



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR Y FISIOLÓGIA

TESIS DOCTORAL:

Búsqueda de dianas terapéuticas en la célula beta-pancreática para el tratamiento de la diabetes

Presentada por José Francisco López Acosta
para optar al grado de

Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dra. Irene Cózar Castellano

Dr. Germán Perdomo Hernández

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Biología y Genética Molecular-Dpto. Bioquímica y Fisiología (Universidad de Valladolid) y en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Puerta del Mar (Cádiz). Ha sido financiado por los siguientes proyectos:

- Instituto de Salud Carlos III (PS09/00671)
- Marie Curie Actions-IRG/FP7 (IRG-247835)
- Servicio Andaluz de Salud (PI-0256/2009)

Del trabajo realizado se han obtenido las siguientes publicaciones que se adjuntan íntegramente en el apartado denominado Anexo:

- **López-Acosta JF**, Moreno-Amador JL, Jiménez-Palomares M, Díaz-Marrero AR, Cueto Mercedes, Perdomo G, Cózar-Castellano I. *Epoxy-pukalide induces proliferation and protects against cytokine-mediated apoptosis in primary cultures of pancreatic beta-cells*. PLOS ONE. 2013;8(1):10.

ÍNDICE (ÍNDIX)

1) ABBREVIATIONS.....	8
2) SUMMARY.....	13
3) INTRODUCTION.....	16
1.- Diabetes Mellitus.....	16
1.1.- Type 1 Diabetes Mellitus.....	17
1.2.- Type 2 Diabetes Mellitus.....	18
2.- Pancreatic islets and the beta-cell.....	19
2.1.- Function and life cycle of the beta-cell under physiological conditions.....	20
2.2.1.- Insulin.....	20
2.2.2.- Glucose.....	22
2.2.3.- Signalling pathways and cell cycle regulation of the beta-cell.....	23
2.2.- Dysfunction and life cycle of the beta-cell under pathophysiological conditions.....	29
2.2.1.- Glycolipotoxicity.....	31
2.2.2.- Cytokines.....	32
3.- Insulin-degrading enzyme (IDE).....	34
4.- Current treatments.....	37
4.1.- Natural products.....	39
4) AIMS.....	43
5) MATERIAL AND METHODS.....	45
1.- Cell cultures.....	45
1.1.- Cell lines.....	45
1.2.- Primary cultures of pancreatic islets.....	45
2.- Loss-of-function studies.....	46
2.1.- Cell transfection with RNAi.....	46
2.2.- IDE activity inhibition.....	47
3.- Protein expression analysis by Western-Blot.....	47
4.- Cell proliferation study.....	49
4.1.- BrdU incorporation.....	49

4.1.1.-In cell lines.....	49
4.1.2.-In pancreatic islets.....	50
4.2.- Tritiated thymidine incorporation.....	51
5.- Pancreatic beta-cell death.....	51
5.1.- TUNEL.....	51
5.2.- Active-caspase 3.....	52
6.- Pancreatic beta-cell function	52
6.1.- Glucose-stimulated insulin secretion in cell lines.....	52
6.1.1.- C-peptide secretion study	53
6.1.2.- Intracelular insulin and proinsulin content	53
6.2.- Glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets.....	53
7.- Protein expression by immunostaining.....	53
7.1.- Pancreas extraction, fixation and inclusion in paraffin.....	53
7.2.- Pancreatic islets extraction, fixation and inclusion in paraffin	54
7.3.- Protein localization by immunostaining.....	54
8.- Gene expression by RT-PCR.....	56
9.- Statistics.....	59
6) RESULTS.....	61
1.- Effects of a collection of natural products on the pancreatic beta-cell.....	61
1.1.- Screening of a collection of marine products.....	61
1.2.- Effect of epoxykukalide on proliferation of primary cultures of pancreatic beta-cells.....	62
1.3.- Activation of signalling pathways by epoxykukalide.....	65
1.4.- Induction of cell cycle activators induced by epoxykukalide.....	65
1.5.- Effect of epoxykukalide on basal and cytokine-induced beta-cell death.....	68
1.6.- Effect of epoxykukalide on pancreatic beta-cell function.....	70
2.- Role of IDE in beta-cell function	72
2.1.- Pathophysiological conditios.....	72

2.1.1.- Effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on IDE expression levels in pancreatic beta-cells.....	72
2.1.2.- Effect of high concentrations of fatty acids on IDE expression levels in pancreatic beta-cell.....	80
2.2.- Physiological conditions.....	81
2.2.1.- Effect of IDE loss-of-expression in pancreatic beta-cells.....	81
2.2.2.- Effect of pharmacological inhibition of IDE in pancreatic beta-cells.....	85
7) DISCUSSION.....	88
7.1.- Study of a collection of marine products in the pancreatic beta-cell.....	88
7.2.- Role of IDE in the pancreatic beta-cell.....	94
8) CONCLUTIONS.....	100
9) REFERENCES.....	102
10) APPENDIX.....	112

ABREVIATURAS

AC/PKA = adenilil ciclasa/proteína quinasa A

Act = actina

AD = Enfermedad de Alzheimer

ADNc = ADN complementario

Ad = Adenovirus

AKT = Proteína quinasa B

ARN = ácido ribonucleico

ARNi = ácido ribonucleico interferente

ARNm = ácido ribonucleico mensajero

BrdU = 5-bromo-2-desoxiuridina

Cdk = quinasas dependientes de ciclinas

col. = colaboradores

CQs = citoquinas proinflamatorias

CRP = Proteína C reactiva

DAPI = 4', 6-diamidino-2-fenilindol

db/db = Ratón deficiente en el receptor de leptina

DM = Diabetes Mellitus

DM2 = Diabetes Mellitus de tipo 2

DM1 = Diabetes Mellitus de tipo 1

EGF = Factor de crecimiento epidérmico

ERK1/2 = Quinasa regulada por señales extracelulares

FFA = ácidos grasos libres

FTY-720 = Modulador del receptor de esfingosina-1-fosfato

GH = Hormona del crecimiento

GK = Glucoquinasa

Glut2 = Transportador de glucosa tipo 2

GLP-1 = Péptido similar al glucagón tipo 1

GSK3= Glucógeno sintasa-quinasa 3

GSIS = Secreción de insulina estimulada por glucosa

HDAC = Histona desacetil ciclasa

HGF = Factor de crecimiento hepático

IAPP = Polipéptido amiloide del islote pancreático

IDE = Enzima degradadora de la insulina

IEq = Islotes equivalentes

IFN- γ = Interferón gamma

IGF = Factor de crecimiento insulínico

IL1 β = Interleuquina 1 beta

IL6 = Interleuquina 6

IL8 = Interleuquina 8

IRS2 = Sustrato del receptor de insulina

JAK = Quinasa de Janus

KATP = Canal de potasio dependiente de ATP

KDa = KiloDalton

Kir6.2 = Subunidad mayor del canal de potasio sensible a ATP

LSB = Laemmli Sample Buffer

MAPK = Proteínas quinasas activadas por mitógeno

MCP-1 = Proteína quimiotáctica del monocito tipo 1

MOI = Multiplicidad de infección

nM = Nanomolar

O/N = Toda la noche

PAI1 = Inhibidor del activador del plasminógeno

pAKT= fosfo-AKT

PCR =Reacción en Cadena de la Polimerasa

pERK1/2 = fosfo-ERK1/2

PI3K = Fosfatidilinositol 3-quinasa

PL = Lactógeno placentario

pRb = Proteína del retinoblastoma

PRL = Prolactina

P/S = Penicilina-estreptomicina

PTHrP = Proteína relacionada con la hormona paratiroidea

r.t. = temperatura ambiente

RES = Estrés de retículo endoplásmico

ROS = Especies reactivas del oxígeno

rpm = Revoluciones por minuto

RT-PCR = PCR a tiempo real

SAHA= Suberoilánilida

SFB = Suero fetal bovino

STAT= Factores de transcripción transductores de señal y activadores de la transcripción

STZ= Estreptozotocina

Sur1 = Subunidad menor del canal de potasio dependiente de ATP

TNF α = Factor de necrosis tumoral alfa

TSA = Tricostatina A

TUNEL = Marcaje in situ del DNA fragmentado (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)

Wnt = Familia de proteínas codificadas por los genes wingles e int-1 ricas en cisteínas

[³H]-T = Timidina tritiada

β -ME = β -Mercaptoetanol

μ Ci = Microcurio

μ M = Micromolar

1,10-Ph = 1,10-fenantrolina

RESUMEN (SUMMARY)

There is an urgency to find new therapeutic targets and effective drugs for diabetes mellitus treatment, to improve glycemic control and diabetes complications. Pancreatic beta-cells viability and function are impaired in the two most common forms of diabetes, type 1 and type 2. Regeneration of functional pancreatic beta-cell mass has been proposed as a potential therapy for diabetes. Therefore, we have proposed two aims, first, the regeneration and protection of pancreatic beta-cell mass; and second, to study proteins that could be crucial for beta-cell function, hence, potential therapeutic targets for diabetes.

In the first part of this thesis project, we screened a collection of marine products looking for beta-cell proliferation induction. One unique compound (epoxypukalide) showed capability to induce beta-cell replication, both in the INS1 832/13 cell line and primary cultures of pancreatic islets. Epoxypukalide was used to study beta-cell proliferation by [³H]thymidine incorporation and BrdU incorporation followed by BrdU/insulin staining in primary cultures of rat islets. AKT and ERK1/2 signalling pathways were analyzed. Cell cycle activators were detected by western-blot. Apoptosis was studied by TUNEL and cleaved caspase 3. Pancreatic beta-cell function was measured by glucose-stimulated insulin secretion (GSIS).

Epoxypukalide induced 2.5-fold increase in beta-cell proliferation; this effect was mediated by activation of ERK1/2 signalling pathway and upregulation of the cell cycle activators, cyclin D2 and cyclin E. Interestingly, epoxypukalide showed protection from basal (40% lower versus control) and cytokine-induced apoptosis (80% lower versus control). Finally, epoxypukalide did not impair beta-cell function when measured by GSIS *in vitro*.

In conclusion, our study showed that epoxypukalide has regenerative and protective properties on the beta-cell. These findings may be translated into new treatments for diabetes.

In the second part, we studied the role of Insulin-degrading enzyme (IDE) in the pancreatic beta-cell under physiologic and pathophysiologic conditions. IDE is an ubiquitous metalloprotease that degrades insulin. It is localized in a susceptibility locus

for type 2 diabetes in humans. At the beginning of this study there were not publications on the role of IDE in the pancreatic beta-cell, and its function was completely unknown.

To this end, we studied IDE expression levels in islets of hyperinsulinemic db/db mice. We measured IDE expression in INS-1E cells and primary cultures of rat islets, under physiological and pathophysiological levels of glucose and insulin. To understand the physiological role of IDE in the pancreatic beta-cell, we used siRNA-IDE in INS-1E cells, and 1,10-Phenantroline (an inhibitor of IDE activity) in rat islets, performing glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) to study beta-cell function. We also studied the expression of proteins involved in the secretory machinery of the beta-cell.

We showed that IDE expression was increased in islets of hyperinsulinemic db/db mice, correlating to plasma insulin levels. IDE expression was markedly downregulated by hyperglycemia in INS-1E cells and rat islets. In contrast, IDE was upregulated by hyperinsulinemia. Surprisingly, IDE loss-of-function reduced GSIS by 50%, whereas beta-cell insulin content remained unchanged. In parallel, secreted C-peptide levels were decreased by 50%. To study the molecular mechanisms underlying these effects, we measured *glut2*, *glucokinase*, *sur1* and *kir6.2* levels by RT-PCR, showing no changes in expression after IDE loss-of-function.

In conclusion, our results are consistent with recently published work where IDE-null mice showed a decreased GSIS due to impaired replenishment of the releasable pool of insulin granules. Together, we have unraveled an unexpected role of IDE on beta-cell GSIS.

These data suggest that IDE could be a therapeutic target for diabetes treatment.

INTRODUCCIÓN

1.-Diabetes Mellitus

El 14 de septiembre de 2011, la Federación Internacional de Diabetes junto a la Organización Mundial de la Salud (OMS) anunció que 336 millones de personas en el mundo tienen diabetes mellitus (DM), la cual es responsable de 4.6 millones de muertes cada año, o una muerte cada siete segundos [1]. Se estima que en el año 2002 existían en el mundo unas 3.000 personas con DM y se producían, por cada 100.000 habitantes, 190 nuevos casos al año. Las previsiones para el año 2030 son de 366 millones de diabéticos en todo el mundo (*Figura 1*). La mayoría de ellos padecerán de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Este importante incremento se atribuye al crecimiento y el envejecimiento de la población, la mayor frecuencia de obesidad, la falta de ejercicio y la urbanización. Es un gran problema en cuanto a la salud, ya que la diabetes aumenta el riesgo de padecer enfermedades coronarias y vasculares como la ceguera, fallo renal y neuropatía periférica. Como consecuencia de ello, esto supone un enorme gasto para los estados y sus sistemas sanitarios [2, 3].

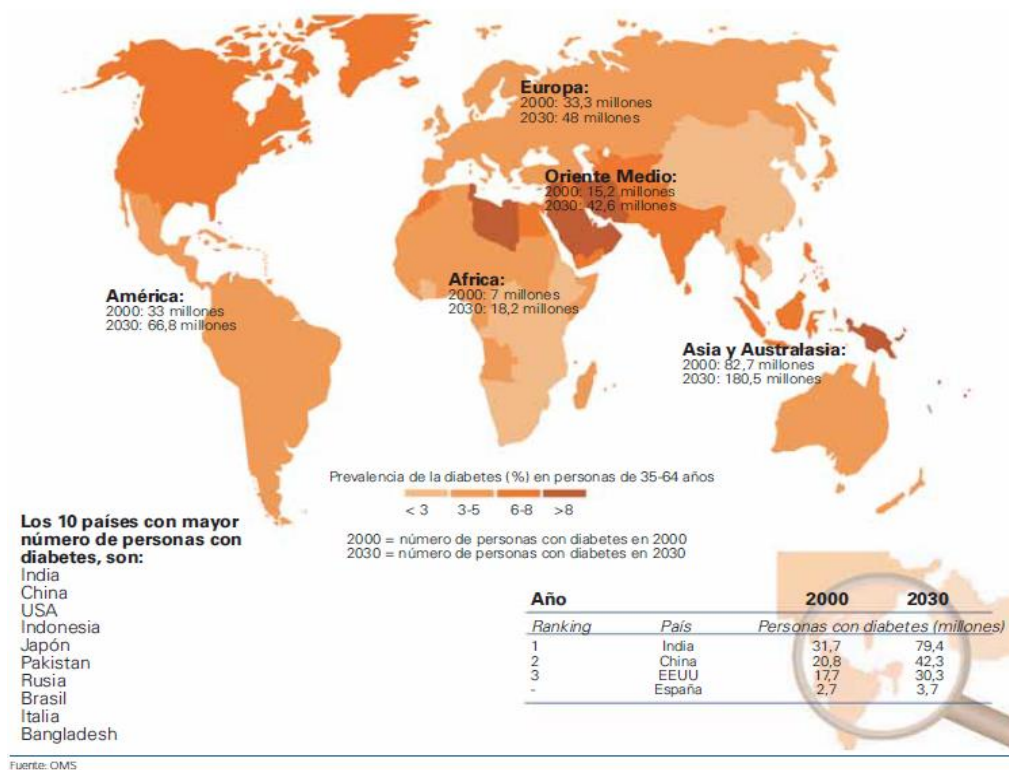


Figura 1. Prevalencia de diabetes (año 2000) y estimación para el año 2030 (*IDF. Atlas Diabetes 2011. disponible en Atlas Diabetes 2011 <http://www.idf.org/diabetesatlas/> Revisado el 26/noviembre de 2011*)

En España, en el año 2007, se inició el mayor estudio epidemiológico sobre la prevalencia de DM en población mayor de 18 años, el *Estudio di@bet.es* (Tabla 1). Los primeros resultados se publicaron en 2011 y muestran una prevalencia de DM entre la población mayor de 18 años del 13,8%. El 43% de los casos estaban sin diagnosticar y, por lo tanto, sin tratamiento. La prevalencia es mayor en hombres y aumenta con la edad. En el intervalo de edad de 61-75 años sufren DM2 el 35,6% de los hombres y el 26,6% de las mujeres. En mayores de 75 años la prevalencia es del 30,7% en hombres y del 33,4% en mujeres. En este estudio los principales factores de riesgo para desarrollar diabetes fueron la edad, el sexo masculino, los niveles educacionales bajos, la historia familiar de DM, la presencia de hipertensión arterial y la obesidad, especialmente la de predominio abdominal. Estos valores representan un aumento de la morbi-mortalidad asociada a esta patología [4].

ESTIMACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LA DIABETES EN ESPAÑA							
Número de personas por año							
1996	2001	2006	2011	2016	2021	2026	periodo 30 años
2.276.127	2.423.788	2.566.301	2.566.305	2.841.895	3.000.610	3.166.297	> 50%

Tabla 1. Evolución de la diabetes en España (*IDF. Atlas Diabetes 2011. disponible en Atlas Diabetes 2011 <http://www.idf.org/diabetesatlas/> Revisado el 26/noviembre de 2011*)

La DM es un síndrome que comprende distintas enfermedades cuyo factor común es la hiperglucemia, los dos tipos etiopatogénicos más frecuentes son los denominados diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y tipo 2 (DM2).

1.1.-Diabetes Mellitus tipo 1

La DM1 es una enfermedad autoinmune que se desarrolla como consecuencia de la interacción entre factores genéticos, inmunológicos y ambientales. Según el concepto tradicional, en su patogenia intervienen factores ambientales que desencadenan una respuesta inmunitaria contra la célula beta-pancreática de los islotes de Langerhans, en individuos genéticamente susceptibles, produciendo su casi completa desaparición

del páncreas. Esta destrucción autoinmune de la célula beta-pancreática de los islotes pancreáticos conduce a una deficiencia absoluta de insulina y dependencia vital a la insulina exógena como tratamiento terapéutico [5]. Entre el 5 y el 10 % de los pacientes con diabetes presentan el tipo 1, generalmente se desarrolla en niños o en jóvenes, y es por ello que también se le conoce como diabetes juvenil. En general se presenta en personas delgadas o que tienen un peso adecuado. Su incidencia mundial varía enormemente entre los diferentes grupos raciales [6].

1.2.-Diabetes Mellitus tipo 2

La DM2 se desarrolla cuando falla la adaptación de las células beta al compensar una mayor demanda de insulina, debida a una resistencia en los tejidos periféricos [7]. Esta falta de compensación se debe a una pérdida en la masa funcional de células beta-pancreáticas, debido bien a la pérdida de células (por aumento de su muerte y/o pérdida de la capacidad de regenerarse) y/o al fallo de su capacidad de secretar insulina. Hay que resaltar, que no todos los individuos con resistencia insulínica acaban debutando con diabetes, la razón para esta diferencia sigue sin estar clara. De la misma forma se desconoce cuáles son los mecanismos compensatorios de la célula beta-pancreática en los primeros estadios de la enfermedad [8]. El riesgo de padecer esta enfermedad aumenta exponencialmente con la obesidad. Los niveles normales de glucosa en pacientes de DM2 pueden restaurarse en fases tempranas de la enfermedad por medio de una pérdida de peso junto a un aumento de la actividad física. Estas observaciones lideran la concepción de que la resistencia insulínica sea el primer signo del desarrollo de DM2 [9].

El aumento de la masa funcional de las células beta-pancreáticas es uno de los objetivos de la investigación relacionada con la DM hoy en día. Cuatro direcciones diferentes se están llevando a cabo en las investigaciones relacionadas con la enfermedad: 1) aumentar la replicación de las células beta-pancreáticas maduras preexistentes; 2) producir células beta-pancreáticas a partir de otros tipos celulares (neogénesis y diferenciación de células madre); 3) disminuir la muerte de la célula

beta-pancreática y, 4) mejorar la función de las células beta-pancreáticas existentes [10].

2.-El islote pancreático y la célula beta-pancreática

El páncreas endocrino consiste en un conjunto de mini-órganos endocrinos altamente vascularizados llamados islotes de Langerhans (*Figura 2*). Estos islotes contienen múltiples tipos de células, en concreto 5 tipos diferentes conocidos hasta el momento, que producen hormonas con actividad biológica importante, las cuales son secretadas al sistema circulatorio. De éstas, la célula secretora de insulina o célula beta-pancreática es la más abundante dentro del islote (50-80%) y la de más importancia. La gran tarea de las células beta-pancreáticas es la regulación de los niveles de glucosa en sangre mediante la secreción de insulina. Estas células poseen una serie de características que le cualifican para registrar la glucosa y para producir, procesar y liberar insulina por exocitosis. Múltiples interacciones con las células del mismo islote, y con otros órganos periféricos afectan a esta capacidad y, por tanto, son necesarias para el desarrollo y función de la célula beta-pancreática. Además, el fallo en algunas de estas interacciones puede impedir la diferenciación de la célula beta-pancreática y la glucohomeostasis llevada a cabo por ellas [11, 12].

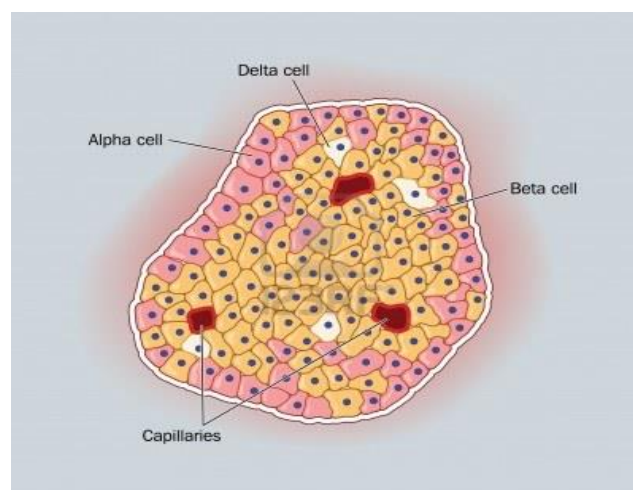


Figura 2. Dibujo de un islote pancreático de Langerhans, que muestra el alfa, beta, delta y las células productoras de hormonas (http://es.123rf.com/photo_14192066_dibujo-de-una-islotes-pancreaticos-de-langerhans-que-muestra-el-alfa-beta-delta-y-las-celulas-produc.html)

Varios de estos tipos celulares involucrados en la diferenciación y homeostasis de la célula beta-pancreática son las células vasculares (células endoteliales), células derivadas de la médula ósea, neuronas y otras células beta-pancreáticas adyacentes. La interacción entre células beta-pancreáticas dentro del islote es muy importante. En ratones y humanos, estas células requieren adhesión con otras células beta-pancreáticas para optimizar su expresión génica de la insulina, el contenido de la misma dentro de la célula y la secreción de insulina estimulada por glucosa [12, 13]. La comprensión de los mecanismos responsables para el mantenimiento de la masa y la integridad de los islotes pancreáticos es de crucial importancia ante la alta prevalencia de DM [8].

2.1.-Función y ciclo de vida en condiciones fisiológicas

La biología molecular y celular de la célula beta-pancreática es extraordinariamente compleja: tanto estimuladora como inhibidora dependiendo de los estímulos secretorios. Además, el comportamiento funcional de las células beta se reduce a unas reglas básicas: la dominante, fisiológicamente hablando, es evitar tanto la hiperglucemia como la hipoglucemia (que amenaza la vida y produce toxicidad en los tejidos) controlando la glucosa del plasma en un estrecho rango (euglucemia), (aproximadamente 3mmol/l en adultos normales) mediada a través de la acción de la insulina [14].

2.1.1.-La insulina

La insulina es una hormona anabólica (promueve el almacenamiento de sustratos energéticos y la síntesis de proteínas) y anticatabólica (frena la movilización de sustratos almacenados). La secreción de insulina se encuentra regulada por la gestión del sistema nervioso autónomo, por la acción de hormonas y de señales intercelulares, etc., aunque el principal estímulo es el nivel de glucosa [15].

La regulación fisiológica de la secreción de insulina en las células beta-pancreáticas se conoce bien (*Figura 3*). La exocitosis de los gránulos de insulina requiere un aumento del calcio intracelular que (al menos en el caso de la secreción de insulina estimulada

por glucosa) proviene del flujo de calcio de los canales dependientes de voltaje del plasmalema. Su apertura es controlada por el canal de potasio sensible a ATP (KATP), el cual juega un importante papel en la secreción de insulina uniendo el metabolismo celular a los potenciales de membrana celulares. En bajos niveles de glucosa, estos canales están abiertos y el flujo de potasio es constante manteniendo la membrana hiperpolarizada, evitando la actividad eléctrica, que los canales de calcio se abran dando paso a la entrada de calcio y la consiguiente secreción de insulina. El aumento de la glucosa en el plasma lidera el aumento de la toma de glucosa y su metabolismo por las células beta, además de producir ATP. Este aumento en la producción de ATP cierra los canales de potasio iniciando la actividad eléctrica celular, donde el calcio entra en la célula y la secreción de insulina se produce [1].

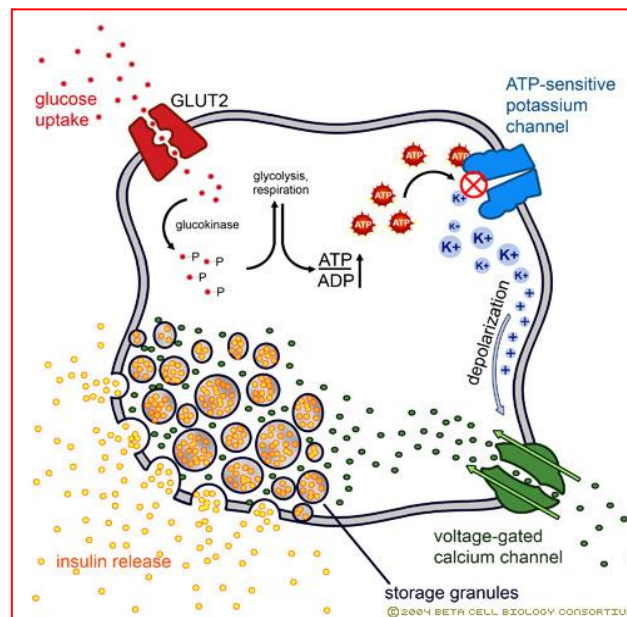


Figura 3. Mecanismo de secreción de la célula beta-pancreática mediada por glucosa (http://www.betacell.org/content/articlepanelview/article_id/1/panel_id/2)

2.1.2.-La glucosa

La glucosa tiene la capacidad de iniciar la secreción de insulina en la célula beta-pancreática. Otras fuentes, como los aminoácidos y los ácidos grasos producen

secreción de insulina aunque generalmente tiene un poder estimulador más pequeño. Como consecuencia, la secreción de insulina es dependiente del metabolismo de la glucosa [1]. La glucosa posee un doble papel en cuanto a la supervivencia de las células beta. La exposición a glucosa durante períodos cortos y dentro de los rangos fisiológicos, juegan un papel estimulador en el crecimiento del islote pancreático en modelos de roedores [16]; mientras que la exposición crónica a altos niveles de glucosa y la hiperglucemia son deletéreos para la función y la diferenciación de la célula beta-pancreática [8, 17].

Varios estudios han demostrado esta capacidad mitogénica de la glucosa bajo determinadas circunstancias, produciendo un efecto positivo sobre la proliferación de la célula beta-pancreática a través del propio metabolismo de la glucosa [18, 19]. En el estudio de Levitt y col., islotes humanos trasplantados en ratones inmunodeprimidos sometidos a perfusiones de glucosa poseen el doble de capacidad proliferativa que las células trasplantadas en ratones control; al igual que en el estudio de Porat y col., donde demuestran el efecto positivo de la glucosa sobre la proliferación de la célula beta-pancreática, mediado por la glucoquinasa.

Existen otros estudios que demuestran que una dieta rica en grasa produce un aumento de la masa de células beta, al igual que el embarazo; los cuales vienen acompañados de un mayor requerimiento de insulina. Cuando la masa de células beta es aumentada o disminuida de manera aguda, existen pequeños cambios en los niveles de glucosa en sangre (solamente percibidas por las células beta), traducido en un aumento del flujo de glucosa y de la secreción de insulina. Este fenómeno regula la proliferación, aumentando la masa de células beta [20, 21].

2.1.3.- Vías de señalización y ciclo celular de las células beta-pancreáticas

El conocimiento sobre las rutas celulares a través de las cuales se activa la progresión del ciclo celular se ha incrementado en la última década (*Figura 5*)[22]. Las rutas implicadas son muchas e incluyen la ruta de adenilil-ciclasa/proteína quinasa A (AC/PKA), MAPK (proteínas quinasa activada por mitógeno), JAK-STAT, PI3K (fosfatidilinositol 3'-kinasa) -PKB/Akt y la ruta del sustrato-2 del receptor de insulina

(IRS2). Por ejemplo, la ruta de JAK2-STAT5 regula la inducción de ciclina D2 [23, 24]. La activación de la ruta de PKB/Akt produce aumento en la actividad de las ciclinas D1, D2, cdk4 y p21; mientras produce disminución de p57, por lo que el balance entre ambas podría producir progresión del ciclo celular [25].

La ruta de señalización de la insulina posee un papel positivo en el crecimiento de las células beta-pancreáticas. La ruta de PI3K es importante para las funciones celulares como el crecimiento celular, proliferación, supervivencia; y esta señal de supervivencia producida por la activación de PI3K es mediada por Akt/PKB [26]. Estudios en islotes pancreáticos de ratones y cultivos celulares demuestran que la exposición a hiperglucemia activa la ruta Akt/PKB [27]. La sobreexpresión de Akt en varios estudios promueve el crecimiento del islote (tamaño y masa) produciendo un aumento del contenido de insulina por islote [28, 29]. La importancia de Akt en la proliferación de la célula beta-pancreática está apoyada por estudios con mediadores positivos o negativos de la ruta de señalización de PI3K [30, 31].

La Glucógeno Sintasa Quinasa 3 (GSK3) es una diana de Akt, y su activación ha demostrado que protege a la célula beta-pancreática de la apoptosis inducida por estrés de retículo endoplasmático [32]. La señalización a través de la familia de proteínas Wingless (Wnt) también ha sido implicada en la regulación de la proliferación de la célula beta-pancreática [8, 33]. Existen sólidas evidencias de que ésta vía de señalización regula el desarrollo prenatal y postnatal de la célula beta-pancreática en ratones, así como el manejo de la glucosa por las células beta-pancreáticas [34, 35]. También se ha publicado que la activación de la ruta de Wnt, tanto en líneas celulares como en islotes aislados, aumenta la proliferación de la célula beta-pancreática [33, 36-38].

También se sabe que múltiples factores de crecimiento, actúan sobre la célula beta-pancreática a través de la ruta MAPK, entre muchas otras [22]. Estos factores de crecimiento, entre los que se incluye la glucosa, la insulina, el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), activan esta cascada de

señalización para producir su actividad reguladora sobre la supervivencia y proliferación de las células beta-pancreáticas [39-41].

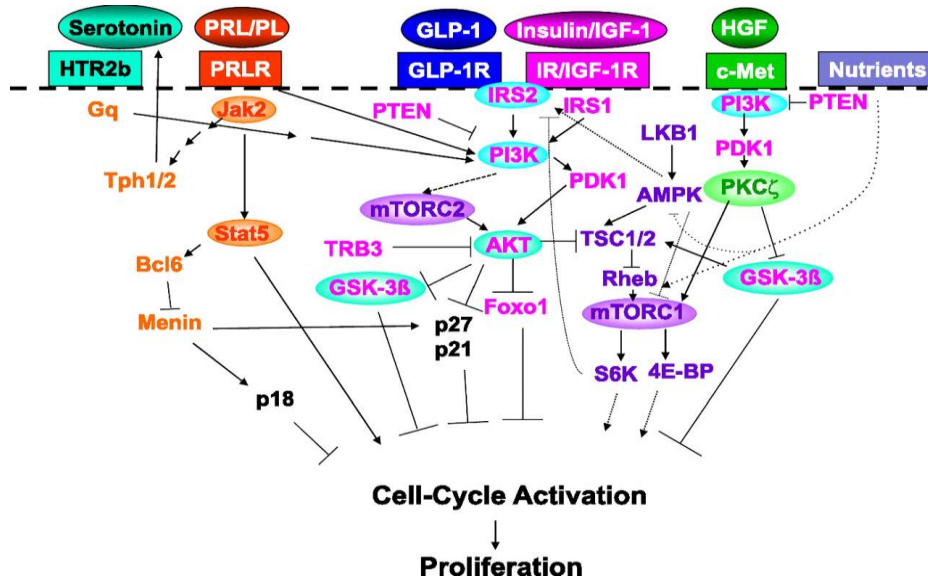


Figura 5. Diferentes rutas de señalización publicadas que modulan la activación y/o la proliferación de la célula beta-pancreática en roedores (*Kulkarni R N et al. Diabetes 2012;61:2205-2213 370*).

La maquinaria del ciclo celular de la célula beta-pancreática posee varios puntos de control, pero la ruta que lidera la interfase G1/S del ciclo celular, gobernado por la proteína del retinoblastoma (pRb), es la que ha mostrado mayor relevancia en el proceso proliferativo de la célula beta-pancreática (*Figura 4*) [25, 42-44].

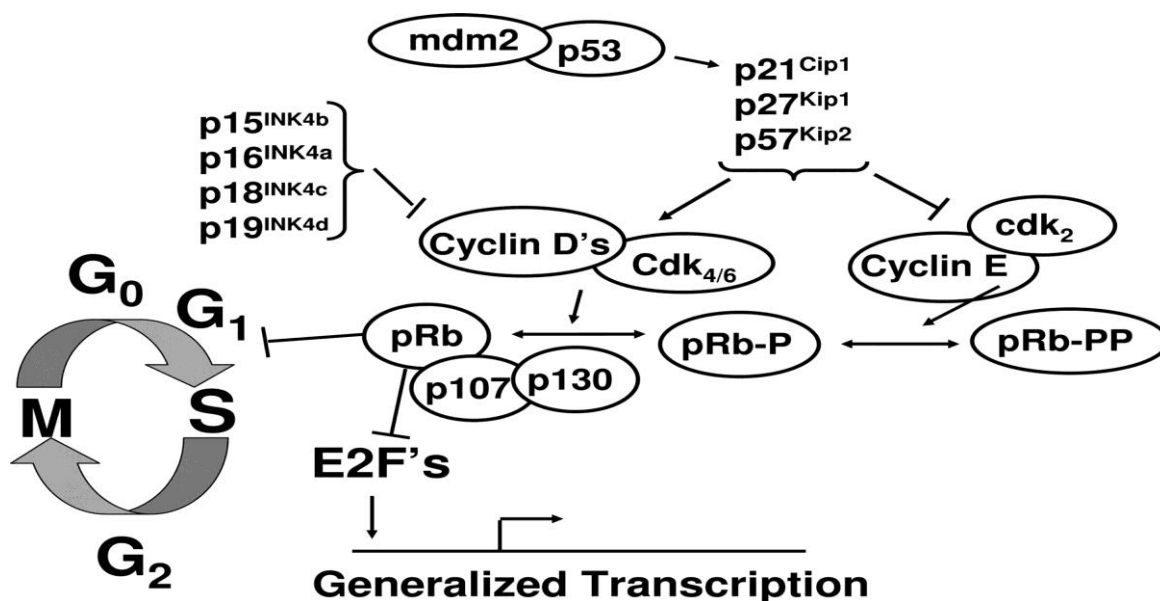


Figura 4. Mecanismo de control del ciclo celular de la célula beta-pancreática. *Cozar-Castellano I et al. Endocrine Reviews 2006;27:356-370*

Para atravesar la fase S satisfactoriamente se requiere la activación de una serie de genes que codifican proteínas necesarias para la síntesis de ADN. Este control es llevado a cabo por una familia de activadores y represores transcripcionales llamados proteínas E2F que son reguladas por los miembros de la familia de “pocket protein”. Las “pocket proteins” incluyen a pRb, p107 y p130. pRb es la más estudiada de todas ellas. pRb inhibe el ciclo uniéndose a E2F1, 2 y 3, activadores de ciclo, y los inhibe impidiendo el avance de las células en el ciclo. Estas uniones permiten a pRb actuar reprimiendo el avance de ciclo, no permitiendo la transcripción de genes que promueven la progresión de ciclo. Esta proteína contiene al menos 16 residuos (serinas y treoninas) susceptibles de fosforilación por múltiples quinasas, incluyendo, por ejemplo, cdk 2, 4 y 6, y la enzima fosfoinositol 3 quinasa (PI3K)[45, 46]. La fosforilación de pRb inhibe su función, lo que provoca que el bloqueo que produce sobre el ciclo celular mediante la familia de factores de transcripción E2F se detenga, produciendo la consiguiente entrada en ciclo.

Cdk4 y cdk6 son quinasas que se unen con los diferentes tipos de ciclinas D (D1, D2 y D3), formando complejos que fosforilan a pRb y a las otras “pocket proteins”,

produciendo su inactivación y la consecuente progresión del ciclo celular. La ruta de cdk4/ciclina D/p53/pRb es crucial en la regulación del ciclo celular de las células beta-pancreáticas. Las ciclinas D pueden ser dianas de diferentes moléculas que activan la progresión del ciclo celular, como la glucosa que estimula la expresión de ciclina D2 [25]. Se sabe que la sobreexpresión de cdk6 en asociación con ciclina D1 produce un marcado aumento replicativo en células beta-pancreáticas humanas [47, 48]. También existen numerosas evidencias que indican que ciclina D2 es indispensable para el crecimiento, desarrollo y función de las células beta-pancreáticas del islote [49, 50].

En la regulación del ciclo celular existe una serie de inhibidores de cdk (quinasas dependientes de ciclinas), los cuales juegan un papel importante en la senescencia de la célula beta-pancreática. Éstos pertenecen a 2 familias de proteínas: INK4/ARF (inhibidor de la quinasa 4/Alternative Reading Frame); p16INK4A, p15INK4b, p18INK4C, p19INK4d; y CIP/KIP (familia de inhibidores de ciclinas), p21CIP, p27KIP y p57KIP. Diversos trabajos publicados demuestran la complejidad del papel de los inhibidores de cdk en la progresión del ciclo celular [43, 51-54], demostrando que los efectos de la familia de proteínas CIP/KIP en la progresión del ciclo celular tienen un papel disfuncional.

Regeneración de las células beta-pancreáticas

La replicación y el crecimiento normal de las células beta-pancreáticas dependen, como hemos comentado, de un preciso control de entrada, recorrido y salida a través del ciclo celular [8]. Recientes estudios en humanos muestran una capacidad de replicación en las células beta durante la infancia, coincidiendo con la expansión de la masa de células beta postnatales, aunque esta capacidad decae pronto después de la infancia hasta <0.2% a los 5 años de edad [55], siendo casi indetectable en los adultos [56, 57]. Muchos estudios en ratones y ratas demuestran una correlación negativa con la edad en la proliferación de las células beta-pancreáticas. Recientes estudios en ratones adultos (1 año de edad) demuestran que la célula beta-pancreática posee una baja tasa de replicación y está limitada a un mínimo recambio, acoplado a la baja tasa de apoptosis de las células beta-pancreáticas [58]. La vida media de las células beta-

pancreáticas en humanos es todavía desconocida, aunque datos *in vitro* sugieren que podría ser mucho más duradera de la que se conoce actualmente [59]. Existe bastante consenso en cuanto a que la célula beta-pancreática tiene capacidad de replicación por si misma [60-67]. La proliferación de las células beta-pancreáticas en humanos adultos es extremadamente baja, y raramente se encuentran islotes de gran tamaño. Los mecanismos encargados de la regulación del crecimiento de la masa de células beta son complejos, los cuales incluyen regulación del ciclo celular de las mismas, fundamental para la proliferación de las células [25]. La mayor diferencia entre humanos y roedores es que en los humanos, los telómeros cromosómicos limitan la replicación y mantienen la senescencia. Por el contrario, los roedores tienen largos telómeros y no producen parada de la replicación durante varias generaciones, incluso después de la pérdida de los telómeros [68]. Esta diferencia en la replicación con la edad podría ser la causa de esta respuesta diferencial en la compensación de la célula beta-pancreática.

Existen algunos trabajos que evidencian la existencia de neogénesis en el páncreas humano (*Figura 6*) [57, 69-71], existiendo un aumento de células productoras de insulina en el ducto pancreático en algunas enfermedades como, por ejemplo, en una fase temprana de la DM1 y en complicaciones graves del hígado. Aunque una de las grandes preguntas sobre neogénesis a debate es: ¿Cuál es la célula de origen? Muchos trabajos sugieren que la célula de origen se encuentra dentro o adyacente al epitelio ductal pancreático, aunque realmente esa célula es una célula madre, una célula diferenciada del epitelio ductal con capacidad multipotente de transdiferenciación. ¿También puede ser de otro tipo celular? Si fuera una célula del ducto pancreático, ¿podría cualquier célula del ducto tener ese potencial o simplemente sería una subpoblación celular? Xu y colaboradores [67] muestran claramente la activación de la neurogenina-3 (factor de transcripción de linaje endocrino) en las células del ducto o adyacentes al mismo. También en un trabajo de Bonner-Weir y col. se muestra la expresión de la anhidrasa carbónica II en la célula madre de origen de la célula beta-pancreática. En resumen, considerando todas estas evidencias podemos decir que la replicación de células beta-pancreáticas existentes y la neogénesis son rutas que

contribuyen a mantener una adecuada masa de células beta-pancreáticas desde justo después del nacimiento [57].

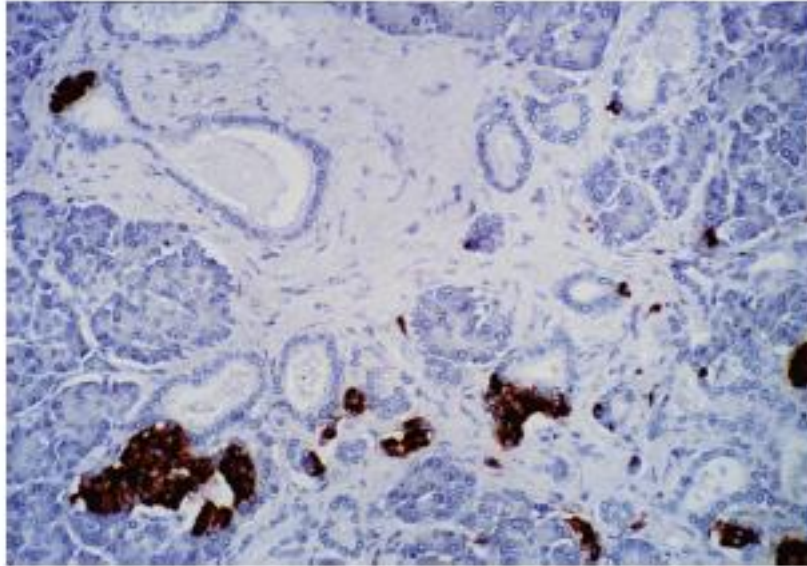


Figura 6. Sección pancreática (aumento 20x) teñida para insulina. Se muestran numerosos ductos pancreáticos con células positivas para insulina presentes en el mismo ducto y en su cercanía, sugiriendo la formación de nuevos islotes procedentes de los ductos endocrinos (neogénesis). (Weir GC, Bonner-Weir S. *Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death.* Ann N Y Acad Sci. 2013 Apr;1281:92-105. Epub 2013 Jan 30.)

Algunos factores de crecimiento celular son capaces de aumentar la replicación *in vitro* y/o *in vivo* de la célula beta-pancreática. Estos incluyen al lactógeno placentario (PL), la insulina, los factores de crecimiento insulínico (IGFs), el péptido glucagonoide-1 (GLP-1), la proteína relacionada con la paratohormona (PTHrP) y el factor de crecimiento hepático (HGF) [72]. HGF no es importante para la proliferación normal de la célula beta-pancreática, pero es relevante en la proliferación de las células beta en diferentes situaciones patológicas como la resistencia insulínica, obesidad, pancreatomectomía parcial o diabetes. Otro factor, como la proteína PTHrP, mitógeno para la célula beta-pancreática, hace aumentar la expresión celular de insulina, por lo que podría estar relacionado con el aumento tanto de la masa como de la función de las células beta-pancreáticas. Los lactógenos, como la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (PRL) o el PL son proteínas homólogas y poseen características biológicas similares. Diversos estudios demuestran que estas proteínas son potentes inductores

de la replicación en la célula beta-pancreática sin comprometer la producción de insulina. GLP-1 controla los niveles de glucosa en sangre estimulando la secreción de insulina, su biosíntesis, la proliferación de las células beta-pancreáticas, la neogénesis del islote y la inhibición de la liberación de glucagón [73]. En resumen, un número de diferentes moléculas, incluyendo nutrientes y péptidos, han sido examinados debido a su potencial mitogénico tanto *in vivo* como *in vitro*, indicando que algunos de estos factores pueden inducir la proliferación de las células beta-pancreáticas humanas [74].

2.2.-Disfuncion y ciclo de vida en condiciones fisiopatológicas

Tradicionalmente, la DM2 es vista como una enfermedad progresiva. Su patogenia es compleja, caracterizada por una predisposición genética que, junto con alteraciones metabólicas, comprometen a la homeostasis de la glucosa. La DM2 está caracterizada por una disminución de la masa funcional de las células beta-pancreáticas que no puede adaptar la secreción de insulina para compensar el aumento de la resistencia insulínica, conduciendo al debut de la enfermedad [56, 75-77].

Estudios genómicos asocian locus cromosómicos de susceptibilidad para DM2 con genes asociados al desarrollo y supervivencia de la célula beta-pancreática, y con genes que controlan la secreción de insulina [78]. Normalmente, la capacidad de compensación de la célula beta-pancreática respecto a la resistencia insulínica mantiene los niveles de glucosa en sangre en los niveles normales, existiendo un balance entre cambios en la sensibilidad a la insulina con cambios proporcionales en la función de la célula beta-pancreática. Esta relación hiperbólica entre la sensibilidad a la insulina y la secreción de insulina llega un momento en el que se rompe, y esta descompensación en personas predispuestas a sufrir DM2 desencadena una serie de fallos, empezando por una imperfecta compensación; incipientes manifestaciones de desregulaciones en la glucemia, así como una elevación mínima de los niveles de glucosa tanto en ayuno como en postprandial; y anomalías en la masa y en la función de las células beta-pancreáticas, las cuales preceden a la DM2 (*Figura 7*) [75].

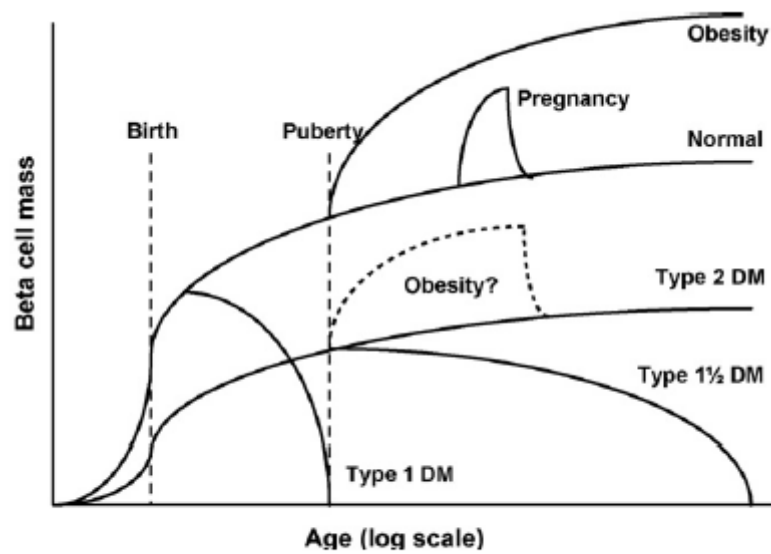


Figura 7. Ilustración general de cambios en la masa de células beta-pancreáticas bajo condiciones tanto fisiológicas como isopatoflógicas (*Regulation of beta cell replication*. Lee YC, Nielsen JH. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Jan 15;297(1-2):18-27. doi: 10.1016/j.mce.2008.08.033. Epub 2008 Sep 7.)

El fallo progresivo de la célula beta-pancreática en la DM2 proviene tanto de factores genéticos como ambientales. Genes que codifican proteínas del metabolismo de la glucosa, moléculas de la ruta de señalización de la insulina, y factores de transcripción [78, 79]. La toxicidad a la glucosa, la lipotoxicidad, el aumento de deposiciones del péptido amiloide en los islotes (IAPP), y las citoquinas inflamatorias están involucradas en el fallo de la célula beta-pancreática [80, 81]. En combinación, estos factores producen incapacidad de respuesta por parte de la célula beta-pancreática al aumento de demanda funcional.

Las anormalidades celulares y anatómicas de las células beta-pancreáticas también caracterizan a la DM2 [82]. Los islotes de la DM2 avanzada tienden a ser desorganizados y deformes, con placas de amiloide pancreáticos derivados del IAPP (placas de polipéptido amiloide del islote)[56, 83, 84].

La pérdida de células beta en la DM2 está producida por un aumento en la apoptosis de la célula beta-pancreática [56, 85]. Varios mecanismos se han propuesto como causantes de este aumento, incluyendo la hiperglucemia crónica (glucotoxicidad) y la alta concentración de ácidos grasos o lipotoxicidad [86]. Otros factores potenciales pueden causar la muerte de la célula beta-pancreática en la DM2 cómo son los oligómeros tóxicos del IAPP, especies reactivas de oxígeno (ROS) [87], estrés de retículo endoplasmático (RES) [88], e inflamación por citoquinas (CQs) como la interleuquina 1-beta (IL-1 β) [89]. Realmente, el síndrome clínico de la DM2 es consecuencia de más de una causa, junto a la pérdida de células beta-pancreáticas, envueltas en más de un mecanismo.

2.2.1.-Glucolipotoxicidad

Mientras que está claramente argumentado y demostrado que la causa de la DM es la disfunción de la célula beta-pancreática, existe mucha controversia sobre la contribución de la glucotoxicidad, la lipotoxicidad y la glucolipotoxicidad [90-92]. Las palabras “glucotoxicidad” y “lipotoxicidad”, como su forma combinada “glucolipotoxicidad”, representan conceptos que definen adversas y tóxicas influencias sobre la función de la célula beta-pancreática causadas por una excesiva concentración de glucosa y/o lípidos. Son conceptos paradójicos, ya que niveles fisiológicos de glucosa y lípidos no son tóxicos y son esenciales para una función normal de la célula beta-pancreática.

En el caso de la glucotoxicidad, se debe a la fuerte correlación entre los niveles de glucosa y la secreción de insulina. Se ha observado que en ratones sometidos a perfusión continua de glucosa durante varios días, muestran defectos en la secreción de insulina; al igual que islotes en cultivos expuestos a alta concentración de glucosa [93, 94]. Los efectos de esta hiperglucemia crónica, probablemente contribuyan al inexorable fallecimiento de la célula beta-pancreática.

Los datos sobre la lipotoxicidad, están basados casi enteramente en estudios *in vitro* de cultivos primarios de células beta-pancreáticas y líneas celulares expuestos a exposiciones crónicas de ácidos grasos como el palmitato. No sólo el palmitato afecta a

la secreción de insulina, sino también se ha utilizado para el estudio de la muerte de la célula beta-pancreática. Algunos autores cuestionan que en estos estudios *in vitro* las concentraciones sean similares a las que existen *in vivo* [95, 96]. El problema se encuentra en que los ácidos grasos sólo serían tóxicos en un ambiente artificial *in vitro*.

En conclusión, mientras que la lipotoxicidad está más relacionada con la patogenia de la resistencia insulínica; la evidencia de que la lipotoxicidad contribuye a la disfunción secretora y/o muerte de la célula beta-pancreática en la DM humana o en modelos de ratones es, actualmente, débil [93].

2.2.2.-Citoquinas proinflamatorias

En cuanto a la inflamación en la DM2, existen evidencias de que mediadores en el proceso de inflamación no pueden ser sólo marcadores metabólicos de la DM2 [97, 98], aunque éstos sí pueden contribuir a la muerte de la célula beta-pancreática mediante un daño en su función y el progresivo declive en la masa de las mismas [56]. Adicionalmente, las células apoptóticas por ellas mismas pueden provocar la activación del sistema inmune [99]. También la hiperglucemia puede inducir la expresión de moléculas envueltas en procesos inmunológicos [94]. El tejido adiposo, el cual está formado por varios tipos celulares diferentes (adipocitos, preadipocitos, matriz extracelular, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos), ha sido considerado durante mucho tiempo un tejido pasivo, aunque recientemente, ha sido revelada su actividad endocrina. Las CQs son un grupo de proteínas de bajo peso molecular activas farmacológicamente que poseen efectos paracrinos y autocrinos y son productos del proceso inflamatorio y efectores del sistema inmune [100]. Por otra parte, el tejido adiposo representa un órgano endocrino que secreta un gran número de CQs, llamadas adipoquinas (incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa [TNF α], interleuquina 6 [IL6], interleuquina 8 [IL8], MCP-1, CRP, inhibidor activador del plasminógeno tipo 1 [PAI1], adiponectina, haptoglobina [101]), las cuales establecen comunicación con el cerebro y con los tejidos periféricos, regulando así el metabolismo y la homeostasis energética [102]. Estas CQs inducen al hígado a producir proteínas y,

al mismo tiempo, pueden actuar en los islotes pancreáticos y dañar la función secretora de la célula beta-pancreática [103] (*Figura 8*).

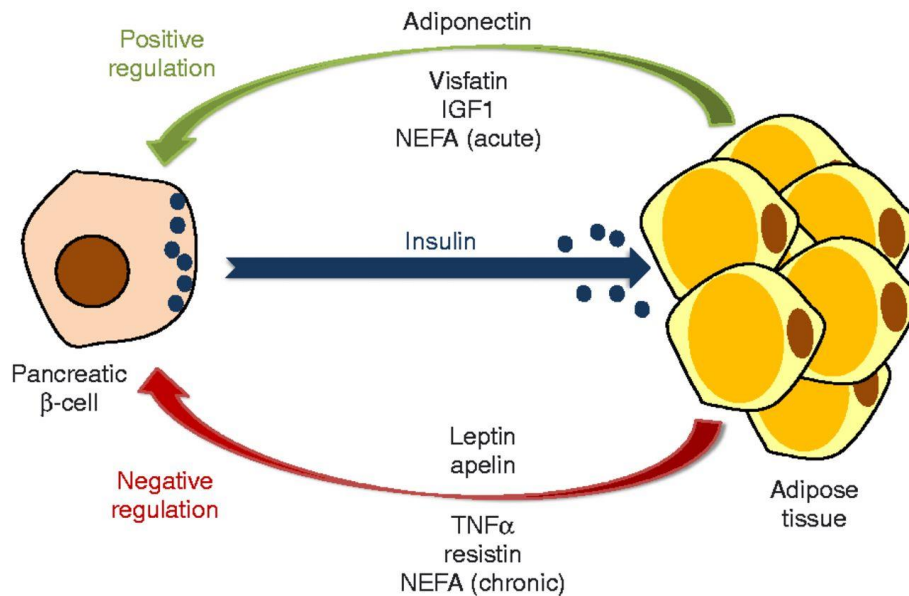


Figura 8. Representación en diagrama de las relaciones entre el tejido adiposo y las células beta-pancreáticas: el “eje adipo-insular”. La regulación positiva puede incluir la estimulación de la síntesis y secreción de insulina, además de la proliferación celular. Al contrario, la regulación negativa puede implicar la inhibición tanto de la producción y secreción de insulina como un aumento de la apoptosis/necrosis de la célula (*Dunmore SJ, Brown JE, The role of adipokines in β -cell failure of type 2 diabetes, J Endocrinol. 2013 Jan 2;216(1):T37-45. doi: 10.1530/JOE-12-0278. Print 2013 Jan*).

En diabetes, los niveles de citoquinas se encuentran relativamente altos [103]. La obesidad está implicada en el desarrollo del estado inflamatorio de la DM. Finalmente, la implicación de las CQs parece tener un papel central en otra fase del estado inflamatorio, las células apoptóticas que pueden provocar una respuesta inmune cuando se presentan en alto número o cuando la apoptosis es consecuencia de la exposición a CQs. Una intensa activación de estas CQs ha sido asociada con la producción de autoanticuerpos de las células del islote en pacientes con DM2 [104]. En algunos casos, cuando la apoptosis es inducida por glucosa o ácidos grasos, se produce la movilización de las células T reactivas hacia los antígenos de las células beta, dando como resultado la destrucción de las células beta similar a la DM1. De este modo, se crea un círculo vicioso empezando por las CQs (particularmente la IL-1 β), las

cuales podrían ser los efectores patogénicos responsables de la inducción de la apoptosis de la célula beta-pancreática en ambos tipos de diabetes. IL-1 β , TNF- α e interferón gamma (IFN- γ) son las principales CQs que actúan sinérgicamente durante la infiltración inmune del páncreas, que produce el daño y la apoptosis de la célula beta-pancreática. IL-1 β es secretada por los macrófagos activados, aunque también se ha demostrado que pueden ser también secretadas por las células beta bajo determinadas circunstancias. TNF- α solamente es producida y secretada por macrófagos, mientras que IFN- γ es secretada por las células T-helper [105].

3.-La enzima degradadora de la insulina (IDE)

Los niveles de insulina están regulados a través de una degradación proteolítica además de otros procesos catabólicos. La degradación de la insulina y su inactivación, en cambio, están bien caracterizadas estando mediada principalmente por la enzima degradadora de la insulina o IDE, una metaloproteasa de zinc de 110 KDa estructuralmente conservada en la evolución. IDE hidroliza un gran número de pequeños péptidos, entre ellos la insulina, el glucagón y el péptido amiloide beta (causante de las placas de amiloide de la enfermedad de Alzheimer (AD)). Esta enzima está implicada en la etiología de la DM2 y la AD [106].

IDE también posee funciones reguladoras para la actividad del propio proteosoma, los receptores de esteroides, en la oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas, en el crecimiento y el desarrollo [107, 108]. IDE se expresa de manera ubicua, tanto en células sensibles a la insulina como en las no sensibles. Su localización celular incluye: membranas celulares, citoplasma y algunos orgánulos celulares como los endosomas, peroxisomas y mitocondrias, y, además, es secretada también al espacio intracelular [109], indicando un papel multifuncional de esta proteína. Todas las células sensibles a la insulina contienen IDE y degradan insulina (*Figura 9*)[110]. Además, el hígado es el responsable del aclaramiento de la insulina, eliminando aproximadamente el 75% de la misma. Algunos estudios muestran el papel regulador de la enzima en el hígado o en células procedentes del mismo [111-113].

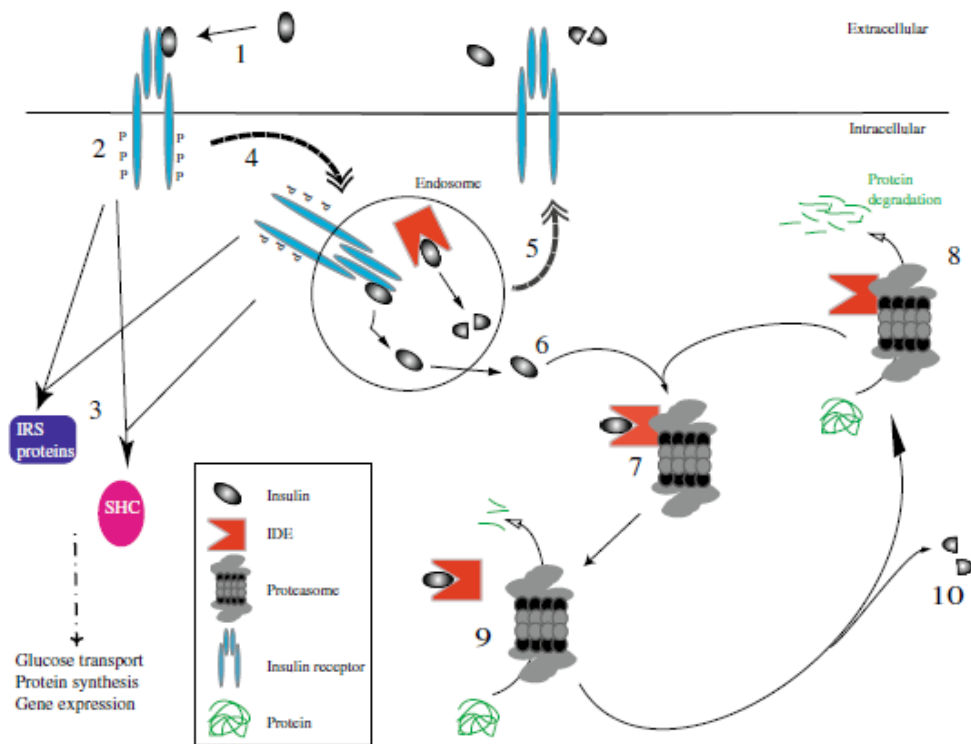


Figura 9. Diagrama esquemático de la degradación de la insulina y sus interacciones con la acción de la insulina. Este incluye cómo la degradación de la insulina actúa inhibiendo al proteosoma y, por tanto, la degradación proteica. La insulina se une a su receptor de la superficie celular (1) causando que el receptor se autofosforile (P) y se active su capacidad tirosina-quinasa (2). A partir de aquí, otras moléculas son activadas en la cascada de señalización (3) aumentando la toma de glucosa (en el músculo y la grasa), la síntesis de glucógeno y la mitogénesis. Seguidamente a la unión de la insulina a su receptor, éste es internalizado hacia endosomas (4) donde comienza la degradación de la insulina. El receptor vuelve a externalizarse a la superficie celular junto a la insulina degradada e intacta (5). Ambos tipos de insulina entran al citosol (6) donde se une a IDE-citosólica, algunas de las cuales está unidas al proteosoma (7). IDE aumenta la actividad del proteosoma (8). La insulina unida a IDE provoca la disociación del proteosoma y la actividad del mismo disminuye (9). A esto le sigue la degradación de la insulina (10), e IDE se vuelve asociar con el proteosoma (8) (Diabetologia. 2009 Aug;52(8):1457-60. doi: 10.1007/s00125-009-1414-8. Epub 2009 Jun 6. Hyperglycaemia and hyperinsulinaemia: is insulin-degrading enzyme the missing link? Fawcett J, Duckworth WC.)

Por un lado, el papel de IDE sobre el catabolismo de la insulina predice que la inhibición de IDE podría aumentar la vida media de la insulina circulante, un efecto que podría ser beneficioso para el tratamiento de la diabetes. Esta idea está soportada a través de un cuerpo de trabajo emergido a partir del descubrimiento de esta enzima en 1949 [114]. Trabajos recientes en dos modelos diferentes de animales producen la

idea contradictoria de que una reducción de la actividad de IDE puede, de hecho, inducir un fenotipo diabético. Primero, el modelo de rata Goto-Kakizaki (GK), modelo de DM2, contiene mutaciones en el gen de IDE mostrando una alta concentración de glucosa e insulina en sangre [115, 116]. Además, el ratón nulo para IDE es intolerante a la glucosa e hiperinsulinémico, respaldando el concepto de que IDE es importante en el mantenimiento de los niveles normales de glucosa e insulina [106]. Recientemente se ha publicado un estudio de Steneberg y colaboradores [117] donde realizan ensayos de función de la célula beta-pancreática en el ratón nulo para IDE. Ellos muestran que la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) se encuentra disminuida en el ratón nulo debido a un fallo en el recambio de gránulos de insulina; además de mostrar que tanto la autofagia y el contenido de microtúbulos se reducen en las células beta-pancreáticas de dicho modelo. Este estudio arroja luz sobre la posible función de IDE en la célula beta-pancreática como un regulador de la secreción de insulina.

La información aportada por estos modelos de animales y estudios anteriores sugiere un papel importante de IDE en la propia fisiología del páncreas y en la fisiopatología de la enfermedad.

Estudios de asociación genética en humanos han demostrado que existen una relación entre polimorfismos en el gen de IDE y un aumento del riesgo de desarrollar resistencia insulínica y DM2 y AD [118-123]. Además, factores que afectan a la actividad de IDE, como una modificación postansduccional, podrían tener un impacto significativo en la progresión de dichas enfermedades.

También se ha visto que la hipofunción de IDE contribuye a una acumulación de placas de beta-amiloide en modelos animales de AD tanto en neuronas como en células beta-pancreáticas [106, 116, 124]. Por otro lado, se ha visto que la sobreproducción de IDE aumenta la degradación de la insulina y disminuye la eficiencia de la estimulación de la insulina en su vía de señalización [125]. Estos resultados muestran que la regulación de la expresión de IDE y/o su actividad podrían contribuir a la patogénesis de la DM2.

Estudios específicos de la función de IDE en la célula beta-pancreática son necesarios para esclarecer el papel de la misma en la fisiología y fisiopatología de este tipo celular.

4.-Tratamientos actuales

En el año 1921 Frederick Banting y Charles Herbert Best descubrieron la insulina. Desde entonces son muchos los avances que se han hecho realidad en el tratamiento de la DM, todos ellos encaminados a lograr un estricto control metabólico.

La prevención de la DM1 en el hombre se encuentra en estos momentos en período de investigación y algunos resultados ya comienzan a ser prometedores. El rápido diagnóstico de la enfermedad, así como la identificación de los factores de riesgo son importantes para interrumpir o retrasar el proceso. A través de la confección de diferentes ensayos clínicos, utilizando terapias con nicotinamida e insulina en familiares de primer grado con riesgo de desarrollar DM1, ha permitido abrigar la esperanza de prevenir - o al menos retrasar- el comienzo del síndrome clínico.

El tratamiento con insulina parece favorecer tanto la remisión de la DM1 de comienzo como su prevención en sujetos de riesgo. El tratamiento intensivo con insulina en pacientes con DM1, recientemente diagnosticados, es efectivo para la consecución de un rápido período de remisión y proporciona una mejora de los parámetros metabólicos durante el primer año de evolución. En la fase preclínica su aplicación se basa en la hipótesis de que la administración de insulina en esta etapa puede reducir la expresión antigénica asociada a la secreción de insulina mediante la inducción del reposo celular y la tolerancia antigénica. De hecho, en modelos animales, la terapia insulínica bloquea la progresión de la DM1.

La nicotinamida protege las células del islote y mejora la respuesta de insulina al estímulo glucémico. Diferentes estudios han evaluado la eficacia y seguridad de la nicotinamida en la prevención de la DM1. Se han desarrollado en familiares de primer grado de personas con DM1 y se han estudiado marcadores inmunológicos positivos, y los resultados son contradictorios. Uno de esos estudios no muestra que la

nicotinamida sea útil en la prevención de la DM1. En el otro, los resultados muestran una reducción del riesgo relativo de padecer DM1 [126-128].

En cuanto a la prevención de la DM2, su progresión se caracteriza por un aumento en los niveles de glucosa en sangre y un mal funcionamiento de la célula beta-pancreática. Los tratamientos son complejos, los cuales se empiezan con agentes antidiabéticos orales, aunque cada vez más temprano se procede a las inyecciones de insulina; también existen fármacos que reducen la resistencia a la insulina. Casi todos los tratamientos actuales producen ganancia de peso y un aumento del riesgo de hipoglucemia. También se ha visto que una restricción energética severa, junto al ejercicio físico habitual, son capaces de mejorar la sensibilidad a la insulina, y en muchos casos de revertir la DM2 [1].

Los estudios en animales proponen la idea de que tanto la función y/o la masa de la célula beta-pancreática puedan ser parámetros modificables, especialmente en los estadios tempranos [81]. La temprana intervención sobre los bajos niveles de glucosa podría cambiar la progresión de la enfermedad. La asociación entre la baja glucosa y el aumento de la respuesta secretora de insulina sugieren una mejora de la célula beta-pancreática. Entre las terapias aceptadas, la tiazolidinedionas ha demostrado en estudios con animales que previenen la pérdida neta de células beta-pancreáticas por muerte y, en ensayos clínicos, parece que promueve la función de la célula beta-pancreática en pacientes con DM2, así como la inducción de un control sobre la glucemia de forma duradera [129]. Por otro lado, la rosiglitazona añadida a un régimen de sulfoniurea y metformina durante 6 meses promueve la función de la célula beta-pancreática, como evidencia restaura la respuesta de la insulina en una primera fase, y promueve la bajada del ratio proinsulina-insulina [130]. Estudios clínicos también sugieren que las terapias con incretinas pueden dirigirse específicamente hacia el fallo de la célula beta-pancreática. Estos tratamientos también incluyen el agonista del receptor de GLP-1, el cual reemplaza farmacológicamente a este péptido, y los inhibidores de la DPP4 (Dipeptidil Peptidasa IV), los cuales aumentan los niveles endógenos de incretinas fisiológicas bloqueando su inhibición. El agonista del receptor de GLP-1 estimula la secreción de insulina de manera glucosa dependiente [131], ya

que mimetizan el efecto de las incretinas naturales, las cuales son reducidas en los pacientes de DM2. Todos estos agentes, en resumen, promueven una mejora de la función de la célula beta-pancreática y la sensibilidad a la insulina, aunque también aumentan la secreción de insulina en respuesta a glucosa, disminuyendo la secreción de glucagón, inhibiendo el vaciado gástrico, reduciendo el apetito, y disminuyendo la toma de calorías [132, 133]. Independientemente de si esos efectos potenciales de los fármacos en la célula beta-pancreática pueden ser mantenidos en el tiempo, la determinación de la calidad de éstos requerirá el estudio de la frecuencia de hipoglucemias, sus mecanismos de acción, los perfiles adversos, la tolerabilidad, el rango de fallo y su coste. Por último, es primordial la determinación de si preservando la masa y/o función de la célula beta-pancreática existe la posibilidad de promover los ratios de morbilidad y mortalidad, reduciendo las complicaciones, y/o llevando a cabo una mejora en la calidad de vida en los pacientes de DM2. La necesidad de continuar la investigación clínica es evidente, no sólo para determinar la prevención a largo tiempo del fallo de la célula beta-pancreática, aunque también para establecer los valores clínicos de las terapias farmacológicas que actúan sobre la masa y/o función de la célula beta-pancreática directamente. Igualmente importante es estudiar la estabilidad y duración de los efectos (tanto clínicos como biológicos) de las terapias posibles. Además, más investigación se debería llevar a cabo para determinar si los diferentes subtipos genéticos específicos de la DM2 podrían individualizarse en cuanto a su terapia para ralentizar o revertir el declive de la célula beta-pancreática [84].

5.1.-Productos Naturales

Las sustancias químicas presentes en plantas y animales han sido y siguen siendo una fuente importante de fármacos y de productos usados en la alimentación, la cosmética y la agricultura entre otros campos [134]. En concreto, las plantas medicinales han sido utilizadas durante miles de años en diferentes campos de terapia, bien en forma de crudos, tinturas u otras formulaciones, o bien como fuente para la obtención de principios activos de interés biológico y farmacológico [135].

Los compuestos naturales ofrecen una diversidad estructural enorme y en algunos casos, una potencia biológica grande y por ello es difícil que la química de síntesis pueda reemplazar a la bioquímica celular como fuente de nuevos compuestos. Estos aspectos unidos al hecho de la enorme biodiversidad del planeta (plantas, mar y microorganismos), en muchos casos inexplorada, convierten a los compuestos naturales en una fuente prometedora de nuevos fármacos [136] .

¿Por qué los productos naturales poseen extraordinaria especificidad y potencia en comparación con moléculas diseñadas artificialmente? La respuesta está en el propio proceso de selección evolutiva de la propia naturaleza para la optimización de compuestos biológicamente activos. Los productos naturales tienden a tener estructuras tridimensionales bien definidas, con grupos funcionales (proporcionando aceptores del enlace de hidrógeno / donantes, etc.), que han sido afinados en una orientación espacial precisa. Además, las estructuras de las dianas biológicas de tales productos naturales (por ejemplo, sitios de unión a proteínas) están a menudo bien conservados entre las proteínas de muy diferentes secuencias genéticas, de tal manera que los metabolitos secundarios que han evolucionado para un fin determinado y su modo de acción en un organismo productor puede ejercer diferentes, pero igualmente potentes, efectos en otros ámbitos. La preparación de análogos de productos naturales, que no están presentes en la naturaleza, puede permitir a los humanos adaptar y mejorar las propiedades (bioactividad, farmacocinética, solubilidad, etc.) de los medicamentos que la naturaleza ha proporcionado. En la actualidad, cerca de la mitad de los fármacos disponibles son compuestos naturales o están relacionados con ellos y en el caso del cáncer la proporción supera el 60%. Además un número importante de compuestos naturales, de estructura diversa, aislados de fuentes vegetales, han sido considerado líderes, y su posterior modificación estructural ha conducido a compuestos con actividad farmacológica o con expectativas terapéuticas (camptotecina, taxol y podofilotoxina entre otros).

La investigación en compuestos naturales, en continua expansión y de gran actualidad, explora nuevos compuestos procedentes de diferentes fuentes, entre las que destacan

el mar, como fuente inagotable de recursos naturales. En los últimos 20 años, el mar se ha convertido en la principal fuente de moléculas bioactivas [134, 137].

En relación a la diabetes, y más específicamente, sobre la célula beta-pancreática, el interés más importante es la búsqueda de pequeñas moléculas que produzcan, como se cita anteriormente, una inducción de la proliferación y/o una protección frente a la muerte celular derivada de la propia enfermedad; mecanismos que podrían revertir y/o prevenir la aparición de la DM.

OBJETIVOS

Este trabajo de investigación tiene como objetivo general la búsqueda de estrategias para mejorar la masa beta-pancreática funcional, con el fin de encontrar dianas terapéuticas para el tratamiento de la diabetes mellitus. Para ello planteamos dos objetivos específicos:

- 1) Buscar pequeñas moléculas que induzcan la regeneración de las células beta-pancreáticas.

- 2) Estudiar el papel de IDE (insulin-degrading enzyme) en la función de la célula beta-pancreática, como diana potencial para mejorar la producción y/o secreción de insulina

MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Cultivos celulares

1.1.-Líneas INS-1 832/13 e INS1-E

La línea celular de insulinoma de rata, INS-1 832/13, fue generada en el laboratorio del Dr Christopher Newgard (Universidad de Duke, EEUU) [138] y la línea celular de rata, INS-1 E, generada en el laboratorio del Dr. Pierre Maechler (Ginebra, Suiza) [139]. Ambos clones celulares derivan de la línea celular parental INS-1, que tienen la capacidad de secretar insulina en respuesta a glucosa. Ambas células crecen en RPMI 1640, 11 mM Glucosa, 10% SFB, 1 mM Piruvato sódico (Invitrogen Ltd, Europa), 10 mM HEPES (Invitrogen Ltd, Europa), 1% Penicilina-Streptomina (P/S) (Invitrogen Ltd, Europa) y 0,05 mM β -Mercaptoethanol (β -ME) (Sigma-Aldrich, EEUU). Las células se cultivaron a 37°C con 5%CO₂ en una atmósfera húmeda.

1.2.-Cultivos primarios de islotes pancreáticos

Los animales utilizados fueron ratas macho Sprague-Dawley y Wistar de 2-4 meses de edad suministrados por el Servicio de Experimentación y Producción Animal (SEPA) de la Universidad de Cádiz y por el Servicio de Investigación y Bienestar Animal (SIBA) de la Universidad de Valladolid. Las ratas fueron sacrificadas por eutanasia con CO₂. A continuación se abrió el abdomen y se cerró la salida del ducto pancreático al intestino mediante un clamp quirúrgico. Entonces se perfundieron 10 mL de una disolución de Colagenasa P (Roche Diagnostics, Indianápolis, USA) en Hanks 1X frío (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) a una concentración 1,7 mg/mL a través del ducto pancreático. Una vez perfundido, el páncreas fue extirpado y mantenido en frío hasta su digestión. La digestión enzimática del tejido se llevó a cabo a 37°C durante 17 minutos. El proceso de digestión se detuvo por la adición de 10 mL de solución al 10 % (v/v) de Hanks-SFB fría, tras lo cual se agitó para disgregar el tejido, se centrifugó durante 2 minutos a 1000 rpm en una centrífuga de cultivo y se descartó el sobrenadante para eliminar así los restos de colagenasa. Este ciclo de lavados se repitió 3 veces. El sedimento fue resuspendido en la misma disolución y fue pasado por un tamiz de malla de 500 μ m para eliminar los posibles restos de tejidos no disgregados, grasas, nódulos linfáticos,

vasos sanguíneos, etc. El tamizado se centrifugó 2 minutos a 1000 rpm y se descartó el sobrenadante, resuspendiéndose el sedimento en 10 mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.). Sobre éste se añadieron muy suavemente 10 mL de Hanks 1X de modo que se formó un gradiente de densidades, tras lo cual se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos a 10°C, sin freno. Tras la centrifugación, los islotes pancreáticos se situaron en la interfase entre las dos densidades. Éstos fueron recogidos con la ayuda de una pipeta y mezclados con 30 mL de Hanks 1X. Los restos de Histopaque se lavaron mediante 3 ciclos de 30 mL de Hanks 1X centrifugando 2 minutos a 1000 rpm. Tras el último ciclo, los islotes fueron resuspendidos en medio para islotes (RPMI 1640, 10% SFB, 5 mM glucosa y 1% penicilina-estreptomicina) y colocados en una placa de Petri, de donde fueron recogidos manualmente mediante una micropipeta bajo un microscopio invertido Zeiss Axiovert 40C (Carl Zeiss, Gottingam, Alemania) para su posterior utilización.

2.-Estudios de pérdida de función

2.1.-Interferencia mediante ARN

La interferencia por ARN es una herramienta molecular para reducir (knock-down) o perder (knock-out) la expresión de un gen a nivel post-transcripcional. Es utilizada para la búsqueda de las funciones asociadas a genes. Esta interferencia se logra mediante la introducción, a nivel celular, de un ARN de doble cadena pequeño de unos 21-27 pb (siRNA), el cual media la degradación o supresión específica del ARNm que contienen la secuencia complementaria al siRNA introducido, produciéndose una degradación del ARNm citoplasmático y una disminución de la traducción del mensajero.

Las células INS-1E se sembraron a una densidad de 600.000 células por pocillo en medio completo e incubamos 24 horas. Al día siguiente y una vez asegurada la viabilidad celular, preparamos los diferentes complejos de Lipofectamina 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, EEUU) con los siguientes ARN interferentes (ARNi):
1) control: ON-TARGET plus® Control pool Non-Targeting pool (Thermo Scientific

Dharmacon, EEUU), 2) siRNA-IDE: ON-TARGET plus SMART pool Rat IDE (Thermo Scientific Dharmacon, EEUU) a una concentración de 100 nM en OptiMEM (Invitrogen, EEUU). Los complejos fueron preincubados durante 20 minutos a temperatura ambiente para inducir la formación del complejo. Esta mezcla se añadió gota a gota a las células con mucho cuidado. A partir de aquí, se incubaron las células a 37°C durante 4 horas. Paramos la transfección añadiendo hasta 2mL de medio completo a cada pocillo. Se dejó toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se cambió el medio de cultivo y se incubaron las células durante un total de 72 horas.

2.2.- Inhibición de la actividad

Ante la imposibilidad de la utilización de ARNi en cultivos primarios, utilizamos un inhibidor farmacológico de IDE, fenantrolina (1,10-Phenanthroline, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.). Este producto es un inhibidor de metaloproteasas que inhibe la actividad de IDE [140]. Se trataron alrededor de 100 islotes equivalentes (IEq) a una concentración de 2mM en medio completo durante 1 hora a 37°C.

3.-Análisis de la expresión de proteínas mediante Western Blot

Los extractos de proteínas se llevaron a cabo a partir de sedimentos de células. Se extrajeron con un tampón de lisis (125mM Tris, pH 6.8, 2% SDS, 1mM DTT) y se cuantificaron por medio de un kit comercial (Micro BCA, Thermo Fisher Scientific, EEUU). Los extractos de proteínas se mezclaron con LSB (Laemmli Sample Buffer) y se calentaron a 100°C durante 5 minutos. Se cargaron a razón de 20-40 µg por pocillo. Las proteínas de las muestras fueron separadas por su peso molecular empleando geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). La concentración de los geles varió dependiendo del tamaño de las proteínas (todos los geles al 10%, excepto caspasa-3-activa que se resolvió en geles al 12,5%).

Se llevó a cabo la electroforesis a 150 V durante el tiempo necesario para la correcta separación de las proteínas de las muestras en tampón de electroforesis (Biorad

Laboratories, Hercules, CA, EEUU) para posteriormente transferir las proteínas del gel a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore, EEUU) a 100V, durante 1 hora, en tampón de transferencia a 4°C (25mM Tris, 192mM glicina, 15% metanol pH=8,3) (Biorad Laboratories, Hercules, CA, EEUU)), o a 30V durante toda la noche a 4°C. La membrana transferida se bloqueó con una solución de PBS-Tween-5% leche desnatada (PBS 1X, 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) y 5% leche desnatada) y fue incubada posteriormente durante toda la noche a 4°C o durante una hora a temperatura ambiente para el anticuerpo adecuado en PBS-Tween-5% o 0.5% leche dependiendo del anticuerpo (*Tabla 1*). Posteriormente, la membrana fue lavada 3 veces durante 10 minutos con PBS-0,1% Tween y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa (*Tabla 2*) en PBS-Tween-0,5% leche durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a lavar y finalmente la membrana fue revelada utilizando el kit Immun-Star WesternC (BIO-RAD, EEUU). El resultado fue detectado por un lector de geles Chemidoc XRS (BIO-RAD, EEUU) y su software asociado Quantity One 1-D 4.6.5 (BIO-RAD, EEUU). Se utilizó el programa Image J (NIH, EEUU) para el procesamiento y análisis de los datos.

Para comprobar que la carga del gel era homogénea, se analizaron los niveles de actina como proteína control. Para ello previamente se realizó la retirada de los anticuerpos que se encontraban unidos a la membrana (stripping) sumergiéndola durante 20 minutos a 50°C en tampón de stripping (100 mM β -mercaptoetanol, 2% (p/v) SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7). Posteriormente se lavó con PBS-0.1% Tween 2 veces durante 10 minutos y se bloqueó durante 1 hora en PBS-Tween-5% leche para luego incubarla durante 1 hora con el anticuerpo 1º anti-Actina (*Tabla 1*), siguiendo el mismo protocolo que acabamos de describir. La expresión de la proteína de estudio fue normalizada respecto a la cantidad de actina.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución WB	Tiempo incubación	Especie	Tamaño
IDE	Millipore	1:15000	1h r.t.	Conejo	110 KDa
Actina	Sigma-Aldrich	1:2000	1h r.t.	Conejo	37 KDa
AKT/PKB	Cell Signalling	1:1000	Toda la noche (O/N) 4°C	Conejo	60 KDa
p-AKT (Ser473)	Cell Signalling	1:1000	O/N 4°C	Conejo	60 KDa
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signalling	1:1000	O/N 4°C	Conejo	42 KDa
p-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signalling	1:1000	O/N 4°C	Conejo	42 KDa
Caspasa 3 activa	Cell Signalling	1:1000	O/N 4°C	Conejo	19 KDa 17 KDa
Ciclina D1	Invitrogen	1:500	2h r.t.	Ratón	36 KDa
Ciclina D2	Invitrogen	1:500	O/N 4°C	Ratón	36 KDa
Ciclina D3	Abcam	1:500	O/N 4°C	Ratón	35 KDa
Ciclina E	Santa Cruz	1:1000	O/N 4°C	Conejo	50 KDa
Cdk2	Santa Cruz	1:500	2h r.t.	Conejo	34 KDa
Cdk4	Abcam	1:500	2h r.t.	Ratón	36 KDa

Tabla 1. Anticuerpos primarios para Western-blot.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución WB	Especie
Anti-conejo IgG-HRP	Jackson Inmunolab	1:10000	Mono
Anti-Ratón IgG-HRP	Amersham	1:5000	Cabra

Tabla 2. Anticuerpos secundarios para Western-blot.

4.-Estudio de la proliferación celular

4.1.-Incorporación de BrdU

4.1.1.-Detección en la línea celular

Una batería de 78 productos naturales (que no se presentan en este trabajo por motivo de protección de los datos para patentes en proceso de solicitud) fueron obtenidos de extractos marinos y naturales de mares poco explorados. Son productos

aislados y estructuralmente caracterizados procesados en el laboratorio de la Dra. Cueto Prieto, Instituto de Productos Naturales y Agrobiología-CSIC, Tenerife. Todos fueron analizados para comprobar su capacidad proliferativa en las células beta-pancreáticas.

Las células INS-1 832/13 se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillos en una placa de 96 pocillos. Pasadas 24 horas, las células se trataron con un medio bajo en glucosa y sin suero (0%FBS y 2mM glucosa) para su sincronización en cultivo. A las 24 horas, se retiró el medio y las células se trataron con los diferentes productos a tres concentraciones diferentes: 0.1, 1 y 10 μ M diluidos en el mismo medio utilizado anteriormente. Además, se añadió al cultivo el BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina), un análogo de la timidina que se incorpora al ADN de las células que están proliferando. Este BrdU procede de un kit colorimétrico de BrdU (Roche, Alemania) con el que procederemos a la posterior cuantificación de la proliferación de las células. 24 horas después, se cuantificó la proliferación por absorbancia a 370nm. Se utilizó un espectrofotómetro de placa (Biotek, EEUU) siendo la absorbancia proporcional a la cantidad de BrdU incorporado.

4.1.2.-Detección en islotes pancreáticos (inmunofluorescencia)

Los islotes pancreáticos se cultivaron en presencia de los productos naturales, a una concentración de 0,1 μ M, junto a BrdU (Sigma-Aldrich, EEUU) a 10,8 μ M durante 24 horas. Se recogieron los islotes y se prepararon para hacer bloques de parafina (ver apartado 3.9.2 de “Materiales y Métodos”). Se realizaron cortes de 5 μ m de los bloques y éstos se marcaron por inmunofluorescencia con los anticuerpos primarios contra insulina (Invitrogen, EEUU) y BrdU (Abcam, UK) (*Tabla 3*) y sus correspondientes anticuerpos secundarios (*Tabla 4*). El núcleo se tiñó con DAPI (Sigma-Aldrich, EEUU). Las imágenes de las tinciones fueron tomadas usando un microcopio Olympus BX40 de fluorescencia. Posteriormente se realizó el análisis de las fotografías utilizando el programa Image J. La proliferación de las células beta-pancreáticas se determinó a través del cociente entre el número de células BrdU positivas/insulinas positivas entre

el número de células insulino-positivas total. Al menos 1.000 células insulino-positivas por condición fueron contadas de manera manual.

4.2.-Incorporación de Timidina tritiada

Se aislaron islotes pancreáticos para su tratamiento con los productos naturales. Se trataron 100 islotes equivalentes (por triplicado) con [³H]-T, un análogo de la timidina que se incorpora al ADN en fase de replicación, lo que permite determinar la cantidad de timidina incorporada y por tanto la proliferación de dichas células. La concentración final de timidina fue 1 μCi y fue añadido las 24 horas finales del ensayo. La proliferación de las células del islote pancreático se determinó mediante la cuantificación de la incorporación del isótopo radiactivo en un contador de centelleo (Hurloa-Erlöss, España). La medida se estandarizó por los miligramos totales de proteínas de las muestras.

5.-Ensayos de apoptosis

5.1.-Ensayo de apoptosis por TUNEL

Los cortes de los bloques de parafina de islotes tratados con Epoxipikalide, y su correspondiente control, descritos en el apartado 3.4, fueron utilizados para realizar ensayos de muerte celular mediante el kit DeadEnd Fluorometric TUNEL Sistem (Promega, EEUU) y su cotinción con insulina (Invitrogen, EEUU). Este kit detecta células apoptóticas in situ, midiendo fragmentación de DNA nuclear, un marcador bioquímico de apoptosis por incorporación de fluoresceína-12-dUTP en el extremo 3'-OH terminal del DNA usando una enzima recombinante, la Terminal Deoxynucleotidyl Transferasa (rTdT). Esta enzima forma extremos poliméricos usando el principio del ensayo del TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labelling). La fluorescein-12-dUTP-labeled DNA puede ser visualizada por microscopía de fluorescencia. Las imágenes de las tinciones fueron tomadas usando un microcopio Olympus BX40 de fluorescencia. Posteriormente se realizó el análisis de las fotografías utilizando el programa Image J.

La apoptosis de las células beta-pancreáticas se determinó dividiendo el número de células TUNEL positivas/insulinas positivas por condición entre el número de células insulino-positivas totales. Al menos 1.000 células insulinopositivas fueron contadas de manera manual.

5.2.-Detección por Caspasa-3-activa

Los islotes fueron tratados con un mix de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IFN- γ y TNF- α) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) a 1000 U/mL, cada una, durante 48 horas en presencia y ausencia de epoxypukalide. Se realizó, a su vez, una dosis-dependencia del epoxypukalide a 0.01, 0,1 y 1 μ M en islotes durante 48 horas. Una vez tratados, los islotes se recogieron y se realizó extracción de proteínas para analizar la expresión de Caspasa-3-activa mediante western-blot (ver apartado 3.4 de “Materiales y Métodos”).

6.-Análisis de función de las células beta-pancreáticas

6.1.-Sobrecarga de glucosa en la línea celular

La función de la célula beta-pancreática se determinó mediante la secreción de insulina estimulada por glucosa en células tratadas y sus controles. Se sembraron 600.000 células por pocillo. Terminado el tratamiento, se retira el medio y se procede al lavado celular con solución HBSS (114mmol/l NaCl, 4.7mmol/l KCl, 1.2mmol/l KH₂PO₄, 1.16mmol/l MgSO₄, 20mmol/l HEPES, 2.5mmol/l CaCl₂, 25.5mmol/l NaHCO₃ y 0.2% albúmina de suero bovino [libre de ácidos grasos], pH 7.2) a 2.2mM de glucosa. Para inducir la secreción de insulina, las células se pretrataron durante 1 hora en HBSS a 2.2mM de glucosa, seguido de una estimulación con HBSS a 22mM de glucosa de 1 hora y 30 minutos. La cantidad de insulina secretada se midió a través de un kit de ELISA de insulina ultrasensible de rata (ALPCO Diagnostics, EEUU).

6.1.1.-Estudio de la secreción de péptido C

Los sobrenadantes procedentes de las sobrecargas de glucosas de las células tratadas y sus controles fueron utilizadas para medir el péptido C secretado por las células. Para ello se utilizó un kit de ELISA de péptido C de rata (Mercodia, Suecia).

6.1.2.-Estudio de la cantidad de insulina y proinsulina intracelular

Las células tratadas con epoxipikalide y control, fueron lavadas con PBS (Lonza, Verviers, Bélgica) y se resuspendieron en 1mL de etanol ácido (375mL etanol absoluto, 117.5mL de agua destilada y 7.5mL de ácido clorhídrico concentrado) y se guardaron a -20°C hasta el momento de su análisis. La cantidad de insulina intracelular se midió a través del kit de ELISA de insulina ultrasensible de rata. Los niveles de proinsulina se cuantificaron por un kit de ELISA de proinsulina de rata (Mercodia, Suecia).

6.2.-Sobrecarga de glucosa en islotes pancreáticos

Los islotes pancreáticos tratados y sin tratar, se trasladaron a insertos estériles para placas multipocillos (Millipore, EEUU) dentro de una placa de 24 pocillos. Los islotes se dispusieron en grupos de 20 islotes equivalentes (por triplicado) por condición. Se realizaron 2 lavados con HBSS seguido de 10 minutos de preincubación en la misma disolución. El tiempo de estimulación fue de 30 minutos en HBSS a 2.2mM de glucosa (secreción basal) y 22mM de glucosa (secreción estimulada). La cantidad de insulina secretada se midió a través del kit de ELISA de insulina ultrasensible de rata.

7.-Detección de la expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia**7.1.-Extracción, fijación e inclusión de páncreas en parafina.**

Para la extracción del páncreas, los animales fueron sacrificados mediante eutanasia con CO₂. Accedimos mediante incisión latero-longitudinal a la cavidad abdominal del animal y se procedió mediante disección a la extracción del páncreas. Una vez diseccionado el páncreas se lavó con PBS a fin de eliminar los posibles restos de sangre

adheridos al mismo. Pesamos el órgano en una balanza de precisión, lo introducimos en un cassette histológico y los sumergimos en solución Bouin's (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.) para un primer paso de fijación. Transcurridas 4 horas, lavamos las muestras con abundante agua para eliminar el exceso de Bouin's y procedimos a un segundo paso de fijado sumergiendo los cassettes en una solución de formalina al 10% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), renovando la solución diariamente durante un período no superior a 3 días. Tras las fases de fijación y previo al proceso de inclusión en parafina se llevó a cabo la deshidratación del tejido, sumergiéndolo en sucesivas disoluciones de etanol (Merck Chemicals Limited, Darmstadt, Alemania) de concentración creciente desde el 70% hasta el 100% de pureza, pasándolos finalmente a xilol absoluto (Merck Chemicals Limited, Darmstadt, Alemania). Tras el proceso de deshidratación se montaron los bloques de parafina. Los bloques se cortaron en el microtomo en secciones de 5 µm de grosor y se recogieron en portas. Las secciones se incubaron a 56°C toda la noche para favorecer la adherencia de la muestra al porta.

7.2.-Extracción, fijación e inclusión de islotes pancreáticos en parafina

Los islotes tratados se fijaron con solución Bouin's durante 1 hora. Una vez lavados los islotes con agua para retirar el exceso de Bouin's, se pasaron a formalina al 10%. Se dejaron al menos 24 horas. Se prepararon pequeños bloques de islotes con Histogel (Thermo Scientific, EEUU) junto a pequeñas esferas de Affigel (BIO-RAD, EEUU) para detectar la presencia de islotes. Éstos se trataron en gradiente de alcoholes para ser embebidos en parafina.

7.3.-Tinción con inmunofluorescencia para la localización de proteínas

Para realizar el estudio de las proteínas en las células beta-pancreáticas, se eliminó la parafina de los portas sumergiéndolos inicialmente en xilol absoluto y en sucesivas disoluciones de etanol de concentración decreciente desde el 100% hasta el 70% de pureza. Se lavó con PBS 1X (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) y se procedió al desenmascaramiento del antígeno sumergiendo los portas durante 5 minutos en citrato sódico (10mM ácido cítrico pH6) calentado a máxima

potencia en el microondas. Este proceso se repitió una vez más, dejándolo atemperar unos 30 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se lavaron con PBS 1X durante 5 minutos, tres veces. Seguidamente se bloqueó durante una hora con una solución de bloqueo (PBS 1X, 5% suero normal de cabra (Dako, Glostrup, Alemania), 1% BSA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.)) y se incubó toda la noche a 4°C con el/los anticuerpo/s primario/s correspondiente/s (*Tabla 3*) en disolución de bloqueo. Tras lavar con PBS 1X se volvió a bloquear durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se incubó durante 30 minutos con el/los anticuerpo/s secundario/s (*Tabla 4*). Una vez lavados con PBS 1X se montó la muestra con un cubre y medio de montaje más DAPI para teñir los núcleos a una dilución 1:1000 en solución de montaje.

Las imágenes de las tinciones fueron tomadas usando un microcopio Olympus BX40 de fluorescencia.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Especie
Insulina	Invitrogen	1:2000	Cobaya
Insulina	Sigma-Aldrich	1:1000	Ratón
BrdU	Abcam	1:250	Rata

Tabla 3. Anticuerpos primarios para inmunofluorescencia

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Especie
Anti-cobaya IgG-Alexa-488	Invitrogen	1:400	Cabra
Anti-ratón IgG-Alexa-488	Invitrogen	1:400	Cabra
Anti-rata IgG-Alexa-594	Invitrogen	1:400	Cabra

Tabla 4. Anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia

8.-Estudio de la expresión de genes por RT-PCR cuantitativa

La PCR a tiempo real (RT-PCR), es una variante de la PCR donde los procesos de amplificación y detección se producen simultáneamente en el mismo vial. En ésta se monitorizan en cada ciclo la aparición del ADN producto de la reacción mediante el uso de fluoróforos. Cada vez que se realiza una copia del ADN molde se libera fluorescencia, por lo que ésta es proporcional a la cantidad de ADN generado. Un detector realiza la medida de esta emisión de fluorescencia, y la representa gráficamente. De este modo se puede realizar la cuantificación de la expresión de genes.

Se extrajo ARN de las células mediante el kit comercial Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare, Alemania). El ARN obtenido se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) mediante el kit comercial Transcriptor First Strand CDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Alemania), tras lo cual se realizó una PCR de β -actina con el fin de comprobar que teníamos ADNc en nuestros extractos. Para realizar la PCR se emplearon las condiciones descritas en las tablas 5 y 6.

Reactivo	Concentración Stock	Volumen
Tampón TaqP (Promega, Madison, WI, EEUU)	10X	2uL
MgCl ₂ (Promega, Madison, WI, EEUU)	50nM	0.8uL
dNTPs (Promega, Madison, WI, EEUU)	10nM	0.4uL
Cebador—Sentido 5'-.-.3' (Integrated DNA Technologies, Bélgica)	20uM	1uL
Cebador-- Anti-sentido 5'-.-.3' (Integrated DNA Technologies, Bélgica)	20uM	1uL
Enzima TaqP (Promega, Madison, WI, EEUU)	5U/uL	0.2uL
H ₂ O destilada	--	13.6uL
ADN genómico	--	1uL
	Volumen final	20uL

Tabla 5. Mezcla de reacción de PCR para β -actina

	Nº ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min.:seg.)
Fase de iniciación	1	94	5:00
Fase de amplificación	30	94	0:30
		60	0:30
		72	0:30
Fase de elongación final	1	72	7:00
Fase de terminación	1	4	∞

Tabla 6. Ciclos de reacción de PCR para β -actina

El producto de la PCR se mezcló con tampón de carga para ADN (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), se cargó en un gel de agarosa al 1% y se realizó la electroforesis en tampón TBE. El gel fue teñido con RedSafe (Invitrogen, EEUU) y las bandas fueron visualizadas mediante un transiluminador ultravioleta. Una vez comprobada la existencia de ADNc, se realizó una PCR a tiempo real para la cual utilizamos el termociclador Corbett research RG-6000 y su software asociado Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 (Build 75) (Corbett Life Science, Sídney, Australia). Estudiamos los niveles de ARNm tanto de IDE como de marcadores de diferenciación de la célula beta-pancreática: Kir6.2 y Sur1 (subunidades del canal de potasio de la célula beta), glucocinasa (GK, encargada del primer paso de fosforilación de la glucosa) y GLUT2 (transportador de glucosa de la célula beta) y los niveles de ARN de beta-actina como control o “housekeeping”. Para realizar la PCR se emplearon las condiciones descritas en las tablas 7-9.

Reactivo	Concentración Stock	Volumen
SensiFAST SYBR NO-ROX Mix (QIAGEN, EEUU)	2x	10uL
Cebador-Sentido	10uM	0,8uL
Cebador-Antisentido	10uM	0,8uL
H2O destilada		7,2uL
ADNc	1:10	1uL
	Volumen final:	20uL

Tabla 7. Mezcla de reacción de RT-PCR

Cebadores	Secuencia
mSur-1R	5'- GTC CTG TAG GAT GAT GGA CAG G -3'
mSur-1F	5'- CCA AGG GAA GAT TCA AAT TCA A -3'
mKir6.2R	5'- GAA GGA CAT GGT GAA AAT GAG C -3'
mKir6.2F	5'- GGG CAT TAT CCC TGA GGA ATA T -3'
rGLUT2R	5'- AGG CGT CTG GTG TCG TAT G -3'
rGLUT2F	5'- TGG GTT CCT TCC AGT TCG -3'
mGKR	5'- CAT TGG CGG TCT TCA TAG TA -3'
mGKF	5'- AAG GGA ACA ACA TCG TAG GA -3'
rIDE-F1	5'- CCC CTT GTT TGA TGC AAG TT -3'
rIDE-R1	5'- TCC CTT ACA TCG ATG CCT TC -3'
R-BActin-rat	5'- CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA -3'
F-BActin-rat	5'- AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC -3'
(Integrated DNA Technologies, Bélgica)	

Tabla 8. Cebadores para RT-PCR

	RT-PCR		
	Nºciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min.:seg.)
Fase de iniciación	1	95	2:00
Fase de ampliación (adquisición fluorescencia)	40	95	0:10
		58	0:15
		72	0:20
		80	0:02

Tabla 9. Condiciones de reacción para RT-PCR

La cuantificación relativa se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Usando este método se determina el cambio de expresión del gen de estudio en la muestra en relación con la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico, o normalizar respecto a la diferente concentración de ARN total de las muestras, ya que si la cantidad de control o “housekeeping” varía es debido a cambios en la cantidad de ARN total empleada en la síntesis de ADNc, no a cambios en su expresión.

9.-Estadística

La distribución de las variables numéricas se evaluó mediante histograma y el test de Kolmogorov-Smirnoff. En caso de tener una distribución normal, las diferencias entre grupos se estudiaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) cuando fueron grupos superiores a dos, y el test no pareado de la t de Student si se trataba de dos grupos. Se empleó la prueba de Bonferroni como test post-hoc. En caso de variables no paramétricas se empleó la U de Mann-Whitney para comparar grupos de dos, y el test H de Kruskal-Wallis cuando los grupos fueron superiores a dos. Del mismo modo se empleó la prueba de Bonferroni como test post-hoc. El nivel de significancia quedó previamente establecido en el 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

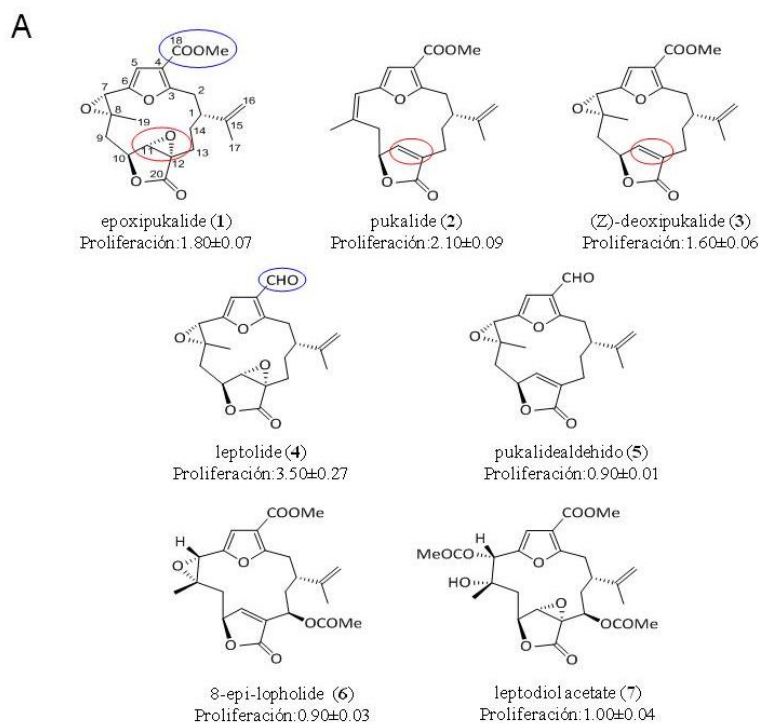
1.- Efecto sobre las células beta-pancreáticas de rata de una colección de productos naturales sin función conocida.

1.1.-Cribado de una colección de los productos naturales marinos.

Se estudió el efecto de una colección de productos naturales sobre la proliferación de las células beta-pancreáticas. Para ello se utilizó la línea celular INS-1 832/13 y una colección de productos naturales marinos de diversos orígenes.

De los 78 productos testados, un único grupo de compuestos indujo proliferación en las células beta-pancreáticas, pertenecientes a una misma familia conocida como furanocembranolidos, obtenidos del coral *Leptogorgia* spp (*Figura 10A*). Este aumento de proliferación se midió por la técnica de incorporación de BrdU.

Cuatro productos: epoxipukalide (1), pukalide (2), (Z)-deoxipukalide (3) y leptolide (4), produjeron proliferación más allá del límite previamente establecido (1.5 veces mayor que la condición control o, lo que es lo mismo, un 50% de aumento en la proliferación) (*Figura 10B*).



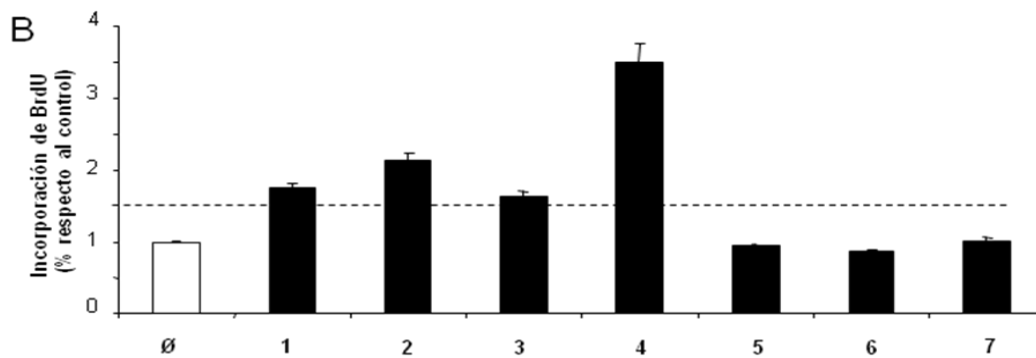
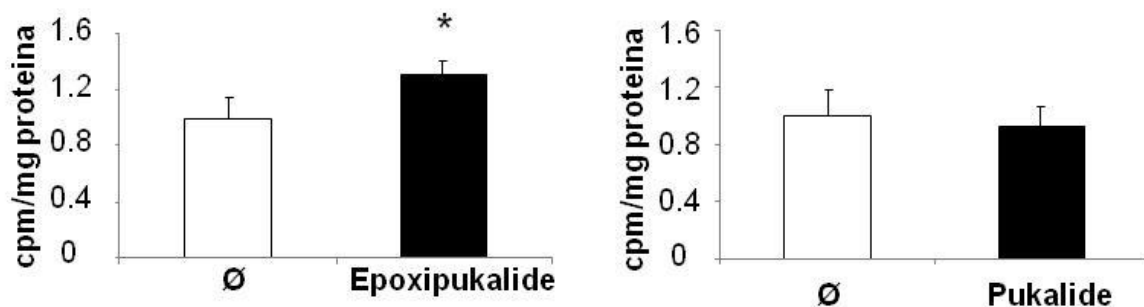


Figura 10. A) Estructura química de los furanocembranolides. B) Cuantificación de la incorporación de BrdU (n=6) en la línea celular INS-1 832/13 tratadas con 0,1 μ M de cada uno de los siete furanocembranolides (1-7). La proliferación se definió como el porcentaje que aumenta la proliferación respecto al control (1.0). Nuestro límite fue 1.5 veces más de proliferación.

1.2.-Efecto del epoxipukalide sobre la proliferación de las células beta-pancreáticas en cultivos primarios de rata.

Para testar *ex vivo* la capacidad proliferativa de los compuestos del 1-4 usamos cultivos primarios de islotes pancreáticos procedentes de rata. Esta vez, y para corroborar la técnica anterior, la proliferación fue medida usando la incorporación de timidina tritiada ([³H]-T). El epoxipukalide mostró un aumento del 30% de proliferación comparado con el control, mientras que el pukalide (2), el leptolide (4) y (Z)-deoxipukalide (3) no produjeron proliferación en los cultivos primarios (*Figura 11*).



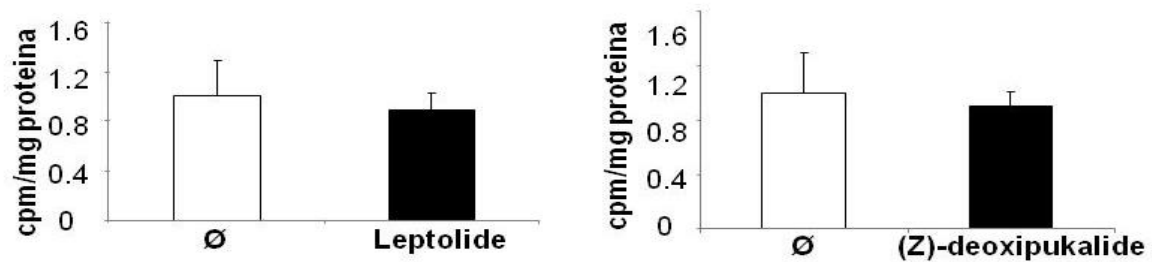


Figura 11. Cuantificación de la proliferación de las células beta-pancreáticas de cultivos primarios de islotes de rata, tratados con 0,1 μ M de los 4 diferentes productos (1-4) o vehículo (\emptyset) durante 24 horas, medida mediante incorporación de 3H-T (n=6 en triplicado) (* p <0,05).

Posteriormente, realizamos un ensayo de dosis-dependencia evaluando la concentración óptima de epoxipukalide en la proliferación de las células, usando concentraciones crecientes desde 0,01-1 μ M. Sólo la concentración 0,1 μ M mostró un aumento significativo en la proliferación celular (*Figura 12*).

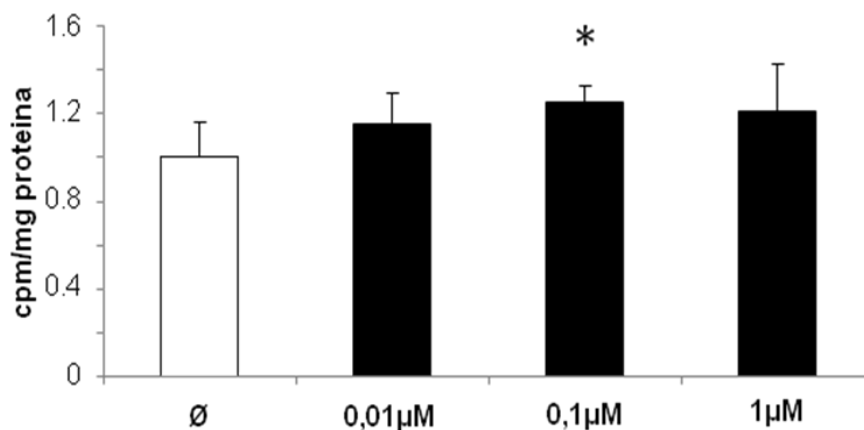


Figura 12. Estudio de dosis-dependencia para testar el efecto del epoxipukalide en la proliferación de las células de islotes pancreático de rata (n=6-12 en triplicado). La proliferación se midió a través de la incorporación de 3H-T.

A partir de aquí, los experimentos siguientes se desarrollaron a la concentración de 0,1 μ M de epoxipukalide.

Como segunda aproximación para medir la proliferación específica de la célula beta-pancreática, usamos la técnica de la incorporación de BrdU seguida de una tinción de insulina/BrdU para cuantificar células BrdU+insulina+ respecto al total de células insulino-positivas. Las células tratadas con epoxipukalide mostraron un aumento del 250% de proliferación comparado con el control (*Figura 13*).

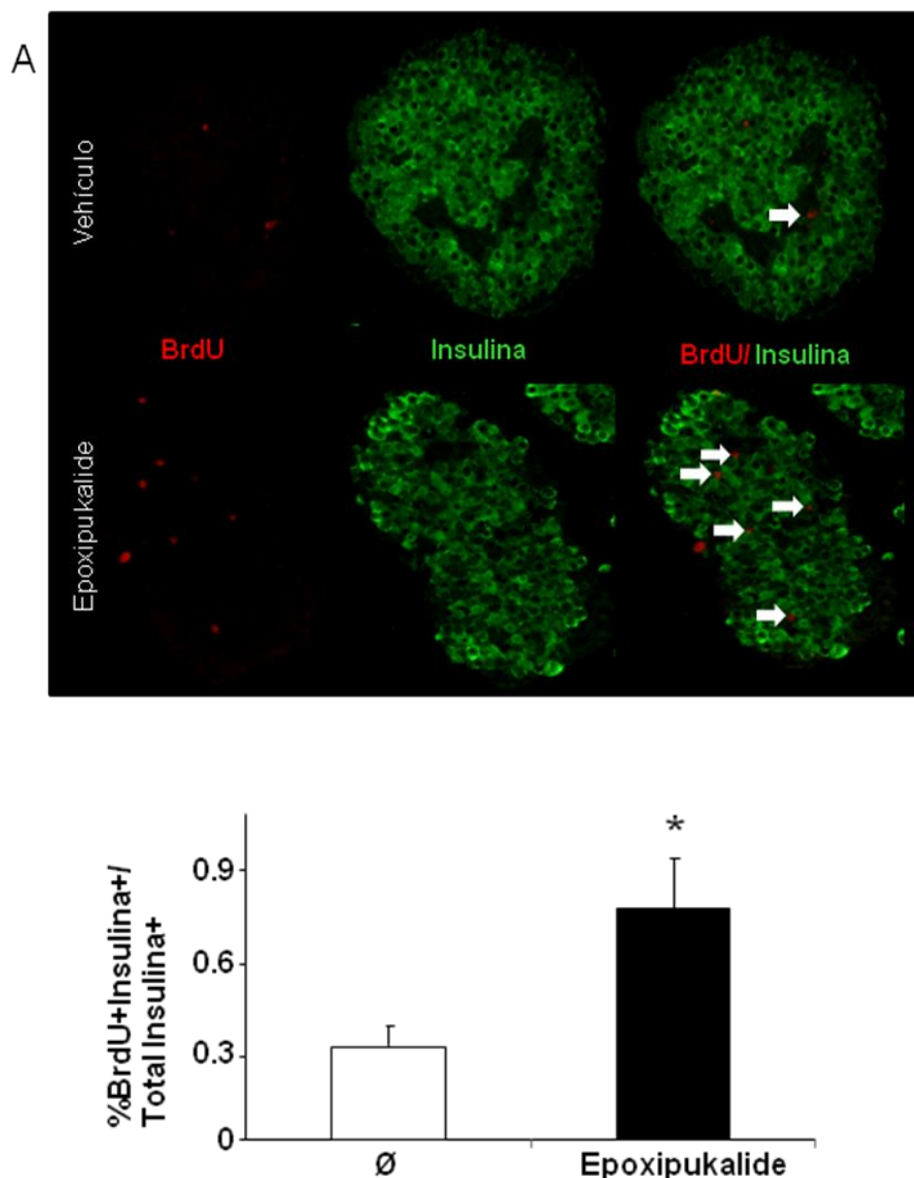


Figura 13. A) Imágenes representativas de cultivos primarios de islotes de rata tratados con 0,1 μ M de epoxipukalide durante 24 horas. Las secciones fueron teñidas para insulina en verde y para BrdU en rojo. Las flechas indican las células beta-pancreáticas positivas. B) Cuantificación del porcentaje de células beta-pancreáticas positivas para BrdU (n=6)(*p<0,05).

Por otra parte, y para analizar si la proliferación causada por el epoxipukalide sobre las células beta-pancreáticas puede producir igualmente proliferación sobre células endocrinas no beta-pancreática del islote, contamos el número de células BrdU+/insulina- respecto al total de células negativas para insulina en las mismas secciones del ensayo anterior. Las células no beta-pancreáticas tratadas con el epoxipukalide no mostraron diferencia en su proliferación comparadas con las células control (*Figura 5*).

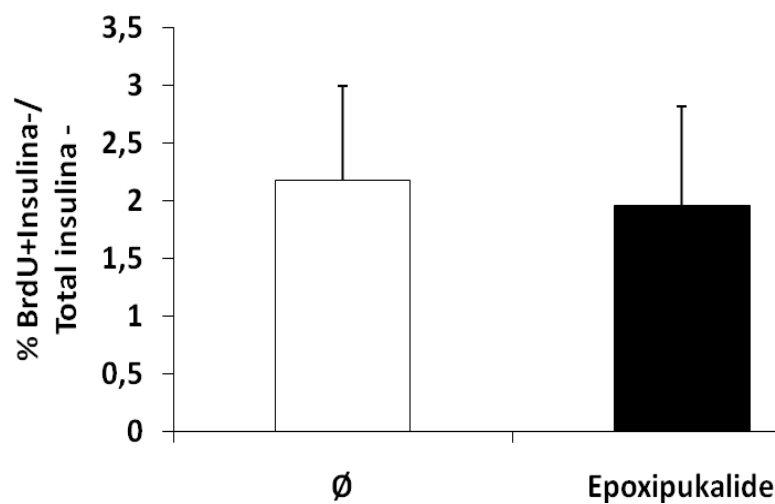


Figura 14. Cuantificación del porcentaje de células no beta-pancreáticas positivas para BrdU procedentes de islotes pancreáticos tratados con 0,1 μ M de epoxipukalide durante 24 horas (n=5).

Este análisis indica que el efecto proliferativo del epoxipukalide es específico y exclusivo de las células beta-pancreáticas del islote pancreático de cultivos primarios de rata.

1.3.-Estudio de las rutas de las rutas de señalización activadas por el Epoxipukalide.

Los análisis por western-blot de dos de las rutas de señalización involucradas en la proliferación de la célula beta-pancreática indicaron que el epoxipukalide no produce

activación de la ruta AKT, pero sí activa la ruta de ERK1/2 en los primeros 15 minutos de tratamiento (*Figura 15*).

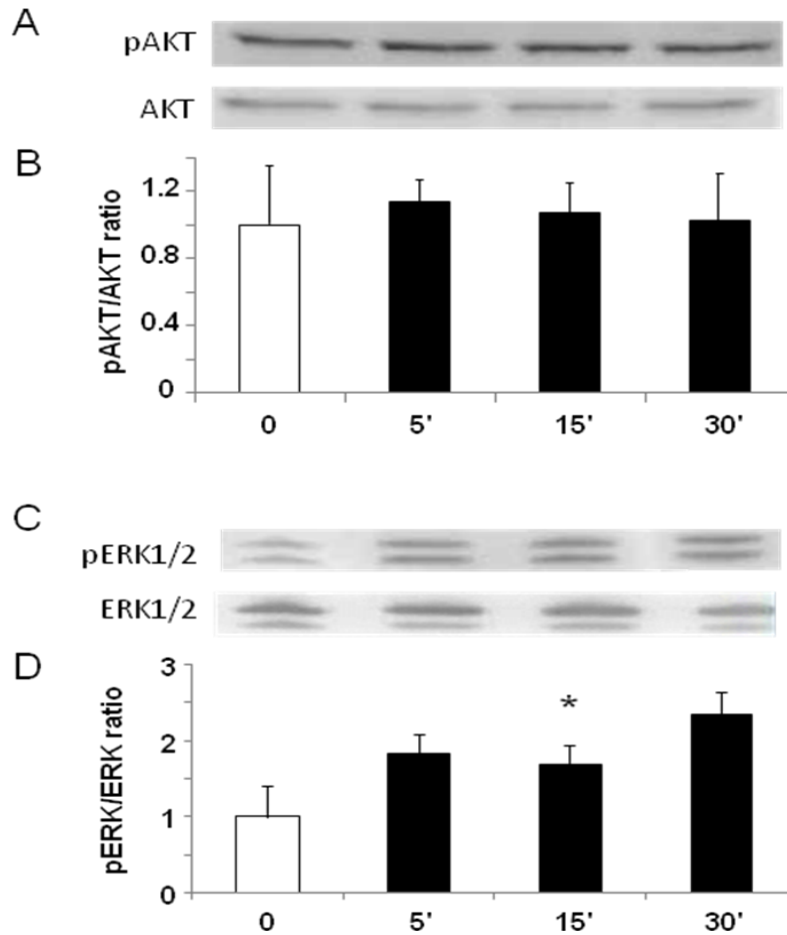


Figura 15. Western-blot representativos que ilustran el efecto del epoxipukalide sobre la ruta de AKT (A) y su cuantificación del ratio pAKT/AKT (B). Western-blot representativos que ilustran la activación de la ruta de ERK1/2 (C) y su cuantificación del ratio pERK/ERK (n=4) (D).

Para confirmar si ERK1/2 podría mediar el efecto proliferativo del epoxipukalide, utilizamos un inhibidor farmacológico específico de la ruta (PD98059) y su efecto fue examinado en la proliferación de islotes tratados con el producto a través de la técnica de incorporación de [3H]-T. PD98059 disminuyó la proliferación inducida por el epoxipukalide a niveles basales (*Figura 16*), mostrando que esta ruta es la encargada de la proliferación inducida por epoxipukalide en las células beta-pancreáticas.

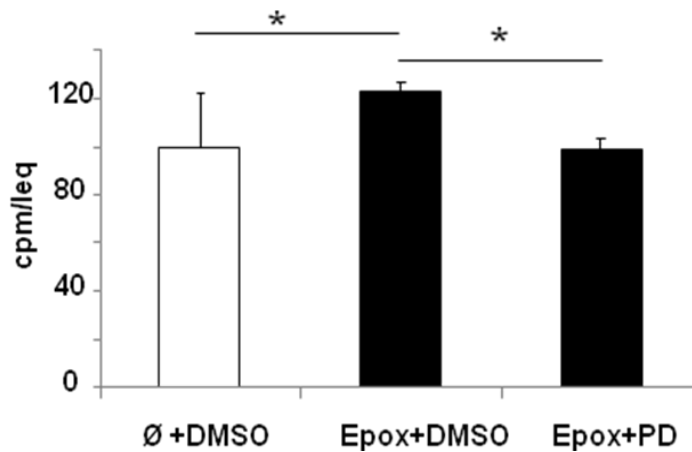
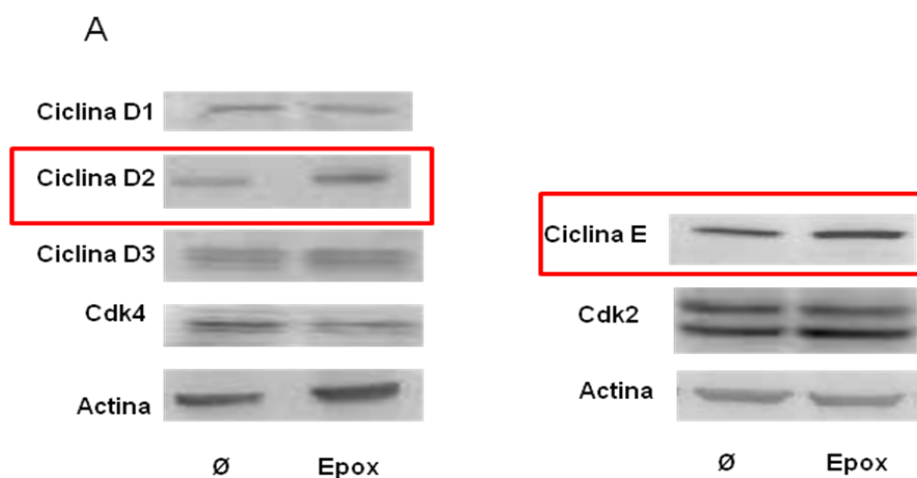


Figura 16. Proliferación celular inducida con el epoxipukalide (Epox) en islotes de rata pretratados en presencia de PD98059 (PD) o vehículo DMSO. La proliferación de las células beta-pancreáticas se midió por incorporación de 3H-T y fue comparada con el control (islotes tratados con el DMSO) (n=3 en triplicado) (*p<0,05).

1.4.- Estudio de activadores del ciclo celular regulados por el epoxipukalide.

Para seguir investigando los mecanismos por los cuales el epoxipukalide induce proliferación de las células beta-pancreáticas, realizamos western-blots para las proteínas involucradas en la fosforilación de pRb en la fase G1/S (ciclina D1, ciclina D2, ciclina D3, cdk4, ciclina E y cdk2) en islotes de rata en presencia o ausencia de epoxipukalide. De las seis proteínas testadas, sólo ciclina D2 y ciclina E estaban aumentadas en su expresión en torno al 15% en los islotes tratados con epoxipukalide comparados con los islotes control (*Figura 17*).



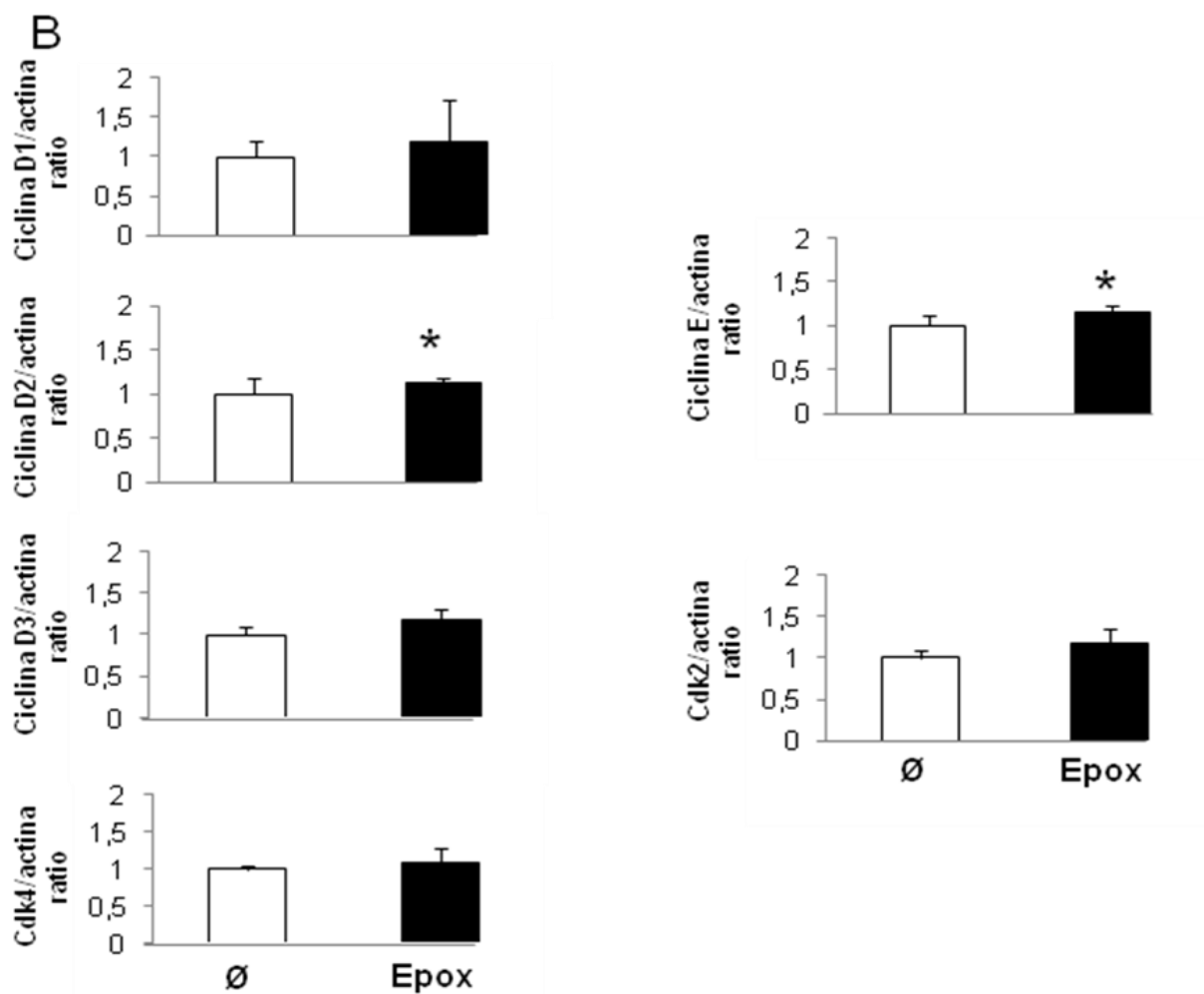


Figura 17. Cultivos primarios de islotes de rata tratados con epoxipukalide (Epox) o vehículo (Ø). Western-blot representativo de las diferentes ciclinas y quinasas (A). Análisis densitométrico de los western-blots (n=3-10) (B) (*p<0,05).

1.5.-Efecto del epoxipukalide sobre la muerte basal e inducida por citoquinas proinflamatorias.

Para investigar los efectos de epoxipukalide sobre la supervivencia de la célula beta-pancreática, realizamos un estudio de dosis-dependencia para evaluar al producto utilizando concentraciones desde 0,01-1 μM . Para ello analizamos la muerte celular mediante la expresión de caspasa 3 activa por western-blot. Aunque las tres dosis disminuían la expresión de caspasa 3 activa, solamente la concentración de 0,1 μM

mostró una disminución significativa (*Figura 18*), por lo que en los siguientes ensayos de muerte celular se utilizó la concentración de $0,1\mu\text{M}$.

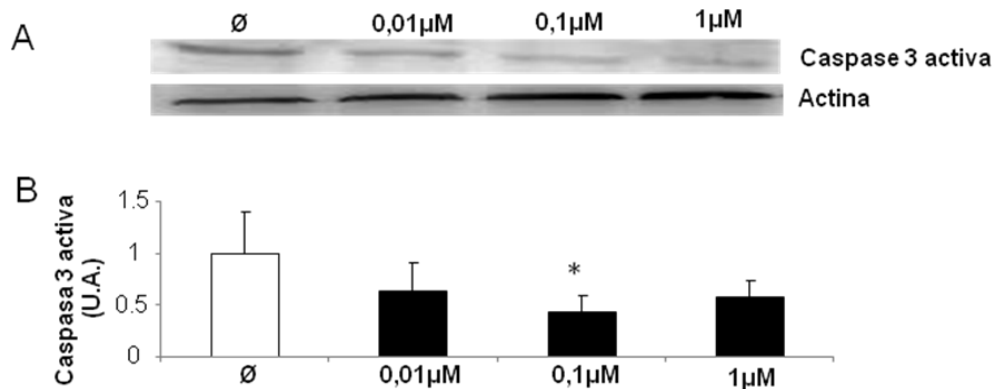
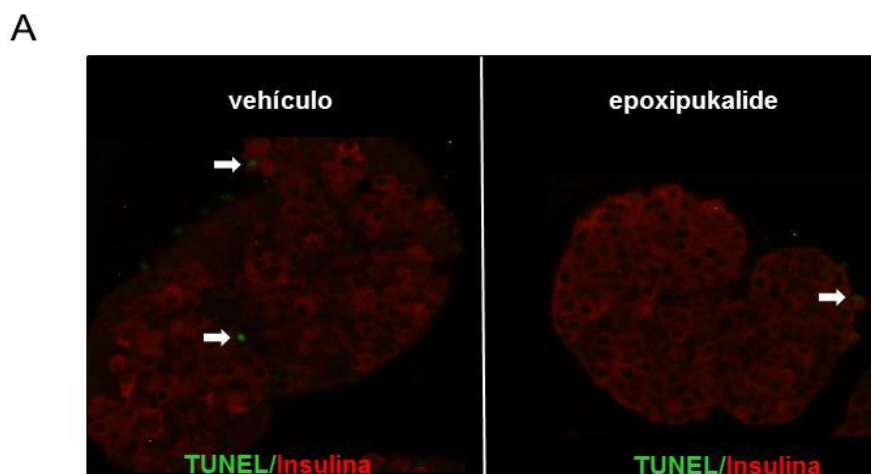


Figura 18. Western-blot representativo que muestran la protección de la muerte celular mediada por el epoxipukalide de manera dosis-dependiente (A). Análisis densitométrico del western-blot (B) (n=4).

Para confirmar el efecto de epoxipukalide sobre la muerte celular realizamos una tinción de TUNEL e insulina en secciones de islotes de rata, tratados previamente con epoxipukalide (*Figura 19*) y, así mismo, determinamos la activación de la apoptosis mediante la expresión de caspasa 3 activa en islotes tratados con epoxipukalide junto al tratamiento con citoquinas (simulando las condiciones fisiopatológicas de la DM) La expresión de caspasa 3 activa aumenta un 70% respecto al control, y dicho incremento es revertido cuando los islotes han sido tratados con epoxipukalide, apreciándose la protección que ofrece el epoxipukalide de la apoptosis basal e inducida por CQs sobre los islotes pancreáticos (*Figura 20*).



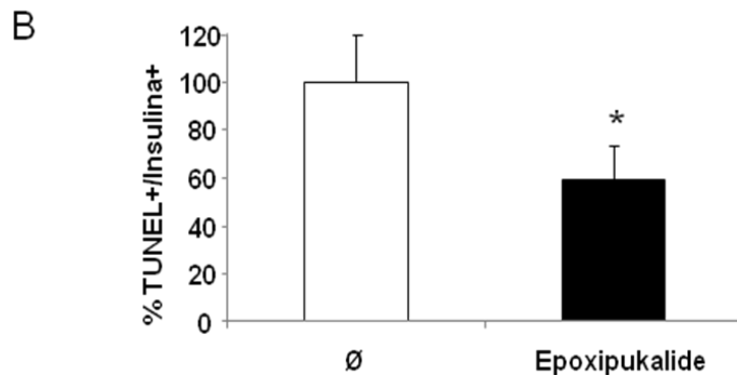


Figura 19. Imágenes representativas de cultivos primarios de células beta-pancreáticas de rata tratados con epoxipukalide durante 24 horas. Las secciones se tiñeron para insulina en rojo y TUNEL en verde; las flechas indican las células beta-pancreáticas positivas para TUNEL (A). Cuantificación del porcentaje de células beta-pancreáticas positivas para TUNEL (n=6) (B).

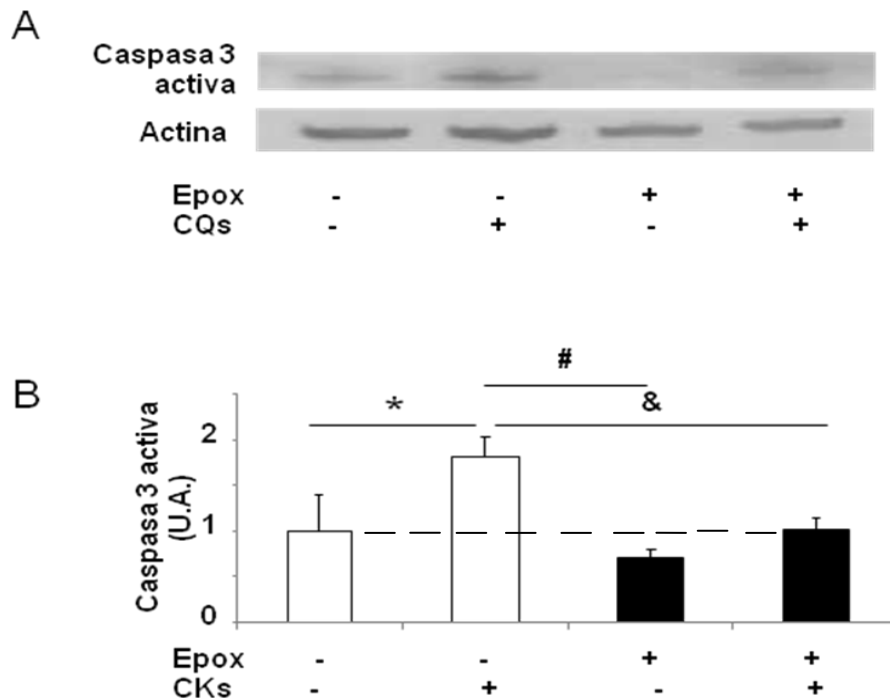


Figura 20. Western-blot representativo que ilustra el efecto protector del epoxipukalide (A). Análisis densitométrico del western-blot (n=5) (#,&,*p<0,05)(B).

1.6.-Efecto del epoxipukalide sobre la función de la célula beta-pancreática.

Finalmente, comprobamos si el tratamiento con epoxipukalide alteraba la función propia de la célula beta-pancreática, es decir, la producción y secreción de insulina.

Realizamos un ensayo de secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes tratados con epoxipukalide, observando que era normal comparada con la condición control (*Figura 21*). Además, medimos el contenido de insulina intracelular tanto en los islotes control como en los tratados con epoxipukalide, a diferentes concentraciones, sin encontrar diferencia alguna entre ambas condiciones (*Figura 22*). Ambos resultados demuestran que epoxipukalide no induce un efecto negativo sobre la función de las células beta-pancreáticas.

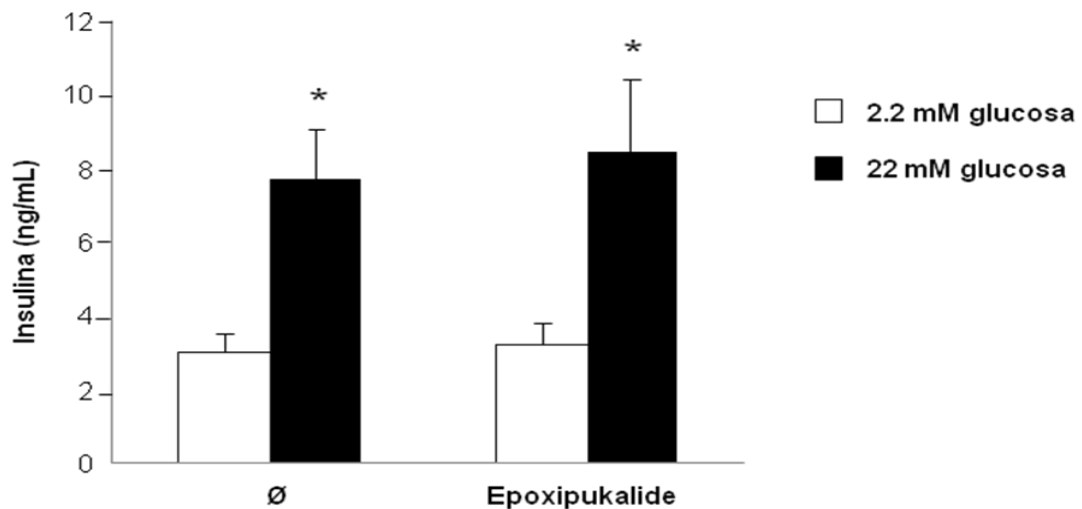


Figura 21. Secreción de insulina estimulada por glucosa realizada en islotes tratados con 0,1 μ M de epoxipukalide o vehículo (Ø) como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Los experimentos se realizaron en triplicados (n=9) (*p<0,05)

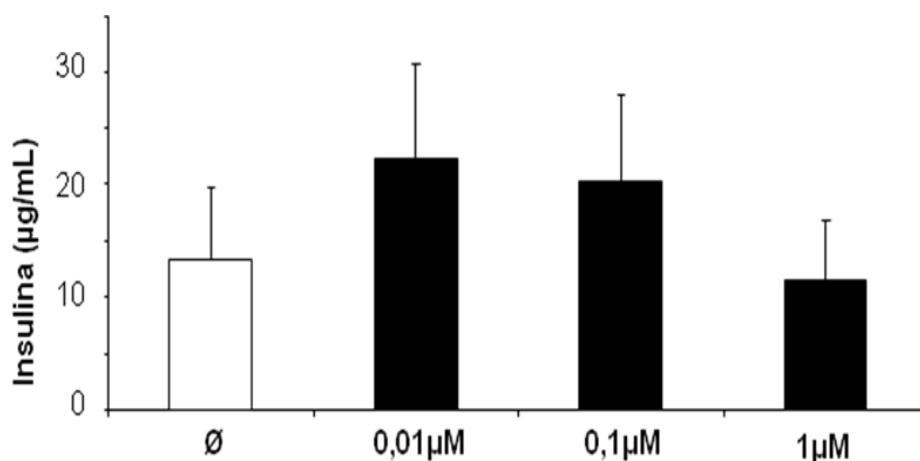


Figura 22. Contenido de insulina de islotes tratados con diferentes concentraciones de epoxipukalide (0,01-1 μ M) (n=5 en triplicado)

Todos estos resultados en conjunto demuestran que el epoxipukalide produce proliferación de la célula beta-pancreática y protege de la muerte celular basal e inducida por CQs; por lo que nos lleva a pensar en la utilización del epoxipukalide como posible terapia para el tratamiento de la diabetes.

2.- Papel de IDE en la función de la célula beta-pancreática.

2.1.-Bajo condiciones fisiopatológicas.

2.1.1.-Efecto de la hiperglucemia y la hiperinsulinemia sobre los niveles de IDE en las células beta-pancreáticas.

Efecto sobre niveles de proteínas.

Ratón db/db.

Para comprender la función de IDE en la regulación de la homeostasis de la glucosa, decidimos analizar los niveles de expresión de IDE en la célula beta-pancreática. Para ello, empleamos el ratón db/db (ratón deficiente en el receptor de leptina), un modelo de obesidad, hiperinsulinemia e hiperglucemia. Se emplearon ratones machos, control (db/+) y knockout (db/db) con una edad de 3 y 6 meses. A partir de la semana 4 de vida los ratones db/db presentaban valores de insulina muy superiores a los de los animales control. Este grupo alcanzó niveles 25-30 veces superiores a los del grupo control en la semana 5-6 de vida (5.0ng/mL vs. 0.5ng/mL, $p < 0,05$ versus control), hasta que en la semana 12 estos niveles comienzan a descender hasta llegar a tener niveles parecidos al grupo control a las 26 semanas. Igualmente, estos ratones a las 4 semanas de vida presentan una tolerancia a la glucosa similar a la de los ratones del grupo control. No es hasta la semana 8, cuando los ratones db/db muestran un fenotipo claramente intolerante a la glucosa e hiperglucémico (450 mg/dL vs. 150mg/dL, $p < 0,05$ versus control). Una vez desarrollada, la intolerancia a la glucosa se incrementa en las semanas posteriores. Tras el sacrificio y el aislamiento de los islotes pancreáticos se estudió, a través de western-blot, la expresión de IDE. Ésta se encontraba aumentada en un 50% de manera significativa ($p < 0.05$) en los ratones de 12 semanas de edad

(Figura 23A). Los niveles de IDE en los islotes de ratones de 24 semanas de edad, no mostraban diferencia respecto al control (Figura 23B).

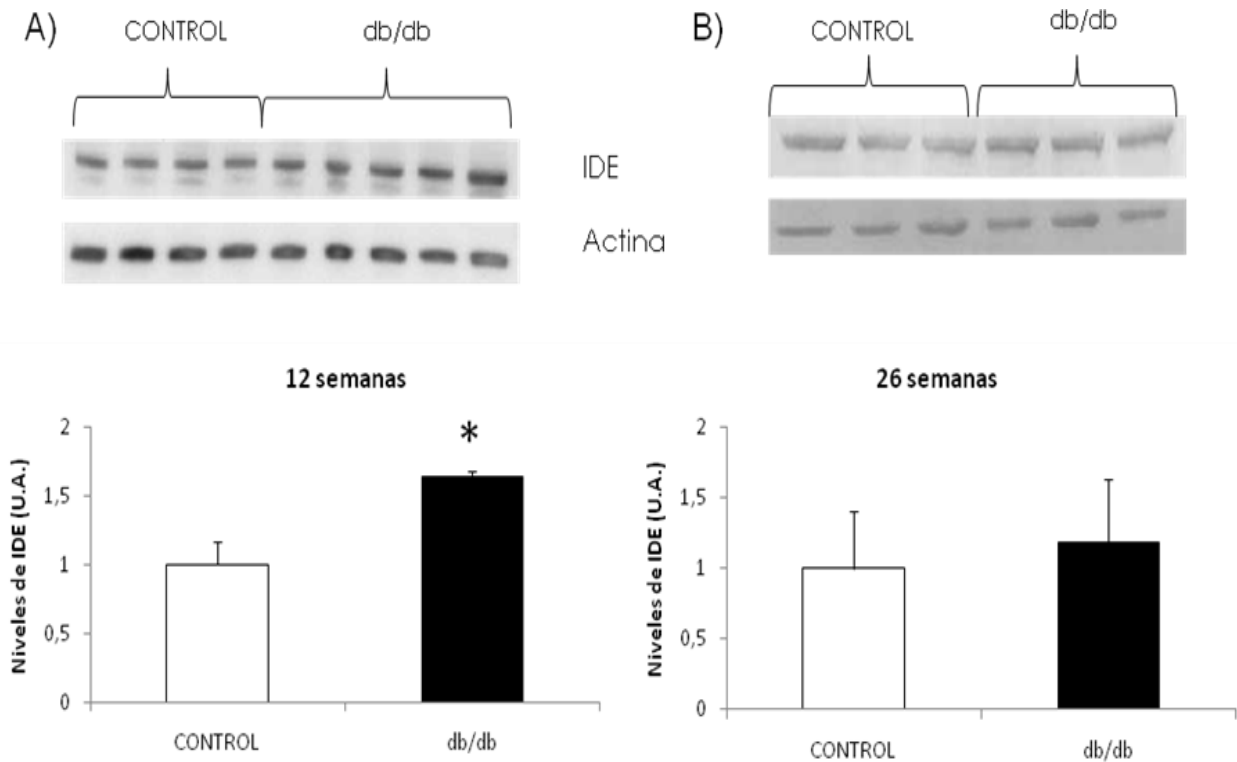


Figura 23. Western-blot representativo de la expresión de IDE en islotes de ratón db/db y control (db/+) a las 12 semanas (A) y 26 semanas (B) junto a sus respectivos análisis densitométrico de los western-blot.

Un análisis estadístico de los datos de la caracterización del modelo demostró una correlación directa entre los niveles de IDE en las células beta-pancreáticas y la concentración de insulina en el plasma de ratones control (n=4) y db/db (n=5). Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico SPSS. Las muestras siguieron una distribución normal, empleándose el coeficiente de correlación de Pearson para estudiar la correlación entre variables ($r=0,479$) (Figura 24); indicando que la hiperinsulinemia está relacionada con un aumento en la expresión de IDE en la célula beta-pancreática.

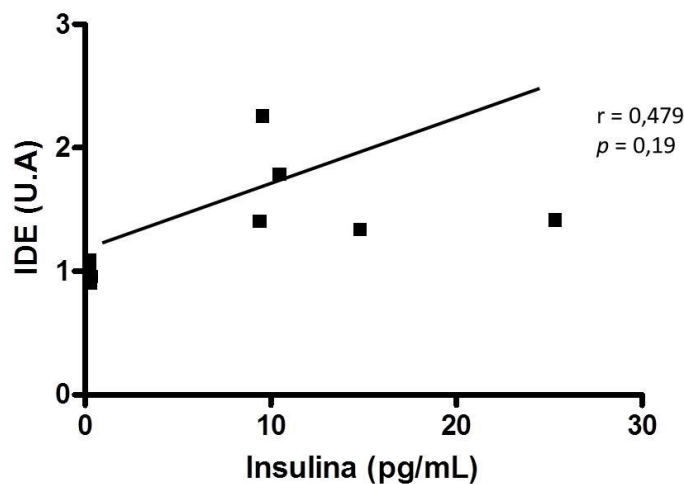
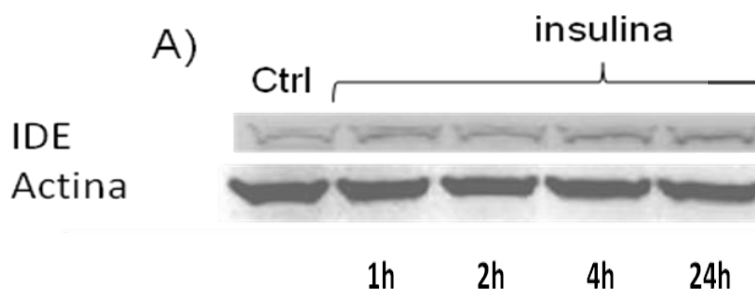


Figura 24. Correlación entre los niveles de insulina en el plasma de los ratones (control y db/db) y los niveles de expresión de IDE.

Línea celular.

Para corroborar nuestra observación de que la insulina aumenta los niveles de IDE, empleamos la línea celular INS-1E sometida a 500 nM de insulina a diferentes tiempos. Al analizar los niveles de IDE a través de western-blot se mostró que la hiperinsulinemia incrementa los niveles de IDE de forma significativa, a partir de 1 hora y hasta las 4 horas de tratamiento, aumentando al doble la expresión en el último tiempo indicado. Tras las 24 horas de tratamiento los niveles de IDE retornan al nivel basal (*Figura 25*).



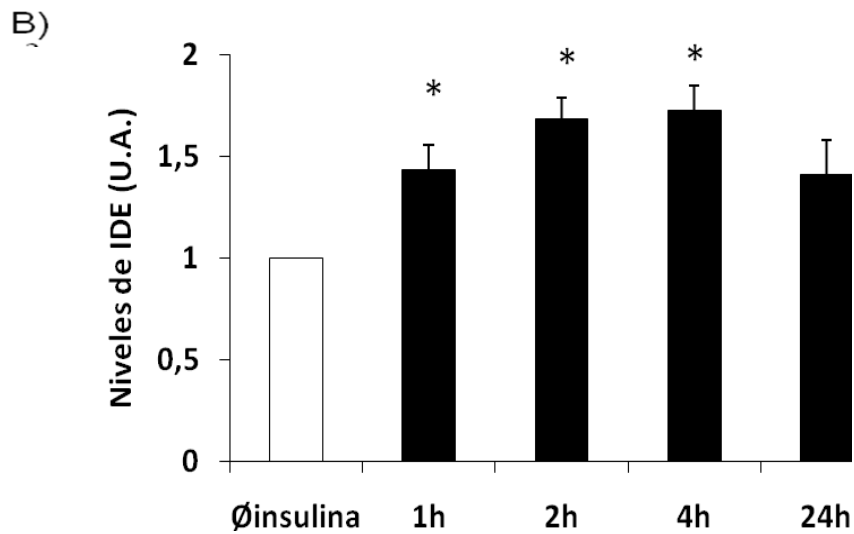
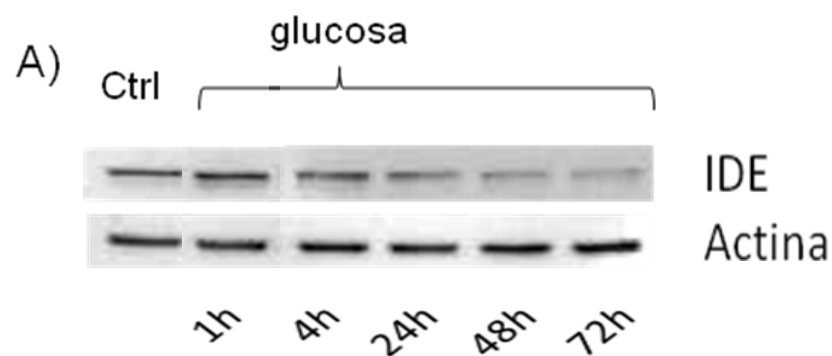


Figura 25. Western-blot representativo que ilustra la regulación de la expresión de IDE en la línea celular tratada con una alta concentración de insulina (500nM) (A). Cuantificación por densitometría de los western-blot de IDE (B) (n=3) (*p<0,05).

Estos datos demuestran que IDE es regulada de manera tiempo-dependiente por la hiperinsulinemia en la célula beta-pancreática, corroborando nuestros datos en el ratón db/db.

En cuanto al efecto de la hiperglucemia sobre la regulación de los niveles de IDE en las células beta-pancreáticas, se trató la línea celular en presencia o ausencia de glucosa 22mM. La hiperglucemia producida demostró que la expresión de IDE se encontraba disminuida en un 20-30% a las 24 horas de tratamiento y un 40% a las 48 y 72 horas (Figura 26), indicando que la exposición crónica a hiperglucemia reduce los niveles de IDE en la célula beta-pancreática de manera tiempo-dependiente.



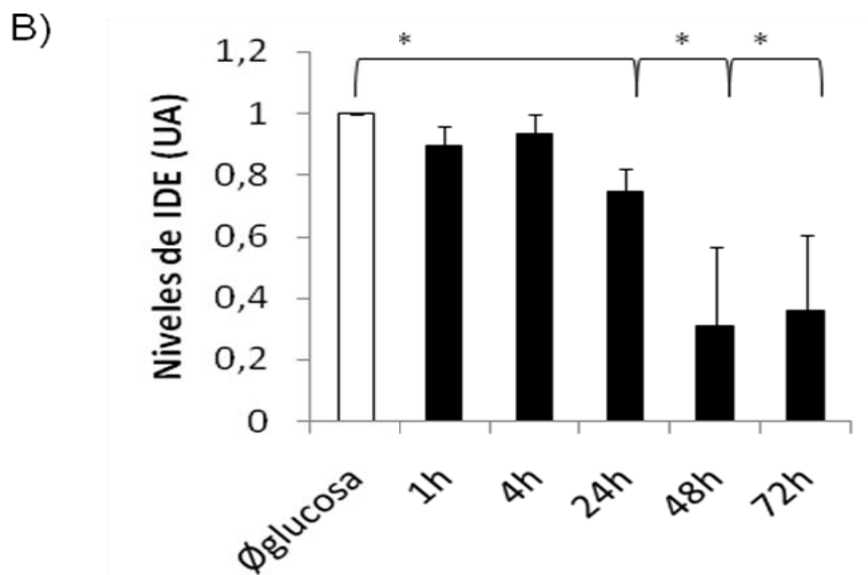
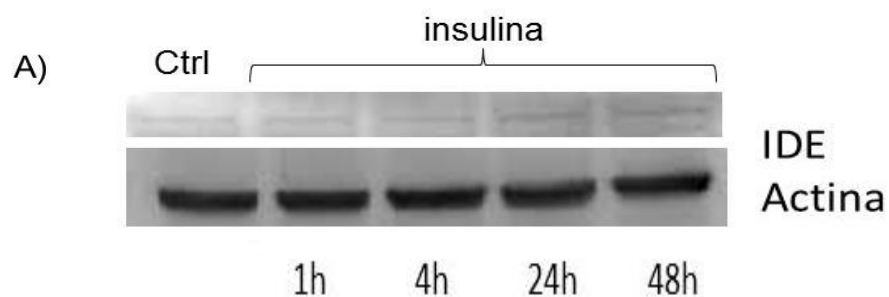


Figura 26. Western-blot representativo que ilustra la regulación de la expresión de IDE en la línea celular tratada con una concentración alta de glucosa (22mM) versus el control no tratado (A). Cuantificación por densitometría de los western-blot de IDE (B) (n=3) (*p<0,05).

Cultivos primarios de islotes pancreáticos de rata.

Para corroborar los datos anteriores en ambos sistemas de estudios, estudiamos la expresión de IDE en cultivos de islotes pancreáticos tratados con insulina 500nM, demostrando que se incrementan los niveles de IDE después de 1 hora de tratamiento y hasta las 48 horas (*Figura 27*) (aunque sin diferencias significativas respecto al control) corroborando así los datos obtenidos anteriormente .



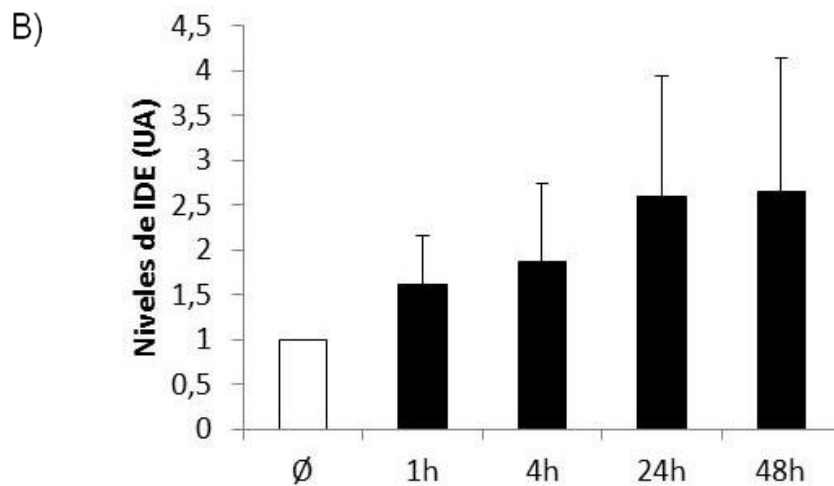
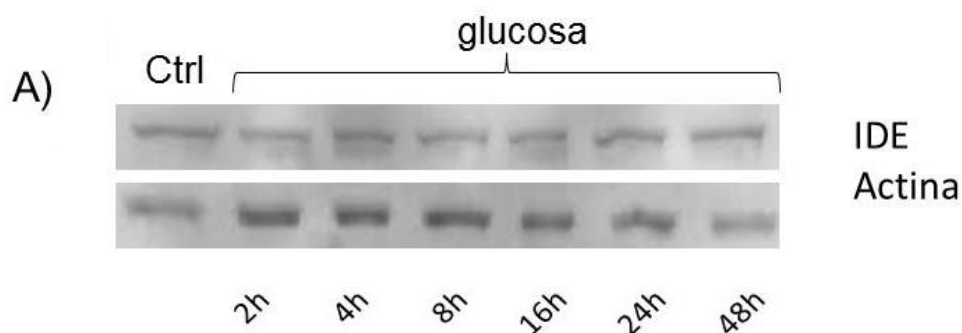


Figura 17. Western-blot representativo que ilustra la regulación de la expresión de IDE en la línea celular tratada con alta concentración de insulina (500nM) versus el control no tratado(A). Cuantificación por densitometría de los western-blot de IDE (B) (n=3).

Estos datos sugieren que IDE se encuentran regulada de manera tiempo-dependiente por la hiperinsulinemia en la célula beta-pancreática de los islotes de rata.

El tratamiento con hiperglucemia de los islotes pancreáticos demostró que la expresión de IDE se encuentra disminuida en todos los puntos de estudio. El menor nivel de IDE se encontró de manera significativa a las 2 horas de tratamiento (*Figura 28*). Estos resultados demuestran que la exposición a hiperglucemia regula la expresión de IDE, corroborando los datos de la línea celular.



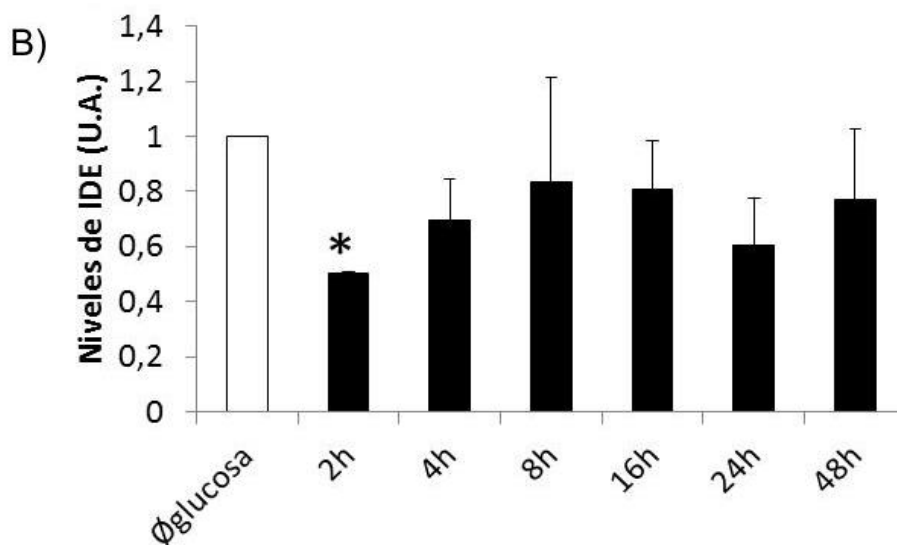
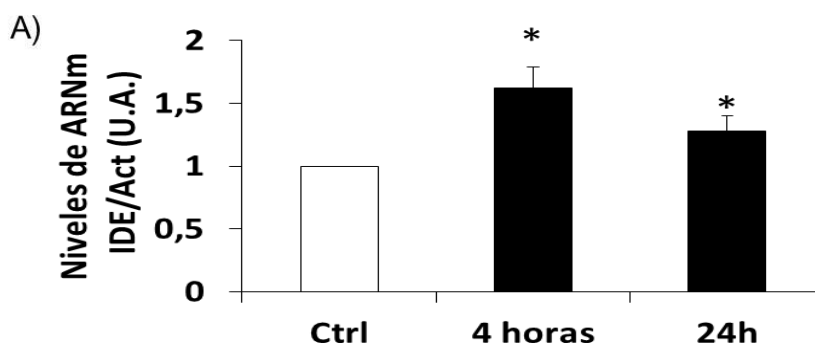


Figura 28. Western-blot representativo que ilustra la regulación de la expresión de IDE en la línea celular tratada con glucosa a una concentración de 11mM, versus el control tratado a 5.5mM de glucosa (A). Cuantificación por densitometría de los western-blot de IDE (B) (n=3) (* $p < 0,05$).

Efecto sobre niveles de ARN.

Línea celular y cultivos primarios de islotes pancreáticos de rata.

Para dilucidar si el aumento en los niveles de IDE debido a la hiperinsulinemia es debida a una regulación transcripcional, se analizaron los niveles de ARNm a 2 y 4 horas de tratamiento con insulina en la línea celular, y a 4 y 24 horas en los cultivos primarios de islotes de rata. Los niveles de IDE se veían aumentados en ambos tiempos y tipos de cultivos, aunque los mayores niveles se encontraban a las 4h en la línea celular (*Figura 29A*) y a las 24h en los cultivos primarios (*Figura 29B*).



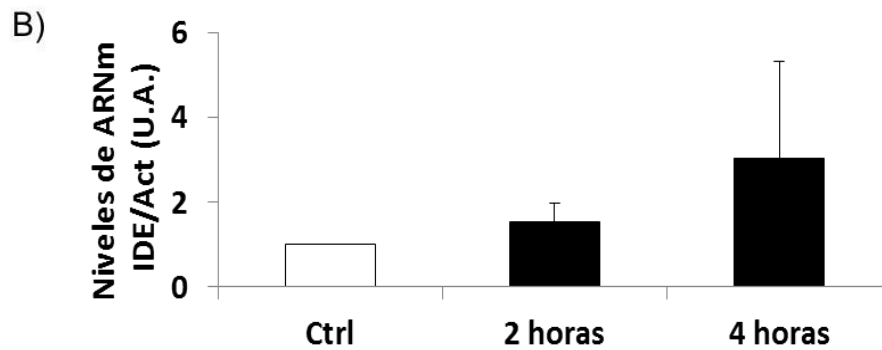


Figura 29. Análisis de los niveles de ARNm a través de PCR a tiempo real de células INS-1E tratadas con insulina a 500nM durante 2 y 4 horas (A) (n=3) e islotes pancreáticos de rata tratados a 4 y 24 horas (B) (n=4) (*p<0,05).

En cuanto a la hiperglucemia, también se estudió si su efecto sobre la expresión de IDE estaba regulado a nivel transcripcional. Los niveles de ARNm de IDE se encontraban disminuidos significativamente con respecto al control en la línea celular INS-1E e islotes de rata a las 24 horas (*Figura 30A*) y 4 hora (*Figura 30B*).

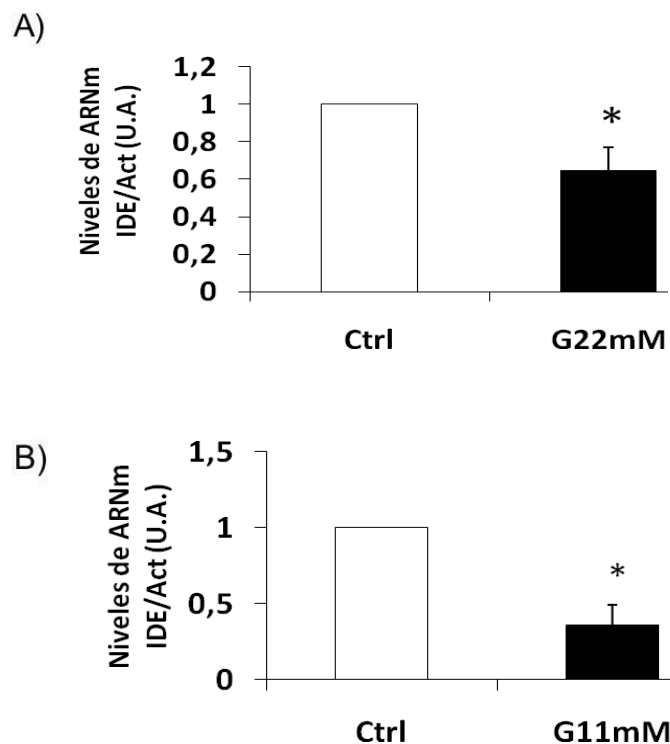


Figura 30. Análisis de los niveles de ARNm a través de PCR a tiempo real de células INS-1E tratadas con glucosa 22mM durante 24 horas (A)(n=3) e islotes pancreáticos de rata tratados durante 4 horas de un total de 48 horas en cultivo (B) (n=3 por triplicado) (*p<0,05).

Estos resultados sugieren que tanto la hiperglucemia como la hiperinsulinemia regulan de manera transcripcional los niveles de IDE en la célula beta-pancreática.

2.1.2.-Efecto de los ácidos grasos sobre la expresión protéica de IDE en la célula beta-pancreática.

Una de las condiciones fisiopatológicas que tienen un papel en la disfunción de la célula beta-pancreática es la alta concentración de ácidos grasos, como el ácido palmítico y el ácido oléico. Se trataron células a una concentración de 0,9 mM de cada producto además de diferentes combinaciones entre ellos. Al analizar la expresión de IDE, no observamos cambio alguno con respecto al control (*Figura 31*).

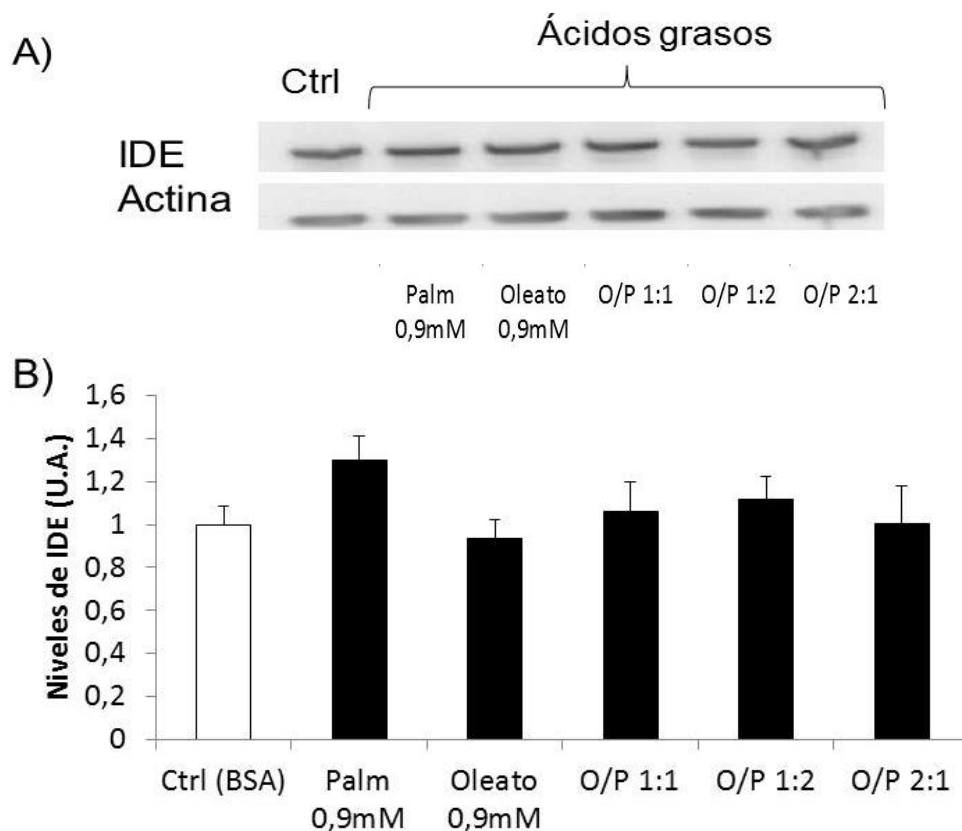


Figura 31. Western-blot representativo que ilustra el tratamiento de la línea celular INS-1E con los ácidos palmítico (Palm) y oleico y las diferentes combinaciones entre ellos comparándolas con el control (tratamiento con BSA) (A). Cuantificación densitométrica de la expresión IDE por western-blot (B) (n=5).

2.2.-Bajo condiciones fisiológicas.

2.2.1.-Efecto de la reducción de expresión de IDE en las células beta-pancreáticas.

Estudio de la secreción de insulina.

Para profundizar el conocimiento de la función de IDE en el metabolismo de la insulina, decidimos estudiar el impacto de la pérdida de función de IDE en las células. Para ello se redujo la expresión de IDE por medio de un silenciamiento génico con ARNi. El tratamiento de las células con el ARNi-IDE redujo la expresión de IDE aproximadamente un 40% respecto a las células tratadas con el ARNi-control (*Figura 32*).

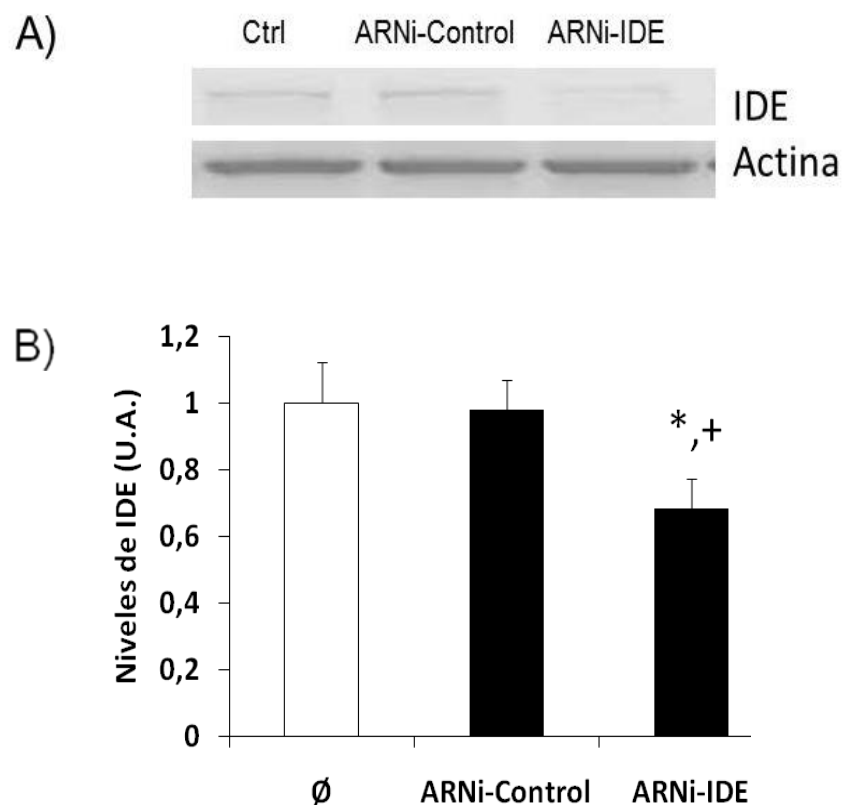


Figura 32. Western-blot representativo de la disminución de expresión de IDE a través de la interferencia de ARNi-IDE (A). Análisis densitométrico de la expresión de IDE por western-blot (B) (n=4 por triplicado) (*,+p<0,05).

Para comprobar el efecto de la pérdida de expresión de IDE sobre la función de las células beta-pancreáticas, sometimos estas células a una sobrecarga de glucosa y se midió la capacidad de secretar insulina. Las células control mostraron una secreción de insulina en respuesta a glucosa normal, triplicando la secreción basal (2.2mM glucosa) en condiciones de alta glucosa (secreción estimulada, 22mM glucosa). Sin embargo, la reducción de los niveles de IDE produjo una disminución de aproximadamente el 50% de la secreción de insulina (*Figura 33*) de manera significativa con respecto al control.

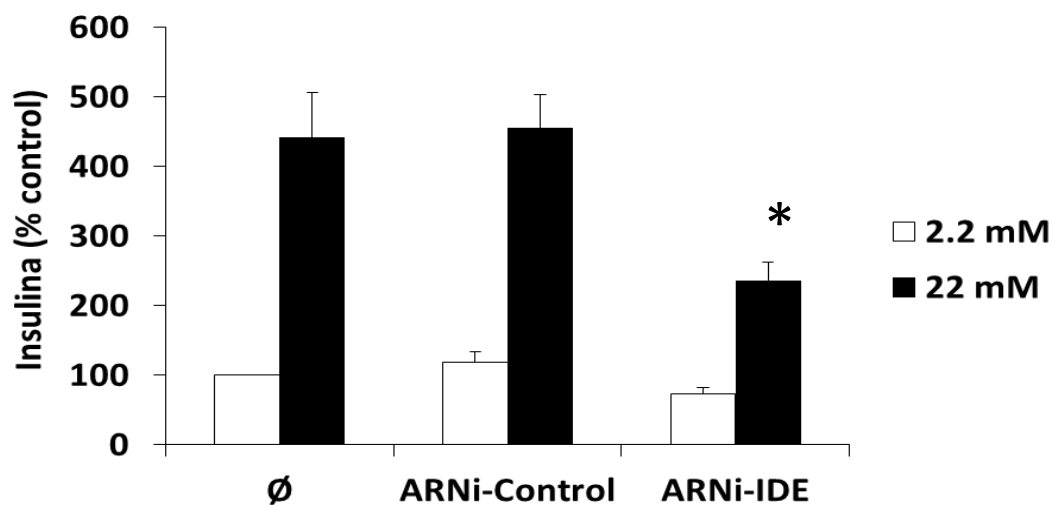


Figura 33. Ensayo de GSIS realizado sobre células transfectadas con el ARNi-control/IDE después de 96h. Los experimentos se realizaron por triplicado (n=4). Las barras blancas corresponden a la insulina secretada a baja concentración de glucosa (2.2mM) y las negras a alta concentración de glucosa (22mM) (*, +p<0,05)

Estos resultados muestran que IDE juega un papel importante en algún punto del mecanismo de producción y/o secreción de insulina en la célula beta-pancreática.

Estudio de la secreción de péptido C.

El péptido C es una proteína que se cosecreta en una proporción 1:1 con la insulina. La medida de su secreción es una medida indirecta de ver si hay un problema en el mecanismo de secreción de la insulina. Los sobrenadantes de las GSIS de las células transfectadas con el ARNi-IDE y su respectivo control, se utilizaron para medir los niveles del péptido C. Al analizarlos, las células tratadas con el control secretaron

niveles normales de péptido C, triplicando la secreción basal. En cambio, se produjo una disminución en torno al 50% de la secreción de péptido C en las células con los niveles de IDE disminuidos (*Figura 34*), de manera significativa con respecto al control.

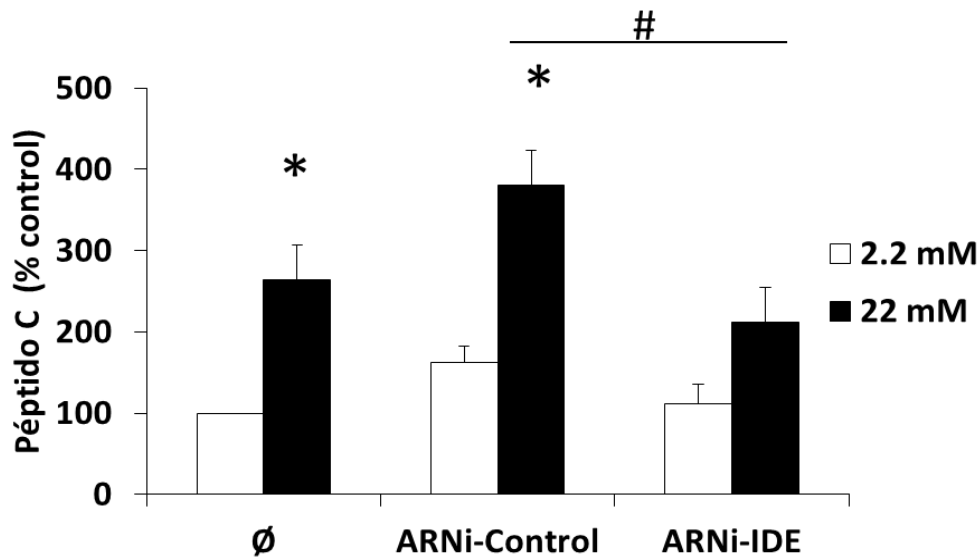


Figura 34. Ensayo de GSIS realizado sobre células transfectadas con el ARNi-control/IDE después de 96h. Los experimentos se realizaron por triplicado ($n=5$). Las barras blancas corresponden a la cantidad de péptido C secretado en baja glucosa (2.2mM) y las negras bajo alta glucosa (22mM)(*, $p<0,05$)

Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos para la insulina; y nos sugieren que IDE es importante en la maquinaria de secreción de insulina de la célula beta-pancreática.

Estudio del contenido de insulina y proinsulina intracelular.

Para entender la causa de la disminución de la secreción de insulina, analizamos los niveles de insulina y proinsulina intracelular en células con niveles de expresión de IDE disminuidos. No existieron diferencias entre ambas condiciones (*Figura 35*), indicando que la pérdida de expresión de IDE no está relacionada con un problema en la producción y/o estabilidad de la insulina, sino en la maquinaria de secreción de la misma.

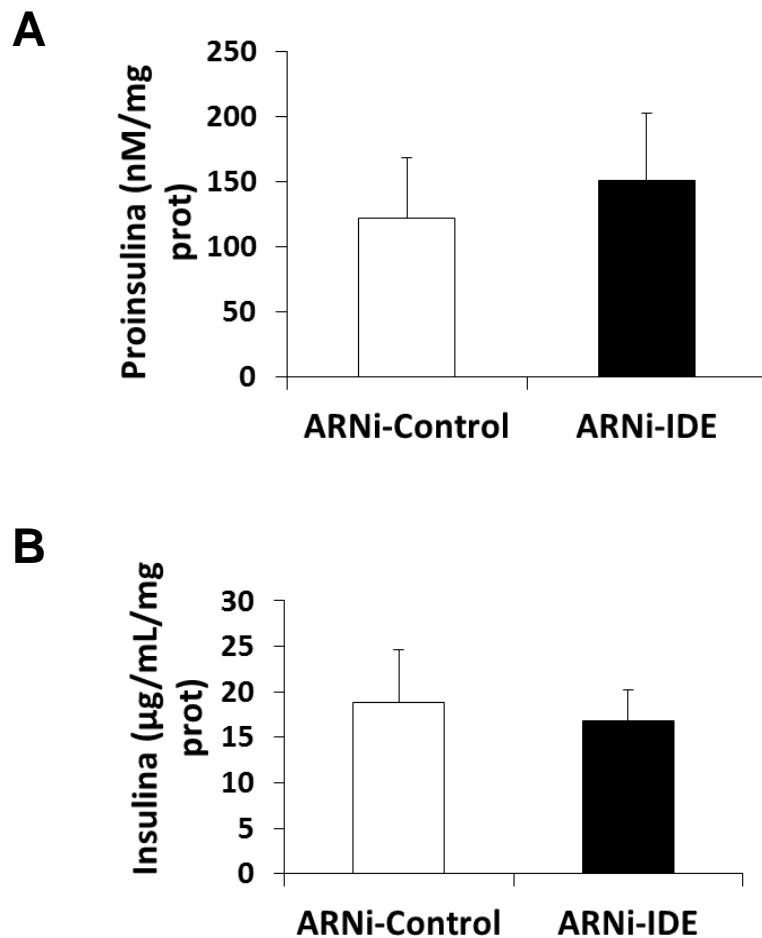


Figura 35. Análisis de los niveles de insulina intracelular (A) y proinsulina (B) de células transfectadas con el ARNi-IDE y su respectivo control. Estas medidas fueron analizadas a través de ELISAs específicos para cada una de las proteínas (n=5 por triplicado).

Estudio de la expresión génica de proteínas que intervienen en la secreción de insulina.

Las proteínas más relevantes implicadas en la secreción de insulina en respuesta a glucosa son: Glut2, GK y transportador de K⁺ (SUR1 y Kir6.2). Para ello decidimos estudiar su expresión en células transfectadas con ARNi-IDE y su respectivo control. No se mostró ninguna diferencia significativa en la expresión de ARNm entre ambas condiciones (*Figura 36*), lo que sugiere que IDE no interviene de manera directa sobre la ruta canónica implicada en la secreción de insulina de la célula beta-pancreática.

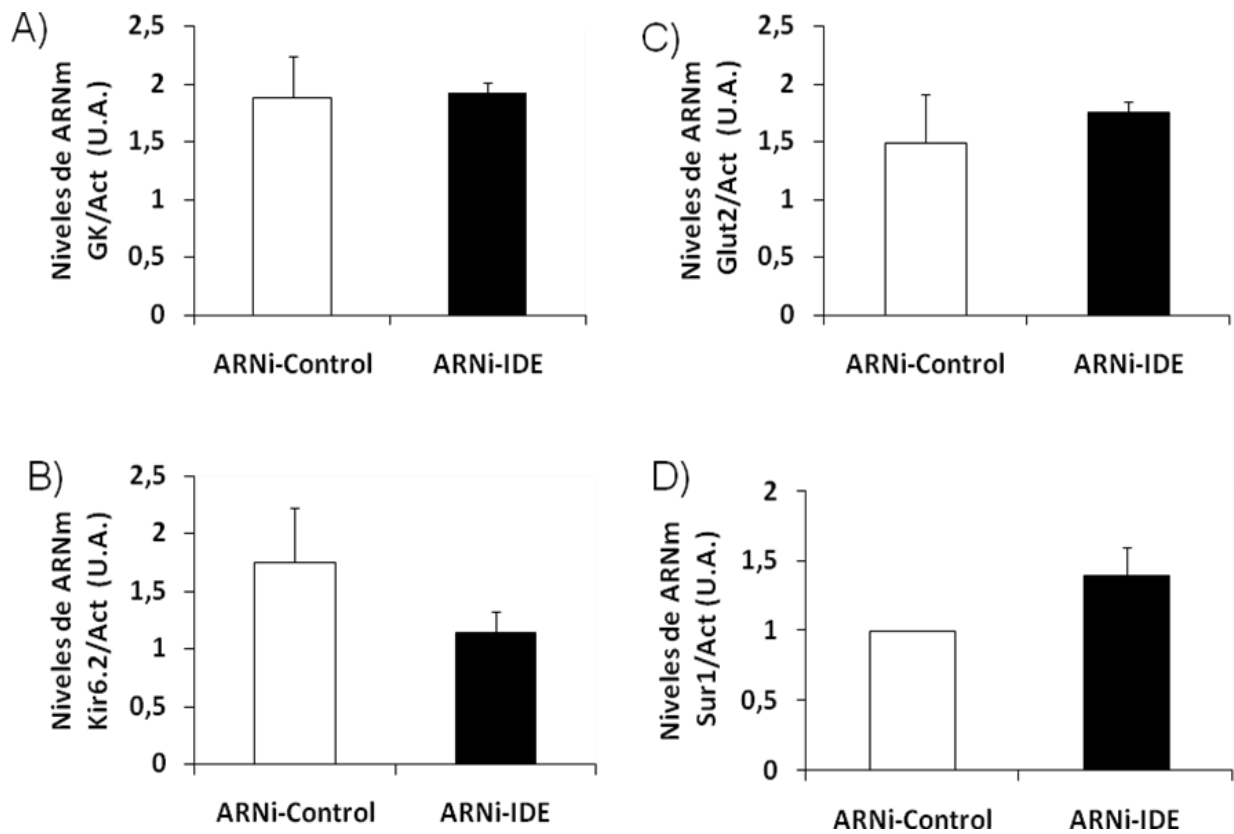


Figura 36. Análisis mediante RT-PCR de los niveles de diferentes proteínas involucrados en la secreción de insulina mediada por glucosa, como Glucocinasa (GK) (A), el transportador de glucosa (Glut2) (C) y las dos subunidades del transportador de potasio (Sur1 y Kir6.2) (ByD). El ARN y posterior ADNc fueron extraídos de células transfectadas con el ARNi-IDE y su respectivo control (ARNi-control) (n=3-5 por triplicado).

2.2.2.- Efecto de la inhibición de IDE por medio de inhibidores farmacológicos.

Cultivos primarios de islotes pancreáticos de islotes de rata.

Estudio de la secreción de insulina.

Para confirmar los resultados obtenidos en la línea celular en islotes pancreáticos de rata, utilizamos un inhibidor farmacológico (1,10-Ph) para inhibir la actividad de IDE. Utilizamos este compuesto en islotes durante 1 hora en medio completo y, posteriormente, se midió la funcionalidad de la célula beta-pancreática utilizando la técnica de la GSIS. La insulina secretada por los islotes tratados con el fármaco se

encontraba disminuida con respecto al control en torno al 60% (Figura 37) de manera significativa, lo cual concuerda con la disminución de la GSIS vista en la línea celular cuando disminuimos la expresión de IDE.

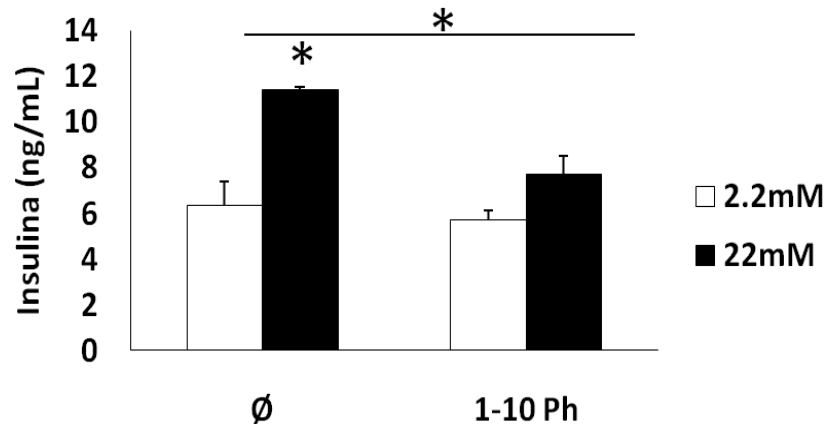


Figura 37. Ensayo de GSIS realizado sobre islotes pancreáticos de rata tratados con fenantrolina (1-10 Ph) durante 1 hora. Los experimentos se realizaron por triplicado (n=4). Las barras blancas corresponden a la cantidad de insulina secretada en baja glucosa (2.2mM) y las negras bajo alta glucosa (22mM) (*p<0,05)

Todos estos resultados en conjunto (tanto en la línea celular como en cultivos primarios) nos llevan a pensar que IDE es de vital importancia en la secreción de insulina estimulada por glucosa, o lo que es lo mismo, imprescindible para la propia funcionalidad de la célula beta-pancreática.

DISCUSIÓN

La complejidad para entender la DM2 reside en la gran variedad de factores que convergen en el desarrollo de la enfermedad. Esto hace muy difícil el diseño de estrategias para tratar, retrasar o prevenir este desorden. Por ello, es esencial conocer los cambios moleculares que operan en la célula beta-pancreática en condiciones fisiopatológicas por dos razones principales: En primer lugar para poder identificar marcadores moleculares que permitan establecer el estadio de desarrollo de la enfermedad y poder aplicar un tratamiento adecuado a tiempo. En segundo lugar, para poder identificar dianas moleculares que permitan el diseño de fármacos específicos que retrasen e incluso eviten la progresión del deterioro funcional en la célula beta-pancreática. A día de hoy, no se dispone de marcadores específicos de la progresión de la enfermedad ni de tratamientos farmacológicos eficientes al cien por cien. Sin embargo, hay que constatar que la investigación ha permitido un espectacular avance en el tratamiento de la enfermedad que en nada se parece a la situación que se vivía hace algunas décadas. Lejos de ser excesivamente optimistas, por lo lejos que queda una aplicación clínica inmediata de los hallazgos de la investigación actual, sí que se puede asegurar sin lugar a dudas que la investigación debe continuar, para poder ir avanzando poco a poco en la comprensión de los complejos mecanismos que subyacen en el desarrollo de la enfermedad diabética.

1) ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA COLECCIÓN DE PRODUCTOS NATURALES SOBRE LAS CÉLULAS BETA-PANCREÁTICAS.

La búsqueda de nuevas moléculas para preservar la masa de células beta-pancreáticas funcional es importante para la diabetes. En adultos normales, el peso de la masa de células beta-pancreáticas en el páncreas es aproximadamente del 2% del peso total de éste, es decir, alrededor de un millón de islotes se encuentran distribuidos por todo el páncreas, lo cual se traduce en un billón de células beta-pancreáticas aproximadamente. En 2003, un estudio liderado por Butler y Butler [56] mostró que la masa de células beta-pancreáticas en personas con DM (en su mayoría con DM2) estaba disminuida en un 50 % respecto a individuos normales (*Figura 38*).

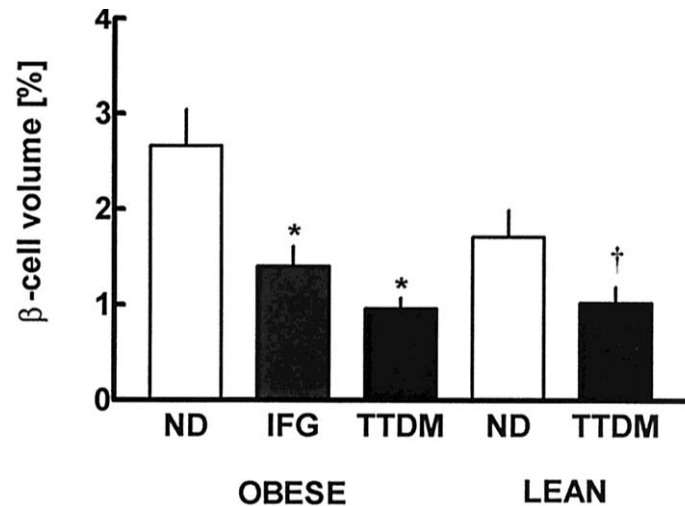


Figura 38. Volumen relativo del total de células beta-pancreáticas procedentes del páncreas de autopsias de individuos no diabéticos (ND), individuos con glucosa en ayunas disminuidas (IFG) o que tuvieron DM2 (TTDM) (Butler, A. E. et al. 2003. Beta-cell deficit and increased beta cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102–110).

Tanto en la DM1 como en la DM2, la masa de células beta-pancreáticas está marcadamente reducida, permitiendo así que los niveles de glucosa se eleven creando un ambiente hiperglucémico alrededor de las células beta-pancreáticas. Este ambiente produce cambios fenotípicos en las células (entre ellos, la disminución de la GSIS). Esta disfunción celular se puede revertir a través de la disminución de los niveles de glucosa en sangre por medio de diferentes tratamientos, de aquí que la restauración de la masa de las células beta-pancreáticas en ambos tipos de diabetes para normalizar los niveles de glucosa, sea hoy en día una de las prioridades de la investigación en el campo de la diabetes [93].

Una de las principales pruebas de la restauración de la masa de células beta-pancreáticas se estableció a través de los trasplantes de islotes en la DM1 [141] y en el trasplante de páncreas para la DM2 [142]. Además se han encontrado maneras de expandir las células beta-pancreáticas *in vitro* y así poder ser trasplantadas. La posibilidad de estimular la replicación de las células posee una considerable atención debido a la identificación de nuevos compuestos que puedan estimular la división de las células beta-pancreáticas [143, 144] y elucidar los mecanismos que subyacen a la misma podrían ser explotados en el futuro [48, 145-148]. Por todo esto, nuestro

estudio de cribado de una colección de nuevos compuestos naturales sin función conocida, es un importante esfuerzo y contribución a la investigación en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para aumentar o proteger la masa de las células beta-pancreáticas en la DM.

Los grupos de investigación y empresas farmacéuticas involucrados en la búsqueda de nuevas moléculas que puedan inducir la proliferación de células beta-pancreáticas y/o aumentar la supervivencia de las mismas, necesitan una buena caracterización de las vías de señalización implicadas en la muerte celular o proliferación de las células beta-pancreáticas [136, 149]; además de encontrar maneras de prevenir la muerte autoinmune de las nuevas células beta-pancreática alojadas (en el caso de la DM1).

Aunque el trasplante de islotes pancreáticos no es, actualmente, una medida terapéutica, la investigación de diversos grupos y sus actuales progresos demuestran la potencialidad del trasplantes de islotes [150] en el tratamiento, sobre todo, de la DM1. Recientemente, estos grupos se han centrado en la identificación de factores que determinan el fracaso o el éxito del trasplante de islotes. Varias alternativas se han investigado tanto en animales como en humanos (como nuevos sitios para el trasplante, agentes que protejan la viabilidad de dichos islotes o incluso inmunosupresores concretos que eviten la muerte de las nuevas células) haciendo posible una reducción de la pérdida de los islotes y, por lo tanto, que el trasplante de islotes sea de nuevo una de las terapias posibles para prevenir o revertir la DM [151]. Nuestra aportación en este sentido es el poder tratar islotes pancreáticos con nuevas moléculas, que protegen de la muerte e inducen proliferación de las células beta-pancreáticas, para ser posteriormente usados, por ejemplo, en la terapia con trasplante de islotes. Aunque por otro lado, estas moléculas también podrían suponer un tratamiento en pacientes diabéticos para la preservación de la masa beta-pancreática funcional *in vivo*.

En nuestro trabajo identificamos un compuesto capaz de inducir proliferación de la célula beta-pancreática *in vitro*. Una de las mayores relevancias de nuestro producto, el epoxipukalide, es la específica capacidad de producir proliferación en las células

beta-pancreáticas y no sobre las otras células endocrinas que forman el islote (células α ,...); además de proporcionar una protección tanto de la muerte basal como de la inducida por CQs.

En lo que respecta a los resultados de inducción de la proliferación, de acuerdo a las estructuras de los compuestos 1-4 y sus resultados, se puede observar que a pesar de que poseen el mismo esqueleto de carbono, las diferencias en sus radicales funcionales son críticos para inducir la proliferación en cultivos primarios de células. Si comparamos el epoxipukalide y leptolide, se puede deducir que la presencia de un grupo metiléster en lugar del grupo aldehído en el carbono número 18 es una clave para la potencia de los furanocembranólidos. Además, de la observación del epoxipukalide, pukalide y (Z)-deoxipukalide (3) se puede deducir que la epoxidación, especialmente en los carbonos 11 y 12 es crucial para mostrar la actividad proliferativa en cultivos primarios de células beta-pancreáticas.

Encontrar exactamente cuál es la parte funcional de la molécula, la cual le confiere a la molécula esa característica proliferativa/protectora, es crucial para el desarrollo de fármacos basados en estas estructuras químicas. Para ello contamos con una colección de 30 productos naturales de la misma familia (furanocembranólidos). El estudio funcional de estos productos, establecerá que parte de la molécula es crucial para su función.

Una de las limitaciones de nuestro estudio ha sido el uso de la técnica de la [3H]-T como medida para cuantificar la proliferación celular producida por el tratamiento de los diferentes productos naturales marinos (1-4), en los cultivos primarios de islotes pancreáticos de rata. La incorporación de este radioisótopo en el ADN de las células es ampliamente utilizada para la monitorización de la síntesis de ADN y la proliferación celular. En cambio, se ha visto que la [3H]-T induce parada del ciclo celular y apoptosis además de daño en el ADN [152]. Debido a las perturbaciones causadas por este método y a la poca sensibilidad del mismo, los resultados de síntesis de ADN y proliferación celular producidos con esta técnica debería ser interpretados con cautela,

siempre corroborando estos resultados con otra técnica homóloga de proliferación como puede ser la incorporación de BrdU y su posterior inmuno-detección [153].

Otro de los inconvenientes de esta técnica es la no especificidad para la proliferación asociada a las células beta-pancreáticas, por lo que un posible aumento de la proliferación celular en cultivos de islotes tratados con cualquier producto podría ser específico de célula no beta-pancreática, obteniendo falsos positivos. Por otro lado, podemos perder el efecto proliferativo de cualquier producto debido a su baja sensibilidad y a los efectos negativos que poseen en las células, de aquí que hayamos podido perder algún producto positivo no detectado a través de esta técnica. Todos los productos negativos en ese paso de cribado, no fueron analizados para otras funciones igualmente importantes como la protección de la muerte celular o la mejora de la función de las células beta-pancreática a través de la GSIS.

A partir de los estudios de dosis-dependencia hemos entendido que 0,1 μM es la concentración óptima para inducir la proliferación e inhibir la muerte de las células beta-pancreáticas. Ésta será la concentración de referencia para el diseño de futuros experimentos *in vivo* en roedores.

Dos de las vías más importantes implicadas en la proliferación de las células beta-pancreáticas (AKT y ERK1/2) fueron estudiadas para saber qué ruta se activaba y producía este efecto proliferativo. Este análisis indicó que el epoxipukalide activa la vía ERK1/2; de la misma forma que algunos factores de crecimiento como son el HGF [154], la insulina y el IGF-1 (factor de crecimiento tipo insulina-1) [74]. Estos estudios han demostrado que estos productos inducen la proliferación de las células beta-pancreáticas a través de la vía de señalización de ERK1/2.

Se ha demostrado que la interfase G1 / S del ciclo celular de la célula beta-pancreática es esencial en la regulación de la proliferación de las mismas. Las ciclinas D2 y E, de forma individual, han demostrado previamente que inducen la replicación de las células beta-pancreáticas bajo el estímulo de varios mitógenos, incluyendo la alta concentración de glucosa, GH (hormona de crecimiento), PRL (prolactina) y PTHrP [48, 74, 146, 155-159]. La ciclina D2 se une a cdk4 y la ciclina E a cdk2, manteniendo la

fosforilación de pRb en diferentes residuos. Podemos argumentar que, dado que ambas ciclinas son suprarreguladas por el epoxipukalide, se induce un efecto sinérgico responsable de mantener la proliferación de las células beta-pancreáticas, a pesar de que sus niveles de expresión aumentan modestamente.

La apoptosis de la célula beta-pancreática inducida por citoquinas, como la IL-1 β e IFN γ , es una de las características básicas de la diabetes, descrita como la principal causa de muerte principal en la destrucción de las células beta-pancreáticas y, por tanto, origen de la pérdida de la masa beta indispensable para el mantenimiento de la normoglicemia [105, 160-162]. Basados en esta idea, Zhao et al. mostraron que los ratones diabéticos (nulos para el receptor de leptina-db/db) tratados con un modulador del receptor de esfingosina-1-fosfato (FTY720) veían revertida su hiperglucemia por inducción de la proliferación y la expansión de la masa de células beta-pancreáticas [163].

En la bibliografía se puede observar que pequeñas moléculas, como los inhibidores de la histona deacetilasa (HDAC) tricostatina A (TSA) o la suberoilánilida (SAHA); o el resveratrol, producen efectos similares sobre la protección de la apoptosis de las células beta-pancreáticas inducidas por citoquinas [48, 149, 156, 158], aunque su capacidad proliferativa no ha sido probada.

El tratamiento con el epoxipukalide mostró que la expresión de la caspasa 3 activa, una de las proteínas efectoras en último término de la ruta de la apoptosis, disminuía en islotes pancreáticos en ausencia o en presencia de CQs. Estos resultados muestran que el epoxipukalide protege a las células beta-pancreáticas tanto de la muerte basal como de la inducida por CQs. Con el ensayo de TUNEL/insulina, además comprobamos que esta función protectora es específica de las células beta-pancreáticas.

Esta capacidad que tiene el epoxipukalide de promover la supervivencia de las células beta-pancreáticas es un beneficio clínico potencial en el tratamiento de la DM.

El aumento de la proliferación de células beta-pancreáticas puede implicar la pérdida de la diferenciación y/o fallo de la función celular. Por ello, se realizó una sobrecarga de glucosa en islotes de rata aislados y tratados con epoxipukalide, para comprobar la funcionalidad de las células beta-pancreáticas ex vivo, midiéndose posteriormente tanto la producción como la secreción de insulina debida al estímulo de glucosa. La producción de insulina y la secreción después de la sobrecarga de glucosa fue completamente normal, lo que significa que no hay efecto perjudicial de epoxipukalide en la función de la célula beta-pancreática.

Esto es muy importante con el fin de una posible utilización de este compuesto en el tratamiento de la diabetes. En esta dirección, Grote et al. mostró que el epoxipukalide no era citotóxico para L-929 (fibrosarcoma murino) o K-562 (línea celular de eritroleucemia humana) [164]. Sus resultados sostienen, además, que el epoxipukalide no tiene efectos adversos sobre otros tipos celulares.

Correspondiente a esta parte del trabajo de tesis doctoral, hemos obtenido más datos que no se exponen porque se encuentran en proceso de evaluación preliminar por la Oficina Nacional de Patentes y Marcas, para una posible solicitud de patente.

2) FUNCIÓN DE IDE EN LA CÉLULA BETA-PANCREÁTICA

En la investigación en diabetes actual, una de las prioridades es esclarecer la función de proteínas potencialmente involucradas en la patología de la enfermedad, a partir de bases de datos obtenidas en estudios de asociación genética.

En nuestro estudio, intentamos esclarecer el papel de IDE en las células beta-pancreáticas a través de los diferentes estímulos propios de la fisiología de la célula beta-pancreáticas, así como en condiciones fisiopatológicas.

Aunque está generalmente aceptado que la hiperinsulinemia en la DM2 es una respuesta compensatoria a la resistencia insulínica del tejido periférico, existe un aumento en las evidencias de que, al menos en una parte de la población que sufre la enfermedad, una hiperinsulinemia basal puede jugar un papel importante en la

patogenia de la DM2 [165, 166]. Nuestros estudios sugieren que la expresión de IDE está regulada a la alza por altos niveles de insulina, tanto a nivel de ARNm como de proteína; corroborando diferentes estudios ya publicados en los que se muestran el control de IDE sobre el metabolismo de la [110]. En el trabajo de Pivorarova y col. [113], llevado a cabo en hepatocitos, se muestra los efectos de la exposición a insulina en la actividad y niveles de IDE, mostrando que la insulina aumenta la actividad de la proteína; aumenta en número de sustratos susceptibles a ser degradados por la enzima, por lo que ésta aumenta su número.

Una vez que la DM2 está establecida, la hiperglucemia crónica y la hiperlipidemia producen efectos deletéreos sobre la función de la célula beta, referido como glucotoxicidad y lipotoxicidad respectivamente [17]. Nuestros resultados confirman que también la hiperglucemia controla tanto la traducción como la expresión de IDE, haciendo que disminuya de manera significativa. Esto puede ser debido al control de la hiperglucemia a través de la acción de la insulina, necesitando más insulina disponible para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, e induciendo la inhibición de la expresión de IDE para evitar la degradación de insulina.

En cuanto a la alta concentración de ácidos grasos, existen trabajos en células procedentes de hígado, que indican que los ácidos grasos libres de cadena larga inhiben la actividad degradadora de IDE [108]. En nuestro caso no encontramos regulación en la expresión de la misma, pero cabría la posibilidad de que sí regulen su actividad, la cual no hemos medido.

Nuestro estudio es robusto ya que todos nuestros datos se encuentran confirmados por tres sistemas de estudios diferentes: 1) Ratón db/db (modelo de resistencia insulínica, obesidad y DM2); 2) Línea celular INS1E; 3) Cultivos primarios de islotes pancreáticos de rata.

La función de la célula beta-pancreática es producir y secretar insulina para mantener la homeostasis de la glucosa. Nuestro estudio muestra que IDE controla la función de las células beta-pancreáticas, ya que al inhibir la expresión de IDE en las células beta-pancreáticas observamos una disminución en la secreción de insulina estimulada por

glucosa. Este hallazgo, aunque inicialmente inesperado, es compatible y consistente con la disminución de la secreción de insulina asociada con las variaciones génicas de los locus HHEX / IDE en los seres humanos [167-169] y el reciente estudio de Steneberg y col. [117], en el que se describe que en los ratones que carecen de un gen funcional de IDE (Ide-/-), la GSIS es deficiente. Sin embargo, en ninguno de los trabajos anteriores [106, 170, 171], en donde se ha utilizado el ratón nulo para IDE, se ha explorado este fenotipo. Además estos trabajos muestran diferencias significativas entre los perfiles metabólicos estudiados. En los trabajos de Farris y col. y Abdul-Hay y col. se muestra que el ratón nulo para IDE es intolerante a la glucosa, posee aumentada la concentración de insulina en ayunas, a la vez que se muestran signos de resistencia insulínica y daño en la degradación de insulina; mientras que el trabajo de Miller y col. muestra que este modelo posee niveles de glucosa e insulina normales. Por el contrario, en el trabajo de Steneberg y col., no se muestra aumento alguno en la concentración de insulina en ayunas en el ratón nulo para IDE, ni evidencias de resistencia insulínica. Estas diferencias pueden reflejar los diferentes fondos genéticos del modelo utilizado, y/o la distinta metodología usada, quedando aún sin resolver el verdadero papel de IDE en la degradación de insulina y en la propia célula beta-pancreática.

Para intentar dilucidar el mecanismo por el que se produce esta disminución de GSIS, hipotetizamos que esta disminución de la insulina secretada podría ser debida a una disminución de la insulina endógena (preparada para ser secretada, internalizada en vesículas) o de la proinsulina (insulina aún inmadura, unida al péptido C). En nuestro estudio no encontramos diferencias entre el contenido de insulina y proinsulina intracelular de las células deficientes en IDE con respecto a las normales, por lo que el problema podría implicar a la propia maquinaria de secreción de la célula beta-pancreática. Estos resultados difieren del estudio realizado en los ratones Ide-/- [117], en los que se muestra que la pérdida del gen produce un aumento del contenido de insulina intracelular. Esta diferencia puede deberse al sistema de estudio utilizado. El uso de una línea celular como la INS-1E, hace que el fenotipo sea más exacto y claro y más reproducible. En cambio, el modelo de ratón utilizado por Steneberg y col. es un

ratón nulo global, es decir, sin IDE en ninguna de las células del organismo, por lo que no se puede excluir que el defecto de las células beta-pancreáticas que muestra este mutante, al menos en parte, pueda estar influenciada por la falta de IDE en otras células y tejidos del organismo, incluso otras células endocrinas.

IDE también puede degradar glucagón [172], la pérdida de su expresión en las células α (productoras de glucagón) haría posible también una hiperglucanemia (no medida en el trabajo de Stenenberg y col.). Este exceso de glucagón podría inducir, de forma paracrina, la secreción de insulina complicando la interpretación del fenotipo. Es por ello, que la generación de un ratón nulo de IDE específico de la célula beta-pancreática, es necesario para poder estudiar su papel *in vivo*.

Para profundizar en la causa de esta disminución de secreción de insulina, analizamos la cantidad de péptido C (que se cosecreta con la insulina) secretada en una GSIS, para conocer si el problema era debido a la propia maquinaria de secreción de la célula beta-pancreática. Igualmente vimos que los niveles de péptido C se encontraban disminuidos en las células con IDE disminuido, del mismo modo que ocurría con la insulina. Esto nos puede dar una idea de la causa de la disminución de la secreción de insulina, situando el problema en este punto; es decir, la falta de IDE impide la secreción normal de la célula.

El siguiente paso fue estudiar diferentes marcadores celulares relacionados con la maquinaria de secreción (toma de glucosa, metabolismo de la glucosa y despolarización de membrana). No encontramos diferencias significativas entre las células con la expresión de IDE disminuida y las células control en respuesta a una GSIS en ninguno de los genes estudiados (Glut2, Kir6.2, Sur1, GK). Este dato nos sugiere que la falta de IDE afecta de manera indirecta a otro proceso en la célula beta-pancreática, que finalmente impide la secreción de insulina en respuesta a glucosa. Aunque nuestra aproximación ha sido por RT-PCR y no por proteínas, nuestros resultados coinciden con los del ratón nulo para Ide-/- [117], en los que no se muestran diferencias significativas entre los diferentes marcadores. Estos datos confirman que la falta de IDE no altera el proceso involucrado en la secreción de la insulina mediada por glucosa.

Nuestros resultados concuerdan con los estudios de asociación génica en el que el locus de IDE ha sido identificado como de susceptibilidad para sufrir diabetes [110, 166, 169, 173]. Por lo tanto, la estimulación de la expresión de IDE o su actividad podría representar una estrategia terapéutica valiosa para la prevención y/o restauración de la función de las células beta-pancreáticas en pacientes con DM2.

CONCLUSIONES (CONCLUTIONS)

1. Epoxypukalide, a furanocembranolide from the coral *Leptogorgia* spp., induces beta-cell proliferation by activation of ERK1/2 signaling pathway and upregulation of the cell cycle activators, cyclin D2 and cyclin E.
2. Epoxypukalide protects against basal and cytokine-mediated beta-cell death, and protects beta-cell function.
3. Epoxypukalide is a potential treatment for diabetes.
4. Hyperinsulinemia stimulates IDE (insulin-degrading enzyme) expression in the pancreatic beta-cell, whereas hyperglycemia has the opposite effect.
5. IDE loss-of-expression in the pancreatic beta-cell impairs glucose-stimulated insulin secretion and C-peptide secretion, whereas intracellular insulin remains unchanged. The molecular mechanism underlying these effects remains unknown, but is not due to beta-cell secretory machinery failure.
6. IDE is a potential target for the treatment of diabetes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ashcroft, F.M. and P. Rorsman, *Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years*. Cell, 2012. **148**(6): p. 1160-71.
2. Rathmann, W. and G. Giani, *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care, 2004. **27**(10): p. 2568-9; author reply 2569.
3. Wild, S., et al., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care, 2004. **27**(5): p. 1047-53.
4. Soriguer, F., et al., *Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study*. Diabetologia, 2012. **55**(1): p. 88-93.
5. Pociot, F. and M.F. McDermott, *Genetics of type 1 diabetes mellitus*. Genes Immun, 2002. **3**(5): p. 235-49.
6. Group, D.P., *Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999*. Diabet Med, 2006. **23**(8): p. 857-66.
7. Prentki, M. and C.J. Nolan, *Islet beta cell failure in type 2 diabetes*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1802-12.
8. Lee, Y.C. and J.H. Nielsen, *Regulation of beta cell replication*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **297**(1-2): p. 18-27.
9. Meier, J.J., *Beta cell mass in diabetes: a realistic therapeutic target?* Diabetologia, 2008. **51**(5): p. 703-13.
10. Dadon, D., et al., *Glucose metabolism: key endogenous regulator of beta-cell replication and survival*. Diabetes Obes Metab, 2012. **14 Suppl 3**: p. 101-8.
11. Gittes, G.K., *Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review*. Dev Biol, 2009. **326**(1): p. 4-35.
12. Eberhard, D. and E. Lammert, *The pancreatic beta-cell in the islet and organ community*. Curr Opin Genet Dev, 2009. **19**(5): p. 469-75.
13. Wojtuszczyz, A., et al., *Insulin secretion from human beta cells is heterogeneous and dependent on cell-to-cell contacts*. Diabetologia, 2008. **51**(10): p. 1843-52.
14. Ferrannini, E., *The stunned beta cell: a brief history*. Cell Metab, 2010. **11**(5): p. 349-52.
15. Lang, J., *Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion*. Eur J Biochem, 1999. **259**(1-2): p. 3-17.
16. Guillemain, G., et al., *Glucose is necessary for embryonic pancreatic endocrine cell differentiation*. J Biol Chem, 2007. **282**(20): p. 15228-37.
17. Poitout, V. and R.P. Robertson, *Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity*. Endocrinology, 2002. **143**(2): p. 339-42.
18. Levitt, H.E., et al., *Glucose stimulates human beta cell replication in vivo in islets transplanted into NOD-severe combined immunodeficiency (SCID) mice*. Diabetologia, 2011. **54**(3): p. 572-82.
19. Porat, S., et al., *Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism*. Cell Metab, 2011. **13**(4): p. 440-9.
20. Butler, A.E., et al., *Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy*. Diabetologia, 2010. **53**(10): p. 2167-76.
21. Finegood, D.T., et al., *Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death*. Diabetes, 2001. **50**(5): p. 1021-9.
22. Kulkarni, R.N., et al., *Human beta-cell proliferation and intracellular signaling: driving in the dark without a road map*. Diabetes, 2012. **61**(9): p. 2205-13.
23. Friedrichsen, B.N., et al., *Signal transducer and activator of transcription 5 activation is sufficient to drive transcriptional induction of cyclin D2 gene and proliferation of rat pancreatic beta-cells*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(5): p. 945-58.
24. Imanishi, Y., et al., *Primary hyperparathyroidism caused by parathyroid-targeted overexpression of cyclin D1 in transgenic mice*. J Clin Invest, 2001. **107**(9): p. 1093-102.

25. Cozar-Castellano, I., et al., *Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic beta-cell*. *Endocr Rev*, 2006. **27**(4): p. 356-70.
26. Downward, J., *PI 3-kinase, Akt and cell survival*. *Semin Cell Dev Biol*, 2004. **15**(2): p. 177-82.
27. Srinivasan, S., et al., *Glucose promotes pancreatic islet beta-cell survival through a PI 3-kinase/Akt-signaling pathway*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. **283**(4): p. E784-93.
28. Tuttle, R.L., et al., *Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha*. *Nat Med*, 2001. **7**(10): p. 1133-7.
29. Bernal-Mizrachi, E., et al., *Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(11): p. 1631-8.
30. Hashimoto, N., et al., *Ablation of PDK1 in pancreatic beta cells induces diabetes as a result of loss of beta cell mass*. *Nat Genet*, 2006. **38**(5): p. 589-93.
31. Nguyen, K.T., et al., *Essential role of Pten in body size determination and pancreatic beta-cell homeostasis in vivo*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(12): p. 4511-8.
32. Srinivasan, S., et al., *Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3beta in mouse insulinoma cells*. *Diabetes*, 2005. **54**(4): p. 968-75.
33. Rulifson, I.C., et al., *Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(15): p. 6247-52.
34. Papadopoulou, S. and H. Edlund, *Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic growth but not pancreatic function*. *Diabetes*, 2005. **54**(10): p. 2844-51.
35. Fujino, T., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(1): p. 229-34.
36. Figeac, F., et al., *Neonatal growth and regeneration of beta-cells are regulated by the Wnt/beta-catenin signaling in normal and diabetic rats*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. **298**(2): p. E245-56.
37. Schinner, S., et al., *Regulation of insulin secretion, glucokinase gene transcription and beta cell proliferation by adipocyte-derived Wnt signalling molecules*. *Diabetologia*, 2008. **51**(1): p. 147-54.
38. Liu, Z. and J.F. Habener, *Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(13): p. 8723-35.
39. Wang, H., et al., *EGF regulates survivin stability through the Raf-1/ERK pathway in insulin-secreting pancreatic beta-cells*. *BMC Mol Biol*, 2010. **11**: p. 66.
40. Hakonen, E., et al., *Epidermal growth factor (EGF)-receptor signalling is needed for murine beta cell mass expansion in response to high-fat diet and pregnancy but not after pancreatic duct ligation*. *Diabetologia*, 2011. **54**(7): p. 1735-43.
41. Fueger, P.T., et al., *Trefoil factor 3 stimulates human and rodent pancreatic islet beta-cell replication with retention of function*. *Mol Endocrinol*, 2008. **22**(5): p. 1251-9.
42. Pagano, M. and P.K. Jackson, *Wagging the dogma; tissue-specific cell cycle control in the mouse embryo*. *Cell*, 2004. **118**(5): p. 535-8.
43. Cozar-Castellano, I., et al., *Evaluation of beta-cell replication in mice transgenic for hepatocyte growth factor and placental lactogen: comprehensive characterization of the G1/S regulatory proteins reveals unique involvement of p21cip*. *Diabetes*, 2006. **55**(1): p. 70-7.

44. Heit, J.J., S.K. Karnik, and S.K. Kim, *Intrinsic regulators of pancreatic beta-cell proliferation*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006. **22**: p. 311-38.
45. Chau, B.N. and J.Y. Wang, *Coordinated regulation of life and death by RB*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(2): p. 130-8.
46. Berns, A., *Tumour suppressors: timing will tell*. *Nature*, 2003. **424**(6945): p. 140-1.
47. Fiaschi-Taesch, N., et al., *Survey of the human pancreatic beta-cell G1/S proteome reveals a potential therapeutic role for cdk-6 and cyclin D1 in enhancing human beta-cell replication and function in vivo*. *Diabetes*, 2009. **58**(4): p. 882-93.
48. Fiaschi-Taesch, N.M., et al., *Induction of human beta-cell proliferation and engraftment using a single G1/S regulatory molecule, cdk6*. *Diabetes*, 2010. **59**(8): p. 1926-36.
49. Kushner, J.A., et al., *Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(9): p. 3752-62.
50. Georgia, S. and A. Bhushan, *Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(7): p. 963-8.
51. Uchida, T., et al., *Deletion of Cdkn1b ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice*. *Nat Med*, 2005. **11**(2): p. 175-82.
52. Garcia-Ocana, A., et al., *Hepatocyte growth factor overexpression in the islet of transgenic mice increases beta cell proliferation, enhances islet mass, and induces mild hypoglycemia*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(2): p. 1226-32.
53. Vasavada, R.C., et al., *Targeted expression of placental lactogen in the beta cells of transgenic mice results in beta cell proliferation, islet mass augmentation, and hypoglycemia*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(20): p. 15399-406.
54. Cozar-Castellano, I., M. Haight, and A.F. Stewart, *The cell cycle inhibitory protein p21cip is not essential for maintaining beta-cell cycle arrest or beta-cell function in vivo*. *Diabetes*, 2006. **55**(12): p. 3271-8.
55. Meier, J.J., et al., *Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans*. *Diabetes*, 2008. **57**(6): p. 1584-94.
56. Butler, A.E., et al., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2003. **52**(1): p. 102-10.
57. Bonner-Weir, S., et al., *Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story*. *Diabetes*, 2010. **59**(10): p. 2340-8.
58. Teta, M., et al., *Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice*. *Diabetes*, 2005. **54**(9): p. 2557-67.
59. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of fat cell turnover in humans*. *Nature*, 2008. **453**(7196): p. 783-7.
60. Nielsen, J.H., et al., *Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors*. *Diabetes*, 2001. **50 Suppl 1**: p. S25-9.
61. Dor, Y., et al., *Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation*. *Nature*, 2004. **429**(6987): p. 41-6.
62. Bonner-Weir, S. and G.C. Weir, *New sources of pancreatic beta-cells*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(7): p. 857-61.
63. Teta, M., et al., *Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors*. *Dev Cell*, 2007. **12**(5): p. 817-26.
64. Brennand, K., D. Huangfu, and D. Melton, *All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance*. *PLoS Biol*, 2007. **5**(7): p. e163.
65. Butler, P.C., et al., *The replication of beta cells in normal physiology, in disease and for therapy*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007. **3**(11): p. 758-68.
66. Hanley, N.A., et al., *Weighing up beta-cell mass in mice and humans: self-renewal, progenitors or stem cells?* *Mol Cell Endocrinol*, 2008. **288**(1-2): p. 79-85.

67. Xu, X., et al., *Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas*. Cell, 2008. **132**(2): p. 197-207.
68. Forsyth, N.R., W.E. Wright, and J.W. Shay, *Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again*. Differentiation, 2002. **69**(4-5): p. 188-97.
69. Meier, J.J., et al., *Hyperinsulinemic hypoglycemia after gastric bypass surgery is not accompanied by islet hyperplasia or increased beta-cell turnover*. Diabetes Care, 2006. **29**(7): p. 1554-9.
70. Meier, J.J., et al., *Increased islet beta cell replication adjacent to intrapancreatic gastrinomas in humans*. Diabetologia, 2006. **49**(11): p. 2689-96.
71. Martin-Pagola, A., et al., *Insulin protein and proliferation in ductal cells in the transplanted pancreas of patients with type 1 diabetes and recurrence of autoimmunity*. Diabetologia, 2008. **51**(10): p. 1803-13.
72. Ling, Z., et al., *Glucagon-like peptide 1 receptor signaling influences topography of islet cells in mice*. Virchows Arch, 2001. **438**(4): p. 382-7.
73. Drucker, D.J., *Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(2): p. 161-71.
74. Vasavada, R.C., et al., *Growth factors and beta cell replication*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(5-6): p. 931-50.
75. Leahy, J.L., *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. Arch Med Res, 2005. **36**(3): p. 197-209.
76. Bagust, A. and S. Beale, *Deteriorating beta-cell function in type 2 diabetes: a long-term model*. QJM, 2003. **96**(4): p. 281-8.
77. Del Prato, S., C. Bianchi, and P. Marchetti, *beta-cell function and anti-diabetic pharmacotherapy*. Diabetes Metab Res Rev, 2007. **23**(7): p. 518-27.
78. Tabara, Y., et al., *Replication study of candidate genes associated with type 2 diabetes based on genome-wide screening*. Diabetes, 2009. **58**(2): p. 493-8.
79. Sladek, R., et al., *A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 881-5.
80. Donath, M.Y. and P.A. Halban, *Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications*. Diabetologia, 2004. **47**(3): p. 581-9.
81. Weir, G.C., et al., *Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes*. Diabetes, 2001. **50 Suppl 1**: p. S154-9.
82. Rhodes, C.J., *Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death?* Science, 2005. **307**(5708): p. 380-4.
83. Lingohr, M.K., R. Buettner, and C.J. Rhodes, *Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes?* Trends Mol Med, 2002. **8**(8): p. 375-84.
84. Leahy, J.L., et al., *Targeting beta-cell function early in the course of therapy for type 2 diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(9): p. 4206-16.
85. Marchetti, P., et al., *Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(11): p. 5535-41.
86. Robertson, R.P., et al., *Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S119-24.
87. Robertson, R.P., *Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42351-4.
88. Laybutt, D.R., et al., *Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes*. Diabetologia, 2007. **50**(4): p. 752-63.
89. Maedler, K., et al., *Glucose- and interleukin-1beta-induced beta-cell apoptosis requires Ca²⁺ influx and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation and is*

- prevented by a sulfonylurea receptor 1/inwardly rectifying K⁺ channel 6.2 (SUR/Kir6.2) selective potassium channel opener in human islets.* Diabetes, 2004. **53**(7): p. 1706-13.
90. Cnop, M., *Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes.* Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 3): p. 348-52.
 91. Delghingaro-Augusto, V., et al., *Islet beta cell failure in the 60% pancreatectomised obese hyperlipidaemic Zucker fatty rat: severe dysfunction with altered glycerolipid metabolism without steatosis or a falling beta cell mass.* Diabetologia, 2009. **52**(6): p. 1122-32.
 92. Poitout, V. and R.P. Robertson, *Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction.* Endocr Rev, 2008. **29**(3): p. 351-66.
 93. Weir, G.C. and S. Bonner-Weir, *Islet beta cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death.* Ann N Y Acad Sci, 2013. **1281**: p. 92-105.
 94. Maedler, K., et al., *Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets.* J Clin Invest, 2002. **110**(6): p. 851-60.
 95. Moffitt, J.H., et al., *Adverse physicochemical properties of tripalmitin in beta cells lead to morphological changes and lipotoxicity in vitro.* Diabetologia, 2005. **48**(9): p. 1819-29.
 96. Kjørholt, C., et al., *Chronic hyperglycemia, independent of plasma lipid levels, is sufficient for the loss of beta-cell differentiation and secretory function in the db/db mouse model of diabetes.* Diabetes, 2005. **54**(9): p. 2755-63.
 97. Pickup, J.C., *Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes.* Diabetes Care, 2004. **27**(3): p. 813-23.
 98. Kolb, H. and T. Mandrup-Poulsen, *An immune origin of type 2 diabetes?* Diabetologia, 2005. **48**(6): p. 1038-50.
 99. Trudeau, J.D., et al., *Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes?* Diabetes, 2000. **49**(1): p. 1-7.
 100. Aldhahi, W. and O. Hamdy, *Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes.* Curr Diab Rep, 2003. **3**(4): p. 293-8.
 101. Murdolo, G. and U. Smith, *The dysregulated adipose tissue: a connecting link between insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis.* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006. **16 Suppl 1**: p. S35-8.
 102. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2548-56.
 103. Dandona, P., et al., *The potential influence of inflammation and insulin resistance on the pathogenesis and treatment of atherosclerosis-related complications in type 2 diabetes.* J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2422-9.
 104. Pietropaolo, M., et al., *Evidence of islet cell autoimmunity in elderly patients with type 2 diabetes.* Diabetes, 2000. **49**(1): p. 32-8.
 105. Alexandraki, K., et al., *Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1084**: p. 89-117.
 106. 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. **100**(7): p. 4162-7.
 107. Fawcett, J., et al., *Regulation of protein degradation by insulin-degrading enzyme: analysis by small interfering RNA-mediated gene silencing.* Arch Biochem Biophys, 2007. **468**(1): p. 128-33.
 108. Hamel, F.G., et al., *Insulin inhibits peroxisomal fatty acid oxidation in isolated rat hepatocytes.* Endocrinology, 2001. **142**(6): p. 2702-6.
 109. Vekrellis, K., et al., *Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme.* J Neurosci, 2000. **20**(5): p. 1657-65.

110. Fawcett, J. and W.C. Duckworth, *Hyperglycaemia and hyperinsulinaemia: is insulin-degrading enzyme the missing link?* Diabetologia, 2009. **52**(8): p. 1457-60.
111. Nikolaev, S.L., M.A. Strelkova, and V.P. Komov, *[Insulin degradation in hepatocytes and erythrocytes of rats in normal condition and in experimental diabetes]*. Vopr Med Khim, 2001. **47**(3): p. 329-37.
112. Li, C.Z., et al., *[Relationship between insulin-degrading enzyme activity and insulin sensitivity in cell model of insulin-resistance]*. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002. **22**(2): p. 151-4.
113. Pivovarova, O., et al., *Glucose inhibits the insulin-induced activation of the insulin-degrading enzyme in HepG2 cells*. Diabetologia, 2009. **52**(8): p. 1656-64.
114. Mirsky, I.A. and R.H. Broh-Kahn, *The inactivation of insulin by tissue extracts; the distribution and properties of insulin inactivating extracts*. Arch Biochem, 1949. **20**(1): p. 1-9.
115. Fakhrai-Rad, H., et al., *Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(14): p. 2149-58.
116. Farris, W., et al., *Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein*. Am J Pathol, 2004. **164**(4): p. 1425-34.
117. 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. **62**(6): p. 2004-14.
118. Furukawa, Y., et al., *Polymorphisms in the IDE-KIF11-HHEX gene locus are reproducibly associated with type 2 diabetes in a Japanese population*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(1): p. 310-4.
119. 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. **52**(6): p. 1562-7.
120. Nordman, S., et al., *Loci of TCF7L2, HHEX and IDE on chromosome 10q and the susceptibility of their genetic polymorphisms to type 2 diabetes*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2009. **117**(4): p. 186-90.
121. Bertram, L., et al., *Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q*. Science, 2000. **290**(5500): p. 2302-3.
122. Bjork, B.F., et al., *Positive association between risk for late-onset Alzheimer disease and genetic variation in IDE*. Neurobiol Aging, 2007. **28**(9): p. 1374-80.
123. Blomqvist, M.E., et al., *Sequence variants of IDE are associated with the extent of beta-amyloid deposition in the Alzheimer's disease brain*. Neurobiol Aging, 2005. **26**(6): p. 795-802.
124. Bennett, R.G., F.G. Hamel, and W.C. Duckworth, *An insulin-degrading enzyme inhibitor decreases amylin degradation, increases amylin-induced cytotoxicity, and increases amyloid formation in insulinoma cell cultures*. Diabetes, 2003. **52**(9): p. 2315-20.
125. Seta, K.A. and R.A. Roth, *Overexpression of insulin degrading enzyme: cellular localization and effects on insulin signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **231**(1): p. 167-71.
126. Atkinson, M.A., *ADA Outstanding Scientific Achievement Lecture 2004. Thirty years of investigating the autoimmune basis for type 1 diabetes: why can't we prevent or reverse this disease?* Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1253-63.
127. Daaboul, J. and D. Schatz, *Overview of prevention and intervention trials for type 1 diabetes*. Rev Endocr Metab Disord, 2003. **4**(4): p. 317-23.
128. Diabetes Prevention Trial--Type 1 Diabetes Study, G., *Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus*. N Engl J Med, 2002. **346**(22): p. 1685-91.

129. Kahn, S.E., et al., *Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy*. N Engl J Med, 2006. **355**(23): p. 2427-43.
130. Ovalle, F. and D.S. Bell, *Effect of rosiglitazone versus insulin on the pancreatic beta-cell function of subjects with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2004. **27**(11): p. 2585-9.
131. Drucker, D.J., *Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2003. **26**(10): p. 2929-40.
132. Drucker, D.J. and M.A. Nauck, *The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes*. Lancet, 2006. **368**(9548): p. 1696-705.
133. Amori, R.E., J. Lau, and A.G. Pittas, *Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2007. **298**(2): p. 194-206.
134. Paterson, I. and E.A. Anderson, *Chemistry. The renaissance of natural products as drug candidates*. Science, 2005. **310**(5747): p. 451-3.
135. Balunas, M.J. and A.D. Kinghorn, *Drug discovery from medicinal plants*. Life Sci, 2005. **78**(5): p. 431-41.
136. Wang, W., et al., *Identification of small-molecule inducers of pancreatic beta-cell expansion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(5): p. 1427-32.
137. Butler, M.S., *Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials*. Nat Prod Rep, 2005. **22**(2): p. 162-95.
138. Hohmeier, H.E., et al., *Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion*. Diabetes, 2000. **49**(3): p. 424-30.
139. Merglen, A., et al., *Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells*. Endocrinology, 2004. **145**(2): p. 667-78.
140. Bennett, R.G., et al., *Insulin inhibition of the proteasome is dependent on degradation of insulin by insulin-degrading enzyme*. J Endocrinol, 2003. **177**(3): p. 399-405.
141. Harlan, D.M., et al., *Current advances and travails in islet transplantation*. Diabetes, 2009. **58**(10): p. 2175-84.
142. Nath, D.S., et al., *Outcomes of pancreas transplants for patients with type 2 diabetes mellitus*. Clin Transplant, 2005. **19**(6): p. 792-7.
143. Annes, J.P., et al., *Adenosine kinase inhibition selectively promotes rodent and porcine islet beta-cell replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(10): p. 3915-20.
144. Andersson, O., et al., *Adenosine signaling promotes regeneration of pancreatic beta cells in vivo*. Cell Metab, 2012. **15**(6): p. 885-94.
145. Rao, P., et al., *Gene transfer of constitutively active Akt markedly improves human islet transplant outcomes in diabetic severe combined immunodeficient mice*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1664-75.
146. Guthalu Kondegowda, N., et al., *Parathyroid hormone-related protein enhances human ss-cell proliferation and function with associated induction of cyclin-dependent kinase 2 and cyclin E expression*. Diabetes, 2010. **59**(12): p. 3131-8.
147. Davis, D.B., et al., *FoxM1 is up-regulated by obesity and stimulates beta-cell proliferation*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(9): p. 1822-34.
148. Schisler, J.C., et al., *Stimulation of human and rat islet beta-cell proliferation with retention of function by the homeodomain transcription factor Nkx6.1*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(10): p. 3465-76.
149. Chou, D.H., et al., *Small-Molecule Suppressors of Cytokine-Induced beta-Cell Apoptosis*. ACS Chem Biol, 2010. **5**(8): p. 729-34.
150. Barton, F.B., et al., *Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010*. Diabetes Care, 2012. **35**(7): p. 1436-45.

151. Smink, A.M., M.M. Faas, and P. de Vos, *Toward engineering a novel transplantation site for human pancreatic islets*. *Diabetes*, 2013. **62**(5): p. 1357-64.
152. Yanokura, M., et al., *Cell death and cell-cycle arrest induced by incorporation of [3H]thymidine into human haemopoietic cell lines*. *Int J Radiat Biol*, 2000. **76**(3): p. 295-303.
153. Hu, V.W., et al., *3H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis*. *FASEB J*, 2002. **16**(11): p. 1456-7.
154. Vasavada, R.C., et al., *Protein kinase C-zeta activation markedly enhances beta-cell proliferation: an essential role in growth factor mediated beta-cell mitogenesis*. *Diabetes*, 2007. **56**(11): p. 2732-43.
155. Alonso, L.C., et al., *Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication*. *Diabetes*, 2007. **56**(7): p. 1792-801.
156. Cozar-Castellano, I., et al., *Lessons from the first comprehensive molecular characterization of cell cycle control in rodent insulinoma cell lines*. *Diabetes*, 2008. **57**(11): p. 3056-68.
157. Georgia, S., et al., *Cyclin D2 is essential for the compensatory beta-cell hyperplastic response to insulin resistance in rodents*. *Diabetes*, 2010. **59**(4): p. 987-96.
158. Salpeter, S.J., et al., *Glucose regulates cyclin D2 expression in quiescent and replicating pancreatic beta-cells through glycolysis and calcium channels*. *Endocrinology*, 2011. **152**(7): p. 2589-98.
159. Zeng, Q., et al., *Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NFkappa B*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(28): p. 25203-8.
160. Matveyenko, A.V. and P.C. Butler, *Relationship between beta-cell mass and diabetes onset*. *Diabetes Obes Metab*, 2008. **10 Suppl 4**: p. 23-31.
161. Eizirik, D.L., M.L. Colli, and F. Ortis, *The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes*. *Nat Rev Endocrinol*, 2009. **5**(4): p. 219-26.
162. Goldberg, R.B., *Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(9): p. 3171-82.
163. Zhao, Z., et al., *FTY720 normalizes hyperglycemia by stimulating beta-cell in vivo regeneration in db/db mice through regulation of cyclin D3 and p57(KIP2)*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(8): p. 5562-73.
164. Grote, D., H.M. Dahse, and K. Seifert, *Furanocembranoids from the soft corals *Sinularia asterolobata* and *Litophyton arboreum**. *Chem Biodivers*, 2008. **5**(11): p. 2449-56.
165. Weyer, C., et al., *A high fasting plasma insulin concentration predicts type 2 diabetes independent of insulin resistance: evidence for a pathogenic role of relative hyperinsulinemia*. *Diabetes*, 2000. **49**(12): p. 2094-101.
166. Weyer, C., et al., *Exaggerated pancreatic polypeptide secretion in Pima Indians: can an increased parasympathetic drive to the pancreas contribute to hyperinsulinemia, obesity, and diabetes in humans?* *Metabolism*, 2001. **50**(2): p. 223-30.
167. Grarup, N., et al., *Studies of association of variants near the HHEX, CDKN2A/B, and IGF2BP2 genes with type 2 diabetes and impaired insulin release in 10,705 Danish subjects: validation and extension of genome-wide association studies*. *Diabetes*, 2007. **56**(12): p. 3105-11.
168. Pascoe, L., et al., *Common variants of the novel type 2 diabetes genes CDKAL1 and HHEX/IDE are associated with decreased pancreatic beta-cell function*. *Diabetes*, 2007. **56**(12): p. 3101-4.

169. Rudovich, N., et al., *Polymorphisms within insulin-degrading enzyme (IDE) gene determine insulin metabolism and risk of type 2 diabetes*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(11): p. 1145-51.
170. Miller, B.C., et al., *Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulysin activity levels in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 6221-6.
171. Abdul-Hay, S.O., et al., *Deletion of insulin-degrading enzyme elicits antipodal, age-dependent effects on glucose and insulin tolerance*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20818.
172. Authier, F., B.I. Posner, and J.J. Bergeron, *Insulin-degrading enzyme*. Clin Invest Med, 1996. **19**(3): p. 149-60.
173. Cotsapas, C., et al., *Expression analysis of loci associated with type 2 diabetes in human tissues*. Diabetologia, 2010. **53**(11): p. 2334-9.

APÉNDICE

Epoxyypukalide Induces Proliferation and Protects against Cytokine-Mediated Apoptosis in Primary Cultures of Pancreatic β -Cells

José Francisco López-Acosta^{1,2}, José Luis Moreno-Amador², Margarita Jiménez-Palomares², Ana R. Díaz-Marrero³, Mercedes Cueto³, Germán Perdomo², Irene Cózar-Castellano^{1,2*}

1 Instituto de Genética y Biología Molecular (IBGM)-Universidad de Valladolid, Valladolid, Spain, **2** Unidad de Investigación, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, Spain, **3** Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC, La Laguna, Tenerife, Spain

Abstract

There is an urgency to find new treatments for the devastating epidemic of diabetes. Pancreatic β -cells viability and function are impaired in the two most common forms of diabetes, type 1 and type 2. Regeneration of pancreatic β -cells has been proposed as a potential therapy for diabetes. In a preliminary study, we screened a collection of marine products for β -cell proliferation. One unique compound (epoxyypukalide) showed capability to induce β -cell replication in the cell line INS1 832/13 and in primary rat cell cultures. Epoxyypukalide was used to study β -cell proliferation by [³H]thymidine incorporation and BrdU incorporation followed by BrdU/insulin staining in primary cultures of rat islets. AKT and ERK1/2 signalling pathways were analyzed. Cell cycle activators, cyclin D2 and cyclin E, were detected by western-blot. Apoptosis was studied by TUNEL and cleaved caspase 3. β -cell function was measured by glucose-stimulated insulin secretion. Epoxyypukalide induced 2.5-fold increase in β -cell proliferation; this effect was mediated by activation of ERK1/2 signalling pathway and upregulation of the cell cycle activators, cyclin D2 and cyclin E. Interestingly, epoxyypukalide showed protection from basal (40% lower versus control) and cytokine-induced apoptosis (80% lower versus control). Finally, epoxyypukalide did not impair β -cell function when measured by glucose-stimulated insulin secretion. In conclusion, epoxyypukalide induces β -cell proliferation and protects against basal and cytokine-mediated β -cell death in primary cultures of rat islets. These findings may be translated into new treatments for diabetes.

Citation: López-Acosta JF, Moreno-Amador JL, Jiménez-Palomares M, Díaz-Marrero AR, Cueto M, et al. (2013) Epoxyypukalide Induces Proliferation and Protects against Cytokine-Mediated Apoptosis in Primary Cultures of Pancreatic β -Cells. PLoS ONE 8(1): e52862. doi:10.1371/journal.pone.0052862

Editor: Thierry Alquier, CRCHUM-Montreal Diabetes Research Center, Canada

Received: August 24, 2012; **Accepted:** November 23, 2012; **Published:** January 2, 2013

Copyright: © 2013 López-Acosta et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, Spain (PS09/00671 and CP08/00094), Europe-FP7 Marie Curie grant (IRG-247835) and Servicio Andaluz de Salud (PI-0256/2009) The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cozarirene@gmail.com

Introduction

Diabetes is one of the most devastating diseases of our era. The most common forms are type 1 and type 2 diabetes. β -cell mass decreases approximately by 70–100% in type 1 diabetes and up to 65% in type 2 diabetes. Both forms of the disease display increased β -cell apoptosis [1,2].

Finding therapeutic targets and molecules that preserves and/or enhances functional beta-cell mass is essential in the long-term treatment of diabetes. It is known that adult pancreatic β -cells, in rodents and humans, are generated from the proliferation of differentiated beta-cells [3,4]. Some growth factors have been shown to induce β -cell proliferation in vitro and in vivo, among them HGF (hepatocyte growth factor), PL (placental lactogen) and PTHrP (Parathyroid hormone related protein) have also shown enhancement of β -cell survival [5].

Classical signalling pathways involved in beta-cell proliferation comprise PI3K/AKT, ERK1/2, PKC and JAK2/STA5 [5]. Activation of these intracellular effectors ends on the regulation of the proteins that control G1/S interphase of the cell cycle. Among all the proteins that regulate this interphase, pRb is the key checkpoint gatekeeper. The complexes that regulate pRb phos-

phorylation (and its inactivation to allow cell cycle progression) are cdk4/cyclin D and cdk2/cyclinE [6]. Both, cyclin D2 and cyclin E have been found to have a relevant role in several models of β -cell proliferation [5,7,8,9,10,11,12,13], being essential to induce β -cell replication.

Epoxyypukalide was reported by Schmitz group in 1984 by the first time [14], they purified it from the gorgonian *Leptogorgia setacea*. Epoxyypukalide and other furanocembranolides were identified in 2007 by Dorta et al. [15] who searched for marine natural products in benthic species around the Isthmus of Panama. Finally Grote et al. [16] described a group of furanocembranolides isolated from the soft coral *Simularia asterolobata*, being one of them epoxyypukalide. They studied the cytotoxic and anti-proliferative effect of those compounds, reporting that epoxyypukalide did not inhibit HeLa (human epithelial carcinoma) cell proliferation nor produces cytotoxicity in the cell lines L-929 (murine fibrosarcoma) or K-562 (human erythroleukemic cell line) [16].

In the current report, we demonstrate a proliferative effect of epoxyypukalide on primary cultures of rat β -cells, in parallel to a protective effect on β -cell death while preserving β -cell function. Epoxyypukalide-induced β -cell proliferation is mediated by ERK1/

2 activation and targets cyclin D2 and cyclin E. Taken together these data support a potential use of epoxyypukalide in the treatment of diabetes.

Methods

Ethical Approval

Experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Cadiz in accordance with the Guidelines for Care and Use of Mammals in Research (European Commission Directive 86/609/CEE and Spanish Royal Decree 1201/2005).

Cell Culture

INS-1 832/13 cells were grown at 37°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. INS-1 culture medium was RPMI-1640 with 2 mmol/l L-glutamine supplemented with 11 mmol/l D-glucose, 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10 mmol/l HEPES, 1 mmol/l sodium pyruvate, and 50 µmol/l β-mercaptoethanol.

Rat islets were isolated from 2 months old male Wistar rats provided by Animal Production and Experimentation Service (SEPA, University of Cádiz) by a standard procedure and incubated at 37°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. Culture medium was RPMI-1640 with 2 mmol/l L-glutamine supplemented with 5.5 mmol/l D-glucose, 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin.

Proliferation in INS-1 Cells

For the first screening, INS-1 832/13 cells were seeded at a density of 20,000 cells per well in 96-well plates. Natural products were assayed at a final concentration of 0.1 µM in culture medium with 5.5 mM glucose. Proliferation was measured after 24 hours by BrdU kit (Roche, Germany), following manufacturer's instructions.

Proliferation in Rat Islets

Rat islets were isolated and incubated in serum free medium with 0, 0.01, 0.1 and 1 µM epoxyypukalide after an overnight recovery. 24 hours later, 100 IEq (islet equivalent) per well were seeded in 24-well plates with fresh medium without FBS containing [³H]thymidine (1 µCi/well). [³H]thymidine incorporation was measured 24 h later; radioactivity was corrected for protein levels measured by the BCA kit (Thermo Fisher, USA). Results are expressed as percentage of counts per minute incorporated per microgram of protein in control cells (100%).

To determine specific β-cell proliferation, isolated rat islets were treated with medium without serum containing 0.1 µM epoxyypukalide after an overnight recovery. 24 hours later, islets were serum depleted and incubated with 1 µl/ml BrdU (Sigma-Aldrich, USA). Islets were then incubated for 24 hours. Afterwards islets were fixed with Bouins Solution (Sigma-Aldrich, USA) for 1 hour and then with formalin until treated for paraffin blocks. 5 µm sections were stained with rat anti-BrdU antibody (Abcam, UK) and with guinea pig anti-Insulin antibody (Invitrogen, USA). Fluorescence images of the sections were acquired using a Olympus BX40 fluorescence axial microscope. The BrdU-positive nuclei of beta cells and the total nuclei of beta cells were counted manually with the assistance of the ImageJ software. At least 1000 insulin-positive cells for each preparation were counted.

Western-blot

Islets used to study signalling pathways activation (AKT and ERK1/2) were treated for 0, 5, 15 or 30 minutes with 0.1 µM epoxyypulide after overnight recovery from islet isolation.

Islets used to study cell cycle proteins expression were treated for 24 h with 0.1 µM epoxyypukalide after overnight recovery from islet isolation.

After their treatment, islets were washed with PBS (phosphate-buffered saline) and lysed in lysis buffer (125 mM Tris, pH 6.8, 2% SDS, 1 mM DTT and protease/phosphatase inhibitors). The protein lysates were briefly sonicated and centrifuged for 1 minute at the maximum speed. Proteins were measured by Micro BCA kit (Thermo-Fisher, USA), run on a 10% EZ-Run Gel (Fisher Scientific, USA) and then transferred to a PVDF Immobilon-P membrane (Millipore, USA). Blots were incubated with the following antibodies: anti-Phospho-AKT (Ser473) (Cell Signaling, UK), anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling, UK), anti-cyclin D1 (Invitrogen, USA), anti-cyclin D2 (Invitrogen, USA), anti-cyclin D3 (Abcam, UK), anti-cyclin E (Santa Cruz, USA), anti-cdk4 (Abcam, UK), anti-cdk2 (Santa Cruz, USA) or anti-actin (Sigma, USA).

For cleaved caspase 3 western-blot, rat islets were treated with cytokines mix (IL-1β, IFN-γ and TNF-α) 1000 U/mL. Islets were preincubated with epoxyypukalide 0.01, 0.1 and 1 µM for 48 h. Western-blot was performed as described above using anti-cleaved-caspase 3 antibody (Cell Signaling, UK).

Beta-cell Death

5 µm sections obtained as explained above were used for TUNEL-staining. DeadEnd Fluorometric TUNEL System Kit (Promega, USA) was used following manufacturer's instructions. TUNEL-positive/beta-cells were counted and represented as a percentage of total number of beta-cells. Nuclei of beta cells were counted manually with the assistance of the ImageJ software. At least 1000 TUNEL-positive cells for each preparation were counted.

Glucose-stimulated Insulin Secretion and Insulin Content

Secretion assays was performed on treated rat islets and their controls. Islets were plated on cell culture inserts onto 24-well plates at a density of 20 IEq groups in HEPES balanced salt solution (HBSS) (114 mmol/l NaCl, 4.7 mmol/l KCl, 1.2 mmol/l KH₂PO₄, 1.16 mmol/l MgSO₄, 20 mmol/l HEPES, 2.5 mmol/l CaCl₂, 25.5 mmol/l NaHCO₃, and 0.2% bovine serum albumin [essentially fatty acid free], pH 7.2). Islets were washed twice in 1 ml HBSS with 2.2 mmol/l glucose followed by 10 minutes of preincubation in 2 ml of the same buffer. Insulin secretion was stimulated by using static incubation for 30 minutes in 1 ml of the same buffer, followed by 30 minutes of incubation in HBSS containing 22 mmol/l glucose. Secretion samples were measured by ultra-sensitive rat insulin ELISA (Alpco Diagnostics, USA).

20 IEq by triplicate of each condition (control, 0.01, 0.1 and 1 µM epoxyypukalide) were harvested after 24 h treatment. Insulin was extracted using 1 mL of acid-ethanol (70% ethanol and 0.02% HCl). Insulin was measured by rat insulin ELISA.

Statistics

Statistical analyses of data were performed by Student-t test when two conditions were compared and ANOVA when more than two conditions were compared. Data were expressed as mean ± SD. P values <0.05 were considered significant.

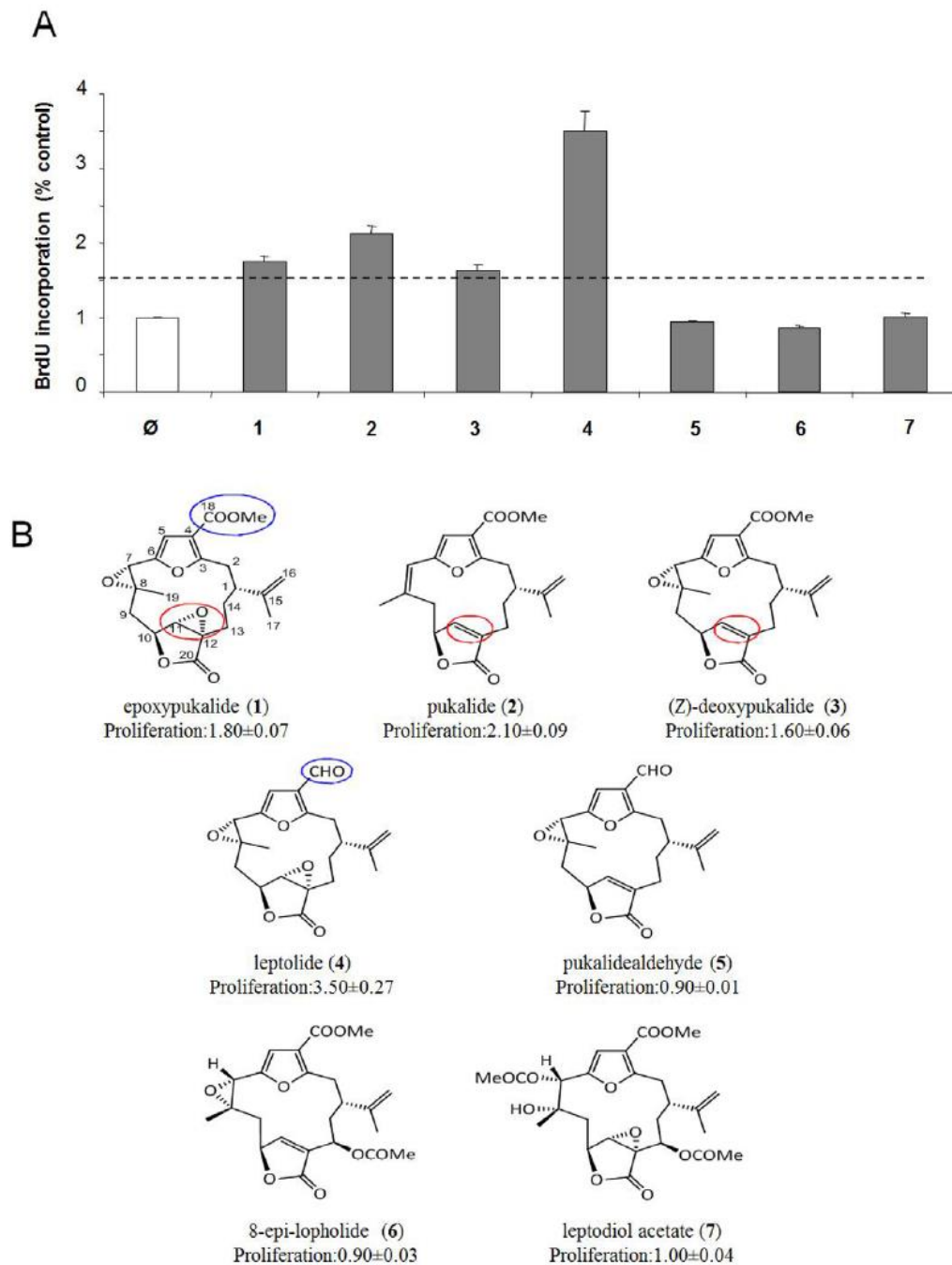


Figure 1. Screening of a collection of marine natural products. INS-1 832/13 cells were preincubated with 0.1 μ M of the seven furanocembranolides (1–7) and proliferation was measured by BrdU incorporation as described in Methods section (N=6). Proliferation was defined as the fold change above untreated cells (1.0) Threshold was over 1.5-fold increase in proliferation (A). Chemical structure of the seven furanocembranolides (B).
doi:10.1371/journal.pone.0052862.g001

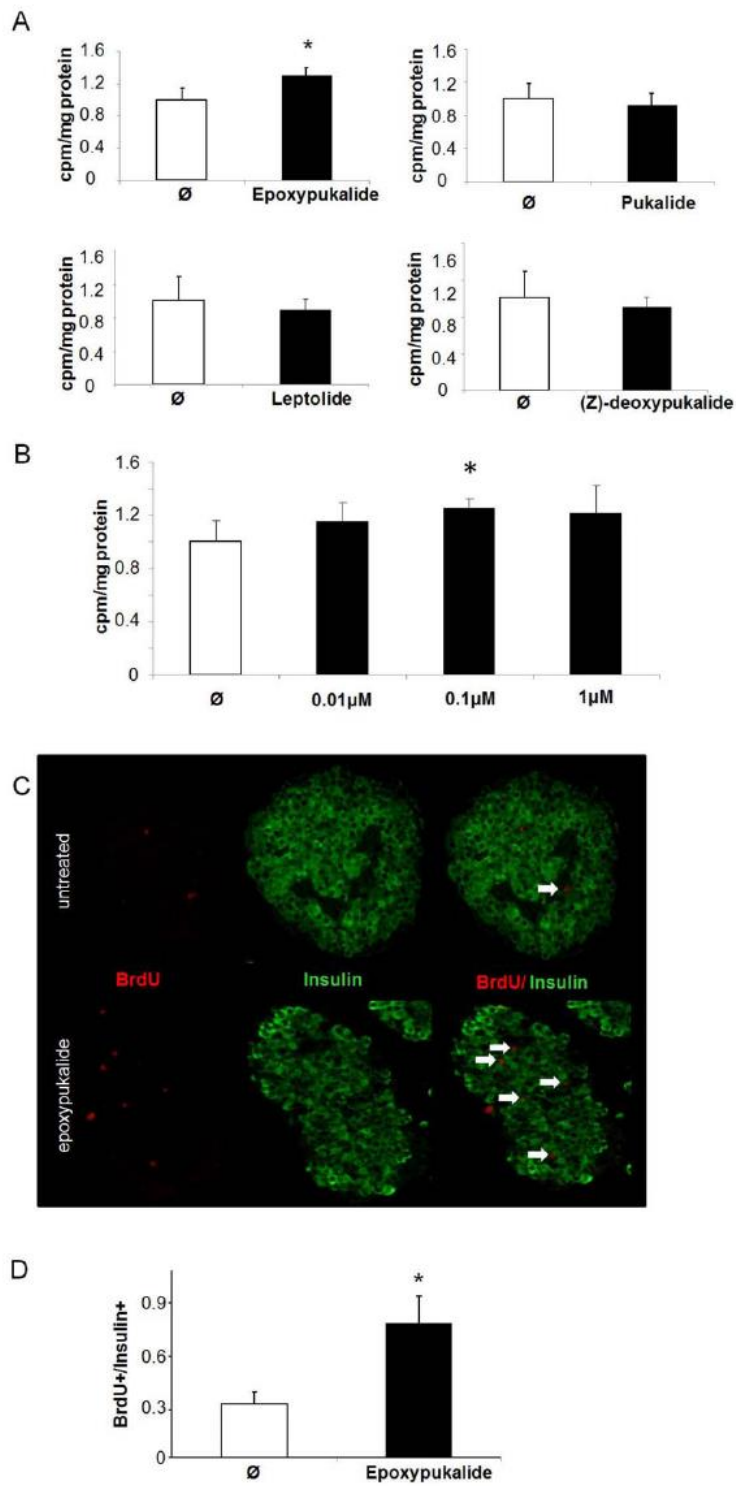


Figure 2. Epoxyypukalide induces β -cell proliferation in primary rat islets. Primary cultures of rat islets were treated with 0.1 μ M epoxyypukalide, pukalide, leptolide, (Z)-deoxyypukalide or vehicle (\emptyset) for 24 h. Cell proliferation was measured by [3 H]thymidine incorporation as described in Methods section (N = 6 in triplicate) (* $p < 0.05$) (A). Dose-dependence experiments to test epoxyypukalide effectiveness in cell proliferation in rat islets (N = 6–12 in triplicate). Proliferation was measured by [3 H]thymidine incorporation (B). Representative pictures of primary islet cell cultures treated with 0.1 μ M epoxyypukalide for 24 h, sections were stained for insulin (green) and BrdU (red). Arrows indicate BrdU-positive β -cells (C). Quantification of the percentage of BrdU-positive β -cells (N = 6) (* $p < 0.05$) (D). doi:10.1371/journal.pone.0052862.g002

Results

Screening of a Collection of Marine Natural Products

Seven furanocembranolides (Figure 1) obtained from the soft coral *Leptogorgia* spp. [15] were screened for induction of β -cell proliferation in the rat cell line INS-1 832/13. This group of compounds was chosen from a larger collection of marine natural products, after a preliminary screening, being the unique group of compounds inducing beta-cell proliferation of the INS1 832/13 cells (data not shown). Cell proliferation was measured using BrdU incorporation. Four products, epoxyypukalide (**1**), pukalide (**2**), (Z)-deoxyypukalide (**3**) and leptolide (**4**), induced β -cell proliferation over the threshold (≥ 1.5 -fold compared to control) (Figure 1).

Epoxyypukalide Induces β -cell Proliferation in Primary Rat Islets

We used isolated rat islets to test ex-vivo the proliferative capability of compounds **1–4**. Proliferation was measured using [3 H]thymidine incorporation. Epoxyypukalide (**1**) showed an increase of 30% in proliferation compared to control, conversely pukalide (**2**), leptolide (**4**) and (Z)-deoxyypukalide (**3**) did not induce proliferation in primary cell cultures (Figure 2A). Then, we performed a dose response evaluation of epoxyypukalide to test cell proliferation, using concentrations from 0.01–1 μ M. Only 0.1 μ M showed a significant increase in cell proliferation (Figure 2B). Thus, for following experiments involving beta-cell proliferation we have used 0.1 μ M epoxyypukalide. As a second approach and in order to measure specific β -cell proliferation, we used BrdU incorporation followed by insulin/BrdU staining to quantify BrdU+insulin+ cells in respect to total insulin+ cells. Epoxyypukalide treatment showed 250% increased β -cell proliferation compared to control cells (Figure 2C, D).

Activation of Signalling Pathways by Epoxyypukalide in Primary Rat Islets

The analysis by western-blot of two of the most relevant signalling pathways involved in β -cell proliferation indicated that epoxyypukalide did not activate AKT pathway (Figure 3A, B), but ERK1/2 was activated within the first 30 minutes after treatment (Figure 3C, D). To determine whether ERK1/2 could mediate the proliferative effect of epoxyypukalide, a specific pharmacological inhibitor of ERK1/2 (PD98059) was used and its effect on epoxyypukalide- β -cell proliferation was examined using [3 H]thymidine incorporation. PD98059 decreased the proliferation induced by epoxyypukalide to basal levels (Figure 3E), showing that this pathway is involved in epoxyypukalide-induced β -cell proliferation.

Epoxyypukalide Induces Expression of Cell Cycle Activators

To further investigate the mechanisms by which epoxyypukalide induces β -cell proliferation, we performed western-blot for the proteins involved in pRb phosphorylation in G1/S (cyclin D1, cyclin D2, cyclin D3, cdk4, cyclin E and cdk2) in rat islets in the presence or absence of epoxyypukalide. Of the six tested proteins, only cyclin D2 and cyclin E were up-regulated, showing ~15%

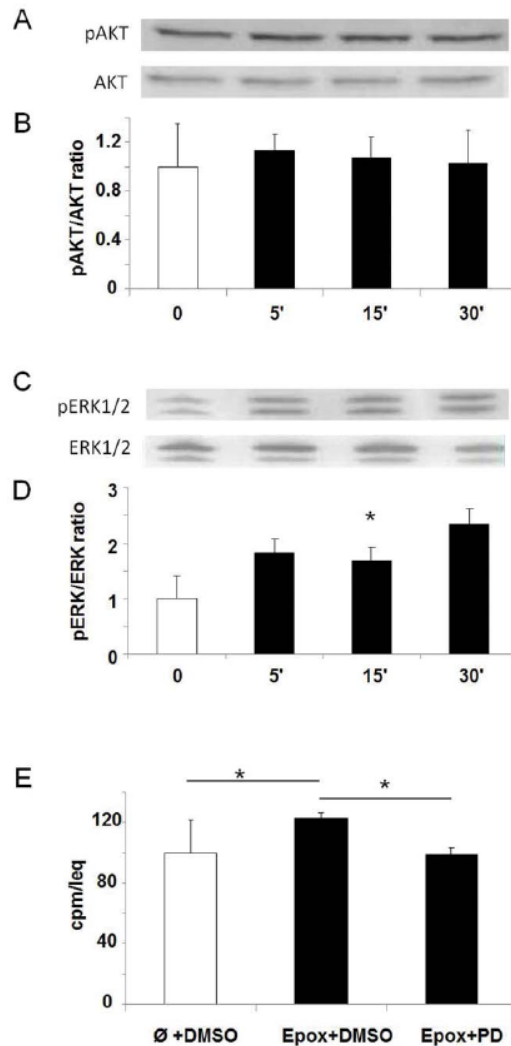


Figure 3. Activation of signalling pathways by epoxyypukalide in primary rat islets. Representative western-blot illustrating the effect of epoxyypukalide on AKT proliferation pathway (A). Quantification of pAKT/AKT western-blot (N = 4) (B). Representative western-blot illustrating activation of ERK1/2 pathway (C). Quantification of pERK/ERK western-blot (N = 4) (D). Cell proliferation was induced with epoxyypukalide (Epoxy) in rat islets pretreated in the presence of PD98059 (PD) (inhibitor of ERK1/2 pathway) or vehicle (DMSO). β -cell proliferation was measured by [3 H]thymidine incorporation assay and compared to control (vehicle-treated islets) (N = 3 in triplicate) (E). (* $p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0052862.g003

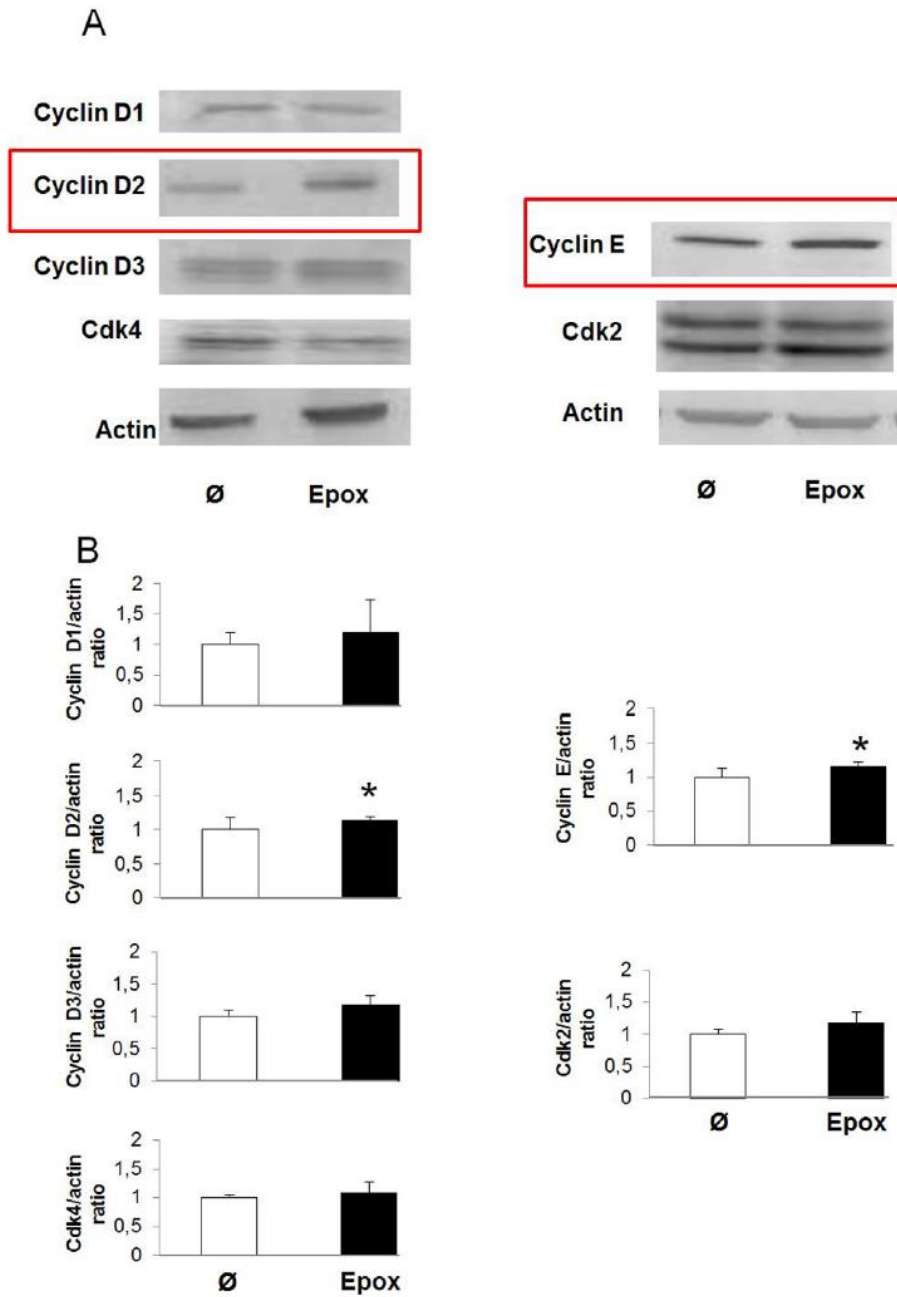


Figure 4. Epoxyypukalide induces expression of cell cycle activators. Primary cultures of rat islets were treated with epoxyypukalide (Epoxy) or vehicle. Representative western-blot of cyclin D1, cyclin D2, cyclin D3, cdk4, cyclin E and cdk2 (A). Densitometric analysis of western-blot (N=3–10) (B). (*p<0.05).
doi:10.1371/journal.pone.0052862.g004

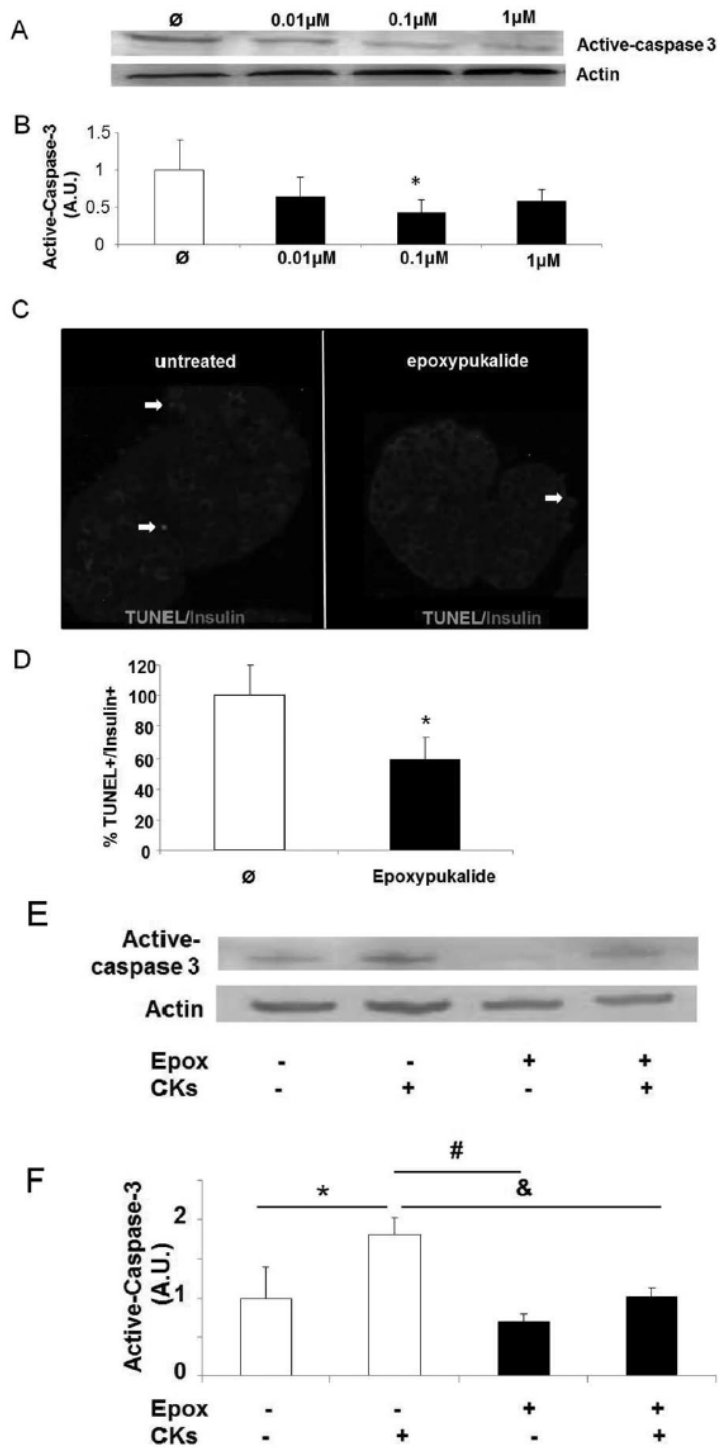


Figure 5. Epoxyypukalide protects basal and cytokine-induced β -cell death. Representative western-blot illustrating cell death protection mediated by epoxyypukalide in a dose-dependent manner (A). Densitometric analysis of western-blot (N = 4) (B). Representative pictures of primary cultures of rat islets treated with epoxyypukalide (Epoxy) for 24 h, sections were stained for insulin (red) and TUNEL (green) and arrows indicate TUNEL-positive β -cells (C). Quantification of the percentage of TUNEL-positive β -cells (N=6) (D). Representative western-blot illustrating the prosurvival effect of epoxyypukalide (E). Densitometric analysis of western-blot (N=5) (F). (#,&,*p<0.05). doi:10.1371/journal.pone.0052862.g005

more expression in epoxyypukalide-treated islets compared to control islets (Figure 4A, B).

Epoxyypukalide Protects Basal and Cytokine-induced β -cell Death

To investigate the effects of epoxyypukalide on β -cell survival, we performed a dose response evaluation of epoxyypukalide, using concentrations from 0.01–1 μ M. We tested cell death using caspase 3 activation detected by western-blot. Only 0.1 μ M showed a significant decrease in cell death (Figure 5A, B), thus, for following experiments involving beta-cell death we have used 0.1 μ M. To confirm epoxyypukalide effect on beta-cell death we performed TUNEL/insulin staining on sections of rat islets that were previously exposed to epoxyypukalide and their untreated control. After quantification of TUNEL+insulin+ cells, we

detected 40% lower basal β -cell death in epoxyypukalide treated islets than in control islets (Figure 5C, D). To test epoxyypukalide-protective effect in conditions of stress for the pancreatic islets, we treated rat islets with cytokines (CK), in the presence or absence of epoxyypukalide, and we determined activation of the apoptotic pathway using caspase-3 activation. Islets treated with CK showed 80% increase in cleaved-caspase 3 compared to control, this effect was reverted when islets were treated with 0.1 μ M epoxyypukalide (Figure 5E, F).

Epoxyypukalide does not Impair β -cell Function

Finally, we tested whether epoxyypukalide alters β -cell function. To this end we performed glucose-stimulated insulin secretion on epoxyypukalide-treated rat islets to check for β -cell function in vitro. Insulin secretion after glucose overload was completely

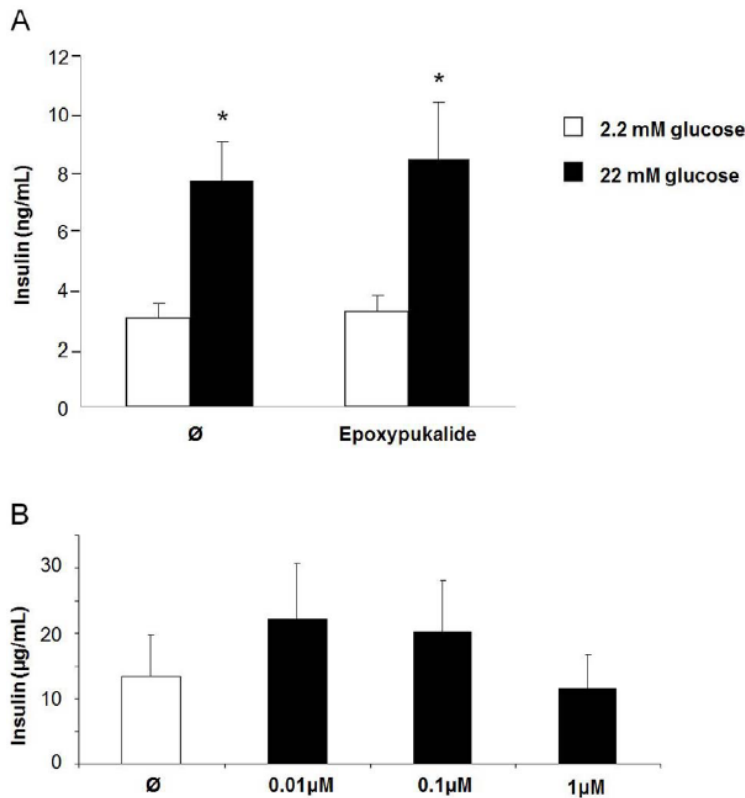


Figure 6. Epoxyypukalide does not impair β -cell function. Glucose-stimulated insulin secretion was performed in 0.1 μ M epoxyypukalide- or vehicle-treated rat islets as described in Methods section. 5.5 mM glucose (white bar) and 22 mmol/L glucose (black bar). Experiments were performed in triplicate (N = 9) (A). Insulin content was measured in islets treated with different concentrations of epoxyypukalide (0.01–1 μ M) (N = 5 in triplicate) (B) (*p<0.05). doi:10.1371/journal.pone.0052862.g006

normal (Figure 6A). Furthermore we have measured insulin content in control islets and epoxyypukalide-treated islets, finding that there are not significant differences between epoxyypukalide-treated and control islets (Figure 6B). Both results support that there is not deleterious effect of epoxyypukalide on β -cell function.

Discussion

Search for new molecules to preserve functional β -cell mass is important for diabetes. Research groups and pharmaceutical companies are involved in the chase of new molecules that can induce β -cell proliferation and/or enhance β -cell survival; their searches are based on the detection of activation of signalling pathways involved in β -cell death or β -cell proliferation [17,18]. The interaction between chemists that purify and identify new compounds and biologists who test their function is essential for the discovery of new treatments.

Accordingly to the structures of compounds 1–4 and the proliferation results, it can be observed that although they possess the same carbon skeleton, differences in their functionalizations are critical to induce proliferation in primary cell cultures. From comparison of epoxyypukalide (1) and leptolide (4) it can be deduced that the presence of a methyl ester instead of the aldehyde group at C-18 is a key to the potency of furanocembranolides. Also from the observation of epoxyypukalide (1), pukalide (2) and (Z)-deoxyypukalide (3) it can be deduced that epoxydation, especially at C-11–C-12, is crucial to show proliferative activity in primary cell cultures.

From the dose-dependence studies we have learned that 0.1 μ M is the optimal concentration to induce beta-cell proliferation and to inhibit beta-cell death. This should be the reference concentration to design *in vivo* experiments in rodents.

Two of the most relevant pathways involved in β -cell proliferation (AKT and ERK1/2) were studied. Analysis of these two pathways indicated that epoxyypukalide did activate ERK1/2 pathway. Some growth factors have shown to induce β -cell proliferation through ERK1/2 signalling including HGF [19], insulin and IGF1 (insulin growth factor-1) [5].

It has been shown that G1/S interphase is essential in the regulation of β -cell cycle proliferation. Cyclin D2 and E, individually, have been shown previously to induce β -cell replication under the stimulus of several mitogens including high glucose, GH (growth hormone), PRL (prolactin) and PTHrP

[5,7,8,9,10,11,12,13]. Cyclin D2 joins to cdk4 and cyclin E to cdk2 maintaining pRb phosphorylation in different residues. We can argue that since both cyclins are upregulated by epoxyypukalide, it induces a synergistic effect responsible to maintain beta-cell proliferation, even though their expression levels increase modestly.

CK (cytokine)-induced β -cell apoptosis is a hallmark of diabetes [1,20,21,22]. Our experiments showed epoxyypukalide protects β -cells from basal and CK-induced apoptosis. Other small molecules have shown similar effects on protection of CK-induced β -cell apoptosis [18], but their proliferative capability was not tested. It is important to expand β -cell mass in order to have an efficient control of glucose homeostasis in diabetes. In support of this notion, Zhao et al. showed that diabetic mice (leptin receptor null-db/db) treated with a sphingosine 1-phosphate receptor modulator (FTY720) counteracted hyperglycemia by induction of β -cell proliferation and β -cell mass expansion [23].

Increased β -cell proliferation may involve loss of differentiation and cell function failure. Thus, we performed glucose-stimulated insulin secretion on epoxyypukalide-treated rat islets to check for β -cell function *in vitro*. Insulin production and secretion after glucose overload was completely normal, meaning that there is not deleterious effect of epoxyypukalide on β -cell function. This is important in order of a possible use of this compound in the treatment of diabetes. In this direction, Grote et al. showed that epoxyypukalide was not cytotoxic for L-929 (murine fibrosarcoma) or K-562 (human erythroleukemic cell line) [16]. Their results sustain that epoxyypukalide has not adverse effects on other cell types.

In conclusion, our study supports that epoxyypukalide is a potential drug for the treatment of diabetes, further work is granted in order to study its *in vivo* effects.

Acknowledgments

We thank Dr. Christopher Newgard for sharing the INS-1 832/13 clone.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JFLA GP ICC. Performed the experiments: JFLA JL MA MJP. Analyzed the data: JFLA JIMA MJP GP ICC. Contributed reagents/materials/analysis tools: AR DM MC. Wrote the paper: JFLA ICC.

References

- Matveyenko AV, Butler PC (2008) Relationship between beta-cell mass and diabetes onset. *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4: 23–31.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, et al. (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 102–110.
- Dor Y, Brown J, Martínez OI, Melton DA (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429: 41–46.
- Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, et al. (2008) Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57: 1584–1594.
- Vasavada RC, Gonzalez-Pertusa JA, Fujinaka Y, Fiaschi-Taesch N, Cozar-Castellano I, et al. (2006) Growth factors and beta cell replication. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 931–950.
- Cozar-Castellano I, Fiaschi-Taesch N, Bigatel TA, Takane KK, Garcia-Ocana A, et al. (2006) Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic beta-cell. *Endocr Rev* 27: 356–370.
- Alonso LC, Yokoe T, Zhang P, Scott DK, Kim SK, et al. (2007) Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication. *Diabetes* 56: 1792–1801.
- Cozar-Castellano I, Harb G, Selk K, Takane K, Vasavada R, et al. (2008) Lessons from the first comprehensive molecular characterization of cell cycle control in rodent insulinoma cell lines. *Diabetes* 57: 3056–3068.
- Fiaschi-Taesch NM, Salim F, Kleinberger J, Troxell R, Cozar-Castellano I, et al. (2010) Induction of human beta-cell proliferation and engraftment using a single G1/S regulatory molecule, cdk6. *Diabetes* 59: 1926–1936.
- Georgia S, Hinault C, Kawamori D, Hu J, Meyer J, et al. (2010) Cyclin D2 is essential for the compensatory beta-cell hyperplastic response to insulin resistance in rodents. *Diabetes* 59: 987–996.
- Guthalu Kondegowda N, Joshi-Gokhale S, Harb G, Williams K, Zhang XY, et al. (2010) Parathyroid hormone-related protein enhances human β -cell proliferation and function with associated induction of cyclin-dependent kinase 2 and cyclin E expression. *Diabetes* 59: 3131–3138.
- Salpeter SJ, Klochendler A, Weinberg-Corem N, Porat S, Granot Z, et al. (2011) Glucose regulates cyclin D2 expression in quiescent and replicating pancreatic beta-cells through glycolysis and calcium channels. *Endocrinology* 152: 2589–2598.
- Yang Q, Yamagata K, Fukui K, Cao Y, Nammo T, et al. (2002) Hepatocyte nuclear factor-1 α modulates pancreatic beta-cell growth by regulating the expression of insulin-like growth factor-1 in INS-1 cells. *Diabetes* 51: 1785–1792.
- Ksehati MB, Ciereszko LS, Schmitz FJ (1984) 11 beta, 12 beta-Epoxyypukalide, a furanocembranolide from the gorgonian *Leptogorgia setacea*. *J Nat Prod* 47: 1009–1012.
- Dorta E, DÁ-az-Marrero AR, Brito I, Cueto M, D'Croz L, et al. (2007) The oxidation profile at C-18 of furanocembranolides may provide a taxonomical marker for several genera of octocorals. *Tetrahedron* 63: 9057–9062.

Epoxykavalide and Pancreatic Beta-Cells

16. Grote D, Dahse HM, Seifert K (2008) Furanocembranoids from the soft corals *Sinularia asterolobata* and *Litophyton arboreum*. *Chem Biodivers* 5: 2449–2456.
17. Wang W, Walker JR, Wang X, Tremblay MS, Lee JW, et al. (2009) Identification of small-molecule inducers of pancreatic beta-cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1427–1432.
18. Chou DH, Bodycombe NE, Carrinski HA, Lewis TA, Clemons PA, et al. (2010) Small-Molecule Suppressors of Cytokine-Induced beta-Cell Apoptosis. *ACS Chem Biol* 5: 729–734.
19. Vasavada RC, Wang L, Fujinaka Y, Takane KK, Rosa TC, et al. (2007) Protein kinase C-zeta activation markedly enhances beta-cell proliferation: an essential role in growth factor mediated beta-cell mitogenesis. *Diabetes* 56: 2732–2743.
20. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F (2009) The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 5: 219–226.
21. Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, Singh J, Alaveras A, et al. (2006) Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 1084: 89–117.
22. Goldberg RB (2009) Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 3171–3182.
23. Zhao Z, Choi J, Zhao C, Ma ZA (2012) FTY720 Normalizes Hyperglycemia by Stimulating beta-Cell in Vivo Regeneration in db/db Mice through Regulation of Cyclin D3 and p57KIP2. *J Biol Chem* 287: 5562–5573.