



UVA



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

**BÚSQUEDA DE NUEVAS MOLÉCULAS PARA
LA REGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS
PRODUCTORAS DE INSULINA**

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor:

Manuel Mellina Vicente

Tutoras:

Dra. Irene Cózar Castellano

Dra. Beatriz Merino Antolín

INDICE

ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Definición, Epidemiología y Factores de riesgo de la Diabetes Mellitus.	3
Fisiología de las células β pancreáticas	4
Fisiopatología de las células β en la DM2	6
Fisiopatología de las células β no relacionada con DM2	6
Tratamiento farmacológico de la DM2	7
Productos naturales con efecto antidiabético	8
Cumarinas	10
MATERIAL Y MÉTODOS	11
Método de cultivo y mantenimiento de la línea celular	11
Método de Siembra	11
Origen y preparación de los compuestos testados	12
Tratamiento <i>in vitro</i> de la línea celular MIN-6 con derivados cumarínicos	12
Ensayo de viabilidad celular (ensayo de MTT)	13
Método estadístico	14
RESULTADOS	14
1. Cribado de la concentración de elección para los compuestos a evaluar	14
2. Evaluación del efecto de compuestos cumarínicos sobre la viabilidad celular en células β pancreáticas	15
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIÓN	19
BIBLIOGRAFÍA	19

ABSTRACT

La Diabetes Mellitus es una enfermedad metabólica cuya característica principal es la hiperglucemia crónica debido a la falta de secreción de insulina o la resistencia periférica de los tejidos a su acción, cuyo interés radica en su elevada prevalencia y las complicaciones que puede causar a largo plazo como por ejemplo, enfermedades cardiovasculares. Las cumarinas son compuestos que se pueden localizar en plantas y, asimismo, formando parte de derivados metabólicos de hongos y bacterias, que han sido estudiados como antidiabéticos, y resulta interesante conocer si poseen propiedades regenerativas en células β pancreáticas. El presente estudio experimental preclínico tiene como objetivo investigar el potencial terapéutico de 8 derivados sintéticos de las cumarinas. Para lograr nuestro propósito, hemos utilizado como modelo la línea celular de insulinoma MIN-6 para evaluar la viabilidad celular de las células productoras de insulina. Aunque no hemos identificado ningún compuesto que module positivamente la viabilidad de las células β pancreáticas para su uso en la diabetes, hemos sido capaces de objetivar un compuesto que disminuye la viabilidad de manera dosis dependiente. Este producto, definido como Q8, podría ser un interesante candidato para el tratamiento de otras patologías neoplásicas derivadas de las células β pancreáticas, como los insulinomas.

Palabras clave: Derivados cumarínicos; Cumarinas; Ensayo MTT; Diabetes Mellitus; Célula β pancreática; Viabilidad celular; Antidiabéticos; Antineoplásicos

Diabetes Mellitus is a metabolic disease whose principal hallmark is chronic hyperglycemia due to the lack of insulin secretion or peripheral tissue resistance to its action, it has a high prevalence and it can cause long-term complications, for example cardiovascular disease. Coumarins are compounds that can be found in plants, fungi and bacteria. They have been studied as antidiabetics, and it is interesting to know whether they have regenerative properties in pancreatic β -cells. The present preclinical study aims to investigate the therapeutic potential of 8 synthetic derivatives of coumarins. To achieve our purpose, we have used the pancreatic MIN-6 insulinoma cell line as a model to assess the cell viability of insulin-producing cells. Although we have not identified any compound that positively modulates pancreatic β -cell viability for use in diabetes, we have been able to identify a compound that decreases β -cell viability in a dose-dependent manner. This product, defined as Q8, could be an interesting candidate for the treatment of neoplastic pathologies derived from pancreatic β -cells, in particular insulinomas.

Keywords: Coumarin derivatives; Coumarins; MTT assay; Diabetes Mellitus; Pancreatic β -cell; Cell viability; Antidiabetics; Antineoplastics

INTRODUCCIÓN

Definición, Epidemiología y Factores de riesgo de la Diabetes Mellitus.

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica cuya característica principal es la elevación crónica de la glucosa en sangre o hiperglucemia, la cual afectará a las vías metabólicas del resto de macronutrientes como son los lípidos y las proteínas. La fisiopatología se centra en la insulina, hormona producida en las células β del páncreas endocrino, siendo el defecto en la secreción por las células β o en la acción de la misma sobre los tejidos periféricos las principales causantes. Hay varios tipos de diabetes siendo los más prevalentes la Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) caracterizada por la destrucción autoinmune de células β y Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) caracterizada por la resistencia periférica a la insulina y a largo plazo, defectos en su secreción. La hiperglucemia crónica derivada del mal manejo terapéutico de la enfermedad, lleva a complicaciones a nivel microvascular, entre las que se destacan retinopatía, nefropatía y neuropatía diabéticas; y a nivel macrovascular, a complicaciones como enfermedad cardiovascular, arterial periférica y cerebrovascular [1].

De los datos epidemiológicos recogidos en 2021, la prevalencia de la diabetes fue de 537 millones de personas en el mundo, siendo aproximadamente el 11,4% en Europa (61 millones). Se estima que la prevalencia aumente a 643 millones en 2030 y 783 millones en 2050. En términos de mortalidad, la diabetes fue causante 6,7 millones de muertes a nivel mundial y en España de 81.717 muertes. En coste sanitario supuso 966 billones de dólares a nivel mundial [2].

El tipo de diabetes más frecuente, es la DM2, siendo aproximadamente el 90% de los casos [3]. Los factores de riesgo ambientales y genéticos que nos predisponen a sufrirla son:

Ambientales: Una dieta densamente energética constituida por alimentos procesados altos en azúcares simples, grasa saturada, y escasa en fibra; ritmo de vida basado en el sedentarismo; y un índice de masa de corporal en el rango de obesidad (mayor o igual a 30), son los principales factores que influyen en el riesgo de padecer DM [3–5].

Genéticos: DM2 no solo tiene componente ambiental, puesto que se han descrito posibles locus de susceptibilidad genética, así como una mayor concordancia entre gemelos monocigóticos frente a dicigóticos [3]. Entre los genes candidatos a poseer posibles locus de susceptibilidad, se encuentran KCNJ11 (canal de rectificación interna de potasio, subfamilia J, miembro 11) y IGF2BP2 (proteína 2 de unión al ARNm del factor 2 de crecimiento insulinoide) [6].

Fisiología de las células β pancreáticas

El páncreas se puede dividir en tejido exocrino, el cual supone un volumen aproximado de 96-99%; y por otro lado el tejido endocrino que supone entre el 1-4% del volumen, el cual está compuesto por secciones circulares, ovaladas o irregulares llamadas islotes de Langerhans. Estos islotes están formados por un 50-70% de células β secretoras de insulina, por un 20-40% de células α secretoras de glucagón, por menos del 10% de células δ secretoras de somatostatina y células PP secretoras de polipéptido pancreático, y menos del 1% por células ϵ secretoras de ghrelina. La estructura de las células en el islote humano es desorganizado, y esto repercute en una gran regulación paracrina de unas células con otras (**figura 1**) [7].

Secreción de insulina estimulada por glucosa: La glucosa postprandial entra en la célula β por los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT2, y tras su fosforilación por la glucokinasa, se produce la glucólisis y se accede al ciclo de Krebs con la obtención de ATP (adenosín trifosfato). Este ATP cierra los canales de K^+ -ATP dependiente, despolarizando la membrana y abriendo los canales de Ca^{2+} activados por voltaje, la apertura de estos canales provoca el incrementando el Ca^{2+} intracelular y dando lugar a la exocitosis de insulina (**figura 2**). Cabe mencionar que en ayunas también se mantiene una secreción basal de insulina [8,9].

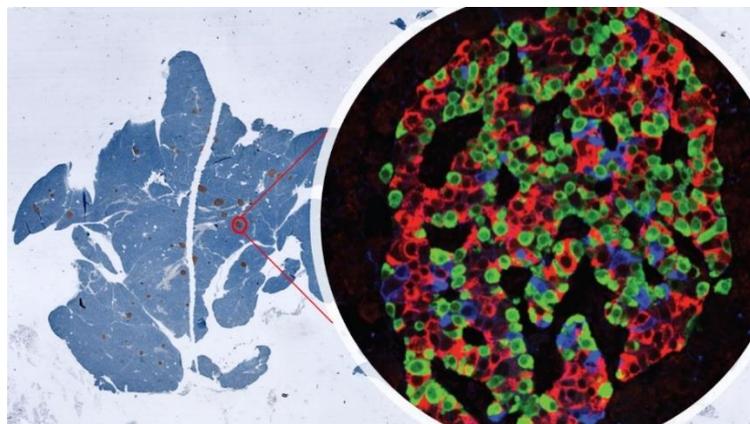


Figura 1: Corte histológico de páncreas humano en inmunohistoquímica, acompañado de imagen de islote de Langerhans por microscopio de inmunofluorescencia. En verde células β , en rojo células α y en azul células δ . La imagen del islote de Langerhans por microscopio de inmunofluorescencia fue tomada de “Gardner DG, Shoback D: Greenspan’s Basic & Clinical Endocrinology, 9th Edition: www.accessmedicine.com”.

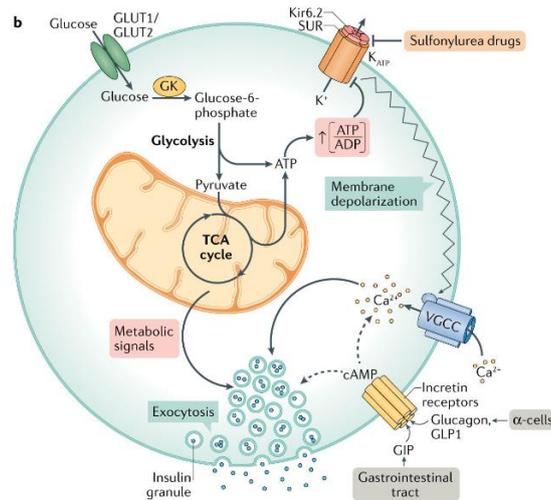


Figura 2: Secreción de Insulina de las células β pancreáticas. Tomado de “Campbell JE, Newgard CB, *Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion, Nature reviews. Molecular cell biology, 2021*”.

Regulación de la secreción de insulina: El principal estímulo para la secreción de insulina es la glucosa postprandial. Además, existen más factores que regulan la secreción de insulina en las células β en mayor o menor medida. Las células intestinales durante la ingesta liberan GIP (polipéptido insulínico dependiente de la glucosa) y GLP-1 (péptido glucagónico dependiente-1) que estimulan la liberación de insulina en la célula β por la vía cAMP (adenosín monofosfato cíclico). Hay evidencias recientes de que GIP estimula la liberación de GLP-1 en las células α pancreáticas lo cual también contribuye a la liberación de insulina.

A nivel paracrino, la insulina inhibe la liberación de glucagón de las células α pancreáticas. En paralelo, las células β liberan UCN3 (urocortina 3) que se une al CRHR2 (receptor de la hormona liberadora de corticotropina 2) en las células δ , incrementando la liberación de somatostatina, que a su vez inhibe la secreción de glucagón e insulina [9].

Rol de la insulina: Una vez secretada la insulina, se distribuye fundamentalmente a los órganos dependientes de su acción, en primer lugar al hígado, y posteriormente al músculo y tejido adiposo. La insulina se va a encargar de disminuir la glucemia postprandial mediante el transporte de glucosa al espacio intracelular de estos tejidos. Además, la insulina favorece el metabolismo anabólico, promoviendo la glucólisis, la glucogénesis y la lipogénesis en el hígado; la síntesis proteica y la glucólisis en el músculo; y la acumulación de grasas en el tejido adiposo [10].

Fisiopatología de las células β en la DM2

Existe un amplio consenso científico en que la base fisiopatológica de la DM2 es la pérdida de la función de las células β pancreáticas seguida de una disminución de la masa celular que varía entre 30-65% [11].

La etiología de esta fisiopatología no está bien definida, por lo que se sugieren varias hipótesis según distintos estudios. El incremento de la apoptosis de las células β debido a diversos factores como deposición de amiloide pancreática (amilina), lipotoxicidad, citoquinas proinflamatorias etc....; y el descenso en la proliferación por las mismas causas, fueron hipótesis planteadas, sin embargo en muestras humanas de páncreas de DM2 no fueron relevantes. Otra hipótesis propuesta fue la desdiferenciación, paso de célula madura a precursora, debido a que se observaron en muestras pancreáticas humanas de DM2 una pérdida de factores de transcripción de células β maduras como son Pdx1 (Homeobox duodenal pancreático 1). La última hipótesis fue la transdiferenciación, paso de un tipo de célula madura a otra también madura, debido a que estudios en modelos de ratón describieron un porcentaje de células β capaz de transdiferenciarse a células α productoras de glucagón, asimismo en muestras pancreáticas de humanos de DM2 se identificó la expresión simultánea de insulina-glucagón en algunas células [11,12].

Fisiopatología de las células β no relacionada con DM2

Las células β pancreáticas no solo forman parte de la fisiopatología de la DM2, puesto que también tienen un papel importante en la patología oncológica, produciendo insulinomas. El insulinoma es un tumor neuroendocrino pancreático capaz de producir insulina de forma exacerbada e hipoglucemias severas, cuya incidencia se estima en torno a 4 casos por 1 millón de personas al año [13–15]. Por un lado, comparando el tejido neoplásico con el tejido normal pancreático en modelos caninos, se han observado diferencias en la expresión de varios genes, como PAX4 (Homeobox 4 emparejado) o INSM1 (asociado a insulinoma 1) a través de secuenciación de ARN (ácido ribonucleico) [13]. Igualmente, en muestras pancreáticas de pacientes con diagnóstico de insulinoma, se describió una mayor activación de la vía de señalización mTOR/P70S6K (diana de rapamicina en mamíferos/ proteína que deriva de mTOR) en células tumorales que en células de islote no neoplásicas, mediante inmunohistoquímica y Western blotting [16]. Por otro lado, en el contexto clínico, se pudo observar en un estudio de cohorte retrospectivo, cierta discrepancia en parámetros bioquímicos entre el insulinoma benigno frente al insulinoma maligno en humanos (niveles de insulina, proinsulina y péptido-C), además de describir evoluciones tórpidas como la aparición de adenopatías positivas o metástasis en hígado tras la resección de insulinomas benignos con bordes libres de células tumorales. Asimismo, el pronóstico fue distinto, la supervivencia global a los 5 años fue mayor en los benignos (95%) que en los malignos (67%) [14]. Por tanto, el insulinoma es una enfermedad de importancia en la fisiopatología de las células β pancreáticas.

Tratamiento farmacológico de la DM2

Mientras que la DM1 se debe tratar de por vida con insulina tanto basal como prandial (en bolos o relacionado con las comidas) debido a que su fisiopatología es la destrucción de células β y por tanto una deficiencia absoluta de insulina, la fisiopatología de la DM2 permite más estrategias terapéuticas y por lo tanto hay mayor oportunidad de dianas farmacológicas a regular, siendo probablemente innecesario realizar la insulinización si se alcanza un buen manejo de la enfermedad [17].

Los antidiabéticos no insulínicos para la DM2 se muestran en **la tabla 1** [3].

Para el control glucémico farmacológico, siguiendo el algoritmo de la *American Association of Clinical Endocrinology 2020*, se utiliza el nivel de hemoglobina glicosilada (HbA1C). Si los niveles de HbA1C son menores de 7,5% se suele utilizar monoterapia y el fármaco de elección suele ser metformina. Si los niveles se encuentran en torno 7,5-9% se puede probar doble o triple terapia junto a metformina, siendo preferidos por su disminución del riesgo de eventos cardiovasculares los análogos de GLP-1 o los inhibidores de SGLT2. Si el paciente tiene una HbA1C mayor de 9% y síntomas, se puede probar añadiendo insulina [17–19].

Grupo Farmacológico	Acción farmacodinámica
Biguadinas (Metformina)	↓ Gluconeogénesis y glucogenólisis hepática, ↑ sensibilidad insulina y glucogénesis en músculo esquelético, activa AMPK
Sulfonilureas (Glipizida)	Cierra el canal K^+ -ATP sensible, ↑ secreción de insulina
Tiazolidinedionas (Pioglitazona)	Ligandos de PPAR- γ ↑ sensibilidad a insulina
Inhibidores de α -glucosidasa (Miglitol)	Inhiben la enzima α -glucosidasa de la mucosa intestinal, ↓ absorción de carbohidratos
Agonistas del receptor GLP-1 (Liraglutide)	↑ Secreción de insulina estimulando el receptor GLP-1
Inhibidores del SGLT2 (Dapagliflozina)	Inhiben la reabsorción de glucosa filtrada en la orina
Inhibidores DPP4 (Sitagliptina)	Inhiben la degradación de las incretinas GLP-1 y GIP por DPP4

Tabla 1 Principales fármacos antidiabéticos orales utilizados en la DM2: Se describe el grupo farmacológico con ejemplo del mismo y acción farmacológica. Abreviaciones: AMPK: proteína quinasa activadora de adenosín monofosfato; ATP: adenosín trifosfato; DPP4: dipeptidil peptidasa 4; GIP: polipéptido insulínico dependiente de glucosa; GLP-1: péptido glucagónico dependiente de glucosa; PPAR- γ : receptor γ activado por proliferadores de peroxisomas; SGLT2: cotransportadores sodio-glucosa 2. Tabla realizada a partir de “Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. *Int J Med Sci*, 2014”.

Productos naturales con efecto antidiabético

La literatura científica describe productos naturales con efecto antidiabético que se explican a continuación:

- **Canela:** En los resultados de un metaanálisis de 10 ensayos clínicos aleatorizados en pacientes con DM2, se describe una disminución significativa de la glucosa plasmática en ayunas, del colesterol LDL y total, de los triglicéridos y un aumento significativo del HDL. La HbA1C no cambió significativamente. Se piensa que el efecto antidiabético se debe a la acción del cinamaldehído, mediante el aumento de expresión de PPAR (receptor activado por proliferadores de peroxisomas). Sin embargo los resultados son contradictorios entre diferentes estudios, posiblemente debido a la variabilidad en la muestra (características de pacientes) de cada estudio, la dosis y la forma de dosificación de canela [20].
- **Moringa Oleifera:** Es una planta con flor perteneciente a la familia *Moringaceae*. Los resultados de un metaanálisis de 46 artículos realizados en modelos de roedores diabéticos mostraron una reducción de los niveles sanguíneos de glucosa, los niveles de triglicéridos en suero/plasma y niveles de colesterol total, sin embargo, no se observaron cambios en el colesterol HDL. El efecto antidiabético puede ser explicado por los fitoquímicos, en especial los flavonoides y ácidos fenólicos que probablemente inhiben la α -amilasa y α -glucosidasa. Además, SGLT1 (cotransportador sodio-glucosa 1) parece ser inhibido, lo que dificultaría la absorción de glucosa en el intestino. La variabilidad en los resultados se pueden explicar en parte por la variedad del tipo de modelo de DM preclínico y los niveles de glucosa en los controles que dependen de dichos modelos [21].
- **Vinagre de Manzana:** Se observó *in vitro* que el vinagre de manzana artesanal posee una mayor capacidad para inhibir α -amilasa y α -glucosidasa que el vinagre de manzana industrial. Estas enzimas digestivas son clave en la DM2, debido a que la disminución de la hidrólisis de carbohidratos mejora los niveles de glucosa y lípidos en sangre. Los compuestos fenólicos del vinagre serían los responsables de este efecto [22].
- **Cúrcuma:** Tiene efecto antidiabético, mediante su componente bioactivo curcumina, en la regulación de glucemia y lipemia. Dicho efecto está mediado por la activación de PPAR- γ ; reducción de expresión de SREBP1c (proteína de unión a elementos reguladores del estero 1c) que reduce la lipogénesis hepática; incrementa el metabolismo lipídico a través del aumento de actividad de CPT1 (carnitina palmitoiltransferasa 1) y ACAT (acil-CoA colesterol aciltransferasa) [23]; mejora la resistencia a insulina y disminuye la HbA1C [23,24]. En un ensayo experimental se demostró que en líneas de células β MIN-6 y en islotes humanos aumenta los niveles de cAMP mediante la disminución de ARN mensajero PDE (fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos) destacando los subtipos PDE3B, PDE8A y PDE10A tanto en situación de alta como en baja glucosa [24].

- **Resveratrol:** Es un polifenol que se puede encontrar en cacahuetes, uvas y bayas. Mejora la sensibilidad a la insulina y la hiperglucemia con el mismo mecanismo explicado en la cúrcuma. En el mismo ensayo experimental que la cúrcuma, se evidenció que en tanto en células β MIN-6 como en islotes humanos se reducían la expresión de PDE3B, PDE8A y PDE10A, tanto en bajas como altas condiciones de glucosa, y aumentando por tanto los niveles de cAMP intracelulares. Las PDE hidrolizan las uniones fosfodiéster de cAMP, degradándola; siendo cAMP un segundo mensajero importante en la secreción de insulina mediada por glucosa e incretinas como se explicó anteriormente [24].

Los siguientes ejemplos se basan en estudios de tratamientos de productos naturales, que producen un aumento en la proliferación de células β como diana terapéutica en DM:

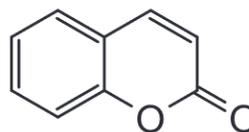
- **Epoxykukulide:** Es un furanocembranólido, purificado del coral blando *Sinularia asterolobata* [25]. En un estudio experimental de modelos de ratón diabéticos inducidos con streptozotocina (STZ), se demostró una mejora en la tolerancia a la glucosa y los niveles plasmáticos de insulina, además de protección de la muerte de células β . Se compararon grupos de ratones control con ratones diabéticos inducidos por STZ, tratados y no tratados con epoxykukulide durante 30 días. El peso y las glucemias fueron similares en ambos grupos antes de tratar con STZ. Tras usar STZ: la reducción de células β pancreáticas respecto al control no diabético fue menor (30%) en el grupo tratado con epoxykukulide respecto al grupo sin tratar, se observó un aumento de la proliferación (100%) en células β de animales tratados con epoxykukulide respecto a los no tratados. Por último, en el grupo tratado con epoxykukulide se observó el doble de insulina circulante en condición postprandial, lo que resultó en una mejora de la tolerancia a la glucosa [26]. Su mecanismo de acción se ha reportado tanto en líneas celulares β pancreáticas como en cultivos primarios de célula β , siendo el mecanismo molecular la activación de vías de señalización ERK1/2 (implicado en la proliferación de célula β) y la regulación al alza de las ciclinas D2 y E (mediante la fosforilación de pRb permitiendo continuar el ciclo celular en la interfase G1/S) [25,26].
- **Leptolide:** Es un miembro de la familia de los furanocembranólidos. En varios estudios se ha demostrado su capacidad de aumentar la proliferación de células β pancreáticas *in vitro*, en líneas celulares y en cultivos primarios de roedores [27]. Además, en ratones obesos se describió mejoría de la microgliosis y reducción de la astrocitosis por su efecto antiinflamatorio [28]. En un estudio con líneas celulares de hepatocarcinoma HepG2 y modelos de ratones C57Bl6J, se reportó una mejoría en la sensibilidad a la insulina *in vitro* e *in vivo* en ambos modelos. En las células de la línea HepG2 tratadas con leptolide mejoró la sensibilidad a insulina tanto basal como en resistencia a la insulina inducida por palmitato, respecto a células de la misma línea sin tratar. En ratones C57Bl6J obesos tratados con leptolide de forma crónica se demostró una mejoría en la tolerancia a la glucosa, se redujeron los niveles circulantes de insulina, los triglicéridos, la interleucina 6, los niveles de leptina y se observó una pérdida de peso respecto a sus controles. En muestras de hígado y músculo de

ratones obesos, se observó que en el grupo tratado mejoró la señalización de la insulina, puesto que leptolide fue capaz de aumentar la fosforilación de proteína quinasa serina/treonina AKT (PKB), diana principal de la transducción de la señal de insulina por vía canónica [27].

- **Cloro-furanocembránolido, Rubifolide y Scabrolide:** Son moléculas obtenidas del género de octocorales *Leptogorgia*. Estudios realizados con estos compuestos, utilizando como modelo la línea celular de insulinoma de rata INS-1, han demostrado tener la capacidad de aumentar la proliferación de dichas células β pancreáticas de forma muy significativa [29].

Cumarinas

Las cumarinas, cuya estructura básica es 1,2-benzopirona (**figura 3**), son metabolitos derivados de plantas (sobre todo en las angiospermas), de bacterias y hongos. Estas moléculas han sido utilizadas como remedios tradicionales en diferentes culturas alrededor del mundo, y han sido objeto de estudio en diferentes enfermedades como patologías óseas líticas [30] o linfedema asociado a cáncer de mama [31]. Además, pertenecen a la familia de anticoagulantes antagonistas de la vitamina K, como son la warfarina, el acenocumarol, y el fenprocumón [32].



Coumarin

Figura 3: Estructura de la cumarina. Tomado de “Tavares SJS, Lima V. Bone anti-resorptive effects of coumarins on RANKL downstream cellular signaling: a systematic review of the literature. *Fitoterapia*. 2021”.

Por otro lado, se han realizado estudios experimentales con las cumarinas en el área de investigación de la DM [33,34]. Por ejemplo, se observó la capacidad inhibitoria de derivados cumarínicos sobre la α -glucosidasa *in vitro* [35]; y se objetivó que la pteryxina, derivada de la piranocumarina, tiene efecto inhibitorio sobre SGLT-1 en la línea celular Caco-2 intestinal humana [36], esto puede sugerir un mejor control de la glucemia postprandial. La ficusina, derivado cumarínico de la planta *Ficus Carica*, fue capaz de reducir la glucemia y mejorar la sensibilidad a la insulina en ratas alimentadas con dieta alta en grasa e inducidas a sufrir diabetes mediante STZ. Además, se encontró una expresión mayor de ARNm de GLUT4 (transportador de glucosa 4) y PPAR- γ en el tejido adiposo de las ratas diabéticas tratadas respecto a las no tratadas, lo que podría explicar una mejor captación de glucosa intracelular y mayor sensibilidad a la

insulina respectivamente [37]. Asimismo, se evaluó *in vitro*, la actividad inhibitoria de formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) de un grupo variado de derivados de 3-arilcumarina, describiendo que una proporción relevante de ellos, poseían mayor actividad inhibitoria que la amino guanidina [38]. Los AGEs son fruto de la interacción de la glucosa con proteínas en el contexto de una hiperglucemia crónica, y tienen un papel importante en la patogenia y complicaciones de la diabetes, por lo que sugiere que estos compuestos podrían ayudar a la prevención y tratamiento de la DM [34,38].

Por ende, el objetivo de este estudio experimental es describir si, compuestos cumarínicos producidos por síntesis química tienen propiedades proliferativas en las células β pancreáticas, ya que la bibliografía apoya la capacidad antidiabética de las cumarinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Método de cultivo y mantenimiento de la línea celular

Para el desarrollo experimental del proyecto, se utilizó la línea celular inmortalizada de insulinoma de ratón MIN-6 (RRID: CVCL_0431), obtenida de *American Type Culture Collection* (ATCC, EE. UU.). El medio de cultivo utilizado para su mantenimiento fue: Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco, EE. UU.) suplementado con 25mM D-Glucosa, 14,86% de Suero Fetal Bovino (FBS) (Gibco, Brasil), 1mM de Piruvato Sódico (Gibco, R. U.), 100 UI/ml de Penicilina junto a 100 μ g/ml de Estreptomina (Gibco, EE. UU.), y 0,05 mM de 2-Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Se mantuvieron las células en un incubador a 37°C con un 5% de dióxido de carbono.

Método de Siembra

Para la siembra de células, se retiró el medio de cultivo del frasco de cultivo de 75 mm², se realizaron 2 lavados de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) (Gibco, EE. UU.), posteriormente se aplicaron 2 ml de 0,05% tripsina-EDTA (Gibco, EE. UU.) durante 5 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con 8 ml de medio de cultivo. De esta solución, 10 μ l se usaron para la cuantificación del número células mediante la Cámara de Neubauer. Se sembraron 50.000 células por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos para llevar a cabo los experimentos. Las células se mantuvieron en medio cultivo durante las 48 horas previas al tratamiento, para asegurar su correcta diferenciación.

Origen y preparación de los compuestos testados

Los productos que se utilizaron son derivados cumarínicos sintetizados químicamente, cuyas estructuras se muestran en la **figura 4** [39]. La colección de cumarinas fue cedida por la Dra. Ana Raquel Díaz Marrero del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC (IPNA-CSIC). Los productos se han conservado a -20°C para preservar su estructura y propiedades.

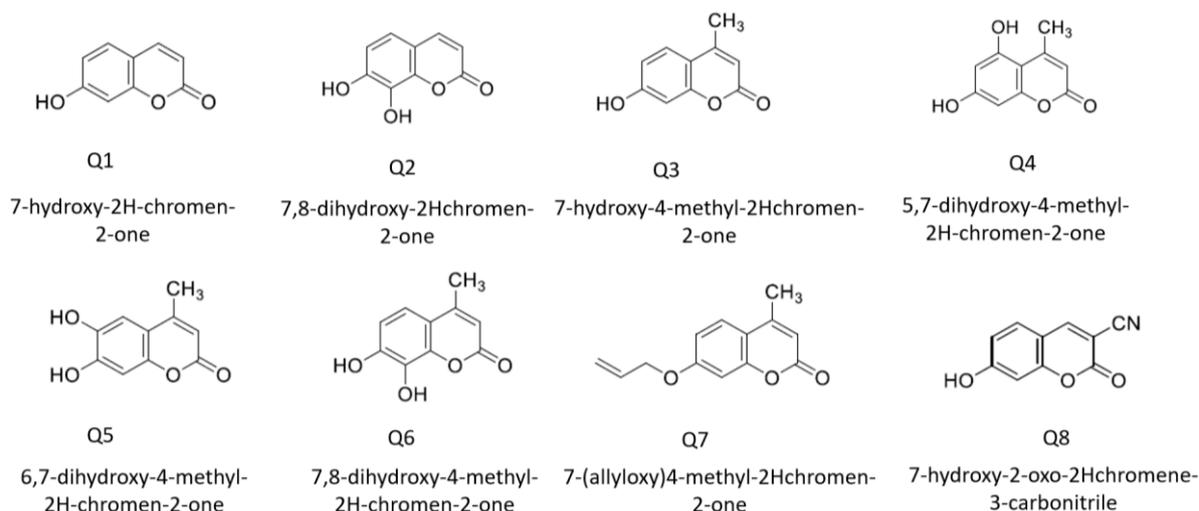


Figura 4: Cumarinas obtenidas por síntesis química, nombradas de Q1 a Q8. Modificado de “Guerrero T, Vázquez-Ortega F, Lagunes I, Ortiz-Blanco E, Sosa-Ortiz G, Tovar-Miranda R, et al. Antagonistic activity of hydroxycoumarin-based antioxidants as possible singlet oxygen precursor photosensitizers. *Dyes and Pigments*. 2021”.

Tratamiento *in vitro* de la línea celular MIN-6 con derivados cumarínicos

Los productos sintéticos se resuspendieron en DMSO (dimetilsulfóxido) a una concentración final de 25mM. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas en medio de cultivo para obtener las concentraciones de interés (0,1-1 μM). Las células se lavaron con 100 μl de DPBS previo al tratamiento, con el fin de eliminar los restos de medio de cultivo. Como control se llevaron en paralelo, células en medio y células en medio con vehículo (DMSO), para asegurar que éste no afectaba a la viabilidad del cultivo. Las células se mantuvieron con los tratamientos (Q1-Q8) durante 24 horas, antes de realizar el ensayo de viabilidad celular (ensayo de MTT).

Ensayo de viabilidad celular (ensayo de MTT)

Para medir la viabilidad celular por tratamiento, se utilizó el ensayo basado en MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Merck, EE. UU.) a 1 mg/ml diluido en medio de cultivo. El ensayo de MTT consiste en una medida indirecta de la viabilidad celular mediante la cuantificación del potencial de reducción intracelular del MTT. El MTT es una sal soluble en agua que, por su carga positiva y su carácter lipofílico, es capaz de penetrar en la membrana plasmática y mitocondrial. Una vez el MTT entra en la célula, se lleva a cabo la reacción de reducción a cristales morados de formazán, principalmente por la coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NADH), la cual forma parte de la fosforilación oxidativa mitocondrial y es producto de la glucólisis citoplasmática. Posteriormente, se solubilizan los cristales con DMSO, permitiendo determinar en un lector de microplacas, la absorbancia de formazán por colorimetría alrededor de una longitud de onda de 570 nm (**figura 5**). De esta manera, dependiendo del experimento a realizar, el ensayo de MTT ha sido utilizado en la literatura científica para medir citotoxicidad farmacológica, actividad metabólica/mitocondrial celular, y en nuestro caso viabilidad/proliferación celular [40–42] .

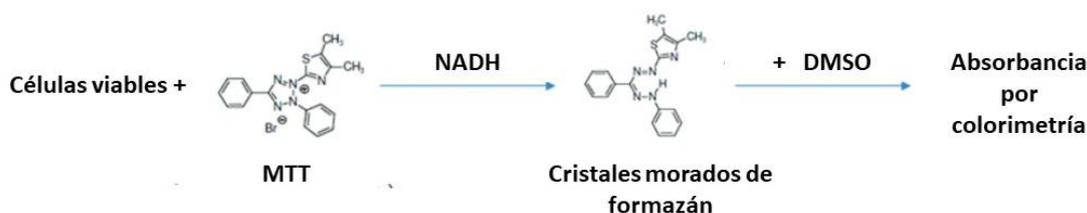


Figura 5: Reacciones bioquímicas en el ensayo de MTT. Modificado de “*Buranaamnuay K. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols, Open Veterinary Journal. 2021*”.

Tras 24 horas de tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se aplicaron 100 µl de MTT disuelto en medio de cultivo (1mg/ml) en cada pocillo. Se incubaron las células en esta solución durante 3 horas en el incubador. Tras el tiempo de incubación, se retiró el medio y se aplicó como disolvente 10g/ml de DMSO (Sigma, EE. UU.) y se homogeneizó la solución final. Posteriormente se utilizó un lector de microplacas *Tecan GENios Pro Multifunction Microplate Reader System* (Holanda) para obtener la absorbancia a 570 nm de cada condición (**figura 6**).

Una vez obtenida la absorbancia, este valor se normaliza respecto a los valores control.

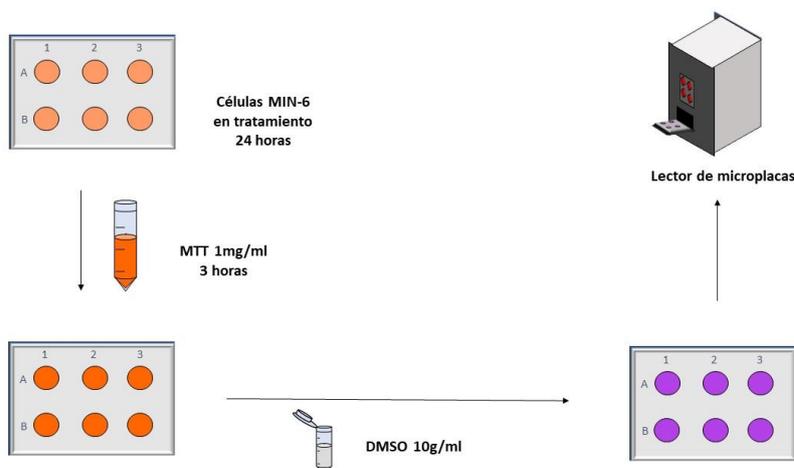


Figura 6: Representación esquematizada del protocolo de ensayo de MTT.

Método estadístico

Para evaluar la distribución estadística de la muestra, se utilizó la *prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnoff*. Si los datos eran paramétricos se usó *Ordinary One-Way Anova test Multiple Comparison*, por el contrario, si no fueron paramétricos se utilizó *Kruskall-Wallis test Multiple Comparison*. Se consideró estadísticamente significativo un $p < 0.05$ (95% de confianza). El programa estadístico utilizado fue *GraphPad Prism 8.0.1*.

RESULTADOS

1. Cribado de la concentración de elección para los compuestos a evaluar

Se evaluó el efecto, sobre la viabilidad celular de la línea β -pancreática MIN-6, de 8 compuestos cumarínicos nombrados como Q1-Q8 de estructura conocida.

Antes de comenzar a probar estos productos sintéticos cumarínicos, se realizó un cribado de concentraciones del producto más simple, Q1 o también nombrado en la literatura científica como Umbeliferona [33,38], y se verificó su citotoxicidad mediante ensayo MTT. Dicho cribado, nos permitió elegir la concentración más adecuada para testar el resto de los productos.

Como se puede observar en la **figura 7**, el producto Q1 no resulta tóxico en ninguna concentración testada respecto al control, tampoco aumenta la viabilidad celular, por tanto, se decidió utilizar la concentración 0,1 μ M, ya que es la concentración más baja en la que no se observa una acción citotóxica.

Los dos controles utilizados fueron medio solo (control) o medio con DMSO (10 μ M), para descartar la citotoxicidad del vehículo en el que están solubilizados los compuestos.

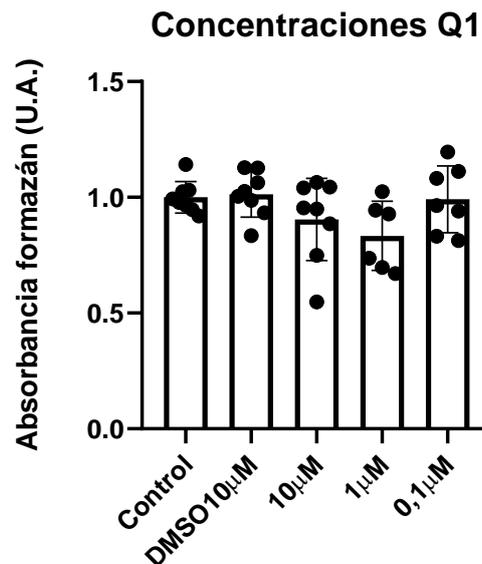


Figura 7: Cuantificación de viabilidad celular mediante ensayo de MTT, de células MIN-6 en tratamiento con Q1, con una duración del tratamiento de 24 horas, y MTT de 3 horas, 2 experimentos por cuadruplicado. *Ordinary One-Way Anova test Multiple Comparison* $p < 0,05$.

2. Evaluación del efecto de compuestos cumarínicos sobre la viabilidad celular en células β pancreáticas

Una vez elegida la concentración no tóxica para evaluar todos los compuestos, se procedió a realizar el tratamiento a las células MIN-6 a 0,1 μ M siguiendo el mismo protocolo experimental que en el cribado de concentraciones (sección material y métodos). En esta evaluación se estableció como control la condición “vehículo” (medio de cultivo suplementado con DMSO 0,1 μ M), ya que en el cribado de concentraciones mostró una viabilidad similar al control (medio de cultivo). No observamos diferencias en la viabilidad celular de las células β pancreáticas, después del tratamiento de 24 horas con cada uno de los compuestos (**figura 8**).

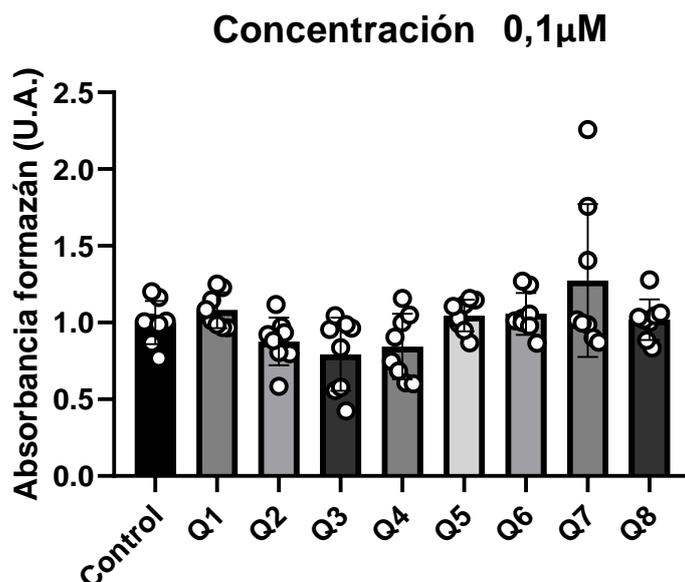


Figura 8: Cuantificación de viabilidad celular mediante ensayo de MTT, de células MIN-6 en tratamiento con Q1-Q8 a 0,1 μ Molar, con una duración del tratamiento de 24 horas, y MTT de 3 horas, 2 experimentos por cuadruplicado. *Kruskal–Wallis test Multiple Comparison* p valor <0.05.

Nuestro siguiente paso después de no observar cambios a la concentración 0,1 μ M, fue testar la viabilidad celular en respuesta al tratamiento en 24 horas de los compuestos cumarínicos a mayor concentración. Elegimos la concentración 1 μ M que se había demostrado seguro en el cribado de concentraciones.

Tras aumentar la concentración de los compuestos, observamos que Q8 disminuye de forma significativa la viabilidad celular comparada con el control. Además, la viabilidad celular de las células tratadas con Q2, Q6 y Q7 tiende a disminuir, aunque no sea estadísticamente significativo (**figura 9**).

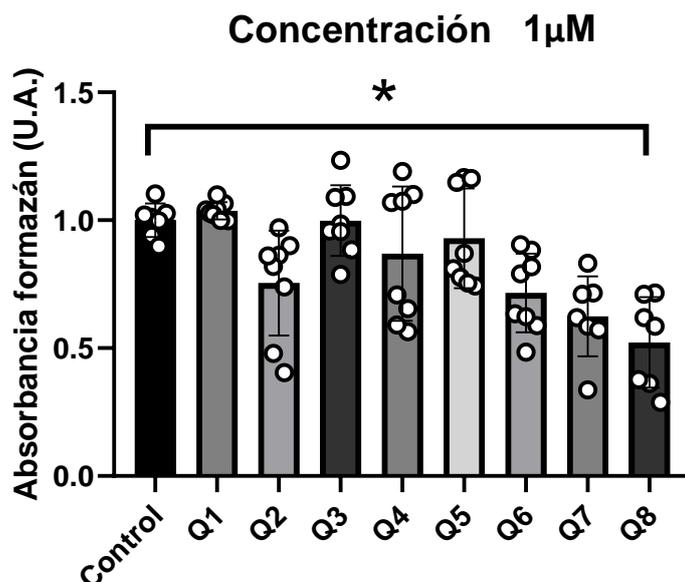


Figura 9: Cuantificación de viabilidad celular mediante ensayo de MTT, de células MIN-6 en tratamiento con Q1-Q8 a 1 μ Molar, con una duración del tratamiento de 24 horas, y MTT de 3 horas, 2 experimentos por cuadruplicado. *Kruskal–Wallis test Multiple Comparison* $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad con una alta prevalencia, 537 millones en 2021, y con un aumento de prevalencia estimado en 783 millones. Su mortalidad y sus complicaciones micro y macrovasculares, son datos importantes a tener en cuenta del gran interés que supone esta enfermedad en la población [1,2]. Por este motivo, la comunidad científica dedica un gran esfuerzo en la búsqueda de nuevos tratamientos en la DM.

Por su parte, las cumarinas han formado parte de la medicina tradicional en diversas culturas, así como de numerosos estudios tanto preclínicos como clínicos en distintas áreas, incluyendo la DM2 [30–34]. Por consiguiente, resulta interesante probar si estos compuestos también poseen propiedades antidiabéticas a nivel celular como la proliferación de células β pancreáticas, con objeto de hallar nuevas moléculas con potencial farmacológico en el tratamiento de la diabetes.

Se han identificado más de 1.300 cumarinas y se ha reportado que patrones de sustitución alteran sus propiedades bioquímicas y farmacológicas [30]. El uso de estos compuestos como agentes terapéuticos tiene su complejidad, por ejemplo, si nos centramos en las cumarinas antagonistas de la vitamina K, su uso en pacientes es individualizado. Esto es debido a que poseen una ventana terapéutica pequeña (dosis bajas no protegen eficazmente de tromboembolismo, y dosis altas favorecen hemorragias), la toma de

fármacos puede interferir con el metabolismo de estas cumarinas (enzima CYP2C9), así como polimorfismos en CYP2C9 y VKORC1 (Subunidad 1 del Complejo Epóxido Reductasa de la Vitamina K) replantean modificar la dosis del fármaco para alcanzar el efecto deseado con menor efectos adversos posibles [32].

El uso complejo de estas cumarinas podría explicar el efecto citotóxico del compuesto Q8 que hemos observado al aumentar su concentración, de 0,1 μ M a 1 μ M. Posiblemente tenga un comportamiento parecido a las cumarinas antagonistas de la vitamina K, y al elevar la dosis de este compuesto conlleva efectos adversos no deseados. Otro dato a tener en cuenta es la estructura química del producto Q8, puesto que posee un radical carbonitrilo en el carbono 3 (**figura 10**) [39], un radical que el resto del grupo de cumarinas testadas no poseen (**figura 4**), y que podría ser un motivo que explicase su citotoxicidad. Este razonamiento podría ser aplicado a los compuestos Q2, Q6 y Q7, sin embargo, no es significativo su disminución de viabilidad.

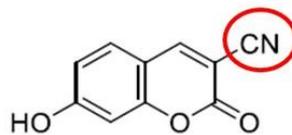


Figura 10: Radical carbonitrilo señalado en el compuesto Q8. Modificado de “Guerrero T, Vázquez-Ortega F, Lagunes I, Ortiz-Blanco E, Sosa-Ortiz G, Tovar-Miranda R, et al. Antagonistic activity of hydroxycoumarin-based antioxidants as possible singlet oxygen precursor photosensitizers. *Dyes and Pigments*. 2021”.

Para poder entender el mecanismo de acción del producto Q8 sería interesante aplicar otras técnicas más específicas que el ensayo MTT.

Por ejemplo, el ensayo de Sulforhodamina B, una técnica de enumeración celular independiente del estado funcional de las células, cuantifica el número total de proteínas celulares, siendo una técnica muy sensible para detectar cambios en el número de células [43]. Aplicando este procedimiento, podríamos evaluar si el descenso de la viabilidad celular observado con el tratamiento Q8 está relacionado con un descenso en el número de células final. Asimismo, se podría usar la técnica de marcaje TUNEL, puesto que es específica de células apoptóticas [26], con la intención de poder relacionar la disminución de viabilidad celular con la apoptosis.

Dado que el producto Q8 disminuye la viabilidad celular, puede resultar interesante sus propiedades en el área oncológica, no siendo el único compuesto cumarínico enfocado en patología tumoral, puesto que ya

existen estudios donde se señalan propiedades antineoplásicas en las cumarinas como son el complejo paladio-cumarina II [44] y la cumarina isoprenilada [45].

El tumor, en el cual se podría enfocar el estudio del producto Q8 sería el insulinoma, debido a que se ha testado con células β pancreáticas de insulinoma de ratón. La primera línea de tratamiento de esta neoplasia es la cirugía, y el manejo de las hipoglucemias previo a cirugía se lleva cabo mediante un plan alimenticio y el uso de diazóxido o análogos de somatostatina. Para aquellos pacientes que no sean candidatos a la cirugía, se puede emplear Everolimus (inhibidor de mTOR), ablación con etanol por endoscopia o ablación por radiofrecuencia guiada por TAC (tomografía computerizada) entre otras opciones [15,46]. Dado los resultados de la viabilidad celular de Q8, resulta interesante como este compuesto podría ayudar en el tratamiento del insulinoma alternativo a la cirugía, sin embargo, es necesario más estudios que apoyen esta hipótesis.

CONCLUSIÓN

- Los productos cumarínicos testados en este estudio, no muestran propiedades proliferativas sobre las células β pancreáticas, según las mediciones de MTT.
- El producto Q8 muestra potencial citotóxico sobre las células β pancreáticas de insulinoma de ratón, y por esta razón, sería interesante profundizar en los mecanismos de acción y aplicaciones de este compuesto.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus [Internet]. World Health Organization; 1999 [citado 2022 oct 12]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66040>
2. Home, Resources, diabetes L with, Acknowledgement, FAQs, Contact, et al. IDF Diabetes Atlas | Tenth Edition [Internet]. [citado 2022 oct 12]; Available from: <https://diabetesatlas.org/>
3. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. *Int J Med Sci* 2014;11:1185-200.
4. Kolb H, Martin S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Med* 2017;15:131.

5. Laakso M. Biomarkers for type 2 diabetes. *Mol Metab* 2019;27:S139-46.
6. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, et al. A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants. *Science* 2007;316:1341-5.
7. Dolenšek J, Rupnik MS, Stožer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* 2015;7:e1024405.
8. Seshadri N, Doucette CA. Circadian Regulation of the Pancreatic Beta Cell. *Endocrinology* 2021;162:bqab089.
9. Campbell JE, Newgard CB. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021;22:142-58.
10. Rahman MS, Hossain KS, Das S, Kundu S, Adegoke EO, Rahman MdA, et al. Role of Insulin in Health and Disease: An Update. *Int J Mol Sci* 2021;22:6403.
11. Beta-Cell Mass in Obesity and Type 2 Diabetes, and Its Relation to Pancreas Fat: A Mini-Review - PMC [Internet]. [citado 2022 oct 4]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7766247/>
12. Remedi MS, Emfinger C. Pancreatic β -Cell Identity in Diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2016;18:110-6.
13. Capodanno Y, Buishand FO, Pang LY, Kirpensteijn J, Mol JA, Elders R, et al. Transcriptomic analysis by RNA sequencing characterises malignant progression of canine insulinoma from normal tissue to metastatic disease. *Sci Rep* 2020;10:11581.
14. Sada A, Yamashita TS, Glasgow AE, Habermann EB, Thompson GB, Lyden ML, et al. Comparison of benign and malignant insulinoma. *The American Journal of Surgery* 2021;221:437-47.
15. Walker MP, Shenoy V, Metz DC, Stanley CA, Fraker D, Chandrasekhara V, et al. Case presentation of 8-year follow up of recurrent malignant duodenal Insulinoma and lymph node metastases and literature review of malignant Insulinoma management. *BMC Endocr Disord* 2022;22:310.
16. Zhan HX, Cong L, Zhao YP, Zhang TP, Chen G, Zhou L, et al. Activated mTOR/P70S6K signaling pathway is involved in insulinoma tumorigenesis. *Journal of Surgical Oncology* 2012;106:972-80.
17. Blonde L, Umpierrez GE, Reddy SS, McGill JB, Berga SL, Bush M, et al. American Association of Clinical Endocrinology Clinical Practice Guideline: Developing a Diabetes Mellitus Comprehensive Care Plan—2022 Update. *Endocrine Practice* 2022;28:923-1049.
18. Comprehensive Type 2 Diabetes Management Algorithm (2020) - EXECUTIVE SUMMARY | American Association of Clinical Endocrinology [Internet]. [citado 2022 oct 19]; Available from:

<https://pro.aace.com/disease-state-resources/diabetes/clinical-practice-guidelines-treatment-algorithms/comprehensive>

19. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal* 2021;42:3599-726.
20. Allen RW, Schwartzman E, Baker WL, Coleman CI, Phung OJ. Cinnamon Use in Type 2 Diabetes: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Fam Med* 2013;11:452-9.
21. Watanabe S, Okoshi H, Yamabe S, Shimada M. Moringa oleifera Lam. in Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Molecules* 2021;26:3513.
22. Ousaaid D, Laaroussi H, Mechchate H, Bakour M, El Ghouizi A, Mothana RA, et al. The Nutritional and Antioxidant Potential of Artisanal and Industrial Apple Vinegars and Their Ability to Inhibit Key Enzymes Related to Type 2 Diabetes In Vitro. *Molecules* 2022;27:567.
23. Pivari F, Mingione A, Brasacchio C, Soldati L. Curcumin and Type 2 Diabetes Mellitus: Prevention and Treatment. *Nutrients* 2019;11:1837.
24. Rouse M, Younès A, Egan JM. Resveratrol and curcumin enhance pancreatic β -cell function by inhibiting phosphodiesterase activity. *J Endocrinol* 2014;223:107-17.
25. Epoxypukalide Induces Proliferation and Protects against Cytokine-Mediated Apoptosis in Primary Cultures of Pancreatic β -Cells - PMC [Internet]. [citado 2022 oct 5]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3534672/>
26. López-Acosta JF, Villa-Pérez P, Fernández-Díaz CM, Román D de L, Díaz-Marrero AR, Cueto M, et al. Protective effects of epoxypukalide on pancreatic β -cells and glucose metabolism in STZ-induced diabetic mice. *Islets* 2015;7:e1078053.
27. Villa-Pérez P, Cueto M, Díaz-Marrero AR, Lobatón CD, Moreno A, Perdomo G, et al. Leptolide Improves Insulin Resistance in Diet-Induced Obese Mice. *Mar Drugs* 2017;15:289.
28. Corraliza-Gómez M, Gallardo AB, Díaz-Marrero AR, de la Rosa JM, D’Croz L, Darias J, et al. Modulation of Glial Responses by Furanocembranolides: Leptolide Diminishes Microglial Inflammation in Vitro and Ameliorates Gliosis In Vivo in a Mouse Model of Obesity and Insulin Resistance. *Mar Drugs* 2020;18:E378.

29. Gallardo AB, Díaz-Marrero AR, de la Rosa JM, D'Cross L, Perdomo G, Cózar-Castellano I, et al. Chloro-Furanocembranolides from *Leptogorgia* sp. Improve Pancreatic Beta-Cell Proliferation. *Mar Drugs* 2018;16:49.
30. Tavares SJS, Lima V. Bone anti-resorptive effects of coumarins on RANKL downstream cellular signaling: a systematic review of the literature. *Fitoterapia* 2021;150:104842.
31. Sheikhi-Mobarakeh Z, Yarmohammadi H, Mokhatri-Hesari P, Fahimi S, Montazeri A, Heydarirad G. Herbs as old potential treatments for lymphedema management: A systematic review. *Complementary Therapies in Medicine* 2020;55:102615.
32. Verhoef TI, Redekop WK, Daly AK, van Schie RMF, de Boer A, Maitland-van der Zee AH. Pharmacogenetic-guided dosing of coumarin anticoagulants: algorithms for warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. *Br J Clin Pharmacol* 2014;77:626-41.
33. Randelović S, Bipat R. A Review of Coumarins and Coumarin-Related Compounds for Their Potential Antidiabetic Effect. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes* 2021;14:11795514211042024.
34. Pan Y, Liu T, Wang X, Sun J. Research progress of coumarins and their derivatives in the treatment of diabetes. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2022;37:616-28.
35. Taha M, Shah SAA, Afifi M, Imran S, Sultan S, Rahim F, et al. Synthesis, α -glucosidase inhibition and molecular docking study of coumarin based derivatives. *Bioorganic Chemistry* 2018;77:586-92.
36. Oranje P, Gouka R, Burggraaff L, Vermeer M, Chalet C, Duchateau G, et al. Novel natural and synthetic inhibitors of solute carriers SGLT1 and SGLT2. *Pharmacol Res Perspect* 2019;7:e00504.
37. Irudayaraj SS, Stalin A, Sunil C, Duraipandiyan V, Al-Dhabi NA, Ignacimuthu S. Antioxidant, antilipidemic and antidiabetic effects of ficusin with their effects on GLUT4 translocation and PPAR γ expression in type 2 diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions* 2016;256:85-93.
38. Hu Y, Wang B, Yang J, Liu T, Sun J, Wang X. Synthesis and biological evaluation of 3-arylcoumarin derivatives as potential anti-diabetic agents. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2018;34:15-30.
39. Guerrero T, Vázquez-Ortega F, Lagunes I, Ortiz-Blanco E, Sosa-Ortiz G, Tovar-Miranda R, et al. Antagonistic activity of hydroxycoumarin-based antioxidants as possible singlet oxygen precursor photosensitizers. *Dyes and Pigments* 2021;192:109447.
40. Buranaamnuay K. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. *Open Vet J* 2021;11:251-69.
41. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci* 2021;22:12827.

42. Pascua-Maestro R, Corraliza-Gomez M, Diez-Hermano S, Perez-Segurado C, Ganfornina MD, Sanchez D. The MTT-formazan assay: Complementary technical approaches and in vivo validation in *Drosophila* larvae. *Acta Histochemica* 2018;120:179-86.
43. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes* 2015;8:47.
44. Krstic A, Pavic A, Avdovic E, Markovic Z, Stevanovic M, Petrovic I. Coumarin-Palladium(II) Complex Acts as a Potent and Non-Toxic Anticancer Agent against Pancreatic Carcinoma Cells. *Molecules* 2022;27:2115.
45. Zhou R, Kusaka E, Wang Y, Zhang J, Webb A, Carrico-Moniz D. Isoprenylated Coumarin Exhibits Anti-proliferative Effects in Pancreatic Cancer Cells Under Nutrient Starvation by Inhibiting Autophagy. *Anticancer Research* 2022;42:2835-45.
46. Giannis D, Moris D, Karachaliou GS, Tsilimigras D, Karaolani G, Papalampros A, et al. Insulinomas: from diagnosis to treatment. A review of the literature. *J BUON* 2020;25:1302-14.

Búsqueda de nuevas moléculas para la regeneración de las células productoras de insulina

Autor: Manuel Mellina Vicente

Tutoras: Dra. Irene Cózar Castellano y Dra. Beatriz Merino Antolín

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica que se caracteriza por una hiperglucemia crónica, afectando además al metabolismo de lípidos y proteínas. Su importancia radica en su elevada prevalencia y las complicaciones que puede causar a largo plazo como por ejemplo, enfermedades cardiovasculares. La fisiopatología se centra en la insulina, hormona producida en las células β del páncreas endocrino, siendo el defecto en la secreción por las células β o en la acción de la misma sobre los tejidos periféricos las principales causantes. Por otra parte, los compuestos de la familia de las cumarinas han sido objeto de estudio en el área de la diabetes mellitus, sugiriendo un potencial antidiabético, tanto en la sensibilidad a la insulina como en la regulación de glucemia postprandial.

OBJETIVO

Describir si 8 compuestos cumarínicos producidos por síntesis química, poseen propiedades proliferativas sobre las células β pancreáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

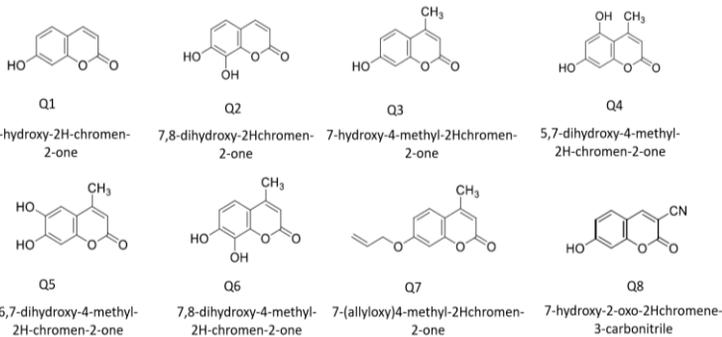


Figura 1: Derivados cumarínicos por síntesis química nombrados de Q1-Q8.

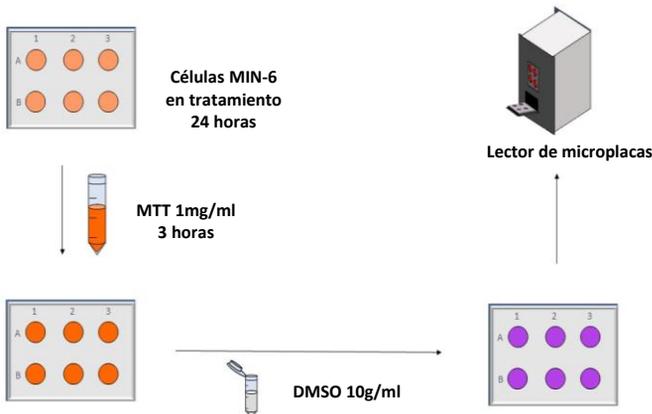


Figura 2: Protocolo esquematizado del ensayo de MTT.

CONCLUSIONES

- Estos productos cumarínicos no muestran propiedades proliferativas sobre células β pancreáticas mediante ensayo de MTT.
- El producto Q8 posee potencial citotóxico sobre las células β pancreáticas de insulinoma ratón, lo que resultaría interesante estudiar su mecanismo de acción y sus posibles aplicaciones, en particular el insulinoma.

RESULTADOS

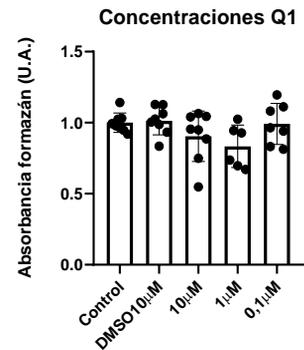


Figura 3: Cribado de concentraciones.

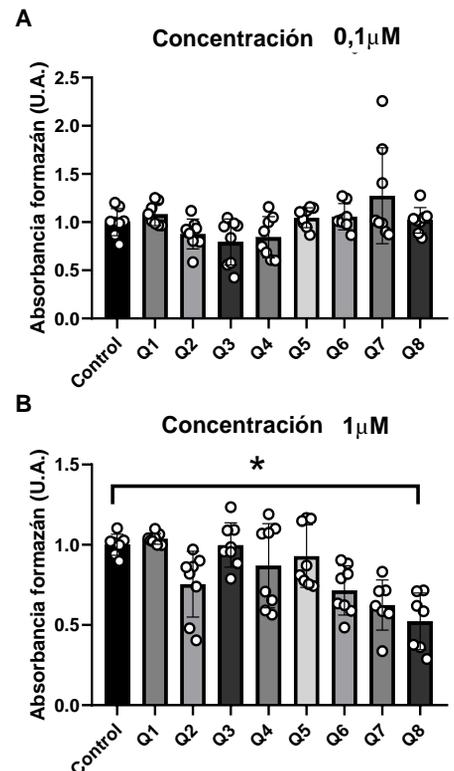


Figura 4: Evaluación del efecto.