



**FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular y Fisiología**

**TRABAJO FIN DE GRADO DE MEDICINA**  
***Estudio del papel de Insulin Degrading  
Enzyme (IDE) en diabetes mellitus***

*Autores:* Sara Fernández Luis  
Blanca Heras Pozas

*Tutor:* Dr. Irene Cózar Castellano  
*Convocatoria:* Junio 2016

# ÍNDICE

---

Resumen .....	2
Introducción .....	3
• Diabetes mellitus e insulina.....	3
• <i>Insulin degrading enzyme</i> (IDE) .....	4
Hipótesis y Objetivos .....	6
Materiales y Métodos .....	7
• Características de las poblaciones a estudio y obtención de muestras .....	7
• Tinción de páncreas de ratón y obtención de imágenes .....	8
• Contaje celular .....	9
• Análisis estadístico.....	9
Resultados .....	10
• Estudio de la población de células $\beta$ pancreáticas.....	10
• Estudio de la expresión de la proteína IDE .....	12
Discusión.....	16
Conclusiones.....	19
Referencias bibliográficas .....	20
Póster.....	22

## RESUMEN

---

La diabetes mellitus (DM) es según la OMS una de las pandemias de nuestro siglo. Es urgente la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para la mejora del tratamiento de esta enfermedad y sus complicaciones. *Insulin degrading enzyme* (IDE) es una proteína ubicua que degrada insulina en el citosol celular y cuyo gen ha sido vinculado a la susceptibilidad de sufrir DM2.

En este estudio nos centramos en la expresión de IDE en páncreas de ratones diabéticos db/db (mutados para el gen del receptor de leptina, modelo de diabetes mellitus tipo 2) y de ratones control, en edades de 12 semanas (estado hiperinsulinémico compensado) y 26 semanas (diabetes instaurada). Se aplicaron tres tinciones distintas (DAPI, insulina e IDE) para el estudio histológico de cortes de páncreas de estos ratones. Posteriormente se realizó el conteo celular y el estudio estadístico.

En primer lugar hemos observado que en islotes pancreáticos de ratones db/db es menor el porcentaje de células  $\beta$ , hay menor cantidad de insulina y existe desorganización celular. En segundo lugar hemos procedido al estudio de la expresión de IDE, en el que hemos encontrado que esta aumenta su expresión en las células del islote de los ratones db/db y que además lo hace a expensas de aumentar su expresión en células  $\beta$  pancreáticas. Dentro del grupo de ratones db/db de 26 semanas teníamos un grupo de ratones db/db “compensadores” que no desarrollaban diabetes, los resultados de porcentaje celular en el islote y la expresión de IDE se asemejan a los ratones control de 26 semanas.

Nuestros resultados nos indican que IDE tiene relevancia en la patogenia de la diabetes y que podría ser una diana terapéutica o un biomarcador de esta enfermedad.

# INTRODUCCIÓN

---

## - Diabetes mellitus e insulina

La diabetes mellitus (DM) es un síndrome endocrino metabólico caracterizado por hiperglucemia e intolerancia a la glucosa debido a una falta de insulina y/o a una deficiencia de acción de la misma, que comprende a un conjunto heterogéneo de trastornos. La etiopatogenia de la diabetes se basa en el desarreglo de los sistemas de regulación de almacenamiento y movilización de los combustibles del metabolismo [1].

Las dos formas más comunes de diabetes son la DM tipo 1 por disminución en la producción de insulina por destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas (mediante mecanismos autoinmunes e idiopáticos) y la DM tipo 2 que se origina por una resistencia insulínica periférica (respuesta dañada de insulina y células  $\beta$  pancreáticas), siendo esta última la causa más frecuente de diabetes (85-95%) [2].

La diabetes es una patología crónica de gran morbimortalidad que preocupa cada vez más por su gran aumento en incidencia y prevalencia en todo el mundo, llegando a ser considerada por la OMS como la pandemia del siglo XXI.

En España, la prevalencia de DM es prácticamente del 14%, de las personas afectadas aproximadamente la mitad desconocen que la padecen. La prevalencia de diabetes y alteraciones de la regulación de glucosa aumenta significativamente con la edad y es más elevada en hombres [3].

Hasta el momento no existe ningún tratamiento curativo, basándose su terapia en el control de la glucemia. Por ello se han abierto muchas vías de investigación para poder encontrar la ansiada y definitiva cura de la diabetes.

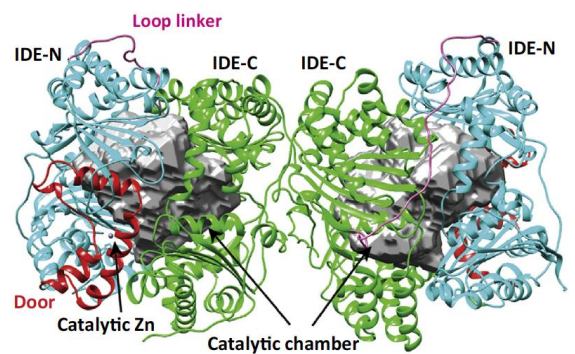
Una de las líneas más potentes de investigación sobre diabetes se encuentra en el estudio del metabolismo de la insulina. La insulina producida en las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos tiene funciones pleiotrópicas, incluida la regulación del metabolismo de glúcidos, lípidos y aminoácidos [4]. La DM tipo 2 comienza siendo un fenómeno de resistencia insulínica periférica, que en su evolución provoca una compensación de las células  $\beta$  pancreáticas. La disfunción de estas células, junto a una activación de su muerte celular, acaba produciendo el debut de diabetes franca.

En este estudio nosotros proponemos estudiar una proteína involucrada en la degradación de la insulina, conocida como *insulin degrading enzyme* (IDE), cuya función en la célula  $\beta$  es desconocida.

## - *Insulin Degrading Enzyme* (IDE)

Hasta hace poco tiempo se entendía que la degradación de insulina era un mecanismo pasivo y no se asociaba a la regulación de su metabolismo. Recientes hallazgos han demostrado que esto no es así, el metabolismo y la degradación están estrechamente regulados. Alteraciones en la pérdida de la homeostasis de la insulina se asocian a enfermedades como la DM tipo 2. Una enzima con gran implicación en este proceso es la *insulin degrading enzyme* (IDE) o enzima degradadora de insulina.

IDE es una metaloproteasa de zinc estructuralmente conservada (Figura 1), de localización ubicua en el organismo que degrada e inactiva varios péptidos bioactivos como insulina, glucagón, amilina y péptido  $\beta$ -amiloide, previniendo la formación de agregados peptídicos en los compartimentos subcelulares. IDE se expresa en todos los tejidos y sus niveles pueden ser modulados por múltiples señales (estrés, insulina, glucagón, ácidos grasos...). Existen varios subtipos específicos de IDE que muestran diferentes afinidades según el sustrato [4].



**Figura 1.** Estructura dimérica de IDE [4].

Defectos en IDE se han visto asociados al desarrollo de enfermedades tan relevantes como Alzheimer y DM tipo 2. Hay varias publicaciones que estudian IDE como una posible diana terapéutica contra el Alzheimer [5]. También se ha estudiado la función de IDE en hígado (órgano donde se ha visto mayor aclaramiento de insulina por sobreexpresión de IDE) [6]. No obstante, son pocas las publicaciones que se han hecho a día de hoy para dilucidar el papel de IDE en el islote pancreático. De hecho, su papel en la regulación de la homeostasis de glucosa es controvertida y hay pocos estudios llevados a cabo sobre este tema [7, 8, 9, 10, 11].

Por un lado se ha visto IDE como una posible diana terapéutica. Una de las primeras teorías que surgieron en relación a IDE fue que su inhibición podría llevar a aumentar la vida media de insulina circundante, y de este modo ser beneficioso en el tratamiento de la diabetes con el fin de aumentar la captación de glucosa [7]. Esta teoría está en contradicho: existen publicaciones que muestran que al reducir la actividad de IDE aparece un fenotipo diabético [8, 9]. De hecho, estudios recientes han mostrado que ratones *knock out* para IDE tienen disminuida la capacidad de secreción de insulina, debido a un fallo en el recambio de los gránulos de insulina en las células  $\beta$  [10]. Por

otro lado, otros estudios han visto que la sobreexpresión de IDE en hígado se asocia a una disminución en la eficiencia de la vía de señalización de la insulina [11].

Hay que añadir que el locus genético que contiene el gen de IDE también se ha asociado a una mayor susceptibilidad de padecer diabetes [12].

Debido a la incertidumbre sobre el verdadero papel de IDE en la diabetes y como potencial diana terapéutica en el tratamiento de la misma, es necesario llevar a cabo nuevos estudios que ayuden a esclarecer su función.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

## - Hipótesis

- La expresión de IDE está aumentada en los islotes pancreáticos de ratones hiperinsulinémicos e hiperglucémicos db/db respecto a una población de ratones control.

## - Objetivos

- Caracterizar la proporción de células  $\beta$  pancreáticas en los islotes pancreáticos de los ratones db/db respecto al control.
- Comparar la expresión de IDE en los islotes pancreáticos de ratones db/db y control.
- Estudiar la expresión de IDE en los distintos tipos celulares del islote pancreático en ratones db/db y control.
- Estudiar la expresión de IDE en el páncreas de ratones db/db “compensadores”, subpoblación de ratones db/db que no desarrollan diabetes.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## - Características de las poblaciones a estudio y obtención de muestras

Las muestras utilizadas proceden de una colonia de ratones del animalario de la Universidad de Cádiz. Estos ratones poseían una mutación homocigota en el receptor de la leptina que les hacía nulos para la misma (fueron llamados  $Lepr^{db/db}$ , de aquí en adelante ratones db/db). La ausencia de receptor de leptina produce polifagia en estos animales, que se hacen obesos desde una edad temprana, además de desarrollar resistencia insulínica y diabetes.

Según la caracterización de estos ratones (llevada a cabo en el laboratorio de la Dra. Cózar), en la semana 6 de vida comienzan un estado hiperglucémico y a partir de la semana 9 desarrollan diabetes franca. Desde la semana 4 hasta la 16 mantienen un estado de hiperinsulinemia. Por lo tanto, son buenos modelos preclínicos de DM tipo 2 [13].

Además se ha empleado una colonia de ratones compensadores (de ahora en adelante db/db-COMP), se trata de ratones db/db que no llegan a desarrollar diabetes, sino que se mantienen constantemente con resistencia insulínica compensadora.

Los ratones empleados como controles (WT) carecían de mutación en el receptor de leptina.

El páncreas fue obtenido posteutanasia con CO<sub>2</sub>. El tejido se fijó en 10% de formalina y posteriormente se incluyó en parafina. Los bloques de parafina fueron seccionados en cortes de 5µm utilizando un microtomo. Estos cortes son los que se procedieron a teñir en nuestro estudio.

Para este estudio dispusimos de una colonia de ratones adultos (12 semanas: hiperinsulinémicos e hiperglucémicos) y de ratones envejecidos (26 semanas: hiperglucémicos). Dispusimos de 13 muestras de páncreas de ratones WT de 12 semanas de edad y 10 de ratones db/db de la misma edad. A su vez, dispusimos de 7 muestras de páncreas de ratones WT, 10 muestras de ratones db/db y 4 de ratones db/db-COMP, todos ellos de 26 semanas de edad.

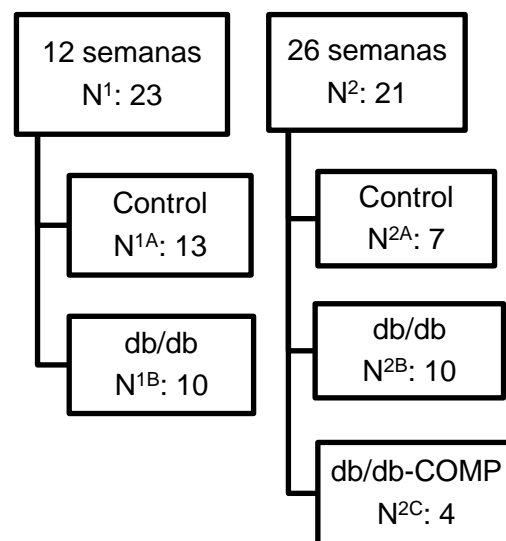


Figura 2. Distribución de muestras.



## - Tinción de páncreas de ratón y obtención de imágenes

Los cortes de páncreas de ratón fueron marcados con anticuerpos anti-insulina (verde), anti-IDE (rojo) y DAPI (marcaje azul de los ácidos nucleicos para detectar los núcleos).

El protocolo de marcaje IDE/insulina en secciones de páncreas fue como se describe: se eliminó la parafina de los portas sumergiéndolos en una batería de alcoholes comenzando con xilol absoluto (15 minutos) y posteriormente en alcoholes de concentraciones decrecientes (100%, 95%, 80% y 70%) durante 10 minutos en cada uno.

Se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS 1x (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) previamente al desenmascaramiento de los antígenos con citrato sódico (10mM ácido cítrico - pH6) en un hervidor de vapor a máxima potencia durante 20 minutos. Tras el hervidor se dejaron atemperar los portas y se realizaron otros 3 lavados con PBS 1x de 5 minutos cada uno.

Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, se añadieron 100µl/porta de una disolución de bloqueo (PBS 1x, 2% NGS, 1% BSA) y se incubó durante 1 hora en una cámara húmeda a temperatura ambiente.

El anticuerpo primario diluido en la disolución de bloqueo fue incubado durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C. Los anticuerpos empleados y sus concentraciones se describen en la Tabla 1.

Al día siguiente se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1x y se bloqueó durante 10 minutos con disolución de bloqueo a temperatura ambiente.

A continuación se incubó con anticuerpo secundario en disolución de bloqueo en cámara húmeda en oscuridad durante 30 minutos. Los anticuerpos secundarios son complementarios a los primarios según se especifica en la Tabla 1.

Anticuerpos primarios					Anticuerpos secundarios		
Anticuerpo	Dilución	Especie	Casa comercial		Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
Anti-insulina	1:2000	Ratón	SIGMA	⇒	Alexa 488 anti-ratón	1:200	Invitrogen
Anti-IDE	1:2000	Conejo	Millipore	⇒	Alexa 594 anti-conejo	1:300	Invitrogen

**Tabla 1.** Anticuerpos primarios y secundarios para inmunofluorescencia.

Finalmente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1x y se montó la preparación con una gota (15µl/porta) de DAFCO+DAPI (medio de montaje con

marcador nuclear) a una dilución 1:1000, protegiéndose con un cubreobjetos. Las muestras fueron guardadas en oscuridad a 4°C hasta el momento de sacar las fotografías.

Las imágenes de todos los islotes pancreáticos de cada corte fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia NIKON Eclipse 90i asociado con cámara CCD marca NIKON, modelo DSRi1, con un objetivo 20X. Las imágenes fueron visualizadas con los filtros necesarios para obtener las imágenes de insulina, IDE y DAPI.

### **- Contaje celular**

El análisis de las imágenes de islotes pancreáticos se realizó con el programa informático *ImageJ* (NIH, EEUU). Este programa permite superponer imágenes de los distintos tipos de marcajes del mismo corte de islote para llevar a cabo un eficaz recuento de células.

Se contaron las células  $\beta$  pancreáticas (todas las células insulina POSITIVO), células no  $\beta$  pancreáticas (células no insulina POSITIVO en el islote pancreático) y células IDE en islote pancreático (en insulina POSITIVO y NO POSITIVO).

### **- Análisis estadístico**

Para analizar los datos recogidos se ha empleado el programa *Microsoft Excell*, distinguiéndose los datos de 12 y 26 semanas. Dentro de cada una de las edades se representaron los datos de los ratones db/db respecto a los WT, no haciendo distinción entre machos y hembras.

En el análisis estadístico se ha utilizado el test de la t Student cuando se comparaban dos condiciones, y el test de Kruskal-Wallis (prueba de análisis de varianza no paramétrica, one-way ANOVA) cuando había más de dos condiciones a comparar. Los datos se expresaron como media  $\pm$  SEM, siendo significativo cuando  $p < 0,05$ .

Las gráficas y los test estadísticos fueron llevados a cabo con el programa *GraphPad*.

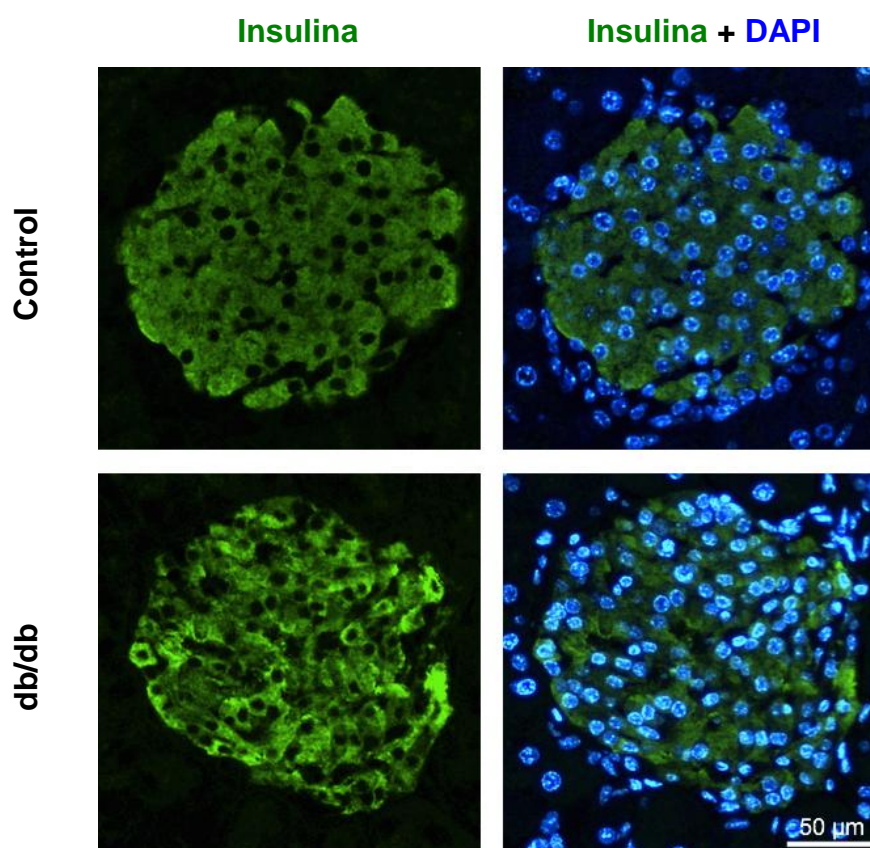
## RESULTADOS

---

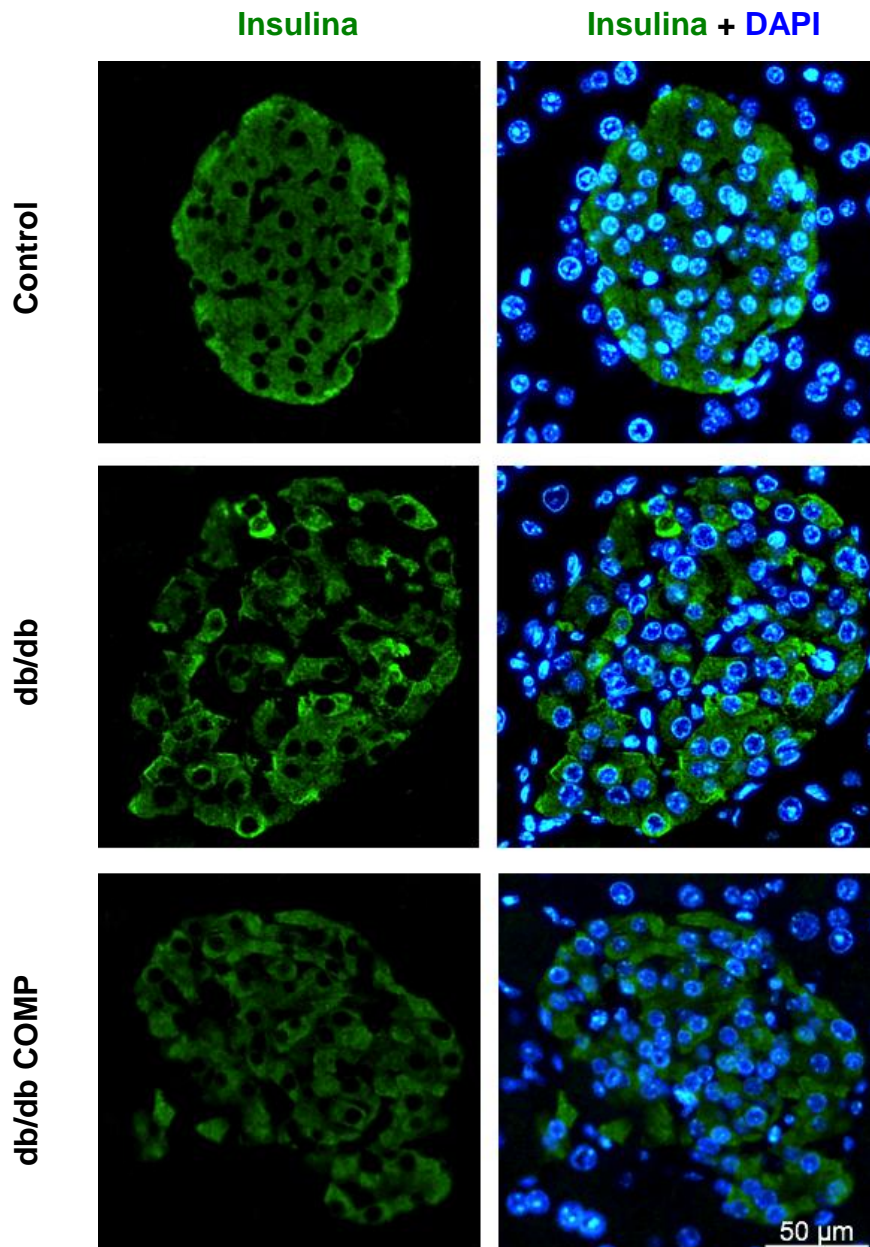
### - Estudio de la población de células $\beta$ pancreáticas

El porcentaje de células  $\beta$  pancreáticas es una medida del estado funcional del páncreas endocrino. Para caracterizar el porcentaje de la población de células insulino positivas del islote en los distintos grupos de estudio, se llevó a cabo un recuento a partir del marcaje para insulina (Figuras 3 y 4).

Desde un enfoque cualitativo, cabe destacar que las tinciones de insulina hechas sobre páncreas de ratones control (WT) se caracterizaron por ser compactos, redondeados, uniformes y adquirir un marcaje insulino positivo de mayor intensidad, mientras que los islotes de los ratones db/db presentaron características más desestructuradas y una expresión de insulina más heterogénea, de menor intensidad y de características más difusas (ver fotos representativas en Figuras 3 y 4). Dentro de los distintos grupos, esta desestructuración y pérdida de intensidad de la tinción fue más patente en los animales de 26 semanas (envejecidos).



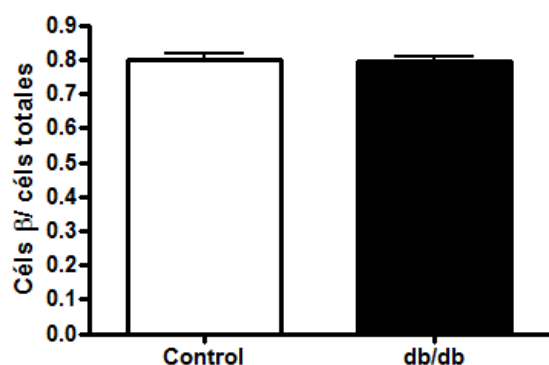
**Figura 3.** Imágenes representativas de los islotes de cada subgrupo de estudio de los animales de 12 semanas al microscopio de fluorescencia. Marcaje citoplasmático verde: insulina. Tinción nuclear azul: DAPI.



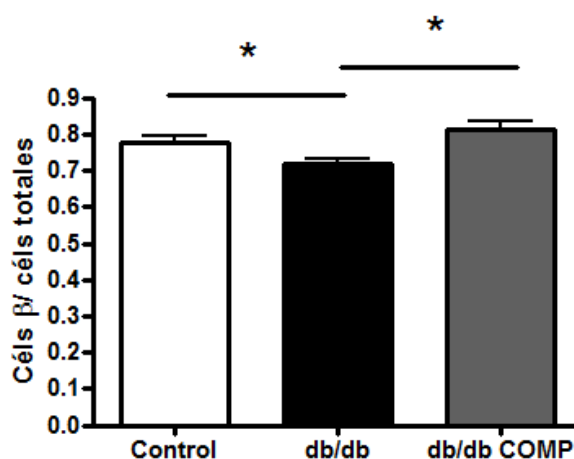
**Figura 4.** Imágenes representativas de los islotes de cada subgrupo de estudio de los animales de 26 semanas al microscopio de fluorescencia. Marcaje citoplasmático verde: insulina. Tinción nuclear azul: DAPI.

En los animales de 12 semanas no se vieron diferencias significativas en cuanto al número de células  $\beta$  pancreáticas entre los animales control y los db/db (Figura 5).

No obstante, en los animales de 26 semanas sí se observaron diferencias significativas en el número de células  $\beta$  pancreáticas por islote: fue significativamente menor en las muestras procedentes de animales db/db (72%) que en animales WT (78%), también hubo diferencias significativas entre las muestras de animales db/db “compensadores” y animales db/db (Figura 6). En este caso vimos que el porcentaje de células  $\beta$  de los db/db “compensadores” se asemejaba a los valores mostrados en los páncreas WT.



**Figura 5.** Ratio de células β por islote de páncreas de animales de 12 semanas en muestras de animales control y animales db/db.



**Figura 6.** Ratio de células β por islote de páncreas de animales de 26 semanas en muestras de animales control, db/db y db/db “compensadores” (db/db COMP). \*p<0.05 (significativo)

### - Estudio de la expresión de la proteína IDE

La expresión de la proteína IDE en el islote fue evaluada mediante el marcaje IDE, insulina y DAPI (Figuras 7 y 8). De este modo comparamos su expresión por grupos de población (control, db/db y db/db “compensadores”) y por ubicación dentro del islote (células totales, células β pancreáticas, células no-β pancreáticas).

Descriptivamente, las células IDE positivas se distribuyeron mayoritariamente en la periferia del islote en células no-β en ratones control, a diferencia de la expresión de IDE positiva en ratones db/db que se localizó de manera más dispersa por todo el islote (Figuras 7 y 8).

Al analizar las muestras de los animales de 12 semanas, vimos en el **islote total** una expresión aumentada de IDE en los animales db/db (5.1%) respecto a los WT (3.8%), diferencias que no llegaron a ser significativas ( $p=0.08$ ) (Figura 9).

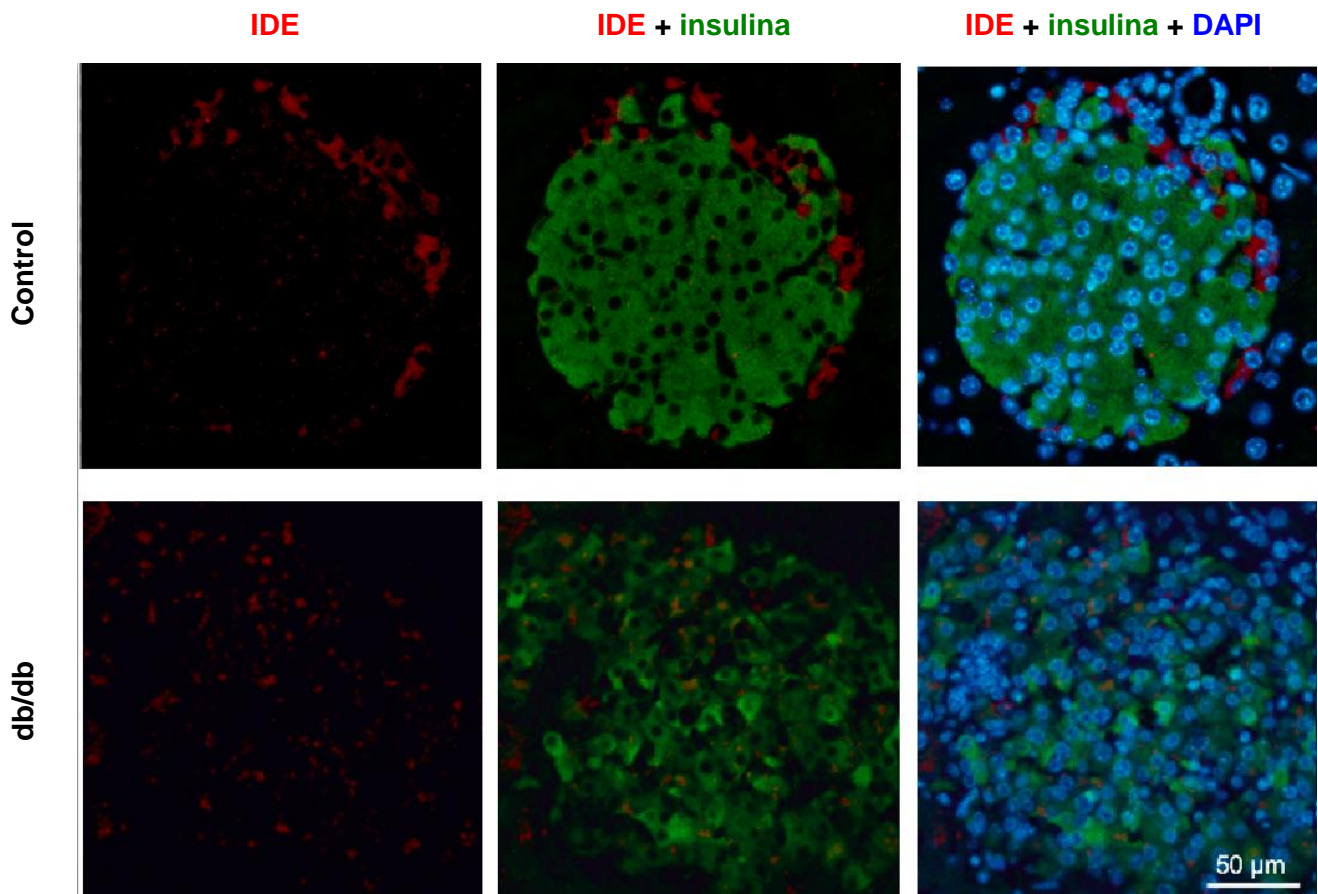
En estas mismas muestras de animales de 12 semanas, al estudiar la expresión de IDE en **células β pancreáticas**, encontramos diferencias significativas en el aumento de expresión entre las muestras de islotes de animales db/db (4.0%) respecto a las de animales WT (0.8%) (Figura 10), mostrando un incremento de cinco veces.

Para acabar con el análisis en este grupo de 12 semanas, al procesar los datos referentes a la expresión de IDE en **células no-β pancreáticas**, cabe destacar que hubo una disminución de expresión en los de islotes de animales db/db (9.1%) respecto a los animales control (14.8%), estos resultados no fueron estadísticamente significativos ( $p=0.4$ ) (Figura 11).

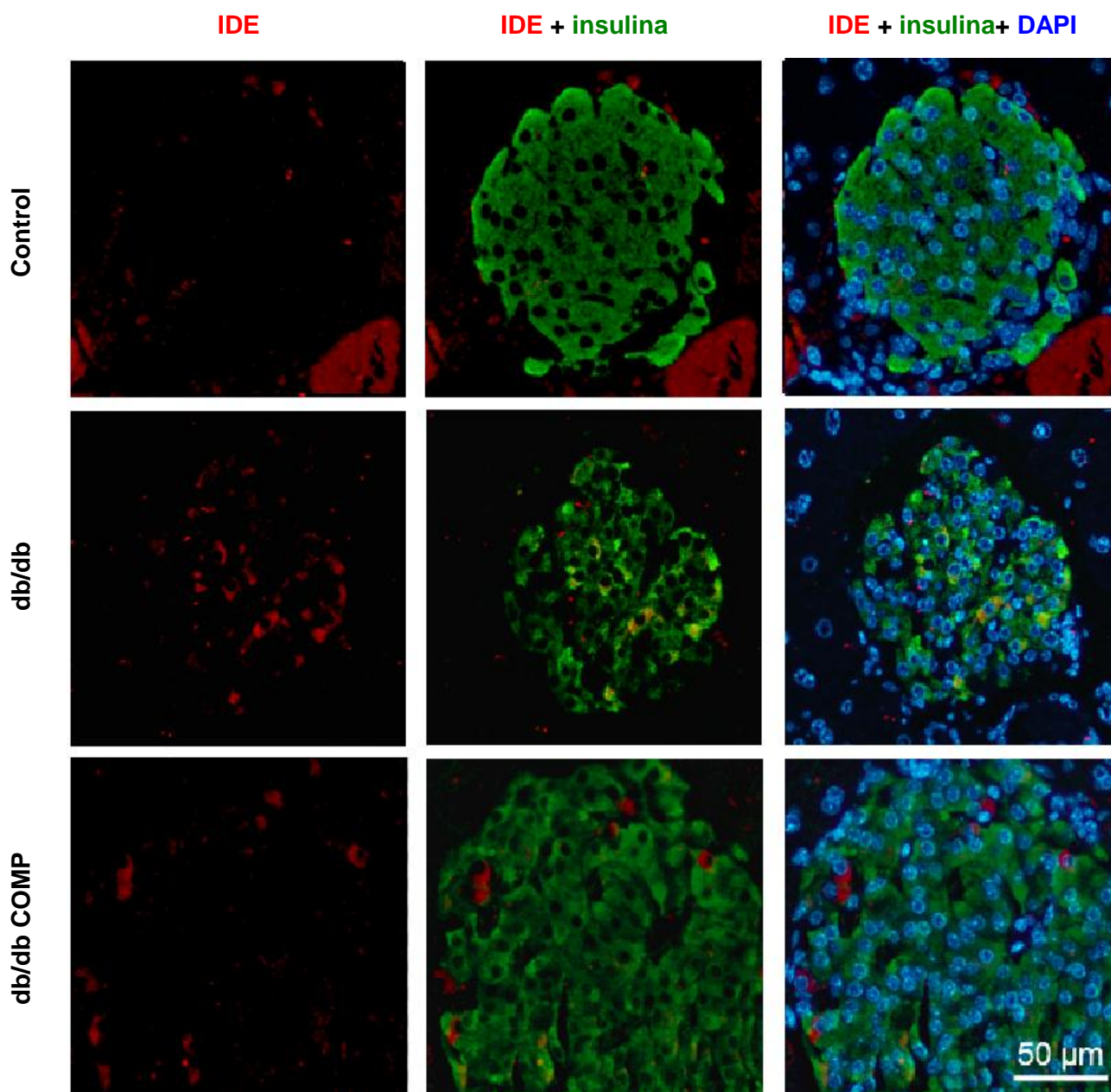


Para valorar la expresión de IDE en las muestras de animales de 26 semanas, comparamos no solo el grupo de animales db/db respecto a animales WT, en este grupo también teníamos muestras de animales db/db “compensadores”. Comparando los animales db/db con los WT, encontramos que no había diferencias significativas ni en el recuento de células del islote totales, ni en el de células  $\beta$  pancreáticas, ni en el de células no- $\beta$  pancreáticas. No obstante, al igual que en las muestras de animales de 12 semanas, encontramos que el porcentaje de células que expresaban IDE en el islote total y en las células  $\beta$  pancreáticas tendería a ser mayor en los animales db/db (Figuras 12, 13 y 14).

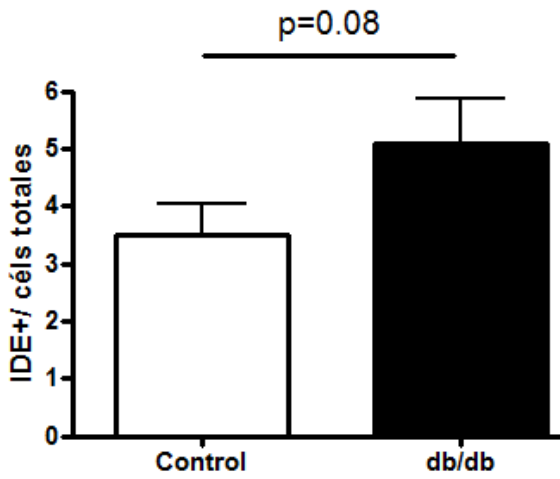
Al comparar la expresión de IDE de los animales db/db “compensadores” con los animales db/db, vimos una disminución no significativa de aproximadamente el 50% en la expresión de IDE en islote total (Figura 12). En segundo lugar, la expresión de IDE en células  $\beta$  pancreáticas de los “compensadores” mostraba una disminución no significativa de 6 veces respecto a los db/db (Figura 13). Por otro lado, la expresión de IDE en las células no- $\beta$  pancreáticas en los distintos subgrupos (control, db/db, db/db compensadores) no mostró cambios significativos (Figura 14).



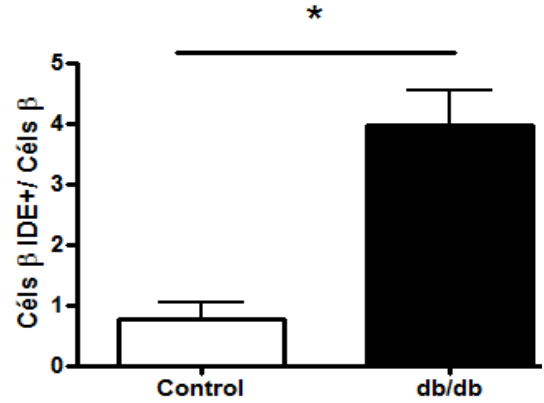
**Figura 7.** Imágenes representativas de los islotes de 12 semanas con tinción IDE, IDE+insulina, IDE+insulina+DAPI. Marcaje rojo: IDE. Marcaje citoplasmático verde: insulina. Tinción nuclear azul: DAPI.



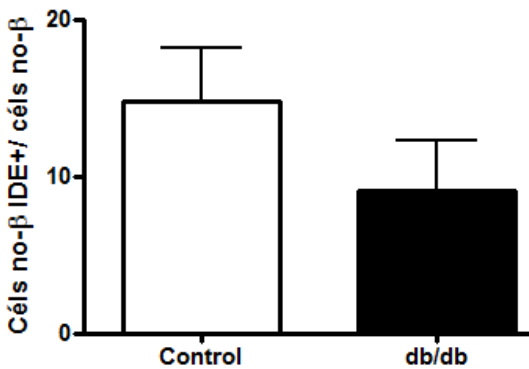
**Figura 8.** Imágenes representativas de los islotes de 26 semanas con tinción IDE, IDE+insulina, IDE+insulina+DAPI. Marcaje rojo: IDE. Marcaje citoplasmático verde: insulina. Tinción nuclear azul: DAPI.



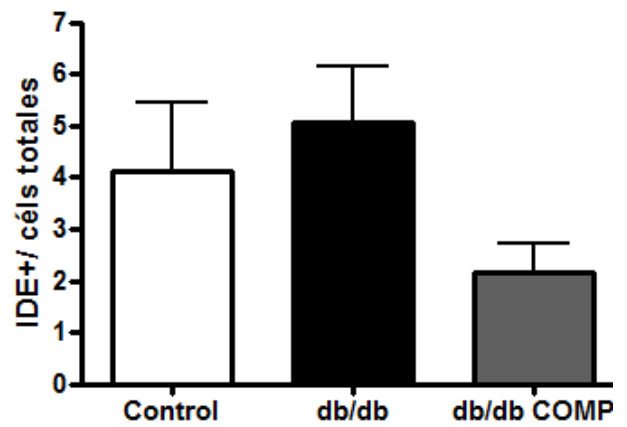
**Figura 9.** Expresión de la proteína IDE en islote total (nº medio de células IDE positivas por islote) procedentes de muestras de páncreas de animales de 12 semanas en muestras de animales control y animales db/db.



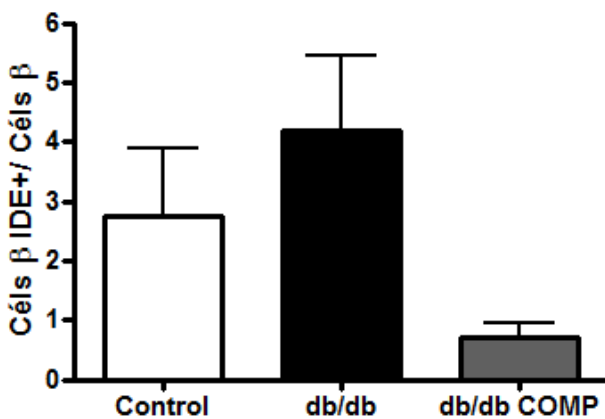
**Figura 10.** Expresión de la proteína IDE en células β pancreáticas (nº medio de células IDE positivas por nº de células β pancreáticas) procedentes de muestras de páncreas de animales de 12 semanas en muestras de animales control y animales db/db. \*p<0.05 (significativo)



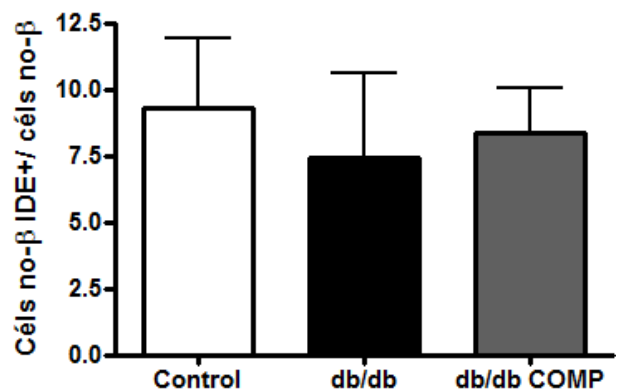
**Figura 11.** Expresión de la proteína IDE en células no-β pancreáticas (nº medio de células IDE positivas por nº de células no-β pancreáticas) procedentes de muestras de páncreas de animales de 12 semanas en muestras de animales control y animales db/db.



**Figura 12.** Expresión de la proteína IDE en islote total (nº medio de células IDE positivas por islote) procedentes de muestras de páncreas de animales de 26 semana en muestras de animales control, db/db y db/db “compensadores” (db/db COMP).



**Figura 13.** Expresión de la proteína IDE en células β pancreáticas (nº medio de células IDE positivas por nº de células β pancreáticas) procedentes de muestras de páncreas de animales de 26 semanas en muestras de animales control, db/db y db/db “compensadores” (db/db COMP).



**Figura 14.** Expresión de la proteína IDE en células no-β pancreáticas (nº medio de células IDE positivas por nº de células no-β pancreáticas) procedentes de muestras de páncreas de animales de 26 semanas en muestras de animales control, db/db y db/db “compensadores” (db/db COMP).



## DISCUSIÓN

---

La diabetes es una enfermedad que requiere cada día más, por su importante prevalencia y comorbilidad, de estudios que hagan entender mejor sus mecanismos fisiológicos y moleculares, para así ayudar a conseguir tratamientos más eficaces y seguros y para evaluar y monitorizar de forma fácil y no invasiva su evolución e incluso respuesta al tratamiento. Centrándonos en la etiopatogenia de DM2, sabemos que al comienzo hay una resistencia periférica a la acción de la insulina (resistencia insulínica), lo que lleva a un aumento de la demanda de la misma. Dicho proceso, con el tiempo, agota los mecanismos de compensación provocando una alteración del funcionamiento e incluso la viabilidad de las células  $\beta$  y, en consecuencia, niveles de hiperglucemia no compensada [2].

Nuestro estudio es un esfuerzo en la dirección de conocer mejor las bases moleculares de la DM2 y de identificar nuevas dianas terapéuticas, como podría ser IDE.

El estudio comenzó con la caracterización de los islotes del modelo de DM2 conocido como ratón db/db, que confirmó lo que ya venía publicándose en la bibliografía [14, 15, 16, 17] y en otros experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio [18]: el porcentaje de células  $\beta$  pancreáticas en el islote disminuye en páncreas de diabéticos (db/db), en los que además cualitativamente existe una mayor desestructuración. Hay que explicar que en nuestro estudio, esta diferencia no fue significativa en las muestras de islotes de 12 semanas pero sí en las de 26 semanas, lo que podemos achacar a que en el periodo de 12 semanas la diabetes era de reciente instauración (diabetes franca en ratones db/db a partir de 9 semanas). No obstante, pese a que no viéramos diferencias cuantitativas en este grupo, sí que existían a nivel cualitativo: los islotes de animales control mostraban características más homogéneas y tinciones de insulina de mayor intensidad, mientras que en los islotes de los ratones db/db la tinción de insulina es menos intensa y la estructura del islote más desorganizada, no tiñéndose todas las células  $\beta$  pancreáticas homogéneamente.

Esta pérdida de células  $\beta$  pancreáticas y de la función de síntesis de insulina en diabéticos se ha explicado por medio de varias teorías: aumento de la apoptosis de células  $\beta$  [19], estrés celular que ocasionaría cambios en la expresión génica de las células  $\beta$  pancreáticas convirtiéndolas en células  $\alpha$  o células inmaduras [20]. También una alteración en la degradación de insulina podría tener efecto en estos cambios.

Una de las piezas clave en la regulación de la degradación de insulina es la IDE (*insulin degrading enzyme*), una proteasa que degrada la insulina con un alto grado de especificidad. Se trata de una proteína ubicua en las células, que se expresa en el citosol [21], lo cual concuerda con la localización de IDE que encontramos en nuestras muestras al realizar la inmunofluorescencia para IDE.

En nuestro estudio, los datos más relevantes que hemos conseguido en cuanto a la evaluación de expresión de IDE se asocian al aumento significativo de expresión de IDE en células  $\beta$  en ratones db/db frente a ratones control en el subgrupo de 12 semanas, si bien se ve aumento no significativo de expresión global en todo el islote en los mismos ratones. Estos resultados concuerdan con otros previos de nuestro laboratorio donde se ha visto por western-blot un aumento de la expresión de IDE en los islotes pancreáticos de ratones db/db de 12 semanas frente a WT [22]. En los animales de 26 semanas existe el mismo patrón de expresión pero menos llamativo: mayor expresión en los ratones db/db que en los control que no llega a ser significativa.

En primer lugar, sabemos que en los animales db/db estudiados a las 12 semanas todavía actúan los mecanismos compensadores y existe una hiperinsulinemia clara que desaparece en ratones de mayor edad, por lo que los ratones de 26 semanas son ratones diabéticos no hiperinsulinémicos [13]. Al haber hiperinsulinemia hay que degradar más insulina, por lo que existe un aumento de expresión de IDE más marcado en el islote. Esta teoría además se sostiene por estudios que han observado que la exposición a insulina aumenta la actividad de la proteína IDE, lo cual provoca un aumento de la expresión de dicha proteína [18, 23].

Hemos visto que el aumento de expresión de IDE es significativo en células  $\beta$  de 12 semanas db/db (hiperinsulinémicos). Podemos hipotetizar que este hecho se puede deber a un proceso que puede contribuir a la patogenia de la diabetes, que acaba haciendo que se produzca una disminución de la insulina efectiva, de modo que promueve una mayor producción por parte de estas células  $\beta$ , que acabaría por agotar el mecanismo de compensación hiperinsulinémico y promover hiperglucemias no compensadas y desregulación de la función de la célula  $\beta$ .

Por otro lado, al igual que en estudios previos [18, 21], hemos visto que la expresión proporcional de IDE en el islote es mayor en células no- $\beta$  que en  $\beta$ , lo que podría indicar un papel importante de IDE en las células que no producen insulina en el islote.

En cuanto al subgrupo de animales db/db “compensadores”, todos ellos de 26 semanas, observamos que existen diferencias, aunque no significativas, de disminución de expresión de IDE en células totales y, específicamente, en células  $\beta$

respecto a los animales de 26 semanas db/db. Estos animales db/db compensadores, pese a tener mutado el gen del receptor de leptina que les predispone a padecer DM2, no la llegan a desarrollar y presentan características tanto cualitativa como cuantitativamente similares a las muestras de animales control de 26 semanas (no diabéticos) [13]. Estos db/db “compensadores” muestran un perfil de expresión de IDE muy similar al modelo de ratón no diabético del estudio (26 semanas control), lo que nos ayuda a defender la teoría de que la sobreexpresión de IDE en animales db/db de 26 semanas es un mecanismo patogénico que contribuye al desarrollo de diabetes. La ausencia de significancia estadística en este grupo se debe a que la N=4 es baja.

Comparando nuestros resultados con estudios descritos en humanos diabéticos insulinizados [18], observamos que al igual que en humanos, la expresión de IDE en células totales del islote de ratón es mayor en sujetos diabéticos. Sin embargo, en nuestro estudio con ratones la expresión de IDE en células no- $\beta$  es menor en diabéticos, mientras que en humanos se ha visto una mayor expresión en diabéticos. Estas diferencias las podemos explicar por varias razones: se trata de especies diferentes y además el perfil de los sujetos diabéticos es muy diferente. En nuestro estudio todos los ratones tienen una mutación definida que les predispone a padecer diabetes, mientras que en humanos el perfil diabético es heterogéneo (distinto origen genético, distinta gravedad, tiempo de evolución, fisiopatología) y son diabéticos en tratamiento (con antidiabéticos orales y/o insulina).

Un hecho a tener en cuenta respecto a nuestros resultados es que hemos observado dos estadios funcionales diferentes en las células  $\beta$ , que se reflejan en la intensidad de la tinción de insulina. Es decir, cuando una célula se tiñe con menor intensidad (como pasaba con los islotes de ratones db/db), quiere decir que es una célula  $\beta$  que contiene insulina pero que quizá esté próxima a dejar de ser funcional, por lo que el contenido de insulina es menor. Por tanto, quizá sería interesante realizar otro tipo de contaje que tenga en cuenta intensidades de tinción en los islotes pancreáticos.

Los resultados obtenidos en este estudio necesitan de una mayor profundidad, aumentando el tamaño muestral por un lado e introduciendo otros modelos animales hiperinsulinémicos y diabéticos para esclarecer el papel de IDE y los mecanismos que lo implican en la homeostasis de la glucosa y lo involucran en la fisiopatología de la DM2. Si se continúa esta línea de investigación, es posible que se confirme que la modificación de la expresión de IDE pueda ser una herramienta terapéutica para la prevención y/o reparación de la función de las células  $\beta$  pancreáticas en la DM2.

## CONCLUSIONES

---

- La proporción de células  $\beta$  pancreáticas en los islotes de ratones hiperinsulinémicos db/db de 12 semanas es similar al control; sin embargo, hay una disminución de células  $\beta$  pancreáticas en ratones db/db hiperglucémicos de 26 semanas.
- La expresión de IDE aumenta en las células de los islotes pancreáticos de ratones hiperinsulinémicos e hiperglucémicos db/db (12 semanas), este incremento se debe fundamentalmente a un aumento en la expresión de IDE en las células  $\beta$  pancreáticas.
- La expresión de insulina e IDE en el islote pancreático de los ratones db/db “compensadores” tiene un comportamiento más parecido a los ratones control que a los db/db.
- La expresión de IDE aumenta en las células endocrinas de modelos de ratones diabéticos (db/db), del mismo modo que en humanos diabéticos insulinizados.
- IDE es una potencial diana terapéutica para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- (1) WHO. Diabetes mellitus [Internet]. Who.int. 2016 [consultado 16 Mayo 2016]. Disponible en: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/)
- (2) Eberhard D., Lammert E. The pancreatic beta-cell in the islet and organ community. *Curr Opin Genet Dev* 2009 Oct; 19(5): 469-75.
- (3) Soriguer F. et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* 2012 Jan; 55(1): 88-93.
- (4) Wei-Jen T. Targeting Insulin Degrading Enzyme to Treat Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2016 Jan; 27(1): 24-34.
- (5) Farris W. et al. Insulin degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Apr; 100(7): 4162-7.
- (6) Fawcett J. et al. Regulation of protein degradation by insulin degrading enzyme: analysis by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Arch Biochem Biophys* 2007 Dec; 468(1): 128-33.
- (7) Mirsky IA., Broh-Kahn RH. The inactivation of insulin by tissue extracts; the distribution and properties of insulin inactivating extracts. *Arch Biochem* 1949 Jan; 20(1): 1-9.
- (8) Fakhrai-Rad H. et al. Insulin degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats. *Hum Mol Genet* 2000 Sep; 9(14): 2149-58.
- (9) Karamohamed S. et al. Polymorphisms in the insulin degrading enzyme gene are associated with type 2 diabetes in men from the NHLBI Framingham Heart Study. *Diabetes* 2003 Jun; 52(6): 1562-7.
- (10) Steneberg P. et al. The type 2 diabetes-associated gene IDE is required for insulin secretion and suppression of alpha-synuclein levels in beta-cells. *Diabetes* 2013 Jun; 62(6): 2004-14.
- (11) Seta KA., Roth RA. Over expression of insulin degrading enzyme: cellular localization and effects on insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Feb; 231(1): 167-71.
- (12) Cotsapas C. et al. Expression analysis of loci associated with type 2 diabetes in human tissues. *Diabetologia* 2010 Nov; 53(11): 2334-9.
- (13) Jiménez, M. Caracterización de tres modelos animales de resistencia insulínica [tesis doctoral]. Universidad de Cádiz, Facultad de Medicina; 2012.
- (14) Yoon K H. et al. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 May; 88(5): 2300-8.

- (15) Clark A. et al. Islet amyloid, increased alpha-cells, reduced beta-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 1988 Dec; 9(4): 151-9.
- (16) Stefan Y. et al. Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of non diabetic and diabetic humans. *Diabetes* 1982 Aug; 31(8 Pt 1): 694-700.
- (17) Saito K. et al. Islet morphometry in the diabetic pancreas of man. *Tohoku J Exp Med* 1978 Jun; 125(2): 185-97.
- (18) Fernández-Díaz CM et al. Insulin Degrading Enzyme is up regulated in type 2 diabetic patients pancreatic alpha-cells. *Diabetes* 65 (Supl 1): A1-A900.
- (19) Butler A. et al. Beta-cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003 Jan; 52(1): 102-10.
- (20) Weir GC., Bonner Weir S. Islet  $\beta$  cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann N Y Acad Sci* 2013 Apr; 1281(1), 92-105.
- (21) Bondy C. et al. Cellular distribution of insulin-degrading enzyme gene expression. Comparison with insulin and insulin-like growth factor receptors. *J Clin Invest* 1994 Mar; 93(3): 966-73.
- (22) 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.
- (23) Pivovarova O. et al. Glucose inhibits the insulin-induced activation of the insulin-degrading enzyme in HepG2 cells. *Diabetologia* 2009 Aug; 52(8): 1656-64.



# Estudio del papel de *Insulin Degrading Enzyme* (IDE) en diabetes mellitus

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

Autores: Sara Fernández Luis y Blanca Heras Pozas

Tutor: Irene Cózar Castellano



## Introducción

Diabetes mellitus (DM): síndrome endocrino metabólico caracterizado por **hiperglucemia** e **intolerancia a la glucosa** debido a una falta de insulina y/o a una deficiencia de acción de la misma.

Hasta el momento no existe ningún tratamiento curativo, basándose su terapia en el control de **glucemias**. Por ello se han abierto muchas vías de investigación para poder encontrar una cura de la diabetes.

DM tipo 2: resistencia insulínica periférica → compensación de las células β pancreáticas // Disfunción de células β pancreáticas + muerte celular → debut de diabetes franca

IDE (*insulin degrading enzyme*): proteína de localización ubicua en el organismo que **degrada e inactiva** varios péptidos bioactivos (insulina, glucagón, amilina y β-amiloide) para prevenir la formación de agregados peptídicos.

El papel de IDE en el islote pancreático es poco conocido. Su papel en la regulación de la homeostasis de glucosa es controvertida y hay pocos estudios llevados a cabo sobre este tema.

Varias teorías:

- Inhibición de IDE puede llevar a aumentar la vida media de la insulina → beneficioso para el tratamiento de DM.
- Reducción de la actividad de IDE favorece fenotipo diabético → perjudicial en la etiopatogenia de la DM.

Son necesarios nuevos estudios en IDE para:

- Intentar descubrir el verdadero papel de IDE en la DM.
- Certificar si IDE es una potencial diana terapéutica en el tratamiento de la DM.

## Hipótesis y objetivos

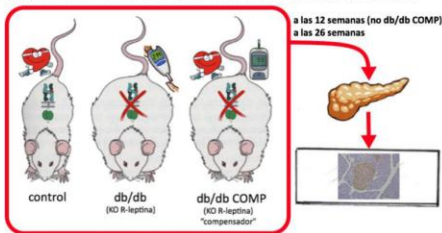
**Hipótesis:**  
La expresión de IDE está aumentada en los islotes pancreáticos de ratones hiperinsulinémicos e hiperglucémicos db/db respecto a una población de ratones control.

**Objetivos:**

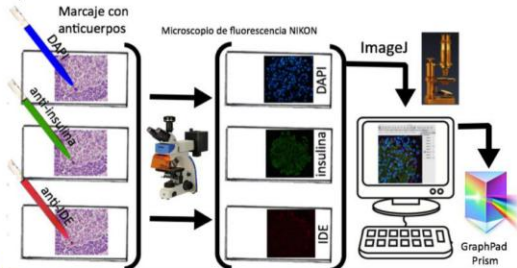
- Caracterizar la proporción de células β pancreáticas en los islotes pancreáticos.
- Comparar la expresión de IDE en los islotes pancreáticos y en los distintos tipos celulares.
- Estudiar la expresión de IDE en el páncreas de ratones db/db "compensadores".

## Materiales y métodos

- Modelo de estudio de obesidad y diabetes:** Ratón db/db (KO para el receptor de leptina).
- 12 semanas de edad: Obesos, hiperinsulinémicos, insulino-resistentes, DM2.
  - 26 semanas de edad: Obesos, insulino-resistentes, DM2.
  - 26 semanas de edad COMP: Obesos, hiperinsulinémicos, insulino-resistentes.



Tinción de páncreas → Obtención de imágenes → Contaje celular y análisis estadístico



## Resultados

### Población de células β pancreáticas

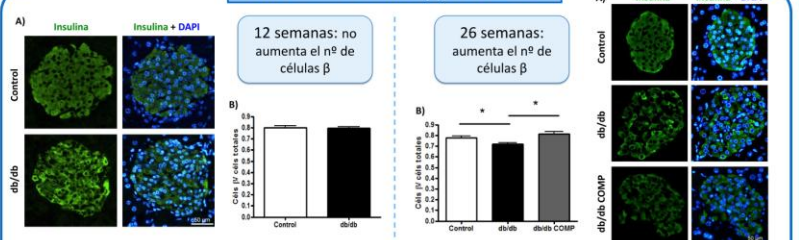


Figura 1. A) Imágenes representativas de los islotes de cada subgrupo de estudio de los animales de 12 semanas al microscopio de fluorescencia. Marcarje citoplasmático verde: insulina. Tinción nuclear azul: DAPI. B) Ratio de células β por islote de páncreas de animales de 12 semanas en muestras de animales control y animales db/db. Control N=13; db/db N=10.

Figura 2. A) Imágenes representativas de los islotes de cada subgrupo de estudio de los animales de 26 semanas al microscopio de fluorescencia. Marcarje citoplasmático verde: insulina. Tinción nuclear azul: DAPI. B) Ratio de células β por islote de páncreas de animales de 26 semanas en muestras de animales control, db/db y db/db "compensadores" (db/db COMP). p<0.05 (significativo). Control N=7; db/db N=10; db/db COMP N=4.

### Expresión de IDE

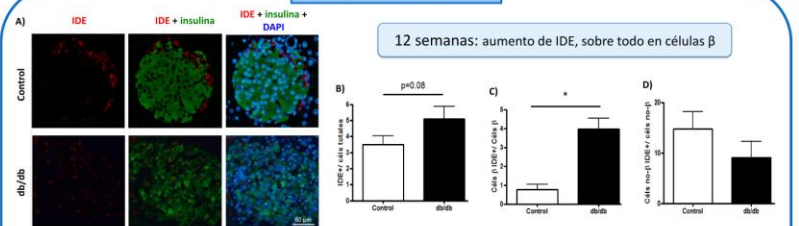


Figura 3. A) Imágenes representativas de los islotes de 12 semanas con tinción IDE, IDE+insulina, IDE+insulina+DAPI. Marcarje rojo: IDE. Marcarje citoplasmático verde: insulina. Tinción nuclear azul: DAPI. B) Expresión de la proteína IDE en islote total (nº medio de células IDE positivas por islote) procedentes de muestras de páncreas de animales de 12 semanas en muestras de animales control y animales db/db. C) Expresión de la proteína IDE en células β pancreáticas (nº medio de células IDE positivas por nº de células β pancreáticas) procedentes de muestras de páncreas de animales de 12 semanas en muestras de animales control y animales db/db. \*p<0.05 (significativo). D) Expresión de la proteína IDE en células no-β pancreáticas (nº medio de células IDE positivas por nº de células no-β pancreáticas) procedentes de muestras de páncreas de animales de 12 semanas en muestras de animales control y animales db/db. Control N=13; db/db N=10.

### 26 semanas: aumento de IDE sin variación significativa

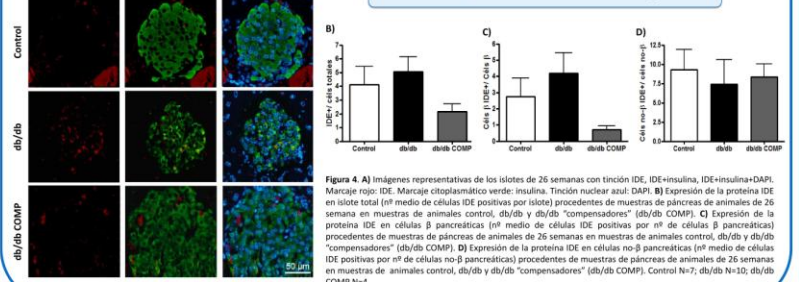


Figura 4. A) Imágenes representativas de los islotes de 26 semanas con tinción IDE, IDE+insulina, IDE+insulina+DAPI. Marcarje rojo: IDE. Marcarje citoplasmático verde: insulina. Tinción nuclear azul: DAPI. B) Expresión de la proteína IDE en islote total (nº medio de células IDE positivas por islote) procedentes de muestras de páncreas de animales de 26 semanas en muestras de animales control, db/db y db/db "compensadores" (db/db COMP). C) Expresión de la proteína IDE en células β pancreáticas (nº medio de células IDE positivas por nº de células β pancreáticas) procedentes de muestras de páncreas de animales de 26 semanas en muestras de animales control, db/db y db/db "compensadores" (db/db COMP). D) Expresión de la proteína IDE en células no-β pancreáticas (nº medio de células IDE positivas por nº de células no-β pancreáticas) procedentes de muestras de páncreas de animales de 26 semanas en muestras de animales control, db/db y db/db "compensadores" (db/db COMP). Control N=7; db/db N=10; db/db COMP N=4.

## Conclusiones

- La proporción de células β pancreáticas en los islotes de ratones hiperinsulinémicos db/db de 12 semanas es similar al control; sin embargo, hay una disminución de células β pancreáticas en ratones db/db hiperglucémicos de 26 semanas.
- La expresión de IDE aumenta en las células de los islotes pancreáticos de ratones hiperinsulinémicos e hiperglucémicos db/db (12 semanas), este incremento se debe fundamentalmente a un aumento en la expresión de IDE en las células β pancreáticas.
- La expresión de insulina e IDE en el islote pancreático de los ratones db/db "compensadores" tiene un comportamiento más parecido a los ratones control que a los db/db.
- La expresión de IDE aumenta en las células endocrinas de modelos de ratones diabéticos (db/db), del mismo modo que en humanos diabéticos insulinizados.
- IDE es una potencial diana terapéutica para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

