



MASTER
EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA

IBGMA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
Y GENÉTICA MOLECULAR



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR Y FISIOLÓGICA

TRABAJO FIN DE MÁSTER:

**Efecto de los cembranos sobre la proliferación
de las células beta-pancreáticas**

Presentado por:

Nagore de Pablo Herranz

Dirigido por:

Dra. Irene Cózar Castellano

ÍNDICE

Abreviaturas	2
Introducción	3
La diabetes	3
Regeneración de la célula beta-pancreática	4
La masa beta-pancreática como diana terapéutica	6
Estudios preliminares	6
Hipótesis y objetivos	8
Material y métodos	9
Resultados	13
Método “Islotes completos”	13
Método “Células dispersas”	17
Discusión	24
Conclusiones	27
Bibliografía	28

Abreviaturas

PBS- Tampón fosfato salino

DM1- Diabetes Mellitus tipo 1

DM2- Diabetes Mellitus tipo 2

DMSO- Dimetilsulfóxido

FBS- Suero fetal bovino

IEq- Islote equivalente

NGS- Suero normal de cabra

t.a.- Temperatura ambiente

TUNEL- Deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end-labeling

INTRODUCCIÓN

La diabetes

La diabetes es un trastorno metabólico de etiología heterogénea que se caracteriza por hiperglucemia crónica y trastornos del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, como consecuencia de anomalías en la secreción de insulina, en su efecto, o en ambas [1].

Se trata de una enfermedad de gran impacto sanitario, debido a su alta y creciente prevalencia global, su cronicidad y las complicaciones asociadas [2]. Entre los efectos a largo plazo de la diabetes se encuentran un mayor riesgo de enfermedades cardio- y cerebrovasculares, y complicaciones microvasculares que inducen al desarrollo de retinopatía (ceguera), nefropatía (fallo renal) y neuropatía periférica [3]. Es por esto que se asocia a una esperanza de vida reducida y menor calidad de vida.

Estudios pertenecientes al IDF (Federación Internacional de Diabetes) revelan que en 2013, 382 millones de personas sufrían diabetes, cantidad que se espera que aumente hasta los 592 millones en 2035 (*Figura 1*) [4]. El estudio di@bet.es, iniciativa conjunta de CIBERDEM, publicó en 2011 datos acerca de la prevalencia en nuestro país, indicando que un 13.8% de la población mayor de 18 años sufre la enfermedad, mientras que el 30% presenta IFG (hiperglicemia en ayunas) o IGT (intolerancia a la glucosa), considerados estados pre-diabéticos [5].

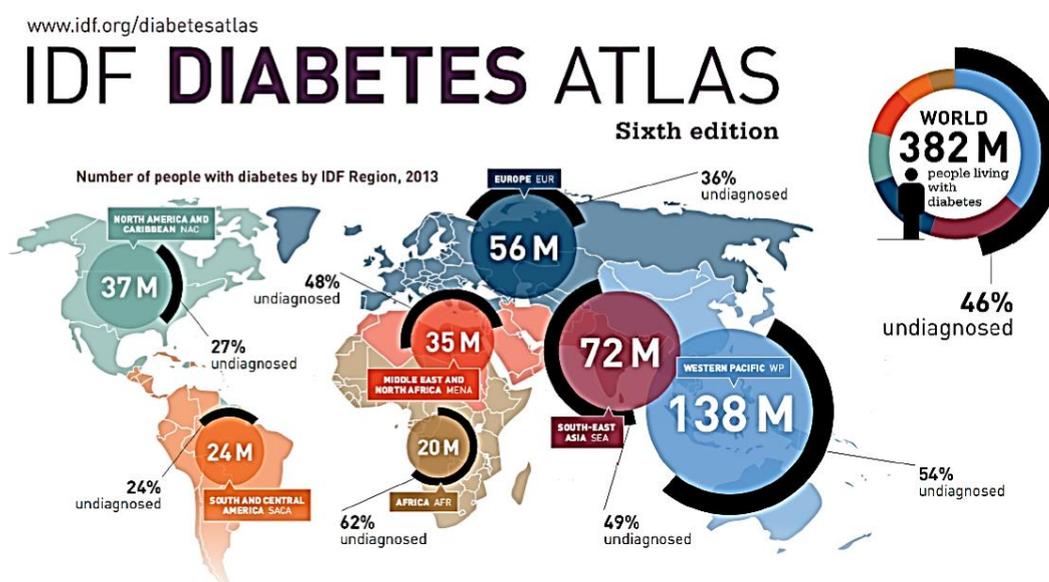


Figura 1. Prevalencia mundial de la diabetes, año 2013 (*IDF Diabetes Atlas, 6th edition*).

Estos datos constatan que actualmente la diabetes se trata de una pandemia de rápido crecimiento que supone una gran carga económica y social.

Las formas mayoritarias de diabetes son la Diabetes tipo 1 (DM1) y la Diabetes tipo 2 (DM2), aunque existen otras formas de esta enfermedad, como son la diabetes gestacional (hiperglucemia y/o intolerancia a la glucosa que aparece durante el embarazo) y cuadros con causas más raras como síndromes genéticos, pancreatitis, fibrosis quística, exposición a ciertos medicamentos o virus, y causas desconocidas.

La DM1 es una enfermedad autoinmune que generalmente se presenta en la niñez o la adolescencia. Se desarrolla como consecuencia de la interacción entre factores genéticos, inmunológicos y ambientales e implica la destrucción específica de las células secretoras de insulina (beta-pancreáticas), por lo que los pacientes necesitan inyecciones de insulina durante toda la vida. Estudios histológicos de páncreas de pacientes con DM1 de reciente aparición han mostrado una reducción de masa beta-pancreática de aproximadamente 80-90% [6,7]. Aunque se sabe que con el tiempo esta reducción es mayor, pueden detectarse células beta varias décadas después de la aparición de la enfermedad [7], lo que implicaría una formación de nuevas células que contrarrestasen la muerte celular.

La DM2 aparece por lo general en la vida adulta y está relacionada con la obesidad, la inactividad física y la mala alimentación. Es la forma más común de diabetes (alrededor del 90% de los casos en el mundo). La enfermedad se desarrolla cuando las células beta son incapaces de secretar una cantidad suficiente de insulina que compense la resistencia periférica a la insulina [8]. Esta pérdida de compensación puede deberse a una alteración de la función celular o a una reducción de la masa de células beta, aunque lo más probable es que ambos estén contribuyendo a este proceso. Se ha descrito una disminución de la masa de células beta de hasta 65% en diabéticos tipo 2 [9], que es paralelo al alcance de la reducción en la secreción de insulina inducida por glucosa [10]. A pesar de que se ha observado un aumento significativo de la frecuencia de muerte celular, no se descarta la posibilidad de que existan también problemas en la regeneración celular que ocurre en respuesta a la demanda de insulina. Entre los factores que producen una disminución de masa beta funcional se han descrito niveles elevados de glucosa (glucotoxicidad) y ácidos grasos (lipotoxicidad), así como el acúmulo de oligómeros tóxicos de polipéptido amiloide, el estrés oxidativo, el estrés del retículo endoplasmático, y la exposición a citocinas inflamatorias [11, 12, 13, 14]. El tratamiento actual de esta diabetes puede consistir en cambios en el estilo de vida y reducción de peso, medicamentos orales o incluso inyecciones de insulina.

Regeneración de la célula beta-pancreática

El páncreas humano se compone de dos compartimentos principales que consisten en tejido endocrino y tejido exocrino. El tejido endocrino representa menos del 2% del órgano y está organizado en unidades funcionales llamadas islotes de Langerhans. Las células beta-pancreáticas secretoras de insulina suponen el 50-80% del total del islote, y aparecen junto a células alfa, delta, epsilon y gamma, encargadas de la producción de

las hormonas glucagón, somatostatina, grelina y el polipéptido pancreático (PP), respectivamente. Las células beta son capaces de secretar insulina en respuesta a los niveles plasmáticos elevados de glucosa con gran precisión y temporalidad, respondiendo también a señales del sistema nervioso autónomo y a las hormonas incretinas secretadas por el tracto gastrointestinal. Gracias al efecto que ejerce la insulina sobre los tejidos diana (hígado, músculo y tejido adiposo) se consigue disminuir los niveles circulantes de glucosa, restableciendo así su homeostasis. Puesto que se trata de la única hormona con este efecto hipoglucemiante, la insulina se considera un factor imprescindible para el control de la homeostasis de la glucosa.

Existen evidencias que indican que la masa de células beta es dinámica y puede ser estimulada para expandirse de manera significativa con el fin de cubrir la demanda metabólica, por ejemplo, durante el embarazo, la obesidad, o después de una pancreatoclectomía parcial [15]. Estas observaciones sugieren que puede ser posible utilizar los estímulos externos para expandir células primarias *ex vivo* para el trasplante, o incluso inducir la regeneración endógena de la masa de células directamente en el páncreas. Aunque el mecanismo de regulación de la expansión de células beta sigue siendo poco claro, se ha demostrado que todas las células beta retienen la capacidad de replicarse y, por tanto, son objetivos viables para esta expansión [16].

Para explicar el mecanismo de mantenimiento de la masa de células beta, la regeneración reparativa y la expansión adaptativa, existen dos líneas de pensamiento. Una de ellas plantea la hipótesis de que la renovación se produce a través de una célula madre adulta que reside en los ductos pancreáticos (neogénesis). En la vida fetal los nuevos islotes se forman a partir de estructuras similares al ducto, y es lógico pensar que la neogénesis postnatal es en gran parte una recapitulación de este proceso [17]. La otra línea propone que las células beta pre-existentes y totalmente diferenciadas son la principal fuente de nuevas células beta [15]. Se ha debatido mucho y aún existe controversia sobre el papel relativo de la replicación frente a la neogénesis. La replicación se ha demostrado que es particularmente importante en la expansión de las células en el adulto y en la regeneración tras daño tisular. En humanos, la mayor expansión celular ocurre durante la infancia probablemente con una mayor contribución de la replicación que de la neogénesis [15].

Respecto a la tasa de proliferación de las células beta, se ha visto que es de en torno al 0,3% en ratones jóvenes (2-3 meses de edad) [18]. Si bien los datos en seres humanos son limitados, parece que las células beta humanas se replican a una tasa menor que en el roedor. A su vez, parece haber una baja tasa de muerte celular (0,07% en humanos), a juzgar por técnicas tales como la de TUNEL [9]. Debido a que la masa de células está bastante bien conservada en las personas no diabéticas, tiene sentido que hubiese baja tasa de recambio, mostrando un equilibrio entre muerte y nacimiento. Sin duda las células beta son quiescentes y de larga vida media [19].

La masa beta-pancreática como diana terapéutica

La diabetes es generalmente considerada como una enfermedad crónica, asociada con una reducción progresiva de la masa y función de las células beta. La administración diaria de insulina sigue siendo el tratamiento más eficaz para la hiperglucemia en DM1, pero ésta no recupera totalmente el control estricto de la glucosa en sangre ejercido por las células beta-pancreáticas y, como resultado, no previene el desarrollo de mayores complicaciones en los pacientes diabéticos. Lo mismo ocurre con los antidiabéticos orales utilizados actualmente para la DM2. Existen diferentes tipos de fármacos que poseen dianas celulares diversas. Los dos grandes grupos se basan en el aumento de la producción y/o secreción de insulina por parte de las células beta-pancreáticas (sulfonilureas, secretagogos, incretinas) y en la mejora de la sensibilidad a la insulina (metformina, tiazolidinedionas) [20]. Tan solo GLP-1, una incretina, y sus análogos, han mostrado efectos adicionales sobre la masa de células beta en estudios preclínicos en roedores, mediante la estimulación de la proliferación y la inhibición de la apoptosis [21].

El déficit de células beta en ambos tipos de diabetes proporciona una base lógica para nuevas estrategias terapéuticas basadas en preservar o regenerar la masa de células beta. Se sabe que la restauración de esta masa celular puede normalizar los niveles de glucosa en sangre, tanto en la DM1 como en la DM2. Prueba de ello es que el trasplante de islotes o de páncreas completo revierte los niveles de hiperglicemia de los pacientes con ambos tipos de diabetes [22]. La identificación de compuestos con capacidad de inducir la división en las células beta es uno de los objetivos para restaurar la masa perdida, y ya se han obtenido moléculas con las que contrarrestar la hiperglicemia en ratones diabéticos gracias a la inducción de la proliferación de las células beta que permite la expansión de la masa beta [23].

Resultados preliminares

El laboratorio de la Dra. Cózar ha publicado recientemente que el Epoxipukalide, una molécula perteneciente a la familia de los furanocembranolidos obtenida del coral *Leptogorgia* spp. es capaz de inducir la proliferación de células beta-pancreáticas en cultivos primarios de rata, así como de protegerlas de la muerte celular basal e inducida por citoquinas, preservando además su función [24]. La naturaleza siempre ha sido y sigue siendo una importante fuente de productos con gran potencial farmacológico, debido a su enorme diversidad estructural y funcional. En este estudio se parte de un grupo de productos naturales de la familia de los cembranos (*Figura 2*) que han mostrado tener capacidad de inducir la proliferación de células beta-pancreáticas de la línea de insulinoma de rata INS1-E: los productos naturales PN27, PN76, PN78, PN86, PN87 y PN91.

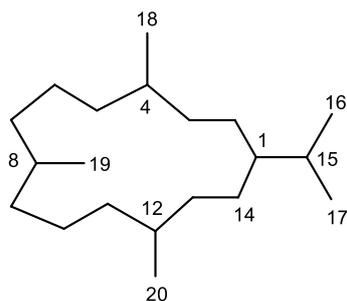


Figura 2. Estructura general del esqueleto cambrano. Se enumeran los átomos de carbono.

Aunque los estudios *ex vivo* de inducción de proliferación con productos naturales se han realizado hasta ahora sobre islotes pancreáticos completos, se sospecha que debido a su compacta estructura, el tratamiento puede no afectar a todas las células que lo componen. Un método alternativo sería, por tanto, realizar un proceso de disgregación de los islotes previo al tratamiento. Se plantea, por ello, comprobar si existen diferencias entre los dos métodos (islote completo o células dispersas) para tratar de elucidar cuál es el más apropiado para este tipo de estudios.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a los resultados preliminares se establece la siguiente HIPÓTESIS:

La familia de los cembranos induce la regeneración de las células beta-pancreáticas primarias.

Por ello, nos planteamos los siguientes OBJETIVOS:

- 1) Estudio del efecto de los cembranos sobre la proliferación de las células beta-pancreáticas primarias.
- 2) Comparación de dos métodos (islote completo *versus* células dispersas) para el estudio del efecto proliferativo en células beta-pancreáticas primarias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extracción y aislamiento de islotes pancreáticos

Se establecieron cultivos primarios de islotes pancreáticos a partir de ratas Wistar de ambos sexos de 2-4 meses de edad suministradas por el Servicio de Investigación y Bienestar Animal (SIBA) de la Universidad de Valladolid. Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico (Pentobarbital) y posteriormente se perfundió el páncreas con 1.7mg/mL de colagenasa P (Roche Diagnostics, Indianápolis, USA) en Hanks 1X (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.). A continuación el tejido fue disecado y digerido durante 17 minutos a 37°C. Se paró la reacción con una disolución de Hanks 1X-FBS fría y se lavó y filtró para retirar restos de otros tejidos y tejido no digerido. Se realizó un gradiente de densidades con Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) y Hanks 1X, que fue centrifugado durante 20 minutos a 2800 rpm (10°C) de modo que los islotes quedaron en la interfase. Se recogieron los islotes, se lavaron con Hanks 1X y se resuspendieron en medio con suero para islotes (RPMI 1640 sin glucosa Gibco, 10% FBS, 5 mM glucosa y 1% penicilina-estreptomicina). Se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24h para su posterior tratamiento.

Tratamiento con productos naturales

Se estimó la cantidad total de islotes del total de los obtenidos en el aislamiento y se separaron en grupos de 400 IEq (islotes equivalentes), siendo 1 IEq un islote de 150 µm de diámetro (normalización de la unidad por compensación del volumen, realizada debido a la variabilidad de diámetro de los islotes).

Para el ensayo de islotes se les retiró el medio completo y se cultivaron los grupos de 400 IEq en placas de 24 pocillos en presencia del producto natural a una concentración de 0.1µM, en medio de cultivo sin suero durante 24h. A los controles negativos se les añadió dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) al 0.0004%, la misma concentración en la que están disueltos los productos naturales.

Para el ensayo en células dispersas se lavaron los islotes con PBS 1X estéril sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (Lonza, Verviers, Belgium) y se tripsinizó cada grupo de 400 IEq con 400 µL de tripsina (BioWest, Nuaille, France) durante 15 minutos a 37°C. Se paró la tripsinización con 600 µL de medio con suero para islotes, se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 400 µL de medio con suero para islotes, se resuspendieron las células y se sembraron 50 µL (1 IEq/µL) sobre cubreobjetos de cristal estériles en placas de 24 pocillos. Se incubó dos horas para que se adhiriesen las células y se les añadió 1 mL de medio con suero para islotes, se incubaron 24h a 37°C y

5% CO₂. Las células dispersas se trataron durante 24h con el producto natural a una concentración de 0.1µM o dimetilsulfóxido al 0.0004% (condición control).

Fijación de islotes pancreáticos y células dispersas

Tras 24h de tratamiento se recogieron los islotes de los pocillos, se lavaron con PBS 1X (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) y se fijaron en disolución de Bouins (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) durante 1h. A continuación, se lavaron con agua y se pasaron a una disolución de formalina 10% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), en la que se dejaron al menos 24h hasta la preparación de los bloques de parafina.

Las células dispersas se lavaron con PBS 1X, se fijaron con formalina 10% durante 20 minutos, se volvieron a lavar con PBS 1X y se dejaron en PBS 1X a 4°C hasta el momento de su tinción.

Preparación de bloques de parafina

Los islotes ya fijados se mezclaron con esferas azules de Affigel (BIO-RAD, EEUU.) que poseen tamaño y densidad similar a la de los islotes, para la identificación y seguimiento de éstos durante los pasos siguientes. Los islotes con las esferas se sumergieron en 300µL de Histogel (Thermo Scientific, EE.UU.) previamente fundido a 70°C, formando pequeños bloques tras enfriado a 4°C. Estos bloques se dejaron en formalina hasta su inclusión en parafina.

Para la preparación de los bloques se utilizó parafina de punto de fusión medio (56°C). Previo al proceso de inclusión se realizó la deshidratación de los bloques de histogel, manteniéndolos durante 20 minutos en agitación en soluciones de concentración creciente de etanol, a 70%, 95% y 100%, con un último paso de xilol absoluto (dos repeticiones por paso). Tras un primer lavado de 1h en parafina líquida, se pasó al molde definitivo y se dejó endurecer a temperatura ambiente.

Secciones de islotes pancreáticos

Los bloques de parafina se cortaron en microtomo Shandon Finesse 325 (Thermo Scientific, EE.UU.) en secciones de 5 µm de grosor y se recogieron en portas tratados con polilisina. Las secciones se incubaron a 70°C toda la noche para favorecer la adherencia de la muestra al porta.

Co-tinción de inmunofluorescencia

Para la tinción de las secciones de los bloques de islotes, se desparafinaron por medio de un gradiente de alcoholes a diferentes tiempos: xilol durante 15 minutos, etanol 100% 10 minutos y disoluciones de etanol al 95%, 80% y 70% durante 3 minutos cada uno. Para el desmascaramiento de antígeno se sumergieron en citrato sódico (10mM ácido cítrico pH=6) y se expusieron a alta temperatura (en vaporera, 20 minutos). Tras dejar enfriar y lavar con PBS 1X se bloqueó con MPST (PBS 1X, 3% NGS (Dako, Glostrup, Alemania.), 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.)) durante 1h a t.a. en un ambiente húmedo y se incubó con los anticuerpos primarios diluidos en la misma disolución de bloqueo a 4°C toda la noche. Al día siguiente, los portas se lavaron con PBS 1X y se incubó con los anticuerpos secundarios durante 1h a t.a. en oscuridad. Finalmente, tras lavar los anticuerpos secundarios se montaron los cubreobjetos sobre los portas con medio de montaje Fluoroshield (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) y DAPI (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) a concentración 1:1000 y se guardó en oscuridad a 4°C mínimo 1h.

Para la tinción de las células dispersas en los cubreobjetos de cristal el proceso fue el mismo, comenzando desde el desmascaramiento de antígeno. El anticuerpo secundario se incubó durante 30 minutos.

Compuesto a detectar	Anticuerpo primario	Concentración de uso	Anticuerpo secundario	Concentración de uso
Insulina	Mouse anti-Insulin; I2018-2mL, SIGMA	1:800	Goat anti-mouse Alexa 488, Invitrogen	1:300
Ki67	Rabbit anti-Ki67; RM-9106-S, Thermo Scientific	1:100	Goat anti-rabbit Alexa 568, Invitrogen	1:300

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en la detección de insulina y Ki67.

Obtención y procesamiento de imágenes

Las imágenes de las secciones de islotes pancreáticos se tomaron con un Microscopio de Fluorescencia NIKON Eclipse 90i. Las de las células dispersas con un Microscopio Confocal Leica TCS SP5. En ambos casos se realizaron fotos de todos los grupos celulares insulino-positivos de la muestra, con objetivo de aumento 40X.

El procesamiento digital de las imágenes se realizó con el programa ImageJ (NIH, EEUU). Con las imágenes obtenidas a las diferentes longitudes de onda, se generó una composición y se llevó a cabo la cuantificación de células beta-pancreáticas (insulino-positivas) y de células beta-pancreáticas Ki67-positivas con el plugin “Cell-counter”. Se contaron al menos 1.000 células insulino-positivas por condición en el caso de los islotes y al menos 200 células insulino-positivas en el de las células dispersas. Se

calculó por cada experimento y condición el porcentaje de células beta-pancreáticas que habían proliferado ([Ki67-positivas e Insulino-positivas]/Insulino-positivas totales).

Representación de datos y tratamiento estadístico

Se representó la media de los porcentajes de proliferación de células beta-pancreáticas de todos los experimentos en los que se testó el producto natural respecto a su control (DMSO). Se mostraron barras del error estándar de la media.

Tras comprobar si la variable cuantitativa “porcentaje de células insulino-positivas proliferantes/células insulino-positivas totales” se ajustaba a una distribución normal con la prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnoff, se comparó cada condición con el control mediante el test T de Student de dos colas para muestras independientes. El nivel de significancia quedó previamente establecido en el 95% ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics Centurion XVI.

RESULTADOS

Resultados previos del laboratorio de la Dra. Cózar han mostrado la capacidad proliferativa de un grupo de productos naturales de la familia de los cembranos, al ser utilizados para inducir la proliferación de un cultivo de células beta-pancreáticas de la línea de insulinoma de rata INS1-E. De ellos, fueron elegidos los productos naturales 27, 76, 78, 86, 87 y 91 (PN27, PN76, PN78, PN86, PN87 y PN91) para confirmar si poseían capacidad de inducir proliferación de células beta-pancreáticas en cultivos primarios de islotes pancreáticos de rata. La proliferación específica de las células beta-pancreáticas se detectó por co-inmuntinción de fluorescencia del marcador endógeno de proliferación Ki67 y de la insulina.

Para el estudio comparativo de los dos métodos se utilizaron los productos naturales PN27, PN76 y PN78.

Método “Islotes completos”

Los resultados de esta prueba mostraron que en los islotes completos ninguno de los tres productos naturales indujo proliferación estadísticamente significativa respecto al control.

Exceptuando los islotes tratados con el producto natural 76, que no mostraron proliferación, tanto el producto natural 27 como el 78 aumentaron el porcentaje medio de proliferación respecto a sus controles. En el primer caso el producto natural aumentó casi 5 veces el porcentaje de proliferación y en el segundo algo más de 2 veces. Las diferencias no son significativas debido a que, en ambos casos, la proliferación se ha visto inducida tan sólo en una de las preparaciones analizadas, es decir, la variabilidad es muy alta, y el número de muestras ha sido demasiado reducido para obtener resultados concluyentes (*Tabla 2*).

% Ki67+Insulina+/Insulina+						
	Control PN27	PN27	Control PN76	PN76	Control PN78	PN78
Prep. 1	-	-	0	0	0	0
Prep. 2	0,167	0	0,167	0	0,167	0
Prep. 3	0,468	3,164	-	-	0,468	1,378
Prep. 4	0	0	-	-	-	-
Prep. 5	0	0	0	0	-	-
<i>Media</i>	<i>0,159</i>	<i>0,791</i>	<i>0,056</i>	<i>0</i>	<i>0,212</i>	<i>0,459</i>
<i>Desv. estándar</i>	<i>0,220</i>	<i>1,581</i>	<i>0,096</i>	<i>0</i>	<i>0,237</i>	<i>0,796</i>
<i>p-valor</i>		<i>0,458637</i>		<i>0,373901</i>		<i>0,632396</i>

Tabla 2. Porcentajes de proliferación de las preparaciones de islotes pancreáticos analizadas. Se indican media, desviación estándar y valor p del test estadístico T Student.

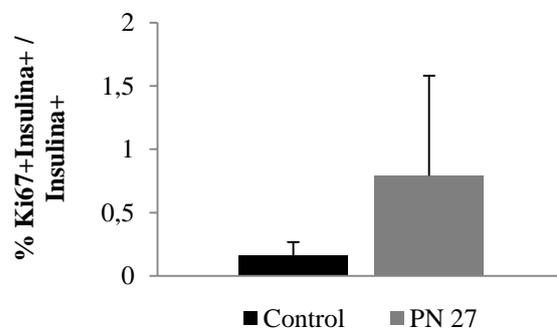


Figura 3. Cuantificación del porcentaje de células beta-pancreáticas positivas para Ki67 en islotes pancreáticos tratados con 0,1 μ M de PN27 durante 24 horas.

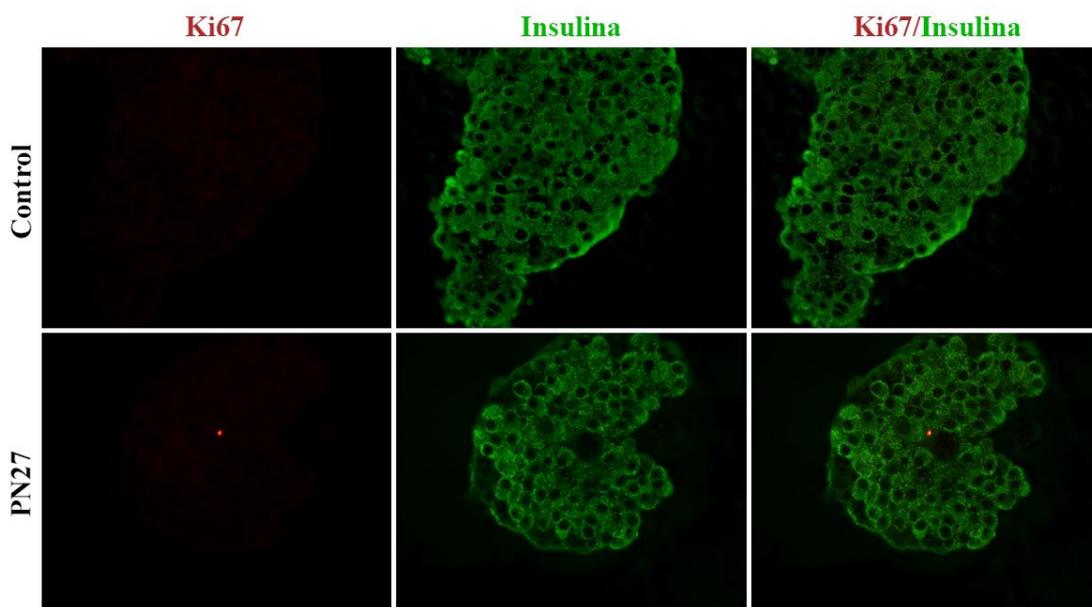


Figura 4. Imagen representativa de secciones de islotes pancreáticos de rata control y tratados con 0,1 μ M de PN27 durante 24 horas. Las secciones fueron marcadas con anticuerpos anti-insulina (verde) y anti-Ki67 (rojo).

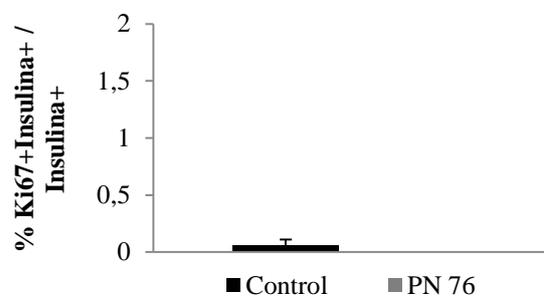


Figura 5. Cuantificación del porcentaje de células beta-pancreáticas positivas para Ki67 en islotes pancreáticos tratados con 0,1 μ M de PN76 durante 24 horas.

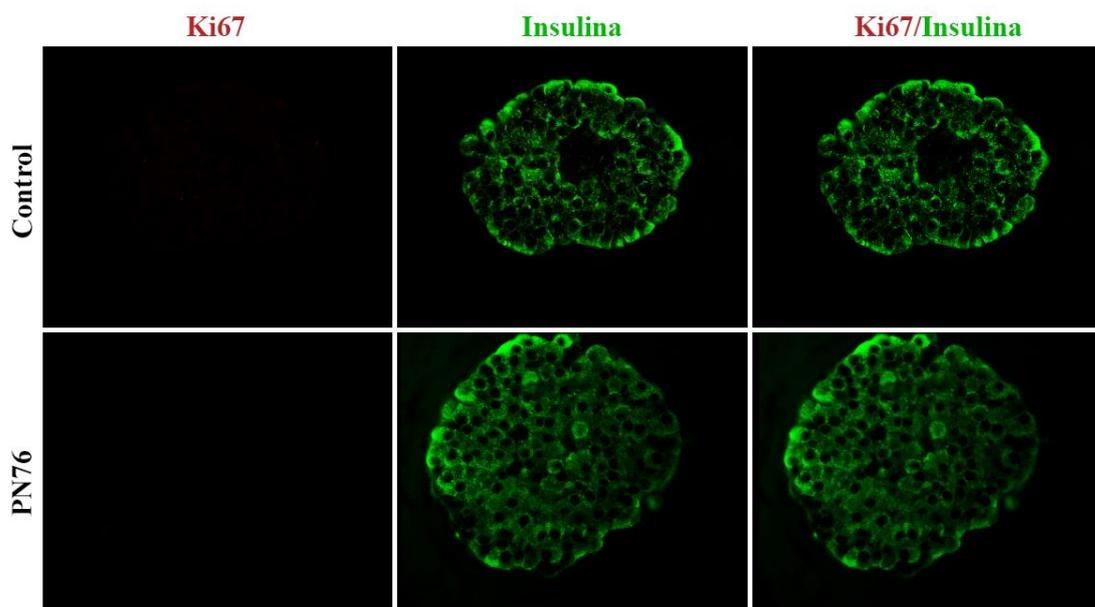


Figura 6. Imagen representativa de secciones de islotes pancreáticos de rata control y tratados con 0,1 μ M de PN76 durante 24 horas. Las secciones fueron marcadas con anticuerpos anti-insulina (verde) y anti-Ki67 (rojo).

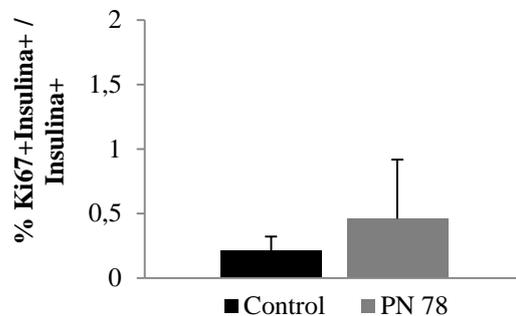


Figura 7. Cuantificación del porcentaje de células beta-pancreáticas positivas para Ki67 en islotes pancreáticos tratados con 0,1 μ M de PN78 durante 24 horas.

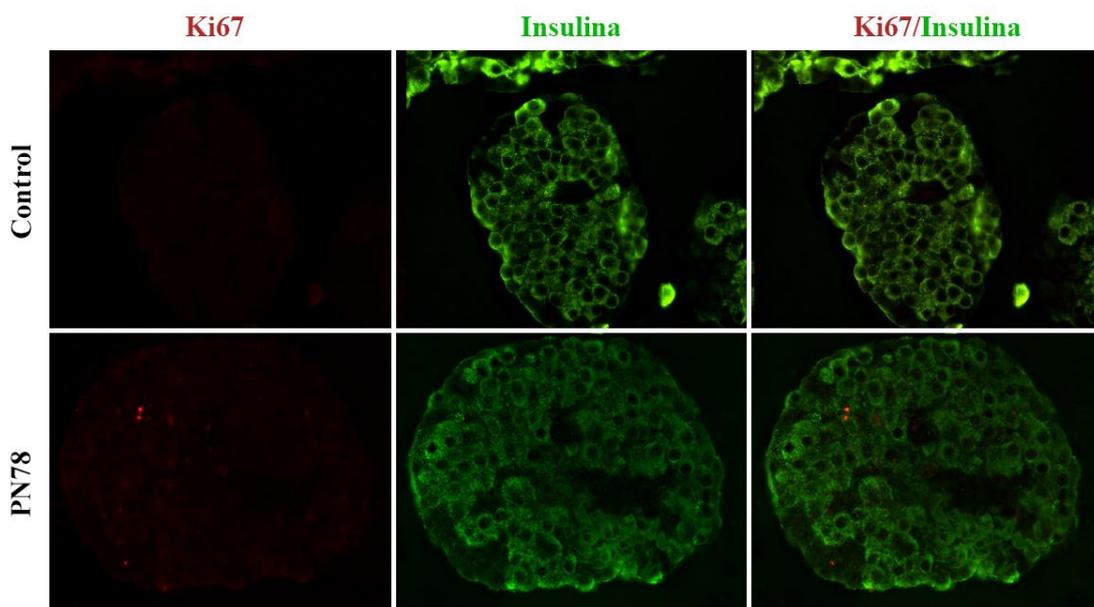


Figura 8. Imagen representativa de secciones de islotes pancreáticos de rata control y tratados con 0,1 μ M de PN78 durante 24 horas. Las secciones fueron marcadas con anticuerpos anti-insulina (verde) y anti-Ki67 (rojo).

Método “Células dispersas”

En cuanto a los ensayos realizados en células dispersas de islotes pancreáticos, siguiéndose el mismo procedimiento de descripción, representación y análisis estadístico, se concluyó que aunque hay una tendencia al aumento en la proliferación, no hay diferencias estadísticamente significativas. Al igual que con el método anterior, las células tratadas con los productos naturales 27, 78 y en este caso, también 76, mostraron un porcentaje medio de proliferación mayor que sus controles, siendo el aumento de 3.4, 2.3 y 2.2 veces, respectivamente. En comparación al método de los islotes completos, los resultados de esta estrategia son más homogéneos (*Tabla 3*), por lo que decidimos que este método era más adecuado que el de islotes completos para el estudio del efecto de los productos naturales sobre la proliferación de las células beta-pancreáticas.

A partir de aquí, todos los experimentos fueron llevados a cabo mediante el método de células dispersas. Los resultados obtenidos nos indicaron un aumento en la proliferación de 10.6, 3.7 y 4.7 veces en las células tratadas con los productos naturales 86, 87 y 91, respectivamente (*Tabla 4*). Casi todas las preparaciones mostraron algo de proliferación tras el tratamiento (19/21), aunque el número de preparaciones analizadas fue pequeño, por lo que no se pudo afirmar que los productos produjeran un aumento de proliferación estadísticamente significativo.

% Ki67+Insulina+/Insulina+						
	Control PN27	PN27	Control PN76	PN76	Control PN78	PN78
Prep. 1	0	0,480	0	0,377	0	1,073
Prep. 2	0,802	1,080	0,802	1,497	0	0,278
Prep. 3	0,424	2,588	0,424	0,797	1,404	0,930
Prep. 4	-	-	-	-	0,766	0
Prep. 5	-	-	-	-	0	2,643
<i>Media</i>	<i>0,408</i>	<i>1,383</i>	<i>0,408</i>	<i>0,890</i>	<i>0,434</i>	<i>0,985</i>
<i>Desv. estándar</i>	<i>0,401</i>	<i>1,086</i>	<i>0,401</i>	<i>0,566</i>	<i>0,635</i>	<i>1,028</i>
<i>p-valor</i>	<i>0,218774</i>		<i>0,295004</i>		<i>0,338071</i>	

Tabla 3. Porcentajes de proliferación de las preparaciones de células beta-pancreáticas dispersas analizadas. Se indican media, desviación estándar y valor p del test estadístico T Student.

% Ki67+Insulina+/Insulina+						
	Control PN86	PN86	Control PN87	PN87	Control PN91	PN91
Prep. 1	0,280	6,979	0,795	1,382	0,280	4,205
Prep. 2	1,0786	8	0,394	0	1,079	2,492
Prep. 3	0,256	2,137	0,190	3,720	0,394	0,223
Prep. 4	-	-	-	-	0,190	2,194
<i>Media</i>	<i>0,543</i>	<i>0,538</i>	<i>0,460</i>	<i>1,701</i>	<i>0,486</i>	<i>2,278</i>
<i>Desv. estándar</i>	<i>0,533</i>	<i>0,468</i>	<i>0,308</i>	<i>1,880</i>	<i>0,405</i>	<i>1,632</i>
<i>p-valor</i>	<i>0,100675</i>		<i>0,371211</i>		<i>0,112809</i>	

Tabla 4. Porcentajes de proliferación de las preparaciones de células beta-pancreáticas dispersas analizadas. Se indican media, desviación estándar y valor p del test estadístico T Student.

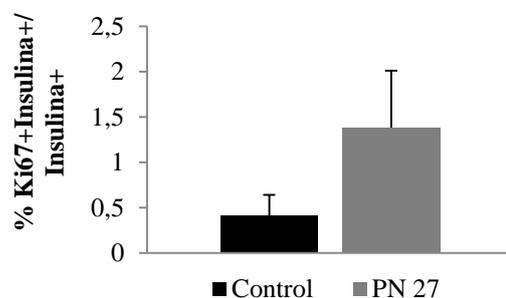


Figura 9. Cuantificación del porcentaje de células beta-pancreáticas positivas para Ki67 en células dispersas de islotes pancreáticos tratadas con $0,1\mu\text{M}$ de PN27 durante 24 horas.

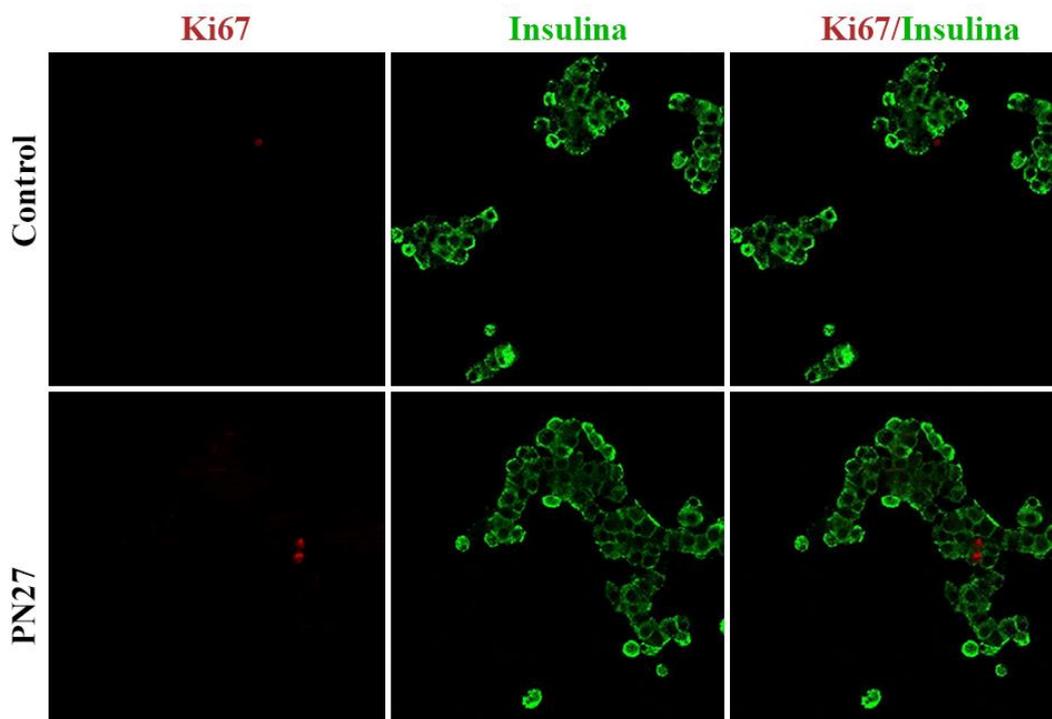


Figura 10. Imágenes representativas de células beta-pancreáticas dispersas tratadas con $0,1\mu\text{M}$ de PN27 durante 24 horas. Las secciones fueron marcadas con anticuerpos anti-insulina (verde) y anti-Ki67 (rojo).

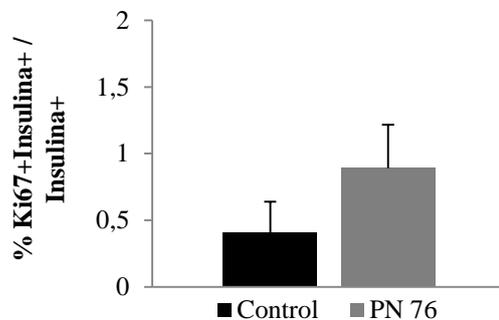


Figura 11. Cuantificación del porcentaje de células beta-pancreáticas positivas para Ki67 en células dispersas de islotes pancreáticos tratadas con 0,1 μ M de PN76 durante 24 horas.

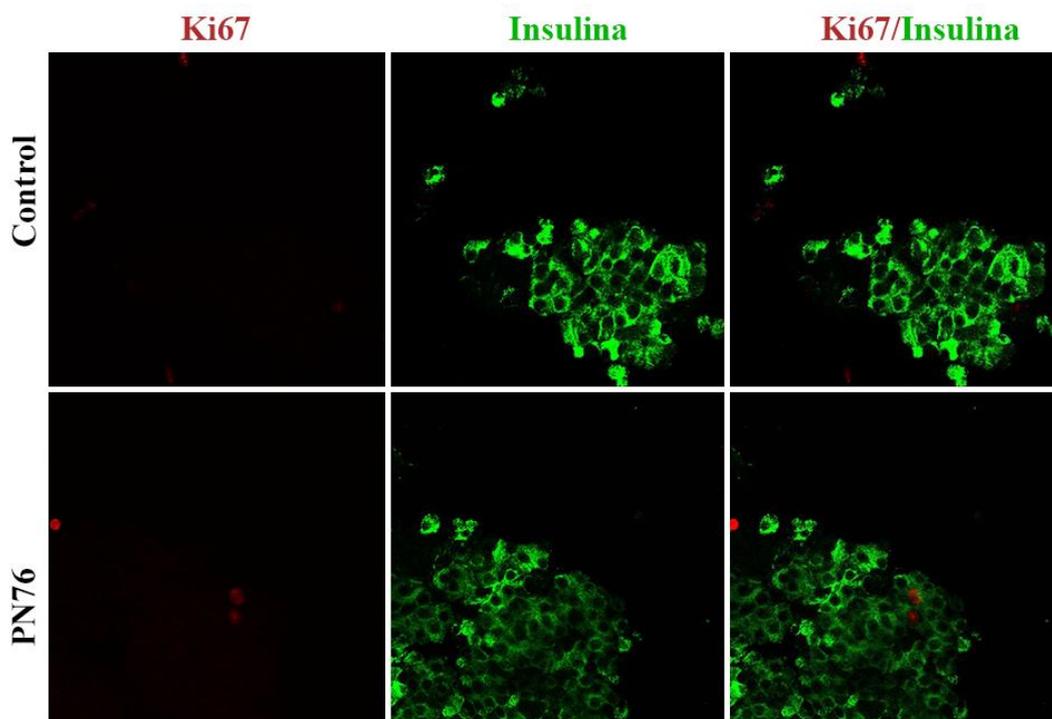


Figura 12. Imágenes representativas de células beta-pancreáticas dispersas tratadas con 0,1 μ M de PN76 durante 24 horas. Las secciones fueron marcadas con anticuerpos anti-insulina (verde) y anti-Ki67 (rojo).

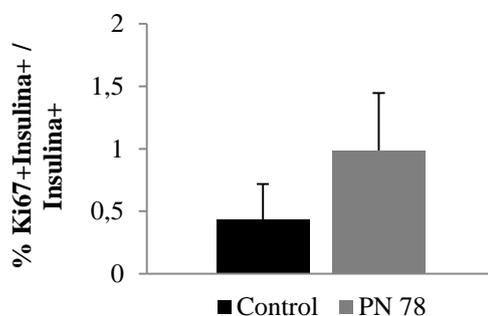


Figura 13. Cuantificación del porcentaje de células beta-pancreáticas positivas para Ki67 en células dispersas de islotes pancreáticos tratadas con 0,1µM de PN78 durante 24 horas.

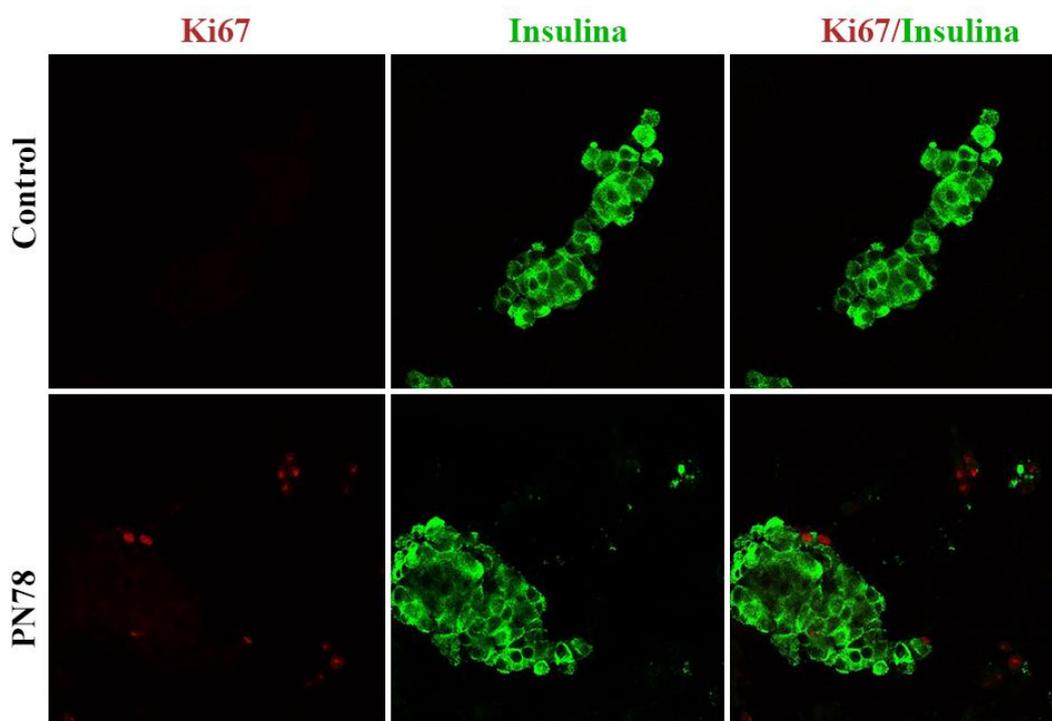


Figura 14. Imágenes representativas de células beta-pancreáticas dispersas tratadas con 0,1µM de PN78 durante 24 horas. Las secciones fueron marcadas con anticuerpos anti-insulina (verde) y anti-Ki67 (rojo).

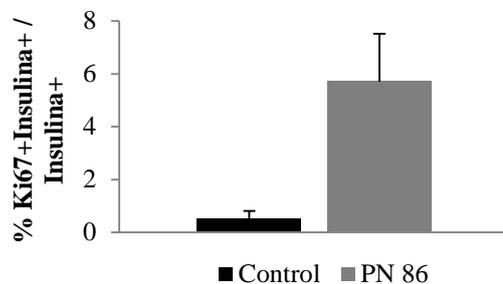


Figura 15. Cuantificación del porcentaje de células beta-pancreáticas positivas para Ki67 en células dispersas de islotes pancreáticos tratadas con $0,1\mu\text{M}$ de PN86 durante 24 horas.

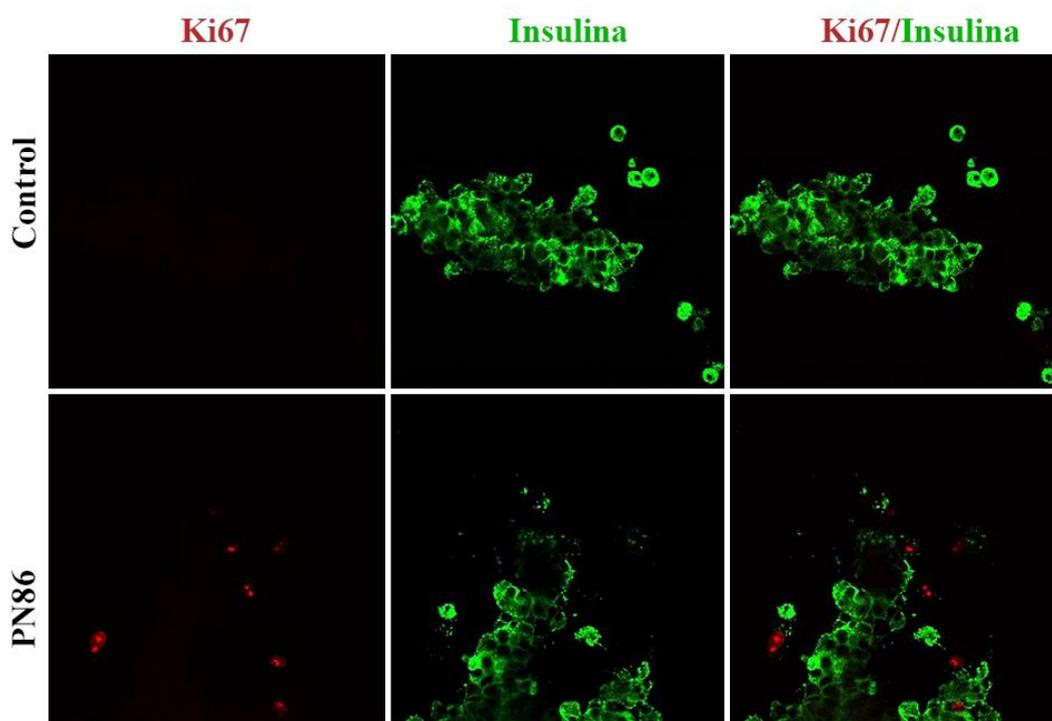


Figura 16. Imágenes representativas de células beta-pancreáticas dispersas tratadas con $0,1\mu\text{M}$ de PN86 durante 24 horas. Las secciones fueron marcadas con anticuerpos anti-insulina (verde) y anti-Ki67 (rojo).

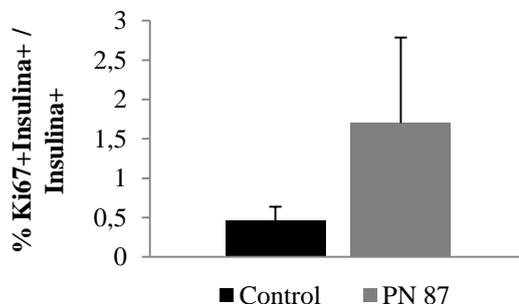


Figura 17. Cuantificación del porcentaje de células beta-pancreáticas positivas para Ki67 en células dispersas de islotes pancreáticos tratadas con $0,1\mu\text{M}$ de PN87 durante 24 horas.

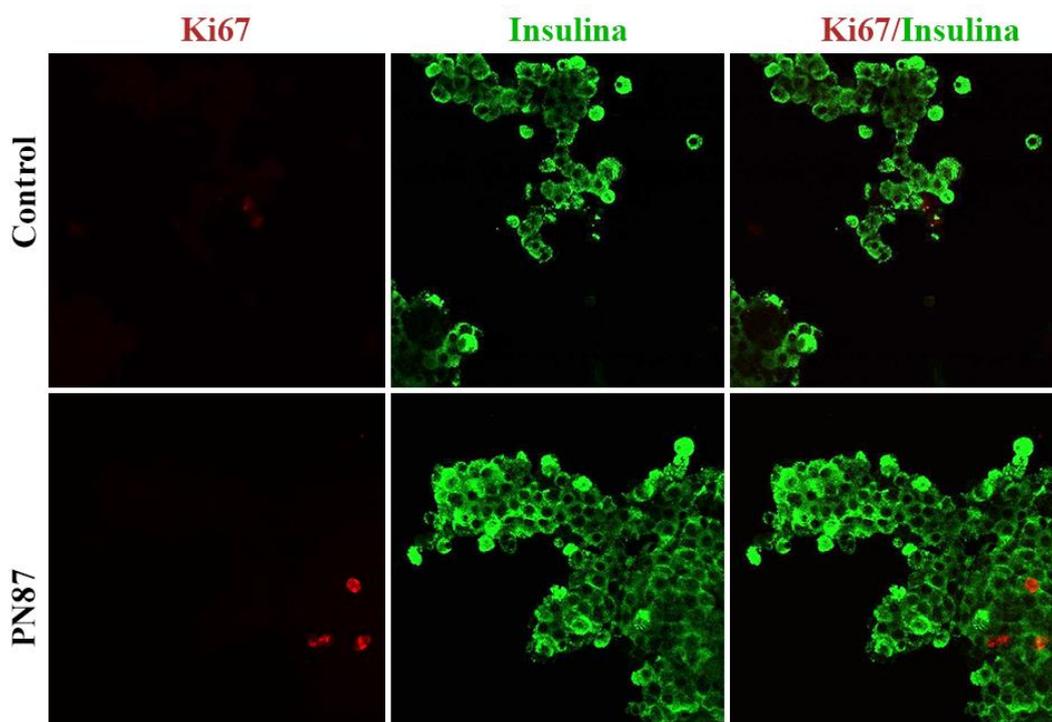


Figura 18. Imágenes representativas de células beta-pancreáticas dispersas tratadas con $0,1\mu\text{M}$ de PN87 durante 24 horas. Las secciones fueron marcadas con anticuerpos anti-insulina (verde) y anti-Ki67 (rojo).

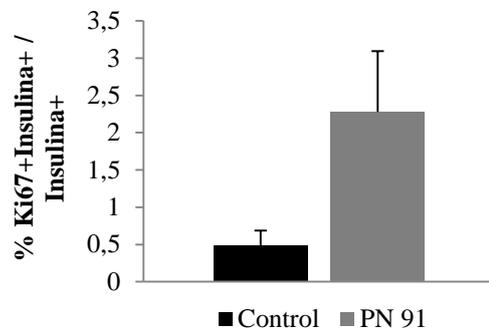


Figura 19. Cuantificación del porcentaje de células beta-pancreáticas positivas para Ki67 en células dispersas de islotes pancreáticos tratadas con $0,1\mu\text{M}$ de PN91 durante 24 horas.

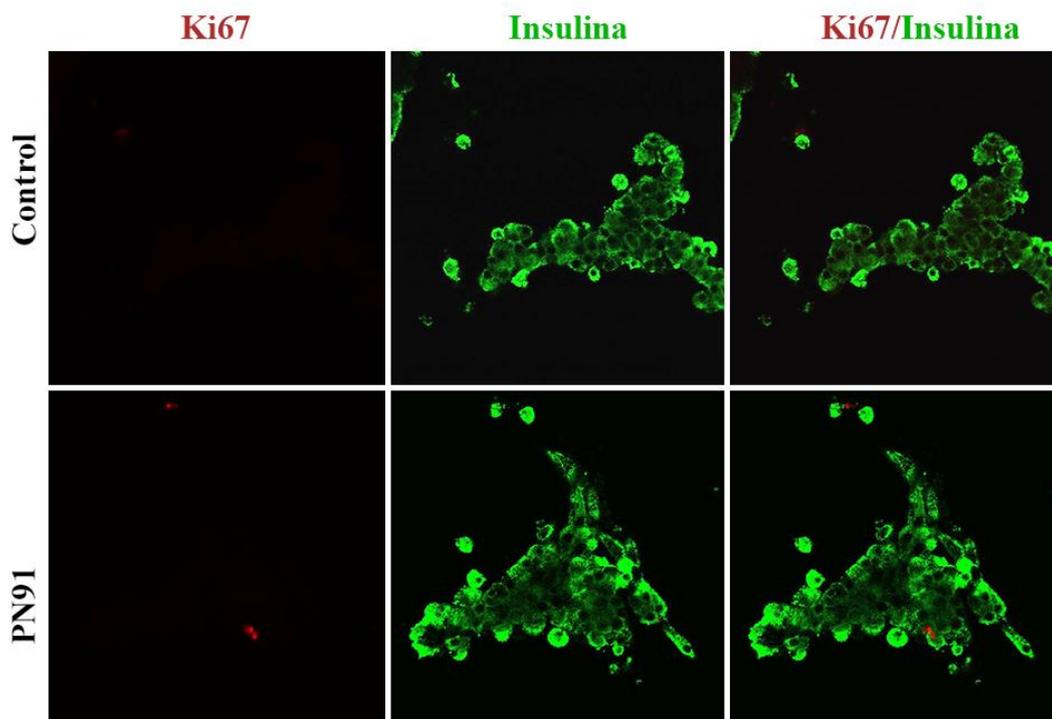


Figura 20. Imágenes representativas de células beta-pancreáticas dispersas tratadas con $0,1\mu\text{M}$ de PN91 durante 24 horas. Las secciones fueron marcadas con anticuerpos anti-insulina (verde) y anti-Ki67 (rojo).

DISCUSIÓN

Tanto la diabetes tipo 1 como la tipo 2 se caracterizan por un déficit en la masa de células beta-pancreáticas (de hasta el 99% en la diabetes tipo 1 [7], y del 65% en la diabetes tipo 2 [9]). Mientras que no hay duda de la existencia de un aumento en la muerte de células beta mediada por autoinmunidad en la diabetes tipo 1 [7], estudios recientes sugieren que la frecuencia de apoptosis de las células beta también se incrementa significativamente en la diabetes tipo 2 [9], aunque no pueden ser excluidos otros factores, tales como el fracaso en la expansión adecuada de la masa de células beta en respuesta a las crecientes demandas de secreción.

Esta pérdida de células beta en ambos tipos de diabetes implica que la restauración de la secreción de insulina endógena y la normalización de la hiperglucemia en estos pacientes puede lograrse a través de la sustitución o regeneración de células beta-pancreáticas de los islotes [25]. De hecho, la hiperglucemia en ambos tipos de diabetes se revierte por el trasplante de páncreas, y el trasplante de islotes por vía intraportal restaura, al menos temporalmente, el control de la glucosa [21]. Desafortunadamente, el reemplazo de la masa de células beta por el trasplante de islotes o por el trasplante de páncreas completo se asocia tanto con la morbilidad quirúrgica, como con efectos adversos de la inmunosupresión crónica. Por otra parte, hay un suministro insuficiente de páncreas disponibles para el creciente número de personas con diabetes, evitando así la aplicación generalizada de esta intervención. Por tanto, existe una necesidad de enfoques alternativos para la restauración de la masa de células beta funcionales en pacientes con diabetes.

Aunque la posibilidad de proliferación de células beta-pancreáticas adultas y diferenciadas, de roedores y humanos estuvo en cuestionamiento durante décadas, hoy se acepta que es posible, aunque a baja velocidad y sólo en respuesta a determinados estímulos [9, 15]. En este estudio se ha tratado de encontrar nuevas moléculas que puedan inducir dicha proliferación. De esta manera, existiría la posibilidad de expandir la masa celular *ex vivo*, resolviendo la falta de masa beta-pancreática disponible para los trasplantes, e incluso utilizarse para regenerar las células beta *in vivo* en pacientes diabéticos.

Estudios previos del grupo de investigación de la Dra. Cózar mostraron que varios productos naturales marinos pertenecientes a la familia química de los cembranos inducían un aumento significativo en la proliferación de células de insulinoma de rata INS-1E, línea celular que se utiliza como modelo de estudio *in vitro* de la célula beta-pancreática. Se quiso comprobar, por tanto, si dicha capacidad se confirmaba en células de islotes pancreáticos aislados de rata, como una aproximación más fisiológica.

Se decidió realizar el tratamiento de células beta-pancreáticas utilizando dos métodos diferentes, a fin de comparar su eficacia y utilidad. El análisis de los resultados obtenidos con cada uno de los métodos nos indica que el tratamiento en células dispersas resulta más efectivo para la inducción de la proliferación con productos naturales.

Por un lado, el ensayo en islotes completos muestra una gran variabilidad dentro de cada condición, de forma que los productos naturales que inducen algo de proliferación, tan solo lo hacen en una de las preparaciones analizadas. Además, coincide que las preparaciones en las que se detectó proliferación fueron obtenidas en el mismo aislamiento, lo que podría explicarse por diferencias en el proceso de obtención de los islotes o el tratamiento de éstos, que provocara de forma artefactual que las células del islote fueran más propensas a la proliferación.

Los resultados obtenidos con el método de las células dispersas, en cambio, muestran en general menor variabilidad entre preparaciones, como entre los diferentes productos naturales dentro de las preparaciones. Es decir, en casi todas las preparaciones las células tratadas han mostrado una proliferación aumentada respecto a su control. Además, el aumento de proliferación medio de las preparaciones ha sido similar o mayor al observado en un estudio previo del laboratorio en el que se confirmó el poder de inducción de la proliferación de un producto natural perteneciente a la misma familia química, el Epoxipikalide [24].

La elección del método de las células dispersas como método más apropiado para la inducción de la proliferación de células beta-pancreáticas, se encuentra apoyado por la idea de que en dicha situación la gran mayoría de las células tiene acceso al medio, y por tanto al producto natural resuspendido en el mismo.

Este razonamiento podría explicar por qué tan pocas células beta-pancreáticas han mostrado proliferación cuando se han tratado islotes completos. Los islotes pancreáticos son estructuras muy compactas y cerradas, de forma que la capacidad del producto natural de penetrar en éstos y llegar a todas las células que lo componen se encuentra considerablemente limitada. Así, en el presente estudio se ha observado que la tasa de proliferación es mayor en islotes visiblemente desestructurados.

Es posible que la proliferación de células individuales no sea detectable en el número real en el que ocurre, puesto que se ha descrito que la proliferación de la célula beta-pancreática puede implicar su desdiferenciación y consiguiente pérdida de funcionalidad [26], escapando de nuestro sistema de selección de célula insulino-positiva. Es decir, si esto estuviera ocurriendo, las células que debido al tratamiento con el producto natural están proliferando podrían haber perdido su capacidad de producir insulina. De esta forma, aunque se detectase proliferación no se tendrían en cuenta debido a la ausencia de marcaje de insulina. Para poner de manifiesto que, en efecto, son células beta-pancreáticas que han perdido de forma transitoria su expresión de

insulina, sería necesario realizar la detección de un factor de transcripción requerido para mantener la diferenciación y función de las células beta-pancreáticas, como es PDX1, que estaría presente en estas células y ausente en cualquiera de otros tipos.

Precisamente por la pérdida de diferenciación de células proliferantes, un siguiente paso tras confirmar la capacidad de inducción de la proliferación de un producto natural, es comprobar si las células tratadas mantienen la secreción de insulina inducida por glucosa. Otro aspecto muy interesante para su posible uso como tratamiento de la diabetes es probar si el compuesto protege a las células tratadas de la muerte celular, tanto basal como inducida por citoquinas, relevante sobre todo en el entorno de la autoinmunidad de la diabetes tipo 1, pero también en el ambiente de inflamación de la diabetes tipo 2 [27]. Si los productos naturales muestran las propiedades adecuadas en los ensayos *ex vivo*, se procedería entonces a comprobar los efectos que poseen en modelos preclínicos de diabetes.

Los datos que nos muestran los ensayos de células dispersas sugieren que existe una tendencia a la inducción de la proliferación en los seis productos naturales testados. Los resultados de este estudio, junto con los previamente obtenidos en la línea celular de insulinoma de rata INS1-E y en los cultivos primarios de islotes pancreáticos con otros productos naturales de esta familia, parecen validar la hipótesis de que los cembranos inducen la proliferación de las células beta-pancreáticas. Tras la confirmación de los resultados sería interesante tratar de esclarecer si las diferencias en la inducción observadas en este estudio se corresponden con diferencias particulares en la estructura química de dichas moléculas. Es decir, tratar de identificar si existen grupos funcionales concretos que mejoren la afinidad por la diana con la que estén interactuando, o incluso, si las diferencias puedan estar debiéndose a la biodisponibilidad del producto en el entorno determinado, cobrando importancia propiedades como la estabilidad o la solubilidad en el medio del ensayo.

En cuanto al efecto que podría tener el producto sobre otros tipos celulares, se ha demostrado que los furanocembranolidos no son citotóxicos para L-929 (fibrosarcoma murino) o K-562 (línea celular de eritroleucemia humana) [28], sosteniendo que no tiene efectos adversos sobre otros tipos celulares.

CONCLUSIONES

De este trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. La inducción de la proliferación de células beta tras tratamiento con un producto natural es más eficiente cuando se realiza sobre células dispersas que sobre islotes completos, por estar éstas más en contacto con el posible agente inductor, por lo que sería un método más conveniente para el estudio de potenciales agentes que induzcan la proliferación.
2. Los productos naturales con estructura de cembrano: PN27, PN76, PN78, PN86, PN87 y PN91 muestran una tendencia a aumentar la proliferación de la célula beta-pancreática que tendrá que ser confirmada por el análisis de un número mayor de muestras.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. WHO/NCD/NCS/99.2 ed. Geneva, World Health Organization, 1999.
2. Shaw J.E., Sicree R. A., and Zimmet P. Z., *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*, *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 87, no. 1, pp. 4–14, 2010.
3. Hanssen K.F., Bangstad H.J., Brinchmann-Hansen O., and Dahl-Jørgensen K. *Blood glucose control and diabetic microvascular complications: long-term effects of near-normoglycaemia*. *Diabet Med*, 9:697-705, 1992.
4. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 6th edn*. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2013. <http://www.idf.org/diabetesatlas>
5. Soriguer, F., Goday, A., Bosch-Comas, A., Bordiú, E., Calle-Pascual, A., Carmena, R.,... & Vendrell, J., *Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study*, *Diabetologia*, vol. 55, pp. 88–93, 2012.
6. Butler A.E., Galasso, R., Meier, J.J., Basu R., Rizza R.A., Butler P.C., *Modestly increased beta cell apoptosis but no increased beta cell replication in recent-onset type 1 diabetic patients who died of diabetic ketoacidosis*. *Diabetologia* 50:2323–2331, 2007.
7. Meier J.J., Bhushan A., Butler A.E., Rizza R.A., Butler P.C., *Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration?* *Diabetologia* 48:2221–2228, 2005.
8. Polonsky K.S., *Dynamics of insulin secretion in obesity and diabetes*. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 (Suppl. 2):S29–S31, 2000.
9. Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. *Diabetes* 52, 102–110, 2003.
10. Del Guerra S., Lupi R., Marselli L., Masini M., Bugliani M., Sbrana S., Torri S., Pollera M., Boggi U., Mosca F ... and Marchetti P. *Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes*. *Diabetes* 54, 727–735, 2005.
11. Robertson R.P., Harmon J., Tran P.O., Poitout V. *Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes*. *Diabetes* 53(Suppl 1):S119–S124, 2004.
12. Janson J., Ashley R.H., Harrison D., McIntyre S., Butler P.C. *The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles*. *Diabetes* 48:491–498, 1999.
13. Laybutt D.R., Preston A.M., Åkerfeldt M.C., Kench J. G., Busch A. K., Biankin, A. V., and Biden, T. J. *Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes*. *Diabetologia* 50:752–763, 2007.

14. Maedler K., Størling J., Sturis J., Zuellig R. A., Spinas G. A., Arkhammar P. O., ... and Donath, M. Y. *Glucose- and interleukin-1 β -induced beta-cell apoptosis requires Ca²⁺ influx and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation and is prevented by a sulfonylurea receptor 1/inwardly rectifying K⁺ channel 6.2 (SUR/Kir6.2) selective potassium channel opener in human islets.* Diabetes 53:1706–1713, 2004.
15. Bouwens L., Rooman I. *Regulation of pancreatic beta-cell mass.* Physiol Rev 85:1255–1270, 2005.
16. Brennand K., Huangfu D., and Melton D. *All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance.* PLoS Biol, 5(7): p. e163., 2007.
17. Bonner-Weir S., Li W. C., Ouziel-Yahalom L., Guo L., Weir G. C., and Sharma A.. *Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story.* Diabetes 59: 2340–2348. 2010.
18. Vasavada R. C., Cozar-Castellano I., Sipula D., and Stewart, A. F. *Tissue-specific deletion of the retinoblastoma protein in the pancreatic β -cell has limited effects on β -cell replication, mass, and function.* Diabetes, 56(1), 57-64, 2007.
19. Köhler C.U., Olewinski M., Tannapfel A., Schmidt W.E., Fritsch H., and Meier J.J. *Cell cycle control of b-cell replication in the prenatal and postnatal human pancreas.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 300, E221–E230, 2011.
20. Del Prato S., Bianchi C., and Marchetti P., *Beta-cell function and anti-diabetic pharmacotherapy.* Diabetes Metab Res Rev, 23(7): p. 518-27, 2007.
21. Drucker D.J. *Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation and apoptosis.* Mol Endocrinol 17:161–171, 2003.
22. Ryan E.A., Paty B.W., Senior P.A., Bigam D., Alfadhli E., Kneteman N. M., ... and Shapiro A. J. *Five-year follow-up after clinical islet transplantation.* Diabetes 54:2060–2069, 2005.
23. Zhao Z., Choi J., Zhao C., Ma Z.A., *FTY720 Normalizes Hyperglycemia by Stimulating beta-Cell in Vivo Regeneration in db/db Mice through Regulation of Cyclin D3 and p57KIP2.* J Biol Chem 287: 5562–5573, 2012.
24. López-Acosta J.F., Moreno-Amador J.L., Jiménez-Palomares M., Díaz-Marrero A.R., Cueto M., Perdomo G., Cózar-Castellano I. *Epoxy pukalide induces proliferation and protects against cytokine-mediated apoptosis in primary cultures of pancreatic beta-cells.* PLOS ONE. 8(1):10, 2013.
25. Meier, J.J., *Beta cell mass in diabetes: a realistic therapeutic target?* Diabetologia, 51(5): p. 703-13, 2008.
26. Eberhard D. and E. Lammert, *The pancreatic beta-cell in the islet and organ community.* Curr Opin Genet Dev, 19(5): p. 469-75, 2009.
27. Donath M.Y., Shoelson S.E. *Type 2 diabetes as an inflammatory disease.* Nat Rev Immunol. Feb;11(2):98-107, 2011.
28. Grote D., Dahse H.M. and Seifert K., *Furanocembranoids from the soft corals Sinularia asterolobata and Litophyton arboreum.* Chem Biodivers, 5(11): p. 2449-56, 2008.