



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR Y FISIOLÓGIA



PROYECTO DE FIN DE MÁSTER:

***“Expresión de Insulin Degrading Enzyme (IDE) en páncreas
endocrino de un modelo preclínico de embarazo”***

Presentado por:

Rocío Belén Damiano

Dirigido por:

Dra. Irene Cózar Castellano

Dr. Germán Perdomo Hernández

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Abreviaturas | 2 |
| Introducción..... | 3 |
| Páncreas endocrino: histología y función | 3 |
| Insulin Degrading Enzyme (IDE)..... | 4 |
| Papel de IDE en diabetes mellitus | 6 |
| Hiperinsulinemia gestacional | 7 |
| Pertinencia del modelo | 7 |
| Hipótesis y objetivo | 9 |
| Materiales y Métodos | 10 |
| Modelo animal de embarazo hiperinsulinémico | 10 |
| Obtención de los cortes histológicos..... | 10 |
| Tinción por Inmunofluorescencia | 11 |
| Microscopía confocal | 12 |
| Análisis de imágenes | 12 |
| Obtención del área de los cortes | 12 |
| Análisis estadístico | 13 |
| Resultados | 14 |
| Caracterización histometabólica | 14 |
| Expresión de IDE | 16 |
| Discusión..... | 17 |
| Conclusión..... | 19 |
| Bibliografía | 20 |

ABREVIATURAS

ADA: Asociación Americana de Diabetes

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DM: Diabetes Mellitus

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

IDE: Insulin degrading enzyme/Enzima degradadora de la insulina

IGF-II: Factor de crecimiento insulínico 2

IL-6: Interleucina 6

NGS: Suero normal de cabra

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Tampón fosfato salino

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

INTRODUCCIÓN

PÁNCREAS ENDOCRINO: HISTOLOGÍA Y FUNCIÓN

El páncreas endocrino se encuentra formado por estructuras altamente vascularizadas e innervadas denominadas islotes pancreáticos o de Langerhans (Eberhard y Lammert, 2009). Éstos contienen cinco tipos celulares productores de hormonas (Figura 1), que secretan polipéptidos biológicamente activos a la sangre: células α productoras de glucagón, células β productoras de insulina, células δ productoras de somatostatina, células PP productoras de polipéptido pancreático y células ϵ productoras de grelina (Gittes, 2009).

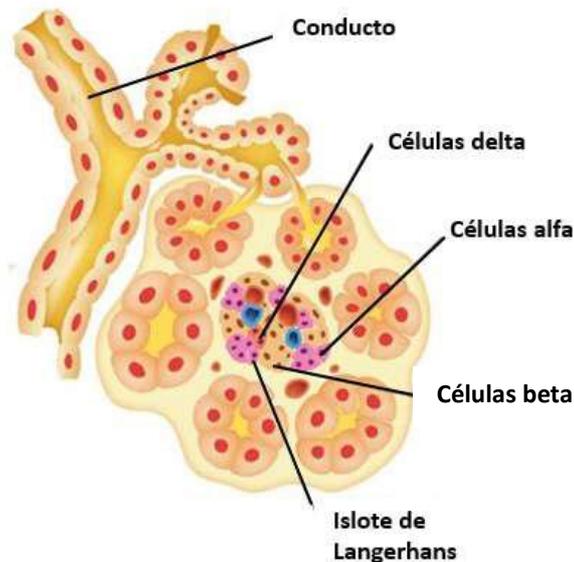


Figura 1. Esquema de islote pancreático
(<http://elbibliote.com/resources/Temas/html/638.php>)

El rol fundamental de las células β -pancreáticas es la regulación de los niveles plasmáticos de glucosa mediante la producción, procesamiento y

secreción de insulina en el torrente sanguíneo, siendo el tipo celular más abundante de los islotes (Eberhard y Lammert, 2009).

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que tiene lugar bien cuando el páncreas no produce suficiente insulina o bien cuando el organismo no es capaz de utilizar apropiadamente la insulina que produce.

La diabetes tipo 1 se caracteriza por una producción deficiente de insulina por el organismo, principalmente por causas autoinmunes, que desencadenan la destrucción de masa de células β -pancreáticas (Atkinson *et al*, 2014).

La diabetes tipo 2 es el resultado de la incapacidad de los tejidos periféricos para responder a la insulina, denominada resistencia insulínica. Tal disfunción es compensada inicialmente por un aumento en la producción de la hormona, que finalmente falla por agotamiento de las células β (Documento de Posición de la ADA, 2011).

Tanto el número de casos como la prevalencia de la DM se han incrementado a lo largo de las últimas décadas. Se estima que 422 millones de adultos vivían con diabetes en 2014, siendo la causa de 1,5 millones de muertes en 2012. Durante la última década, la prevalencia de la DM ha aumentado más rápidamente en países de ingresos bajos e intermedios, en comparación con aquellos de ingresos más altos. La mayoría de la población diabética padece de DM tipo 2, lo que suele ocurrir principalmente en adultos, aunque actualmente también es diagnosticada durante la juventud e infancia (Informe global sobre diabetes de la OMS, 2016).

INSULIN DEGRADING ENZYME (IDE)

IDE es una proteasa capaz de degradar a la insulina y a otros péptidos bioactivos como el β -amiloide, IGF-II, glucagón, amilina y somatostatina. Como principal mecanismo de degradación de la insulina, IDE es un blanco candidato para el tratamiento farmacológico de la diabetes (Deprez-Poulain

et al, 2015). Sin embargo, su rol en el control de la glucemia *in vivo* aún no se encuentra completamente dilucidado y su estudio hasta el momento ha arrojado resultados contradictorios (Abdul-Hay *et al*, 2011).

IDE es una metaloproteasa altamente conservada asociada a zinc y de un peso molecular de 110 kDa. Contiene un sitio catalítico amplio, formado por la conjunción de un dominio C y otro N-terminal (Figura 2). El átomo de zinc se encuentra en el dominio N-terminal, mientras que los residuos catalíticos claves se hallan en ambos. Esta estructura tiene como consecuencia la formación del sitio catalítico sólo en la conformación cerrada de la enzima (Deprez-Poulain *et al*, 2015).

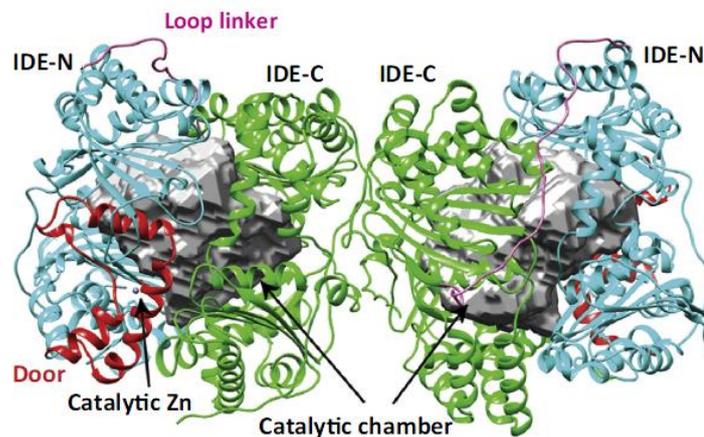


Figura 2. Estructura de Insulin-Degrading Enzyme (IDE).

(Trends in Endocrinology & Metabolism, January 2016, Vol. 27, No. 1)

IDE tiene una distribución tisular y una localización subcelular amplias, y sólo una pequeña fracción es secretada. Ejerce sus funciones tanto mediante proteólisis, como por interacción con otras proteínas intracelulares, incluyendo actividad del tipo chaperona sobre péptidos amiloidogénicos (Deprez-Poulain *et al*, 2015). Esta última función atribuye a IDE un carácter citoprotector, mediante la degradación o la formación de complejos estables e irreversibles de tales péptidos, limitando su

concentración y/o agregado intracelular y previniendo la formación de oligómeros tóxicos (Steneberg *et al*, 2013).

PAPEL DE IDE EN DIABETES MELLITUS

Estudios de secuenciación genética masiva han identificado ciertos *loci* de riesgo para el padecimiento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) ligados al perjuicio de la función de la célula β -pancreática. En particular, el *locus* HHEX/IDE ha sido asociado a la reducción de la secreción de insulina en respuesta a la estimulación oral por glucosa en humanos (Garup *et al*, 2007 y Pascoe *et al*, 2007).

Sin embargo, el rol de IDE en el establecimiento de la diabetes permanece poco claro, dadas las observaciones aparentemente opuestas hechas en distintos modelos experimentales. Estudios previos indican que la delección de IDE en roedores de distintos trasfondos genéticos resulta en un aumento de la tolerancia a la glucosa sólo a una edad temprana, mientras que la carencia de la enzima en animales de mayor edad conlleva intolerancia a la glucosa. Algunos autores han atribuido dichas observaciones a la adquisición de insulinoresistencia por exposición crónica a hiperinsulinemia (Abdul-Hay *et al*, 2011), mientras que otros basan la explicación de tales resultados en la disfunción de la secreción secundaria de insulina dependiente de glucosa dada por un aumento de polipéptidos amiloidogénicos, la disminución de la expresión de microtúbulos en los islotes pancreáticos y la imposibilidad de reabastecer los gránulos secretorios de insulina (Steneberg *et al*, 2013).

HIPERINSULINEMIA GESTACIONAL

Durante un embarazo normal, la sensibilidad a la insulina disminuye conforme avanza la gestación. Estas modificaciones responden a hormonas placentarias, progesterona y estrógenos (Baz Baz *et al*, 2016).

En situaciones fisiológicas, un aumento compensatorio de la masa de células β -pancreáticas, la mayor expresión del gen de insulina y, subsecuentemente, el aumento en la secreción de esta hormona, mantienen la homeostasis de la glucosa (Eberhard y Lammert, 2009).

La diabetes mellitus gestacional (DMG) tiene lugar en el caso de que las células β -pancreáticas sean incapaces de hacer frente a la demanda creciente de insulina y es algunas veces precursora de la DM 2 (Baz *et al*, 2016).

PERTINENCIA DEL MODELO

A pesar de las evidencias previas del rol de IDE en la homeostasis de la glucemia e insulinemia, no se han realizado estudios en el contexto de la hiperinsulinemia gestacional. Hasta el momento, la resistencia a la insulina durante el embarazo se ha correlacionado con los niveles circulantes de factores proinflamatorios como TNF α e IL-6 (Baz *et al*, 2016).

Se ha observado que, durante la preñez en ratonas, el pico de proliferación de células β -pancreáticas tiene lugar en el día 14,5 de gestación. Estudios en ratas indican que esto coincide con el pico en los niveles de lactógenos placentarios (Rieck *et al*, 2009).

Resulta de interés el abordaje de la homeostasis de la glucosa en el embarazo, no sólo por su importancia como condición fisiológica de hiperinsulinemia y potencial intolerancia a la glucosa, sino como posible fuente de abordajes terapéuticos para la DM y sus estadios previos o predisponentes (Ernst *et al*, 2011).

Trabajos previos de nuestro laboratorio han caracterizado la expresión de IDE en distintos modelos experimentales: Cuando la línea celular de insulinoma de rata INS-1E fue sometida a un ambiente con alta concentración de insulina (500 nM), los niveles de expresión de IDE mostraron un incremento dependiente del tiempo de exposición al tratamiento. El mismo efecto fue corroborado en cultivos primarios de islotes pancreáticos de rata, demostrándose mediante análisis de niveles de ARNm que operaría a nivel transcripcional del gen de IDE (López-Acosta, 2013).

En ratones db/db (carentes de receptores de leptina) hiperglucémicos e hiperinsulinémicos de 12 semanas de edad, se vio mayor expresión de IDE en células β -pancreáticas frente a ratones control (Fernández-Luis y Heras-Pozas, 2016), mientras que al estudiar páncreas humanos, se observó una mayor expresión de IDE en pacientes diabéticos tipo 2 tratados con insulina exógena respecto al grupo control y a pacientes tratados con antidiabéticos orales (Fernández-Díaz, 2014).

HIPÓTESIS Y OBJETIVO

HIPÓTESIS: Existe una mayor expresión de IDE en el páncreas endocrino de ratonas preñadas hiperinsulinémicas en relación a las no preñadas.

OBJETIVO: Determinar la expresión de IDE en páncreas endocrino de ratonas preñadas hiperinsulinémicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MODELO ANIMAL DE EMBARAZO HIPERINSULINÉMICO

Fueron utilizadas 15 ratonas C57Bl6j de 8 semanas de edad¹, 7 de las cuales estaban preñadas en estadio 14,5 *post coitum*. Las 8 restantes (no preñadas) serán referidas de aquí en adelante como grupo control.

A los 14,5 días *post coitum*, se midieron los niveles de insulinemia y glucemia en condiciones de no ayuno de ambos grupos, por ELISA (Mercodia Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA, Suecia) y tiras reactivas comerciales (Bayer Breeze2, Suiza) respectivamente, obteniéndose los valores que se detallan en la Tabla 1.

| Grupo | Control | Preñadas |
|----------------------------------|---------------|----------------|
| Glucemia postprandial (mg/dl) | 125 ± 3 | 126 ± 4 |
| Insulinemia postprandial (ng/ml) | 0,218 ± 0,014 | 1,219 ± 0,337* |

Tabla 1. Glucemia e insulinemia en condiciones de no ayuno de los grupos control y preñadas. *p<0,05 respecto al grupo control

OBTENCIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS

Los grupos de ratonas previamente descritos fueron sacrificados por inhalación de isoflurano, habiendo cumplido las ratonas preñadas 14,5 días *post coitum*. Se procedió a la obtención de los páncreas mediante cirugía, que fueron conservados en formalina durante 24 horas.

¹ Proyecto de Investigación Animal N° 5003931, aprobado por el Comité de Bienestar Animal de la UVa y por la Junta de Castilla y León.

Los páncreas fueron incluidos en bloques de parafina y conservados a temperatura ambiente hasta la obtención de los cortes. Éstos fueron realizados con un grosor de 5 μm en micrótomo.

TINCIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA

Se procedió a la desparafinación y rehidratación de los cortes por inmersión en xilol y concentraciones decrecientes de etanol en agua desionizada (100, 95, 80 y 70%). Seguidamente, los cortes fueron lavados en solución PBS 1X y bloqueados a temperatura ambiente con solución 2% NGS/1% PBSA en PBS 1X durante 1 hora. Una vez bloqueados los sitios de unión inespecíficos, se incubaron los anticuerpos primarios anti-insulina, anti-glucagón y anti-IDE diluidos en solución de bloqueo 1:50, 1:2000 y 1:2000 respectivamente (Tabla 2), durante toda la noche y a 4°C.

Después de lavar el exceso de anticuerpo primario con PBS 1X y realizar un bloqueo de 10 minutos, se incubaron los anticuerpos secundarios anti-guinea pig, anti-mouse y anti-rabbit, conjugados con los fluoróforos Alexa 488, Alexa 647 y Alexa 594 y diluidos en solución de bloqueo 1:200, 1:200 y 1:300 respectivamente, durante 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente. A continuación, se lavó el exceso de anticuerpo secundario de los preparados, que fueron cubiertos con medio de montaje Fluoroshield-DAPI (SIGMA) y un cubreobjetos.

Los preparados así teñidos fueron almacenados en oscuridad a 4°C hasta el momento de su visualización por microscopía confocal.

| Anticuerpo | Casa comercial | Dilución | Especie |
|---------------|----------------|----------|---------|
| anti-Insulina | SIGMA, USA | 1:50 | Cobaya |
| anti-Glucagón | Abcam, USA | 1:2000 | Ratón |
| anti-IDE | Millipore, USA | 1:2000 | Conejo |

Tabla 2. Detalle de anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia.

MICROSCOPIA CONFOCAL

Los preparados teñidos tal como se describió previamente fueron visualizados en un microscopio confocal (Leica TCS SP5), con filtros para la detección de las longitudes de onda 461 (azul), 488 (verde), 594 (rojo) y 647 nm (rojo lejano). Se utilizó el objetivo 20X y el filtro de detección de luz verde (insulina) para enfocar la muestra.

ANÁLISIS DE IMÁGENES

Las imágenes fueron analizadas mediante el software ImageJ (32 bits). Se cuantificaron los núcleos celulares totales presentes en cada islote (DAPI, filtro azul), las células insulina positivas o β (anti-insulina, filtro verde), las células glucagón positivas o α (anti-glucagón, filtro rojo lejano) y las células IDE positivas (anti-IDE, filtro rojo).

OBTENCIÓN DEL ÁREA DE LOS CORTES

Tras realizar una tinción por hematoxilina de un corte contiguo al utilizado para la tinción descrita en el apartado anterior, los preparados fueron

escaneados y densitometrados en ImageJ, con el objetivo de normalizar la cuantificación por unidad de área de tejido.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos por cuantificación de células positivas para los distintos marcadores fueron sometidos a la prueba t de Student de dos colas mediante Microsoft Office Excel. Se consideraron significativos los resultados en los que $p < 0,05$.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN HISTOMETABÓLICA

Mediante microscopía confocal, se obtuvieron fotografías de los islotes (n=10 ± 1) de los 15 cortes de páncreas. Se cuantificó, mediante visualización de la tinción por DAPI, la cantidad de células por islote pancreático. Además, se contabilizaron los tipos celulares α y β , en base a la presencia de señal fluorescente indicando expresión de glucagón o insulina respectivamente (Figura 3).

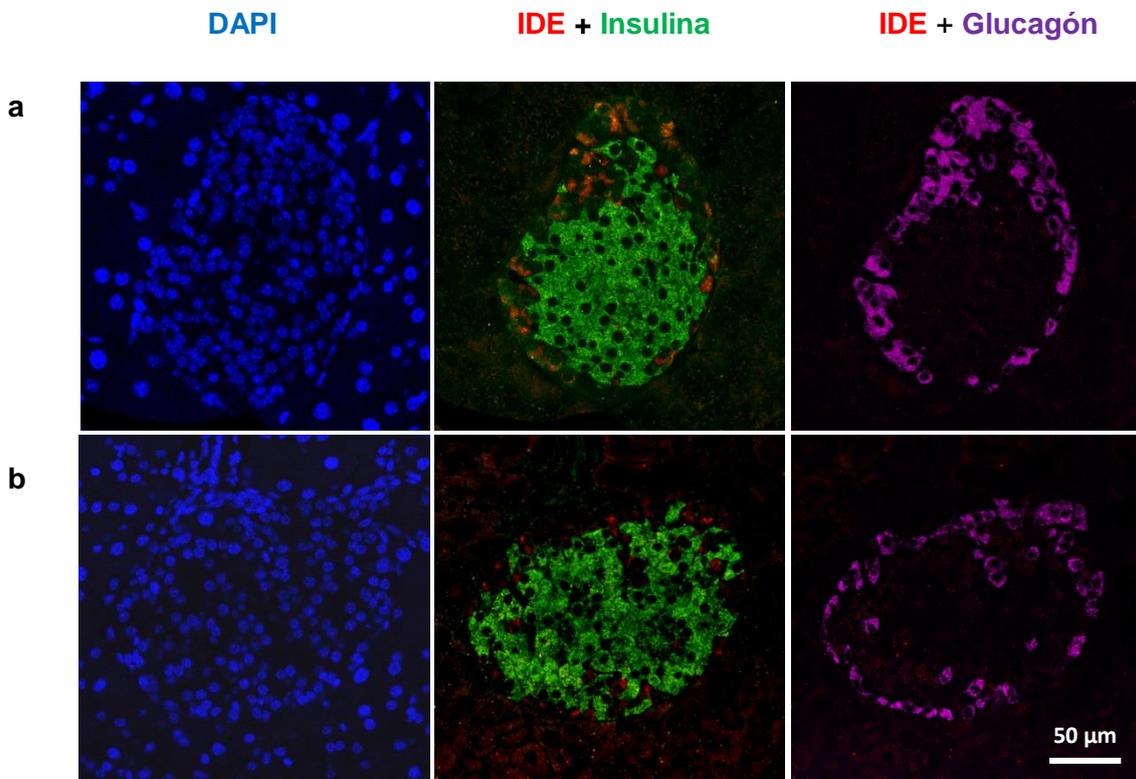


Figura 3. Tinción por inmunofluorescencia de islote pancreático de ratona control **(a)** y preñada **(b)**. Los núcleos del islote pancreático fueron visualizados por tinción con DAPI (azul). Marcaje de insulina (verde), glucagón (rojo lejano) e IDE (rojo).

No se hallaron diferencias significativas en el número de islotes por área de tejido o en la cantidad de células dentro de cada islote al comparar los páncreas de ratonas preñadas con las control, como se muestra en las Figuras 4a y b. Tampoco se observaron diferencias en la cantidad o proporción de células β y α (Figuras 4 c-e).

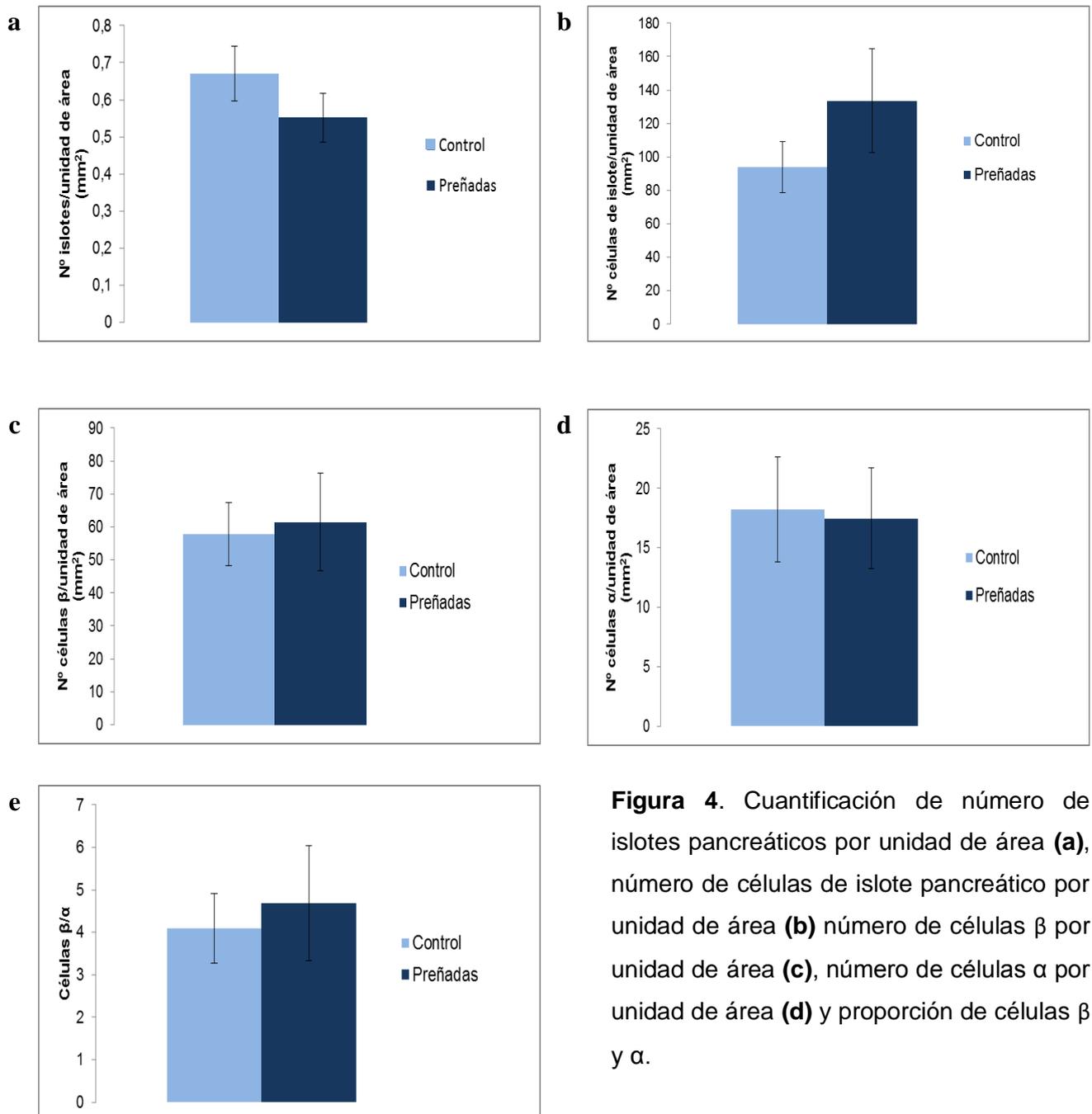
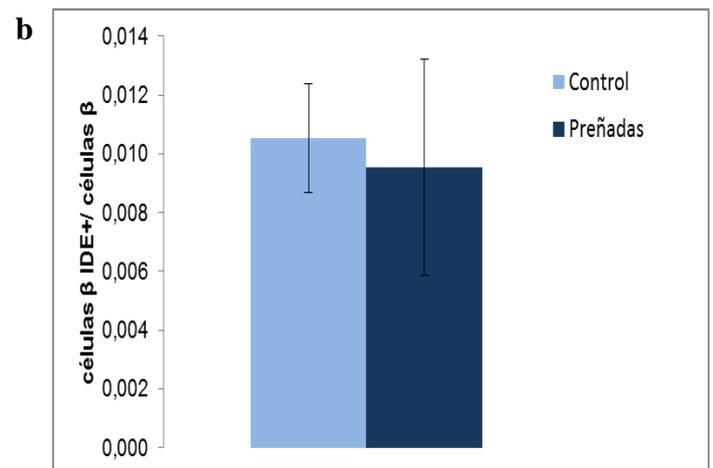
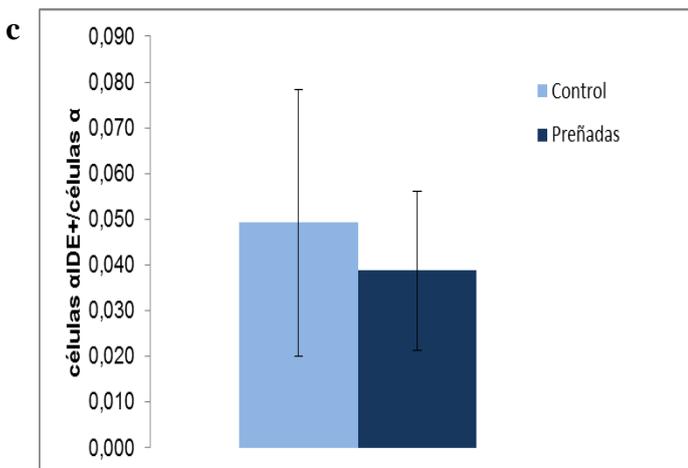
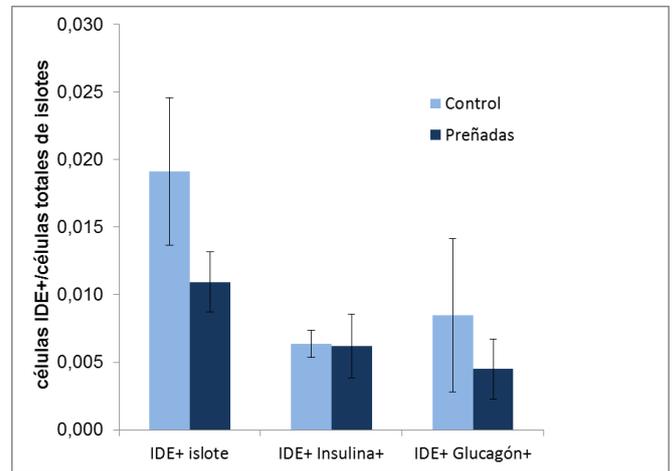


Figura 4. Cuantificación de número de islotes pancreáticos por unidad de área (a), número de células de islote pancreático por unidad de área (b) número de células β por unidad de área (c), número de células α por unidad de área (d) y proporción de células β y α .

EXPRESIÓN DE IDE

De la manera descrita previamente, se identificaron y cuantificaron las células que expresaban IDE. Además, se determinó la colocación de la señal correspondiente a IDE con la de insulina o glucagón (Figura 3), con el objetivo de identificar el tipo celular endocrino que expresaba la enzima. El número de células IDE positivas fue relativizado tanto al área del preparado como al tipo celular (α , β u otra). No se hallaron diferencias en la expresión de IDE entre los páncreas de ratonas preñadas y control, ni en la proporción de células α o β IDE positivas (Figura 5).

Figura 5. Cuantificación de células IDE+ en **a** relación a las células totales por islote pancreático **(a)** y de la proporción de células IDE+ respecto a su colocación β **(b)** o α **(c)**.



DISCUSIÓN

Según lo observado en el presente estudio, las ratonas preñadas descritas no presentan hiperplasia o hipertrofia en sus páncreas endocrinos, tal como se esperaba dada la hiperinsulinemia fisiológica que exhiben. Las ratonas preñadas suelen mostrar un aumento de la masa de células β -pancreáticas y de la resistencia a la insulina, hecho bien conocido y registrado en la bibliografía (Sorenson y Breije, 1997). En nuestro caso sí se observó resistencia insulínica, ya que las ratonas preñadas presentaron normoglucemia a costa de una hiperinsulinemia significativa.

Esto puede atribuirse al tamaño muestral y al número de cortes procesados por páncreas. El páncreas es un órgano de anatomía heterogénea y compleja (Gittes, 2009), para el cual un estudio más exhaustivo requeriría de un mayor número de cortes de distintos planos representativos (al menos tres, separados por 100 μ m). Esto permitiría visualizar no sólo un mayor número de islotes pancreáticos, sino también realizar cuantificaciones más representativas de las poblaciones celulares que los conforman.

Los niveles de expresión de IDE no variaron en los páncreas de ratonas preñadas respecto de las control. Tomando en cuenta las limitaciones ya mencionadas del presente estudio, este dato podría indicar que en el modelo preclínico de embarazo los niveles de insulina alcanzados en las ratonas preñadas no son suficientes para inducir la expresión de IDE o bien que otras hormonas (estrógenos, prolactina) podrían estar contrarregulándola.

Respecto a los resultados previos de nuestro laboratorio, en donde se ha visto un aumento de la expresión de IDE bajo condiciones de hiperinsulinemia *in vivo*, debe considerarse que los contextos fisiológicos son distintos. Tanto en los ratones db/db como en los pacientes diabéticos tipo 2 insulinizados, existe un ambiente glucolipotóxico, ausente en las ratonas preñadas. Estas ideas se esquematizan en la Figura 6.

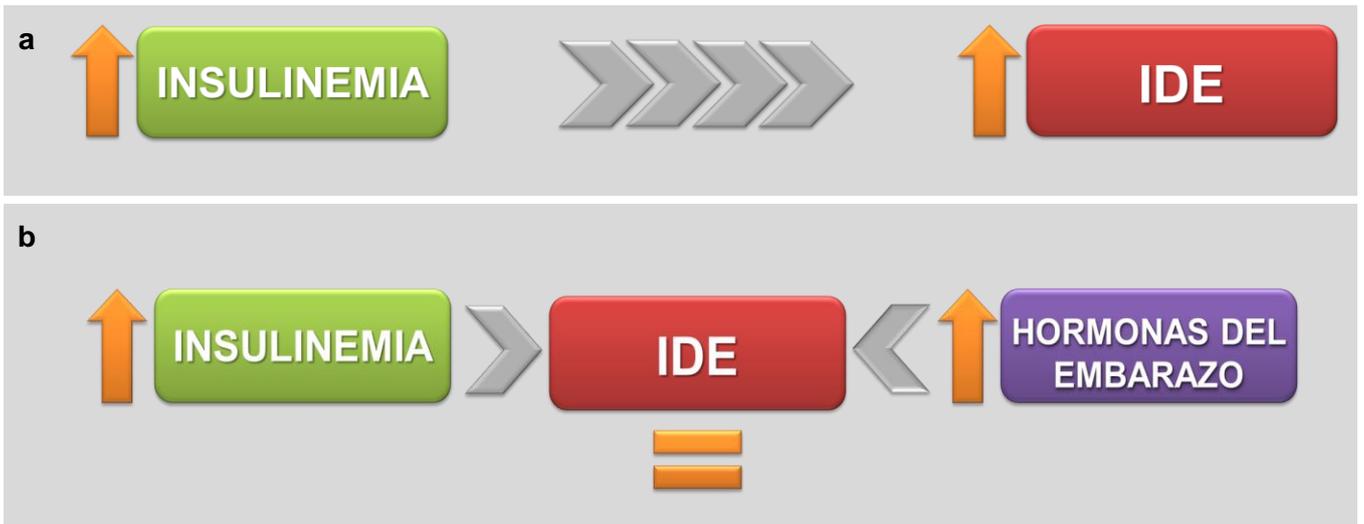


Figura 6. Representación esquemática de **(a)** la hipótesis propuesta y **(b)** los posibles factores regulatorios de la expresión de IDE durante el embarazo.

CONCLUSIÓN

La hiperinsulinemia fisiológica presente en el embarazo no induce un aumento de la expresión de IDE en el páncreas endocrino.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Hay S.O, Kang D., McBride M., Li L., Zhao J., Leissring M.A., *Deletion of Insulin-Degrading Enzyme Elicits Antipodal, Age-Dependent Effects on Glucose and Insulin Tolerance*. PLoS ONE, 2011. 6(6): e20818.
- American Diabetes Association. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Position Statement Diabetes Care, 2011. Vol 34, Suppl. 1: p. 62.69.
- Atkinson M.A., Eisenbarth G.S., Michels A.W. *Type 1 diabetes*. Lancet, 2014. 383(9911): p. 69-82.
- Baz B., Riveline J.P., Gautier J.F., *Endocrinology of pregnancy. Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects*. European Journal of Endocrinology, 2016. 174:2, R43-R51.
- Deprez-Poulain R., Hennuyer N., Bosc D., Liang W.G., Ene´e E., Marechal X., Charton J., Totobenazara J., Berte G., Jahklal J., Verdelet T., Dumont J., Dassonneville S., Woitrain E., Gauriot M., Paquet C., Duplan I., Hermant P., Cantrelle F.X., Sevin E., Culot M., Landry V., Herledan, Piveteau C., Lippens G., Leroux F., Tang W.J., van Ender P., Staels B., Deprez B., *Catalytic site inhibition of insulin-degrading enzyme by a small molecule induces glucose intolerance in mice*. Nature Communications, 2015. 6:8250.
- Eberhard, D. and E. Lammert, *The pancreatic beta-cell in the islet and organcommunity*. Curr Opin Genet Dev, 2009. 19(5): p. 469-75.
- Ernst S., Demirci C., Valle S., Velazquez-Garcia S., Garcia-Ocaña A., *Mechanisms in the adaptation of maternal β -cells during pregnancy*. Diabetes Manag (Lond), 2011. 1(2): p. 239-248.
- Fernández-Díaz C.M., *Estudio de la expresión de IDE (insulin degrading enzyme) en páncreas de población diabética y control*

[trabajo de fin de máster]. Universidad de Valladolid, Facultad de Medicina; 2014.

- Fernández-Luis S. y Heras-Pozas B., *Estudio del papel de Insulin Degrading Enzyme (IDE) en diabetes mellitus* [trabajo de fin de grado]. Universidad de Valladolid, Facultad de Medicina; 2016.
- Grarup N., Rose C.S., Andersson E.A., Andersen G., Nielsen A.L., Albrechtsen A., Clausen J.O., Rasmussen S.S, Jørgensen T., Sandbæk A., Lauritzen T., Schmitz O., Hansen T., Pedersen O., *Studies of Association of Variants Near the HHEX, CDKN2A/B, and IGF2BP2 Genes With Type 2 Diabetes and Impaired Insulin Release in 10,705 Danish Subjects. Validation and Extension of Genome-Wide Association Studies*. *Diabetes*, 2007. 56: p. 3105–3111.
- Gittes G. K., *Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review*. *Developmental Biology*, 2009. 326: p. 4-35.
- López-Acosta J.F. *Búsqueda de dianas terapéuticas en la célula beta-pancreática para el tratamiento de la diabetes* [tesis doctoral]. Universidad de Valladolid, Facultad de Medicina; 2013.
- Organización Mundial de la Salud, *Global report on diabetes*, 2016.
- Pascoe L., Tura A., Patel S.K., Ibrahim I.M., Ferrannini E., Zeggini E., Weedon M.N., Mari A., Hattersley A.T., McCarthy M.I., Frayling M.T., Walker M., *Common Variants of the Novel Type 2 Diabetes Genes CDKAL1 and HHEX/IDE Are Associated With Decreased Pancreatic-Cell Function*. *Diabetes*, 2007. 56: p. 3101-3104.
- Rieck S., White P., Schug J., Fox A.J., Smirnova O., Gao N., Gupta R.K., Wang R.V., Scherer P.E., Keller M.P., Attie A.D., Kaestner K.H., *The Transcriptional Response of the Islet to Pregnancy in Mice*. *Mol Endocrinol.*, 2009. 23(10): p. 1702-1712.

- Sorenson R.L. and Breije T.C., *Adaptation of Islets of Langerhans to Pregnancy: 3-Cell Growth, Enhanced Insulin Secretion and the Role of Lactogenic Hormones*. Horm. Metab. Res., 1997. 29: p. 301-307.
- Steneberg P., Bernardo L., Edfalk S., Lundberg L., Backlund F., Östenson G.C., Edlund H., *The Type 2 Diabetes–Associated Gene Ide Is Required for Insulin Secretion and Suppression of a-Synuclein Levels in b-Cells*. Diabetes, 2013. 62: p. 2004-2014.