

Efectos de la sobreexpresión de Insulin Degrading Enzyme (IDE) en la señalización de insulina en células hepáticas

Blanca Escribano Romero

Tutora: Irene Cózar Castellano

Co-Tutor: Germán Perdomo Hernández



Índice

Abreviaturas	1
1. Introducción	2
1.1 Diabetes mellitus y resistencia insulínica	2
1.2 Mecanismos de señalización de la insulina.....	4
1.3 Insulin Degrading Enzyme (IDE)	4
1.4 Papel de IDE en el metabolismo	5
1.5 Hipótesis y Objetivos.....	8
2. Materiales y métodos.....	9
2.1 Materiales.....	9
2.2 Línea celular.....	11
2.3 Sobreexpresión de IDE en línea celular Hep-G2.	11
2.4 Preparación/procesado de las muestras.....	12
2.5 Western-Blot.	14
2.6 Análisis estadístico.....	15
3. Resultados.....	16
4. Discusión	19
5. Conclusiones	21
6. Bibliografía.....	22

Abreviaturas

AdIDE: Adenovirus IDE

AdNull: Adenovirus null

ANOVA: *ANalysis Of VAriance*

BSA: Albúmina de Suero Bovino

IDE: *Insulin Degrading Enzyme*

INS: Insulina

IRS: Sustrato del receptor de insulina

LSB: *Laemmli Sample Buffer*

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

p-Akt: Akt fosforilada

PBS: Tampón Fosfato Salino

PBS-T: PBS-Tween 20

PDK1: Proteína Kinasa 1 Dependiente de Fosfoinosítido

PI3K: Fosfoinositol-3-Kinasa

PIC: *Protease Inhibitor Cocktail*

PMSF: Fluoruro de Fenilmetilsulfonio

S473: Serina 473

SBF: Suero Bovino Fetal

SDS: Dodecil Sulfato Sódico

SV: Sin virus

1. Introducción

1.1 Diabetes mellitus y resistencia insulínica

La diabetes engloba un conjunto de enfermedades caracterizadas por elevados niveles de glucosa en sangre como consecuencia de alteraciones en la producción de insulina, su acción o ambas¹. La hiperglucemia crónica de la diabetes está asociada a daños a largo plazo que incluye disfunción y fallo de diferentes órganos, especialmente los ojos, riñones, nervios, el corazón y los vasos sanguíneos².

La diabetes y la obesidad suponen un problema social por su elevada prevalencia y las comorbilidades asociadas³. En España la prevalencia de diabetes se estima en un 14% de la población y casi el 30% posee intolerancia a la glucosa⁴. La diabetes supone una pesada carga económica para la sanidad global y las complicaciones asociadas a esta enfermedad se han convertido en una de las principales causas de muerte⁵.

La mayoría de casos de diabetes se subdividen en dos categorías principales: diabetes mellitus tipo I y diabetes mellitus tipo II, siendo esta última más prevalente². La diabetes tipo I es una patología crónica autoinmune, caracterizada por la incapacidad del organismo de producir insulina debido a la muerte de las células β del páncreas (células productoras de insulina)⁶; mientras que la diabetes tipo II es una enfermedad metabólica, asociada a obesidad e inactividad física⁷ caracterizada por una resistencia a la insulina⁶, que provoca un incremento en la secreción de insulina para compensar⁸. Este mecanismo de compensación conduce a la pérdida de masa de células β ⁹ (figura 1).

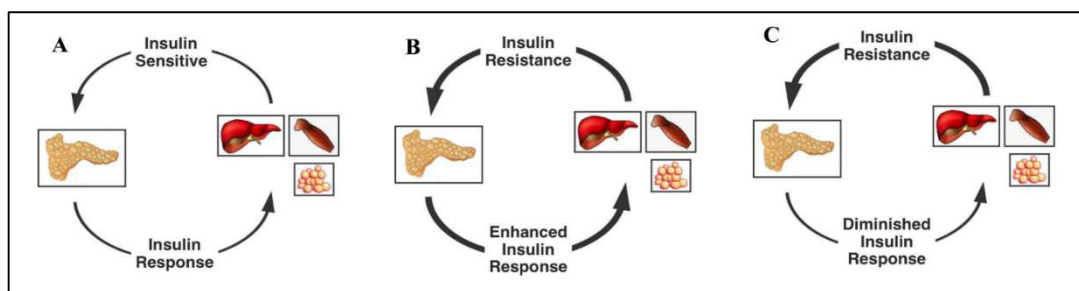


Figura 1. Resistencia a insulina. (A) Sensibilidad y niveles de secreción normal de insulina. (B) Resistencia a insulina e incremento en la secreción de la misma en respuesta compensatoria (Fase de prediabetes) (C) Resistencia a insulina, caída de la secreción de insulina por pérdida de masa celular β (Diabetes). *Modificado de Kahn, S. E., Cooper, M. E. & Del Prato, S.*¹⁰

La aparición de la diabetes tipo I tiene lugar en la infancia o la juventud. Hasta hace algunos años, el debut de la diabetes tipo II ocurría en individuos a partir de los 35 años de edad; actualmente la edad de comienzo de la enfermedad ha disminuido, afectando a la edad infanto-juvenil, y el número de pacientes con un largo historial de esta enfermedad va en aumento¹¹.

La insulina es la hormona más importante de la homeostasis del metabolismo intermedio, activando la captación de glucosa, la síntesis de lípidos y proteínas e inhibiendo la gluconeogénesis hepática¹².

La resistencia a la insulina, característica de la diabetes tipo II, podría ser consecuencia de niveles crónicamente elevados de glucosa en sangre, que provocarían una hiperinsulinemia sostenida en el tiempo, que alteraría la sensibilidad a insulina por parte de los tejidos¹³.

Por otro lado, también existen evidencias que sugieren que elevados niveles de ácidos grasos circulantes, como los observados en casos de obesidad y enfermedades asociadas a ésta, podrían estar relacionados con la etiología de la resistencia a insulina¹⁴. La hiperlipidemia sostenida conlleva alteraciones en las funciones celulares o incluso apoptosis¹⁵. Se han propuesto varios mecanismos, como la activación de varias kinasas del estrés que interfieren en la señalización de insulina^{14,15}.

A nivel molecular, la resistencia a insulina se caracteriza por una menor activación del receptor de insulina, el sustrato del receptor de insulina (IRS) y/u otros componentes de la vía de señalización como la proteína quinasa B (PKB o Akt)¹⁶ (figura 2).

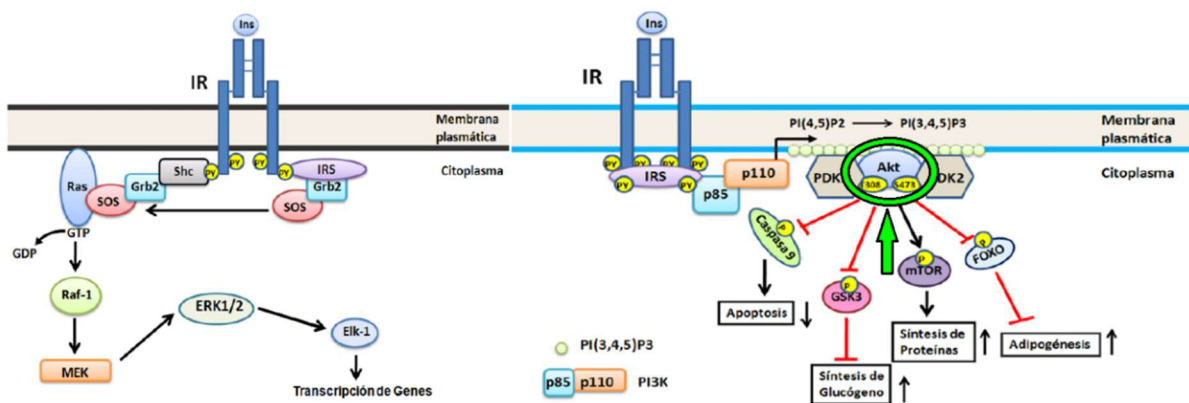


Figura 2. Señalización de insulina. Ruta de MAPK, conduce a la activación de la proliferación y supervivencia celular. Ruta de PI3K-Akt, activación de la síntesis de lípidos, proteínas y glucógeno e inhibición de la apoptosis. *Modificado de Reyes, O., Alberto, J. & Arellano Plancarte, A.*¹⁷

1.2 Mecanismos de señalización de la insulina

La absorción, procesamiento y degradación celular de insulina es un proceso complejo con múltiples rutas intracelulares. La mayoría de las evidencias apoyan a *Insulin Degrading Enzyme* (IDE) como enzima fundamental para la degradación de insulina, a pesar de que otras enzimas contribuyen en este proceso¹⁸.

El receptor de insulina es un complejo heterotetramérico bifuncional, que consiste en dos subunidades α extracelulares, unidas a dos subunidades β transmembrana, con actividad tirosina kinasa¹⁹. La unión de la insulina al receptor lleva a la autofosforilación de la tirosina del receptor y la fosforilación de sustratos citosólicos, IRS, que activan una compleja red de rutas intracelulares, incluyendo la ruta de Ras/MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) y la ruta de fosfoinositol-3-kinasa (PI3K)-Akt⁸ (figura 2).

A través de la fosforilación estos sustratos intracelulares, interaccionan con una serie de moléculas efectoras o adaptadoras que activan a PI3K y la proteína kinasa 1 dependiente de fosfoinosítido (PDK1), que conduce a la activación de Akt¹⁹.

Akt media la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina, activando la síntesis de glucógeno, proteínas y lípidos; así como la inhibición de la gluconeogénesis. Además, también juega un papel en la activación del ciclo celular, favoreciendo la supervivencia celular⁸.

Akt es uno de los integrantes centrales de la señalización por insulina, actúa como sensor de energía, disponibilidad de oxígeno y factores de crecimiento¹². La actividad de Akt es fundamental para regular el metabolismo y múltiples dianas de Akt están involucradas en la acción de la insulina⁸. Por este motivo, en este trabajo de investigación, se estudiará la fosforilación de Akt (p-Akt) en el residuo de serina 473 (S473).

1.3 Insulin Degrading Enzyme (IDE)

Estudios de asociación genética en humanos y modelos animales sugieren que IDE posee un papel importante en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo II²⁰. La disfunción de esta enzima se ha visto ligada al desarrollo de enfermedades como diabetes tipo II y Alzheimer, lo cual la convierte en un posible nexo entre ambas²¹.

IDE es una metaloproteasa de zinc (figura 3), evolutivamente conservada, capaz de unir e inactivar varios péptidos bioactivos²². La insulina es su sustrato preferido, pero se ha visto que puede utilizar como sustrato otros péptidos como el glucagón, la amilina o el péptido β -amiloide^{21,23}. Esta enzima se expresa de manera ubicua en todos los tejidos del organismo, por lo que se ha visto implicada en varias funciones fisiológicas y fisiopatológicas²².

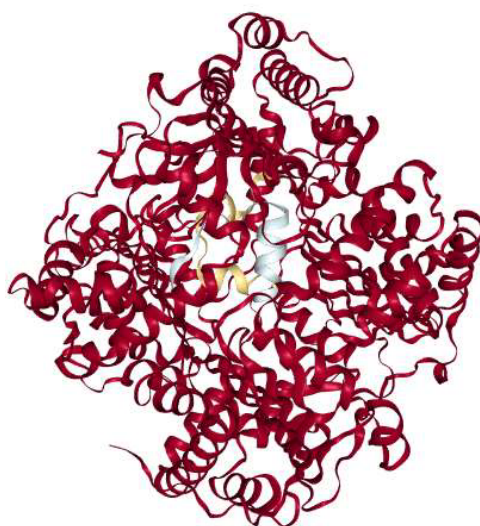


Figura 3. Estructura terciaria de IDE. Estructura terciaria de IDE, obtenida mediante cristalografía de rayos X en complejo con insulina. *Protein Data Bank (ID:2WBY)*²⁴.

Puede ser regulada por varias señales como el estrés celular o ácidos grasos y se encuentra presente en distintas localizaciones subcelulares²², siendo mayoritaria en el citosol²⁵, además de ser secretada al medio extracelular^{22,25,26}.

Posee múltiples funciones celulares además de la de degradación de insulina, entre las cuales cabría destacar sus funciones reguladoras de la actividad del receptor de esteroides, el proteasoma y la oxidación lipídica¹⁸. También controla la función de la célula β y la secreción de insulina²⁷.

1.4 Papel de IDE en el metabolismo

IDE regula la abundancia y los efectos fisiológicos de glucagón y amilina, además de los de la insulina²⁸.

Los resultados de la pérdida de actividad de IDE respecto a la disponibilidad y acción de la insulina presentan mucha controversia, en función del tipo de estudio y el modelo utilizado.

Se ha visto que al inhibir IDE en modelo celular Hep-G2 se incrementa la concentración de insulina intra- y extracelular, en consecuencia la fosforilación de Akt se ve ligeramente aumentada y la expresión de genes gluconeogénicos disminuye; lo que apunta a una activación de la ruta de señalización de insulina por vía de Akt²⁰. Su inhibición *in vivo*, en modelos roedores, resulta principalmente en un incremento de la sensibilidad a la insulina y una bajada en los niveles de glucosa sanguínea, por lo que inhibidores endógenos de IDE podrían potenciar el efecto hipoglucémico de la insulina *in vivo*²².

Sin embargo, mientras que estas investigaciones apuntan que la inhibición farmacológica de la actividad de IDE en modelos roedores provoca el aumento de los niveles de insulina en sangre²²; los ratones *knockout* para IDE se caracterizan por el fenotipo clásico de una diabetes tipo II, con hiperinsulinemia e intolerancia a glucosa²⁹. Además, polimorfismos de IDE se han asociado con la diabetes tipo II en el modelo de rata Goto-Kakizaki³⁰.

La degradación de insulina es un proceso complejo y multifactorial¹⁸. El aclaramiento de insulina tiene lugar principalmente en el hígado¹⁸, fundamentalmente por acción de IDE²¹ (figura 4). En la diabetes tipo II, el aclaramiento de insulina se ve alterado y está asociado con la resistencia a insulina y la pérdida de masa de células β ¹⁶. Estas alteraciones en el aclaramiento provocan niveles aberrantes de insulina y respuestas inapropiadas a esta u otras hormonas encargadas de regular los niveles de glucosa, y son una de las principales causas de la diabetes tipo II²².

Las investigaciones de Pivovarova y col.²⁰ indican que existe un descenso en la actividad de IDE en el hígado de sujetos con diabetes tipo II. Lo cual conlleva una reducción en la degradación hepática de insulina, marcador temprano de alteraciones en su metabolismo²³.

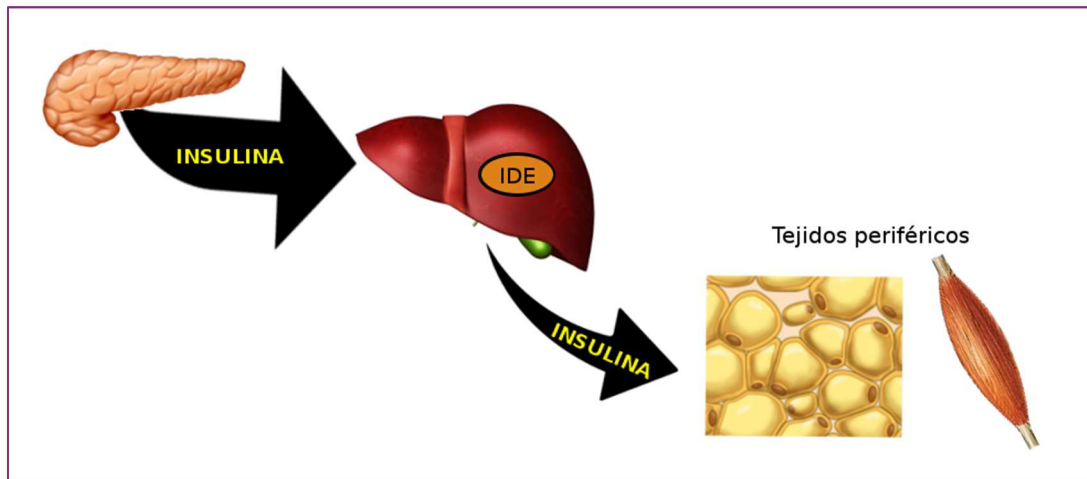


Figura 4. Aclaramiento de insulina. Aproximadamente el 50% de la insulina se elimina en el primer paso por el hígado¹⁸, antes de llegar a otros tejidos periféricos. Este porcentaje varía ampliamente bajo distintas condiciones.

La degradación de insulina ayuda a controlar la respuesta celular a la hormona disminuyendo su disponibilidad, además el proceso de degradación podría mediar parte de la actividad de la insulina, mediante la endocitosis del complejo hormona-receptor²⁵. La degradación celular y endosomal de insulina responde a moduladores de la actividad de IDE. De modo que la insulina internalizada interaccionaría con IDE¹⁸.

Dada la importancia del aclaramiento de insulina en la diabetes y el papel de IDE en su regulación, no es sorprendente que alteraciones en la expresión de esta proteína se encuentren relacionadas con el debut de la diabetes tipo II¹⁶.

Este tipo de alteraciones en su actividad o expresión se ven estrechamente relacionadas con hiperinsulinemia. Por lo que el aumento de la función de IDE se plantea como estrategia de tratamiento de estas patologías^{21,31}.

Por otro lado, la sobreproducción de IDE incrementa la degradación de insulina y reduce la eficacia de la estimulación por insulina en su ruta de señalización^{23,26}. Los resultados de las investigaciones de Kim y col.²⁵ apuntan a que la sobreexpresión de IDE se considera un factor que regula negativamente la señalización por insulina.

En contraposición, resultados de nuestro laboratorio³², obtenidos en un modelo nulo para IDE en células hepáticas, muestran que una menor expresión de IDE reduce la señalización por insulina.

1.5 Hipótesis y Objetivos

Por lo expuesto anteriormente, nuestra hipótesis de trabajo es que, en un modelo de sobreexpresión de IDE en células de hígado, ésta inducirá positivamente la señalización por insulina.

Debido al importante papel del hígado en la señalización de insulina y su efecto metabólico, el objetivo de este trabajo es comprobar si variaciones en los niveles de expresión de IDE provocan alteraciones en la señalización por insulina en una línea celular de hepatoma humano (Hep-G2). Para ello se llevará a cabo la sobreexpresión de IDE mediada por vectores adenovirales y la determinación del ratio p-Akt/Akt tras la estimulación con insulina.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales.

Tampón de lisis celular:

- Tampón de lisis 10X 100µl/ml (9803S, Cell Signaling Technology, MA, USA)
- Inhibidor de fosfatasa 2 10µl/ml (P5726, Sigma, MO, USA)
- Inhibidor de fosfatasa 3 10µl/ml (P0044, Sigma)
- *Protease Inhibitor Cocktail* (PIC) 10µl/ml (P8340, Sigma)
- Fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF) 10µl/ml (Sigma)

LSB 4x:

- Tampón Tris HCl 62,5mM; pH 6,8 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Glicerol 5% (Sigma)
- SDS 1% (Merck)
- β-mercaptoetanol 2,5% (Sigma)
- Azul de bromofenol 1,25mg/ml

Geles 10% acrilamida:

Running:

- Tampón Tris HCl 0,5M; pH 8,8 (Merck)
- SDS 0,1% (Merck)
- Acrilamida 10% (Bio-rad)
- Temed 0,06% (Bio-rad)
- APS 0,06% (Bio-rad)

Stacking:

- Tampón Tris HCl 126mM; pH6,8 (Merck)
- SDS 0,1% (Merck)
- Acrilamida 4% (Bio-rad)
- Temed 0,15% (Bio-rad)
- APS 0,05 % (Bio-rad)

Tampón de electroforesis (Bio-rad, Laboratories Inc., USA):

- Tris 25mM
- Glicina 192 mM
- 0,1% SDS

Tampón de transferencia (Bio-rad):

- Tris 25 mM
- Glicina 192 mM
- 20% de metanol (PanReac, Barcelona, España)

PBS-Tween 20 (PBS-T):

PBS 1X

- NaCl 137mM (Merck)
- KCl 2,7mM (Merck)
- KH₂PO₄ 2mM (Merck)
- Na₂HPO₄ 10mM (Merck)

Tween 20; 0,1% (v/v) (Bio-rad)

Tampón de *stripping*:

- SDS 2% (Merck)
- β-mercaptoetanol 0,7% (Sigma)
- Tampón Tris HCl 62,5mM, pH 6,8 (Merck)

Disolución de bloqueo:

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

2.2 Línea celular.

La línea celular de hepatoma humano HepG2 se cultivó en medio DMEM (11995-065 Gibco, USA), suplementado con suero bovino fetal (SBF) (Gibco) 10% (v/v) y penicilina/estreptomicina (Gibco) 1% (v/v). Se incubaron en atmósfera húmeda a 37°C al 5% de CO₂. Los experimentos de sobreexpresión se llevaron a cabo a una confluencia del 80% (figura 5).

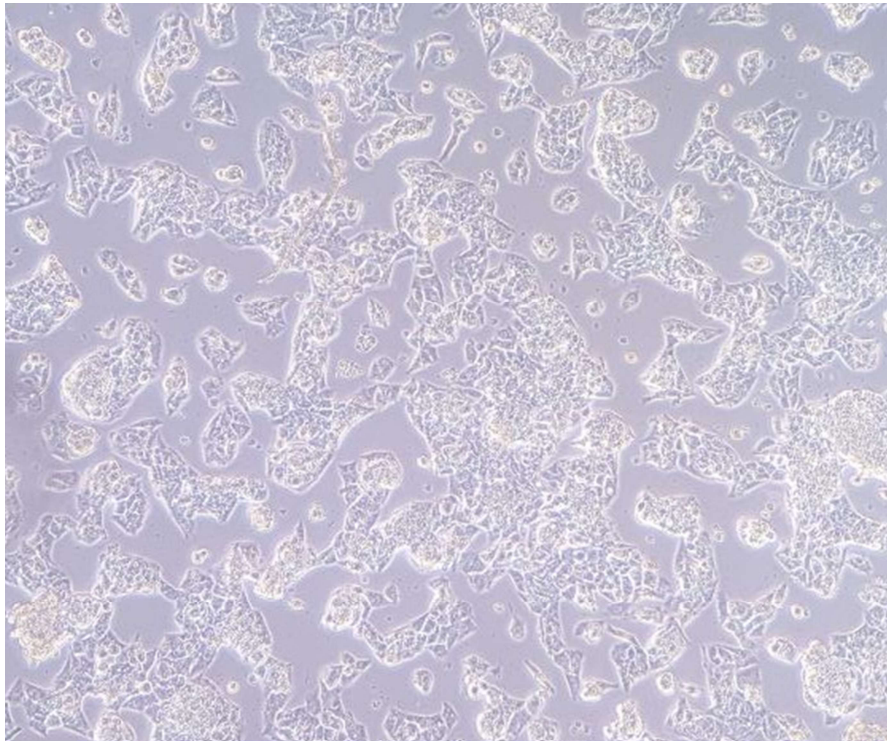


Figura 5. Imagen del cultivo en el momento de la transducción.

2.3 Sobreexpresión de IDE en línea celular Hep-G2.

Se sembraron 750.000 células por pocillo, en 2 placas de 6 pocillos, se incuban durante 24 horas en medio completo.

Pasadas las 24 horas se llevó a cabo la transducción con adenovirus null (AdNull), que no contiene cDNA, y adenovirus IDE (AdIDE), que contiene el cDNA humano que codifica para la enzima IDE. Utilizando en cada placa un pocillo como control sin virus, dos para la transducción con adenovirus null y tres para la transducción con adenovirus IDE (figura 6).

La transducción se realiza en medio sin SBF, durante 1 hora a 37°C, 5% CO₂. Finalizada esta incubación se retira el medio con virus y se incuba otras 24 horas con medio completo.

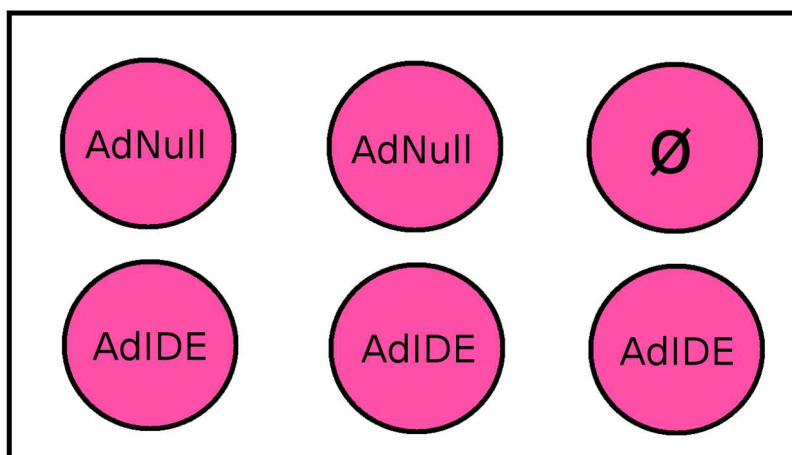


Figura 6. Esquema de la placa de cultivo para la transducción.

Para la sobrecarga con insulina es necesario mantener a las células en ayuno, para lo cual se cambia el medio completo por un medio sin SBF, para evitar la presencia de factores de crecimiento 24 horas antes de la estimulación.

Por experimento se llevan en paralelo 2 placas: una como control sin estimular y otra estimulada con insulina humana (I9278, Sigma). Se diluye insulina humana en medio DMEM sin SBF a una concentración final de 100nM y se pipetea 1ml/pocillo. Las células se estimulan durante 15 minutos a temperatura ambiente. Retirada la insulina se lava con PBS (Gibco) frío para eliminar restos de medio. Y una vez retirado el PBS, en frío, se pipetea 100µl/pocillo de tampón de lisis celular, se deja actuar durante 10 minutos y se levantan las células con ayuda de una rasqueta. Por último, se recoge el extracto en eppendorfs correctamente identificados para su procesado o congelación.

2.4 Preparación/procesado de las muestras.

Como las muestras van a ser analizadas por western-blot es necesario eliminar los restos de membranas celulares y obtener una muestra homogénea. Con este objetivo se sonicán las muestras con 3 pulsos de 10 segundos al 23% de amplitud (sonicador Vibra Cell 75115, Bioblock Scientific) y siempre enfriando la muestra entre los pulsos. Una vez sonicadas, se centrifugan a 17.135xg a 4°C y recogemos el sobrenadante.

Para cargar la misma cantidad de proteína en cada pocillo del gel de electroforesis se lleva a cabo una cuantificación de proteínas con el kit microBCA (Thermoscientific, IL, USA). Utilizando para la curva patrón albúmina de suero bovino (BSA) del mismo kit (figura 7). Se incuba durante 1 hora a 37°C en estufa de calor seco y se obtiene una lectura de absorbancia (A_{562nm}) a partir de la cual calcularemos la recta patrón y la concentración en proteína de cada una de las muestras.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	1	2	3	4	6	8	10	12	14	16	18
B	0	1	2	3	4	6	8	10	12	14	16	18
C	∅	AdNull	AdNull	AdIDE	AdIDE	AdIDE	∅ +Ins	AdNull +Ins	AdNull +Ins	AdIDE +Ins	AdIDE +Ins	AdIDE +Ins
D	∅	AdNull	AdNull	AdIDE	AdIDE	AdIDE	∅ +Ins	AdNull +Ins	AdNull +Ins	AdIDE +Ins	AdIDE +Ins	AdIDE +Ins
E												
F												
G												
H												

Figura 7. Esquema de la placa de cuantificación de proteínas. Filas A y B, concentraciones de BSA $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$. Filas C y D, muestras problema $1\mu\text{l}/100\mu\text{l}$.

Por último se añade el tampón de carga LSB (en stock 4x) en relación 1:3 (v/v) y se hierva la muestra a 100°C durante 5 minutos. Con ello conseguimos desnaturalizar las proteínas para que posteriormente sean separadas por sus pesos moleculares.

Finalizado este paso, las muestras pueden ser almacenadas a -20°C o cargadas en el gel de electroforesis.

2.5 Western-Blot.

Con los datos obtenidos de la cuantificación mencionada anteriormente, calculamos el volumen de muestra que es necesario para cargar 40 μ g de proteína de cada muestra. Se realiza una separación por electroforesis en un gel de poliacrilamida 10% a 150mV durante 1 hora.

Una vez finalizada la electroforesis se transfieren las proteínas a una membrana PVDF Immobilon-P transfer membrane (Millipore, Merck) para su detección con anticuerpos. Ya que IDE es una proteína de elevado peso molecular la transferencia se realiza a 4°C, durante toda la noche a bajo voltaje (30mV).

Para que las interacciones entre el anticuerpo y las proteínas de la membrana sean específicas es necesario bloquear la superficie de membrana en la que no haya proteínas. Con este objetivo, se incuba la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con la disolución de bloqueo.

Tras el bloqueo, incubamos con un anticuerpo primario específico de la proteína que queramos detectar. En nuestro caso son: anticuerpos de conejo anti-IDE (AB9210, Millipore), anti-p-Akt (S473) (9171S, Cell Signaling) y anti-Akt (9172S, Cell Signaling) y anticuerpo de ratón anti-actina (BD612656 BD Biosciences, USA). Los anticuerpos se diluyeron en la disolución de bloqueo al 10%, a la concentración recomendada por los proveedores (1/15.000 IDE, 1/1.000 p-Akt y Akt, 1/8.000 actina). Para IDE y actina se realiza una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, mientras que para la detección de Akt y p-Akt se incuba a 4°C durante toda la noche; con agitación en todos los casos.

A continuación, se lava para eliminar el exceso de anticuerpo que no haya quedado específicamente unido. Se realizan tres lavados en PBS-T, con agitación, durante 10 minutos.

Tras los lavados, se incuba con un anticuerpo secundario, conjugado a peroxidasa. Este anticuerpo va dirigido específicamente al primario, en el caso de actina usamos un anticuerpo anti-ratón (NA9310, GE Healthcare, UK) dilución 1/2.000 y en los casos de IDE, Akt y p-Akt un anticuerpo anti-conejo (711-035-152 Jackson Immunoresearch, USA) dilución 1/15.000. Todos ellos diluidos en disolución de bloqueo al 10%.

Éstos se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. De nuevo, se lava para eliminar los posibles restos de anticuerpo no unido, siguiendo el mismo procedimiento que para los lavados anteriores.

Por último, para detectar la presencia de nuestra proteína de interés, pipeteamos *Clarity Western ECL substrate* (Bio-rad) como sustrato de la reacción con la peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario. Se deja reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se elimina el exceso de líquido y se revela en película fotosensible en cuarto oscuro.

La detección de Akt se lleva a cabo una vez detectado p-Akt. Para ello, se somete la membrana a *stripping* durante 30 minutos a 50°C. Se eliminan los restos de tampón de *stripping* lavando tres veces con PBS-T durante 15 minutos cada lavado, a temperatura ambiente y con agitación. Finalizados estos lavados, se vuelve a bloquear, incubando durante 1 hora a temperatura ambiente con la disolución de bloqueo y se continúa el proceso hasta la detección de Akt, siguiendo el protocolo anterior.

Las imágenes obtenidas del revelado de los experimentos de western-blot fueron escaneadas y analizadas con el programa ImageJ.

2.6 Análisis estadístico.

Para la realización del análisis estadístico de los resultados se utilizó como herramienta el programa GraphPad Prism. Considerando estadísticamente significativos todos aquellos valores $p < 0,05$.

Se comprobó que estos datos se ajustaban a una distribución normal mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov. A aquellos datos que no se ajustan a una distribución normal se les aplicó un test de Kruskal-Wallis. Los que sí se ajustaban a esta distribución fueron sometidos a un ANOVA (*ANalysis Of VAriance*) y un test de Tukey como test post-hoc.

3. Resultados

Para estudiar el efecto de la expresión de IDE sobre la señalización de la insulina en células hepáticas, sobreexpresamos IDE humano en las células Hep-G2 siguiendo el protocolo que se explicó en materiales y métodos.

Primero, detectamos la expresión de IDE tras la transducción (figura 8). Como control de carga se llevó a cabo la detección de actina.

Observamos la correcta sobreexpresión de IDE en la transducción con adenovirus IDE y la ausencia de alteraciones en su expresión en la transducción con el adenovirus null.

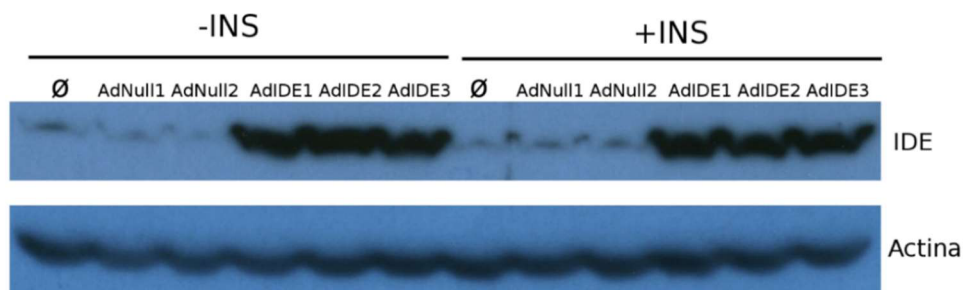


Figura 8. Expresión de IDE tras la transducción con adenovirus. Detección de IDE, y actina, para todas las muestras de un experimento: en condiciones sin estimular (-INS) y estimuladas con insulina (+INS), 1 muestra sin tratamiento viral (\emptyset), 2 muestras tratadas con adenovirus null (AdNull1 y 2) y 3 muestras tratadas con adenovirus IDE (AdIDE1, 2 y 3).

Una vez comprobado que la sobreexpresión de IDE había tenido lugar correctamente, estudiamos el grado de fosforilación de Akt en la S473, como medida de la activación de señalización de la insulina (figura 9).

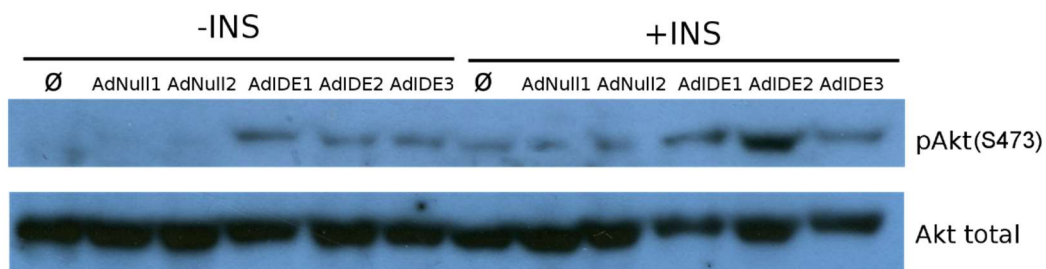


Figura 9. Western-Blot ejemplo de la fosforilación de Akt tras la estimulación con insulina. Detección de p-Akt (S473), y Akt, para todas las muestras de un experimento: en condiciones sin estimular (-INS) y estimuladas con insulina (+INS), sin tratamiento viral (\emptyset), tratadas con adenovirus null (AdNull1 y 2) y tratadas con adenovirus IDE (AdIDE1, 2 y 3).

Se observa un incremento en la fosforilación de Akt en respuesta a la estimulación con insulina, que parece mayor en aquellas muestras con sobreexpresión de IDE. Para poder analizar estos datos se cuantificó la intensidad de las bandas de p-Akt y Akt total de cada una de las muestras analizadas y se calculó el ratio p-Akt/Akt. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes por triplicado.

Inicialmente comprobamos que no existieran diferencias para el ratio p-Akt/Akt de los dos grupos control (figura 10), el grupo que no había recibido ningún tratamiento con virus (SV) y el tratado con el adenovirus null. Para lo cual se aplicó un test de Kruskal-Wallis.

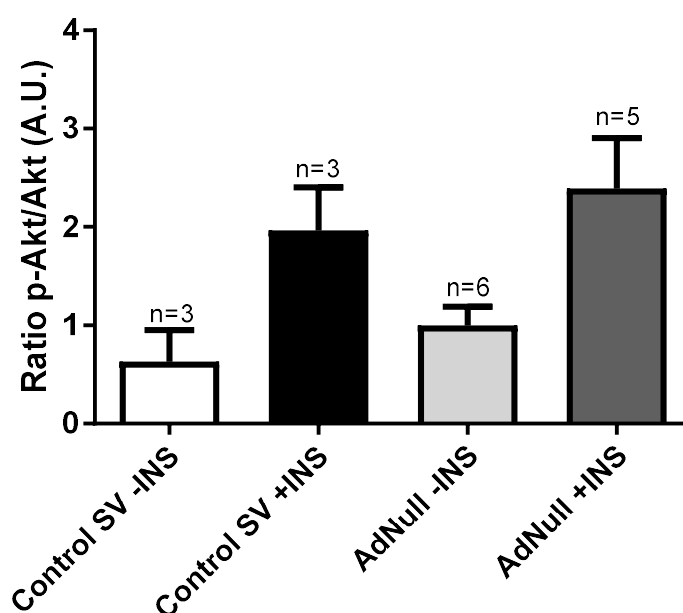


Figura 10. Señalización por insulina en células Hep-G2 sin transducir y transducidas con AdNull. La gráfica representa el valor promedio \pm sem. n=nº de la muestra. No existen diferencias significativas entre estos grupos.

Tras comprobar que no existían diferencias significativas entre ambos grupos, ambos han sido incluidos en un grupo que hemos denominado “control”. Estos valores control se enfrentaron a los valores del ratio p-Akt/Akt obtenidos tras la sobreexpresión de IDE (figura 11).

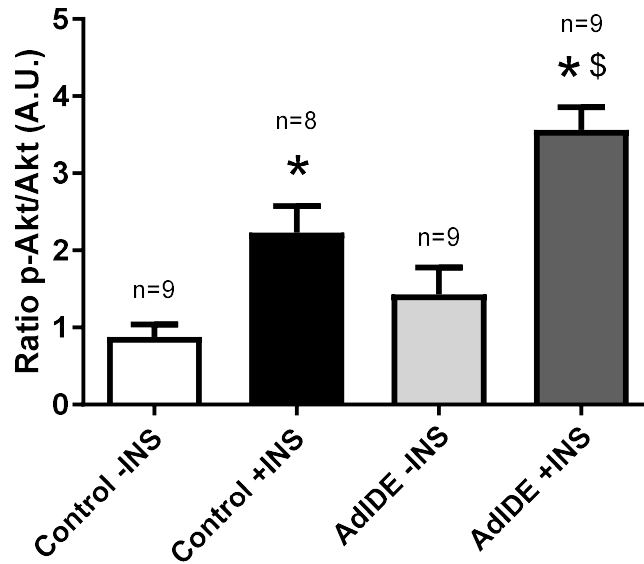


Figura 11. Señalización por insulina en células Hep-G2 que sobreexpresan IDE.
 * p valor<0,05 frente a su respectivo control sin estimular con insulina (-INS).
 \$ p valor<0,05 frente a Control +INS. La gráfica representa el valor promedio \pm sem.
 n=n° de la muestra.

Del análisis estadístico de estos experimentos se confirmó que la distribución de todas las muestras se ajusta a una normal, y que tanto las diferencias en niveles de fosforilación de Akt debidas a la estimulación con insulina, como las asociadas a la sobreexpresión de IDE, bajo condiciones de estimulación con insulina, son estadísticamente significativas.

Observando la gráfica podemos comprobar que tanto bajo la condición experimental de sobreexpresión de IDE, como bajo condiciones control (con y sin tratamiento viral), la estimulación con insulina provoca un incremento significativo en la fosforilación de Akt, secundario a la activación del receptor. Además, bajo condiciones de estimulación con insulina encontramos un 60% de aumento significativo entre la activación del receptor en condiciones de sobreexpresión de IDE respecto al control, lo que indica una mayor activación de la señalización por insulina.

4. Discusión

La diabetes tipo II es una enfermedad que se asocia a factores de riesgo como edad avanzada y obesidad²⁷. La actividad de IDE se ve reducida con la edad e inhibida por ácidos grasos de cadena larga, lo que la convierte en una diana de estudio importante en la etiología de esta enfermedad.

La mayoría de los estudios sobre el papel de IDE en diabetes se centran en su función catalítica de degradar insulina y en el aclaramiento de esta hormona^{22,26,28}. Este estudio busca un nuevo enfoque para entender si IDE tiene un papel en la señalización de insulina independiente de su papel catalítico en la degradación de dicha hormona. Inspirado principalmente por datos de nuestro laboratorio, los cuales muestran que en modelo animal de deficiencia hepática de IDE (*knockout* específico de tejido) no se ve afectado el aclaramiento de insulina, pero sí se observa un fenotipo de intolerancia a glucosa y resistencia a insulina, asociado a una afectación de la señalización hormonal, que se ve reducida, así como la disponibilidad del receptor de insulina³².

Esto nos lleva a pensar que, en lugar de como se creía hasta ahora, el papel de IDE podría no influir únicamente en el aclaramiento de insulina, sino que además podría regular su señalización.

Inicialmente se decidió llevar a cabo la sobreexpresión de IDE en una línea celular de hepatoma, Hep-G2, sobre los cuales se realizaron experimentos de estimulación con insulina. Los resultados de estos experimentos demuestran que la sobreexpresión de IDE incrementa la señalización a través del receptor de insulina tras la estimulación con insulina. Y concuerdan perfectamente con los previamente observados por Villa-Pérez y col.³² en nuestro laboratorio.

Como se ha mencionado anteriormente, en el modelo animal de deficiencia hepática de IDE se observa también una disminución en la disponibilidad del receptor de insulina, es decir, hay menos receptor presente en membrana. Por esto, en un futuro se quiere comprobar también si en el caso de la sobreexpresión de IDE en células hepáticas se observa el efecto contrario, es decir, un incremento en el receptor de insulina. Y llevar a cabo experimentos confirmatorios *in vivo*, con modelos animales que presenten ganancia de función de IDE.

A falta de confirmar estos resultados, podríamos pensar que IDE colabora en el reciclado del receptor de insulina, favoreciendo su regreso a membrana y permitiendo que vuelva a ser estimulado. Esto supondría un papel regulador en el tráfico de vesículas, que encajaría con el efecto observado en células β pancreáticas en las que la deficiencia de IDE se ve asociada a defectos en la secreción de insulina debidos aparentemente a la afectación del tráfico celular²⁷.

Lo que indicaría que en el modelo de ratón *knockout* global de IDE la disminución del receptor de insulina debida a la hiperinsulinemia²⁹, podría en realidad ser debida a la deficiencia de IDE, en la cual la hiperinsulinemia sería un efecto compensatorio a la resistencia a la hormona. Además, dado el elevado número de funciones asociadas a IDE y a su dependencia del tipo celular en que la encontremos, un *knockout* o una inhibición global podría generar un fenotipo inespecífico, dando lugar a resultados artefactuales.

Teniendo en cuenta la relación propuesta en los últimos años entre la enfermedad de Alzheimer y la diabetes tipo II^{22,23,26}, de la cual se han llegado a aportar datos como que el hecho de padecer diabetes tipo II implica un incremento del 65% en el riesgo de desarrollar Alzheimer¹². Y habiéndose observado además, que defectos en la expresión y la actividad de IDE se ven asociados a la enfermedad de Alzheimer^{12,26}. No debería resultar extraño el hecho de que las alteraciones de esta enzima en ambas enfermedades se produzcan en un mismo sentido, es decir, en ambos casos sean alteraciones que conllevan un efecto de pérdida de función de IDE. Y no al contrario, como se proponía por algunos autores, siendo una inhibición de IDE el tratamiento propuesto para la diabetes tipo II²² y una activación el propuesto para tratar la enfermedad de Alzheimer²⁶. Asumiendo, por lo tanto, que las alteraciones en ambas enfermedades eran opuestas.

Al contrario de lo que se deducía de estudios anteriores^{18,22,26}, el incremento mostrado en nuestro estudio en la señalización de insulina bajo condiciones de sobreexpresión de IDE, propone la activación de IDE como posible diana terapéutica para la diabetes tipo II. Esta discrepancia respecto a estudios previos podría estar en las diferencias existentes entre un modelo *in vitro* con un tipo celular concreto (hepatocitos) y un modelo animal *in vivo* de *knockout* global²⁹. Junto con las diferencias entre una inhibición farmacológica²², transitoria y un modelo *knockout* crónico tejido-específico³².

5. Conclusiones

La sobreexpresión de IDE en la línea celular de hepatoma Hep-G2 activa la señalización por insulina, incrementando la fosforilación de Akt.

Estos datos sugieren que un aumento en la expresión o actividad de IDE en las células hepáticas podría ser una diana terapéutica para el tratamiento de la resistencia insulínica.

6. Bibliografía

1. Control, C. for D., Prevention & others. National diabetes statistics report: estimates of diabetes and its burden in the United States, 2014. *Atlanta GA US Dep. Health Hum. Serv.* **2014**, (2014).
2. Association, A. D. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **33**, S62–S69 (2010).
3. Mehmood, Y., Al-Swailmi, F. K. & Al-Enazi, S. A. Frequency of obesity and comorbidities in medical students. *Pak. J. Med. Sci.* **32**, 1528–1532 (2016).
4. Soriguer, F. *et al.* Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* **55**, 88–93 (2012).
5. Li, C. *et al.* Effect of probiotics on metabolic profiles in type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Medicine (Baltimore)* **95**, e4088 (2016).
6. Racicka, E. & Bryńska, A. Eating Disorders in children and adolescents with Type 1 and Type 2 Diabetes: prevalence, risk factors, warning signs. *Psychiatr. Pol.* **49**, 1017–1024 (2015).
7. Hipp, J. A. & Chalise, N. Spatial analysis and correlates of county-level diabetes prevalence, 2009-2010. *Prev. Chronic. Dis.* **12**, E08 (2015).
8. Chettouh, H., Lequoy, M., Fartoux, L., Vigouroux, C. & Desbois-Mouthon, C. Hyperinsulinaemia and insulin signalling in the pathogenesis and the clinical course of hepatocellular carcinoma. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **35**, 2203–2217 (2015).
9. Jourdan, T. *et al.* Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nat. Med.* **19**, 1132–1140 (2013).
10. Kahn, S. E., Cooper, M. E. & Del Prato, S. PATHOPHYSIOLOGY AND TREATMENT OF TYPE 2 DIABETES: PERSPECTIVES ON THE PAST, PRESENT AND FUTURE. *Lancet* **383**, 1068–1083 (2014).

11. Lajara, R., Aguilar, R., Hehnke, U., Woerle, H.-J. & von Eynatten, M. Efficacy and safety of linagliptin in subjects with long-standing type 2 diabetes mellitus (>10 years): evidence from pooled data of randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trials. *Clin. Ther.* **36**, 1595–1605 (2014).
12. Diehl, T., Mullins, R. & Kapogiannis, D. Insulin resistance in Alzheimer's disease. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **183**, 26–40 (2017).
13. Chen, W., Balland, E. & Cowley, M. A. Hypothalamic Insulin Resistance in Obesity: Effects on Glucose Homeostasis. *Neuroendocrinology* **104**, 364–381 (2017).
14. Martins, A. R. *et al.* Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis.* **11**, 30 (2012).
15. Csala, M. [Hyper-free fatty acidemia - insulin resistance and β -cell death]. *Orv. Hetil.* **157**, 733–739 (2016).
16. Costa-Júnior, J. M. *et al.* Endurance training inhibits insulin clearance and IDE expression in Swiss mice. *PLoS One* **10**, e0118809 (2015).
17. Reyes, O., Alberto, J. & Arellano Plancarte, A. Bases Moleculares de las Acciones de la Insulina. *REB Rev. Educ. Bioquímica* **27**, 9–18 (2008).
18. Duckworth, W. C., Bennett, R. G. & Hamel, F. G. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr. Rev.* **19**, 608–624 (1998).
19. Chang, L., Chiang, S.-H. & Saltiel, A. R. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol. Med. Camb. Mass* **10**, 65–71 (2004).
20. Pivovarova, O. *et al.* Modulation of insulin degrading enzyme activity and liver cell proliferation. *Cell Cycle Georget. Tex* **14**, 2293–2300 (2015).
21. Kurauti, M. A. *et al.* Interleukin-6 increases the expression and activity of insulin-degrading enzyme. *Sci. Rep.* **7**, 46750 (2017).
22. Tang, W.-J. Targeting Insulin-Degrading Enzyme to Treat Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **27**, 24–34 (2016).

23. Pivovarova, O., Gögebakan, O., Pfeiffer, A. F. H. & Rudovich, N. Glucose inhibits the insulin-induced activation of the insulin-degrading enzyme in HepG2 cells. *Diabetologia* **52**, 1656–1664 (2009).
24. Manolopoulou, M., Guo, Q., Malito, E., Schilling, A. B. & Tang, W.-J. Molecular basis of catalytic chamber-assisted unfolding and cleavage of human insulin by human insulin-degrading enzyme. *J. Biol. Chem.* **284**, 14177–14188 (2009).
25. Kim, M. S. *et al.* Overexpression of Insulin Degrading Enzyme could Greatly Contribute to Insulin Down-regulation Induced by Short-Term Swimming Exercise. *Lab. Anim. Res.* **27**, 29–36 (2011).
26. Pivovarova, O., Höhn, A., Grune, T., Pfeiffer, A. F. H. & Rudovich, N. Insulin-degrading enzyme: new therapeutic target for diabetes and Alzheimer's disease? *Ann. Med.* **48**, 614–624 (2016).
27. Steneberg, P. *et al.* The type 2 diabetes-associated gene *ide* is required for insulin secretion and suppression of α -synuclein levels in β -cells. *Diabetes* **62**, 2004–2014 (2013).
28. Maianti, J. P. *et al.* Anti-diabetic activity of insulin-degrading enzyme inhibitors mediated by multiple hormones. *Nature* **511**, 94–98 (2014).
29. Abdul-Hay, S. O. *et al.* Deletion of insulin-degrading enzyme elicits antipodal, age-dependent effects on glucose and insulin tolerance. *PLoS One* **6**, e20818 (2011).
30. Fakhrai-Rad, H. *et al.* Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2149–2158 (2000).
31. Wei, X. *et al.* Regulation of insulin degrading enzyme activity by obesity-associated factors and pioglitazone in liver of diet-induced obese mice. *PLoS One* **9**, e95399 (2014).
32. Villa-Perez, P., Ciudad, P., Lobaton, C.D., Moreno, A., Leissring, M., Cozar-Castellano, I., Perdomo, G. Liver-specific ablation of insulin-degrading enzyme causes hepatic insulin resistance and glucose intolerance, without effect on insulin clearance in mice. *Diabetologia* **60**, Issue 1 Suppl, A-17-1481 (2017).