidad para la célula β inducida por el transgén depende de los valores de expresión de este gen, y se correlaciona con el hecho de que la presencia de amiloide se detecta fundamentalmente en aquellos insulinomas que presentan un elevado contenido de amilina⁶⁹.

Estudios desarrollados por nuestro grupo de investigación han detectado en la región promotora del gen de la amilina la presencia de una mutación, consistente en la sustitución G/A, en posición -132 pb del punto de inicio de la transcripción en un 9,7% de pacientes con DM tipo 2. Dicha mutación presenta una frecuencia significativamente superior en población diabética en relación con población control (9,7 frente a 1,5%; $p < 0,005$; *odds ratio*: 6,85; intervalo de confianza del 95%: 1,56-30,08). Estudios *in vitro* han demostrado que causa un incremento significativo de la actividad transcripcional del gen de la amilina, es decir, es capaz de producir una sobreexpresión de la amilina, sugiriendo

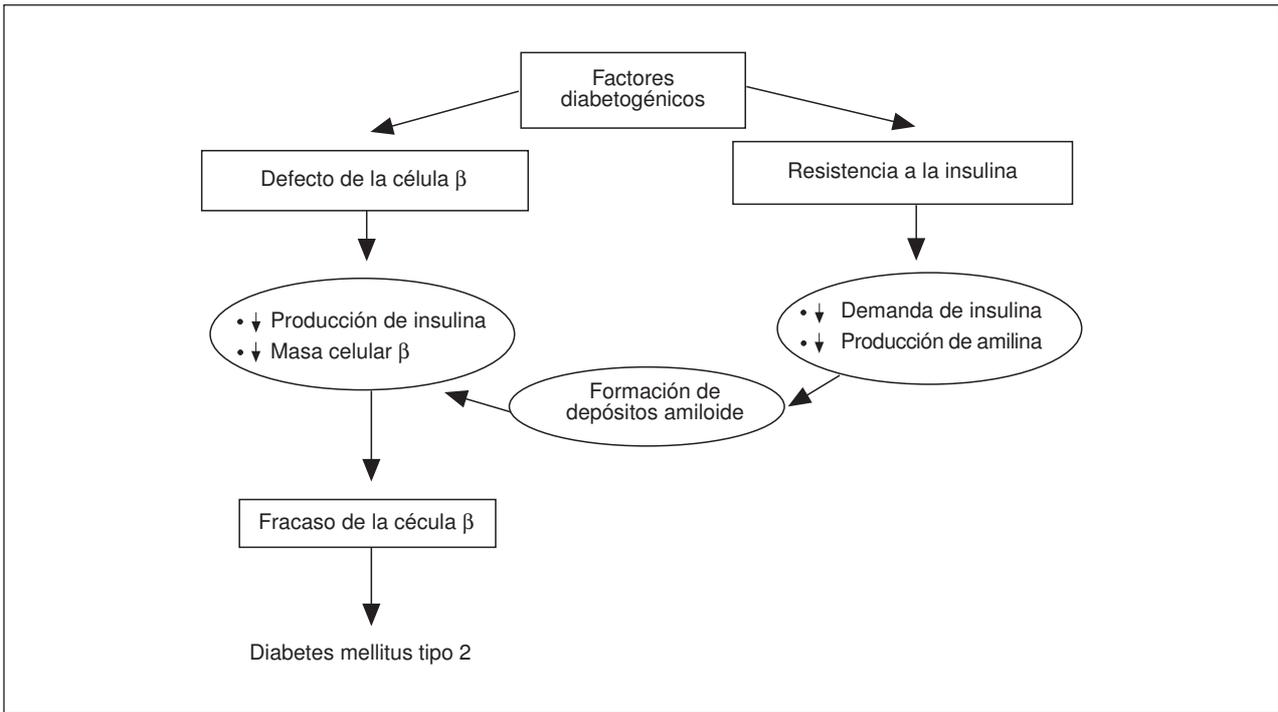


Fig. 4. Modelo propuesto de la función de la amilina con su secuencia amiloidogénica en la patogenia de la diabetes mellitus tipo 2. Diversos factores diabéticos primarios, determinados genética y ambientalmente, podrían deteriorar la función de las células β , conduciendo a un defecto de la célula β , o bien disminuir la sensibilidad periférica a la insulina, conduciendo a un estado de resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina incrementa la demanda de insulina, dando lugar a hiperinsulinemia. Si la coexistente hipersecreción de amilina es lo suficientemente importante o prolongada, dará lugar a la formación de depósitos amiloide en los islotes pancreáticos, la cual se asocia a una degeneración de las células β , una reducción de la masa celular β y una disminución de la capacidad secretora de insulina (fracaso de la célula β) con aumento de la concentración plasmática de glucosa. En el caso de un defecto primario de la célula β que comporte una reducción en la secreción de insulina (p. ej., un procesamiento defectuoso de la proinsulina), puede desarrollarse resistencia a la insulina como un defecto secundario, con el consecuente incremento de la demanda de esta sustancia, lo que conducirá también finalmente a la formación de amiloide.

que esta mutación podría desempeñar un potencial papel en la formación de depósitos de amiloide en humanos y un ulterior desarrollo de diabetes tipo 2 (manuscrito pendiente de publicación).

Por otro lado, dado que la amilina es cosecretada con la insulina, como resultado de secuencias promotoras reguladoras comunes para ambos genes codificantes³², la inducción de resistencia a la insulina ocasiona un incremento de la expresión de la insulina y amilina. En este sentido, el desarrollo de hiperinsulinemia en estados de resistencia a la insulina probablemente va asociado a un incremento de las concentraciones plasmáticas de amilina. Así, se ha hipotetizado que la combinación de la producción de la amilina humana con resistencia a la insulina podría estar implicada en la formación de amiloide *in vivo*⁷⁰.

Estudios practicados por Höppener et al han demostrado que el cruzamiento de ratones transgénicos con el ratón genéticamente obeso y deficiente en leptina ob/ob como consecuencia de una mutación en el gen de la leptina, induce un estado de resistencia a la insulina y el desarrollo de una amiloidosis extensa en los islotes pancreáticos de los ratones resultantes⁶⁸. Resultados similares fueron obtenidos por Soeller et al con el cruzamiento de ratones transgénicos con el ratón amarillo $A^{y/a}$, modelo murino de obesidad y resistencia a la insulina⁷¹, así como por Couce et al con ratones transgénicos sometidos a tratamiento con hormona del crecimiento y dexametasona⁷². Además, en el modelo creado por Höppener et al⁶⁸ el grado de formación de amiloide se

correlacionó positivamente con el cociente molar glucosa/insulina en plasma. Ratones transgénicos ob/ob que sobreexpresaban la amilina humana presentaron glucemias superiores y concentraciones inferiores de insulina que ratones ob/ob no transgénicos, indicando que el fracaso de la célula β era el resultado de la formación de amiloide.

Estos estudios *in vivo* indican que la deposición de amiloide puede producirse como consecuencia de la resistencia a la insulina y, al mismo tiempo, puede provocar un deterioro de la secreción de insulina (fig. 4).

Recientemente, se ha demostrado que la glucosilación de la amilina humana puede aumentar su potencial amiloidogénico⁷³, sugiriendo que la hiperglucemia puede promover la formación de amiloide no sólo estimulando la producción de amilina, sino también aumentando su capacidad de agregación y fibrilación. Este efecto estará ausente en sujetos con resistencia a la insulina que no presentan diabetes, y podría explicar por qué, a pesar de presentar concentraciones plasmáticas de amilina elevadas, tales individuos infrecuentemente desarrollan amiloide.

CITOTOXICIDAD DE LA AMILINA HUMANA

La formación de depósitos de amiloide en los islotes pancreáticos se asocia *in vivo* a una reducción del 40 al 50% de la masa celular β en pacientes con DM tipo 2⁷⁴. Se han implicado varios mecanismos en la citotoxicidad de la amilina humana. Diversos estudios indican que la formación de fi-

bras de amilina extracelulares induce la apoptosis de las células β , toxicidad que requiere el contacto directo de las fibras con la superficie celular⁷⁵, y que también puede estar mediada por los mecanismos de estrés oxidativo^{76,77}, y por un aumento de la expresión de los genes promotores de apoptosis celular p53 y p21⁷⁸.

La amilina humana es capaz de formar canales iónicos⁷⁹. Así, a concentraciones elevadas, puede formar agregados que serían integrados en la membrana celular y podrían funcionar como canales permeables para el calcio, dando lugar a un flujo intracelular de éste que, de ser prolongado, contribuiría en el mecanismo de apoptosis de la célula β ⁸⁰.

Estudios desarrollados por McLean et al han demostrado que la interacción de la amilina humana con membranas liposomales induce la formación de fibras con conformación β ⁸¹, sugiriendo que la interacción de la proteína amiloidogénica con los componentes de la membrana celular induciría la formación de amiloide y la apoptosis de las células β . La detección de perlecan, un componente de la membrana basal de las células endoteliales, en los depósitos de amiloide presentes en islotes humanos, así como de simios y ratones transgénicos, apoya esta hipótesis. Estudios *in vitro* han mostrado que este heparán sulfato estabilizaría las fibras de amilina formadas, acelerando el proceso de fibrilación⁵⁹. El hecho que los depósitos estén localizados primariamente entre las células de los islotes y los capilares, tal como fueron descritos originalmente por Opie, apoya esta posible acción promotora de la fibrilación de los componentes de la membrana basal.

Experimentos practicados por Janson et al⁸² demostraron que la acción citotóxica de la amilina humana puede ser mediada por la interacción de la membrana celular con partículas tóxicas de amilina de tamaño intermedio, o ISTAP (*intermediated-sized toxic amyloid particles*). Se trataría de agregados hidrofóbicos conteniendo de 25 a 6.000 moléculas de amilina que causarían la desestabilización de las membranas celulares, con su ulterior disrupción y vesiculación. Tras su muerte celular (por necrosis o apoptosis), los agregados preamiloidogénicos serían liberados al espacio extracelular, donde madurarían, dando lugar como segundo acontecimiento a la aparición de grandes ($> 10^6$ moléculas por partícula) depósitos fibrilares de amiloide, en los que la capacidad para causar lesión de membrana está considerablemente disminuida o abolida.

ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA AMILINA

La elevada analogía de la secuencia de aminoácidos del péptido maduro entre diferentes especies, y la amidación del residuo carboxiterminal, sugiere que la amilina puede actuar como hormona paracrina. Asimismo, el origen pancreático y el hecho de que sea cosecretada con la insulina indica que podría ejercer una función en la regulación del metabolismo de la glucosa. Además, su homología con la calcitonina y los neuropéptidos CGRP sugiere una acción hormonal en el metabolismo del calcio.

Hasta la actualidad, se han descrito efectos biológicos de la amilina en el músculoquelético, el hígado, el páncreas, el tracto gastrointestinal, el sistema nervioso central⁸³, el metabolismo óseo⁸⁴ y el sistema cardiovascular⁸⁵. No obstante, a pesar de haberse realizado estudios fisiológicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, las funciones exactas de la amilina no han sido completamente elucidadas, y su posible relevancia es motivo de controversia. Ello es debido a que, en la mayoría de investigaciones, las concentraciones necesarias del péptido para obtener un efecto biológico han resultado muy superiores a las concentraciones fisiológicas del péptido.

Efecto en el metabolismo de la glucosa

Cooper et al proporcionaron la primera evidencia a favor de que la amilina podría ser una hormona glucorreguladora, demostrando la inhibición dependiente de la dosis de la incorporación de glucosa a glucógeno en el tejido musculoesquelético por la amilina⁸⁶. Este hecho hizo que se postulara la hipótesis de que la hipersecreción de amilina induce resistencia a la insulina y, en consecuencia, podría ejercer una acción importante en la disminución de la sensibilidad a la insulina que se produce en la DM tipo 2. La amilina actuaría como un inhibidor no competitivo de la insulina y disminuiría la acumulación de glucógeno inducida por esta hormona⁸⁷. Así, inhibe la síntesis de glucógeno y estimula la glucogénesis, a través de la activación de la glucógeno sintasa y la inhibición de la glucógeno fosforilasa^{88,89}, respectivamente, produciéndose ambas acciones a través de mecanismos de fosforilización independientes del AMP cíclico.

Por otra parte, la amilina aumenta la producción hepática de lactato. No obstante, no se sabe con certeza si este efecto es el resultado de la acción directa en el hígado, o sería secundario a un aumento de la producción de sustratos gluconeogénicos. En este sentido, algunos estudios han evidenciado un incremento de la producción de lactato después de la administración de amilina⁹⁰.

El tejido adiposo no constituiría un tejido diana de las acciones de la amilina, pero sí que resultaría afectado de forma indirecta. Se ha hipotetizado que un flujo excesivo del lactato muscular al hígado podría promover la lipogénesis hepática y la producción de lipoproteínas de muy baja densidad, que serían transportadas al tejido adiposo.

Efecto en la secreción de insulina

Estudios efectuados en islotes pancreáticos han demostrado que la amilina es capaz de inhibir la secreción de insulina estimulada por la glucosa⁹¹.

El efecto inhibidor de la amilina en la secreción de insulina puede ser revertido por el antagonista IAPP₈₋₃₇⁹², que actúa selectivamente bloqueando los receptores de la amilina y que, además, es capaz de estimular la secreción de insulina en islotes pancreáticos aislados. Se desconoce el mecanismo por el que la amilina inhibe la liberación de insulina. Estudios en islotes pancreáticos de rata y en la línea celular β TC3 han demostrado que la amilina no modifica los valores de ARN mensajero ni tampoco la biosíntesis de proinsulina, habiéndose sugerido que la amilina actuaría regulando el mecanismo de acoplamiento estímulo-secreción de la célula β ⁹³.

Efecto en la secreción de glucagón

Estudios en ratas utilizando el clamp euglicémico-hiperinsulinémico han demostrado que la amilina a concentraciones fisiológicas es capaz de inhibir la secreción de glucagón inducida por aminoácidos, como la arginina⁹⁴. Este efecto también se ha documentado utilizando el análogo de la amilina pramlintide (AC₁₃₇, en el que los aminoácidos en posición 25, 28 y 29 se han sustituido por prolina), tanto en estudios en animales de experimentación como en pacientes con DM tipo 1. La acción glucagonostática de la amilina no se ha demostrado en el modelo de páncreas perfundido, indicando que podría estar mediada por un mecanismo extrapancreático. Por otro lado, el hecho de que el efecto supresor de la secreción de glucagón no se produzca en presencia de hipoglucemia inducida por insulina apoya la hipótesis de un mecanismo central.

Efectos en el tracto gastrointestinal

Estudios clínicos efectuados con pramlintide han demostrado que la infusión continua de este análogo es capaz de reducir las elevaciones de la glucemia posprandial. Esta acción es debida al efecto inhibitorio de la amilina del vaciamiento gástrico⁹⁵. La supresión de este efecto tras una vagotomía supradiafragmática indica que se requiere la presencia de una innervación vagal preservada, que sería mediada por un mecanismo central. Además, un hecho relevante en el potencial uso terapéutico de análogos de la amilina es que este efecto es revertido por la hipoglucemia inducida por la insulina, lo que indica la existencia de un mecanismo glucosensor protector de la hipoglucemia grave⁹⁶.

Por otro lado, también se ha documentado un efecto inhibitorio de la amilina en la secreción ácida gástrica⁹⁷, pero no se conoce el mecanismo exacto de esta acción. Es posible que la amilina liberada a partir de las células de la mucosa antral estimule la secreción autocrina de somatostatina, dando lugar a una inhibición de la secreción antral de gastrina, así como a una inhibición de la secreción ácida y de histamina en el fundus.

Efecto en el control de la ingesta

Diversos estudios en animales de experimentación han documentado que la amilina es capaz de reducir el apetito, y que su administración crónica causa una disminución dependiente de la dosis del consumo de alimentos y del peso corporal^{83,98}. Asimismo, estudios clínicos en pacientes con DM tipo 2 han demostrado una reducción del índice de masa corporal con la utilización del análogo pramlintide⁹⁹. Este efecto anorexígeno sería independiente de la inhibición del vaciamiento gástrico y se produciría como consecuencia de una acción directa en el sistema nervioso central⁹⁸.

Efectos en la función renal

Se ha demostrado la presencia de zonas de unión con elevada afinidad por la amilina en el córtex renal¹⁰⁰. También se ha documentado un efecto estimulador de la amilina sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona, por lo que se hipotetizó que una hipersecreción de amilina podría ser causa de hipertensión arterial. Por otro lado, estudios recientes han demostrado que la amilina presenta efectos diuréticos y natriuréticos¹⁰¹. No obstante, nunca se han documentado cambios significativos de la presión arterial en pacientes sometidos a tratamiento crónico con análogos de la amilina.

Efectos en el metabolismo del calcio

Estudios *in vitro* han demostrado que la amilina presenta efectos inhibidores de la resorción ósea y estimuladores de la remodelación ósea, lo cual sugiere que podría actuar como una hormona paracrina en el metabolismo del calcio⁸⁴. Así, se ha documentado que la amilina es capaz de inhibir la motilidad de los osteoclastos y que puede presentar una potente acción hipocalcemiante¹⁰². Los efectos biológicos de la amilina serían mediados, al menos en parte, a través de la unión a receptores de la calcitonina en los osteoclastos. No obstante, estudios clínicos con el análogo pramlintide en pacientes con DM tipo 1 no han objetivado cambios en la densidad mineral ósea ni en marcadores plasmáticos del metabolismo del calcio y fosfatos¹⁰³.

Efectos en el sistema cardiovascular

Se han documentado efectos vasodilatadores e hipotensores de la amilina en experimentos con ratas. Así, después de la administración intradérmica, es capaz de promover el au-

mento del flujo sanguíneo y la formación del edema inducido por la bradicinina⁸⁵, y puede causar una disminución de la presión arterial sistémica después de su administración intravenosa¹⁰⁴. No obstante, estos efectos no se han documentado en humanos, al menos con concentraciones fisiológicas del péptido.

POTENCIALES PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS

Tratamiento con análogos de la amilina

La historia natural de la secreción de insulina en la DM tipo 2 actualmente está bien caracterizada: después de un período de resistencia a la insulina e hipersecreción compensadora de la célula β , se produce una disminución progresiva de la secreción. El patrón de secreción de la amilina en la evolución de la DM tipo 2 parece ser paralelo, con una primera fase de hiperamilinemia (con probable formación de depósitos de amiloide, responsables de la ulterior disfunción de la célula β), y una posterior reducción progresiva de las concentraciones plasmáticas de amilina. Por tanto, el fracaso de la célula β en la DM, tanto tipo 1 como tipo 2, ha de ser contemplada como el déficit de dos hormonas: insulina y amilina. En consecuencia, la restauración completa del control de la homeostasis de la glucosa requerirá la corrección de ambos déficit hormonales¹⁰⁵. Este hecho abre nuevas perspectivas terapéuticas en la diabetes, mediante la utilización de análogos de la amilina, que presentan todas las acciones fisiológicas de la amilina, pero que son hidrosolubles. En este sentido, estudios clínicos con pramlintide indican que puede contribuir a optimizar el control metabólico de pacientes con DM tipo 1 y tipo 2^{99,106,107}.

Inhibición del proceso de amiloidogénesis

En una fase precoz de la DM tipo 2, la prevención o interrupción del proceso de deterioro de la función de la célula β asociado a la amiloidosis de los islotes podría preservar la función endógena de insulina o, al menos, retrasar la aparición de hiperglucemia. Diversos estudios apoyan la hipótesis de que la sobreexpresión de la amilina puede promover la formación de amiloide⁶⁸⁻⁷⁰, aunque también podrían influir factores microambientales (p. ej., el pH u otros componentes de la célula β)¹⁰⁸. Por otro lado, los depósitos de amiloide no constituyen formaciones inertes *in vivo*, sino que están en remodelación constante, pudiendo incluso remitir si se detiene el proceso de formación de las fibras de amilina¹⁰⁹. Por tanto, las estrategias terapéuticas tendrán que ir dirigidas en dos direcciones.

Inhibición de la producción de amilina

– Inhibición directa. Se ha demostrado una reducción de los valores del ARN mensajero de la amilina en experimentos *in vitro* utilizando oligonucleótidos antisentido¹¹⁰, o mediante adenovirus que expresan el ADN complementario antisentido de la amilina¹¹¹. Estos resultados indican que la terapia génica potencialmente podría ser efectiva en la supresión de la producción de amilina.

– Inhibición indirecta. Dado que los genes de la insulina y de la amilina presentan elementos promotores reguladores comunes³³, la expresión de ambos genes habitualmente está corregulada. En consecuencia, algunos fármacos capaces de inhibir la expresión del gen de la insulina también inhibirán simultáneamente la expresión del gen de la amilina. Asimismo, una reducción de los requerimientos de la producción endógena de insulina también disminuirá la producción de amilina y, por tanto, puede inhibir indirectamente la formación

de depósitos de amiloide. Esta reducción puede conseguirse iniciando precozmente el tratamiento con insulina en el curso de la DM tipo 2¹¹², o mediante fármacos capaces de disminuir la producción endógena de glucosa¹¹³ o de aumentar la sensibilidad a la insulina¹¹⁴. Así, se ha demostrado una disminución de las concentraciones plasmáticas de amilina con tratamiento con insulina y metformina^{112,113}. En contraposición, dado su efecto estimulador de la secreción de insulina, el tratamiento con sulfonilureas incrementa las concentraciones de amilina⁴⁷, y esta acción potencialmente amiloidogénica podría ser el mecanismo responsable del fracaso secundario observado frecuentemente con la utilización de tales fármacos.

Inhibición de la formación de fibras de amiloide

Como se ha discutido previamente, todos los depósitos de sustancia amiloide presentan, además de la proteína amiloidogénica, otros componentes que potencialmente pueden estabilizarlos, tales como el componente sérico P, la apoproteína E, y el perlecan. Por tanto, el bloqueo de su unión a las fibras de amiloide en formación podría inhibir el proceso de amiloidogénesis¹¹⁵.

Finalmente, estudios en la enfermedad de Alzheimer han puesto de manifiesto la inhibición del proceso de fibrillogénesis como resultado del tratamiento con anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína β -amiloide¹¹⁶, y con péptidos sintéticos capaces de romper las fibras formadas¹¹⁷. Estos resultados podrían proporcionar la base de una nueva aproximación terapéutica para prevenir la formación de amiloide en la DM tipo 2.

CONCLUSIONES

En los últimos años se ha producido un notable avance en el conocimiento de las acciones biológicas de la amilina y su importancia en la formación de los depósitos de amiloide en los islotes pancreáticos que acontece en la DM tipo 2. Sabemos que el fracaso de la célula β que se produce tanto en la DM tipo 1 como en la DM tipo 2 ha de ser contemplado como el déficit de dos hormonas: insulina y amilina, y que ambas contribuirían en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Estudios *in vivo* con animales transgénicos han demostrado que la sobreexpresión de la amilina es un importante factor inductor de la formación de amiloide en los islotes pancreáticos, mientras que estudios *in vitro* han demostrado que dicha sobreexpresión ejerce una acción citotóxica en la célula β pancreática. En humanos, las mutaciones capaces de producir una sobreexpresión del gen podrían ejercer un potencial efecto diabetogénico, dentro del contexto poligénico de la enfermedad. Finalmente, la inhibición de la producción de amilina o de su agregación en forma de fibras podrían constituir futuras estrategias terapéuticas para la DM tipo 2.

BIBLIOGRAFÍA

- Opie EL. The relation of diabetes mellitus to lesions of the pancreas: hyaline degeneration of the islands of Langerhans. *J Exp Med* 1901; 5: 527-540.
- Westermarck P, Wernstedt C, Wilander E, Sletten K. A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 140: 827-831.
- Westermarck P, Wernstedt C, Wilander E, Hayden DW, O'Brien TD, Johnson KH. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3881-3885.
- Cooper GJS, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, Reid KBM. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 8628-8632.
- Serpell LC, Sunde M, Benson MD, Tennent GA, Pepys MB, Fraser PE. The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J Mol Biol* 2000; 300: 1033-1039.
- Glennner GG. Amyloid deposits and amyloidosis: the beta-fibrilloses. *N Engl J Med* 1980; 302: 1283-1292.
- Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake C. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* 1997; 273: 729-739.
- Hutchinson WL, Hohenester E, Pepys MB. Human serum amyloid P component is a single uncomplexed pentamer in whole serum. *Mol Med* 2000; 6: 482-493.
- Charge SB, Esiri MM, Bethune CA, Hansen BC, Clark A. Apolipoprotein E is associated with islet amyloid and other amyloidoses: implications for Alzheimer's disease. *J Pathol* 1996; 179: 443-447.
- Young ID, Ailles L, Narindrasorasak S, Tan R, Kisilevsky R. Localization of the basement membrane heparan sulfate proteoglycan in islet amyloid deposits in type II diabetes mellitus. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 951-954.
- Kahn SE, Andrikopoulos S, Verchere CB. Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 241-253.
- Westermarck P. Quantitative studies on amyloid in the islets of Langerhans. *Ups J Med Sci* 1970; 77: 91-94.
- Clark A, Saad MF, Nezzar T, Uren C, Knowler WC, Bennett PH et al. Islet amyloid polypeptide in diabetic and non-diabetic pima Indians. *Diabetologia* 1990; 33: 285-289.
- Westermarck P. Amyloid and polypeptide hormones: what is their relationship? *Amyloid* 1997; 1: 47-60.
- Westermarck P, Wernstedt C, O'Brien TD, Hayden DW, Johnson KH. Islet amyloid in type 2 human diabetes mellitus and adult diabetic cats contains a novel putative polypeptide hormone. *Am J Pathol* 1987; 127: 414-417.
- Howard CF. Longitudinal studies on the development of diabetes in individual *Macaca nigra*. *Diabetologia* 1986; 29: 301-306.
- O'Brien TD, Butler AE, Roche PC, Johnson KH, Butler PC. Islet amyloid polypeptide in human insulinomas. Evidence for intracellular amyloidogenesis. *Diabetes* 1994; 43: 329-336.
- Nishi M, Sanke T, Nagamatsu S, Bell GI, Steiner DF. Islet amyloid polypeptide: a new β -cell secretory product related to islet amyloid deposits. *J Biol Chem* 1990; 265: 4173-4176.
- Kahn SE, D'Alessio DA, Schwartz MW, Fujimoto WY, Ensink JW, Taborsky GJ Jr et al. Evidence of cosecretion of islet amyloid polypeptide and insulin by beta-cells. *Diabetes* 1990; 39: 634-638.
- Butler PC, Chou J, Carter WB, Wang YN, Bu BH, Chang D et al. Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans. *Diabetes* 1990; 39: 752-756.
- Hartert E, Svoboda T, Ludvik B, Schuller M, Lell B, Kuenburg E et al. Basal and stimulated plasma levels of pancreatic amylin indicate its co-secretion with insulin in humans. *Diabetologia* 1991; 34: 52-54.
- Cooper GJS. Amylin compared with calcitonin gene-related peptide. Structure, biology, and relevance to metabolic disease. *Endocr Rev* 1994; 15: 163-201.
- Sanke T, Bell GI, Sample C, Rubenstein AH, Steiner DF. An islet amyloid peptide derived from a 89-amino acid precursor by proteolytic processing. *J Biol Chem* 1988; 263: 17243-17246.
- Lukinius A, Wilander E, Westermarck GT, Engström U, Westermarck P. Co-localization of islet amyloid polypeptide in the B cell secretory granules of the human pancreatic islet. *Diabetologia* 1989; 32: 240-244.
- Baillyes EM, Shennan KI, Seal AJ, Smeekens SP, Steiner DF, Hutto JC et al. A member of the eukaryotic subtilisin family (PC3) has the enzymic properties of the type 1 proinsulin-converting endopeptidase. *Biochem J* 1992; 285: 391-394.
- Roder ME, Porte D, Schwartz RS, Kahn SE. Disproportionately elevated proinsulin levels reflect the degree of impaired B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 604-608.
- Nishi M, Sanke T, Seino S, Eddy R, Fan YS, Byers MG et al. Human islet amyloid polypeptide gene: complete nucleotide sequence, chromosomal localization, and evolutionary history. *Mol Endocrinol* 1989; 3: 1775-1781.
- Hoovers JMN, Redeker E, Speleman F, Höppener JWM, Bhola S, Blik J et al. High-resolution chromosomal localization of the human calcitonin/CGRP/IAPP gene family. *Genomics* 1993; 15: 525-529.
- Christmansson L, Rorsman F, Stenman G, Westermarck P, Betsholtz C. The human islet amyloid polypeptide (IAPP) gene. Organization, chromosomal localization and functional identification of a promoter region. *FEBS Letters* 1990; 267: 160-166.
- Carty MD, Lillquist JS, Peshavaria M, Stein R, Soeller WC. Identification of cis- and trans-active factors regulating human islet amyloid polypeptide gene expression in pancreatic β -cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 11986-11993.
- Mosselman S, Höppener JWM, De Wit L, Soeller W, Lips CJM, Jansz HS. IAPP/amylin gene transcriptional control region: evidence for negative regulation. *FEBS Letts* 1990; 271: 33-36.
- German MS, Moss LG, Wang J, Rutter WJ. The insulin and islet amy-

- loid polypeptide genes contain similar cell-specific promoter elements that bind identical beta-cell nuclear complexes. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 1778-1788.
33. Ekawa K, Nishi M, Ohagi S, Sanke T, Nanjo K. Cloning of mouse islet amyloid polypeptide gene and characterization of its promoter. *J Mol Endocrinol* 1997; 19: 79-86.
 34. Watada H, Kajimoto Y, Kaneto H, Matsuoka T, Fujitani Y, Miyazaki J, et al. Involvement of the homeodomain-containing transcription factor PDX-1 in islet amyloid polypeptide gene transcription. *Biochem Biophys Res Comm* 1996; 229: 746-751.
 35. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994; 371: 606-609.
 36. Bretherton-Watt D, Gore N, Boam DS. Insulin upstream factor 1 and a novel ubiquitous factor bind to the human islet amyloid polypeptide/amylin gene promoter. *Biochem J* 1996; 313: 495-502.
 37. Petersen HV, Serup P, Leonard J, Michelsen BK, Madsen OD. Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10465-10469.
 38. Edlund H. Transcribing pancreas. *Diabetes* 1998; 47: 1817-1823.
 39. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. Beta-cell specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset of diabetes. *Genes Dev* 1998; 12: 1763-1768.
 40. Petersen HV, Peshavaria M, Pedersen AA, Philippe J, Stein R, Madsen OD et al. Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Lett* 1998; 43: 362-366.
 41. MacFarlane WM, McKinnon CM, Felton-Edkins ZA, Cragg H, James RF, Docherty K. Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 1011-1016.
 42. MacFarlane WM, Smith SB, James RF, Clifton AD, Doza YN, Cohen P et al. 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 high glucose in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 20936-20944.
 43. Stridsberg M, Sandler S, Wilander E. Cosecretion of islet amyloid polypeptide (IAPP) and insulin from isolated rat pancreatic islets following stimulation or inhibition of β cell function. *Regul Pept* 1993; 45: 363-370.
 44. Novials A, Sarri Y, Casamitjana R, Rivera F, Gomis R. Regulation of islet amyloid polypeptide in human pancreatic islets. *Diabetes* 1993; 42: 1514-1519.
 45. Enoki S, Mitsukawa T, Takemura J, Nakazato M, Aburaya J, Toshimori H et al. Plasma islet amyloid polypeptide levels in obesity, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1992; 15: 97-102.
 46. Kahn SE, Verchere CB, Andrikopoulos S, Asberry PJ, Leonetti DL, Wahl P et al. Reduced amylin release is a characteristic of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in Japanese Americans. *Diabetes* 1998; 47: 640-645.
 47. Rachman J, Payne MJ, Levy JC, Barrow BA, Holman R, Turner RC. Changes in amylin and amylin-like peptide concentrations and β -cell function in response to sulfonylurea or insulin therapy in NIDDM. *Diabetes Care* 1998; 21: 810-816.
 48. Dechenes CJ, Verchere CB, Andrikopoulos S, Kahn SE. Human aging is associated with parallel reductions in insulin and amylin release. *Am J Physiol* 1998; 275: E785-E791.
 49. Ludvik B, Clodi M, Kautzky-Willer A, Schuller M, Graf H, Hartter E et al. Increased levels of circulating islet amyloid polypeptide in patients with chronic renal failure have no effect on insulin secretion. *J Clin Invest* 1994; 94: 2045-2050.
 50. Kautzky-Willer A, Thomaseth K, Ludvik B, Nowotny P, Rabensteiner D, Waldhäusl W et al. Elevated islet amyloid pancreatic polypeptide and proinsulin in lean gestational diabetes. *Diabetes* 1997; 46: 607-614.
 51. Semenkovich CF, Heinecke JW. The mystery of diabetes and atherosclerosis. Time for a new plot. *Diabetes* 1997; 46: 327-334.
 52. Davignon J, Cohn JS, Mabile L, Bernier L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clin Chim Acta* 1999; 286: 115-143.
 53. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res* 1992; 33: 447-457.
 54. Rubinsztein DC, Easton DF. Apolipoprotein E genetic variation and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999; 10: 199-209.
 55. Basu SK, Ho YK, Brown MS, Bilheimer DW, Anderson RG, Goldstein JL. Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J Biol Chem* 1982; 257: 9788-9795.
 56. Sanan D, Weisgraber KH, Russell SJ, Mahley RW, Huang D, Saunders A et al. Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils: isoform E4 associates more efficiently than apoE3. *J Clin Invest* 1994; 94: 860-869.
 57. Kisilevski R, Fraser PE. A β amyloidogenesis: unique, or variation on a systemic theme? *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997; 32: 361-404.
 58. Castillo GM, Lukito W, Wight TN, Snow AD. The sulfate moiety of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of beta-amyloid protein fibril formation. *J Neurochem* 1999; 72: 1681-1687.
 59. Castillo GM, Cummings JA, Yang W, Judge ME, Sheardown MJ, Rimvall K et al. Sulfate content and specific glycosaminoglycan backbone of perlecan are critical for perlecan's enhancement of islet amyloid polypeptide (amylin) fibril formation. *Diabetes* 1998; 47: 612-620.
 60. Westermark P, Engstrom U, Johson KH, Westermark GT, Betsholtz C. Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 13: 5036-5040.
 61. Martin JB. Molecular basis of neurodegenerative disorders. *N Engl J Med* 1999; 340: 1970-1980.
 62. Sakagashira S, Sanke T, Hanabusa T, Shimomura H, Ohagi S, KY Kumagaye et al. Missense mutation of amylin gene (S20G) in Japanese NIDDM patients. *Diabetes* 1996; 45: 1279-1281.
 63. Sakagashira S, Hidinga HJ, Tateishi K, Sanke T, Hanabusa T, Nanjo J et al. S20G mutant amylin exhibits increased intracellular cytotoxicity compared to wild-type amylin. *Am J Pathol* 2000; 157: 2101-2109.
 64. O'Brien TD, Rizza RA, Carney JA, Butler PC. Islet amyloidosis in a patient with chronic massive insulin resistance due to antiinsulin receptor antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 290-292.
 65. Ludvik B, Berzlanovich A, Hartter E, Lell B, Prager R, Graf H. Increased amylin levels in patients on chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1990; 6: 694-695.
 66. Höppener JWM, Verbeek JS, De Koning EJP, Oosterwijk C, Van Hulst KL, Visser-Vernooij HJ et al. Chronic overproduction of islet amyloid polypeptide/amylin in transgenic mice: lysosomal localization of human islet amyloid polypeptide and lack of marked hyperglycaemia or hyperinsulinaemia. *Diabetologia* 1993; 36: 1258-1265.
 67. Janson J, Soeller WC, Roche PC, Nelson RT, Torchia AJ, Kreutter DK et al. Spontaneous diabetes mellitus in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7283-7288.
 68. Höppener JWM, Oosterwijk C, Nieuwenhuis MG, Posthuma G, Thijsen JH, Vroom TM et al. Extensive islet amyloid formation is induced by development of type II diabetes mellitus and contributes to its progression: pathogenesis of diabetes in a mouse model. *Diabetologia* 1999; 42: 427-434.
 69. Van Hulst KL, Oosterwijk C, Born W, Vroom TM, Nieuwenhuis MG, Blankenstein MA et al. Islet amyloid polypeptide/amylin messenger RNA and protein expression in human insulinomas in relation to amyloid formation. *Eur J Endocrinol* 1999; 140: 69-78.
 70. Höppener JWM, Ahrén B, Lips CJM. Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2000; 343: 411-419.
 71. Soeller WC, Janson J, Hart SE, Parker JC, Carty MD, Stevenson RW et al. Islet amyloid-associated diabetes in obese A β mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Diabetes* 1998; 47: 743-750.
 72. Couce M, Kane LA, O'Brien TD, Charlesworth J, Soeller W, McNeish J et al. Treatment with growth hormone and dexamethasone in mice transgenic for human islet amyloid polypeptide causes islet amyloidosis and beta-cell dysfunction. *Diabetes* 1996; 45: 1094-1101.
 73. Kapurniotu A, Bernhagen J, Greenfield N, Al-Abed Y, Teichberg S, Frank RW et al. Contribution of advanced glycosylation to the amyloidogenicity of islet amyloid polypeptide. *Eur J Biochem* 1998; 251: 208-216.
 74. Röcken C, Linke RP, Saeger W. Immunohistology of islet amyloid polypeptide in diabetes mellitus: semi-quantitative studies in a post-mortem series. *Virchows Arch* 1992; 421: 339-344.
 75. Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC, Yankner BA. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature* 1994; 368: 756-760.
 76. Janciauskiene S, Ahren B. Different sensitivity to the cytotoxic action of the IAPP fibrils in two insulin-producing cell lines, HIT-T15 and RINm5F cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 888-893.
 77. Janciauskiene S, Ahren B. Fibrillar islet amyloid polypeptide differentially affects oxidative mechanisms and lipoprotein uptake in correlation with cytotoxicity in two insulin-producing cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 619-625.
 78. Zhang S, Liu J, Saafi EL, Cooper GJ. Induction of apoptosis by human amylin in RINm5F islet beta-cells is associated with enhanced expression of p53 and p21WAF1/C1P1. *FEBS Lett* 1999; 455: 315-320.
 79. Mirzabekov TA, Lin MC, Kagan B. Pore formation by the cytotoxic islet amyloid peptide amylin. *J Biol Chem* 1996; 271: 1988-1992.
 80. Bai JZ, Saafi EL, Zhang S, Cooper GJS. Role of Ca $^{2+}$ in apoptosis evoked by human amylin in pancreatic islet β -cells. *Biochem J* 1999; 343: 53-61.
 81. McLean LR, Balasubramaniam A. Promotion of beta-structure by interaction of diabetes associated polypeptide (amylin) with phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1122: 317-320.
 82. Janson J, Ashley RH, Harrison D, McIntyre S, Butler PC. The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes* 1999; 48: 491-498.
 83. Morley JE, Flood JF. Amylin decreases food intake in mice. *Peptides* 1991; 12: 865-869.
 84. Zaidi M, Datta HK, Bevis PJR, Wimalawansa SJ, MacIntyre I. Amylin-amide: a new bone-conserving peptide from the pancreas. *Exp Physiol* 1990; 75: 529-536.
 85. Brain SD, Wimalawansa S, MacIntyre I, Williams TJ. The demonstra-

- tion of vasodilatador activity of pancreatic amylin amide in the rat. *Am J Pathol* 1990; 136: 487-490.
86. Cooper GJS, Leighton B, Dimitriadis GD, Parry-Billings M, Kowalchuk JW, Howland K et al. Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 7763-7766.
 87. Young AA, Gedulin B, Wolfe-López D, Greene HE, Rink TJ, Cooper GJ. Amylin and insulin in rat soleus muscle: dose responses for cosecreted noncompetitive antagonists. *Am J Physiol* 1992; 263: E274-E281.
 88. Young AA, Mott DM, Stone K, Cooper GJ. Amylin activates glycogen phosphorylase in the isolated soleus muscle of the rat. *FEBS Lett* 1991; 281: 149-151.
 89. Young DA, Deems RO, Deacon RW, McIntosh RH, Foley JE. Effects of amylin on glucose metabolism and glycogenolysis in vivo and in vitro. *Am J Physiol* 1990; 259: E457-E461.
 90. Young AA, Wang MW, Cooper GJ. Amylin injection causes elevated plasma lactate and glucose in the rat. *FEBS Lett* 1991; 291: 101-104.
 91. Ar'Rajab A, Ahrén B. Effects of amidated rat islet amyloid polypeptide on glucose-stimulated insulin secretion in vivo and in vitro in rats. *Eur J Pharmacol* 1991; 192: 443-445.
 92. Silvestre RA, Salas M, Degano P, Peiró E, Marco J. Reversal of the inhibitory effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and amylin by the 8-37 fragment of the human CGRP. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2343-2347.
 93. Wang F, Permert J, Östenson CG. Islet amyloid polypeptide regulates multiple steps in stimulus-secretion coupling of β cells in rat pancreatic islets. *Pancreas* 2000; 20: 264-269.
 94. Gedulin BR, Rink TJ, Young AA. Dose-response for glucagonostatic effects of amylin in rats. *Metabolism* 1997; 46: 67-70.
 95. Kong MF, King P, MacDonald IA, Stubbs TA, Perkins AC, Blackshaw PE et al. Infusion of pramlintide, a human amylin analogue, delays gastric emptying in men with NIDDM. *Diabetologia* 1997; 40: 82-88.
 96. Gedulin B, Young AA. Hypoglycemia overrides amylin-mediated regulation of gastric emptying in rats. *Diabetes* 1997; 47: 93-97.
 97. Cooper GJS. Amylin compared with calcitonin gene-related peptide. Structure, biology, and relevance to metabolic disease. *Endocr Rev* 1994; 15: 163-201.
 98. Rushing PA, Hagan MM, Seeley RJ, Lutz TA, Woods SC. Amylin: a novel action in the brain to reduce body weight. *Endocrinology* 2000; 141: 850-853.
 99. Thompson RG, Pearson L, Schoenfeld SL, Kolterman OG. The Pramlintide in Type 2 Diabetes Group. Pramlintide, a synthetic analog of human amylin, improves the metabolic profile of patients with type 2 diabetes using insulin. *Diabetes Care* 1998; 21: 987-993.
 100. Wookey PJ, Tikellis C, Du HC, Qin HF, Sexton PM, Cooper ME. Amylin binding in rat renal cortex, stimulation of adenylyl cyclase, and activation of plasma renin. *Am J Physiol* 1996; 39: F289-F294.
 101. Vine W, Smith P, LaChapell R, Blase E, Young A. Effects of rat amylin on renal function in the rat. *Horm Metab Res* 1998; 30: 518-522.
 102. Alam AS, Moonga BS, Bevis PJ, Huang CL, Zaidi M. Amylin inhibits bone resorption by a direct effect on the motility of rat osteoclasts. *Exp Physiol* 1993; 78: 183-196.
 103. Borm AK, Klevesath MS, Borcea V, Kasperk C, Seibel MJ, Wahl P et al. The effect of pramlintide (amylin analogue) treatment on bone metabolism and bone density in patients with type 1 diabetes. *Horm Metab Res* 1999; 31: 472-475.
 104. Gardiner SM, Compton AM, Kemp PA, Bennet T, Bose C, Foulkes R et al. Antagonistic effect of human α -calcitonin gene-related peptide (8-37) on regional hemodynamic actions of rat islet amyloid polypeptide in conscious Long-Evans rats. *Diabetes* 1991; 40: 948-951.
 105. Kruger DF, Gatcomb PM, Owen SK. Clinical implications of amylin and amylin deficiency. *Diabetes Educ* 1999; 25: 389-397.
 106. Thompson G, Peterson J, Gottlieb A, Mullane J. Effects of pramlintide, an analog of human amylin on plasma glucose profiles in patients with IDDM. Results of a multicenter trial. *Diabetes* 1997; 46: 632-636.
 107. Thompson G, Pearson L, Kolterman OG. Effects of 4 weeks' administration of pramlintide, a human amylin analogue, on glycaemia control in patients with IDDM: effects on plasma glucose profiles and serum fructosamine concentrations. *Diabetologia* 1997; 40: 1278-1285.
 108. Westermark P, Li ZC, Westermark GT, Leckström A, Steiner DF. Effects of beta cell granules components on human islet amyloid polypeptide fibril formation. *FEBS Lett* 1996; 379: 203-206.
 109. Gillmore JD, Hawkins PN, Pepys M.B. Amyloidosis: a review of recent diagnostic and therapeutic developments. *Br J Haematol* 1997; 99: 245-256.
 110. Kulkarni RN, Smith DM, Ghatei MA, Jones PM, Bloom SR. Investigation of the effects of antisense oligodeoxynucleotides to islet amyloid polypeptide mRNA on insulin release, content and expression. *J Endocrinol* 1996; 151: 341-348.
 111. Novials A, Jiménez-Chillarón JC, Franco C, Casamitjana R, Gomis R, Gómez-Foix AM. Reduction of islet amyloid expression and basal secretion by adenovirus-mediated delivery of amylin antisense cDNA. *Pancreas* 1998; 17: 182-186.
 112. Lindström T, Leckström A, Westermark P, Arnqvist HJ. Effect of insulin treatment on circulating islet amyloid polypeptide in patients with NIDDM. *Diabet Med* 1997; 14: 472-476.
 113. Zapečka-Dubno B, Czyżyk A, Dworak A, Bak MI. Treatment with metformin in NIDDM patients lowers plasma amylin level. *Diabetologia* 1997; 40: A316.
 114. Inzucchi SE, Maggs DG, Spollet GR, Page SL, Rife FS, Walton V et al. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1998; 338: 867-872.
 115. Kisilevsky R. Anti-amyloid drugs: potential in the treatment of diseases associated with aging. *Drugs Aging* 1996; 8: 75-83.
 116. Solomon B, Koppel R, Frankel D, Hanan Aharon E. Disaggregation of Alzheimer β -amyloid by site-directed mAb. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4109-4112.
 117. Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castaño EM, Frangione B. Beta sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med* 1998; 4: 822-826.