



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR Y FISIOLÓGIA



PROYECTO DE FIN DE MÁSTER

**Efecto de la glucosa sobre la expresión de
IDE (Insulin Degrading Enzyme) en células
 α -pancreáticas**

Presentado por:
Elena Casanueva Álvarez

Dirigido por:
Dra. Irene Cózar Castellano
Dra. Beatriz Merino Antolín

Valladolid, Julio 2018

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	2
Diabetes Mellitus.....	2
Páncreas endocrino. Los islotes pancreáticos.....	2
Células α - pancreáticas.....	4
Insulin Degrading Enzyme (IDE)	6
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVO	7
2. MATERIAL Y MÉTODOS	7
MATERIAL	7
Medio de cultivo para α -TC1.9	7
Tampón de lisis celular.....	8
Tampón de carga de proteínas (LSB 4X)	8
Geles de poliacrilamida para electroforesis de proteína:	8
Tampón de electroforesis (Bio-Rad):	8
Tampón de transferencia (Bio-Rad):	9
Disolución de bloqueo	9
PBS-Tween 20 (PBS-T):	9
Disolución anticuerpos primarios	9
Disolución anticuerpos secundarios.....	9
MÉTODOS.....	9
1. Cultivo celular	9
2. Tratamiento y obtención de las muestras.....	10
3. Cuantificación de proteínas	11
4. Western Blot	12
5. Análisis estadístico.....	13
3. RESULTADOS	14
1. Efecto del tratamiento con baja glucosa (2.2 mM) crónico (24h) y agudo (1h y 4h) en la expresión proteica de IDE en células α -pancreáticas	14
2. Efecto del tratamiento con alta glucosa (22 mM) crónico (24h) y agudo (1h y 4h) en la expresión proteica de IDE en células α -pancreáticas.	17
3. Efecto del tratamiento de glucagón en la expresión de IDE en células α -pancreáticas.	20
4. DISCUSIÓN.....	20
5. CONCLUSIONES	23
6. BIBLIOGRAFÍA.....	24

1. INTRODUCCIÓN

Diabetes Mellitus

Según datos de la Organización Mundial de la Salud¹ (OMS), la prevalencia mundial de la Diabetes Mellitus (DM) en adultos (mayores de 18 años) ha aumentado del 4,7% en 1980 al 8,5% en 2014. Se estima que en 2015 la diabetes fue la causa directa de 1,6 millones de muertes, debido principalmente a las importantes complicaciones derivadas de esta enfermedad tales como ceguera, insuficiencia renal, infarto de miocardio o accidente cardiovascular. Según estimaciones de esta misma organización, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030.

En España los datos no son alentadores, según el estudio Di@bet.es², llevado a cabo por la Sociedad Española de Diabetes (SED), la prevalencia general de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) de la población española ajustada por edad y sexo fue 13.8% (IC 95% 12.8, 14.7%), de los cuales aproximadamente la mitad desconocía que la padecía: 6.0% (IC 95% 5.4, 6.7%).

Un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado implica una reducción de las patologías asociadas y una mejora en la calidad de vida de los pacientes, suponiendo además un importante ahorro en el gasto sanitario³.

Hay varios tipos de diabetes descritos, de entre los cuales destacan:

- La Diabetes tipo 1 (DM1) es una patología crónica que comienza con la destrucción autoinmunitaria de las células β -pancreáticas, de esta manera el sistema inmune del propio organismo ataca a las células productoras de insulina, lo que lleva a la disminución de la producción de la hormona⁴.
- La Diabetes tipo 2 (DM2) es una patología que cursa con resistencia de los tejidos periféricos a la insulina. Para compensar esta resistencia, las células β -pancreáticas aumentan la secreción de insulina. Este mecanismo compensatorio acaba fallando debido a la pérdida de funcionalidad de estas células. El principal factor de riesgo para el desarrollo de DM2 es la obesidad y el sobrepeso. Representa aproximadamente el 90-95% de todos los casos de diabetes⁴.

Por tanto, la diabetes aparece cuando el páncreas es incapaz de producir suficiente insulina y/o cuando los tejidos no la utilizan eficazmente.

Páncreas endocrino. Los islotes pancreáticos

Al tratarse de una glándula mixta, el páncreas es capaz de llevar a cabo funciones tanto exocrinas como endocrinas. A pesar de que el páncreas exocrino constituye un 98% del órgano, el páncreas endocrino juega un papel fundamental

en la homeostasis de la glucosa y el metabolismo. Las células endocrinas del páncreas se localizan en los islotes de Langerhans (figura 1) y son las encargadas de secretar distintas enzimas⁵:

- **Células beta (β):** son las encargadas de liberar insulina. Representan el 50-70% del islote en humanos y el 60-80% en roedores.
- **Células alfa (α):** liberadoras de glucagón. Representan el 20-40% del islote en humanos y el 10-20% en roedores.
- **Células delta (δ) y gamma (γ):** responsables de la secreción de somatostatina y polipéptido pancreático respectivamente. Representan menos del 10% celular en humanos y menos del 5% en roedores.
- **Células épsilon (ϵ):** encargadas de la liberación de grelina, representan menos del 1% celular en ambas especies⁶.

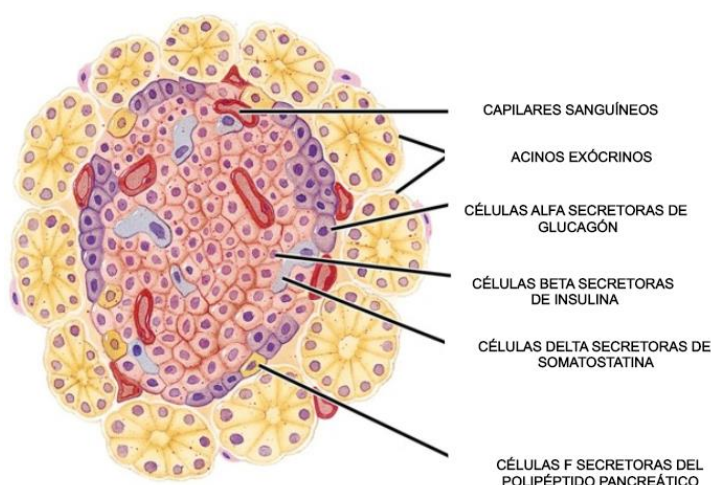


Figura 1. Esquema de un islote pancreático [Adaptado de referencia 7].

El tipo celular predominante en el islote pancreático es la célula β , responsable de la liberación de insulina. Por este motivo casi todos los trabajos científicos han ido dirigidos a su estudio y gracias a ello hoy en día se tiene gran conocimiento acerca de su regulación. No ocurre lo mismo con la fisiología de las poblaciones no- β , a pesar de su relevancia en el islote y su papel en el control de la homeostasis de la glucosa⁸.

La función y la interacción de estos tipos celulares está muy implicada en la regulación de la glucemia (figura 2); cuando existe un aumento en la concentración de glucosa en sangre, actúa la célula β liberando insulina, poniendo en marcha mecanismos dirigidos a disminuir la glucosa en sangre y activación del anabolismo como la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas; e inhibiendo la gluconeogénesis y los procesos catabólicos. A su vez inhibe la secreción de glucagón por la célula α . Por el contrario, ante una situación de hipoglucemia, la célula α secreta glucagón, que pone en marcha mecanismos dirigidos a aumentar los niveles de glucosa en sangre y promueve la secreción de insulina por las células β para poder utilizar la glucosa en liberada⁹.

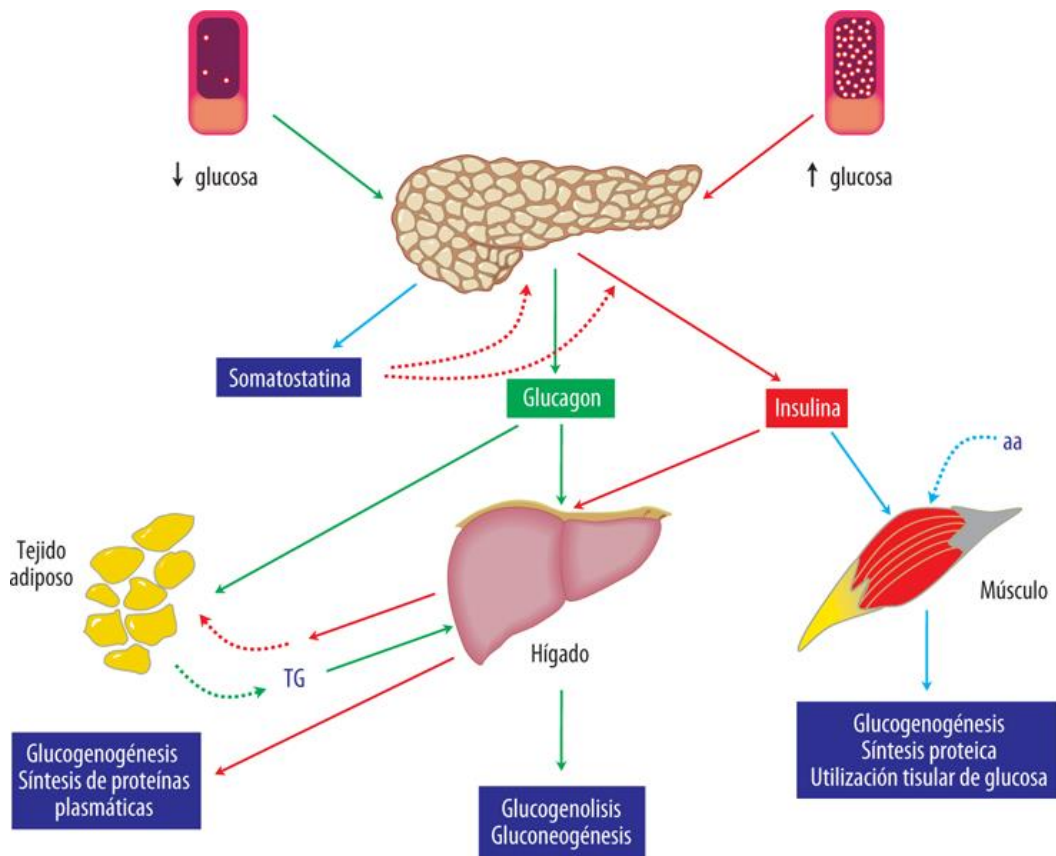


Figura 2. Regulación del metabolismo de la glucosa. [Adaptado de referencia 9]

Como se ha descrito anteriormente, además de la insulina y el glucagón, existen otras hormonas liberadas por distintos tipos celulares localizados en el islote pancreático. Las células δ , secretoras de somatostatina, apenas están caracterizadas, se cree que tienen un comportamiento fisiológico y unos mecanismos de control con grandes paralelismos con la célula β . Al igual que la secreción de insulina reprime la acción de la célula α , la somatostatina es capaz de inhibir tanto la secreción de insulina como la de glucagón⁸.

Células α - pancreáticas

A pesar de que el interés por el estudio de la célula α se ha incrementado en los últimos años, aún no se ha llegado a un consenso respecto a los mecanismos que dirigen su funcionamiento. Esto es debido a que son varios los niveles de regulación que afectan a esta población incluyendo el control autocrino de la propia célula, el control nervioso, el control directo de la glucosa y un control paracrino por parte de las células no- α .

En 2004, el grupo de Patrick Rorsman propuso un modelo¹⁰ de funcionamiento para la célula α posteriormente revisado por el mismo grupo en 2013¹¹. A pesar de que existe cierta controversia, este modelo está aceptado por gran parte de

la comunidad científica, si bien muchos de los trabajos de los últimos años empiezan a proponer algunos cambios de menor o mayor consideración.

Este modelo, esquematizado en la figura 3 sostiene que, la baja concentración de glucosa detectada por el transportador de glucosa GLUT-1, lleva a un cambio en los niveles de ATP/ADP que produce que los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) tengan una baja actividad. Esto lleva a una moderada despolarización de la membrana, que produce la activación de los canales de Na^+ . Esta activación lleva el potencial de membrana a valores más positivos que hacen que se activen canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Esta entrada de calcio lleva a la movilización de los gránulos de glucagón citoplasmáticos y por tanto a la exocitosis de la hormona. Este modelo propone, por tanto, un mecanismo muy similar al de la liberación de insulina por parte de la célula β pero generando cambios opuestos y con diferencias como el transportador de glucosa, siendo GLUT-1 en célula α y principalmente GLUT-2 en célula β . Existen algunos estudios que sostienen que las diferencias entre ambos mecanismos de secreción tienen lugar a nivel mitocondrial, siendo mayor el metabolismo anaeróbico en células α frente a una mayor actividad metabólica mitocondrial en las células β .

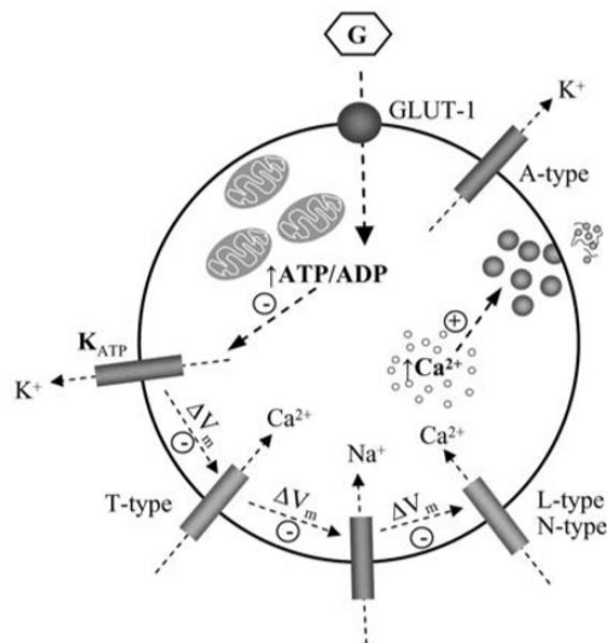


Figura 3. Modelo de acoplamiento estímulo-secreción en la célula alfa. [Adaptado de referencia 8]

Estudios recientes han asociado la DM2 con una incapacidad de suprimir la producción de glucagón en las células α en condiciones de hiperglucemia¹².

Se ha demostrado que ante una situación de resistencia insulínica, el aumento compensatorio de insulina en sangre no inhibe la producción de glucagón como cabría esperar. Esto podría ser debido a que la propia célula α también presenta resistencia a la insulina¹². Está descrita la presencia de hiperglucagonemia en

pacientes con DM2 no controlada¹³. Esta hiperglucagonemia, sumada a la secreción insuficiente de insulina y/o resistencia de los tejidos periféricos a la misma, contribuye a mantener la hiperglucemia de las personas diabéticas.

En el presente estudio, hemos empleado como modelo de célula α -pancreática la línea celular α TC1 clon 9. Se trata de una línea comercial tumoral procedente de un adenoma pancreático de ratón. Esta línea celular es una herramienta idónea para estudiar la biosíntesis de glucagón y los mecanismos regulatorios de la célula α -pancreática. Proponemos esta herramienta ya que el estudio de la población α del islote completo es muy complejo. La población α supone un 10-20% de la población celular total del islote, por lo que el resto de tipos celulares podrían enmascarar nuestros resultados.

Insulin Degrading Enzyme (IDE)

La proteína IDE, cuya estructura podemos ver en la figura 4, es una metaloproteasa dependiente de zinc de 110 kDa¹⁴. La IDE humana es sintetizada como un solo polipéptido de 1019 residuos codificado por un gen localizado en el cromosoma 10. Debe su nombre a su habilidad para degradar la cadena B de la insulina, este proceso fue descrito por primera vez hace 60 años¹⁵. Además, actualmente sabemos que también es capaz de degradar otros pequeños polipéptidos como glucagón, el péptido nutraceútico auricular, el péptido β amiloide, el factor de crecimiento transformante α , así como los factores de crecimiento insulínico 1 y 2. Se trata de una enzima con una estructura evolutivamente conservada, expresada de forma ubicua en todos los tejidos del organismo¹⁶, tanto en células sensibles a la insulina como en las que no lo son. Diferentes estudios la han localizado mayoritariamente en el citoplasma, pero también en las membranas celulares, en orgánulos como endosomas, peroxisomas y mitocondrias y es secretada al espacio extracelular¹⁴.

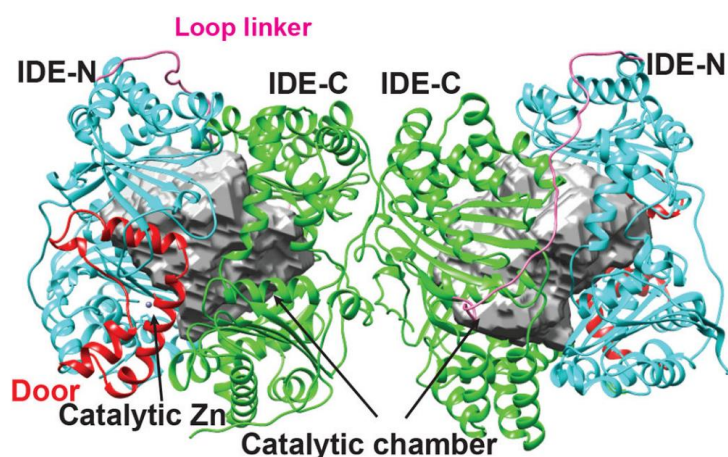


Figura 4. Estructura de la proteína Insulin degrading Enzyme. [Adaptado de referencia 16]

Defectos en la proteína Insulin Degrading Enzyme (IDE) se han asociado con el desarrollo de enfermedades como el Alzheimer o la DM2, proponiendo IDE como una posible diana terapéutica contra el Alzheimer¹⁷ y un posible nexo entre ambas enfermedades¹⁶. Además, el locus genético que contiene el gen de IDE también se ha asociado a una mayor susceptibilidad de padecer diabetes¹⁸. Todo esto nos lleva a pensar que esta enzima podría estar jugando un papel fundamental y hasta ahora poco dilucidado en el desarrollo de la DM2.

Parece que esta enzima podría jugar un papel importante en la regulación del metabolismo de la célula α , estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado que existe una mayor expresión de IDE en las células α comparadas con las β -pancreáticas¹⁹. No existen publicaciones sobre el papel de IDE en células α -pancreáticas, y hay muy pocos estudios realizados en células β , ya que estudios de esta proteína en el contexto de la homeostasis de la glucosa se han centrado en el hígado, que es dónde ocurre el mayor aclaramiento de insulina.

HIPÓTESIS

1. La hiperglucemia estimula los niveles proteicos de IDE en células α -pancreáticas.
2. La hipoglucemia disminuye los niveles proteicos de IDE en células α -pancreáticas.
3. El glucagón tiene un efecto autocrino sobre la regulación de los niveles proteicos de IDE.

OBJETIVO

1. Estudiar la expresión de IDE en la célula α -pancreática en condiciones de baja y alta glucosa en exposición crónica (24h) y aguda (1h y 4h).
2. Estudiar los niveles proteicos de IDE en la célula α -pancreática en presencia de glucagón.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

Medio de cultivo para α -TC1.9

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complementado con:

- 10 μ g/mL Streptomina
- 10 μ g/mL Penicilina

- 10% suero fetal bovino (FBS) inactivado
- 0.1 mM de aminoácidos (AA) no esenciales 100X
- 15mM HEPES
- Glucosa:
 - Low: 2.2 mM (Medio bajo en glucosa: Low)
 - Control: 11 mM (Medio de mantenimiento: Control)
 - High: 22 mM (Medio alto en glucosa: High)

Tampón de lisis celular

- Tampón de lisis 10X 100 µl/mL (9830S, Cell Signaling Technology, MA., EEUU)
- Inhibidor de fosfatasa 2 10 µL/mL (P5726, Sigma, MO, EEUU)
- Inhibidor de fosfatasa 3 10 µL/mL (P0044, Sigma)
- Protease Inhibitor Cocktail (PIC) 10 µL/mL (P8340, Sigma)
- Fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF) 10 µL/mL (Sigma)

Tampón de carga de proteínas (LSB 4X)

- Tampón TRIS HCl 62.5 mM; pH 6 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)
- Glicerol 5% (Sigma)
- SDS 1% (Merck)
- β-mercaptoetanol 2.5% (Sigma)
- Azul de bromofenol 1.25 mg/mL

Geles de poliacrilamida para electroforesis de proteína:

Running para geles al 7,5%

- Tampón Tris HCl 0.5M; pH 8.8 (Merck)
- SDS 0.1% (Merck)
- Acrilamida 7.5% (Bio-Rad)
- Temed 0.06% (Bio-Rad)
- APS 0.06% (Bio-Rad)

Stacking

- Tampón Tris HCl 126 mM; pH 6.8 (Merck)
- SDS 0.1% (Merck)
- Acrilamida 4% (Bio-Rad)
- Temed 0.15% (Bio-Rad)
- APS 0.05% (Bio-Rad)

Tampón de electroforesis (Bio-Rad):

- Tris 25 mM
- Glicina 192 mM

- 0.1% SDS

Tampón de transferencia (Bio-Rad):

- Tris 25 mM
- Glicina 192 mM
- 20% de metanol

Disolución de bloqueo

- Leche en polvo (5%) (p/v)
- PBS-T

PBS-Tween 20 (PBS-T):

- PBS 1X
 - NaCl 137 mM (Merck)
 - KCl 2.7 mM (Merck)
 - KH₂PO₄ 2 mM (Merck)
 - Na₂HPO₄ (Merck)
- Tween 20; 0.1% (v/v) (Bio-Rad)

Disolución anticuerpos primarios

- Anticuerpo de conejo anti-IDE (AB9210, Millipore, Massachusetts, EEUU) diluido en leche 0.05% en PBS-T a una concentración 1:40.000
- Anticuerpo de ratón anti-actina (BD612656 BD Biosciences, EEUU): diluido en leche 0.05% en PBS-T a una concentración 1:40.000

Disolución anticuerpos secundarios

- Para IDE, se empleó un anticuerpo anti-conejo (711-035-152 Jackson ImmunoResearch, EEUU) diluido diluido en leche 0.05% en PBS-T a una concentración 1:8.000
- Para la actina, se empleó el anticuerpo anti-ratón (NA9310, GE Healthcare, Reino Unido) diluido en leche 0.05% en PBS-T a una concentración 1:5.000

MÉTODOS

1. Cultivo celular

La línea celular empleada fue alphaTC1, Clon 9 (ATCC® CRL-2350™). Se trata de una línea celular inmortalizada, de morfología epitelial, adherentes, procedentes de un adenoma pancreático de ratón (*mus musculus*).

El manejo de esta línea celular se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, empleando soluciones a 37°C y material estériles.

Las células se cultivaron en flask de 75 cm², en el medio descrito previamente en un incubador con una atmósfera húmeda a 37°C al 5% de CO₂

Se reemplazó el medio del flask por medio nuevo cada 48 horas. Las células se mantenían en cultivo a una confluencia máxima de 70-80%.

2. Tratamiento y obtención de las muestras

Siembra

1. Experimentos glucosa

Se sembraron 500.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos, se completaron con medio hasta un volumen final de 2 mL/pocillo.

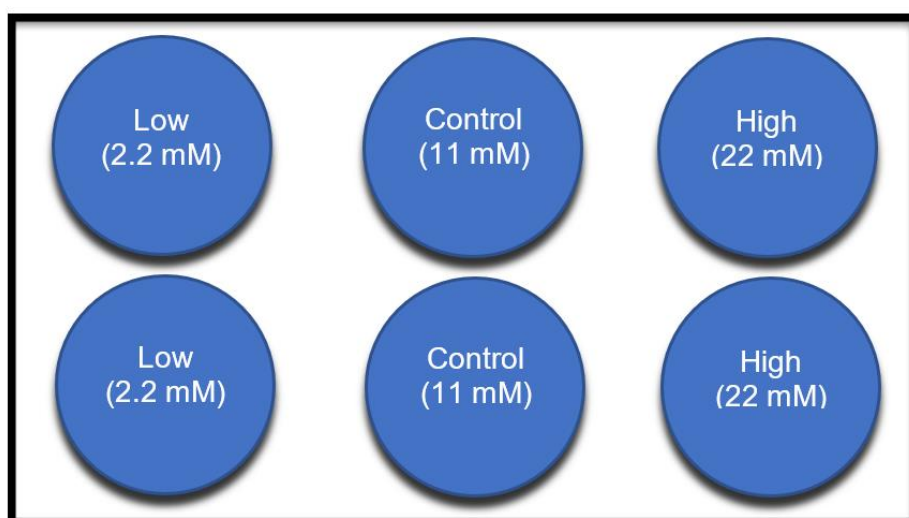


Figura 5. Esquema de la placa de cultivo para el tratamiento.

Transcurridas 24 horas se sustituyó el medio presente en cada pocillo por medio nuevo. Al día siguiente, 48h después de la siembra, se trataron con las distintas concentraciones de glucosa. Se retiró el medio y se sustituyó por el del tratamiento, según se explica en la figura 5.

2. Experimentos glucagón

Al igual que en el experimento con glucosa, se sembraron 500.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos, se completaron con medio hasta un volumen final de 2 mL/pocillo.

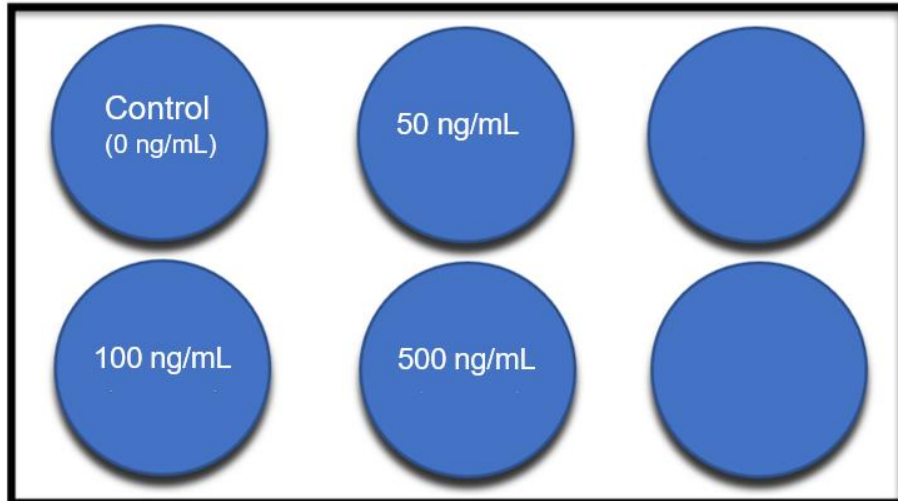


Figura 6. Esquema de la placa de cultivo para el tratamiento.

Transcurridas 24 horas se sustituyó el medio presente en cada pocillo por medio nuevo. Al día siguiente, 48h después de la siembra, se trataron con las distintas concentraciones de glucagón (50 ng/ μ L, 100 ng/ μ L y 500 ng/ μ L), se retiró el medio y se sustituyó por el del tratamiento como se muestra en la figura 6.

Recogida de los extractos celulares

Una vez transcurrido este tiempo se procedió a la recogida de las muestras, para ello, con la placa en hielo, se lavaron los pocillos dos veces con 0.5 mL de PBS frío y posteriormente se añadió a cada pocillo 100 μ L de tampón de lisis celular descrito previamente. Transcurridos 10 minutos, se recogieron las células con ayuda de una rasqueta y se introdujeron en eppendorfs rotulados estériles.

3. Cuantificación de proteínas

Con el fin de romper el DNA genómico de las células, los extractos se sonicaron con 3 pulsos de 4 segundos al 30% de amplitud (sonicador Vibra Cell 75115, Bioblock Scientific), introduciendo la muestra en hielo entre pulsos.

Una vez sonicadas, se procedió a la cuantificación de proteína de las muestras con el objetivo de cargar la misma cantidad de proteína en cada pocillo del gel. Se empleó el Kit microBCA (Thermoscientific, IL, EEUU) para la cuantificación de la proteína. Se llevó a cabo una curva patrón con BSA (del kit) entre las concentraciones 0 y 20 mg/mL para cuantificar la proteína de los extractos. Posteriormente se añadieron 100 μ L del reactivo (25 partes del reactivo A, 24 partes del reactivo B y 1 parte del reactivo C) a cada pocillo hasta completar un volumen de 200 μ L en cada pocillo. Se incubó durante 1 hora a 37°C en una estufa de calor seco y se procedió a la lectura de la absorbancia a 562 nm.

A partir de los datos de la lectura se calculó la recta patrón y la cantidad de muestra a añadir al gel, para obtener una cantidad final de proteína de 30 µg de cada muestra.

Para desnaturalizar las proteínas y que éstas posteriormente se separen por sus pesos moleculares se añadió a cada muestra el tampón de carga LSB 4X en relación 1:3 (v/v), y se hirvieron a 100°C durante 5 minutos. De esta manera las muestras ya están preparadas para cargarlas en el gel o congelarlas a -20°C.

4. Western Blot

Con el objetivo de conocer la cantidad relativa de proteínas que hay en cada muestra se empleó la técnica "Western Blot", basada en la migración de las proteínas de la muestra mediante electroforesis por acción de un campo eléctrico a lo largo de un gel de poliacrilamida, en función de su peso molecular y su posterior identificación con un anticuerpo específico para detectar la proteína de interés, en este caso la proteína IDE.

Cuanto menor sea el porcentaje de acrilamida del gel, mayores serán los poros formados, por lo que se separarán proteínas más grandes. Como IDE es una proteína de elevado peso molecular se emplearon geles de 7.5% de acrilamida cuya composición está descrita en el apartado de materiales. Los peines empleados fueron de 10 pocillos y 1.0 mm, estableciendo así el grosor del gel. Al cargar el gel, además de las muestras a estudio, se llenó un pocillo con el Peso Molecular premarcado (Bio-Rad) para tener una referencia de dónde migran las proteínas.

Una vez cargado el gel se procedió a la separación de las proteínas mediante una electroforesis. Para ello se introdujo el gel en una cubeta y se añadió buffer de electroforesis y sometió a una corriente de 150 V durante aproximadamente 1h.

Una vez separadas las proteínas se montó el sándwich de la siguiente manera (figura 7). Es importante sumergir la membrana en metanol durante un minuto, y posteriormente equilibrarla con el buffer de transferencia, antes de utilizarla.

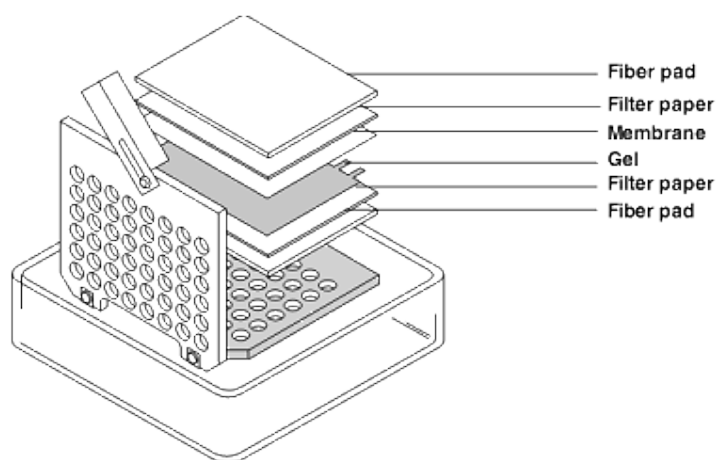


Figura 7. Esquema del montaje del "sandwich".

Tras el montaje del sándwich se procedió a la transferencia, con ello se consigue transferir las proteínas del gel a una membrana polifluoruro de vinilideno (PVDF) Imobilon-P transfer membrane (Millipore, Merck). Al ser IDE una proteína de elevado peso molecular, la transferencia se realizó toda la noche a 30 mV en una cámara fría a 4°C.

Al día siguiente, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo se bloquearon los sitios de unión que habían quedado libres tras la transferencia, para ello se incubó la membrana en la disolución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente.

Una vez bloqueada la membrana, se cortó para poder incubar cada parte con su anticuerpo primario correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente en un balancín, la parte superior se utilizó para la identificación de IDE ya que es una proteína de 110 kDa y la inferior para la identificación de actina como control de carga, cuyo peso molecular son 42 kDa.

Tras la incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos con agitación, en PBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo primario que no se haya unido específicamente.

Una vez lavada la membrana se incubó con el anticuerpo secundario adecuado a temperatura ambiente durante 30 minutos diluidos en disolución de bloqueo. Posteriormente se volvió a lavar para eliminar el exceso de anticuerpo secundario no unido de la forma explicada en los lavados anteriores.

Antes de revelar, se hizo reaccionar la membrana con Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) (1:1 A y B) durante 5 minutos a temperatura ambiente, con el fin de poder detectar por luminiscencia la presencia de IDE y actina. Transcurrido este tiempo se eliminó el exceso de reactivo y se reveló la membrana en una película de RX fotosensible en un cuarto oscuro.

Una vez finalizado el revelado se escanearon las películas con un escáner a una resolución de 600 ppp y se analizaron y cuantificaron con el software ImageJ (NIH, EEUU).

5. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el software GraphPad Prism 6. La normalidad de las variables se contrastó mediante los test de Shapiro-Wilk. Para comparar 2 variables paramétricas se empleó la prueba T-Student. Sin embargo, para comparar dos variables no paramétricas se empleó la prueba U de Mann-Whitney. Para la comparación de más de dos variables se empleó el Análisis de la Varianza (ANOVA). El nivel de significación estadística se alcanzó con $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

1. Efecto del tratamiento con baja glucosa (2.2 mM) crónico (24h) y agudo (1h y 4h) en la expresión proteica de IDE en células α -pancreáticas

a. Tratamiento crónico (24h)

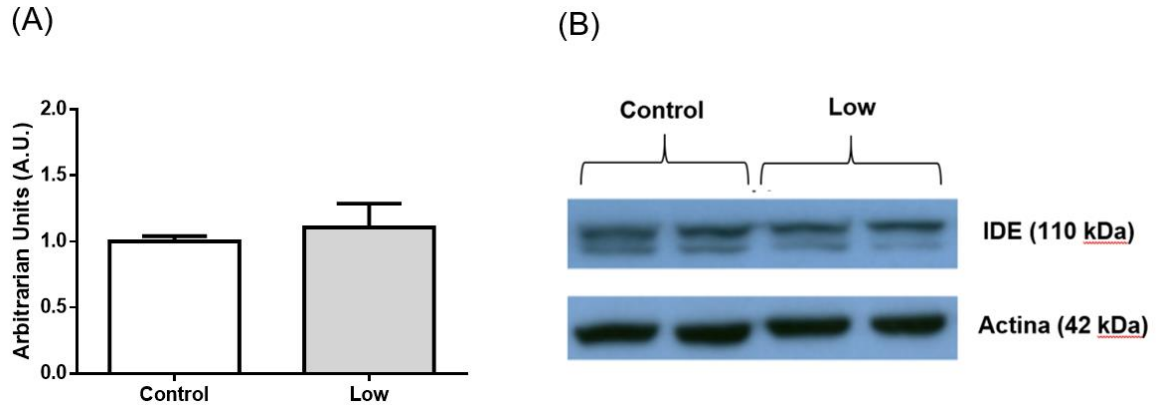


Figura 8. (A) Cuantificación Expresión de IDE en células α -TC1.9 tras tratamiento con glucosa durante 24h. Detección de IDE y actina en condiciones 2.2 mM de glucosa (Low) respecto al control (11mM de glucosa). No existen diferencias significativas entre esta condición y el control. **(B) Imagen representativa de los Western Blot cuantificados.** n=4 (por duplicado).

Las células fueron sometidas a un tratamiento crónico (24h) a baja concentración de glucosa (2.2 mM), y posteriormente se cuantificó la expresión de IDE mediante la técnica Western Blot, empleando como control de carga la detección de actina. Se llevaron a cabo 4 experimentos independientes por duplicado.

La concentración baja de glucosa no modificó el número de células después de 24 horas de tratamiento, respecto al medio control.

La expresión de IDE fue normalizada respecto a la cantidad de actina. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre la expresión de IDE en células α TC1.9 tratadas a bajas concentraciones de glucosa, respecto al control.

b. Tratamiento agudo
i. Tratamiento de 1 hora

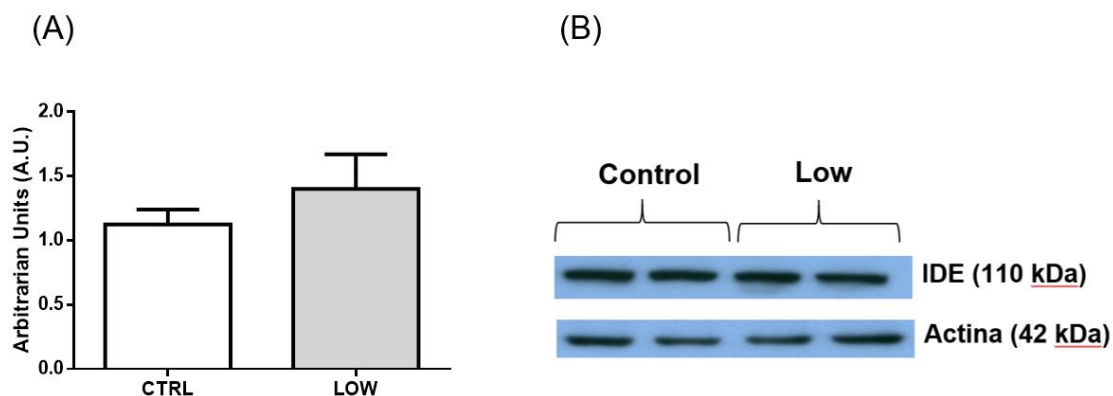


Figura 9. (A) Cuantificación Expresión de IDE en células α -TC1.9 tras tratamiento con glucosa durante 1h. Detección de IDE y actina en condiciones 2.2 mM de glucosa (Low) respecto al control (11mM de glucosa). No existen diferencias significativas entre esta condición y el control. **(B) Imagen representativa de los Western Blot cuantificados.** n=5 (por duplicado).

Al igual que en el tratamiento de 24, las células fueron sometidas a un tratamiento a baja concentración de glucosa (2.2 mM), esta vez durante 1 hora. Posteriormente se cuantificó la expresión de IDE mediante la técnica de Western Blot, empleando como control de carga la detección de actina. Se llevaron a cabo 5 experimentos independientes por duplicado.

La expresión de IDE fue normalizada respecto a la cantidad de actina. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre la expresión de IDE en células α TC1.9 tratadas a bajas concentraciones de glucosa (2.2 mM) durante 1 hora respecto al control.

ii. Tratamiento de 4h

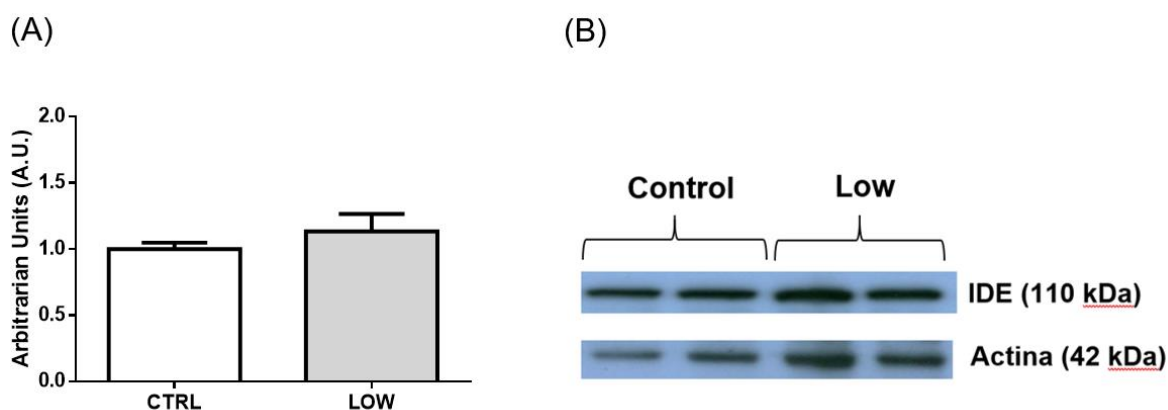


Figura 10. (A) Cuantificación Expresión de IDE en células α -TC1.9 tras tratamiento con glucosa durante 4h. Detección de IDE y actina en condiciones 2.2 mM de glucosa (Low) respecto al control (11mM de glucosa). No existen diferencias significativas entre esta condición y el control. **(B) Imagen representativa de los Western Blot cuantificado.** n=5 (por duplicado).

De la misma manera que en el tratamiento de 1 hora, las células fueron sometidas a un tratamiento con baja concentración de glucosa (2.2 mM), esta vez durante 4 horas. Posteriormente se cuantificó la expresión de IDE mediante la técnica de Western Blot, empleando como control de carga la detección de actina. En este caso, al igual que en el de 1 hora, se llevaron a cabo 5 experimentos independientes por duplicado.

La expresión de IDE fue normalizada respecto a la cantidad de actina. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre la expresión de IDE en células α TC1.9 tratadas a bajas concentraciones de glucosa (2.2 mM) durante 4 horas respecto al control.

Por medio de estos experimentos concluimos que una condición de baja glucosa no es capaz de variar los niveles proteicos de IDE a 1, 4 ó 24 horas. Estos datos no desestiman la posibilidad de que sí pudiera existir una regulación a nivel transcripcional.

2. Efecto del tratamiento con alta glucosa (22 mM) crónico (24h) y agudo (1h y 4h) en la expresión proteica de IDE en células α -pancreáticas.

a. Tratamiento crónico (24h)

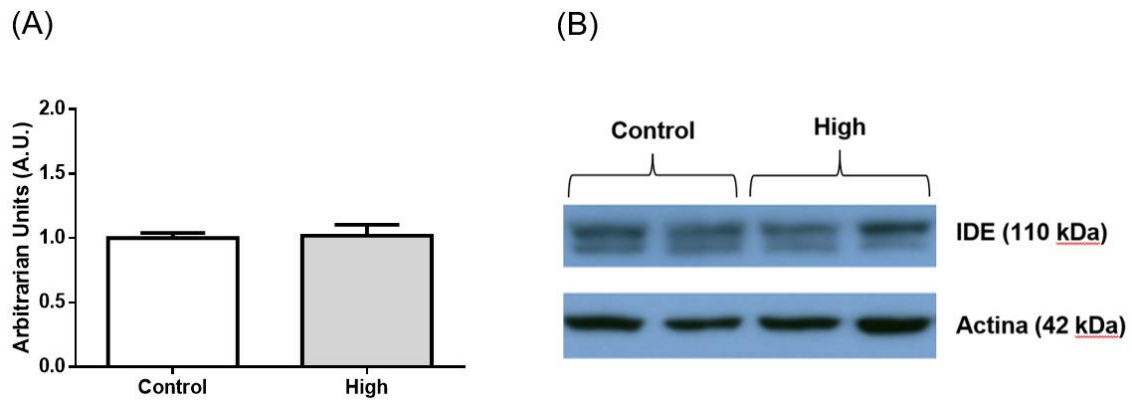


Figura 11. (A) Cuantificación Expresión de IDE en células α -TC1.9 tras tratamiento con glucosa durante 24h. Detección de IDE y actina en condiciones 22 mM de glucosa (High) respecto al control (11mM de glucosa). No existen diferencias significativas entre esta condición y el control. **(B) Imagen representativa de los Western Blot cuantificados.** n=5 (por duplicado).

Las células fueron sometidas a un tratamiento crónico de glucosa (24h) a alta concentración de glucosa (22 mM), y posteriormente se cuantificó la expresión de IDE mediante la técnica de Western Blot, empleando como control de carga la detección de actina. Se llevaron a cabo 4 experimentos independientes por duplicado.

La concentración alta de glucosa no modificó el número de células después de 24 horas de tratamiento, respecto al medio control.

La expresión de IDE fue normalizada respecto a la cantidad de actina. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre la expresión de IDE en células α TC1.9 tratadas a altas concentraciones de glucosa, respecto al control.

b. Tratamiento agudo
i. Tratamiento de 1 hora

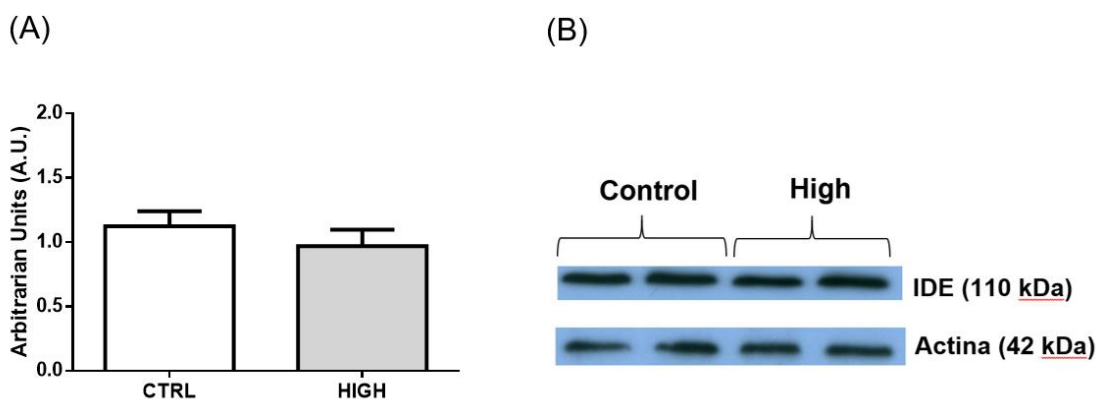


Figura 12. (A) Cuantificación Expresión de IDE en células α -TC1.9 tras tratamiento con glucosa durante 1h. Detección de IDE y actina en condiciones 22 mM de glucosa (High) respecto al control (11mM de glucosa). No existen diferencias significativas entre esta condición y el control. **(B) Imagen representativa de los Western Blot cuantificados.** n=5 (por duplicado).

Al igual que en el tratamiento de 24, las células fueron sometidas a un tratamiento a alta concentración de glucosa (22mM), en este caso durante 1 hora. Posteriormente se cuantificó la expresión de IDE mediante la técnica de Western Blot, empleando como control de carga la detección de actina. Se llevaron a cabo 5 experimentos independientes por duplicado.

La expresión de IDE fue normalizada respecto a la cantidad de actina. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre la expresión de IDE en células α TC1.9 tratadas a altas concentraciones de glucosa (22 mM) durante 1 hora respecto al control.

ii. Tratamiento de 4 horas

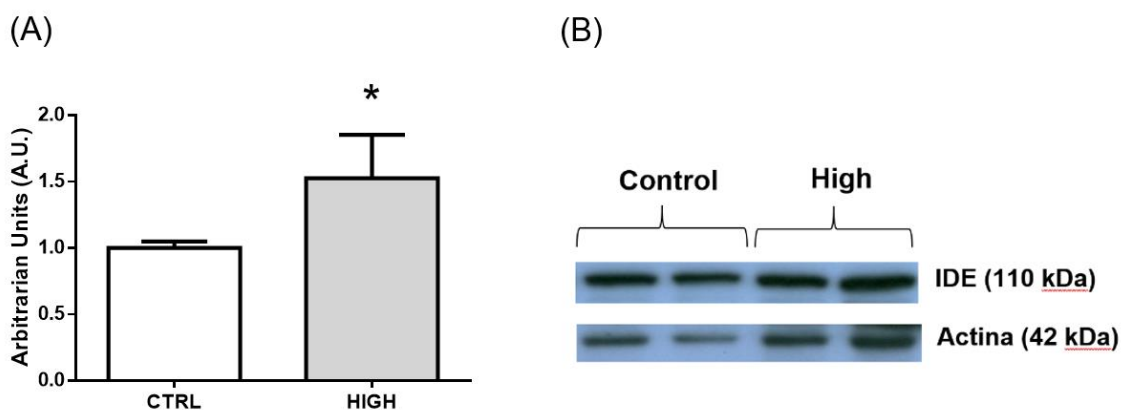


Figura 13. (A) Cuantificación Expresión de IDE en células α -TC1.9 tras tratamiento con glucosa durante 4h. Detección de IDE y actina en condiciones 22 mM de glucosa (High) respecto al control (11mM de glucosa). Existen diferencias significativas entre la esta condición y el control. **(B) Imagen representativa de los Western Blot cuantificados.** n=5 por duplicado. *p<0.05.

De la misma manera que en el tratamiento de 1 hora, las células fueron sometidas a un tratamiento con alta concentración de glucosa (22mM), esta vez durante 4 horas. Posteriormente se cuantificó la expresión de IDE mediante la técnica Western Blot, empleando como control de carga la detección de actina. En este caso, al igual que en el de 1 hora, se llevaron a cabo 5 experimentos independientes por duplicado.

La expresión de IDE fue normalizada respecto a la cantidad de actina. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre la expresión de IDE en células α TC1.9 tratadas a altas concentraciones de glucosa (22 mM) a 4 y 24h, sin embargo, observa aumento significativo del 50% en los niveles proteicos de IDE con el tratamiento a alta glucosa (22 mM) durante 4 horas.

Este grupo de experimentos nos indican que una condición de alta glucosa es capaz de regular positivamente los niveles proteicos de IDE hasta en un 50%. Además, la estimulación de los niveles de IDE son tiempo-dependientes, ya que sólo se observan tras 4h de tratamiento con altas concentraciones de glucosa.

3. Efecto del tratamiento de glucagón en la expresión de IDE en células α -pancreáticas.

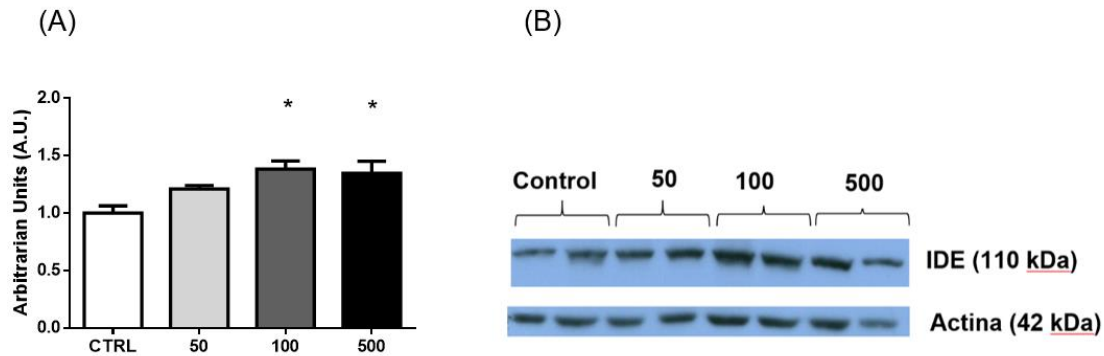


Figura 14. (A) Cuantificación Expresión de IDE en células α -TC1.9 tras tratamiento con glucagón durante 24h. Detección de IDE y actina en condiciones 0 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL y 500 ng/mL de glucagón. Existen diferencias significativas entre las condiciones a 100 ng/mL y 500 ng/mL de glucagón respecto al control. **(B) Imagen representativa de los Western Blot cuantificados.** n=2 por duplicado. *p<0.05.

Las células fueron sometidas a un tratamiento crónico (24h) a distintas condiciones de glucagón (0 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL y 500 ng/mL) y posteriormente se cuantificó la expresión de IDE mediante la técnica Western Blot, empleando como control de carga la detección de actina. Se llevaron a cabo 2 experimentos independientes por duplicado.

La expresión de IDE fue normalizada respecto a la cantidad de actina. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre la expresión de IDE en células α TC1.9 tratadas con 100 ng/mL y 500 ng/mL de glucagón, respecto al control.

Estos resultados nos indican que a medida que aumenta la concentración de glucagón, tienden a aumentar los niveles proteicos de IDE, siendo significativos estos resultados tanto a 100 ng/mL como a 500 ng/mL. Podemos concluir que el glucagón es capaz de regular positivamente los niveles proteicos de IDE en células α -pancreáticas.

4. DISCUSIÓN

Es importante la búsqueda de marcadores específicos que permitan conocer el estadio de desarrollo de la DM para poder mejorar su tratamiento, evitando así las posteriores complicaciones. También es de vital importancia la búsqueda de nuevas dianas moleculares que permitan el diseño de fármacos específicos dirigidos a retrasar o incluso evitar la progresión de esta enfermedad, para ello resulta imprescindible el estudio de proteínas potencialmente involucradas en la patología de la enfermedad con el fin de esclarecer su función.

El presente estudio tiene como objetivo esclarecer si IDE tiene un papel regulador en las células α -pancreáticas en el contexto de la DM2. Para ello hemos estudiado los niveles proteicos de IDE en las células α -pancreáticas en diferentes condiciones fisiológicas y fisiopatológicas: tanto en hipoglucemia, condición fisiológica en la que la célula α se encuentra activa; como en hiperglucemia, característica propia de la resistencia a la insulina y la DM2. Se trata de un estudio novedoso, ya que son inexistentes los estudios acerca de la expresión de IDE en célula α .

La DM2 es una patología que cursa con resistencia de los tejidos periféricos a la insulina. Como mecanismo para compensar esta resistencia, las células β -pancreática se adaptan tanto estructuralmente, lo que conlleva un aumento de su masa celular, como funcionalmente, aumentando la secreción de insulina con el fin de mantener la homeostasis de la glucosa²⁰. Este mecanismo compensatorio acaba fallando debido a la pérdida gradual del correcto funcionamiento de las células β y llevando al organismo a una hiperglucemia crónica²¹. A pesar de existir numerosos estudios que demuestran esta adaptación de la célula β -pancreática ante la resistencia de los tejidos periféricos a la insulina que caracteriza a la obesidad, son pocos los estudios de estas adaptaciones en las células α -pancreáticas. Un reciente estudio²² ha señalado que, durante esta etapa, además de los cambios ya comentados en la célula β -pancreática, se produciría una disminución transitoria de la célula α con el fin de mantener unos niveles normales de glucosa en sangre. A medida que avanza la obesidad y la insulinoresistencia, disminuiría la adaptación de la célula β , como se ha señalado previamente, además, disminuirían los cambios en la célula α -pancreática, aumentando su masa y/o función. Todo esto conduciría a una posterior hiperglucemia y a la necesidad de insulina exógena para disminuir este exceso de glucosa en sangre.

Resultados previos del laboratorio de la Dra. Cózar-Castellano¹⁹ sugieren que la expresión de IDE es regulada al alza de manera tiempo-dependiente por la hiperinsulinemia en células β -pancreáticas, tanto a nivel de ARNm como de proteína corroborando otros estudios revisados en la revisión de Fawcett²³ en distintos tejidos, que muestran el control de IDE sobre el metabolismo de la glucosa. En otros estudios no publicados de nuestro laboratorio, se observó que también la hiperglucemia controla tanto la traducción (niveles de proteína) como la expresión (niveles de ARNm) de IDE, haciendo que ambos disminuyan de manera significativa. Nuestra hipótesis es que durante la hiperglucemia se requiere más insulina disponible para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, por lo tanto, la glucosa estaría inhibiendo la expresión de IDE para evitar la degradación de insulina.

Para el diseño del presente estudio nos hemos basado en los tiempos empleados en el estudio señalado previamente en condiciones de hiperglucemia. Es éste, se observó que en la línea celular INS1E tratada con

22mM de glucosa durante 24h, disminuían los niveles de proteína de IDE en un 25%.

En nuestro estudio actual, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre la expresión de IDE en células α -TC1.9 tratadas a altas concentraciones de glucosa a 24 horas, ni durante 1 hora. Sin embargo, al tratar con alta concentración de glucosa durante 4 horas hemos observado un aumento de IDE del 50%.

Estos resultados cobran sentido cuando los valoramos con los obtenidos previamente en células β -pancreáticas en condiciones de alta glucosa, es decir, mientras que la hiperglucemia induce una disminución de IDE en las células β , para aumentar la disponibilidad de la insulina; en las células α -pancreáticas, aumentarían los niveles de IDE con el fin de aumentar la degradación de glucagón en la célula y disminuir los niveles de esta hormona con efectos hiperglucemiantes.

Basado en estos resultados del efecto de la hiperglucemia sobre los niveles de IDE en las células α - y β -pancreáticas, hemos generado un modelo que esquematizamos en la figura 15.

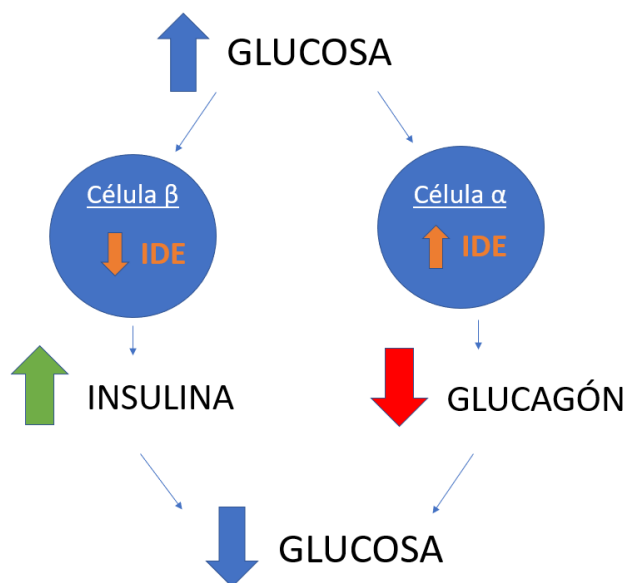


Figura 15. Modelo para explicar la regulación de la expresión de IDE en células β y α -pancreáticas como consecuencia de un aumento de los niveles de glucosa.

Por otro lado, los resultados obtenidos con el tratamiento de glucagón mostraron diferencias significativas entre los niveles de IDE en células α tratadas a las concentraciones de 100 ng/mL y 500 ng/mL de glucagón respecto al control, lo que parece indicar que el glucagón es capaz de regular positivamente la expresión de los niveles de IDE en la célula α .

Estos resultados sugieren que ante una situación de hiperglucagonemia, el glucagón, por medio de un mecanismo autocrino, es capaz de producir un aumento en los niveles proteicos de IDE con el hipotético fin de disminuir los niveles secretados de glucagón. Estos resultados van en la misma línea que los publicados recientemente¹⁹, en los que se observó que ante una situación de hiperinsulinemia, aumentaban los niveles de IDE en célula β . Esto podría explicarse de la misma manera, ante una situación de exceso de insulina, ésta activa un mecanismo autocrino para tratar de disminuir su secreción, como aumentar su degradación por medio de la proteína IDE.

Estos resultados nos indican la relevancia de IDE en la patogenia de la DM2, así como una posible diana terapéutica o un biomarcador de esta enfermedad, ya que la modificación en su expresión podría ser relevante para su tratamiento o prevención.

5. CONCLUSIONES

- La hipoglucemia no regula de forma significativa la expresión proteica de IDE en células α -pancreáticas.
- La hiperglucemia estimula la expresión proteica de IDE en células α -pancreáticas de una manera tiempo-dependiente.
- La hiperglucagonemia estimula la expresión proteica de IDE en células α -pancreáticas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Diabetes [Internet]. World Health Organization. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- [2] Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. enero de 2012;55(1):88-93.
- [3] IDF Diabetes Atlas Sixth Edition. International Diabetes Federation 2013 [Internet]. Disponible en: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/19-atlas-6th-edition.html>
- [4] Menéndez Torre, E, Barrio Castellanos, R. Novials Sardá. A. Tratado de Diabetes Mellitus. 2ª Edición. Sociedad Española de Diabetes: Panamericana; 2017.
- [5] A. Fernández-Tresguerres, Carmen Ariznavarreta Ruiz, Victoria Cachofeiro, Daniel P. Cardinali et al. Fisiología humana, 4e <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=1858>.
- [6] Dolenšek J, Rupnik MS, Stožer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*. 2015;7(1):e1024405.
- [7] Gerard J, Derrickson, B. Principios de Anatomía y Fisiología, 13ª edición. Madrid. Panamericana; 2013.
- [8] Montanya E. El Islote Pancreático en el Desarrollo y Tratamiento de la Diabetes. *SED*. 5:132.
- [9] Costanzo LS. Physiology. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2010. 493 p.
- [10] Gromada J, Ma X, Høy M, Bokvist K, Salehi A, Berggren P-O, et al. ATP-sensitive K⁺ channel-dependent regulation of glucagon release and electrical activity by glucose in wild-type and SUR1^{-/-} mouse alpha-cells. *Diabetes*. diciembre de 2004;53 Suppl 3:S181-189.
- [11] Role of KATP Channels in Glucose-Regulated Glucagon Secretion and Impaired Counterregulation in Type 2 Diabetes Zhang, Quan et al. *Cell Metabolism* , Volume 18 , Issue 6 , 871 - 882).
- [12] Tsuchiyama N, Takamura T, Ando H, Sakurai M, Shimizu A, Kato K, et al. Possible Role of α -Cell Insulin Resistance in Exaggerated Glucagon Responses to Arginine in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 1 de octubre de 2007;30(10):2583-7.
- [13] Sherwin R, Wahren J, Felig P. Evanescent effects of hypo- and hyperglucagonemia on blood glucose homeostasis. *Metabolism*. 1 de noviembre de 1976;25(11, Supplement):1381-3.
- [14] Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev*. octubre de 1998;19(5):608-24
- [15] Pivovarova O, Höhn A, Grune T, Pfeiffer AFH, Rudovich N. Insulin-degrading enzyme: new therapeutic target for diabetes and Alzheimer's disease? *Annals of Medicine*. 16 de noviembre de 2016;48(8):614-24.

- [16] Tang W-J. Targeting Insulin-Degrading Enzyme to Treat Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* enero de 2016;27(1):24-34.
- [17] Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1 de abril de 2003;100(7):4162-7.
- [18] Cotsapas C. et al. Expression analysis of loci associated with type 2 diabetes in human tissues. *Diabetologia* 2010 Nov; 53(11): 2334-9.
- [19] Fernández-Díaz CM, Escobar-Curbelo L, López-Acosta JF, Lobatón CD, Moreno A, Sanz-Ortega J, et al. Insulin degrading enzyme is up-regulated in pancreatic β cells by insulin treatment. *Histol Histopathol.* 4 de mayo de 2018;11997.
- [20] Gonzalez, A. et al. Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated with several functional adaptations in individual beta-cells. *Endocrinology* 154, 3515-24 (2013)
- [21] Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. *Regul Pept.* 7 de febrero de 2008;146(1-3):4-11.
- [22] Merino B, Alonso-Magdalena P, Lluesma M, Neco P, Gonzalez A, Marroquí L, et al. Pancreatic alpha-cells from female mice undergo morphofunctional changes during compensatory adaptations of the endocrine pancreas to diet-induced obesity. *Sci Rep [Internet].* 25 de junio de 2015
- [23] Fawcett, J. and W.C. Duckworth, Hyperglycaemia and hyperinsulinaemia: is insulin-degrading enzyme the missing link? *Diabetologia*, 2009. 52(8): p. 1457-60.